

**Respuesta regenerativa *in vitro* de
Zamioculcas zamiifolia (Fam. Araceae) a
partir de explantes foliares**

Fabián Andrés Díaz Aguirre

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

**Respuesta regenerativa *in vitro* de
Zamioculcas zamiifolia (Fam. Araceae) a
partir de explantes foliares**

Proyecto especial presentado como requisito parcial
para optar al título de Ingeniero Agrónomo
en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

Fabián Andrés Díaz Aguirre

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2007

El autor concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Fabián Andrés Díaz Aguirre

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

**Respuesta regenerativa *in vitro*
de *Zamioculcas zamiifolia* (Fam. Araceae) a
partir de explantes foliares**

Presentado por:

Fabián Andrés Díaz Aguirre

Aprobado:

Dinie Espinal de Rueda, M.Sc.
Asesora Principal

Miguel Vélez, Ph.D.
Coordinador de la Carrera de Ciencia
y Producción Agropecuaria

Alfredo Rueda , Ph.D.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Abelino Pitty, Ph.D.
Coordinador de Fitotecnia

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A Dios por ser la luz de mi camino durante toda mi vida y ser un guía para el mejoramiento continuo.

A mis padres por apoyarme siempre en todas las actividades que he realizado y los objetivos que me he propuesto, entre ellos el estudiar en mi Alma Mater. Sin ustedes nada de lo que he realizado hubiese sido posible.

A mi abuelita Marujita por ser un angelito guardián que me ha cuidado y apoyado siempre, ha sido como mi segunda madre.

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque gracias a su bendición me ha permitido llegar hasta este punto.

A mis padres por su apoyo incondicional y respaldo en mis estudios.

A mi familia por su respaldo a la distancia.

A la Ing. Dinie Espinal por ser una excelente guía y asesora que me ayudo a culminar con éxito la investigación.

Al Dr. Alfredo Rueda por su asesoría en los análisis estadísticos y sus consejos.

A Gabriela por su amor, apoyo y momentos muy especiales. Además por su incondicional ayuda tanto en laboratorio como en la elaboración del documento.

A Julia, Claudia, Daniela y Vivian por su apoyo, ayuda y consejos.

A Freddy, Erika, Zoila y Deysi por su enorme colaboración en la realización de la evaluación.

A Juan Pablo, Geovanny, Carlos, Felipe, Marcelino, Nelson, José, Edison y Jorge por su amistad y compañerismo durante los cuatro estupendos años en la escuela.

RESUMEN

Díaz, F. 2007. Respuesta regenerativa *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia* (Fam. Araceae) a partir de explantes foliares. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. 31 p.

La *Zamia*, *Zamioculcas zamiifolia*, es una especie tropical perenne nativa de África. Se ha convertido en una planta ornamental apreciada especialmente por su follaje exótico. El objetivo del estudio fue desarrollar un protocolo para establecer y multiplicar eficientemente *Zamioculcas zamiifolia*. Se establecieron 12 tratamientos utilizando tres concentraciones de la auxina 2,4-D (2,4-Diclorofenoxiacético) (0, 2 y 4 μM) y cuatro concentraciones de las citocininas BAP (Bencilaminopurina) (15 y 20 μM) y Kinetina (15 y 20 μM). La callogénesis, organogénesis directa e indirecta se midieron mediante la asignación de valores categóricos donde 0= no regeneración, 1= 1 a 25% de regeneración, 2= 26 a 50% de regeneración, 3= 51 a 75% de regeneración y 4= 76 a 100% de regeneración, sobre el explante foliar. Analizando el efecto de auxinas, la mejor respuesta en callogénesis y microtuberización ($P \leq 0.05$) se obtuvo a un nivel de 2 μM de 2,4-D. Analizando el efecto de las citocininas, utilizando 15 ó 20 μM de Kinetina y 20 μM de BAP se obtuvo la mejor formación de tejido callogénico y microtuberización ($P \leq 0.05$). Tomando en cuenta la interacción del 2,4-D con las citocininas, las dosis que presentaron la mejor formación de tejido callogénico ($P \leq 0.05$) fueron 2 y 20 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente, 4 y 15 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente y 2 y 20 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente. Las dosis que presentaron la mejor formación de microtubérculos ($P \leq 0.05$) fueron 2 y 15 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente, 4 y 15 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente, 2 y 20 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente y 4 y 20 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente, siendo estos tratamientos iguales ($P \leq 0.05$). Los tratamientos que presentaron mayor oxidación ($P \leq 0.05$) fueron 0 y 15 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente, 4 y 15 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente y 0 y 20 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente. No se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en la supervivencia entre tratamientos, lo que confirma que el nivel de hormonas no tiene efecto en la mortalidad de los explantes. Analizando la contaminación por bacterias, hongos y contaminación total no se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre tratamientos. Al finalizar el experimento la contaminación acumulada fue de 18%, la oxidación acumulada de 13% y la supervivencia acumulada de 69%.

Palabras clave: 2,4-D, BAP, callogénesis, Kinetina, organogénesis, ornamental, planta exótica.

CONTENIDO

| | |
|-------------------------------------|-------|
| Portada | i |
| Portadilla | ii |
| Autenticación | iii |
| Página de firmas | iv |
| Dedicatoria | v |
| Agradecimientos | vi |
| Resumen | vii |
| Contenido | viii |
| Índice de cuadros | x |
| Índice de gráficos | xi |
| Índice de anexos | |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 3 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 10 |
| CONCLUSIONES | 19 |
| RECOMENDACIONES | 20 |
| LITERATURA CITADA | 21 |
| ANEXOS | 22 |

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

| | |
|--|----|
| 1. Tratamientos basados en la interacción de 2.4-D con BAP y Kinetina durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 4 |
| 2. Porcentaje de contaminación en los diferentes tratamientos de desinfección durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 8 |
| 3. Efecto del 2.4-D en la formación de tejido callogénico durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 10 |
| 4. Efecto de citocininas en la formación de tejido callogénico durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 10 |
| 5. Efecto del 2.4-D y las citocininas BAP y Kinetina en la formación de tejido callogénico durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 11 |
| 6. Efecto del 2.4-D sobre la microtuberización durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 13 |
| 7. Efecto de citocininas sobre la microtuberización durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 13 |
| 8. Efecto del 2.4-D y las citocininas BAP y Kinetina sobre la microtuberización durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 14 |
| 9. Porcentaje de oxidación durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 15 |

| | |
|---|----|
| 10. Porcentaje de supervivencia durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 16 |
| 11. Porcentaje de contaminación por bacterias, hongos y total durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 17 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico

1. Formación semanal de tejido callogénico utilizando la auxina 2,4-D y las citocininas BAP y Kinetina durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007..... 9
2. Desarrollo semanal de la microtuberización utilizando la auxina 2,4-D y las citocininas BAP y Kinetina durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007..... 12

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

| | |
|---|----|
| 1. Medio nutritivo básico Murashigue & Skoog adaptado para <i>Anthurium andreanum</i> usado durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 22 |
| 2. Porcentaje Valores porcentuales de las diferentes categorías de regeneración callogénica durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 23 |
| 3. Valores porcentuales de las diferentes categorías de microtuberización durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 24 |
| 4. Descripción semanal de oxidación durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007.. | 25 |
| 5. Descripción semanal de supervivencia durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 26 |
| 6. Descripción semanal de la contaminación por bacterias durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 27 |
| 7. Descripción semanal de la contaminación por hongos durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 28 |
| 8. Contaminación por bacterias, hongos y total durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 29 |
| 9. Valores porcentuales de las causas de desecho en cada tratamiento durante el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , Zamorano, Honduras, 2007..... | 30 |

INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos se define como el cultivo en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y tallo, primordios foliares y florales, partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo y hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen (Street 1977).

El cultivo de tejidos ha impactado la agricultura con su variedad de aplicaciones, entre las más destacadas se encuentran la producción masiva de plantas a partir de porciones de material vegetal, la propagación de plantas que naturalmente son difíciles de reproducir, la producción de plantas libres de virus, la regeneración de material vegetal genéticamente modificado y la crioconservación en bancos de germoplasma.

El cultivo de tejidos hace un manejo estratégico de reguladores de crecimiento con el fin de generar la respuesta deseada en el explante. Es así como los reguladores de crecimiento vegetal se definen como compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas (Street 1977).

El crecimiento en las plantas es un proceso dinámico, complejo y que esta rigurosamente controlado, en el que los reguladores de crecimiento juegan un papel principal en el control del crecimiento, no únicamente dentro de las plantas como un universo, sino también a nivel de órgano, tejido y célula (Wareing y Phillips 1973).

La *Zamia*, *Zamioculcas zamiifolia*, es una especie tropical perenne nativa de África, encontrada desde el sur de Kenia hasta el noreste de Sudáfrica, siendo su centro de origen Tanzania (Anónimo, 2006). Esta especie se ha convertido en una planta ornamental importante apreciada especialmente por su follaje exótico además de tolerancia al stress hídrico y a la baja intensidad lumínica.

En Zamorano en 2005 se realizó una investigación para obtener datos preliminares para el cultivo *in vitro* de este ornamental, la cual mostró que la planta presenta recalcitrancia en sus procesos de regeneración (Hernández Sermeño 2005).

El objetivo general de este estudio fue desarrollar un protocolo para establecer y multiplicar eficientemente *Zamioculcas zamiifolia*. Específicamente se estimó los

niveles óptimos de la auxina 2,4- D y de las citocininas BAP y Kinetina para la estimular la inducción de: Calogénesis, brotación indirecta a partir de tejido calogénico y brotación directa a partir de los explantes. Además en cada tratamiento se midió el porcentaje de contaminación, oxidación y supervivencia a la finalización del experimento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

La evaluación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Reproducción *In Vitro* (LCTRIV) perteneciente al área de Biotecnología Aplicada de la Escuela Agrícola Panamericana “El Zamorano”, localizada en el Valle del Yeguaire, vía panamericana a 32 km de Tegucigalpa, departamento de Francisco Morazán, Honduras.

Material vegetal

La *Zamia*, *Zamioculcas zamiifolia*, es perteneciente a la familia Araceae. Esta especie es nativa de bosques tropicales y originaria de Zanzíbar, Tanzania. Por su apariencia única, habilidad para tolerar bajos niveles de luz, agua y su resistencia a enfermedades y plagas, es una planta importante para el diseño de interiores (Chen 2004).

El material vegetal se obtuvo de las plantas madres localizadas en el invernadero de aclimatación de especies perteneciente al LCTRIV. Un mes antes de iniciar la investigación, las plantas fueron sometidas a aplicaciones de fungicida, bactericida y fertilizante, con el fin de evitar la contaminación con patógenos del material vegetal y tener un follaje vigoroso al momento de introducirlo al laboratorio.

Se realizaron dos aplicaciones con 15 días de intervalo, con solución de Benlate[®] 50WP (2 g/L) y Agrymicin[®] 16.5 WP (2 g/L). De igual forma se realizaron dos aplicaciones del fertilizante Florifert[®] (20-20-20) a una concentración de 4 g/L una semana después de cada aplicación de la solución fungicida-bactericida.

EQUIPO

Cámara de flujo laminar Se lleva a cabo la preparación y aislamiento de los explantes. En esta cámara el aire es tomado del exterior, se hace pasar a través de un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air) de poro muy fino, antes de que llegue a la mesa de la cámara de inoculación, asegurando que el flujo de aire sobre la mesa esté y permanezca completamente estéril (Pierik 1976).

Autoclave Los instrumentos y medios de cultivo que se esterilizaron a 121°C de temperatura y 15 PSI (lb/in²) de presión por 25 minutos.

PRUEBAS PRELIMINARES DE DESINFECCIÓN

Se realizó una prueba preliminar para escoger el método de desinfección que presente menor porcentaje de contaminación de los explantes. Se evaluaron tres concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) de 0.5, 1 y 2% de ingrediente activo y dos tiempos de exposición del explante a la solución desinfectante de 15 y 20 minutos (Cuadro 1).

Después del corte, las hojas fueron introducidas al laboratorio para ser lavadas cuidadosamente con una mezcla de agua con detergente en un biker de 2000 ml, con el fin de remover partículas de tierra o impurezas. A continuación las láminas foliares fueron trasladadas a la cámara de transferencia, donde fueron introducidas en un biker de 2000 ml conteniendo la solución de NaOCl específica. A cada solución se aplicó tres gotas del emulsificante Tween 80 por cada 100 ml de solución y en ella se mantuvieron las láminas foliares en agitación constante, durante el tiempo correspondiente a cada tratamiento.

Luego de la exposición (15 ó 20 minutos) a la solución desinfectante, se enjuagó tres veces con agua destilada estéril durante dos minutos cada vez. Después se disectó, cortando aproximadamente 2 mm de los bordes de cada una de las hojas, para posteriormente introducirlo a un biker con una segunda solución de NaOCl al 0.4%, con tres gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución, durante cinco minutos. Finalmente se procedió a una segunda fase de cuatro enjuagues con agua destilada estéril, con una duración de dos minutos cada uno.

Al final del procedimiento de desinfección, se realizó la segunda disección de cada hoja, cortando los bordes y obteniendo múltiples explantes de aproximadamente 1.5 × 1.5 cm. Cada explante se introdujo en un frasco con 20 ml de medio nutritivo Murashigue & Skoog (MS) de iniciación. Los frascos fueron transferidos a la cámara de incubación para evaluar los resultados a los siete días.

De la misma manera se realizó la desinfección de los explantes para el estudio.

REGENERACIÓN *IN VITRO* DE EXPLANTES FOLIARES A PARTIR DE LA INTERACCIÓN DE LA AUXINA 2,4-D CON LAS CITOCININAS BAP Y KINETINA

Una vez realizada la desinfección, se establecieron los explantes en los medios de cultivo. Se evaluaron 12 tratamientos que consistieron en tres concentraciones de la auxina 2,4-D (0, 2 y 4 μM) y dos concentraciones de (15 y 20 μM) de BAP y dos concentraciones (15 y 20 μM) de Kinetina (cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos basados en la interacción de 2,4-D con BAP y Kinetina durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007

| | (μM) | | |
|--|--------------------|------------------|----------|
| | 2,4-D ^ψ | BAP ^Ω | Kinetina |
| | 0 | 15 | |
| | 2 | 15 | |
| | 4 | 15 | |
| | 0 | 20 | |
| | 2 | 20 | |
| | 4 | 20 | |
| | 0 | | 15 |
| | 2 | | 15 |
| | 4 | | 15 |
| | 0 | | 20 |
| | 2 | | 20 |
| | 4 | | 20 |

^ψ 2,4- Diclorofenoxiacético

^Ω 6- Bencilaminopurina

Medios nutritivos El medio nutritivo básico que se utilizó en el experimento fue Murashige & Skoog (MS) adaptado para el ornamental *Anthurium andreanum* (Anexo 1).

Reguladores de crecimiento Los reguladores de crecimiento que se utilizaron en el experimento fueron la auxina 2,4-D (2,4-Diclorofeniloacético) y las citocininas BAP (Benzilaminopurina) y Kinetina (6-furfuril aminopurina).

El 2,4-D es una fitohormona perteneciente al grupo de las auxinas. Este grupo de hormonas fue el primer regulador de crecimiento descubierto en una planta, siendo el Ácido indoleacético (AIA) la auxina que se encuentra mayormente en las plantas superiores en forma natural (Hurtado 1987).

Las auxinas tienen una función fundamental como controladores de los procesos vegetales, incluyendo la regulación de las proporciones del crecimiento diferencial y la regulación de fenómenos de diferenciación, los cuales según la concentración de auxina son estimulados o inhibidos. Se ha acumulado una gran cantidad de datos sobre los efectos auxínicos en las plantas, siendo los principales los que afectan el alargamiento y la división celular (Bidwell 1979).

El BAP y la Kinetina son reguladores de crecimiento perteneciente al grupo de las citocininas. El nombre genérico de las citocininas es empleado para aquellas sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular o citocinesis.

Corte y preparación de follaje El corte de las hojas se hizo de 16 plantas madres, escogiendo el material al azar. El criterio de selección fue escoger hojas adultas con aproximadamente 4 cm de largo y 2.5 cm de ancho, de color verde oscuro y que no muestren daño por patógenos o malformaciones.

El corte se realizó en las primeras horas de la mañana para evitar estrés calórico del material por la incidencia de sol y altas temperaturas. Después del corte el follaje se introdujo al laboratorio para ser lavado con agua con detergente y posteriormente iniciar el proceso de desinfección.

Desinfección El procedimiento de desinfección utilizado fue el mejor tratamiento de pruebas preliminares de desinfección, que fue el de 2% de concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl) con un tiempo de exposición de 20 minutos.

Siembra La siembra del material vegetal se realizó en la cámara de transferencia por tres operadores durante dos días. La primera y segunda repetición se sembraron durante el primer día y la tercera repetición durante el segundo día.

Variables a medir Se establecieron dos tipos de variables, las variables tipo 1 y tipo 2.

Variables tipo 1: Variables evaluadas en la semana ocho a partir de establecido el experimento en una escala categórica:

- Callogénesis: La callogénesis se evaluó mediante una escala categórica donde:

0 = No hay formación de callogénica.

1 = Callogénesis cubriendo de 1 a 25% del total del explante.

2 = Callogénesis cubriendo de 26 a 50% del total del explante.

3 = Callogénesis cubriendo de 51 a 75% del total del explante.

4 = Callogénesis cubriendo del 76 al 100% del total del explante.

- Brotación indirecta a partir del tejido callogénico establecido:

0 = No hay formación de brotes.

1 = Formación de brotes de 1 a 25% del total del explante.

2 = Formación de brotes de 26 a 50% del total del explante.

3 = Formación de brotes de 51 a 75% del total del explante.

4 = Formación de brotes de 76 a 100% del total del explante.

- Brotación directa a partir de láminas foliares

0 = No hay formación de brotes.

1 = Formación de brotes de 1 a 25% del total del explante.

2 = Formación de brotes de 26 a 50% del total del explante.

3 = Formación de brotes de 51 a 75% del total del explante.

4 = Formación de brotes de 76 a 100% del total del explante.

Variables tipo 2: Variables evaluadas desde el establecimiento del experimento, monitoreadas cada semana hasta la semana ocho:

- Oxidación: La oxidación al final del experimento se midió como porcentaje de frascos conteniendo explantes oxidados en cada tratamiento.

- Contaminación: Hongos y bacterias fueron las dos fuentes de contaminación, los mismos que fueron medidos y diferenciados. La contaminación al final del experimento se midió como porcentaje de frascos contaminados con bacterias, hongos así como contaminación total en cada tratamiento. Los datos se tomaron de forma que 1 indica la presencia bacteriana o de hongos y 0 la ausencia.

- Supervivencia: La supervivencia se evaluó al final del experimento como porcentaje de frascos conteniendo explantes sobrevivientes en cada tratamiento.

Diseño experimental El diseño experimental fue un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial de 3×4 , donde el factor A fue tres niveles de 2,4-D (0, 2, 4 μM) y el factor B fue cuatro niveles de citocininas (15, 20 μM de BAP y 15, 20 μM de Kinetina).

Hubo un total de 12 tratamientos o combinaciones de hormonas. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento y cada repetición tuvo 20 unidades experimentales, para un total de 720 unidades experimentales.

Análisis estadístico El análisis estadístico se realizó con el programa Statistical Analysis System (SAS[®] 2003). Se usó un modelo lineal general (GLM) y los datos se evaluaron mediante análisis de varianza (ANDEVA) y el procedimiento de separación de medias Tukey para encontrar diferencias entre tratamientos. El nivel de significancia utilizado fue de ≤ 0.05 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PRUEBAS PRELIMINARES DE DESINFECCIÓN

No hubo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre las pruebas preliminares de desinfección (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de contaminación en los diferentes tratamientos de desinfección durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007

| (%) NaOCl [€] | (min) Tiempo | (%) ^{NS} Contaminación |
|---------------------------|-----------------|------------------------------------|
| 0.5 | 15 | 13 |
| 1 | 15 | 13 |
| 2 | 15 | 20 |
| 0.5 | 20 | 12 |
| 1 | 20 | 13 |
| 2 | 20 | 10 |

[€]Hipoclorito de Sodio

^{NS}No se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$)

Aunque no hubo diferencia significativa entre tratamientos, el procedimiento de desinfección que numéricamente mostró el porcentaje más bajo de contaminación fue la solución con 2% de NaOCl y tiempo de exposición a la solución de 20 minutos.

REGENERACIÓN *IN VITRO* DE EXPLANTES FOLIARES A PARTIR DE LA INTERACCIÓN DE LA AUXINA 2,4-D CON LAS CITOCININAS BAP Y KINETINA.

CALLOGÉNESIS

Descripción semanal de callogénesis No se observó regeneración callogénica durante las primeras dos semana, iniciándose la formación de callo en la tercera semana. El incremento de formación de tejido callogénico en todos los tratamientos presentó una tendencia estable, teniendo crecimiento continuo durante todo el experimento, con excepción del tratamiento de 0 y 15 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente, que detuvo su regeneración en la sexta semana (Gráfico 1).

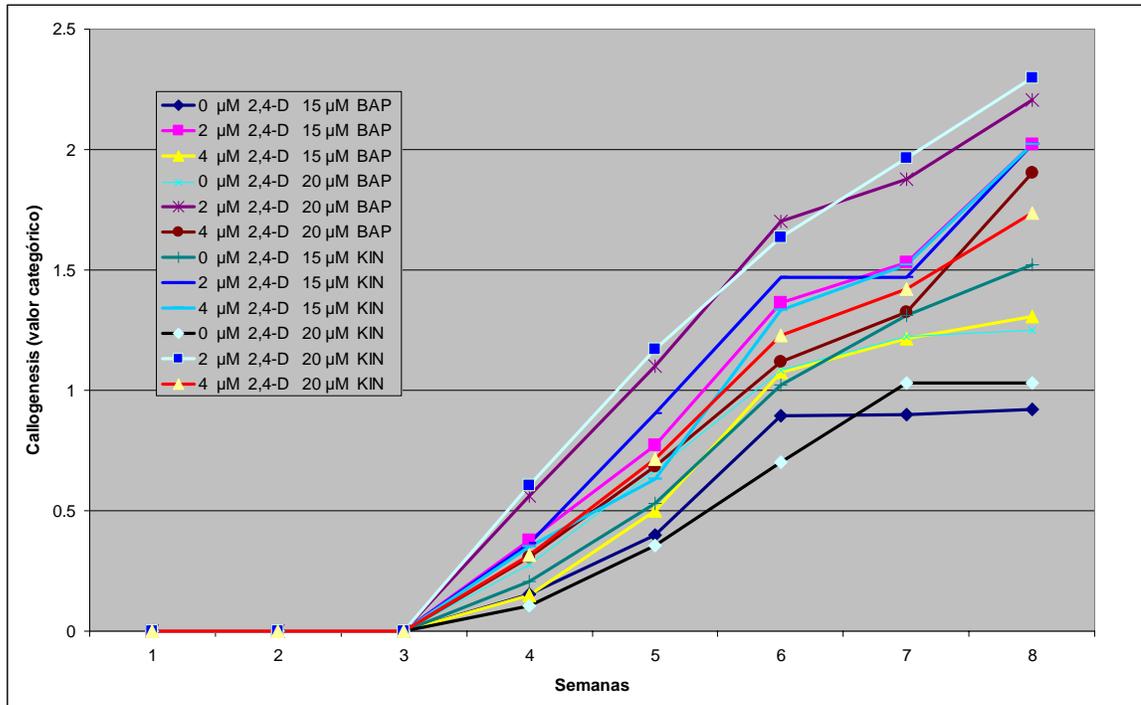


Gráfico 1. Formación semanal de tejido callogénico utilizando la auxina 2,4-D y las citocininas BAP y Kinetina durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007

Evaluación de los resultados finales de callogénesis Con respecto al aporte del 2,4-D, la mejor formación de tejido callogénico ($P \leq 0.05$) se obtuvo con 2 μM , independientemente del tipo y nivel de citocininas. Se concluye que el uso de 2,4-D es importante para la formación de tejido callogénico (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto del 2,4-D en la formación de tejido callogénico durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007

| $\frac{(\mu\text{M})}{2,4\text{-D}^{\Psi}}$ | (Valor categórico) Callogénesis |
|---|------------------------------------|
| 0 | 1.16 ^c |
| 2 | 2.14 ^a |
| 4 | 1.78 ^b |

^{abc} Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia significativa ($P < 0.05$)

^{\Psi} 2,4- Diclorofenoxiacético

Analizando el efecto de las citocininas independientemente de la influencia del 2,4-D, se encontró que utilizando 15 ó 20 μM de Kinetina y 20 μM de BAP se obtuvo la mejor formación de tejido callogénico ($P \leq 0.05$) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de citocininas en la formación de tejido callogénico durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007

| (μM) | | (Valor categórico) Callogénesis |
|-----------------------|----------|------------------------------------|
| BAP ^{\Omega} | Kinetina | |
| 15 | | 1.41 ^b |
| 20 | | 1.80 ^a |
| | 15 | 1.86 ^a |
| | 20 | 1.83 ^a |

^{ab} Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia significativa ($P < 0,05$)

^{\Omega} 6- Bencilaminopurina

Tomando en cuenta la interacción del 2,4-D con las citocininas, las dosis que presentaron la mejor formación de tejido callogénico ($P \leq 0.05$) fueron 2 y 20 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente, 4 y 15 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente y 2 y 20 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente. El tratamiento que presentó menor formación de tejido callogénico ($P \leq 0.05$) fue el de 0 y 15 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto del 2.4-D y las citocininas BAP y Kinetina en la formación de tejido callogénico durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007

| (μM) | | | (Valor categórico) |
|--------------------|------------------|----------|--------------------|
| 2,4-D ^ψ | BAP ^Ω | Kinetina | Callogénesis |
| 0 | 15 | | 0.74 ^d |
| 2 | 15 | | 2.02 ^b |
| 4 | 15 | | 1.31 ^c |
| 0 | 20 | | 1.25 ^{cd} |
| 2 | 20 | | 2.20 ^{ab} |
| 4 | 20 | | 1.90 ^b |
| 0 | | 15 | 1.52 ^c |
| 2 | | 15 | 2.02 ^b |
| 4 | | 15 | 2.02 ^{ab} |
| 0 | | 20 | 1.03 ^d |
| 2 | | 20 | 2.30 ^a |
| 4 | | 20 | 1.84 ^b |

^{ab} Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia significativa ($P < 0,05$)

^ψ 2,4- Diclorofenoxiacético

^Ω 6- Bencilaminopurina

ORGANOGENESIS INDIRECTA/MICROTUBERIZACION

La organogénesis indirecta se expresó como la aparición de microtubérculos a partir de tejido callogénico.

Descripción semanal de microtuberización Durante las primeras cinco semanas no hubo microtuberización, observándose la misma en la sexta semana. El incremento de microtuberización tuvo en general un comportamiento lineal estable a excepción del tratamiento 0 y 15 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente, que en la séptima semana cesó la formación de microtubérculos (Gráfico 2).

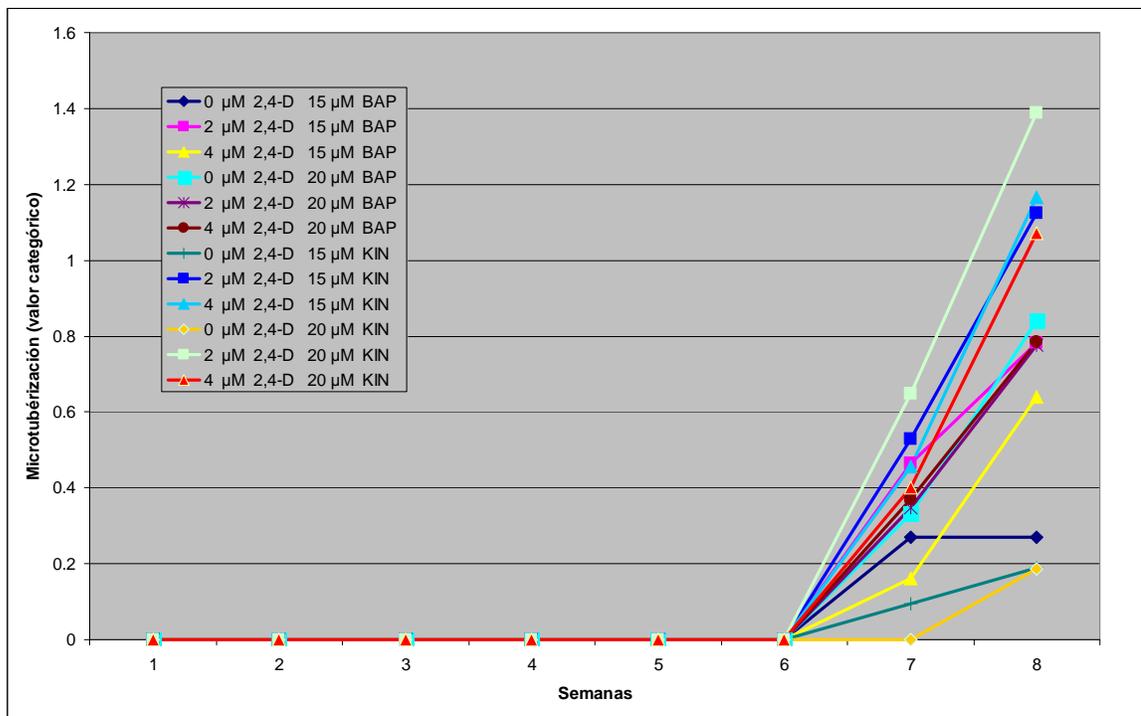


Gráfico 2. Desarrollo semanal de la microtuberización utilizando la auxina 2,4-D y las citocininas BAP y Kinetina durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007

Evaluación de los resultados finales de microtuberización Al igual que en el caso de la callogénesis, la mejor formación de microtubérculos se obtuvo utilizando 2 μM de 2,4-D. Todos los niveles de auxina presentaron diferencias ($P \leq 0.05$) entre ellos, siendo el nivel 0 μM de 2,4-D el que menor microtuberización presentó. Esto confirma que la presencia de auxina es importante para la buena respuesta regenerativa (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto del 2,4-D sobre la microtuberización durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007

| $\frac{(\mu\text{M})}{2,4\text{-D}^\Psi}$ | (Valor categórico) Microtuberización |
|---|---|
| 0 | 0.35 ^c |
| 2 | 1.03 ^a |
| 4 | 0.92 ^b |

^{ab} Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia significativa ($P < 0,05$)

^{\Psi} 2,4- Diclorofenoxiacético

Analizando el efecto de las citocininas independientemente de la influencia del 2,4-D, se encontró que utilizando 15 ó 20 μM de Kinetina y 20 μM de BAP se obtuvo la mejor formación de microtubérculos ($P \leq 0.05$) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de citocininas sobre la microtuberización durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007

| (μM) | | (Valor categórico) |
|-----------------------|----------|--------------------|
| BAP ^{\Omega} | Kinetina | Microtuberización |
| 15 | | 0.54 ^b |
| 20 | | 0.80 ^a |
| | 15 | 0.84 ^a |
| | 20 | 0.98 ^a |

^{ab} Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia significativa ($P < 0,05$)

^{\Omega} 6- Bencilaminopurina

Tomando en cuenta la interacción del 2,4-D con las citocininas, las dosis que presentaron la mejor formación de microtubérculos ($P \leq 0.05$) fueron 2 y 15 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente, 4 y 15 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente, 2 y 20 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente y 4 y 20 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente, siendo estos iguales ($P \leq 0.05$) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto del 2,4-D y las citocininas BAP y Kinetina sobre la microtuberización durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007

| (μM) | | | (Valor categórico) |
|--------------------|------------------|----------|--------------------|
| 2,4-D ^ψ | BAP ^Ω | Kinetina | Microtuberización |
| 0 | 15 | | 0.11 ^c |
| 2 | 15 | | 0.78 ^b |
| 4 | 15 | | 0.63 ^b |
| 0 | 20 | | 0.84 ^b |
| 2 | 20 | | 0.77 ^b |
| 4 | 20 | | 0.79 ^b |
| 0 | | 15 | 0.19 ^c |
| 2 | | 15 | 1.12 ^{ab} |
| 4 | | 15 | 1.16 ^{ab} |
| 0 | | 20 | 0.18 ^c |
| 2 | | 20 | 1.38 ^a |
| 4 | | 20 | 1.07 ^{ab} |

^{ab} Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia significativa ($P < 0,05$)

^ψ 2,4- Diclorofenoxiacético

^Ω 6- Bencilaminopurina

ORGANOGENESIS DIRECTA

Ninguno de los tratamientos presentó formación directa de brotes a partir de láminas foliares.

OXIDACIÓN

Evaluación de los resultados finales de oxidación Los tratamientos que presentaron mayor oxidación ($P \leq 0.05$) fueron 0 y 15 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente, 4 y 15 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente y 0 y 20 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente. 2 y 15 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente, no presentó oxidación durante el experimento. La oxidación promedio obtenida en el experimento fue de 13% (Cuadro 9).

Cuadro 9. Porcentaje de oxidación durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007

| (μM) | | | (%) |
|--------------------|------------------|----------|--------------------|
| 2,4-D ^ψ | BAP ^Ω | Kinetina | Oxidación |
| 0 | 15 | | 20.0 ^{ab} |
| 2 | 15 | | 3.3 ^a |
| 4 | 15 | | 23.3 ^{ab} |
| 0 | 20 | | 8.3 ^b |
| 2 | 20 | | 1.6 ^b |
| 4 | 20 | | 10.0 ^b |
| 0 | | 15 | 16.7 ^b |
| 2 | | 15 | 0.0 ^b |
| 4 | | 15 | 16.7 ^b |
| 0 | | 20 | 41.7 ^a |
| 2 | | 20 | 6.7 ^b |
| 4 | | 20 | 8.3 ^b |
| TOTAL | | | 13.0 |

^{ab} Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia significativa ($P < 0,05$)

^ψ 2,4- Diclorofenoxiacético

^Ω 6- Bencilaminopurina

SUPERVIVENCIA

Evaluación de los resultados finales de supervivencia No se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en la supervivencia entre tratamientos, lo que confirma que el nivel de hormonas no tiene efecto en la mortalidad de los explantes. La supervivencia promedio obtenida en el experimento fue de 69% (Cuadro 10).

Cuadro 10. Porcentaje de supervivencia durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007

| (μM) | | | (%) |
|--------------------|------------------|----------|-----------------------------|
| 2,4-D ^Ψ | BAP ^Ω | Kinetina | Supervivencia ^{NS} |
| 0 | 15 | | 61.7 |
| 2 | 15 | | 73.3 |
| 4 | 15 | | 61.7 |
| 0 | 20 | | 66.7 |
| 2 | 20 | | 81.7 |
| 4 | 20 | | 71.7 |
| 0 | | 15 | 70.0 |
| 2 | | 15 | 81.7 |
| 4 | | 15 | 56.7 |
| 0 | | 20 | 51.7 |
| 2 | | 20 | 87.7 |
| 4 | | 20 | 61.7 |
| TOTAL | | | 69.0 |

^{NS} No se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$)

^Ψ 2,4- Diclorofenoxiacético

^Ω 6- Bencilaminopurina

CONTAMINACIÓN

Evaluación de los resultados finales de contaminación Se puede apreciar que en general en todos los tratamientos el mayor causante de contaminación fueron bacterias (Cuadro 11).

Analizando la contaminación por bacterias, hongos y contaminación total no se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre tratamientos. Al igual que en la supervivencia, los resultados obtenidos confirman que los niveles de hormonas no tienen efecto sobre la contaminación de los explantes, siendo afectados por factores como contaminación endógena y asepsia en el experimento. La contaminación promedio fue de 18%.

Cuadro 11. Porcentaje de contaminación por bacterias, hongos y total durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007

| (μM) | | | Contaminación (%) | | |
|--------------------|------------------|----------|-------------------------|----------------------|---------------------|
| 2,4-D ^ψ | BAP ^Ω | Kinetina | Bacterias ^{NS} | Hongos ^{NS} | TOTAL ^{NS} |
| 0 | 15 | | 13.3 | 5.0 | 18.3 |
| 2 | 15 | | 18.3 | 5.0 | 23.3 |
| 4 | 15 | | 10.0 | 5.0 | 15.0 |
| 0 | 20 | | 16.7 | 8.3 | 25.0 |
| 2 | 20 | | 13.4 | 3.3 | 16.7 |
| 4 | 20 | | 15.0 | 3.3 | 18.3 |
| 0 | | 15 | 8.3 | 5.0 | 13.4 |
| 2 | | 15 | 8.3 | 7.0 | 15.6 |
| 4 | | 15 | 21.7 | 5.0 | 26.7 |
| 0 | | 20 | 5.0 | 1.6 | 6.7 |
| 2 | | 20 | 3.3 | 3.3 | 6.7 |
| 4 | | 20 | 30.0 | 0.0 | 30.0 |
| TOTAL | | | | | 18.0 |

^{NS} No se encontró diferencia significativa ($P \leq 0.05$)

^ψ 2,4- Diclorofenoxiacético

^Ω 6- Bencilaminopurina

CONCLUSIONES

- La formación de tejido callogénico inicio a partir de la tercera semana y la organogénesis indirecta (microtuberización) inicio a partir de la sexta semana de iniciado el experimento. Ninguno de los tratamientos presentó formación directa de brotes. La organogénesis indirecta se expresó como aparición de microtubérculos a partir de tejido callogénico.
- La mejor respuesta en callogénesis y microtuberización se obtuvo a un nivel de 2 μM de 2,4-D. El nivel 0 μM de 2,4-D fue el que menor microtuberización y callogénesis presentó.
- Se encontró que utilizando 15 ó 20 μM de Kinetina y 20 μM de BAP se obtuvo la mejor formación de tejido callogénico y microtuberización ($P \leq 0.05$).
- Las dosis que presentaron la mejor formación de tejido callogénico fueron 2 y 20 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente, 4 y 15 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente y 2 y 20 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente. Las dosis que presentaron la mejor formación de microtubérculos fueron 2 y 15 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente, 4 y 15 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente, 2 y 20 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente y 4 y 20 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente.
- Los tratamientos que presentaron mayor oxidación fueron 0 y 15 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente, 4 y 15 μM de 2,4-D y BAP, respectivamente y 0 y 20 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente. 2 y 15 μM de 2,4-D y Kinetina, respectivamente, no presentó oxidación durante el experimento.
- Los niveles de hormonas no tienen efecto sobre la contaminación de los explantes, siendo afectados por factores como material vegetal y asepsia.
- En todos los tratamientos la contaminación por bacterias fue superior a la contaminación por hongos. La contaminación acumulada fue de 18%, la oxidación acumulada de 13% y la supervivencia acumulada de 69%.

RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas de desinfección con dosis de NaOCl y tiempos de exposición más altos.
- Utilizar en LCTRIV para la propagación de *Zamioculcas zamiifolia* cualquiera las dosis de 2 y 20 μ M de 2,4-D y Kinetina, respectivamente, 4 y 15 μ M de 2,4-D y Kinetina, respectivamente ó 2 y 20 μ M de 2,4-D y BAP, respectivamente, ya que fueron las dosis que mejor formación de tejido callogénico presentaron.
- Evaluar Kinetina en la etapa de multiplicación de *Zamioculcas zamiifolia*.
- Evaluar si se encuentra efecto sobre la respuesta regenerativa a dosis mayores a 20 μ M de Kinetina.
- Evaluar si la exposición a regimenes de luz y oscuridad tiene un efecto sobre la formación de tejido callogénico, brotación indirecta a partir de tejido callogénico o brotación directa a partir de explantes foliares.
- Evaluar el efecto de antibióticos y fungicidas en el medio nutritivo para reducir la contaminación.
- Mejorar las prácticas de bioseguridad aplicadas en el LCTRIV y el aislamiento del laboratorio sobre todo en Cámara de Transferencia y Crecimiento para reducir el ataque de agentes infecciosos.

LITERATURA CITADA

- Anonimo. 2006. Zamioculcas (en línea). Consultado el 20 oct 2006. Disponible en: <http://es.mimi.hu/jardineria/zamioculcas.html>
- Bidwell, R. 1979. Fisiología Vegetal. AGT. editor, Mexico. 1ª. Ed. 320 p.
- Chen. 2004. Cultural guidelines for commercial production of ZZ plant. Institute of food and agricultural sciences, University of Florida. Extension service press.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura; Fundamentos y Aplicaciones. Roca, M. y Mroginski, L. (eds.). Cali, Colombia. 970 p.
- Hernández Sermeño, V. 2005. Organogénesis indirecta *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia* (Fam. Araceae). Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras, 40 p.
- Hurtado, M. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Ed. Trillas. México. 252 p.
- INA (Instituto Nacional de Aprendizaje). 1994. Propagación clonal *in vitro* de diferentes especies vegetales en el laboratorio del INA. San José, Costa Rica. 27 p.
- Pierik, R. 1976. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Trad. por Luis Ayerbe Mateo-Sagasta. 3 ed. Madrid, España, Mundi-Prensa. 326 p.
- Street, H. 1977. Plant tissue and cell culture, Sec. Ed. Academic Press.,U.S.A. 110 p.
- Wareing, R y Phillips, I. 1973. The control of growth and differentiation in plants. Pergamon Press. England. 215 p.

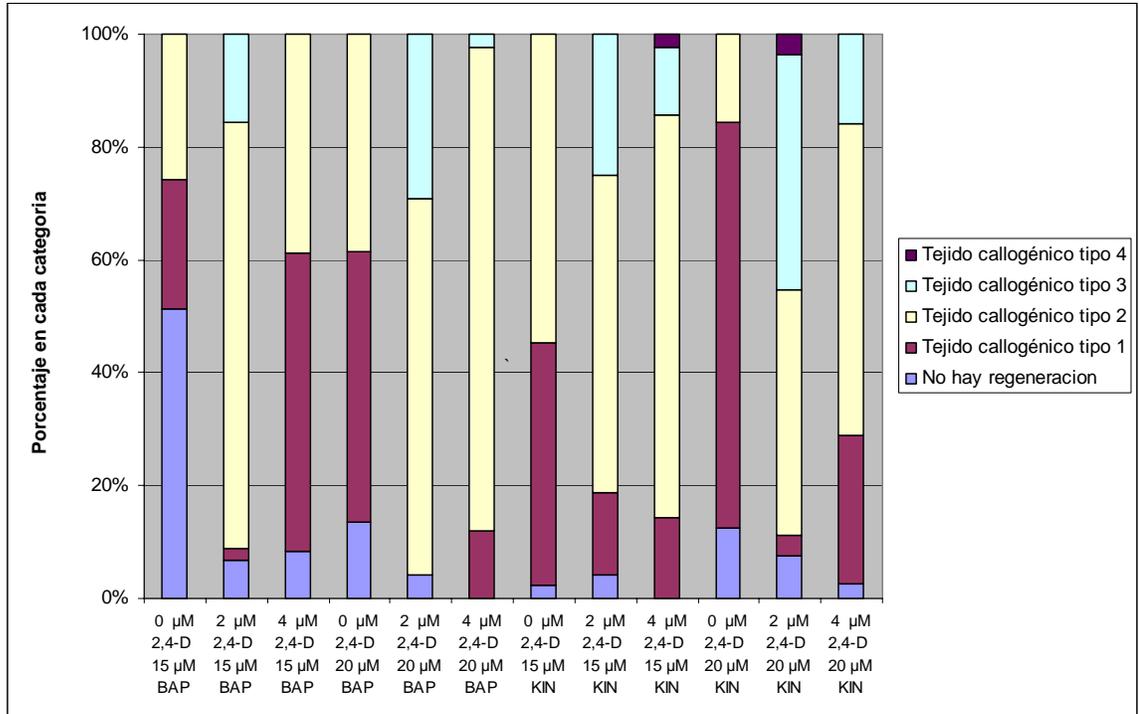
ANEXOS

Anexo 1. Medio nutritivo básico Murashigue & Skoog adaptado para *Anthurium andreanum* usado durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007

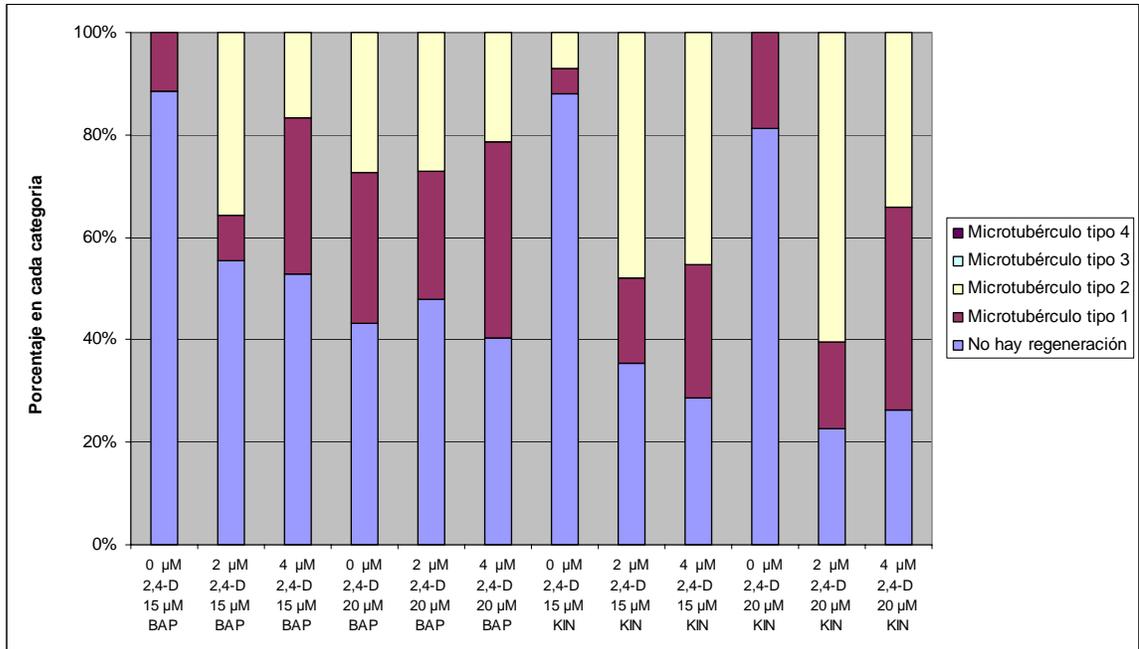
| Componente | Cantidad (mg/L) |
|---|-----------------|
| Macroelementos (1/2 MS) | |
| Nitrato de amonio (NH_4NO_3) | 825.000 |
| Nitrato de potasio (KNO_3) | 950.000 |
| Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 220.000 |
| Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 185.000 |
| Fosfato potásico (KH_2PO_4) | 85.000 |
| Microelementos | |
| Acido bórico (H_3BO_3) | 6.200 |
| Sulfato de manganeso monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) | 16.900 |
| Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 8.600 |
| Yoduro de potasio (KI) | 0.830 |
| Molibdato de sodio ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 0.250 |
| Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) | 0.025 |
| Cloruro cobáltico ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) | 0.025 |
| FeNaEDTA | 50.000 |
| Vitaminas | |
| Acido nicotínico | 0.500 |
| Tiamina HCl | 0.400 |
| Piridoxina HCl | 0.500 |
| Inositol | 100.000 |
| Azúcar | |
| Glucosa | 30000.000 |
| Phytigel | 1800.000 |
| pH = 6.0 | |

Fuente: Instituto Nacional de Aprendizaje, Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, San José, Costa Rica, 1994.

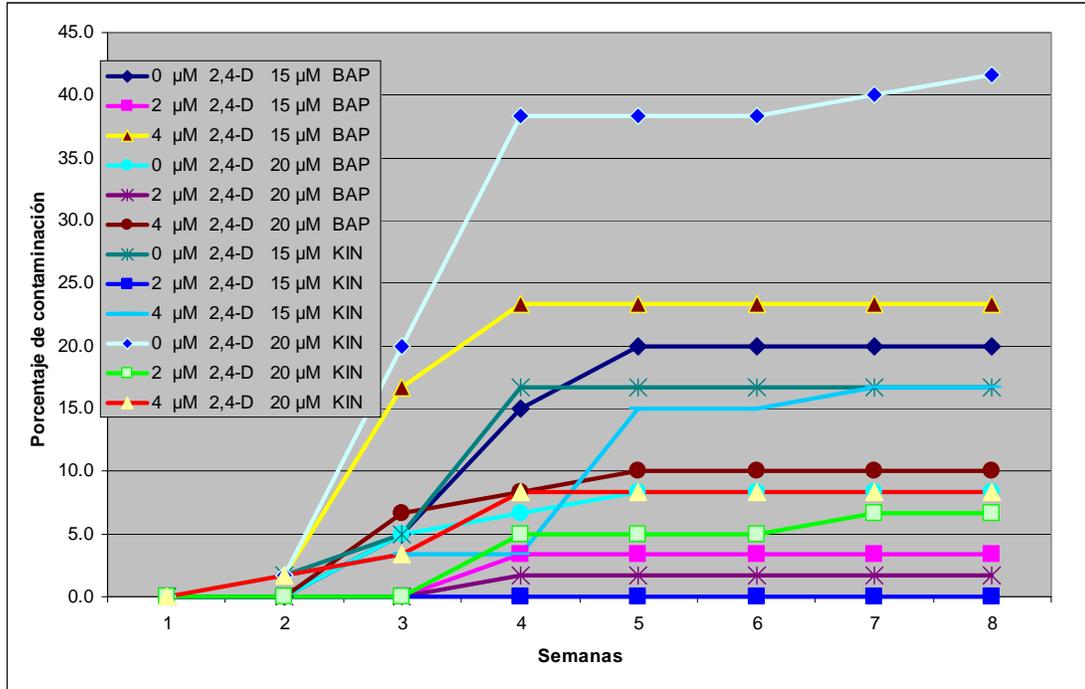
Anexo 2. Valores porcentuales de las diferentes categorías de regeneración callogénica durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007



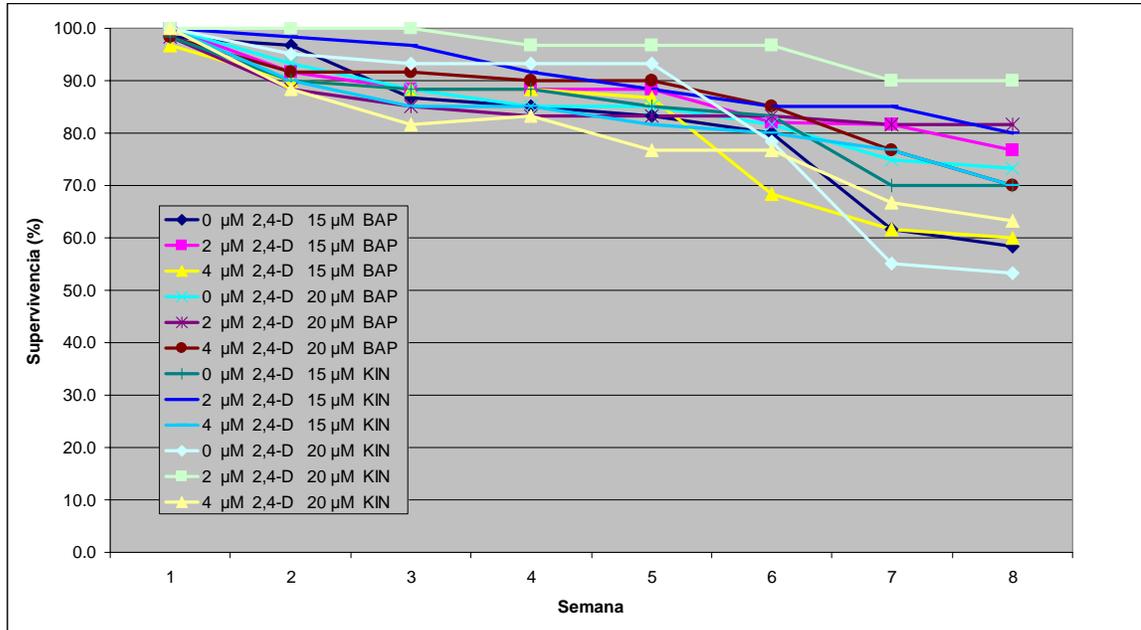
Anexo 3. Valores porcentuales de las diferentes categorías de microtuberización durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007



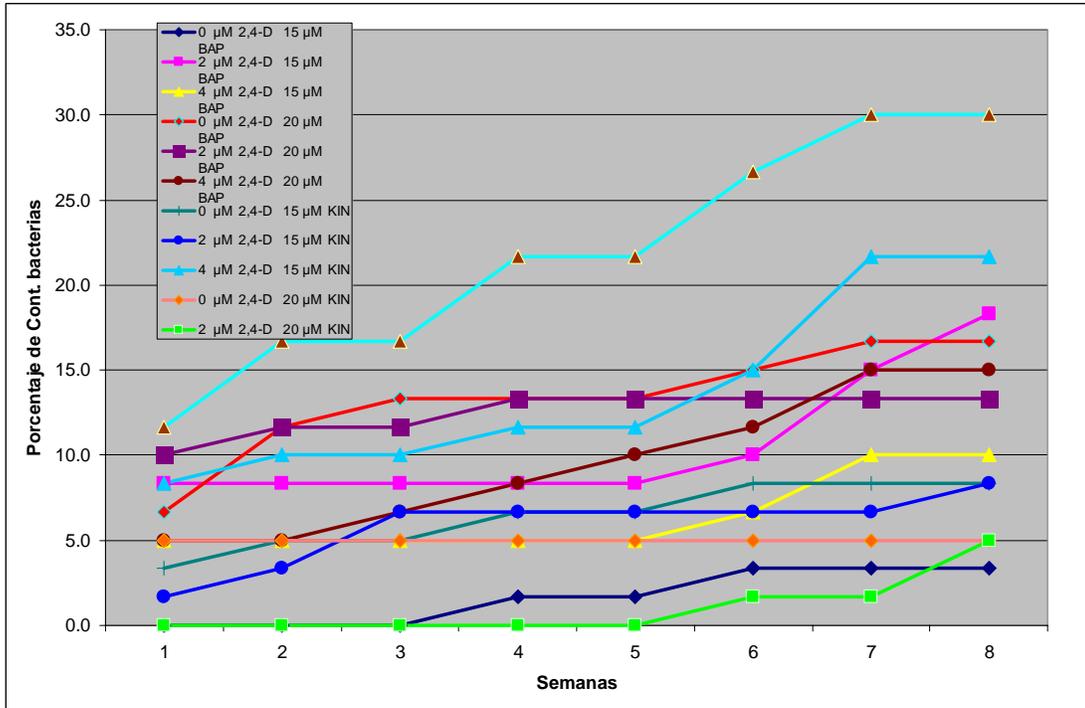
Anexo 4. Desarrollo semanal de oxidación durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007



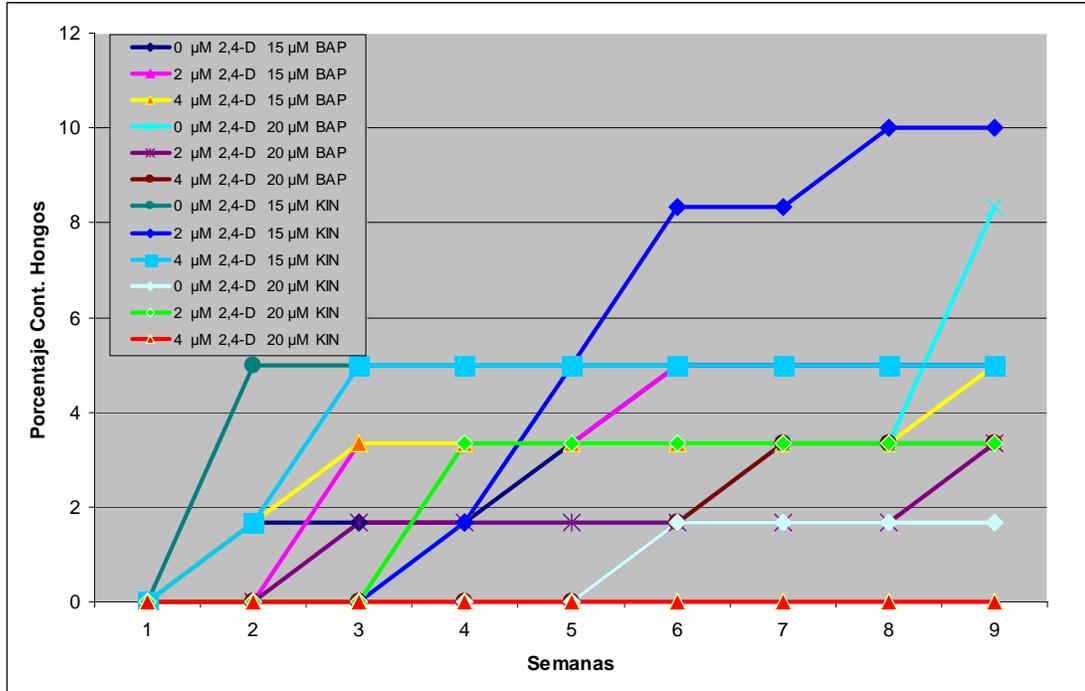
Anexo 5. Descripción semanal de supervivencia durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007



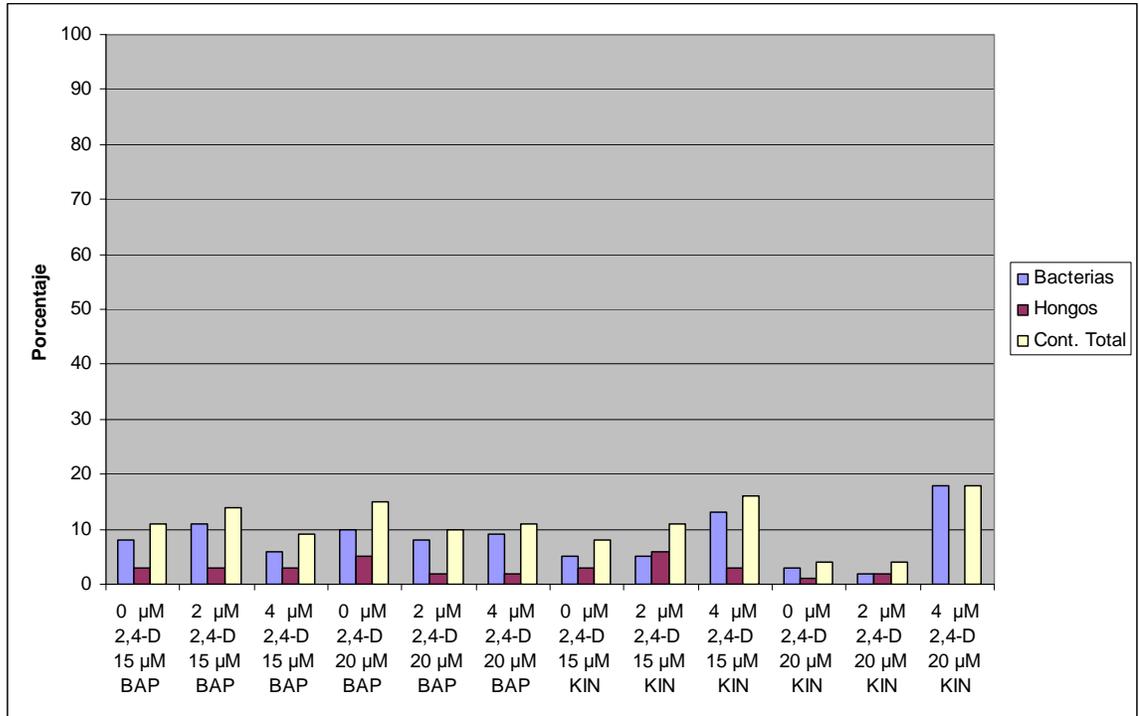
Anexo 6. Desarrollo semanal de la contaminación por bacterias durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007



Anexo 7. Desarrollo semanal de la contaminación por hongos durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007



Anexo 8. Contaminación por bacterias, hongos y total durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007



Anexo 9. Valores porcentuales de las causas de desecho en cada tratamiento durante el establecimiento *in vitro* de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*, Zamorano, Honduras, 2007

