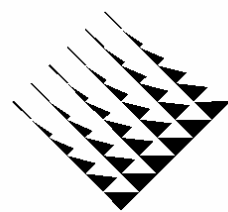


**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**  
**ESCUELA DE BIOLOGÍA**  
**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**  
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**



**TEC**

Instituto Tecnológico de Costa Rica

**INFORME DE PRÁCTICA DE ESPECIALIDAD**

**Establecimiento *in vitro* y micropropagación en medio semi-sólido y  
medio líquido de *Cala (Zantedeschia sp)***

**Montserrat Jarquín Cordero**

**Cartago, Noviembre, 2001**

“No esperes de la vida nada distinto de lo que tú seas capaz de obtener

No esperes jamás que todos tus sueños se efectúen, si no luchas por hacerlos cumplir.

No hagas nada distinto de lo que tu razón, tus ideales y tu virtud te indiquen como correcto.

No adoptes creencias que rebajen tu personalidad, tu capacidad de acción o tu libertad.

Si sigues siempre una norma de conducta acorde con tu conciencia, la realidad te mostrará que has obrado con la verdad”

Anónimo

## **DEDICATORIA**

A mi madre, quien siempre me ha apoyado e impulsado para seguir adelante.

A la memoria de mi hermana, fue ella quien me enseñó a nunca darme por vencida a pesar de lo incierto que pueda parecer el futuro.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por otorgarme el privilegio de la vida y permitirme perseverar para alcanzar mis metas.

A mi familia, sin ellos no podría haber llegado hasta este punto en mi vida.

A mi tutora M.Sc. Dora Flores Mora por su guía, asesoría y apoyo en la realización de esta práctica.

Al Ing. Francisco Monge por su asesoría en las aplicaciones estadísticas de este documento.

A mis amigos y compañeros, por todos aquellos grandes detalles y momentos que pasamos juntos. ¡Muchas gracias, muchachos!

A todas aquellas personas que de alguna forma intervinieron en mi formación personal y profesional.

## **ESTABLECIMIENTO IN VITRO Y MICROPROPAGACIÓN EN MEDIO SEMI-SÓLIDO Y MEDIO LÍQUIDO DE GALA (*ZANTEDESCHIA SP*)**

Informe final de Práctica de Especialidad presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica por Montserrat Jarquín Cordero como requisito parcial para optar por el título de bachillerato en Ingeniería en Biotecnología.

---

M. Sc. Dora María Flores Mora  
Escuela de Biología  
Instituto Tecnológico de Costa Rica

---

M.Sc. Ana Abdelnour Esquivel  
Escuela de Biología  
Instituto Tecnológico de Costa Rica

---

Dr. Daniel Peralta  
Empresario

## TABLA DE CONTENIDOS

Resumen.....	x
Abstract.....	xi
Introducción.....	1
Justificación.....	2
Objetivo General .....	3
Objetivos Específicos .....	3
Revisión de Literatura .....	4
Cultivo de tejidos vegetales.....	4
Sistema de inmersión temporal.....	7
Descripción del género Zantedeschia sp. ....	9
Metodología .....	14
Resultados .....	17
Discusión .....	27
Conclusiones.....	33
Recomendaciones .....	34
Literatura Consultada.....	35

## TABLA DE CUADROS

Cuadro N°	Título	Página
1	Tratamientos para la micropropagación de cala ( <i>Zantedeschia sp</i> x variedades silvestres) .....	15
2	Introducción de cala ( <i>Zantedeschia sp</i> x variedades silvestres).....	17
3	Introducción de cala ( <i>Zantedeschia sp</i> x variedades silvestres).....	17
4	Rendimiento promedio de los tratamientos para la micropropagación de cala ( <i>Zantedeschia sp</i> x variedades silvestres).....	19
5	Índice de Biomasa para los tratamientos de micropropagación de cala ( <i>Zantedeschia sp</i> x variedades silvestres)....	21
6	Rendimiento promedio de los tratamientos de micropropagación de cala ( <i>Zantedeschia sp</i> x variedades silvestres) en medio líquido.....	23
7	Índice de Biomasa de cala ( <i>Zantedeschia sp</i> x variedades silvestres) para los tratamientos en el sistema de inmersión temporal.....	24
8	Comparación del rendimiento promedio de brotes/explante producidos en medio semisólido y utilizando la técnica de inmersión temporal.....	26

## TABLA DE FIGURAS

<b>Figura N°</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Establecimiento <i>in vitro</i> de cala.....	18
2	Número de brotes obtenido en los tratamientos en medio semi-sólido.....	20
3	Micropropagación en medio semi-sólido a $25 \pm 2$ °C.....	22
4	Número de brotes/RITA obtenido en los tratamientos en medio líquido .....	24
5	Micropropagación en medio líquido de cala.....	25



## TABLA DE ANEXOS

<b>Anexo N°</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Análisis estadístico.....	38
2	Análisis estadístico.....	42
3	Esquema de RITA.....	46
4	Vitroplanta enraizada.....	48
5	Organismos patógenos presentes en el cultivo de ca- la.....	50

## RESUMEN

En el establecimiento *in vitro* de cala (*Zantedeschia sp* x variedades silvestres) se realizaron varios ensayos para las etapas de introducción y micropropagación, utilizando medio de cultivo semi-sólido y el sistema de inmersión temporal, con el fin de implementar un protocolo de micropropagación, para esta especie.

Al validar el protocolo de desinfección se logró el mejor resultado efectiva cuando se utilizaron yemas de 3,72 mm de longitud promedio. En cuanto a la micropropagación en medio semi-sólido se obtuvo un mejor rendimiento al utilizar un medio de cultivo con sales M&S, vitaminas L&S, 2,5mg/L de BAP y una temperatura de  $25 \pm 2$  °C;

Este tratamiento en medio semi-sólido fue probado en el sistema de inmersión temporal, en donde se obtuvieron buenos resultados, sin embargo este fue un estudio preliminar que debe ser retomado en investigaciones posteriores.

**Palabras clave:** *Zantedeschia sp*, medio semi-sólido, medio líquido, rendimiento, calidad, micropropagación.

## ABSTRACT

To the *in vitro* establishment of calla (*Zantedeschia sp* x wild varieties), it has been prove different tests for the introduction and micropropagation using semi-solid culture media and the temporary immersion system.

To validate the disinfection protocol has been determinate it has been determined the effective of buds of 3,72 mm longitude.

For the micropropagation in semi-solid culture media the best treatment was a macroelements and microelements M&S medium, supplemented with L&S vitamins, sacarose (30g/L), BAP (2,5 mg/L), Phytigel (2,1 g/L), pH 5,8 and  $25 \pm 2$  °C.

The treatment above was implemented in the temporary immersion system, with good results. However this specific research must be take again in future investigations.

**Key words:** *Zantedeschia sp*, semi-solid medium, liquid medium, yield, quality, micropropagation.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado la demanda de plantas ornamentales, razón por la cual se ha recurrido a nuevas técnicas de cultivo que permitan la multiplicación masiva de dichas especies, una reducción en el ciclo de crecimiento y la obtención de plantas con mejor calidad fitosanitaria.

Costa Rica ha basado su economía principalmente en la exportación de productos; tradicionales tales como el banano, el café y la caña de azúcar, sin embargo el país se ha visto en la necesidad de explotar nuevos productos, entre los cuales se destacan las flores y las plantas de follaje.

Con la implementación de la técnica de cultivo de tejidos, la cual consiste en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionar artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido (Roca, 1991); se ha logrado dar una respuesta oportuna a las empresas interesadas en obtener grandes volúmenes de material de buena calidad con el fin de cumplir las exigencias del mercado nacional e internacional.

En los últimos años los laboratorios comerciales han sentido la necesidad de implementar técnicas de micropropagación de material utilizando medios líquidos, es así, como el uso de la técnica de inmersión temporal, constituye una alternativa para incrementar la producción de material vegetal, a un menor costo de producción y una mejor calidad del producto.

## JUSTIFICACIÓN

La cala (*Zantedeschia sp*) es importada en cormos y flor por países de Europa, el Oriente medio, el Oeste asiático y Japón.

Productores costarricenses de cala, actualmente están comercializando este producto a los Estados Unidos y Europa, su producción mediante el sistema de división de rizoma a aumentado en los últimos años debido a la demanda y buen precio en el mercado internacional. Sin embargo con el uso de esta técnica no se logran obtener el rendimiento y la calidad que exigen los mercados.

Es por esta razón que la aplicación de la técnica de cultivo de tejidos ofrece la posibilidad de producir materiales limpios de virus y en cantidades adecuadas con el fin de suplir los requerimientos del mercado local e internacional ofreciendo un producto de alta calidad.

Tradicionalmente el cultivo de tejidos utiliza el medio semi-sólido para la micro-propagación de los materiales, sin embargo la implementación del sistema de inmersión temporal (RITA o Recipiente para Inmersión Temporal Automático), constituye una alternativa para incrementar los rendimientos en la producción. Además se logra una reducción del periodo de cultivo y se minimizan los costos de producción; esto se constituye en una ventaja comparativa con respecto a la técnica de cultivo en medio semi-sólido, lo cual se traduce en una producción más eficiente, que dará mayores posibilidades de exportación, contribuirá a generar mayores ingresos de divisas a nuestro país.

## **OBJETIVO GENERAL**

Implementar el protocolo de micropropagación de cala (*Zantedeschia sp* x variedades silvestres) en medio semi-sólido y medio líquido.

## **Objetivos Específicos**

1. Validar el protocolo de desinfección de brotes de cala.
2. Evaluar diferentes tratamientos en la micropropagación de cala en medio semi-sólido.
3. Definir las variables implicadas en la micropropagación de cala utilizando el sistema de inmersión temporal
4. Comparar el material producido en ambos sistemas (medio semi-sólido y medio líquido).
5. Analizar estadísticamente el rendimiento de la micropropagación en medio semi-sólido y en medio líquido.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo *in vitro* de tejidos comprende, un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. (Roca, 1991)

En 1989, Haberlandt consignó por primera vez el cultivo de células vegetales aisladas de distintas partes de la planta; sin embargo, los avances más importantes en el área del cultivo de células *in vitro* se han llevado a cabo en los últimos decenios.

En los años cuarenta y cincuenta se llevó a cabo el cultivo de células animales y vegetales de diferentes especies, y en los setenta se dio la primera aplicación comercial del cultivo de células vegetales: la producción de la enzima de restricción 3,5 fosfodiesterasa, proveniente de las células del tabaco. (Topete *et al.*, 1991)

Para crecer, las células requieren una variedad de nutrimentos orgánicos e inorgánicos. En cuanto a los tejidos de plantas, desde 1940 se ha desarrollado una gran cantidad de trabajos sobre sus requerimientos nutricionales en medios estrictamente definidos. La mayor parte de los tejidos se pueden cultivar exitosamente en un medio que contenga cualquiera de varias mezclas de sales minerales diseñadas para mantener el crecimiento de tejidos y órganos. (Roca, 1991)

El primer objetivo en la preparación de un medio de cultivo es suministrar los nutrientes minerales en concentraciones adecuadas; se deben incluir los Macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca y Mg) y los microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe y Cl). Todos los medios parecen beneficiarse con suplementos vitamínicos como la tiamina, el ácido nicotínico y la piridoxina; el myo-inositol es empleado como fuente de nitrógeno.

Las principales diferencias entre los medios de cultivo se relacionan con los diferentes compuestos utilizados para estimular la división celular.

Los reguladores de crecimiento de las plantas son compuestos orgánicos que se producen en una parte de la planta y luego se transportan a otra, en donde estimulan una respuesta fisiológica; son efectivos, aún en cantidades muy pequeñas.

Las citocininas fueron descubiertas como factores que promueven la división celular en cultivo de tejidos de tabaco. Desde entonces las citocininas han sido las encargadas de regular los eventos de desarrollo, como por ejemplo la formación de nuevos brotes con el incremento de yemas con dominancia apical, expansión de la hoja, retarda la senescencia, promueve la germinación de las semillas y la formación de cloroplastos. Son un ingrediente necesario de los medios de cultivo de tejidos vegetales, y deben estar presentes para inducir la meiosis. (Mok *et al.*, 2000)

Las citocininas poseen una estructura complicada. Son similares a la purina, adenina. En las plantas se producen en las raíces y después se transportan, a través del xilema a todas las partes de la planta. (Salisbury, 1995)

Se han propuesto dos rutas para la biosíntesis de las citocininas. La primera es la ruta directa, la cual involucra la formación de N<sup>6</sup>-isopenteniladenosina monofosfato (i<sup>6</sup> AMP) y dimetilalil pirofosfato (DMAPP) a partir del AMP, seguido por la hidroxilación de una cadena lateral para formar un componente de zeatina. La segunda ruta es de tipo indirecta, en la cual las citocininas son incrementadas mediante un cambio en el ARNt que contiene cis-zeatina. (Mok *et al.*, 2000)

En los cultivos tisulares, las citocininas interactúan con las auxinas durante la organogénesis; por ejemplo, en cultivo de tejidos de tabaco, una relación citocina/auxina alta, induce la formación de los tallos, en tanto que cuando esta relación es baja, se induce la formación de las raíces. Las citocininas y auxinas también interactúan en el control de la dominancia apical; en este caso, la rela-



ción es antagónica ya que las primeras promueven el crecimiento de las yemas laterales, en tanto que las segundas inhiben el crecimiento de las mismas. En las raíces la situación se invierte, y las auxinas propician el crecimiento de las raíces laterales y las citocininas lo inhiben.

Entre las principales aplicaciones que tiene la técnica de cultivo de tejidos se mencionan los siguientes: la investigación básica sobre los procesos bioquímicos y morfológicos de la diferenciación celular, investigación aplicada y desarrollo de tecnologías para ser utilizadas en la propagación clonal, o el mejoramiento genético de las plantas. (Roca, 1991)

Uno de los mayores problemas en el establecimiento *in vitro* de una especie es superar la contaminación inicial del explante. Para ello el procedimiento para la desinfección superficial de los explantes debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantes; sin embargo no es factible recomendar un procedimiento general para este propósito, y se deben considerar de manera especial las especies vegetales y el tipo de explante.

Los explantes provenientes de materiales que crecen en invernaderos son relativamente más fáciles de desinfectar que los provenientes de plantas que crecen en el campo, también es más fácil la desinfección de explantes de órganos jóvenes que la de explantes provenientes de materiales adultos. Las aplicaciones de fungicidas o bactericidas, realizadas previamente a las plantas, pueden ser de utilidad. (Roca, 1991)

Los métodos convencionales de micropropagación los cuales consisten en el uso de medios semi-sólidos presentan varias desventajas entre las que se destacan, los bajos coeficientes de multiplicación, los altos costos por mano de obra, la necesidad de implementar varios pasos para la regeneración de una planta completa y la escasa posibilidad de automatización del proceso productivo, lo cual trae consigo una menor eficiencia económica y un aumento de costos de producción. (Connor and Meredith et al., 1984)

El empleo de medios líquidos, el cual consiste en exponer a los explantes a un medio de cultivo sin un agente gelificante, ya sea de forma estacionaria o en agitación constante, representa una alternativa para solventar las desventajas citadas anteriormente con respecto al uso de medios semi-sólidos.

### **Sistema de inmersión temporal**

Con la implementación de los medios líquidos en el cultivo de tejidos surgió el problema de vitrificación en algunas especies el cual consiste en malformaciones de hojas, tallos y raíces, ligadas a factores nutricionales sobredimensionados y/o superfluos (elementos minerales, carbohidratos) y elevadas dosis de reguladores de crecimiento, que producen un efecto subtóxico global; una baja intensidad de luz durante el periodo de crecimiento, la humedad relativa y un potencial hídrico son el factor clave para explicar estas complejas anormalidades morfogénicas. (Evans, 1986)

Por esta razón Teisson y colaboradores consideraron la opción del diseño de sistemas de inmersión temporal, el cual consiste en el uso de unidades de filtración comercial que inyectan presión de aire al compartimiento inferior del sistema, logrando que el medio de cultivo ascienda y esté en contacto periódicamente con los explantes, evitando así la constante exposición de los explantes al medio de cultivo ya que este se da en forma periódica. (Anexo 3) (Teisson *et al.*, 1994)

Teisson y Alvard (1996) diseñaron un recipiente conocido por su nombre comercial como "RITA" que significa Recipiente de Inmersión Temporal Automática, el cual demostró un desempeño exitoso a escala experimental y comercial para la organogénesis y embriogénesis somática.

Los recipientes están conformados por dos compartimientos, uno superior en el cual se siembra el material vegetal y uno inferior en el que se encuentra el medio de cultivo líquido. Estos compartimientos están unidos de tal forma, que al apli-

car una presión de aproximadamente 0.3 bar en el recipiente de abajo, el medio se impulsa hacia arriba sumergiendo las plantas por un periodo corto de tiempo. Cuando la presión de aire se detiene, el medio retorna al compartimiento de abajo por gravedad, el aire que se inyecta al sistema pasa a través de filtros hidrofóbicos de  $0.2\mu$  lo que permite su esterilización y una renovación continua de la atmósfera dentro de la RITA; la frecuencia y duración del proceso son controladas por un reloj. (Teisson *et al.*, 1994)

Las primeras investigaciones en el uso de esta técnica fueron reportadas en café (*C. canephora* y *C. arabica*) en donde se logró una misma tasa de multiplicación que en medio de cultivo semi-sólido pero la duración de esta etapa fue reducida a la mitad. (Berthouly *et al.*, 1995).

En tanto, Etienne *et al.*, en 1997 en un solo recipiente RITA con 200 ml de medio líquido, produjo 9000 plantas de café, llegando a la conclusión de que esa misma cantidad de material producida a partir de un medio con gelificante habría requerido 1500 frascos con 30 ml de medio por frasco.

Otra implementación de la inmersión temporal se reportó en banano (*Musa sp.*), mediante esta técnica fue posible la multiplicación inicial de embriones somáticos dándose un incremento de 100 a 250 explantes en 2 a 3 meses de haberse cultivado y la germinación de los mismos fue de 70 – 80%. (Teisson *et al.*, 1994)

En papa (*Solanum tuberosum*) se obtuvo un promedio de 3 micro tubérculos, en 10 semanas provenientes de cada micro estaca con un solo nudo, además un 50 % de los microtubérculos tenían un peso mayor a 0,5g. (Teisson *et al.*, 1998)

En un estudio realizado por Murrell en el 2000 de *Bergenia spp* con medio M&S líquido se obtuvo en brotación un rendimiento promedio de 4,3 brotes por plántula, mientras que en la etapa de enraizamiento empleando el medio WPM modificado se logró reducir a la mitad el período necesario para inducir la proliferación de raíces.

## Descripción del género *Zantedeschia* sp.

### GENERALIDADES

#### Taxonomía

**Reino:** Plantae

**Filo:** Magnoliophyta

**Clase:** Liliopsida (Monocotiledonea)

**Orden:** Arales

**Familia:** *Araceae*

**Género:** *Zantedeschia*

#### Características de la planta

**Color de las flores:** blanca, rosada, amarilla.

**Periodo de floración:** Julio - Octubre

**Tamaño de planta promedio:** 30 - 90 cm

**Profundidad al plantar los bulbos:** 10 cm

**Espacio entre los bulbos:** 40 cm

**Tipo de bulbo:** cormo

**Requerimientos de luz:** 75% de luz directa

**Usos como paisaje:** frontera, macizo, jardín de plantas perennes.

Las cala son plantas herbáceas y acuáticas frágiles, de caducidad perenne, son nativas de Sur África. Se pueden plantar en invernaderos, a una temperatura mínima de 50° F o en exteriores con condiciones de clima templado.

Estas plantas son cultivadas principalmente debido a su belleza, sus grandes flores, las cuales se producen en primavera y verano. La Cala lilly es la más común y se cultiva en grandes cantidades para su comercialización, debido a que se usa como elemento decorativo durante los meses de primavera y posteriormente en el verano.

## Principales especies

Existen diferentes especies de *Zantedeschia* a continuación se describen las más estudiadas.

### ***Zantedeschia albomaculata***

Esta especie proviene de Suráfrica y es denominada “la cala moteada”, ya que presenta manchas en las hojas. Las hojas son verdes, en forma de flechas y con puntos blancos oblongos y translúcidos en ellas. Su espata tiene forma de trompeta, con el ápice puntiagudo y es de color blanco hueso o crema. La garganta es púrpura.



### ***Zantedeschia elliotiana***

La *Z. elliotiana* es una especie africana que se denomina comúnmente “Calla amarilla”. Crece a partir de un rizoma aplanado. Sus hojas son verdes, suculentas, acorazonadas y muy brillantes con manchas blancas translúcidas. La espata oblicua, tubular y acampanada mide 15 cm de largo y es de color amarillo intenso.



### ***Zantedeschia rehmannii***

La *Z. rehmannii* se denomina “Cala Rosa”, es una especie con hojas lanceoladas de color verde brillante y con marcas blancas translúcidas lineales. Tiene una espata rosado-púrpura en forma de campana, sus márgenes son rebordados de color crema. (GardenGuides, 2000)



### ***Zantedeschia aethiopica***

La especie *Z. aethiopica* se denomina “Cala lily” presenta una espata de color blanco con un matiz amarillo, con el espadice amarillo y esto produce un brillo alrededor de las hojas de la planta. Esta variedad crece de 2 a 3 pies de altura. (Murphy, 1999)



Existen tres subespecies de *Zantedeschia aethiopica* estas son:

La variedad *Zantedeschia aethiopica-‘compacta’* crece de una manera compacta, alcanzando alturas de entre 45 y 63,5 cm. Es muy florífera , con espatas de 12,5 a 15 cm de ancho. Esta planta es la más apropiada para el cultivo en macetas.

La variedad *Zantedeschia aethiopica- ‘minor’* es conocida como “pequeña joya”. Crece como máximo 40 cm y tiene espatas de 7,5 a 10 cm de ancho las cuales se producen abundantemente.

La variedad *Zantedeschia aethiopica-Hercules* fue descubierta por investigadores en Estados Unidos. Es una cala de proporciones gigantes, que llega a medir hasta 2 metros de altura. Sus espatas son proporcionalmente grandes de unos 50 cm de longitud.

## **PROPAGACIÓN TRADICIONAL**

Se conocen tres métodos de propagación.

### **Semilla**

Las variedades pueden cultivarse a partir de semilla la cual se siembra en la época de primavera en recipientes o en soportes al aire.

Un recubrimiento de turba o gravilla asegura que las plantas tengan un buen drenaje y se mantengan libres de malas hierbas, además este tipo de sustrato ayuda al levantamiento de los cormos. Cuando son recolectados se limpian eliminando el sustrato, se bañan en formol al 2% durante una hora y luego se secan en un lugar aireado, posteriormente se almacenan en un ambiente fresco.

### **División de cormos**

La propagación se lleva a cabo mediante la división de los cormos. Un rizoma maduro presenta muchas yemas, las cuales constituyen numerosos puntos de crecimiento, estos se cortan o dividen, se sumergen en un fungicida como el captan y se dejan secar superficialmente antes de plantarse. Para lograr una buena brotación de los cormos, estos se sumergen en una solución de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) a 50 ppm durante unos 5 a 10 minutos.

### **División de tallos**

El tercer método de propagación, el cual es el más difícil de practicar, consiste en dejar brotar los rizomas y posteriormente separar los tallos una vez los rizomas han producido raíces en su base.

También existen técnicas más avanzadas para la propagación como el cultivo de tejidos, para la cual se emplean diferentes partes de las plantas. Estos explantes se cultivan asépticamente en un medio de cultivo apropiado. (Jacobs, 2001)

## ENFERMEDADES Y PLAGAS

Existen diferentes enfermedades y plagas que afectan el cultivo de la cala. A continuación se describen las enfermedades bacterianas y fungosas más importantes:

Una de las bacterias que afectan el cultivo de la cala es *Erwinia aroideae*, la cual provoca la podredumbre del rizoma. Esta enfermedad se produce durante el crecimiento de las plantas generalmente la planta se vuelve susceptible cuando se presenta un ataque previo de un hongo patógeno, acompañado por altas temperaturas del suelo (>23°C). Para prevenirla se debe evitar el ataque primario del hongo, buena higiene, usar agua limpia y emplear algún bacteriostático.

Otra de las enfermedades importantes son los hongos patógenos que incluyen *Pythium*, *Fusarium* y *Rhizotonia*; todos ellos atacan la raíz. Los síntomas se presentan hasta 2 semanas después de la infección. Para su control se usan distintos funguicidas como el Benlate, Protek, Thiram, Captan entre otros.

Entre las plagas más comunes que atacan las calas se mencionan los thrips y los áfidos; el control de estos insectos es importante para evitar la diseminación de enfermedades virales como por ejemplo el Virus del Mosaico de salpicadura. (Zelttler, 1986)



## METODOLOGÍA

### ESTABLECIMIENTO IN VITRO

#### Desinfección del material

El inicio del establecimiento *in vitro* de la cala (*Zantedeschia sp* x variedades silvestres) se realizó a partir de yemas de diferentes tamaños: de 4 a 9mm, de 3,72mm y de 2,6mm. Posteriormente las yemas fueron desinfectadas a continuación se describe el proceso

Para la primer introducción se seleccionaron yemas de 4 a 9 mm de longitud, Las yemas fueron separadas de los cormos, se les eliminó las hojas coráceas envolventes y luego se lavaron con un cepillo suave con agua y jabón.

Después se expusieron las yemas a una solución de Agrimicin (1g/L) + Benlate (1g/L) durante 45 minutos en agitación constante; luego se realizaron tres lavados con agua destilada. Posteriormente se colocaron en una solución de hipoclorito de calcio ( $\text{CaClO}_2$ ) al 6% por 6 minutos en la bomba de vacío, luego en la cámara de flujo laminar se le aplicó 3 lavados con agua bidestilada estéril. Nuevamente se colocaron en una solución de hipoclorito de calcio al 4% durante 5 minutos; se efectuaron 4 lavados más con agua destilada estéril y por último se procedió a inocular los explantes en el medio de cultivo. El medio de cultivo utilizado fue un M&S con vitaminas L&S, Fe-EDTA, 3% de sacarosa, 2,1g de Phytigel, suplementado con 2,5mg/L de BAP y un pH de 5,8. Los explantes fueron colocados a dos temperaturas: a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Para la segunda introducción, se utilizaron yemas de 3,72 mm de longitud en promedio, en este caso no hubo que eliminar hojas coráceas y para la tercera introducción se emplearon yemas de 2,6 mm de longitud en promedio.

En ambos casos se siguió el mismo procedimiento de desinfección mencionado para la primera introducción además los explantes fueron inoculados en el mis-

mo medio de cultivo a las mismas temperaturas mencionadas para la primera introducción.

### Micropropagación en medio de cultivo semi-sólido

Para determinar el mejor medio de cultivo semi-sólido se realizaron diferentes ensayos, sin embargo se tomó como base los macroelementos y microelementos de Murashige & Skoog (1962) + Fe-EDTA, sacarosa al 3%, Phytigel (2g/l) y un pH de 5,8. Las variaciones de cada ensayo se observan en el cuadro 1.

**Cuadro 1** Ensayos para la micropropagación de cala (*Zantedeschia rehmannii* x otras variedades).

Ensayo	Vitaminas	Regulador del crecimiento	Temperatura
1	L&S <sup>1</sup>	2,5 mg/l BAP	25 ± 2°C
2	L&S <sup>1</sup>	2,5 mg/l BAP	22 ± 2°C
3	L&S <sup>1</sup>	2,5 mg/l Kinetina	25 ± 2°C
4	L&S <sup>1</sup>	2,5 mg/l Kinetina	22 ± 2°C
5	M&S <sup>2</sup>	2,5 mg/l BAP	25 ± 2°C
6	M&S <sup>2</sup>	2,5 mg/l BAP	22 ± 2°C
7	M&S <sup>2</sup>	2,5 mg/l Kinetina	25 ± 2°C
8	M&S <sup>2</sup>	2,5 mg/l Kinetina	22 ± 2°C

Fuente: CIB

<sup>1</sup> Vitaminas L&S: Tiamina y Myo-inositol.

<sup>2</sup> Vitaminas M&S: Myo-inositol, Glicina, Ácido nicotínico, Piridoxina y Tiamina.

El explante inicial en todos los ensayos consistió de dos brotes de cala de aproximadamente 1,5cm de longitud, el cual se colocó en un frasco Gerber® que contenía 20 ml de medio de cultivo. Para cada ensayo se establecieron tres repeticiones de 30 frascos cada uno.

El proceso de evaluación se realizó un mes y medio después de establecido cada ensayo. Se evaluó el rendimiento (número de brotes por explante) y el peso fresco y el peso seco, con el fin de obtener el índice de biomasa.

### **Micropropagación en medio líquido**

Con el fin de lograr una producción acelerada de cala in vitro se procedió a realizar dos ensayos utilizando la técnica de inmersión temporal y tomando como base el mejor tratamiento obtenido en los experimentos realizados en medio semi-sólido.

El medio de cultivo empleado fue un M&S + Fe-EDTA, sacarosa al 3% y un pH de 5,8; suplementado con, vitaminas L&S y 2,5mg/l de BAP. Los ensayos se mismo se colocaron a dos temperaturas  $25 \pm 2$  °C y  $22 \pm 2$  °C.

Las variables establecidas fueron las siguientes:

Volumen de medio por RITA: 200 ml.

Densidad de siembra : 30 plantas por RITA.

Período de inmersión: 2 minutos.

Frecuencia de inmersión: 2 veces al día.

## RESULTADOS

### Establecimiento *in vitro*

En el cuadro 2 se observan los resultados obtenidos en las introducciones llevadas a cabo con diferentes longitudes de yemas (de 4 a 9mm, 3,72mm promedio y 2,6 mm promedio) y colocadas a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C

**Cuadro 2** Introducción de cala (*Zantedeschia sp* x variedades silvestres).

Introducciones	Tamaño de yema	Porcentaje de Contaminación	Porcentaje de Oxidación	Porcentaje de Supervivencia
1	4 a 9 mm	71%	21,87%	6,25%
2	3,72 mm	48%	28%	24%
3	2,6 mm	56%	28%	17%

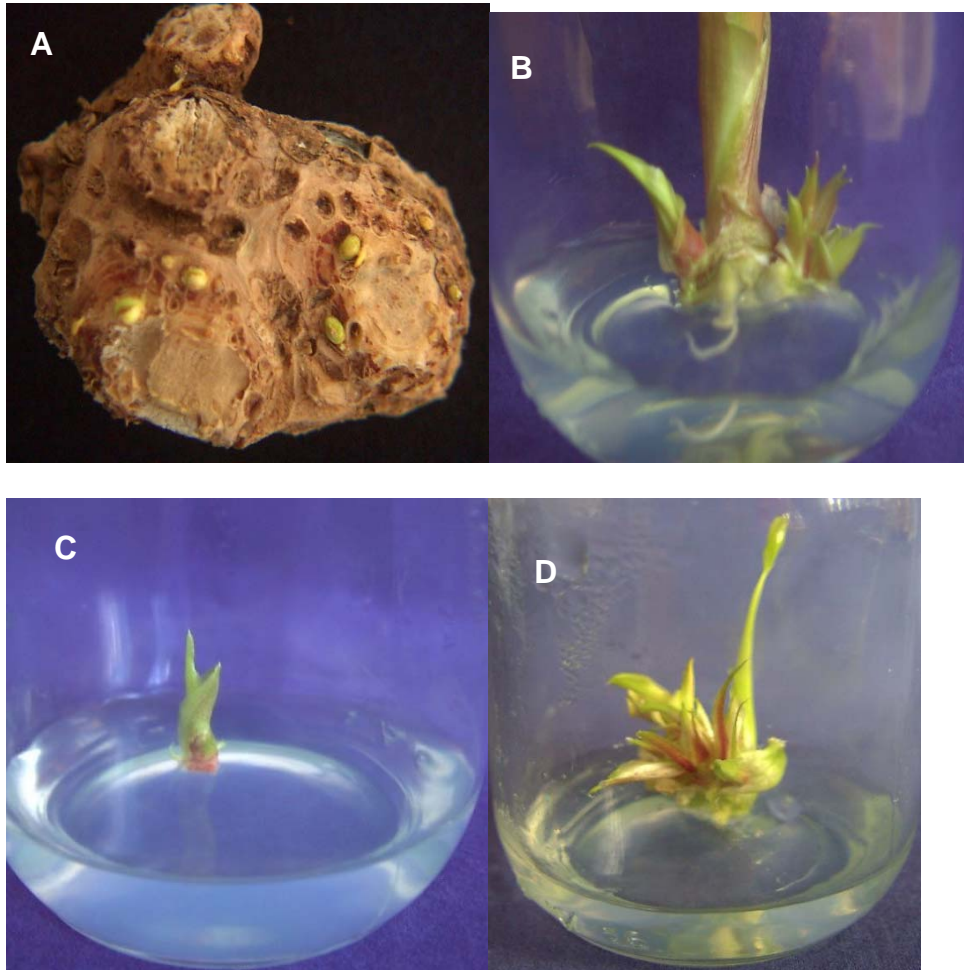
Fuente: CIB

En el cuadro 3 se observan los resultados obtenidos de las introducciones llevadas a cabo con diferentes longitudes de yemas (de 4 a 9mm, 3,72mm promedio y 2,6 mm promedio) y colocadas a una temperatura de  $22 \pm 2$ °C .

**Cuadro 3** Introducción de cala (*Zantedeschia sp* x variedades silvestres).

Introducciones	Tamaño de yemas	Porcentaje de Contaminación	Porcentaje de Oxidación	Porcentaje de Supervivencia
1	4 a 9 mm	75%	19%	6%
2	3,72 mm	58%	13%	29%
3	2,6 mm	67%	28%	6%

Fuente: CIB



**Figura 1** Establecimiento *in vitro* de cala. **A.** Cormo de cala brotado. **B.** Primera introducción utilizando yemas con longitud de 4mm a 9mm. **C.** Segunda introducción utilizando yemas de 3,72mm longitud promedio. **D.** Tercera introducción empleando yemas de 2,6mm de longitud promedio.

## Multiplicación

Para el establecimiento del protocolo de micropropagación se realizaron 8 tratamientos en el cuadro 4 se observan los resultados.

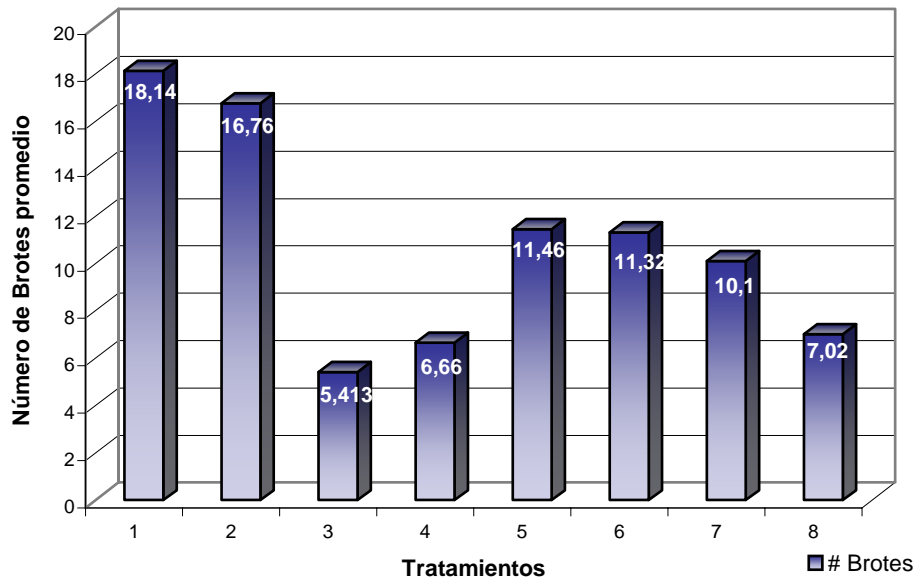
**Cuadro 4** Rendimiento promedio de los tratamientos para micropropagación de *cala (Zantedeschia sp x variedades silvestres)*.

Tratamientos N°	Rendimiento promedio/ explante	Grupos Homogéneos
1	18,14	I
2	16,76	I
3	5,41	I
4	6,66	I I
5	11,46	I
6	11,32	I
7	10,10	I I
8	7.02	I I I

Fuente: CIB

Tratamientos	N°1	Sales M&S, Vitaminas L&S, BAP, 25 ± 2 °C
	N°2	Sales M&S, Vitaminas L&S, BAP, 22 ± 2 °C
	N°3	Sales M&S, Vitaminas L&S, Kinetina, 25 ± 2 °C
	N°4	Sales M&S, Vitaminas L&S, Kinetina, 22 ± 2 °C
	N°5	Sales y vitaminas M&S, BAP, 25 ± 2 °C
	N°6	Sales y vitaminas M&S, BAP, 22 ± 2 °C
	N°7	Sales y vitaminas M&S, Kinetina, 25 ± 2 °C
	N°8	Sales y vitaminas M&S, Kinetina, 22 ± 2 °C

En el cuadro 4 y la figura 2 se observa que los tratamientos N°1 y N°2 presentan la mayor cantidad de brotes, en contraste con el tratamiento N°3 en el que se obtuvo el menor rendimiento.



**Figura 2** Número de brotes obtenidos en los tratamientos en medio semi-sólido. CIB, ITCR, 2001

El cuadro 5 muestra el peso fresco promedio y el peso seco promedio obtenidos, para los ensayos realizados, los tratamientos 1 y 5 fueron los que presentaron el mayor índice de biomasa.

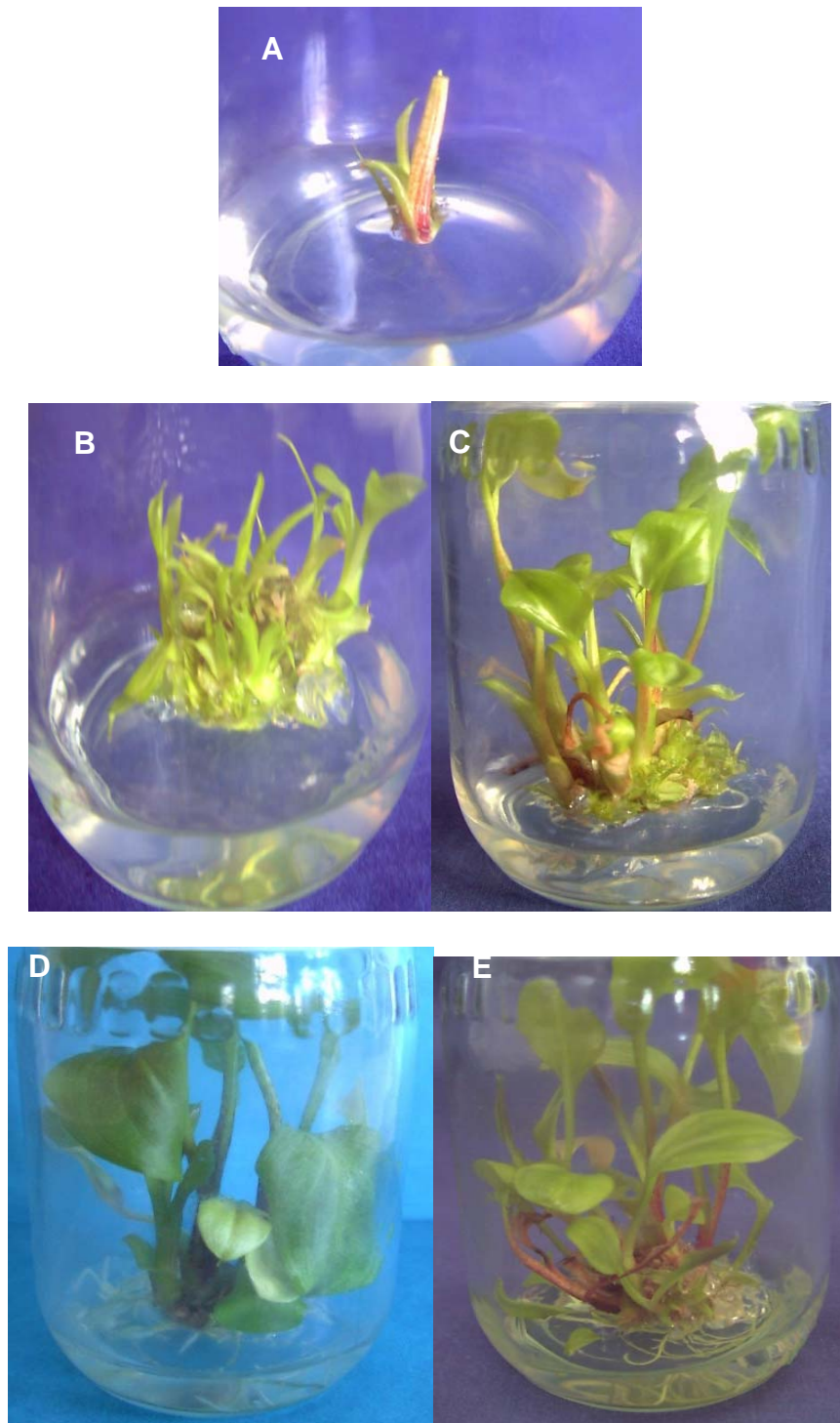
**Cuadro 5** Índice de Biomasa para los tratamientos de micropropagación de caña (*Zantedeschia sp* x variedades silvestres).

Tratamientos N°	Peso fresco promedio	Peso seco promedio	Índice de Biomasa
1	4,76	0,48	10%
2	4,88	0,46	5,52%
3	3,04	0,18	5,95%
4	2,46	0,13	5,36%
5	3,77	0,30	8,06%
6	2,18	0,16	7,22%
7	4,24	0,28	6,65%
8	2.35	0,18	7,66%

Fuente: CIB

Tratamientos	N°1	Sales M&S, Vitaminas L&S, BAP, 25 ± 2 °C
	N°2	Sales M&S, Vitaminas L&S, BAP, 22 ± 2 °C
	N°3	Sales M&S, Vitaminas L&S, Kinetina, 25 ± 2 °C
	N°4	Sales M&S, Vitaminas L&S, Kinetina, 22 ± 2 °C
	N°5	Sales y vitaminas M&S, BAP, 25 ± 2 °C
	N°6	Sales y vitaminas M&S, BAP, 22 ± 2 °C
	N°7	Sales y vitaminas M&S, Kinetina, 25 ± 2 °C
	N°8	Sales y vitaminas M&S, Kinetina, 22 ± 2 °C





**Figura 3** Micropropagación de cala en medio semi-sólido a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C. **A.** Explante inicial. **B.** Tratamiento N°1 (Vitaminas L&S, BAP). **C.** Tratamientos N°5(Vitaminas M&S, BAP). **D.** Tratamientos N°3 (Vitaminas L&S. Kinetina). **E.** Tratamientos N°7(Vitaminas M&S. Kinetina).

La figura 3 muestra la brotación obtenida mediante el cultivo en medio semi-sólido, se notó como a partir de un explante inicial de 2 brotes se obtuvo una brotación mayor en el tratamiento N°1, mientras que para el tratamiento N°5 la brotación disminuyó sensiblemente y para los tratamientos N°3 y N°7 la brotación fue muy poca y se presentó formación de raíces.

### Sistema de inmersión temporal

En el cuadro 6 se observan los resultados de los tratamientos en el sistema de inmersión temporal.

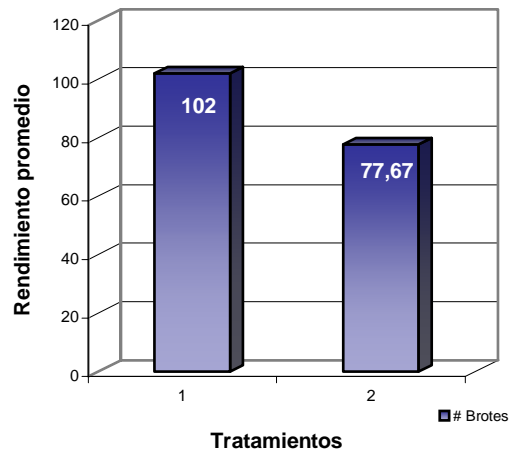
**Cuadro 6** Rendimiento promedio de los tratamientos de micropropagación de *Zantedeschia sp* x variedades silvestres en medio líquido

Tratamientos N°	Rendimiento promedio/RITA	Rendimiento promedio/explante
1	102	3.40
2	77,67	2.589

Fuente: CIB

Tratamientos	N°1	Sales M&S, Vitaminas L&S, BAP, 25 ± 2 °C
	N°2	Sales M&S, Vitaminas L&S, BAP, 22± 2 °C

En la figura 4 se observan los resultados obtenidos para los tratamientos en medio líquido. El tratamiento N°1 presenta la mayor cantidad de brotes/RITA.



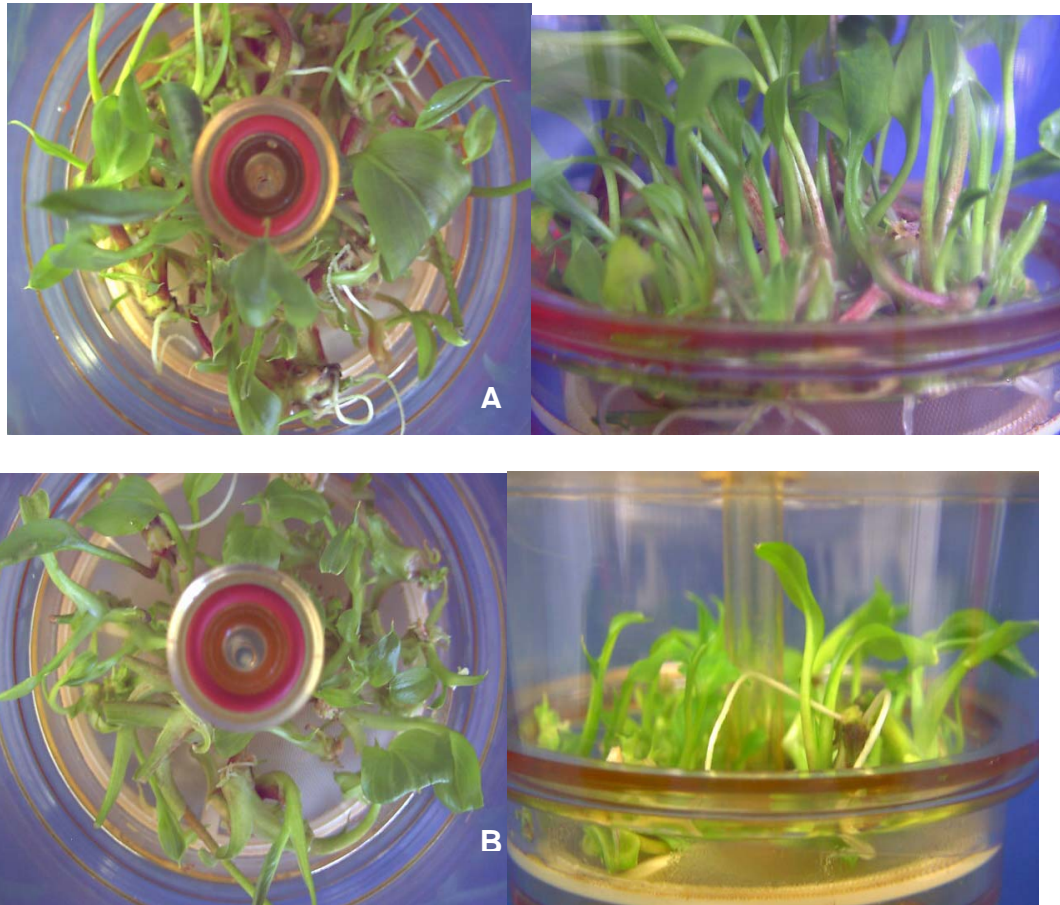
**Figura 4** Número de brotes/RITA obtenidos en medio líquido. CIB, ITCR, 2001

El cuadro 7 muestra el peso fresco promedio y el peso seco promedio obtenidos, además se indica el índice de biomasa para los tratamientos en el sistema de inmersión temporal de cala.

**Cuadro 7** Índice de Biomasa de cala (*Zantedeschia sp* x variedades silvestres) para los tratamientos en sistema de inmersión temporal.

Tratamientos N°	Peso fresco	Peso seco	Índice de Biomasa
1	0,984	0,083	8,46%
2	0,425	0,012	2,74%

Fuente: CIB



**Figura 6** Micropropagación de cala en medio líquido. **A.** Tratamiento 1 ( $25 \pm 2$  °C) **B.** Tratamiento 2 ( $22 \pm 2$  °C)

El cuadro 8 muestra de forma comparativa el rendimiento promedio de número de brotes/ explante, en donde se obtuvo un mejor resultado en el tratamiento N°1 utilizando medio semi-sólido.

**Cuadro 8** Comparación de promedio de brotes/explante producidos en medio semi-sólido y utilizando la técnica de inmersión temporal

<b>Tratamientos</b>	<b>Rendimiento promedio brotes/explante</b>
N°1 medio semi-sólido	18,14
N°1 medio líquido	3,4
N°2 medio líquido	2,589

Fuente: CIB

## DISCUSIÓN

Para el establecimiento *in vitro* de una planta se deben de tomar en cuenta varios factores entre los cuales se deben citar, la procedencia del material vegetal, los tratamientos previos a su introducción, así como la parte de la planta de donde se obtiene el explante inicial, ya que conociendo estas condiciones se establece el procedimiento a seguir para lograr una buena desinfección.

Para el establecimiento *in vitro* de cala se utilizó como explante inicial yemas provenientes de cormos, por lo cual se aplicó un proceso de desinfección fuerte con el fin de lograr su limpieza, sin embargo en algunos casos se presentó maltrato de las yemas.

Un factor importante a considerar es el tamaño de las yemas que van a ser desinfectadas, ya que si se utilizan yemas de 4 a 9 mm de longitud las posibilidades de contaminación fungosa y bacteriana (Cuadro 2 y 3, Anexo 5) son mayores, si se emplean yemas muy pequeñas, menos de 2,6 mm es probable que mueran en el proceso.

Al comparar los resultados obtenidos en los procesos de desinfección se determinó que al utilizar yemas de 4 a 9 mm de longitud se presentó un 71% y un 75% de contaminación a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C y a  $22 \pm 2$  °C respectivamente. Cuando se emplearon yemas de 3,72 mm se logró el menor porcentaje de contaminación, un 48% a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C y un 58% a  $22 \pm 2$  °C. Sin embargo cuando el explante fue reducido a un tamaño de 2,6 mm el porcentaje de contaminación nuevamente se incrementó a 50% y 67% en temperaturas de  $25 \pm 2$  °C y  $22 \pm 2$  °C respectivamente.

Las yemas de mayor tamaño se encontraban cubiertas por hojas coráceas lo cual sugiere que a pesar de que fueron eliminadas albergan gran cantidad de microorganismos, resultando más difícil el ingreso de las sustancias desinfectan-

tes (Agrimicin, Benlate y  $\text{CaClO}_2$ ) a estas áreas lo que limitó la efectividad de los productos.

En cuanto a la muerte del material vegetal por oxidación se observó que en la introducción N°1 expuesta a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C presentó el menor porcentaje de oxidación (21.78%). Debe indicarse que en esta introducción las yemas midieron de 4 a 9 mm de longitud, lo cual indica que sufrieron un menor maltrato en el proceso de desinfección.

El tamaño de las yemas en la etapa de establecimiento *in vitro* fue determinante, ya que entre más pequeñas eran las yemas (2,6 mm) estaban menos protegidas, por lo tanto más expuestas a los desinfectantes, lo cual produjo quemaduras al tejido durante el proceso de desinfección. Antes de la siembra *in vitro*, se trató de eliminarle al explante todo el tejido dañado, sin embargo el tamaño de las yemas en muchos de los casos no permitió realizar los cortes necesarios, por lo tanto al inocularse el explante en el medio de cultivo, el tejido maltratado formó un anillo de fenoles en la base que se encontraba en contacto con el medio, lo cual pudo provocar obstrucción de los conductos vasculares de las yemas limitando la absorción de nutrientes del medio además la contaminación por gases dentro del frasco de cultivo, pudieron haber provocado la muerte del explante.

En los cuadros 2 y 3 se observa que los mayores porcentajes de sobrevivencia se obtuvieron en la introducción N°2 a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C y a  $22 \pm 2$  °C en donde las yemas poseían un tamaño de 3,72 mm de longitud.

El porcentaje más bajo de sobrevivencia (6,25%) correspondió a la introducción N°1, en donde las yemas poseían un tamaño de 4 a 9 mm presentaron y se encontraban expuestas a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C, las yemas con una longitud de 4 a 9 mm y de 2,6 mm a expuestas a  $22 \pm 2$  °C presentaron un 6% de sobrevivencia.

Con base en estos resultados se determinó que las yemas de 3,72 mm de longitud, presentaron un tamaño apropiado para la introducción de cala, debido a que reunieron las características necesarias para resistir el proceso de desinfección con un riesgo relativamente bajo de maltrato, garantizando la eliminación de los microorganismos y la sobrevivencia del explante.

En estudios llevados a cabo por Ruiz *et al.*, en 1998 sobre el establecimiento *in vitro* de cala se reportó un 80% de contaminación bacteriana. También en una investigación similar efectuada por Bernal y López en el 2001 se obtuvieron porcentajes de contaminación cercanos al 90% en la fase de establecimiento *in vitro*.(Bernal *et al.*, 2001)

Esto demuestra que el procedimiento logrado en este estudio para el establecimiento *in vitro* de cala resultó positivo, ya que al comparar los datos de la segunda introducción (yemas de 3,72 mm) con las experiencias anteriormente citadas, la contaminación debida a microorganismos fue de un 48% a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C y de un 58% a una temperatura de  $22 \pm 2$ °C, aproximadamente un 30% menor que la reportada en la literatura.

Con el objetivo de establecer un protocolo para la micropropagación de cala se realizaron estudios preliminares con el fin comparar el comportamiento del explante inicial, si se utiliza uno o dos brotes. Se observó que con un brote el proceso de brotación fue muy lento y el material sufría un gran estrés; sin embargo, al utilizar dos brotes como explante inicial, se obtuvo una mejor respuesta y brotes de mayor calidad.

Al comparar los resultados de los tratamientos (fig. 2), se observa que en el tratamiento N° 1 (medio de cultivo M&S, con vitaminas L&S, 2,5mg/L de BAP y a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C), se obtuvo el mejor rendimiento, 18,14 brotes/explante, para el tratamiento N° 2 cuya única variable con respecto al tratamiento N° 1 fue la temperatura ( $22 \pm 2$ °C) y se obtuvo un rendimiento sensiblemente menor de 16,76 brotes.



Al comparar estadísticamente los ocho tratamientos (Anexo 1) se observó que existen cuatro grupos homogéneos, los cuales están compuestos por distintos tratamientos que no presentaron diferencias significativas entre sus promedios, sin embargo al efectuar las comparaciones entre cada grupo se determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos.

A pesar de que los tratamientos N°1 y N°2 fueron los que presentaron los mayores rendimientos promedio, se obtuvo que no existen diferencias significativas; sin embargo, al presentarse un mayor rendimiento promedio en el tratamiento N°1, se vuelve más atractivo en un proceso de producción comercial de cala (*Zantedeschia sp* x variedades silvestres), además en este tratamiento se observó una mejor calidad del material.

El uso de Kinetina como regulador de crecimiento, tuvo un efecto negativo, es así como en los tratamientos N° 3 y N° 4, se obtuvo una brotación de 5,4 y 6,6 brotes/explante. Cabe señalar que el empleo de la Kinetina indujo la formación de raíces. (Anexo 4)

Con respecto al uso de las vitaminas empleadas en el medio de cultivo, también se observaron diferencias en relación al rendimiento. Para los tratamientos cuya medio contenía vitaminas L&S los rendimientos fueron superiores al compararlos con los tratamientos cuyos medios se prepararon con las vitaminas M&S. (Cuadro 4, fig.2)

Por otra parte es notable el efecto de la interacción de las vitaminas y el regulador del crecimiento empleado, ya que las mezclas L&S + BAP y M&S + BAP produjeron mayores rendimientos en comparación con las mezclas L&S +Kinetina y M&S + Kinetina.

Con respecto a la calidad del material obtenido (Cuadro 5) se observó que el tratamiento N° 1 presentó los mejores resultados con un 10% de Índice de Biomasa, seguido por el tratamiento N° 5 con un 8,06%. En ambos casos el regulador de crecimiento empleado fue el BAP, lo cual concuerda con los resultados

de rendimiento obtenidos, ya que con la aplicación de esta citocinina se logró una buena inducción de brotes laterales, mientras que al utilizar Kinetina los índices de biomasa disminuyeron. Otro factor que influyó fue la temperatura a la cual se expuso el material, ya que ambos ensayos (Tratamientos N°1 y N°5) fueron colocados a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C, por lo tanto, esto evidencia que una temperatura más cálida favoreció la formación de brotes y el desarrollo de los mismos.

Con el objetivo de buscar técnicas alternativas para la producción masiva de caña, se realizó un estudio preliminar utilizando la técnica de inmersión temporal.

En este caso se realizaron pruebas con 2 tratamientos, para las cuales se tomó como base el tratamiento N°1 de los experimentos realizados en medio semi-sólido y se expuso el material a dos temperaturas.

A partir de estos ensayos se determinó el tratamiento N°1 (sales M&S, vitaminas L&S, 2,5 mg/L de BAP, a  $25 \pm 2$ °C), fue el mejor ya que se obtuvo un rendimiento de 102 brotes/RITA, mientras que en el tratamiento N°2 (sales M&S, vitaminas L&S, 2,5 mg/L de BAP, a  $22 \pm 2$ °C) se obtuvo un rendimiento de 77,67 brotes/RITA. En lo que se refiere a la calidad de los brotes se observó para el tratamiento N°1 un 8,43% de índice de biomasa, en comparación con el tratamiento N°2 en el cual se logró un 2,74%.

Algunas investigaciones realizadas por Debergh *et al*, en el año 1981, se demostraron que la disponibilidad de las citocininas, agua y sales minerales es diferente en medio semi-sólido vrs medio líquido, esto justifica el crecimiento acelerado de las vitroplantas en el medio de cultivo líquido, pues es importante señalar que mediante esta técnica los explantes en ambos tratamientos a los 4 días de haber sido colocados en las RITAs, empezaron a tomar polaridad dentro de las mismas y además se les observó un crecimiento significativo.

Tomando como base el análisis estadístico realizado (Anexo 2) resultó evidente las diferencias significativas en cuanto a brotación e índice de biomasa entre

ambos sistemas de cultivo *in vitro*, mientras que en medio semi-sólido se obtuvo un rendimiento promedio de 18,14 brotes/explante con la técnica de inmersión temporal se obtuvo un rendimiento de 3,40 brotes/explante.

Al analizar los datos correspondientes al índice de biomasa se observan pocas diferencias . Sin embargo al analizar el peso seco obtenido para ambos tratamientos la diferencia es mucho mayor, para el tratamiento en medio semi-sólido fue de 0,482 g y para el tratamiento en RITAs fue de 0,083 g en promedio.

Es así como en medio semi-sólido al haberse producido mayor cantidad de brotes se obtuvo un peso seco promedio mayor. Sin embargo al observar el material obtenido en ambos sistemas se puede concluir que fue de excelente calidad.

En relación al tiempo de evaluación, es importante resaltar que para los tratamientos en medio semi-sólido, la evaluación final fue al termino de un mes y medio, en el cual los explantes obtuvieron un tamaño adecuado, sin embargo para el sistema de inmersión temporal la evaluación final se realizó a los 22 días, pues como se comentó anteriormente hubo un crecimiento acelerado de las vitroplantas, lo que obligó a disminuir el tiempo de evaluación.

De acuerdo a los datos obtenidos en la implementación de la técnica de inmersión temporal para la etapa de micropropagación de cala (*Zantedeschia sp* x variedades silvestres), se observó una reducción significativa en el tiempo. Sin embargo se debe continuar investigando para optimizar la técnica, pues a pesar de que el material obtenido por esta técnica fue de buena calidad el rendimiento en producción de brotes fue muy bajo en comparación al sistema de producción en medio semi-sólido.

## CONCLUSIONES

- ✎ La selección del tamaño de la yema es fundamental para lograr establecer una desinfección eficiente en el cultivo *in vitro* de cala (*Zantedeschia sp*).
- ✎ El medio de cultivo más apropiado para la micropropagación fue el que contenía sales M&S, vitaminas L&S y 2,5mg/L de BAP, ya que fue en el se obtuvo el mayor rendimiento (18,14 brotes/explante)
- ✎ A una temperatura de  $25 \pm 2$  °C se logró el mejor desarrollo de los brotes.
- ✎ La utilización del sistema de inmersión temporal contribuyó a la simplificación de las labores en cuanto a micropropagación y además redujo el tiempo de producción de material.
- ✎ El material obtenido mediante ambas técnicas de micropropagación (medio semi-sólido y medio líquido) fue de buena calidad, sin embargo el sistema de inmersión temporal presentó un bajo rendimiento.

## RECOMENDACIONES

- ✎ Para obtener buenos resultados en la introducción de cala se deben utilizar yemas de 3,5 mm aproximadamente.
- ✎ Utilizar dos brotes como explante inicial para la micropropagación de cala es recomendable para obtener mayor brotación y material de mejor calidad.
- ✎ El uso de Kinetina como regulador de crecimiento debe ser disminuido, ya que a una dosis de 2,5 mg/L provocó una fuerte inducción de raíces.
- ✎ Se deben continuar los estudios en la aplicación de la técnica de inmersión temporal en esta etapa de micropropagación de cala, tratando de que los brotes no se desarrollen de forma acelerada y se logre incrementar el rendimiento promedio

## LITERATURA CONSULTADA

Bernal, M; López, E. 2001." Contribución al estudio del control de la contaminación endógena con antibióticos y evaluación de la brotación lateral mediante 2 niveles de la hormona Bencil Amino Purina (BAP), en el cultivo "in vitro" de *Zantedeschia aethiopica*" 15 Junio, 2001. Disponible en: <http://ng.netgate.net/~kk/Zantedeschia/aethiopica.html>

Berthouly, M; Dufour, M; Carrasco, C; Alvard, D y Teisson, C. 1995."El sistema de inmersión Temporal: Un método de propagación in vitro del café en medio líquido". En: XVII Simposio Sobre caficultura Latinoamericana 23 al 27 de octubre 1995. Memoria Resumen Promecafé, San Salvador, El Salvador. pp 34

Connor, A; Meredith, C. 1984. An improved polymethane support system for monitoring growth in plant cell cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 3:59-68.

Debergh, P; Harbaoui, Y; Lemeur, R. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol. Plant.* 53: 181-187

Etienne, H; Solano, W; Pereira, A; Etienne, D.B; Berthouly M; Bertrand, B; Anthony, F; Cote, F. 1997. La propagación masal de los híbridos F1 de cafés arábigos *Boletín-Promecafe*, No 80,11-15.

- Evans, D. 1986. Applications of somaclonal variation. *Biotechnology* 4: 528-532
- Garden Guides. 2000. "Summer Bulb Guide *Zantedeschia*". 5 Abril, 2001.  
Disponible en: [http:// www.gardenguides.com/flowers/bulbs/calla.htm](http://www.gardenguides.com/flowers/bulbs/calla.htm)
- Jacobs, F. 2001. 2 Octubre,2001. Disponible en: [www.ediho.es/horticom/tem-aut/mat-veg/calla.html](http://www.ediho.es/horticom/tem-aut/mat-veg/calla.html)
- Mok, M; Martín, R y Mok, D. 2000. Cytokinins: Biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cell, Dev. Biol - Plant* 36: 102-107
- Murrel, M. 2000. Establecimiento de un sistema de inmersión temporal para la micropropagación y el enraizamiento de *Bergenia spp* Var. *Herbstblüte*. Informe final de Práctica de Especialidad. ITCR, Cartago, Costa Rica. pp 4-5.
- Murphy, S. 1999. "Zantedeschia" 5 Abril, 2001. Disponible en:  
<http://www.sd1new.net/GardenPages/callalily.htm>
- Roca, W; Mroginski, L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. p.274-291
- Ruiz, G; Márquez, E y Flores, C. 1998. Research Note: *Zantedeschia aethiopica* propagation by tissue culture. XXXXII Annual Meeting, Guatemala, 1-4 September, 1997. Proceeding of the Interamerican Society for Tropical Horticulture. Guatemala. P. 193-194
- Salisbury, F y Ross, C. 1995. Fisiología Vegetal. 4 ed. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. de C.V. México D.F., México. p 772-774.

- Teisson, C; Alvard, D. 1994. A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary inmersión. VIIIth. Congress of Plant Tissue and Cell Culture (ppS2-2) Firenze, Italy. Book of Abstracts. pp25.
- Teisson, C; Alvard D, 1998. In vitro propagation of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion, Conf. Potato seed production by tissue culture, Brussels, Cost 822, European Commission
- Topete, M; Torres, L; Ramírez, M; Herrera, M; Galindo, E. 1991. VOL 17 #9 Ciencia y desarrollo. Avances en los sistemas de cultivo masivo de células vegetales. Julio-Agosto. pp36-40
- Zettler, F; Hiebert, E; Rodoni, B. 1986. "Plant Viruses Online. Dasheen mosaic potyvirus" 20 Junio, 2001. Disponible en:  
<http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>



# ANEXO 1

## Comparación entre medias

Tabla de datos

Tratamientos N°	Repeticiones		
	1	2	3
1	14,77	20,43	19,23
2	17,37	17,37	15,53
3	4,37	5,17	6,7
4	7,5	6,47	6
5	10,97	11,97	11,43
6	10,4	11,43	12,13
7	10,67	9,97	9,67
8	6,33	6,9	7,83

## Análisis de varianza

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Probabilidad
Tratamientos	7	453,11	64,73	37,37	0.000
Error	16	27,72	1,73		
Total	23	480,83			

Al ser la Fcalculada (37,37) notoriamente superior a la probabilidad (0,000) este análisis indica que hay grandes diferencias significativas entre los tratamientos.

## Prueba de Tukey

Cálculo del valor crítico DMS

$$DMS = q_{\alpha} S_x$$

En donde:

$$S_x = \text{error estándar de la media} = \sqrt{S^2/n}$$

$S^2$  = cuadrado medio del error calculado para los tratamientos y repeticiones en medio semi-sólido

$n$  = número de valores utilizados para calcular la media en tratamientos y repeticiones en medio semi-sólido.

$q_{\alpha}$  = valor tabular para prueba de Tukey\*

\* el valor tabular se extrae de la tabla mediante el número de promedios de los tratamientos, los grados de libertad del error y la precisión del experimento  $\alpha$ . Para el 5% y el 1%.

## Análisis estadístico de resultados

$$\text{Número de comparaciones} = x(x-1)/2 = 8(7)/2 = 28$$

$$S^2 = 1,73$$

$$n = 24$$

$$q_{\alpha} = 5\% = 4,99$$

$$S_x = 0,27$$

$$1\% = 6,26$$

$$DMS_{5\%} = 1,34$$

$$DMS_{1\%} = 1,68$$

Prueba de Tukey para comparación de las medias del número de brotes por tratamiento, con una precisión del 5%

Tratamientos N°	Medias	Grupos Homogéneos
1	18.143	I
2	16.757	I
5	11.457	I
6	11.320	I
7	10.103	I I
8	7.0200	I I
4	6.6567	I I
3	5.4133	I

Prueba de Tukey para comparación de las medias del número de brotes por tratamiento, con una precisión del 1%

Tratamientos N°	Medias	Grupos Homogéneos
1	18.143	I
2	16.757	I
5	11.457	I
6	11.320	I
7	10.103	I I
8	7.0200	I I I
4	6.6567	I I
3	5.4133	I

Existen cuatro grupos homogéneos entre los tratamientos, los cuales presentan diferencias significativas entre ellos.

# ANEXO 2

## Prueba de hipótesis para dos medias

Estadísticos de prueba

$$Z = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

En donde:

$X_1$  = valor promedio del tratamiento en medio líquido.

$\sigma_1^2$  = varianza obtenida del tratamiento en medio líquido.

$n_1$  = número de individuos que componen el tratamiento en medio líquido.

$X_2$  = valor promedio del tratamiento en medio semi-sólido.

$\sigma_2^2$  = varianza obtenida del tratamiento en medio semi-sólido.

$n_2$  = número de individuos que componen el tratamiento en medio semi-sólido.

**TABLA DE DATOS**  
(rendimiento)

Tratamiento 1 Medio semi-sólido (M&S, Vitaminas L&S, BAP, 25 ± 2°C)					
17	17	20	15	23	14
10	19	15	21	22	18
16	16	18	18	17	21
19	19	1	24	20	16
12	23	15	20	20	17
18	20	19	21	23	21
12	22	17	15	21	16
17	17	20	19	22	23
11	21	5	21	19	18
14	22	13	23	19	29
13	27	18	19	25	16
12	21	20	28	15	24
15	19	18	14	21	19
15	20	16	30	16	19
3	16	14	21	21	7

Tratamiento 1 Medio líquido (M&S, Vitaminas L&S, BAP, 25 ± 2°C)				
3	1	9	3	1
7	3	16	3	1
6	2	2	2	1
3	3	13	7	1
7	4	6	2	2
8	7	8	3	1
3	2	2	9	2
5	3	6	3	1
4	1	1	5	3
4	1	4	1	3
3	6	1	1	
6	13	1	1	
2	18	8	3	
4	3	2	1	
3	16	1	3	

**Análisis estadístico de resultados**

Ho: No existe diferencia significativa ( $\mu_1 - \mu_2 = 0$ )

Ha: Existe diferencia significativa ( $\mu_1 - \mu_2 < 0$ )

$X_1 = 102$

$X_2 = 18,14$

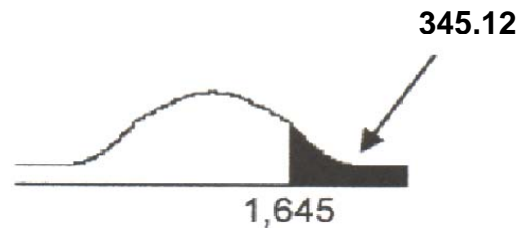
$\sigma_1^2 = 13,99$

$\sigma_1^2 = 21,76$

$n_1 = 306$

$n_1 = 1633$

$Z = 345,12$



R/ Se rechaza la hipótesis nula, existen diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a su rendimiento, con una precisión del 5%

## TABLA DE DATOS

(Biomasa)

Tratamiento 1 Medio semi-sólido (M&S, Vitaminas L&S, BAP, 25 + 2°C)		
0,32	0,35	0,35
0,25	0,34	0,34
0,22	0,38	0,38
0,34	0,34	0,34
0,21	0,54	0,54
0,36	1,21	1,21
0,29	0,32	0,32
0,22	1,91	1,91
0,28	0,62	0,62
0,26	0,23	0,23

Tratamiento 1 Medio líquido (M&S, Vitaminas L&S, BAP, 25 + 2°C)		
0,08	0,08	0,06
0,14	0,21	0,08
0,04	0,16	0,05
0,1	0,06	0,02
0,12	0,09	0,02
0,08	0,11	0,03
0,09	0,09	0,02
0,17	0,09	0,02
0,1	0,11	0,04
0,02	0,13	0,09

### Análisis estadístico de resultados

Ho: No existe diferencia significativa ( $\mu_1 - \mu_2 = 0$ )

Ha: Existe diferencia significativa ( $\mu_1 - \mu_2 < 0$ )

$$X_1 = 0,083$$

$$X_2 = 0,508$$

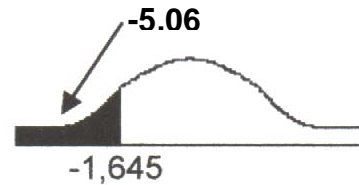
$$\sigma_1^2 = 0,002$$

$$\sigma_2^2 = 0,204$$

$$n_1 = 30$$

$$n_2 = 30$$

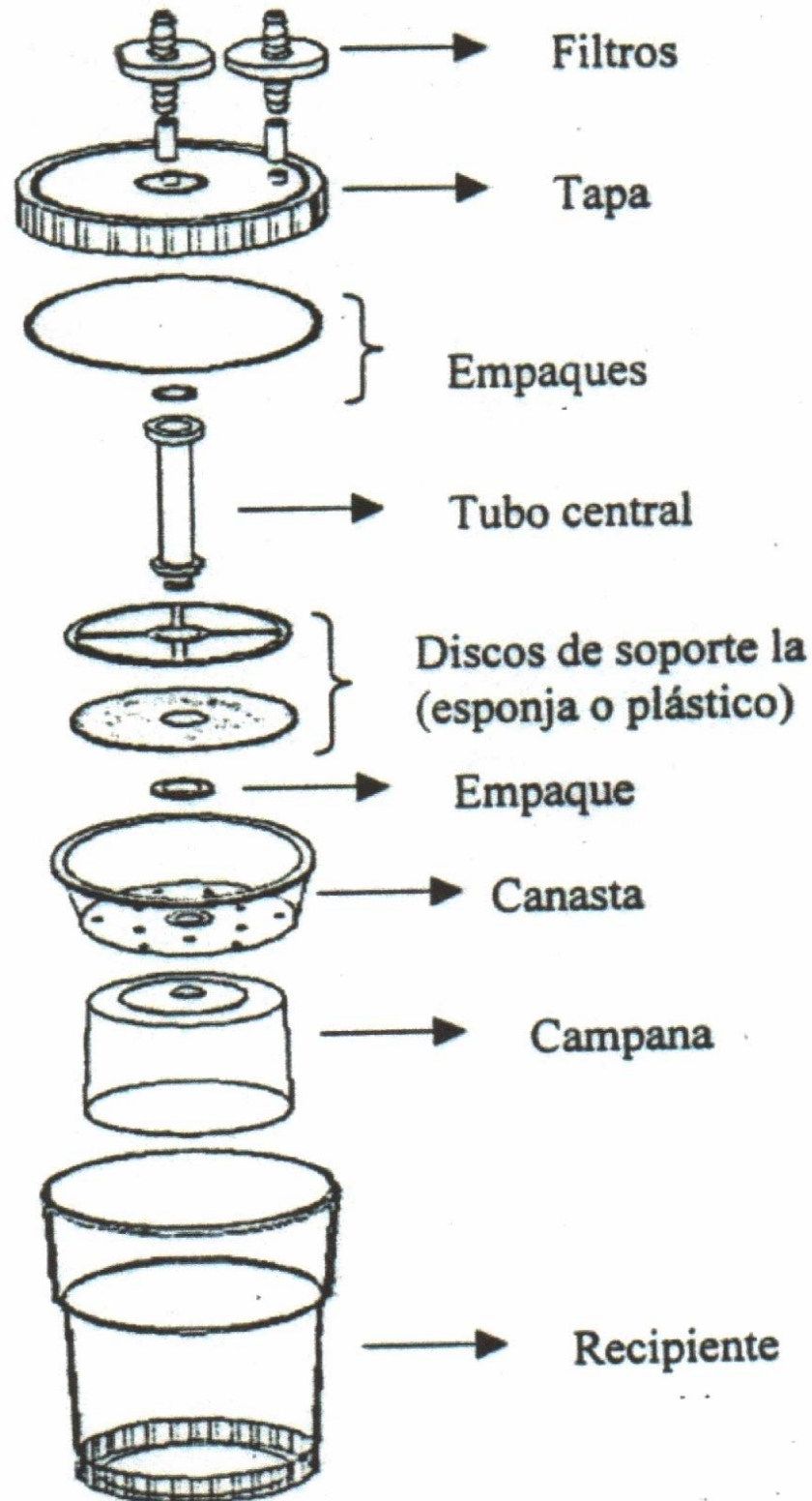
$$Z = -5,06$$



R/ Se rechaza la hipótesis nula, existen diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a su rendimiento, con una precisión del 5%



# ANEXO 3



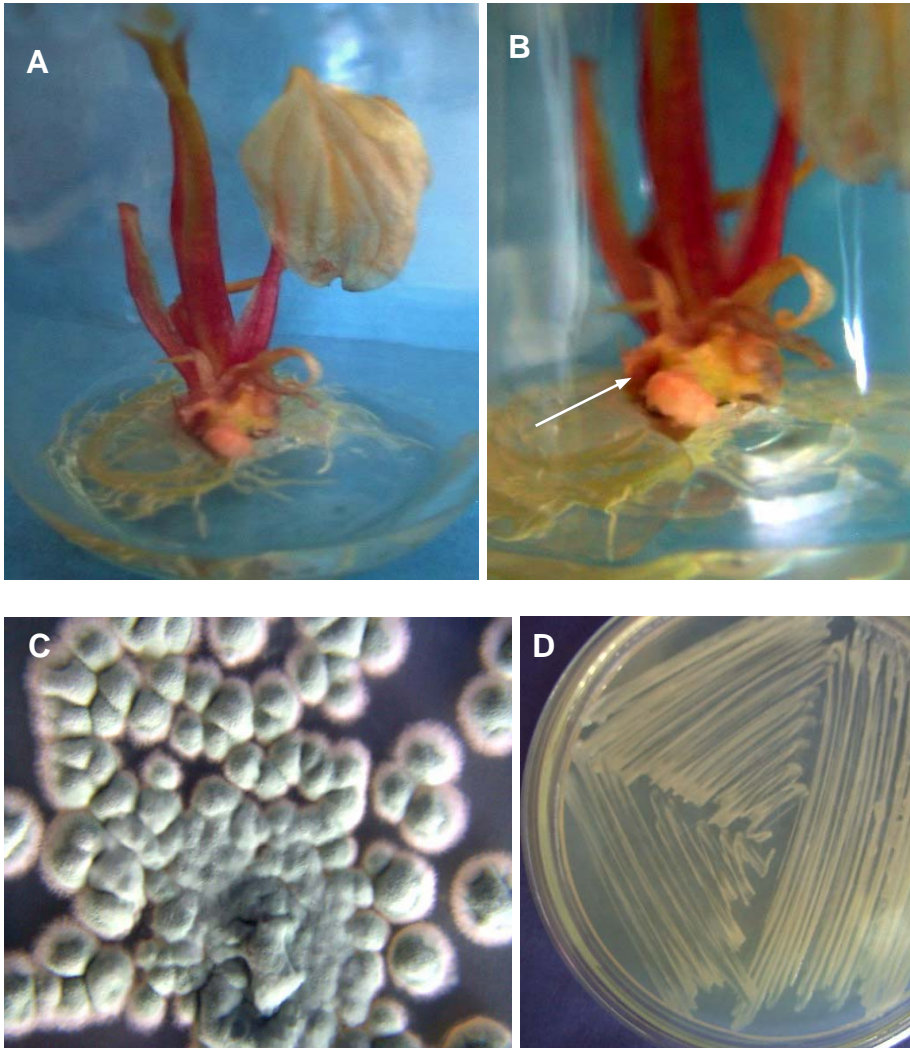
Esquema del Recipiente de Inmersión Temporal Automático (RITA)

# ANEXO 4



Vitroplanta de cala enraizada por la presencia de Kinetina

# ANEXO 5



Contaminación del cultivo *in vitro* de cala (*Zantedeschia sp* x variedades silvestres). **A.** Planta enferma **B.** Detalle de bacteria contaminante. **C.** Cultivo de hongo no identificado. **D.** Cultivo de bacteria no identificado.