



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INFORME DE PRACTICA DE ESPECIALIDAD**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA LUZ SOBRE LA PROPAGACIÓN MASIVA DE  
*Sinningia speciosa* VÍA ORGANOGÉNESIS**

**RANDALL PACHECO VÁSQUEZ**

**CARTAGO, 2001**

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INFORME DE PRACTICA DE ESPECIALIDAD**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA LUZ SOBRE LA PROPAGACIÓN MASIVA DE  
*Sinningia speciosa* VÍA ORGANOGÉNESIS**

**TEC**

---

**RANDALL PACHECO VÁSQUEZ**

**CARTAGO, 2001**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA LUZ SOBRE LA PROPAGACIÓN MASIVA DE  
*Sinningia speciosa* VÍA ORGANOGÉNESIS**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

**Miembros del Tribunal**

---

**Lic. Jaime Brenes Madríz,  
Profesor Guía**

---

**MSc. Vilma Jiménez,  
Lectora**

---

**MSc. Silvana Alvarenga,  
Lectora**

# EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA LUZ SOBRE LA PROPAGACIÓN MASIVA DE *Sinningia speciosa* VÍA ORGANOGÉNESIS

Randall Pacheco Vásquez <sup>Ω</sup>

## RESUMEN

La producción vía organogénesis en gloxinias (*Sinningia speciosa*) se evaluó a partir del efecto de tres condiciones de luz (directa, difusa y oscuridad) en un medio Murashige y Skoog (M&S, 1962) modificado. La mayor formación de plántulas se presentó en el tratamiento a la luz difusa, con el cual se logró establecer un protocolo de producción rápido y masivo.

Las variables evaluadas fueron analizadas a las 3 y 8 semanas de cultivo *in vitro*, determinando así las mejores condiciones de luminosidad para la producción de gloxinia. Todos los resultados se determinaron a través del conteo del número total por tratamiento y promedio por frasco de plántulas obtenidas, así como por un modelo estadístico basado en análisis de varianza y pruebas de Tukey para la comparación de medias.

**Palabras clave:** organogénesis / micropropagación / gloxinia / *Sinningia speciosa* / *in vitro* / luz.

---

<sup>Ω</sup> Informe de Práctica de Especialidad, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2001.

# EVALUATION OF LUMINOSITY EFFECT ON *Sinningia speciosa* CLONAL PROPAGATION VIA ORGAN GENESIS

Randall Pacheco Vásquez <sup>Ω</sup>

## ABSTRACT

Gloxinias`(*Sinningia speciosa*) production via organ genesis was evaluate from the effect of three luminosity conditions (direct, diffuse and darkness) on a Murashige and Skoog modified media (M&S, 1962). The biggest number of plants was obtained in the diffuse luminosity treatment, this treatment established a fast and massive production protocol.

Evaluation was realized on 3<sup>rd</sup> and 8<sup>th</sup> weeks of *in vitro* culture, to determinate the best luminosity conditions to produce gloxinia. Resultants was determinate from simple count of plants by treatments, and by variance analysis and Tukey probes for statistic medias.

**Keywords:** organ genesis / micropropagation / gloxinia / *Sinningia speciosa* / *in vitro* / luminosity.

---

<sup>Ω</sup> Informe de Práctica de Especialidad, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2001.

## **DEDICATORIA**

A Dios por todas las bendiciones  
derramadas sobre mi familia y sobre  
mi carrera, Gracias Barbas!

A Viviana y a Mauricio por su  
incondicionalidad y por haberle  
agregado a mi vida más felicidad,  
Los Amo.

A mis padres y hermanos por todo  
el apoyo sin titubeos durante todos los  
años de mis estudios, Los Amo.

A mis amigos de la carrera por su  
apoyo y amistad. Gracias.

## AGRADECIMIENTOS

Deseo dejar constancia de mi agradecimiento a los siguientes organismos y personas, por su colaboración en el presente trabajo:

A Plantaciones Exóticas S.A., por la oportunidad y el apoyo financiero que me brindaron para la realización del proyecto.

A Hellen Jiménez por su valiosa ayuda y paciencia durante el tiempo en que fuimos compañeros de laboratorio.

A mi profesor asesor y amigo, Lic. Jaime Brenes M., así como a mis profesoras lectoras por la comprensión, orientación y ayuda durante la realización de la práctica.

A Vivi y a Mao por su apoyo, ayuda y sobretodo por su paciencia y amor, por enseñarme lo valiosos que son en mi vida y que sin ustedes no podría estar donde estoy. Gracias de corazón, ¡Los Amo con toda mi alma!

A Mami por todas sus enseñanzas morales, religiosas y familiares; a mi Padre por sus excelentes ejemplos de esfuerzo, superación y por enseñarme que un padre es también un amigo y un compañero y que la familia es lo único valioso en la vida.

A Cindy por sus sacrificios para conmigo y mi familia. ¡Éxitos mi hermanilla, sé muy bien que te irá excelente en la vida!

A los gemelos (Oscar y Luis) por ser los mejores hermanos del mundo, ¡nunca se separen y apóyense uno a otro!

A mis compañeros y amigos por su apoyo y por el valor que le dieron al concepto de amistad. ¡Gracias!

A todos los profesores del Tec que de una u otra forma ayudaron a mi formación profesional y personal.

## INDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>6</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>7</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
Objetivo General: .....	12
Objetivos específicos: .....	12
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
Taxonomía.....	13
Antecedentes .....	13
Actualidad .....	14
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
Localización del ensayo .....	17
Descripción del material experimental.....	17
Tratamientos evaluados.....	18
Análisis de datos.....	18
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
- Efecto de la luz directa.....	19
- Efecto de la luz indirecta o difusa.....	22
- Efecto de la oscuridad.....	24
- Comparación entre tratamientos .....	26
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
- Efecto de la luz directa.....	29
- Efecto de la luz difusa.....	32
- Efecto de la oscuridad.....	34
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>36</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>37</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>38</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>40</b>
ANEXO 1 .....	40
ANEXO 2.....	41



## INDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Principales estadios de desarrollo de una plántula obtenida por organogénesis. ....	19
<b>Figura 2.</b> Plántula de <i>Sinningia speciosa</i> obtenida por organogénesis en el tratamiento bajo luz directa. ....	20
<b>Figura 3.</b> Plántulas de <i>Sinningia speciosa</i> obtenidas por microtuberización en el tratamiento bajo oscuridad.....	24
<b>Figura 4.</b> Promedio de plántulas de <i>Gloxinia</i> spp. obtenidas por frasco por medio de organogénesis, a las 8 semanas de cultivadas. ....	27
<b>Figura 5.</b> Comparación luego de 8 semanas de observación, entre los distintos tratamientos, en la sumatoria total de plántulas obtenidas por organogénesis en hojas de <i>Gloxinia</i> spp. <i>in vitro</i> .....	28
<b>Figura 6.</b> Plántulas etioladas de <i>Sinningia speciosa</i> obtenidas por organogénesis en el tratamiento bajo oscuridad.....	34

## INDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
Cuadro 1. Comparación del número de plántulas obtenidas por organogénesis en hojas de <i>Gloxinia</i> spp. <i>in vitro</i> a las 3 semanas de exposición a la luz directa, Plantaciones Exóticas S.A. 2 001.....	20
Cuadro 2. Comparación del número de plántulas obtenidas por organogénesis en hojas de <i>Gloxinia</i> spp. <i>in vitro</i> a las 8 semanas de exposición a la luz directa, Plantaciones Exóticas S.A. 2 001.....	21
Cuadro 3. Comparación del número de plántulas obtenidas por organogénesis en hojas de <i>Gloxinia</i> spp. <i>in vitro</i> a las 3 semanas de exposición a la luz difusa, Plantaciones Exóticas S.A. 2 001.....	22
Cuadro 4. Comparación del número de plántulas obtenidas por organogénesis en hojas de <i>Gloxinia</i> spp. <i>in vitro</i> a las 8 semanas de exposición a la luz difusa, Plantaciones Exóticas S.A. 2 001.....	23
Cuadro 5. Comparación del número de plántulas obtenidas por organogénesis en hojas de <i>Gloxinia</i> spp. <i>in vitro</i> a las 4 semanas de exposición a la oscuridad, Plantaciones Exóticas S.A. 2 001.....	25
Cuadro 6. Comparación del número de plántulas obtenidas por organogénesis en hojas de <i>Gloxinia</i> spp. <i>in vitro</i> a las 8 semanas de exposición a la oscuridad, Plantaciones Exóticas S.A. 2 001.....	25
Cuadro 7. Comparación luego de 8 semanas de observación, entre los distintos tratamientos, en el proceso de organogénesis en hojas de <i>Gloxinia</i> spp. <i>in vitro</i> , Plantaciones Exóticas S.A. 2 001.....	26
Cuadro 8. Composición del medio de cultivo empleado, M&S (1962) modificado.....	41

## INTRODUCCIÓN

Por ser Costa Rica un país tropical y con una gran diversidad de ambientes y climas, es posible encontrar tanto especies endémicas como exóticas, inclusive de otras regiones del continente. Dentro de la riqueza vegetal exótica existente en nuestro país, se encuentra una planta ornamental que se ha logrado adaptar muy bien, no sólo a nuestro ambiente, sino también al comercio y a las producciones a gran escala, ésta ornamental es conocida como gloxinia (*Sinningia speciosa*).

Las gloxinias son ornamentales suculentas de gran belleza floreal, son especies originarias de Brasil, y miembros de la familia de las Gesneriáceas, a la que la violeta africana también pertenece.

El sector ornamental, representado por plantas de follajes y flores, ha tenido un desarrollo expansivo en las últimas décadas. Éste desarrollo se ha debido a la gran demanda de nuestros productos en los diferentes mercados como Estados Unidos, Japón y Europa, mercados que son altamente demandantes en calidad y que han sido los principales destinos de exportación de ornamentales de Costa Rica.

La demanda por estas plantas se ha incrementado y con ello la necesidad de las empresas de producir masivamente plantas de una excelente calidad. De hecho, las exportaciones del sector agrícola durante el año 2000 en Costa Rica, ascendieron a \$1270,9 millones, de los cuales el 63% corresponde a frutas y vegetales; un 25% a café, té y otras especias, y el restante **11%** a plantas, flores y follajes (Procomer, 2001).

Es por ello que se hace necesaria la producción de especies como la gloxinia, de una manera intensiva e industrial; esto con el fin de ofrecer una mayor cantidad y variedad de éstas a los interesados y de producir con menos costos y mayor eficiencia; de hecho, el objetivo de éste trabajo nace a partir de la gran demanda de ésta especie, demanda que podrá ser suplida al implementar técnicas *in vitro* más eficientes y rápidas, como lo es la propagación masiva o micropropagación clonal.

El presente proyecto pretendió establecer un protocolo *in vitro* de producción de gloxinias, con el fin de obtener una cantidad de plántulas *in vitro* a gran escala y a corto plazo, así como dar a conocer el éxito de la técnica utilizada para la especie en cuestión.

## OBJETIVOS

### **Objetivo General:**

- Establecer un protocolo *in vitro* de producción de gloxinias, con el fin de obtener una cantidad de plántulas *in vitro* a gran escala y a corto plazo.

### **Objetivos específicos:**

- Obtener un aproximado de 3000 plántulas *in vitro* en un periodo de 5 meses.
- Reconocer la eficiencia del proceso productivo de la micropropagación clonal *in vitro*.
- Proveer a las empresas e instituciones de una fuente rápida y eficiente de vitroplantas de *Gloxinias* spp.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### *Sinningia speciosa* (Gloxinia).

#### **Taxonomía**

*Reino:* Plantae

*Filo:* Magnoliophyta

*Clase:* Magnoliopsida –

Dicotiledóneas

*Orden:* Scrophulariales

*Familia:* Gesneriaceae

*Género:* ***Sinningia***

*Especie:* ***speciosa***



#### **Antecedentes**

Las “Gloxinias” (*Sinningia speciosa*) también llamadas "Gloxinia de floricultor," no son una gloxinia verdadera del todo, ya que las verdaderas gloxinias no producen tubérculos mientras que las Sinningias si lo hacen. La gloxinia de floricultor es una planta perenne herbácea y un miembro de la familia de las Gesneriáceas, a la que la violeta africana popular también pertenece. Dicha familia es nativa de Brasil (Morley, 1999).

Las gloxinias están entre las plantas que son crecidas durante la primavera y verano, aunque con un manejo apropiado, es posible producir plantas florecientes a lo largo de todo el año. Sus flores aterciopeladas, campanudas promedian más de 3 pulgadas de diámetro. Cada flor se despliega en un pétalo largo. Su rango de color es muy amplio, y abarca blanco, rosa, rojo, azul y púrpura. A la vez, también pueden ser de dos tonos, con los centros o los márgenes blancos. Hay plantas florecientes simples y solas, con los bordes del pétalo plano u ondulado, su follaje es oblongo, elegante y aterciopelado como sus flores (Morley, 1999).

## **Actualidad**

Debido a la gran producción y comercialización de plantas ornamentales que existe hoy en día, tanto en los mercados nacionales como internacionales, es que se hace necesario optimizar las fuentes de producción de las mismas; las gloxinias son un claro ejemplo de estos tipos de plantas y el mejoramiento de las técnicas de producción y comercialización, requieren ser modificados. La *Sinningia speciosa* presenta una gran demanda, la cual puede ser suplida o complementada en las empresas dedicadas a los cultivos ornamentales, al implementar las técnicas del cultivo *in vitro*, como lo es la micropropagación clonal. En general, las técnicas *in vitro* consisten en el cultivo aséptico de tejidos vegetales mediante condiciones artificiales de crecimiento y desarrollo.

Una de esas técnicas es la micropropagación clonal, la cual consiste en la producción y desarrollo de plántulas clonales *in vitro* a partir de explantes asépticos, ya sea vegetativos o sexuales. Este proceso se produce con cierta facilidad en laboratorios especializados en casi todo el mundo, presentándose en más de 60 familias de plantas, algunas de ellas como las compuestas, crucíferas, cucurbitáceas, gramíneas, rosáceas, leguminosas, palmáceas, etc. (López y Perán, 2000).

La micropropagación clonal ha llegado a significar una excelente vía de solución a muchos de los problemas del sector ornamental, tales como la baja y lenta tasa de multiplicación, así como la gran heterogeneidad obtenidas por las técnicas de propagación convencionales; permitiendo así producciones casi inmediatas de grandes cantidades de plantas de calidad, con las mejores características y homogeneidad.

Haberland en 1902 citado por CIAT (1991), postuló su enunciado de totipotencialidad celular; y uno de los alcances de éste postulado fue el nacimiento de una técnica de cultivo *in vitro* muy usada y exitosa, la micropropagación clonal, técnica que tiene sus orígenes en la teoría de 1902, aprovechando así la capacidad de las células vegetales de poder llegar a formar plantas completas por medio de su organización paulatina en tejidos, órganos, etc. llamado éste proceso Organogénesis; esto debido a la facilidad de las células a desdiferenciarse o perder su especialización.

La técnica de micropropagación permite la multiplicación masiva, en un tiempo corto y en un espacio reducido, de variedades e individuos con características élite de alta demanda y apreciabilidad en el mercado de ornamentales; traducéndose así, en bajos costos de producción y de mantenimiento y por supuesto en obtención de plantas homogéneas y libres de patógenos.

Originalmente la gloxinia ha sido multiplicada por semilla, tubérculos o vegetativamente por medio de hojas o tallos, sin grandes éxitos en la obtención masiva de ésta especie, es así como la necesidad de mantener líneas homogéneas y producir altos volúmenes ha impulsado la búsqueda y desarrollo de métodos más eficientes para reproducirlas y comercializarlas (Alvarenga y Abdelnour, 1999).

Según Abdelnour y Vincent (1994), la micropropagación ha logrado excelente aceptación en el sector industrial y es practicada tanto en especies hortícolas como en ornamentales, además de presentar importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de reproducción tales como, un mayor número de plantas obtenidas, reducción significativa en el tiempo de multiplicación, un mejor control sanitario de los materiales, entre otras. A la vez, ésta técnica permite una gran versatilidad en el uso de diversos explantes para la obtención de un número teóricamente ilimitado de plantas, tal es el caso del uso de ápices radiculares y caulinares, hipocótilos, pecíolos, pedúnculos, hojas jóvenes y en general tejidos y órganos con características embrionarias, meristemáticas o reproductivas (embriones e inflorescencias inmaduras, trozos de escutelo, nucela y endospermo, óvulos y tejido ovárico) (López y Perán, 2000).

En el caso del cultivo de hojas, éstas han sido usadas para la propagación masiva *in vitro* del cafeto con el fin de obtener embriones somáticos vía callogénesis; también se han hecho experimentos con segmentos de hojas de violeta africana para obtener brotes y posteriormente enraizarlos para una clonación rápida, así como en banano, piña, orquídeas, claveles, begonias, gerberas e innumerables especies tanto de interés agronómico como ornamental (Hurtado y Merino, 1987). Específicamente en plantas ornamentales y algunas herbáceas se utiliza la propagación *in vitro* a nivel industrial para satisfacer la demanda de muchos países; algunos de los países que optan por ésta técnica se ubican principalmente en Europa, Estados Unidos, Latinoamérica y Asia (Navarro y Perea, 1996).

Dentro de los primeros ensayos conseguidos a cerca de ésta teoría se encuentran los de Reinert en 1958 y Steward *et al*, en 1958; donde ambos lograron producir plántulas enteras a partir de raíces de zanahoria. Hoy en día se pueden encontrar cientos de ensayos referentes al tema con distintas especies, los cuales refuerzan tanto la teoría de totipotencia como la técnica de micropropagación, éste último como un procedimiento ágil y eficaz en la obtención de plantas élite con poca variación (Abdelnour y Vincent, 1994).

Un modelo reciente de micropropagación clonal exitosa lo presenta un ensayo realizado con *Nicotiana tabacum* var. Xanthi, *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana*; en el cual se obtuvo un éxito total en el cultivo de las plantas mencionadas, además de lograr su adaptación dentro de la tecnología de transformación de plantas mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Fernández, 1996).

Otro ejemplo lo manifiesta la propagación de *Obregonia denegri*. La *Obregonia denegri* es una cactácea en peligro de extinción cuyas posibilidades reproductivas están muy limitadas. En dicho ensayo, al desarrollar la metodología se logró producir plantas viables y resistentes al trasplante al campo, a partir de brotes producidos *in vitro* (Xochitl y Barrera, 1997).

Cabe aclarar, que luego de agotar todas la fuentes bibliográficas, no se logró obtener información de ensayos realizados con la técnica en cuestión sobre la especie ornamental *Sinningia speciosa*.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización del ensayo

El experimento se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la empresa Plantaciones Exóticas S.A., ubicada en Concepción de Tres Ríos, provincia de Cartago.

### Descripción del material experimental

Se tomaron frascos de gloxinia *in vitro* conteniendo aproximadamente 12 plántulas cada uno. Dichos frascos se llevaron a la cámara de flujo y se les extrajeron las plántulas, a cada una de éstas se les cortó las hojas grandes y medianas, con un área aproximada de  $1 \text{ cm}^2$ .

Las hojas se sembraron por su parte adaxial en un medio de cultivo M&S (1962) modificado con  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de 6-BAP,  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$  de 2iP,  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  de AIA,  $0.2 \text{ mgL}^{-1}$  de tiamina,  $100 \text{ mgL}^{-1}$  de Myo-inositol,  $1.8 \text{ gL}^{-1}$  de Phytigel y  $30 \text{ gL}^{-1}$  de Sacarosa, pH 6 y en condiciones de oscuridad, luz difusa y luz directa; por un tiempo de 6 a 8 semanas, durante el cual se realizaron evaluaciones cada dos días con el fin de dar seguimiento al desarrollo embrionario. Pasado éste tiempo, se procedió a realizar el mismo procedimiento con el fin de aumentar la cantidad de plántulas a producir.

Se dispensaron 20 ml del medio de cultivo en frascos transparentes de vidrio de la marca comercial Gerber<sup>®</sup> (Gerber – Novartis, C.R. Apto 1811-1000 San José) con capacidad para 125 ml, y se protegieron del exterior con tapas transparentes de la marca Magenta<sup>®</sup>.

Para cada uno de los tratamientos se realizaron 4 repeticiones de 20 frascos cada una, conteniendo cada frasco 4 explantes. Finalmente, se procedió a realizar el conteo de plántulas producidas por frasco en cada repetición de su respectivo tratamiento y a obtener los análisis estadísticos concernientes.

## **Tratamientos evaluados**

### Luz Directa

Se realizó un diseño experimental basado en 4 repeticiones de 20 frascos cada una. Dicho diseño fue expuesto a la luz directa bajo una intensidad de 2000 lux, con fluorescentes de la marca Silvania® Grow-lux de 40 watts (vida de 20.000 horas, salida inicial de 1650 lúmenes) que irradian energía adicional en las regiones rojo-lejano (700-800nm), roja (600-700nm) y azul (400-500nm) del espectro; todo con el fin de analizar su efecto sobre la micropropagación clonal y la organogénesis de las plántulas obtenidas.

### Luz Difusa

Se realizó también un diseño experimental de 4 repeticiones de 20 frascos cada una, el ensayo se colocó en estantes con los fluorescentes apagados y con incidencia de luz indirecta de los otros estantes.

### Oscuridad

Éste último tratamiento se basó, en el mismo diseño experimental de los anteriores, con la diferencia que se colocó bajo una manta negra doble, con el propósito de evitar el paso de luz completamente hacia los explantes.

## **Análisis de datos**

Se utilizó un modelo estadístico basado en un análisis de varianza y pruebas de Tukey para la comparación de medias, para lo cual se utilizó el programa Statistix® para Windows® versión 4,0.

## RESULTADOS

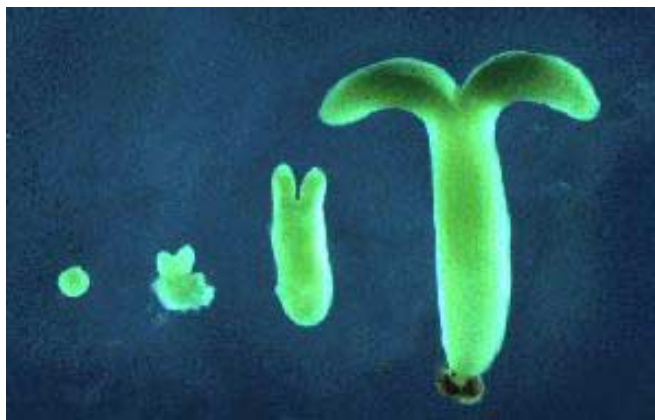
### - Efecto de la luz directa

Para el 7<sup>mo</sup> día después de la siembra, hubo un inicio claro de respuesta en 16 de los frascos, dándose un aumento en la densidad, longitud y grosor de los tricomas adaxiales de las hojas, así como un plegamiento parcial de las hojas sobre sí mismas; se empezó a notar algunas pequeñas protuberancias tempranas.

Al 10<sup>mo</sup> día, todos los explantes en los frascos presentaron respuesta, se observó un gran número de domos y algunos indicios de iniciación de organogénesis. Para el 13<sup>vo</sup> día los domos anteriores, se observaron con indicios de polaridad y formación de la sección meristemática de las plántulas.

En el día número 17, no se presentaba oxidación de los explantes, se observaron algunos domos celulares tardíos, mientras que la mayoría de explantes presentaban plántulas poco diferenciadas, algunas de estas con indicios de organización de sus órganos (Figura 1). En el día 21, se observó una oxidación parcial en la mayoría de los explantes, a la vez, se presentaron muchas plántulas con sus cotiledones bien formados y varias plántulas en estado juvenil.

En la Figura 1. se observan los principales estados de una plántula obtenida por organogénesis, se presentan en forma progresiva. Inicialmente, se presenta un pequeño domo globular, luego una organización celular en tejidos poco diferenciados, seguida de un estado un poco más organizado y finalmente un estado con cotiledones formados.



**Figura 1.** Principales estadíos de desarrollo de una plántula obtenida por organogénesis.

Fuente: López y Perán (2000).

En la Figura 2. se observa una plántula en estado juvenil obtenida por organogénesis bajo la luz, nótese la oxidación del explante.



**Figura 2.** Plántula de *Sinningia speciosa* obtenida por organogénesis en el tratamiento bajo luz directa.

En el Cuadro 1, se muestra el número promedio de plántulas obtenidas por frasco para cada una de las repeticiones y el número total de plántulas obtenidas por repetición, a la vez se indica el número total de plántulas obtenidas a los 22 días de tratamiento, se puede apreciar que la repetición 4 se llevó a cabo con 19 frascos debido a la contaminación por hongo de uno de los frascos; también se observa un comportamiento de producción similar en las 3 primeras repeticiones, no así en la repetición 4 que presentó una leve disminución dada la pérdida del frasco contaminado.

**Cuadro 1. Comparación del número de plántulas obtenidas por organogénesis en hojas de *Gloxinia* spp. *in vitro* a las 3 semanas de exposición a la luz directa, Plantaciones Exóticas S.A. 2 001.**

Repetición	Número de frascos	*Plántulas / frasco	Total de plántulas
1	20	12,2	244
2	20	15,6	312
3	20	14,75	295
4	19	8,95	170
		$\bar{x} : 12,875$	<b>Total: 1 021</b>

\* Número promedio de plántulas.

A las 8 semanas después de sembrados los explantes, las plántulas se contaron de nuevo, como se observa en el Cuadro 2, se duplicó el número de plántulas en el tratamiento, luego de 5 semanas desde el último conteo. A la vez, se observa el número promedio final de plántulas obtenidas por frasco para cada repetición, así como el número total de plántulas por repetición.

**Cuadro 2. Comparación del número de plántulas obtenidas por organogénesis en hojas de *Gloxinia* spp. *in vitro* a las 8 semanas de exposición a la luz directa, Plantaciones Exóticas S.A. 2 001.**

<b>Repetición</b>	<b>Número de frascos</b>	<b>*Plántulas / frasco</b>	<b>Total de plántulas</b>
1	20	30,5	610
2	20	25,7	514
3	20	24,1	482
4	19	20,7	414
		$\bar{x} : 25,25$	<b>Total: 2 020</b>

\* Número promedio de plántulas.

### - Efecto de la luz indirecta o difusa

En éste tratamiento se obtuvo la mayor producción de plántulas por organogénesis, e inclusive se puede asegurar con un 99% de confianza que existe diferencia significativa entre éste tratamiento y los demás con respecto al número de plántulas obtenidas.

Al 3<sup>er</sup> día después de la siembra, se empezó a notar la respuesta en los tricomas, por medio de un pequeño engrosamiento, alargamiento y aumento en número de estos, así como plegamiento de las hojas.

Para el día número 6, todos los frascos tuvieron respuesta en la mayoría de sus explantes; en el 10<sup>mo</sup> día, se observaron gran cantidad de domos globulares, así como de algunas pequeñas plántulas en estado muy temprano y poco diferenciadas.

En el 13<sup>vo</sup> día, se presentaron nuevos domos, y también plántulas pequeñas poco diferenciadas.

Al 17<sup>vo</sup> día, se presentaron muchas plántulas más diferenciadas y algunas con los cotiledones presentes, así como algunas plántulas formadas (Figura 1).

En el Cuadro 3, se puede apreciar el número promedio de plántulas obtenidas por frasco de acuerdo a cada repetición realizada en el tratamiento 2; se observa la producción total de plántulas para cada repetición, y la sumatoria total de plántulas a las 3 semanas de sembrados los explantes.

**Cuadro 3. Comparación del número de plántulas obtenidas por organogénesis en hojas de *Gloxinia* spp. *in vitro* a las 3 semanas de exposición a la luz difusa, Plantaciones Exóticas S.A. 2 001.**

<b>Repetición</b>	<b>Número de frascos</b>	<b>*Plántulas / frasco</b>	<b>Total de plántulas</b>
1	20	17,6	352
2	20	19,8	396
3	20	19,2	384
4	20	22,1	442
		<b><math>\bar{x}</math> : 19,675</b>	<b>Total: 1 574</b>

\* Número promedio de plántulas.

Pasadas 8 semanas después de sembrados los explantes, las plántulas se contaron de nuevo, alcanzándose un aumento de casi el doble en la producción de plántulas. Lo anterior se pone de manifiesto en el Cuadro 4, después de 5 semanas se obtuvo un total de 2 900 plántulas.

**Cuadro 4. Comparación del número de plántulas obtenidas por organogénesis en hojas de *Gloxinia* spp. *in vitro* a las 8 semanas de exposición a la luz difusa, Plantaciones Exóticas S.A. 2 001.**

<b>Repetición</b>	<b>Número de frascos</b>	<b>*Plántulas / frasco</b>	<b>Total de plántulas</b>
1	20	33,4	668
2	20	35,9	718
3	20	37,2	744
4	20	38,5	770
		<b><math>\bar{x}</math> : 36,25</b>	<b>Total: 2 900</b>

\* Número promedio de plántulas.

### - Efecto de la oscuridad

Al 3<sup>er</sup> día de sembrados, se notó una palidez de los explantes, en especial en sus venas centrales, además no se observó ningún indicio de respuesta en organogénesis.

En el 7<sup>mo</sup> día, se observó una mayor palidez en el lado adaxial de las hojas, así como un aumento en la densidad, grosor y longitud de los tricomas, y un plegamiento de los explantes.

Al 11<sup>vo</sup> día se observó un inicio en la respuesta de todos los explantes. Al día 25, los tricomas que iniciaron la dediferenciación se formaron en callos y de allí salieron algunas plántulas pero no significativas; a la vez, se dio una formación de microtubérculos, uno en el pecíolo de cada hoja, del cual también posteriormente saldrían plántulas. En la Figura se visualizan plántulas etioladas producidas a partir de un microtubérculo formado en el tratamiento 3.



**Figura 3.** Plántulas de *Sinningia speciosa* obtenidas por microtuberización en el tratamiento bajo oscuridad.



Los datos recolectados a las 4 y 8 semanas de tratamiento en la oscuridad se representan en los Cuadros 5 y 6. En el Cuadro 5 se aprecia una producción nula de plántulas en todas las repeticiones luego de 4 semanas de sembrados los explantes.

**Cuadro 5. Comparación del número de plántulas obtenidas por organogénesis en hojas de *Gloxinia* spp. *in vitro* a las 4 semanas de exposición a la oscuridad, Plantaciones Exóticas S.A. 2 001.**

<b>Repetición</b>	<b>Número de frascos</b>	<b>*Plántulas / frasco</b>	<b>Total de plántulas</b>
1	20	0	0
2	20	0	0
3	20	0	0
4	20	0	0
			<b>Total: 0</b>

\* Número promedio de plántulas.

Así también, en el Cuadro 6 se indica el número promedio de plántulas obtenidas luego de 8 semanas de sembrados los explantes; se puede apreciar la baja cantidad de plántulas producidas tanto por frasco, como por repetición, presentándose un comportamiento similar en las 4 repeticiones.

**Cuadro 6. Comparación del número de plántulas obtenidas por organogénesis en hojas de *Gloxinia* spp. *in vitro* a las 8 semanas de exposición a la oscuridad, Plantaciones Exóticas S.A. 2 001.**

<b>Repetición</b>	<b>Número de frascos</b>	<b>*Plántulas / frasco</b>	<b>Total de plántulas</b>
1	20	1,1	22
2	20	1,0	20
3	20	0,5	10
4	20	0,3	6
			<b>Total: 58</b>

\* Número promedio de plántulas.

### - Comparación entre tratamientos

Al final de los tratamientos (8 semanas) se compararon los resultados de cada uno de estos de acuerdo al número promedio de plántulas obtenidas y al número promedio de las mismas por frasco.

Como se pone en manifiesto en el Cuadro 7, la tasa más alta de producción de plántulas de gloxinia obtenidas por organogénesis se consiguió en el tratamiento 2 (Luz difusa), con un promedio de 36,25 plántulas por frasco, incidiendo por ende en el número total de plántulas obtenidas al final del tratamiento (2 900 plántulas). Con un promedio de 25,25 plántulas por frasco y un total de 2 020 plántulas al final de las 8 semanas, se ubicó el tratamiento 1 (Luz directa) y con una producción mucho más baja que ambos; 0,725 plántulas / frasco y 58 plántulas al final del tratamiento, se encontró el tratamiento 3 (Oscuridad) (Cuadro 7).

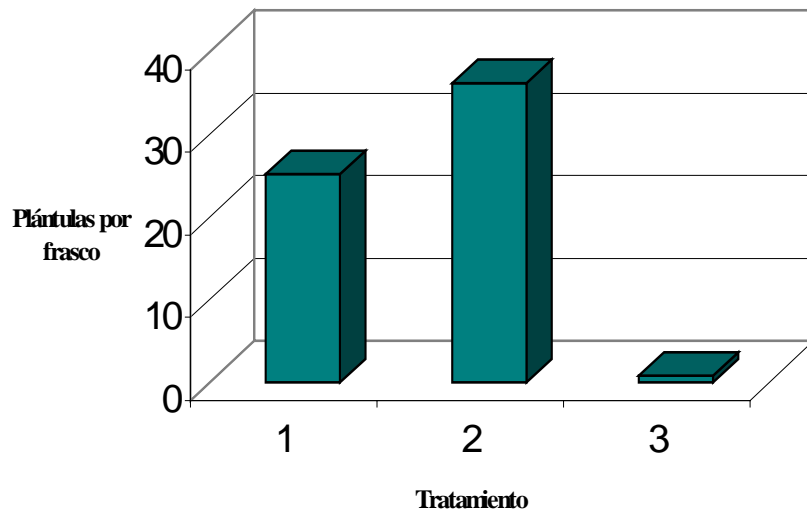
Así también, se encontraron diferencias significativas en el número promedio y en el total final de plántulas obtenidas por organogénesis entre los 3 tratamientos, afirmado con un 99% de confianza, al realizar la prueba de Tukey para la comparación de medias (Anexo 1).

**Cuadro 7. Comparación luego de 8 semanas de observación, entre los distintos tratamientos, en el proceso de organogénesis en hojas de *Gloxinia* spp. *in vitro*, Plantaciones Exóticas S.A. 2 001.**

Tratamiento	Número de frascos	*Promedio Final / Frasco	Total de plántulas
1	80	25,25	2 020
2	80	36,25	2 900
3	79	0,725	58

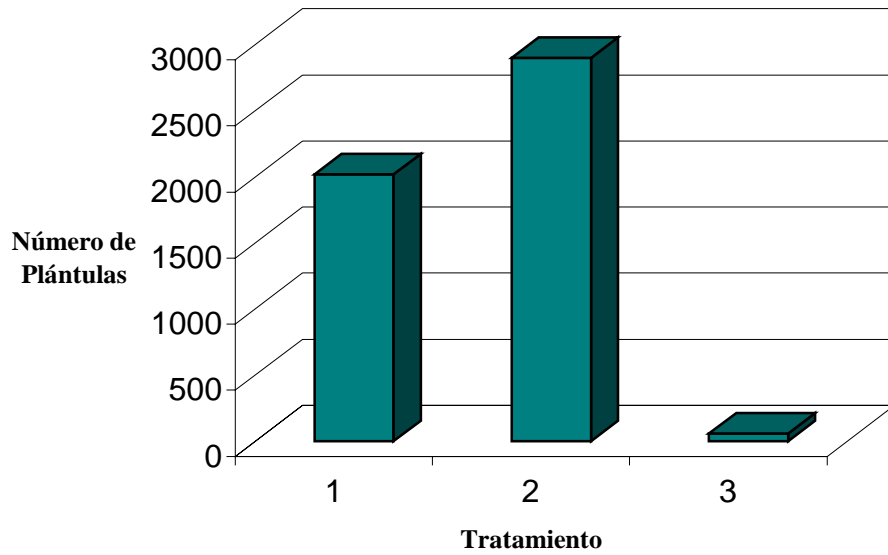
\* Número promedio de plántulas.

En las Figuras 4 y 5, se muestra el comportamiento de los 3 tratamientos según el número de plántulas obtenidas por frasco y el número de plántulas por tratamiento. En la Figura 4, se puede apreciar la gran diferencia conseguida por el tratamiento 2, obteniendo un promedio de 36,25 plántulas por frasco, mientras que en el tratamiento 1 y en el tratamiento 3, se produjo un promedio de 25,25 y de 0,725 plántulas por frasco, respectivamente.



**Figura 4.** Promedio de plántulas de *Gloxinia* spp. obtenidas por frasco por medio de organogénesis, a las 8 semanas de cultivadas.

En la Figura 5, se observa como el tratamiento 2 (luz difusa) produjo un total de 2 900 plántulas al final de las 8 semanas, mientras que en los otros tratamientos, se produjo un total de 2 020 plántulas para el tratamiento 1(luz directa) y de 58 plántulas para el tratamiento 3 (oscuridad).



**Figura 5.** Comparación luego de 8 semanas de observación, entre los distintos tratamientos, en la sumatoria total de plántulas obtenidas por organogénesis en hojas de *Gloxinia* spp. *in vitro*.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### - Efecto de la luz directa

De los explantes utilizados en el ensayo, fue muy significativa la presencia de tricomas, ya que estos favorecieron la formación de nuevas plántulas. De ahí que un factor tan determinante en la introducción *in vitro*, como son los tricomas o cualquier estructura de la planta, que en muchas ocasiones puede servir como hospedero de patógenos, se volvió esencial en la organogénesis.

El proceso de organogénesis se llevó a cabo por la desdiferenciación y rediferenciación celular inducida en los tricomas del lado adaxial de las hojas de gloxinia sembradas en el medio de cultivo. Se eligió el sector adaxial de las hojas debido a que, en comparación con el lado abaxial y por medio de la observación al estereoscopio, se logró visualizar una mayor cantidad de estos, lo que favoreció directamente en el número de plántulas obtenidas al final del ensayo, ya que, con una mayor densidad de tricomas se aumentaron también las probabilidades de producir un mayor número de plántulas.

A pesar de que no hay estudios concretos sobre la base de la organogénesis en Gloxinia, al igual que Bigot (1976) citado por Alvarenga y Abdelnour (1999), se podría pensar que la respuesta celular obtenida se debió a una diferencia en la capacidad metabólica de los tejidos, lo que llevó a la diferenciación de las células tricomaes a plántulas. Es importante recalcar que, en otras plantas ornamentales como la begonia (*Begonia spp.*) y la violeta africana (*Saintpaulia spp.*), Ohki (1994) reportó una intensa activación en los tejidos superficiales, específicamente en las células epidérmicas, para la posterior diferenciación.

En el tratamiento 1, se obtuvo una respuesta inicial rápida en los tricomas expuestos al medio de cultivo, aproximadamente al 7<sup>mo</sup> día después de la siembra. Dentro de esa respuesta inicial, se observó un aumento claro en la densidad o número de tricomas en la superficie adaxial del explante, así como también, una elongación y engrosamiento de los mismos; esto debido al proceso de desdiferenciación y rediferenciación celular de los tricomas al ser expuestos a los reguladores de crecimiento antes mencionados, así, las auxinas provocaron la elongación y aumento de grosor, las

citocininas el aumento en la densidad y la combinación de ambos indujeron la formación de las plántulas.

La respuesta favorable de la organogénesis en condiciones de luz se presentó por medio de una buena producción de plántulas a partir del concepto de totipotencia celular aplicado a la organogénesis, en donde a partir de células somáticas se obtuvieron individuos nuevos sin pasar por una fusión de gametos.

El medio de cultivo empleado (Anexo 2) presentó las características necesarias para la realización del ensayo, las cuales se dieron principalmente a nivel de reguladores de crecimiento, debido a la concentración y combinación ideal de una auxina (AIA) con dos citocininas (2iP y BAP), las cuales se mezclaron de manera que se presentara una baja concentración de auxinas y una media o alta concentración de citocininas, esto para inducir favorable y directamente a la formación de brotes en las hojas de gloxinia.

Es así como la combinación de la auxina y las citocininas presentes promovió una división, elongación y diferenciación celular en el desarrollo de las plántulas, así como la neoformación de órganos. A la vez, la auxina promovió el fototropismo de las plántulas pues éstas, primariamente se encontraban bajo el explante<sup>1</sup>.

Un resultado similar lo obtuvieron García y Menéndez (1987) en café, donde lograron producir las mayores cantidades de plántulas combinando tanto BAP con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D – una auxina) como 2-isopentenil adenina (2iP) con ácido indol-butírico (AIB – una auxina).

Debido a la respuesta progresiva y al estado de madurez de los tricomas presentes en los explantes fue que se evidenció un aumento significativo del número de plántulas presentes, promoviéndose una producción masiva de la semana 3 a la semana 5 Ode tratamiento, en la cual se obtuvieron más plántulas adicionales por organogénesis.

En comparación, éste tratamiento obtuvo una menor producción y una diferencia significativa, con respecto al tratamiento 2. Los resultados obtenidos parecen sugerir que la luz directa incide en un incremento de la temperatura interna y externa de los frascos, lo que pudo afectar la capacidad organogénica, siendo ésta más favorable en presencia de menor intensidad y cantidad lumínica.

---

<sup>1</sup> Peraza, J. 2000. Hormonas vegetales y respuestas. Instituto Tecnológico de Costa Rica. (Comunicación personal).

Así también, la luz directa y el incremento en la temperatura incurrieron en la oxidación de los explantes. Dicho fenómeno repercutió directamente sobre la obtención final de plántulas, ya que, al oxidarse los explantes por la luz, también se oxidaron las plántulas poco diferenciadas provocando muerte prematura y por ende menor producción final de plántulas al terminar las 8 semanas de tratamiento.

### **- Efecto de la luz difusa**

Cabe resaltar que, uno de los objetivos de éste trabajo consistió en obtener un aproximado de 3000 plántulas *in vitro* en un periodo de 5 meses, cantidad que casi se logró por medio del tratamiento 2, ya que se produjo un total de 2 900 plántulas. Pero, a pesar de ese logro, se obtuvo una reducción del tiempo de producción, alcanzando dicha cantidad de plántulas en 2 meses (8 semanas) menos de la mitad del tiempo proyectado en los objetivos.

Una vez que el explante fue colocado en el medio de cultivo, se dio la absorción de sales y reguladores de crecimiento (BAP – 2iP - AIA), los cuales ejercieron efectos directos sobre la formación de nuevas plantas. El BAP y el 2iP, como citocininas que son, se caracterizan por poder interactuar con las auxinas, especialmente el AIA; con el cual, en éste ensayo, provocaron división celular y afectaron los patrones de diferenciación de las células, lo que provocó a posteriori la morfogénesis celular de las plántulas<sup>2</sup>.

En éste caso, también se obtuvo una respuesta en los tricomas similar a la del tratamiento 1, en donde los tricomas iniciaron su proceso de dediferenciación primero con un aumento en su densidad en la superficie de la hoja, luego se dio un engrosamiento paulatino de los mismos y posteriormente se presentó un aumento en la longitud de los tricomas que se rediferenciaron finalmente a plántulas.

En éste tratamiento, el mayor número de plántulas tempranas se presentaron hasta finales de la segunda semana (13<sup>vo</sup> día), probablemente provocado por la menor incidencia de luz, lo que indicó un proceso de desarrollo un poco más lento referente al tratamiento 1, tratamiento que pudo verse acelerado por la luz directa.

A pesar de tenerse un inicio más lento en el proceso de respuesta y diferenciación celular en el tratamiento 2, se llegó a obtener un aumento masivo en el número de plántulas que también significó un incremento en el total de producción final de dicho tratamiento. Ya que, en comparación con el tratamiento 1, para el día 17 se obtuvo un mayor promedio de plántulas por frasco que el obtenido en el tratamiento 1 para el día 21, 19,675 y 12,875 plántulas / frasco respectivamente.

---

<sup>2</sup> Peraza, J. 2000. Hormonas vegetales y respuestas. Instituto Tecnológico de Costa Rica. (Comunicación personal).



Al final de las 8 semanas la cantidad total de plántulas casi se duplicó, obteniéndose un total de 2 900 plántulas que evidenciaron el éxito del tratamiento y por ende su recomendación de utilización en investigaciones y proyecciones a futuro.

La capacidad productiva de plántulas también se debió a la presencia de luz, ya que el fitocromo (principal pigmento vegetal que absorbe la luz) es inducido por las longitudes de onda del rojo y rojo-lejano del espectro de luz<sup>3</sup>. Es así como el fitocromo es un fotorreceptor que controla la respuesta germinativa y fotosintética de las plantas, y al tener la presencia de luz con amplio espectro dada por los fluorescentes en el cuarto de crecimiento, se explica la respuesta sobre la organogénesis en los explantes.

La diferencia tan marcada entre los tratamientos 1 y 2 (más de 800 plántulas), se debió principalmente a las condiciones lumínicas a las cuales fueron expuestas, ya que en el tratamiento 1 se dio fotooxidación de los explantes que a posteriori se tradujo en pérdida de plántulas; mientras que, en el tratamiento 2 se prestaron las condiciones de luz indirecta para que se realizara el proceso de organogénesis sin repercutir en la cantidad de plántulas obtenidas, pues al haber una menor incidencia de luz sobre los explantes, se evitó una posible fotooxidación que minimizara el número de plántulas finales.

La fotooxidación de los explantes se pudo deber a la sensibilidad de la gloxinia por los cambios bruscos de temperatura, ya que, al haber una alta incidencia de luz en el tratamiento 1, también pudo haber un incremento en la temperatura interna y externa de los frascos que repercutiera directamente sobre la sensibilidad celular a la luz. Es así como, en el tratamiento 2, al haber menor incidencia de luz, hubo mayor constancia en las condiciones de temperatura y por ende una menor oxidación de los explantes debida a la luz. Así también, se podría pensar que, al haber presencia de estrés lumínico y calórico sobre el explante, éste pudo haber secretado fenoles en su base que ocasionaran la muerte de las plántulas posterior a la muerte de los explantes<sup>4</sup>. Según Navarro y Perea (1996) los compuestos fenólicos emitidos por los explantes en el medio de cultivo, pueden oxidarlos causando un ennegrecimiento del medio y la muerte de estos, situación del tratamiento 1.

---

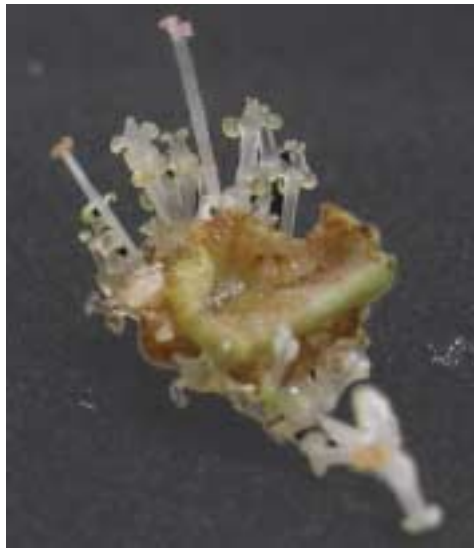
<sup>3</sup> Abdelnour, A. 2000. Rol de los Fitocromos en la germinación. Instituto Tecnológico de Costa Rica. (Comunicación personal).

<sup>4</sup> Jiménez, V. 2000. Curso de Cultivo de Tejidos II. Instituto Tecnológico de Costa Rica. (Comunicación personal).

### - Efecto de la oscuridad

Del día 3 al día 7, se observó palidez en los explantes, esto debido a la ausencia de luz sobre las células superficiales de los mismos.

A pesar que; en éste tratamiento se dio un inicio de dediferenciación celular en los tricomas aproximadamente al 11<sup>vo</sup> día y que se presentó el mismo comportamiento dado en los tratamientos anteriores, en donde se incrementó la densidad, la longitud y el grosor de estos; en el tratamiento 3 casi no se llegó a observar ninguna plántula producida, a excepción de 58 casos aislados y de algunas plántulas etioladas producidas a partir de callos y de microtubérculos inducidos por las condiciones de oscuridad; la etiolación de las plántulas se debió a la ausencia de luz, lo que provocó una elongación y palidez en la plántulas, tal y como se ve en la Figura 6.



**Figura 6.** Plántulas etioladas de *Sinningia speciosa* obtenidas por organogénesis en el tratamiento bajo oscuridad.

Los callos obtenidos en éste tratamiento, se debieron a la presencia de la auxina y las citocininas que promovieron una proliferación y desarrollo celular traducido en masas amorfas de tejido indiferenciado, tejido que posteriormente produjo algunas plántulas por organogénesis, poco significativas para el ensayo y para los objetivos. A la vez, al ser la gloxinia una planta tuberosa, la ausencia de luz promovió la formación de microtubérculos en los extremos de las venas principales de los explantes, estructuras que también produjeron cierta cantidad de plántulas de poco interés para el ensayo en cuestión (Figura 3).

Al contrario de los dos tratamientos anteriores, el tratamiento 3 (Oscuridad) presentó una inhibición total en el proceso de rediferenciación celular hacia la organogénesis sin callos, lo que implicó que la luz es un factor determinante en la inducción de dicho proceso. Esto se debió a la ausencia de luz que activara los fotorreceptores en las células vegetales, inhibiéndose así la respuesta organogénica de los explantes.

## CONCLUSIONES

- En luz difusa, a las 4 semanas hay plántulas obtenidas por organogénesis.
- En la oscuridad se da una inhibición de la diferenciación celular que evita la organogénesis sin callos.
- Se obtiene plántulas de mejor calidad en el tratamiento de luz difusa que en el tratamiento de luz directa.
- La luz directa incide en la oxidación de los explantes.
- En oscuridad, un alto porcentaje de las plántulas obtenidas se desarrollaron a partir de micro-tubérculos.
- La luz es un factor determinante en la inducción de la organogénesis.
- En el tratamiento de luz difusa se obtienen vitroplantas en un menor tiempo.

## **RECOMENDACIONES**

- Se recomienda el tratamiento 2 (luz difusa) pues se obtiene un mayor número de plántulas y se logra una producción masiva de gloxinias con un gran ahorro de energía eléctrica en el laboratorio.
- En caso de utilizar el protocolo de producción proseguido por un proceso de individualización de plántulas, se recomienda utilizar 10 o 15 ml de medio de cultivo por frasco para minimizar los costos.
- Se recomienda realizar un estudio genético generacional con el fin de estudiar o comprobar que no haya riesgo de variaciones somaclonales al establecer el presente protocolo de producción.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A; y Flores, D. 2000. **Manual de Laboratorio de Cultivo de Tejidos II**. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 51 p.
- Abdelnour, A; y Vincent, J. 1994. **Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales**. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 38 p.
- Alvarenga, S. y Abdernour, A. 1999. **Micropropagación y organogénesis *in vitro* de *Gloxinia spp.*** Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 19 p.
- Fernández, J. 1996. **Metodologías para la embriogénesis somática y el mantenimiento de cultivos *in vitro* de tabaco (*Nicotiana tabacum*)** en: [http://www.uis.edu.co/investigacion/paginas/proyectos/fac\\_cien.htm](http://www.uis.edu.co/investigacion/paginas/proyectos/fac_cien.htm)  
Consultada el 6/11/2001
- García, E. y Menéndez, A. 1987. **Embriogénesis somática a partir de explantes de café**. En: <http://www.café-cacao.es>  
Consultada el 12/11/2001
- Hurtado, D. y Merino, M. 1987. **Cultivo de Tejidos Vegetales**. Editorial Trillas. México, D.F. 232 p.
- López, C. y Perán, R. 2000. **Embriogénesis Somática**. En: <http://www.ciencias.upma.es/>  
Consultada el 6/11/2001
- Morley, B. 1999. **Gesneriaceae: African Violets And Gloxinias**. En: <http://home.pathcom.com/gesneria.htm>  
Consultada el 6/11/2001
- Murashige, T.; Skoog, F. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. *Physiol. Plant.* 15:473-497; 1962.
- Navarro, W; y Perea, M. 1996. **Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas** . 2. ed. EUNA. Heredia, Costa Rica. 105 p.

Okhi, S. 1994. **Scanning electron microscopy of shoot differentiation *in vitro* from leaf explants of the Africans violet.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture 36: 157-162.

Procomer. 2001. **Exportaciones 1999 – 2000 en Costa Rica.** En:  
<http://procomer.com>  
Consultada el 6/11/2001

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1991. **Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones.** Cali, Colombia. 445 p.

Xochitl, G. y Barrera, M. 1997. **Propagación de *Obregonia denegri* fric. por embriogénesis somática y cultivo *in vitro* modificado.** En:  
<http://investigacion.uat.mx/PROY/PROY444.HTM>  
Consultada el 6/11/2001

## ANEXOS

### ANEXO 1

- Análisis de Varianza y Comparación de medias de Tukey para el número promedio de plántulas por tratamiento

#### STATISTIX FOR WINDOWS

##### ONE-WAY AOV FOR PLANTULAS BY TRATA

<u>SOURCE</u>	<u>DF</u>	<u>SS</u>	<u>MS</u>	<u>F</u>	<u>P</u>
BETWEEN	2	2646.00	1323.00	184.76	0.0000
WITHIN	9	64.4475	7.16083		
TOTAL	11	2710.45			

TRATA	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
1	25.250	4	4.0739
2	36.250	4	2.1764
3	0.7250	4	0.3862
TOTAL	20.742	12	2.6760

CASES INCLUDED 12 MISSING CASES 0

#### STATISTIX FOR WINDOWS

##### TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF PLANTULAS BY TRATA

TRATA	HOMOGENEOUS MEAN	GROUPS
2	36.250	I
1	25.250	.. I
3	0.7250	.... I

ALL 3 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 5.436 REJECTION LEVEL 0.010  
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 7.2729  
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 1.8922



## ANEXO 2

**Cuadro 8. Composición del medio de cultivo empleado, M&S (1962) modificado.**

Componentes	Cantidad (g $L^{-1}$ )
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	37,0
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,69
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,86
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0025
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	44,0
KI	0,083
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0025
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,62
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> EDTA	3,724
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,784
Bencil Amino-Purina (BAP)	1,0 (mg $L^{-1}$ )
2 iP	1,5 (mg $L^{-1}$ )
Ácido Indolacético (AIA)	0,5 (mg $L^{-1}$ )
Tiamina	0,2 (mg $L^{-1}$ )
Myo – Inositol	100 (mg $L^{-1}$ )
Phytigel	1,8
Sacarosa	30

**Fuente:** Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497; 1962.