

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

Montserrat Jarquín Cordero ¹
Dora María Flores Mora ²

Resumen

Este estudio se realizó con el fin de establecer el protocolo de desinfección y micropropagación de cala (*Zantedeschia* sp. x variedades silvestres) en medio semi-sólido.

El mejor tratamiento de desinfección se logró cuando se utilizaron yemas de 3,72 mm de longitud en promedio. Con respecto a la etapa de micropropagación, el mayor rendimiento promedio (18.14 brotes/explante) se obtuvo en un medio M&S, con vitaminas L&S, suplementado con 2,5mg/L de BAP y expuestos a una temperatura de 25 + 2 °C.

Palabras clave

Zantedeschia, cala, micropropagación.

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, la reducción en el ciclo de crecimiento y la obtención de plantas con una mejor calidad fitosanitaria.

Costa Rica tradicionalmente ha basado su economía en la exportación de productos 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 con las exigencias del mercado nacional e internacional.

Las calas son plantas herbáceas y acuáticas frágiles, de caducidad perenne,

¹ Ingeniería Biotecnóloga. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

² Profesora e investigadora del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

y nativas de Suráfrica. Se pueden plantar en invernaderos, a una temperatura mínima de 50 °F o en exteriores que presenten condiciones de clima templado. Estas plantas son cultivadas principalmente debido a la belleza de 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 (Zettler, *et al.*, 1986).

Metodología

La investigación se realizó en el Centro de Investigación en Biotecnología en la Sede Central del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Establecimiento *in vitro*

El establecimiento *in vitro* de la cala (*Zantedeschia* sp. x variedades silvestres) se realizó a partir de yemas de diferentes tamaños.

Desinfección del material

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 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 (CaClO_2) al 6% por 6 minutos en la bomba de vacío, y se trasladaron a la cámara de flujo laminar en donde se aplicaron tres lavados con agua bidestilada estéril. Nuevamente se colocaron en una solución de hipoclorito de calcio al 4% durante 5 minutos; se efectuaron cuatro lavados más con agua destilada estéril y por último se procedió a inocular los

explantes en un medio 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: 25 ± 2 °C y 22 ± 2 °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. 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 mismo medio de cultivo y a las mismas temperaturas mencionadas anteriormente.

Micropropagación en medio de cultivo semi-sólido

Para determinar el mejor medio de cultivo se realizaron diferentes tratamientos, 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 entre tratamientos se observan en el Cuadro 1.

El explante inicial consistió de dos brotes de cala de 1,5 cm de longitud en promedio, 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.

La evaluación se realizó un mes y medio después de establecido cada ensayo. Las variables evaluadas fueron: rendimiento (número de brotes por explante), peso fresco y peso seco, con el fin de obtener el índice de biomasa.

Análisis estadístico de los resultados

Para analizar los resultados obtenidos entre los tratamientos (Rendimiento promedio/explante), se realizó la prueba

Cuadro 1
Tatamientos para la micropropagación de cala
(*Zantedeschia* sp. x variedades silvestres).

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

Fuente: Datos de laboratorio.

¹ Vitaminas L&S: Tiamina y Myo-inositol.

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

de Tuckey para la comparación de medias.

Resultados y discusión

Establecimiento in vitro

Para el establecimiento *in vitro* se debe tomar en cuenta la procedencia del material vegetal, así como la parte de la planta de donde se obtiene el explante inicial.

En los Cuadros 2 y 3 se observan los resultados obtenidos en las introducciones llevadas a cabo con diferentes tamaños de yemas y

Cuadro 2
Introducción de cala (*Zantedeschia* sp. x variedades silvestres), a 25 ± 2 °C.

Introducciones	Tamaño de yema	Porcentaje de contaminación	Porcentaje de oxidación	Porcentaje de sobrevivencia
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: Datos de laboratorio.

Cuadro 3
Introducción de cala (*Zantedeschia* sp. x variedades silvestres), a 22 ± 2 °C.

Introducciones	Tamaño de yemas	Porcentaje de contaminación	Porcentaje de oxidación	Porcentaje de sobrevivencia
1	4 a 9 mm	75%	19%	6%
2	3,72 mm	58%	13%	29%
3	2,6 mm	67%	28%	6%

Fuente: Datos de laboratorio.

colocadas a dos temperaturas: $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente.

Al comparar los resultados obtenidos en los procesos de desinfección (Cuadros 2 y 3) se determinó que, al utilizar yemas de 4 a 9 mm de longitud, se presentó un 71% y un 75% de contaminación a temperaturas de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente. Cuando se emplearon yemas de 3,72 mm se logró el menor porcentaje de contaminación, un 48% a una temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y un 58% a $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Sin embargo cuando el explante fue reducido a un tamaño de 2,6 mm, el porcentaje de contaminación nuevamente se incrementó a 56% y 67% en temperaturas de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente.

Las yemas de mayor tamaño se encontraban cubiertas por hojas coráceas, lo cual sugiere que albergaban gran cantidad de microorganismos y, además, limitaron el ingreso de las soluciones desinfectantes (Agrimicin, Benlate y CaClO_2) a estas áreas, lo que disminuyó la efectividad de los productos.

En relación al porcentaje de oxidación, se observó que las yemas de mayor tamaño expuestas a temperaturas de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ presentaron los menores porcentajes.

El tamaño de las yemas en la etapa de establecimiento *in vitro* es determinante; cuanto más pequeñas eran las yemas (2,6 mm) estaban menos protegidas, por lo tanto, más expuestas a los desinfectantes, produciéndose quemaduras en el tejido durante el proceso de desinfección.

Antes de la siembra *in vitro*, se le eliminó al explante el tejido dañado; sin embargo, en muchos casos no se lograron realizar los cortes necesarios debido al tamaño. Al inocularse el explante en el medio de cultivo, el tejido maltratado formó un anillo de fenoles en la base, lo cual pudo



Figura 1
Establecimiento *in vitro* de cala con yemas de 3,72 mm en promedio.

provocar obstrucción de los conductos vasculares de las yemas, limitando la absorción de nutrientes del medio; además, la presencia de gases dentro del frasco de cultivo también pudo contribuir a la muerte del explante.

Los mayores porcentajes de sobrevivencia se obtuvieron en la segunda introducción a temperaturas de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, en donde las yemas poseían un tamaño de 3,72 mm en promedio. (Cuadros 2 y 3).

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).

En el presente estudio el procedimiento logrado para el establecimiento *in vitro* de cala resultó positivo, ya que al comparar los resultados de porcentaje de contaminación para la segunda introducción (48% y 58% a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente) con

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

Tratamientos N°	Rendimiento promedio/ explante	Grupos homogéneos		
1	18,14			
2	16,76			
3	5,41			
4	6,66			
5	11,46			
6	11,32			
7	10,10			
8	7,02			

Nivel de significancia según Prueba de Tuckey ($p < 0.01$).

las experiencias anteriormente citadas, la contaminación provocada por microorganismos fue aproximadamente un 30% menor.

Multiplicación

Se realizaron estudios preliminares con el fin de determinar si se utilizaban una o dos yemas como explante inicial. Se



Figura 2
Micropropagación en medio
semi-sólido, explante inicial.

observó que, con una yema, el proceso de brotación era muy lento y el material sufría estrés; sin embargo, al utilizar dos yemas, se obtuvo una mejor respuesta y brotes de mayor calidad.

Para el establecimiento del protocolo de micropropagación se realizaron 8 tratamientos. En el Cuadro 4 y Fig. 2 se observan los resultados obtenidos.

Al comparar los resultados obtenidos en el Cuadro 4, se observa que el tratamiento 1 (medio de cultivo M&S, con vitaminas L&S, 2,5mg/L de BAP y a una temperatura de $25 + 2$ °C), se obtuvo el mayor rendimiento, 18,14 brotes/explante. Para el tratamiento 2, cuya única variación con respecto al tratamiento 1 fue la temperatura ($22 + 2$ °C), se obtuvo un rendimiento sensiblemente menor (16,76 brotes).

A pesar de que los tratamientos 1 y 2 presentan diferencias en sus rendimientos promedio, no existen diferencias estadísticas significativas entre ellos; sin embargo, al presentarse un mayor rendimiento promedio en el tratamiento 1, se vuelve más atractivo en un proceso de producción comercial de cala



Figura 3
Micropropagación
de cala Tratamiento 1.

(*Zantedeschia* sp. x variedades silvestres); además, en este tratamiento se observó una mejor calidad del material.

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

Con respecto a la interacción de las vitaminas empleadas en el medio de cultivo y el regulador del crecimiento, también se observaron diferencias en relación al rendimiento. Para los tratamientos cuya medio contenía vitaminas L&S o M&S y suplementados con BAP, los rendimientos fueron superiores (T_1, T_2, T_5, T_6) al compararlos con el resto de los tratamientos (Cuadro 4).

El Cuadro 5 muestra el peso fresco promedio y el peso seco promedio obtenidos en los tratamientos.

Con respecto a la calidad del material obtenido (Cuadro 5) se observó que el tratamiento 1 presentó el mayor Índice de Biomasa (10%) seguido por el tratamiento 5 (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 1 y 5) fueron colocados a una temperatura de 25 ± 2 °C, evidenciándose que una temperatura más cálida favorece la formación de brotes y el desarrollo de los mismos.

Conclusiones

La selección del tamaño de la yema fue fundamental para garantizar la sobrevivencia del explante al proceso de desinfección y lograr una apropiada eliminación de los microorganismos.

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 en él se obtuvo el mayor rendimiento (18,14 brotes/explante).

A una temperatura de 25 ± 2 °C se logró el mejor desarrollo de los brotes.

Recomendaciones

Para la introducción de cala se recomienda utilizar yemas de 3,5 mm en promedio, con el fin de disminuir los porcentajes de contaminación.

Utilizar dos brotes como explante inicial y emplear las vitaminas M&S o L&S suplementadas con BAP es recomendable para obtener mayor brotación y material de mejor calidad.

El uso de Kinetina en dosis de 2,5 mg/L como regulador de crecimiento podría ser considerado para el enraizamiento *in vitro* de cala.

Cuadro 5

Índice de Biomasa en los tratamientos para la micropropagación de cala (*Zantedeschia* sp. x variedades silvestres).

Tratamientos N°	Peso fresco promedio	Peso fresco promedio	Índice de biomasa
1	4,76	0,48	10,00%
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: Datos de laboratorio.

Bibliografía

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>

Jacobs, F. 2001. 2 Octubre, 2001. Disponible en: www.ediho.es/horticom/tem-aut/mat-veg/calla.html.

Roca, W; Mroginski, L. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. pp. 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. pp.193-194.

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/vidé>.