

Organogénesis indirecta *in vitro* de
Zamioculcas zamiifolia (Fam. Araceae)

Víctor Salvador Hernández Sermeño

Zamorano - Honduras
Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria
Noviembre, 2005

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN
AGROPECUARIA

Organogénesis indirecta in vitro de
Zamioculcas zamiifolia (Fam. Araceae)

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

Presentado Por:

Víctor Salvador Hernández Sermeño

Honduras
Noviembre, 2005

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

Víctor Salvador Hernández Sermeño

Organogénesis indirecta *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia* (Fam. Araceae)

Presentado por:

Víctor Salvador Hernández Sermeño

Aprobada:

Dinie Espinal de Rueda, M.Sc.
Asesor Principal

Abelino Pitty, Ph. D.
Director Interino de la carrera de
Ciencia y Producción Agropecuaria

Alejandra Lara, M. Sc.
Asesor

Abelino Pitty, Ph. D.
Coordinador Area Temática

Alfredo Rueda, Ph. D.
Asesor

George Pilz, Ph. D.
Decano Académico

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

DEDICATORIA

Primero a Dios todopoderoso por tenerme siempre con vida y aprender de lo bueno y malo.

A San Juan Bosco y María Auxiliadora por haberme llevado a su casa y por permitirme ser Salesiano, un buen cristiano y honrado ciudadano.

A Mamá Carmela por haberme cuidado y criado desde muy pequeño.

A mis padres por que a pesar de las dificultades nos han sacado adelante por forjarme la persona que soy ahora.

A mi hermanita bella y mi cuñado por ser las personas que siempre me acompañaron en mi niñez y adolescencia.

A la Michellita por que nuevamente mi familia se ha llenado de alegría con su llegada.

A Taimy por las compañías, cuidados, alegrías y fidelidad que nos diste siempre en casa.

A mis abuelos Tomás, Manuel y Audelia.

A mi Colonia Guanaca (desde los PIA hasta la clase 2008) por ser siempre buenos amigos en toda ocasión y por vivir los mejores cuatro años de mi vida junto a ustedes.

A la clase NEMESIS por ser un ejemplo de clase a seguir en nuestra alma mater; en especial a Ismael, Carlos, Oscar, Luis, Henry e Isaac por ser grandes amigos en estos cuatro años.

A Rolando por compartir conmigo siempre y ser una persona especial, bendiciones a ti y tu familia.

A mis amigos (Arístides, Alex, César, Douglas, Sonia, Rocío, Yeldy, Jenniffer) por brindarme su amistad siempre a pesar de la distancia, los quiero mucho hermanos.

A mi familia en general por haber confiado en mí y alentarme en mi superación.

AGRADECIMIENTOS

A la Ing. Dinie de Rueda por ser mucho más que una asesora, usted fue como una madre que nos guió por el buen camino.

Al Dr. Alfredo Rueda por su gran ayuda.

Al vivero Tukan Agroexport por colaborarnos con las plantas madres en la elaboración de esta investigación.

A la Ing. María Bravo por su alegría y carisma que nos dio, éxitos en su maestría.

A la Ing. Alejandra Lara por su ayuda y apoyo total con mis colegas tesisistas.

A Zoily y Ericka por sus valiosos consejos, ayudas y experiencias brindadas en el laboratorio.

Al Ing. José Linares por su tiempo, colaboración desinteresada y amor a las plantas cuando uno lo buscaba.

A mis compañeros tesisistas, Laura, Ricardo, Carlos, Julia y Sarahí por el tiempo que me dedicaron al ayudar en esta investigación.

A Ester Navas y Sor Rosario por la ayuda en la recta final de mi carrera.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

A mis padres por el sacrificio que hicieron por sacarme adelante, padres míos no los he defraudado, gracias.

A la Fundación para el Desarrollo Agropecuario Salvadoreño (FUNDEAGROS) por apoyarnos siempre para ingresar en Zamorano.

A FEPADE, al Instituto Salvadoreño de Formación Profesional (INSAFORP), al Fondo Dotal Suizo por las ayudas financieras que me otorgaron para completar mi carrera.

Al Banco Cuscatlán y a la Fundación Save a Children que me ayudaron en el último año de mi carrera.

RESUMEN

Hernández, Víctor. 2005. Organogénesis indirecta *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia* (Fam. Araceae). Proyecto especial de graduación para optar al título de Ingeniero en Ciencia y Producción Agropecuaria, Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano. 40 p.

En la República de Honduras la producción de ornamentales se ha ido intensificando cada vez más. La empresa Tukan Agroexport localizada en Yojoa, Honduras, se dedica a la producción y exportación de *Zamioculcas zamiifolia* (Fam. Araceae) que es un ornamental muy exótico para el mercado de exportación Europeo. El objetivo de este estudio fue la elaboración de un protocolo para el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de la *Zamioculcas zamiifolia*. El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de Zamorano, Honduras. Se realizó una prueba preliminar de desinfección con dos tipos de explantes: yemas rizomatosas y explantes foliares, siendo estas últimas las que mejor respondieron utilizando hipoclorito de sodio al 0.5% de ingrediente activo durante 15 minutos. Se realizaron dos experimentos: en el primer experimento de establecimiento *in vitro* se sembraron los explantes foliares en un medio de iniciación (Etapa I) MS con 50% de sus macroelementos en el cual se evaluaron dos tipos de hormonas a cuatro concentraciones cada una: BAP (0, 1.5, 3.0 y 6.0 mg/l) y 2,4-D (0, 0.2, 0.4 y 0.8 mg/l). En el segundo experimento de multiplicación (Etapa II) se buscó la formulación nutritiva más adecuada para la inducción de meristemoides, evaluando las mismas concentraciones de BAP y 2,4-D utilizadas en el primer experimento. El estudio se efectuó entre mayo y septiembre de 2005. Se utilizó un arreglo factorial de 4×4 en un diseño completamente al azar (DCA). 1) Para la etapa I se realizó un experimento con 16 tratamientos, tres repeticiones y cada repetición constó de 13 frascos. 2) Para la etapa II se evaluaron 16 tratamientos, con tres repeticiones cada uno y cada repetición constó de ocho frascos. Después de ocho semanas, las variables evaluadas fueron: para la Etapa I: a) tipo de regeneración (tejido callogénico ó tejido rizogénico), b) días a formación de tejido callogénico o tejido rizogénico y c) categorización de tejido callogénico; para la Etapa II: tipo de regeneración (brotación o microtuberización). En la Etapa I el mejor tipo de regeneración fue aquel que presentó más de 67% de tejido callogénico, que se observó al utilizar 3.0 y 0.8 mg/l de BAP y 2,4-D teniendo un 54% de formación callogénica. En la Etapa II se observó una mejor estimulación de la brotación a partir de tejido callogénico al utilizar 3.0 y 0 mg/l de BAP y 2,4-D respectivamente; así mismo, durante la etapa II se observó la formación de microtubérculos y una mejor tuberización *in vitro* a partir del tejido callogénico, al utilizar 3.0 y 0.4 mg/l de BAP y 2,4-D respectivamente. Se recomienda: a) evaluar el efecto de la kinetina en la inducción de brotes en *Zamioculcas zamiifolia*, b) encontrar la concentración más adecuada de BAP y 2,4-D para la formación de tejido callogénico, brotación y tuberización, c) continuar realizando y evaluando diferentes pruebas para inducir la tuberización *in vitro* a partir de tejido callogénico, d) evaluar el tipo y nivel de hormonas más adecuado para la inducción organogénica a partir de microtubérculos, e) evaluar las tasas de multiplicación en la producción de vitroplantas tanto a partir de brotes como microtubérculos.

Palabras clave: Araceae, callogénesis, establecimiento *in vitro*, microtubérculos, microtuberización.

CONTENIDO

Portada	i
Portadilla	ii
Autenticación	iii
Página de firmas	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Agradecimientos a patrocinadores	vii
Resumen	viii
Contenido	ix
Indice de cuadros	xi
Indice de gráficos	xiii
Indice de anexos	xiv
Abreviaturas y símbolos más usados	xvi
1. Introducción	1
2. Materiales y métodos	3
2.1 Ubicación	3
2.2 Equipo	3
2.3 Cristalería e instrumentos	3
2.4 Material vegetal	4
2.5 Preparación de los explantes	4
2.6 Desinfección de los explantes	5
2.6.1 Primera prueba de desinfección: desinfección de yemas rizomatosas de <i>Zamioculcas zamiifolia</i>	5
2.6.2 Segunda prueba de desinfección: desinfección de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i>	6
2.7 Experimento 1: evaluación del efecto de 2,4-D y BAP en el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares (Etapa I) de <i>Zamioculcas</i> <i>zamiifolia</i>	8
2.7.1 Medio de cultivo	9
2.7.2 Reguladores de crecimiento	9
2.7.3 Desinfección de los explantes foliares	10
2.7.4 Siembra	10
2.7.5 Cuarto de crecimiento	10
2.7.6 Variables evaluadas	10
2.7.7 Análisis estadístico	12
2.8 Experimento 2: evaluación del efecto de 2,4-D y BAP en la multiplicación <i>in vitro</i> de explantes foliares (Etapa II) de <i>Zamioculcas</i> <i>zamiifolia</i>	12
2.8.1 Medio de cultivo	13
2.8.2 Reguladores de crecimiento	13

2.8.3 Material vegetal	13
2.8.4 Siembra	14
2.8.5 Cuarto de crecimiento	14
2.8.6 Variables evaluadas	14
2.8.7 Análisis estadístico	14
3. Resultados y discusión	15
3.1 Primera prueba de desinfección: desinfección de yemas rizomatosas de <i>Zamioculcas zamiifolia</i>	15
3.2 Segunda prueba de desinfección: desinfección de explantes foliares de <i>Zamioculcas zamiifolia</i>	15
3.3 Experimento 1: evaluación del efecto de 2,4-D y BAP en el establecimiento <i>in vitro</i> de explantes foliares (Etapa I) de <i>Zamioculcas zamiifolia</i>	15
3.3.1 Tipo de regeneración	15
3.3.2 Días a formación de callo y/o raíces	16
3.3.3 Categorización del tejido callogénico y rizogénico	17
3.3.3.1 Categorización del tejido callogénico	17
3.3.3.2 Categorización del tejido rizogénico	19
3.3.4 Supervivencia de explantes	19
3.3.5 Contaminación	20
3.3.6 Oxidación	23
3.3.7 Necrosis	24
3.4 Experimento 2: evaluación del efecto de 2,4-D y BAP en la multiplicación <i>in vitro</i> de explantes foliares (Etapa II) de <i>Zamioculcas zamiifolia</i>	25
3.4.1 Tipo de regeneración	25
3.4.2 Supervivencia de explantes	26
4. Conclusiones	27
5. Recomendaciones	28
6. Bibliografía	29
7. Anexos	30
7.1 Fotografías	30
7.2 Anexos	34

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Composición del medio nutritivo utilizado para el establecimiento de yemas rizomatosas en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , El Zamorano, Honduras, 2005.	6
2. Composición del medio nutritivo utilizado para el establecimiento de explantes foliares en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , El Zamorano, Honduras, 2005.	8
3. Tratamientos hormonales evaluados en la etapa de iniciación en el cultivo de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , El Zamorano, Honduras, 2005.	9
4. Tratamientos hormonales utilizados en el medio nutritivo para la etapa de multiplicación e inducción de brotes de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , El Zamorano, Honduras, 2005.	13
5. Efecto del BAP y 2,4-D en la formación de tejido callogénico y rizogénico a partir de explantes foliares a la sexta semana en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , El Zamorano, Honduras, 2005.	16
6. Efecto del BAP y 2,4-D en el número promedio de días a formación de tejido callogénico y rizogénico a partir de explantes foliares en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , El Zamorano, Honduras, 2005.	17
7. Efecto del BAP y 2,4-D en el porcentaje de categorización de formación de tejido callogénico de explantes foliares a la octava semana en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , El Zamorano, Honduras, 2005.	18
8. Efecto del BAP y 2,4-D en porcentaje de supervivencia de explantes foliares en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , El Zamorano, Honduras, 2005.	20
9. Efecto del BAP y 2,4-D en el porcentaje de contaminación de explantes foliares durante el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , El Zamorano, Honduras, 2005.	21

10. Efecto del BAP y 2,4-D en los días promedio a contaminación durante el establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005. 22
11. Efecto del BAP y 2,4-D en el porcentaje de oxidación de explantes foliares durante el establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005. 24
12. Efecto del BAP y 2,4-D en la categorización de formación de brotes y microtubérculos a partir de tejido callogénico procedente de explantes foliares en la etapa de multiplicación *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005. 26

ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfica	Página
1. Efecto del BAP y 2,4-D en porcentaje de categorización de formación de tejido callogénico de explantes foliares en el establecimiento <i>in Vitro</i> de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , El Zamorano, Honduras, 2005.	19
2. Porcentajes de contaminación de callos según los patógenos identificados correspondientes en la Etapa I en el cultivo de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , El Zamorano, Honduras, 2005.	23

ÍNDICE DE ANEXOS

FOTOGRAFÍAS

Fotografía	Pág.
1. Plantación madre de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> en el vivero Tukan Agroexport ubicado en Yojoa, Honduras. 2005.....	30
2. Planta madre de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> . El Zamorano, Honduras, 2005.....	30
3. Tejido callogénico generado a partir de explantes foliares durante el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> . El Zamorano, Honduras, 2005.....	31
4. Tejido rizogénico generado a partir de tejido callogénico durante el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> . El Zamorano, Honduras, 2005.....	31
5. Oxidación observada durante el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> . El Zamorano, Honduras, 2005.....	32
6. Necrosis observada durante el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> . El Zamorano, Honduras, 2005.....	32
7. Formación de brotes durante la etapa de multiplicación de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> . El Zamorano, Honduras, 2005.....	33
8. Formación de microtubérculos durante la etapa de multiplicación de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> . El Zamorano, Honduras, 2005.....	33

ANEXOS

Anexo	Pág.
1. Taxonomía de la <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , El Zamorano, Honduras, 2005...	34
2. Protocolo de desinfección de explantes foliares para el establecimiento <i>in vitro</i> de la <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , El Zamorano, Honduras, 2005.	35
3. Protocolo de multiplicación de explantes foliares para el establecimiento <i>in vitro</i> de la <i>Zamioculcas zamiifolia</i> , El Zamorano, Honduras, 2005.	37
4. Formulación nutritiva para la iniciación de tejido callogénico durante el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> a partir de explantes foliares. El Zamorano, Honduras, 2005.....	38
5. Formulación nutritiva para la estimulación de brotación a partir de tejido callogénico durante la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> . El Zamorano, Honduras, 2005.....	39
6. Formulación nutritiva para la estimulación de microtuberización a partir de tejido callogénico durante la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Zamioculcas zamiifolia</i> . El Zamorano, Honduras, 2005.....	40

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS MAS USADOS.

Término o Unidad de medida	Abreviatura
etc.	Etcétera
LCTM	Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación
i.a.	Ingrediente activo
<i>et. al.</i>	Entre otros autores
g	Gramos
L o l	Litro
WP	"Wet Powder" (Polvo mojable)
NaOCl	Hipoclorito de Sodio
INA	Instituto Nacional de Aprendizaje, Costa Rica
min	Minutos
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados
NH ₄ NO ₃	Nitrato de Amonio
FeNaEDTA	Quelato de hierro
MS	Murashige & Skoog
BAP	6-Bencilaminopurina
2,4-D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
°C	Grados centígrados
psi	"Pound square inches" (libras por pulgada cuadrada)
AIB	Ácido 3-indolebutírico
ANA	ácido α -naftalenoacético
DCA	Diseño completamente al azar
SAS	"Statistical Analysis System"
ANDEVA	Análisis de Varianza
GLM	Modelo General Lineal
Pág.	Página

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología ha sido utilizada por el hombre desde hace mucho tiempo en actividades de mejoramiento de cultivos; abarcando muchos campos, entre ellos el cultivo de tejidos, en donde se han obtenido muchos resultados en diferentes tipos de cultivos agrícolas, forestales y ornamentales.

Entre las ventajas del cultivo *in vitro* encontramos que se pueden producir en forma masiva las plantas que se desean, además de esto se puede mantener la identidad genética de la planta madre (Fotografía 1) al momento de producirlas. Así mismo se pueden producir plantas libres de patógenos por medio del cultivo de meristemos y uno de los avances más importantes en el ámbito de ornamentales es el de crear nuevas variedades a través de mutagénesis (Hurtado y Merino 1987).

La *Zamioculcas zamiifolia* (Fotografía 2) es un ornamental muy exótico para el mercado de exportación Europeo; a pesar de parecerse a una Cycadaceae, esta especie pertenece a la familia Araceae (Anexo 1) de donde provienen muchas otros géneros conocidos como el *Anthurium*, la *Dieffenbachia*, el *Philodendron*, etc. Esta especie es originaria de Zanzibar, Tanzania, en donde en su hábitat, prefiere suelos un poco secos de bosques bajos; se puede encontrar entre rocas, es tolerante a media sombra y es de crecimiento lento (Desert-Tropicals 2004).

En la República de Honduras la producción de ornamentales se ha ido intensificando cada vez mas, desde pequeños productores, hasta los grandes exportadores de dicho rubro. La empresa Tukan Agroexport localizada en Yojoa, Honduras, se dedica a la producción y exportación de ornamentales exóticos hacia Europa. Entre las plantas que exportan, se encuentran *Dracaenas*, *Scheffleras*, *Sansevieria*, *Zamioculcas*, entre otras.

La limitante que posee actualmente la empresa, es que debido a los altos niveles de exportación hacia el mercado europeo de la variedad tradicional de *Zamioculcas*, se está convirtiendo común ante los compradores y su popularidad está disminuyendo. Debido a este problema la encargada de la empresa, está explorando la posibilidad de crear una nueva variedad de la misma especie que presente características innovadoras y diferentes a la variedad que se comercializa actualmente (Anexo 2). La solución se encuentra por medio de experimentos con mutagénesis; sin embargo, esta especie nunca ha sido trabajada *in vitro* y por ello fue necesario el implementar un protocolo de regeneración *in vitro* de esta especie antes de proceder a someterla a tratamientos mutagénicos.

Uno de los objetivos de la propagación *in vitro* es el de proporcionar alternativas de reproducción a plantas que sean exóticas y/o que su reproducción vegetativa o sexual sea muy difícil por los métodos convencionales de propagación. Además, proporciona

también alternativas a otras especies que puedan estar en peligro de extinción o simplemente para reproducirlas comercialmente para su venta.

Los diferentes métodos de propagación *in vitro* incluyen: Esquejes de segmentos nodales, ramas axilares, regeneración de órganos adventicios (raíces o vástagos) sobre explantes, formación de órganos adventicios y embriones somáticos sobre callo y regeneración de plantas a partir de suspensiones celulares y protoplastos (Pierik 1976).

Por medio de este experimento se busca elaborar un procedimiento de desinfección y un protocolo de reproducción y regeneración *in vitro* de la *Zamioculcas zamiifolia* como paso previo a la inducción de tratamientos de mutagénesis como una alternativa para inducir variegación y poder producir una planta más llamativa que se pueda exportar hacia el mercado europeo. Una especie variegada sería muy bien reconocida sabiendo la aceptación que ya tiene la variedad tradicional.

El objetivo principal de este estudio fue la elaboración de un protocolo para el establecimiento y la multiplicación *in vitro* de la *Zamioculcas zamiifolia*.

Los objetivos específicos del mismo fueron: 1) la elaboración de un procedimiento de desinfección para el establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*; 2) selección del mejor tipo de explante (yemas rizomatosas y/o explantes foliares) para usarlo en la etapa de establecimiento; 3) determinación de los mejores tipos y niveles de hormonas en el establecimiento *in vitro* de explantes foliares y yemas rizomatosas de *Zamioculcas zamiifolia*; 4) determinación de los mejores tipos y niveles de hormonas en la multiplicación y regeneración de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*; y 5) determinación de los mejores tipos y niveles de hormonas para inducir tuberización *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 UBICACIÓN

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Micropropagación *in vitro* (LCTM) de Zamorano, Honduras, durante los meses de mayo a septiembre de 2005. Dentro del laboratorio se contó con todas las condiciones y el equipo adecuado para el desarrollo del experimento.

2.2 EQUIPO

Cámara de flujo laminar

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

Autoclave

Aparato esterilizador por medio de vapor (entre 115 y 135 °C) a presión utilizado para esterilizar instrumentos de trabajo, cristalería y medios nutritivos. Al momento de esterilizar instrumentos de trabajo, estos van empacados con papel aluminio y papel de empaque. Bajo las condiciones del LCTM el medio de cultivo es dispensado en tubos de ensayo o frascos para ser esterilizados en el autoclave con las siguientes características: 121 °C, 20 minutos y una presión de 15 psi.

2.3 CRISTALERÍA E INSTRUMENTOS

Se utilizó diversos materiales de vidrio, entre ellos, balones volumétricos, beakers, probetas, pipetas y jeringas dispensadoras. Al nivel de la cámara de flujo laminar, se utilizaron platos de Petri, tubos de ensayo, frascos. Los platos de Petri se empacaron con papel aluminio y papel de empaque para poder ser esterilizados en el autoclave.

Para el lavado de la cristalería, primero se lava con detergente luego se hace un primer enjuague con agua de llave, y finalmente se le hace un segundo enjuague con agua

destilada. Al nivel de la cámara de flujo laminar se utilizaron mecheros, bisturíes y pinzas para poder dividir el material vegetativo.

2.4 MATERIAL VEGETAL

La plantación madre de *Zamioculcas zamiifolia* se encuentra ubicada en la empresa Tukan Agroexport, Yojoa, Honduras. Las plantas utilizadas en el experimento fueron transportadas desde la plantación madre hacia los invernaderos del laboratorio en Zamorano, donde fueron sometidas a un período de cuarentena que consistió en aplicaciones semanales del bactericida Agrymicin[®] 16.5 WP (2g/L) y del fungicida Benlate[®] 50WP (2g/L); además, se aplicó semanalmente el fertilizante Florifert[®] (20-20-20) a razón de 60 gramos por bomba de 15 litros.

Se ha observado que los explantes obtenidos a partir de plantas cultivadas en invernadero bajo condiciones óptimas, se establecen más fácilmente *in vitro* en comparación con el material que proviene del campo (Barba, *et al.* 2001).

El material utilizado fue hojas adultas, bien desarrolladas, sin deformidades foliares. Además se usaron yemas rizomatosas con un tamaño aproximado de dos a ocho milímetros y con un estado saludable.

2.5 PREPARACIÓN DE LOS EXPLANTES

Ruíz (2000) define al explante como una porción de tejido escindida, u órgano tomado de la planta, para iniciar un cultivo y que para el establecimiento y desarrollo de cada cultivo se debe seleccionar el explante adecuado.

La recolección de explantes foliares y yemas rizomatosas se realizó en horas de la mañana para reducir el estrés calórico; para las hojas se tomó en cuenta la salud de las hojas y un tamaño de largo mínimo de cinco centímetros; para las yemas se consideró la apariencia saludable y el desarrollo vigoroso de la planta.

En el invernadero, las hojas se cortaron con un bisturí #21, dejando una pequeña porción de pecíolo. Luego las hojas fueron trasladadas al laboratorio donde se realizó un lavado con agua y jabón, seguido del proceso de desinfección y el procedimiento de siembra. Una vez terminado el proceso de desinfección, a nivel de la cámara de flujo laminar, se hizo la última disección sobre un plato de Petri, utilizando bisturí y pinzas estériles, se cortaron los bordes y extremos de las hojas, quedando al final explantes de 1cm² aproximadamente.

Para las yemas, se extrajo la planta completa del invernadero, los tallos fueron removidos dejando únicamente los rizomas con las yemas; seguidamente se lavaron con agua, jabón, junto con un cepillo fino para remover con mayor efectividad la suciedad y no dañar las yemas. Por último se siguió el proceso de desinfección que está en la sección 2.6.1.

2.6 DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES

Debido a que es un nuevo cultivo que se trabaja en propagación *in vitro*, según el INA (1994) se deben realizar pruebas preliminares de desinfección con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) y diferentes tiempos de exposición, por lo que se elaboró un procedimiento de desinfección tanto para las yemas rizomatosas como para los explantes foliares con base en el documento mencionado.

2.6.1 Primera prueba de desinfección: desinfección de yemas rizomatosas de *Zamioculcas zamiifolia*

La primera prueba de desinfección en yemas rizomatosas, para el manejo de contaminación en el establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, consistió en cuatro tratamientos correspondientes a dos concentraciones de hipoclorito de sodio: 10 y 15% y dos tiempos de exposición: 15 y 20 minutos.

Luego del lavado inicial, los tubérculos se sometieron a un enjuague en agua destilada estéril por 15 minutos. Seguidamente se escindieron las yemas con la ayuda de un estereoscopio, agujas hipodérmicas y bisturí #11. Una vez extraídas las yemas, estas se colocaron en un plato de Petri con solución antioxidante (150 mg de ácido cítrico mas 100 mg de ácido ascórbico) por 10 minutos en constante agitación.

A nivel de la cámara de flujo laminar, las yemas fueron transferidas a cada solución desinfectante del tratamiento correspondiente.

Finalmente se hicieron dos enjuagues con agua destilada estéril por cinco minutos cada uno antes de proceder a la siembra de los explantes en el medio correspondiente (Cuadro 1). En total se sembraron 120 tubos divididos en cuatro tratamientos, tres repeticiones y diez tubos por repetición.

Cuadro 1. Composición del medio nutritivo utilizado para el establecimiento de yemas rizomatosas en el cultivo *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

Compuesto	mg/l
Macroelementos	
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	1650.000
Nitrato de potasio (KNO ₃)	1900.000
Cloruro de calcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	440.000
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	370.000
Fosfato potásico (KH ₂ PO ₄)	170.000
Microelementos	
Acido bórico (H ₃ BO ₃)	6.200
Sulfato de manganeso monohidratado (MnSO ₄ ·H ₂ O)	16.900
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	8.600
Yoduro de potasio (KI)	0.830
Molibdato de sodio (NaMoO ₄ ·2H ₂ O)	0.250
Sulfato de cobre (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.025
Cloruro cobáltico (CoCl ₂ ·6H ₂ 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 = 5.7	

Fuente: Guía para la producción de cultivos. Módulo de Biotecnología Aplicada, Zamorano, 2004.

2.6.2 Segunda prueba de desinfección: desinfección de explantes foliares de *Zamioculcas zamiifolia*

La prueba de desinfección en explantes foliares, para el manejo de contaminación en el establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, consistió en seis tratamientos correspondientes a tres concentraciones de NaOCl: 0.5, 1.0 y 2.0% y dos tiempos de exposición: 15 y 20 minutos.

La recolección de los explantes se efectuó tomando en cuenta el estado de salud de la planta, el tamaño de las hojas y la forma de las mismas, es decir, que no tengan deformidad ni deficiencias nutricionales. Pierik (1976) demostró que para los explantes de hoja se deben de tomar aquellas hojas jóvenes que tengan entre 50 y 70% de largo definitivo.

Luego de su recolección, las hojas fueron transportadas al laboratorio donde se lavaron con agua y jabón líquido para poder remover las suciedades del exterior. Después se colocaron en bandejas plásticas para el secado previo a la siembra.

Al nivel de la cámara de flujo laminar, las hojas se introdujeron en un beaker con la solución desinfectante de NaOCl, según el tratamiento utilizado y durante el tiempo respectivo más tres gotas de agente humectante (Tween 80) por cada 100 ml de solución desinfectante que se utilizó. Luego el beaker se cubrió con una gasa y se ajustó con una banda plástica.

Finalmente se procedió a realizar tres lavados con agua destilada estéril de dos minutos cada uno. Seguidamente se hizo la primera disección en un plato de Petri, eliminando los bordes de las hojas, el ápice y el pecíolo. Al final quedó un rectángulo de 3×8 cm aproximadamente. El tejido disectado se sumergió en un segundo lavado en una solución al 0.4% de NaOCl durante cinco minutos y luego se lavó cuatro veces con agua destilada y estéril para eliminar los residuos de la solución desinfectante.

Por último se cortan los bordes de las hojas, para lo cual se prepararon láminas foliares de 1cm^2 aproximadamente y se sembraron en el medio (Cuadro 2).

Se sembraron 180 tubos divididos en seis tratamientos, cada tratamiento con tres repeticiones y diez tubos por repetición.

Cuadro 2. Composición del medio nutritivo utilizado para el establecimiento de explantes foliares en el cultivo *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

Compuesto	mg/l
Macroelementos (1/2 MS)	
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	825.000
Nitrato de potasio (KNO ₃)	950.000
Cloruro de calcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	220.000
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	185.000
Fosfato potásico (KH ₂ PO ₄)	85.000
Microelementos	
Acido bórico (H ₃ BO ₃)	6.200
Sulfato de manganeso monohidratado (MnSO ₄ ·H ₂ O)	16.900
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	8.600
Yoduro de potasio (KI)	0.830
Molibdato de sodio (NaMoO ₄ ·2H ₂ O)	0.250
Sulfato de cobre (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.025
Cloruro cobáltico (CoCl ₂ ·6H ₂ 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.

2.7 EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE 2,4-D Y BAP EN EL ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES FOLIARES (ETAPA I) DE ZAMIOCULCAS ZAMIIFOLIA

Luego de dilucidar un procedimiento efectivo de desinfección para explantes foliares, se procedió a elaborar el experimento de establecimiento *in vitro*, en el cual se buscó los niveles ideales de hormonas que induzcan una respuesta regenerativa de los explantes.

Cada fracción aislada del explante, tiene su propia porción de reservas de hormonas, es obvio que mientras mayor sea el fragmento vegetal, más fácil es inducir el crecimiento y regeneración (INA 1994).

Para el ordenamiento de los tratamientos del experimento, se realizaron combinaciones de las fitohormonas 2,4-D (0, 0.2, 0.4, 0.8 mg/l) y de BAP (0, 1.5, 3.0, 6.0 mg/l) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos hormonales evaluados en la etapa de iniciación en el cultivo de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento	(mg/l)	
	2,4-D [‡]	BAP [§]
1		0.0
2		1.5
3	0.0	3.0
4		6.0
5		0.0
6		1.5
7	0.2	3.0
8		6.0
9		0.0
10		1.5
11	0.4	3.0
12		6.0
13		0.0
14		1.5
15	0.8	3.0
16		6.0

[§] 6-Bencil aminopurina

[‡] Acido 2,4-Diclorofenoxiacético

2.7.1 Medio de cultivo

El medio nutritivo utilizado para la iniciación de *Zamioculcas* a partir de explantes foliares, consistió en una modificación del medio original de Murashige & Skoog (MS) para iniciación de *Anthurium andreanum* (INA 1994) (Cuadro 2).

La cantidad de macroelementos utilizada se redujo a la mitad (50%) siguiendo el protocolo de producción *in vitro* para *Anthurium andreanum*, el cual establece que una alta concentración de nitrato de amonio (NH₄NO₃) es una limitante para que los brotes adventicios de los tejidos callogénicos en aráceas puedan regenerar (Ruíz 2002).

Los microelementos y FeNaEDTA se utilizaron de acuerdo a las cantidades utilizadas en el medio original MS (Cuadro 2).

2.7.2 Reguladores de crecimiento

Las auxinas sintéticas y relativamente más activas 3-indolbutírico (AIB), ácido α -naftalenoacético (ANA) y ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) generalmente producen

elongación celular y expansión de los tejidos; división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias; y a altas concentraciones se da la formación de callo en lugar de raíces.

Para la Etapa I se usaron los siguientes reguladores de crecimiento: BAP y 2-4,D los cuales fueron añadidos al medio de cultivo para formación callogénica y luego inducir organogénesis indirecta (Cuadro 3).

2.7.3 Desinfección de los explantes foliares

Se siguió el proceso de desinfección que se elaboró en la segunda prueba de desinfección detallada en el numeral 2.6.2. utilizando el mejor tratamiento obtenido de ésta prueba, 0.5% de ingrediente activo de NaOCl y 15 minutos de exposición, seguido de una segunda desinfección con 0.4% de NaOCl durante cinco minutos.

Se realizó la primera desinfección con 0.5% de NaOCl durante 15 minutos de exposición. Luego de la primera desinfección química se realizó un lavado con agua destilada estéril para eliminar residuos y se hizo la primera disección eliminando los bordes de los explantes foliares. Luego se realizó la segunda desinfección con 0.4% NaOCl durante cinco minutos de exposición, un segundo lavado antes de proceder a una segunda disección cortando nuevamente los cuatro bordes del tejido dejando explantes de aproximadamente 1.5×1.5 cm. Los explantes disectados se sembraron en frascos conteniendo el medio de formación callogénica (Cuadro 2).

2.7.4 Siembra

La siembra fue realizada por el mismo operador con el objetivo de disminuir el error experimental que se puede dar por una contaminación cruzada o por la forma de siembra; se realizaron en bloques de tres días, las cuales corresponden a las tres repeticiones del experimento; es decir, se sembró una repetición por día. Los explantes foliares se sembraron de forma polar.

Los frascos se sellaron con parafilm, anotando fecha y nombre en cada contenedor. Por último se llevan los tubos al cuarto de crecimiento.

2.7.5 Cuarto de crecimiento

Luego de la siembra, los frascos conteniendo los explantes foliares fueron incubados en un cuarto de crecimiento con las condiciones controladas de temperatura (22 °C) y un fotoperíodo de 16 horas luz, procedente de tubos fluorescentes de tipo blanco frío.

2.7.6 Variables evaluadas

Una semana después de la siembra del experimento, se inició con la toma de datos del mismo. En estas primeras observaciones se determinaron, cambios en color, forma y tamaño del explante, además de los niveles de contaminación de los cultivos.

Luego de seis semanas después de la siembra se evaluó la variable tipo de regeneración; para obtener diferenciación estadística en la variable categorización de tejido callogénico, se evaluó esta variable a la octava semana. El resto de variables se evaluaron en la octava semana; las variables que se midieron fueron:

- a) Tipo de regeneración: determinando el porcentaje de formación callogénica o de formación de órganos o de embriones somáticos.
- b) Días a formación de callo y/o raíces: considerándose, para callo, el inicio de la formación al observar pequeñas protuberancias alrededor del explante; para raíces la aparición de raicillas en el explante tanto de forma polar como apolar.
- c) Categorización de tejido callogénico: se evaluó dando valores numéricos según la intensidad de la formación callogénica cubriendo el explante directamente:
 - 0: no se observó formación de tejido callogénico (0% de tejido callogénico cubriendo el explante foliar),
 - 1: formación leve de tejido callogénico (1-33%),
 - 2: formación media de tejido callogénico (34-66%),
 - 3: formación severa de tejido callogénico (>67%).
- d) Categorización del tejido rizogénico: se evaluó dando valores numéricos según la intensidad de la formación rizogénica:
 - 0: no se observó formación de tejido rizogénico (0 raíces formadas del tejido callogénico),
 - 1: formación leve de tejido rizogénico (1-3 raíces),
 - 2: formación media de tejido rizogénico (4-6 raíces),
 - 3: formación severa de tejido rizogénico (> 7 raíces).
- e) Supervivencia de explantes: determinando el porcentaje de explantes saludables y regenerado que llegaron al final del experimento y que no presentaron signos de contaminación, necrosis y/u oxidación.
- f) Contaminación: evaluando la presencia o ausencia de contaminación. Una vez determinado el tipo de contaminante (hongo o bacteria), se desechaba inmediatamente el frasco.
- g) Oxidación: se evaluó presencia o ausencia de oxidación. Todo explante que mostró exudados y manchas de color café se determinó como oxidado.
- h) Necrosis: se evaluó presencia o ausencia de necrosis. Todo explante que mostró características de necrosis se desechaba el frasco.

2.7.7 Análisis estadístico

Para los explantes foliares se realizó un arreglo factorial de (4×4) en un diseño completamente al azar (DCA); siendo los factores A las cuatro concentraciones de BAP (0, 1.5, 3.0, 6.0 mg/l) y B las cuatro las concentraciones de 2,4-D (0, 0.2, 0.4, 0.8 mg/l).

Se usó el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS, 1998) y para el tratamiento se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con un modelo general lineal (GLM). El nivel de significancia requerido fue de 0.05.

2.8 EXPERIMENTO 2: EVALUACION DEL EFECTO DE 2,4-D Y BAP EN LA MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE EXPLANTES FOLIARES (ETAPA II) DE *ZAMIOCULCAS ZAMIIFOLIA*

Mientras se estaba desarrollando el experimento primario, los explantes que se generaron en el proceso de desinfección, desarrollaron callos y raíces.

Ruíz (2000) explica que existen dos procesos en la formación de órganos adventicios, conocidos como organogénesis directa, en la que del explante se originan directamente brotes o raíces y organogénesis indirecta en la que hay formación de callo a partir del explante, luego de este tejido calloso se originan brotes y raíces.

Debido a la alta cantidad de explantes generados en la etapa de desinfección, se decidió llevarlo a Etapa II para buscar el mejor tratamiento que induzca a la multiplicación de callos o el mejor tratamiento que estimule brotación a partir de tejido callogénico.

Para el ordenamiento de los tratamientos del experimento, se realizó la misma combinación de las fitohormonas 2,4-D (0, 0.2, 0.4, 0.8 mg/l) y de BAP (0, 1.5, 3.0, 6.0 mg/l), utilizada en el experimento de Etapa I (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tratamientos hormonales utilizados en el medio nutritivo para la etapa de multiplicación e inducción de brotes de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento	(mg/l)	
	2,4-D [§]	BAP [£]
1		0.0
2	0.0	1.5
3		3.0
4		6.0
5		0.0
6		1.5
7	0.2	3.0
8		6.0
9		0.0
10		1.5
11	0.4	3.0
12		6.0
13		0.0
14		1.5
15	0.8	3.0
16		6.0

£ 6-Bencilaminopurina.

§ Acido 2,4 Diclorofenoxiacético.

2.8.1 Medio de cultivo

El medio nutritivo utilizado para la Etapa II fue el mismo medio utilizado en la Etapa I (Cuadro 2) con el objetivo de determinar los tratamientos que mejor respondan a generación de brotes o tejido callogénico, siendo lo ideal buscar la inducción de brotes para multiplicar los tejidos y llevarlos a Etapa III.

2.8.2 Reguladores de crecimiento

La única excepción al experimento anterior fue una prueba con los explantes para determinar el crecimiento rizogénico polar y apolar, separando cuatro frascos por tratamiento para esta prueba (Cuadro 4).

2.8.3 Material vegetal

Se utilizó tejido callogénico procedente de explantes foliares establecido en el proceso de desinfección descrito en 2.6.2. Los criterios de selección del material fueron, apariencia saludable, sin presencia de oxidación o patógenos contaminantes como hongos o bacterias; además se tomo en cuenta la cantidad ó intensidad de callo formado, así como la formación rizogénica en el explante.

2.8.4 Siembra

Al igual que en el experimento principal, la siembra se realizó por una persona, con el objetivo de disminuir el error experimental que se puede dar por contaminación o por la forma de siembra de cada uno.

Las siembras se realizaron en tres días, las cuales corresponden a las tres repeticiones del experimento; es decir, se sembró una repetición por día. Para estas transferencias se realizó una limpieza del explante al momento de su división y colocarlo en un nuevo medio nutritivo.

Se sellaron los tubos con parafilm, anotando fecha y nombre según lo deseado. Por último se llevan los tubos al cuarto de crecimiento.

2.8.5 Cuarto de crecimiento

El material transferido para este experimento fue incubado bajo las mismas condiciones que se detallan en 2.7.5.

2.8.6 Variables evaluadas

Una semana después de la siembra del experimento, se inició con la toma de datos del mismo. En estas primeras observaciones se determinaban, cambios en color, forma y tamaño del explante; además de los niveles de contaminación de los cultivos.

Luego de ocho semanas después de la siembra, las variables que se midieron fueron:

- a) Tipo de regeneración: formación de tejido callogénico, brotes a partir de yemas o rizogénesis.
- b) Supervivencia de explantes: determinando el porcentaje de explantes saludables y regenerados que llegaron al final del experimento.

2.8.7 Análisis estadístico

Se realizó un arreglo factorial de (4×4) en un diseño completamente al azar (DCA); siendo los factores A las cuatro concentraciones de BAP (0, 1.5, 3.0, 6.0 mg/l) y B las cuatro concentraciones de 2,4-D (0, 0.2, 0.4, 0.8 mg/l).

Se usó el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS, 1998) y para el tratamiento se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con un modelo general lineal (GLM). El nivel de significancia requerido fue de 0.05.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 PRIMERA PRUEBA DE DESINFECCIÓN: DESINFECCIÓN DE YEMAS RIZOMATOSAS DE *ZAMIOCULCAS ZAMIIFOLIA*

Los cuatro tratamientos de desinfección evaluados para las yemas rizomatosas resultaron con un 100% de contaminación por hongos. Esta alta contaminación fue debido seguramente a la presencia endógena de patógenos en las yemas posteriori a las pruebas de desinfección. Después de dos semanas todos los tubos estaban contaminados, por lo que se procedió a su eliminación.

3.2 SEGUNDA PRUEBA DE DESINFECCIÓN: DESINFECCIÓN DE EXPLANTES FOLIARES DE *ZAMIOCULCAS ZAMIIFOLIA*

A diferencia de las yemas, los explantes foliares tuvieron mejores respuestas. El menor porcentaje de contaminación se obtuvo utilizando 0.5% de ingrediente activo de NaOCl por 15 minutos, el cual no presentó contaminación de ningún tipo. Iguales resultados se observaron utilizando 0.5% NaOCl durante 20 minutos; sin embargo, se eligió el tratamiento uno por que tiene menor tiempo de exposición, reduciendo el posible daño mecánico que puedan sufrir las hojas durante la agitación (Anexo 2).

3.3 EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE 2,4-D Y BAP EN EL ESTABLECIMIENTO DE EXPLANTES FOLIARES (ETAPA I) DE *ZAMIOCULCAS ZAMIIFOLIA*

3.3.1 Tipo de regeneración

Luego de ocho semanas de evaluación, los tipos de regeneración formados fueron tejido callogénico y tejido rizogénico (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto del BAP y 2,4-D en la formación de tejido callogénico y rizogénico a partir de explantes foliares a la sexta semana de establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento (mg/l)		Tejido Callogénico (%)	Formación de raíces (%)
2,4-D [§]	BAP [£]		
0	0	59 ^{ab₁}	12 ^a
	1.5	31 ^{bcd}	-
	3	21 ^{cd}	-
	6	5 ^d	-
0.2	0	67 ^{ab}	14 ^a
	1.5	77 ^a	8 ^{ab}
	3	64 ^{ab}	12 ^a
	6	39 ^{abcd}	15 ^a
0.4	0	64 ^{ab}	-
	1.5	70 ^a	-
	3	72 ^a	8 ^{ab}
	6	44 ^{abc}	15 ^a
0.8	0	62 ^{ab}	-
	1.5	77 ^a	-
	3	75 ^a	-
	6	67 ^{ab}	-

¹ abcd Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia estadística significativa (P<0.05)

[£] 6-Bencilaminopurina.

[§] Acido 2,4 Diclorofenoxiacético.

Los tratamientos que tuvieron una mejor regeneración callogénica (77%) (Fotografía 3) generaron fueron donde se utilizó 1.5 y 0.2 mg/l de BAP y 2,4-D respectivamente y 1.5 y 0.8 mg/l de BAP y 2,4-D respectivamente, demostrando que el uso de la auxina 2,4-D es muy importante para la regeneración de callo.

La formación de tejido rizogénico (Fotografía 4) se presentó en mayor cantidad en los tratamientos donde se utilizó 6.0 mg/l de BAP combinado tanto con 0.2 como con 0.4 mg/l de 2,4-D, en ambos tratamientos hubo un 15% de formación rizogénica a partir del tejido callogénico.

3.3.2 Días a formación de callo y/o raíces

Los días a formación de callo fueron similares en todos los tratamientos. El menor número de días a formación de tejido callogénico (15 días) se registro al utilizar 6.0 y 0 mg/l de BAP y 2,4-D respectivamente (Cuadro 6). Sin embargo fue el que presentó el menor porcentaje de tejido callogénico (5%) (Cuadro 5) y mayor porcentaje de oxidación (72%).

Cuadro 6. Efecto del BAP y 2,4-D en el número promedio de días a formación de tejido callogénico y rizogénico a partir de explantes foliares en el establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento		Días a formación de tejido	
(mg/l)		Callogénico	Rizogénico
2,4-D [§]	BAP [£]		
0	0	33 ^{a1}	45
	1.5	30 ^a	-
	3	34 ^a	-
	6	15 ^b	-
0.2	0	23 ^{ab}	37
	1.5	22 ^{ab}	45
	3	29 ^a	46
	6	26 ^{ab}	45
0.4	0	27 ^{ab}	-
	1.5	31 ^a	-
	3	26 ^{ab}	41
	6	25 ^{ab}	44
0.8	0	32 ^a	-
	1.5	28 ^{ab}	-
	3	27 ^{ab}	-
	6	27 ^{ab}	-

¹ ab Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia estadística significativa (P<0.05)

[£] 6-Bencilaminopurina.

[§] Acido 2,4 Diclorofenoxiacético.

Independientemente de las dosis utilizadas de 2,4-D, siempre se observó el menor número de días a formación de tejido callogénico al utilizar concentraciones de 6 mg/l de BAP.

En promedio se observó que hubo formación de raíces a partir de los 43 días después de la siembra.

3.3.3 Categorización del tejido callogénico y rizogénico

3.3.3.1 Categorización del tejido callogénico

El tejido callogénico se categorizó según la intensidad generada (Cuadro 7, Gráfica 1) a partir de los explantes foliares iniciales según se describió en 2.7.6.

Cuadro 7. Efecto del BAP y 2,4-D en el porcentaje de categorización de formación de tejido callogénico a partir de explantes foliares a la octava semana del establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento (mg/l)		Categoría de tejido callogénico			
2,4-D [§]	BAP [£]	0	1	2	3
0	0	34 ^{d1}	42 ^a	17 ^c	7 ^e
	1.5	62 ^{bc}	30 ^b	8 ^d	0 ^f
	3	59 ^c	35 ^b	6 ^d	0 ^f
	6	92 ^a	0 ^e	8 ^d	0 ^f
0.2	0	27 ^e	10 ^d	21 ^c	42 ^b
	1.5	22 ^{ef}	7 ^d	22 ^c	49 ^a
	3	23 ^e	19 ^c	7 ^d	51 ^a
	6	37 ^d	7 ^d	7 ^d	49 ^a
0.4	0	35 ^d	16 ^{cd}	9 ^d	40 ^b
	1.5	17 ^f	20 ^c	12 ^{cd}	51 ^a
	3	16 ^f	20 ^c	11 ^{cd}	53 ^a
	6	36 ^d	0 ^e	24 ^{bc}	40 ^b
0.8	0	27 ^e	16 ^{cd}	40 ^a	17 ^d
	1.5	24 ^e	18 ^c	9 ^d	49 ^a
	3	19 ^f	11 ^d	16 ^c	54 ^a
	6	15 ^f	19 ^c	26 ^c	40 ^b

¹ abcde Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia estadística significativa (P<0.05)

[£] 6-Bencilaminopurina

[§] Acido 2,4 Diclorofenoxiacético

Callo 0: no formación de tejido callogénico

Callo 1: 1-33% de formación de tejido callogénico cubriendo el explante foliar

Callo 2: 34-66% de formación de tejido callogénico cubriendo el explante foliar

Callo 3: 67-100% de formación de tejido callogénico cubriendo el explante foliar.

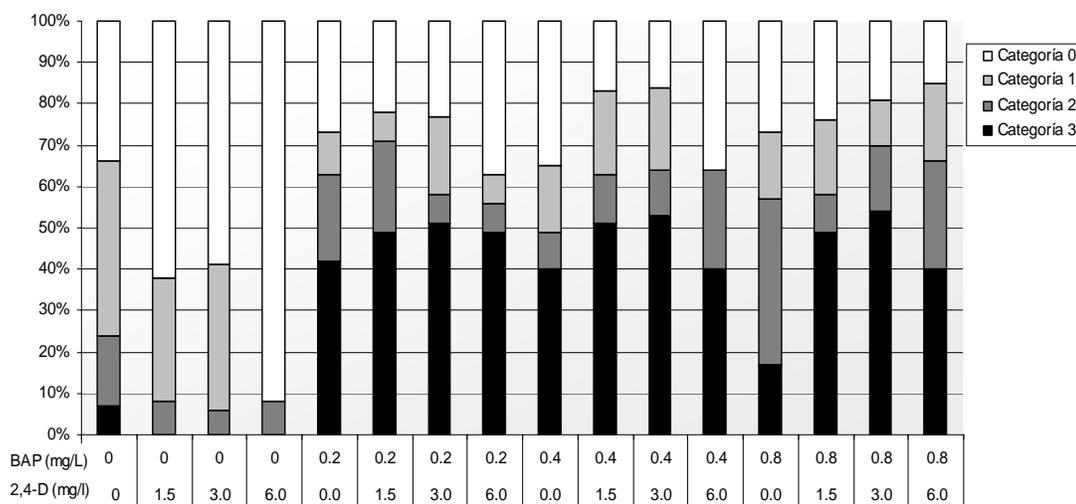
La categoría 3 es la más importante en este análisis por el hecho de que a mayor cantidad de callo generado, potencialmente se puede obtener un mayor número de plantas aptas para pasar a la siguiente etapa. Hubo varios tratamientos que estadísticamente mostraron el valor mas alto.

Estadísticamente se observó un mayor porcentaje de formación callogénica de categoría 3 al utilizar 1.5, 3.0 y 6.0 mg/l de BAP combinado con 0.2 mg/l de 2,4-D, igualmente al utilizar 1.5 y 3.0 mg/l de BAP ambos combinados con 0.4 y 0.8 mg/l de 2,4-D. La tendencia a formar un mayor porcentaje de formación callogénica categoría 3 (54%) se expresó al utilizar 3.0 y 0.8 mg/l de BAP y 2,4-D respectivamente.

Los mayores valores para la formación de callo categoría 0, es decir no formación ó ausencia de tejido callogénico se obtuvo en aquellos tratamientos sin 2,4-D; siendo más crítico cuando utilizamos solo 6 mg/l BAP (92%).

Por otro lado la mayor formación (42%) de tejido callogénico de categoría 1 (1-33% de tejido callogénico cubriendo el explante foliar) se obtuvo al no utilizar hormonas de crecimiento.

El mayor porcentaje (40%) de callo categoría 2 (34-66% de tejido callogénico cubriendo el explante) se generó al utilizar la concentración más alta de 2,4-D (0.8 mg/l) sin BAP.



Gráfica 1. Efecto del BAP y 2,4-D en el porcentaje de categorización de formación de tejido callogénico a partir de explantes foliares en el establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

3.3.3.2 Categorización del tejido rizogénico

Independiente de la concentración de fitohormonas utilizada, no existieron diferencias significativas en la categorización del tejido rizogénico formado en los explantes de los tratamientos que generaron raíces (Cuadro 5). Estos tratamientos tuvieron un nivel de categorización 3 (mayor de siete raíces), lo cual indica que a pesar de las diferentes concentraciones de fitohormonas, todas generaron más de siete raíces.

3.3.4 Supervivencia de explantes

La variable supervivencia de explantes incluyó a todos aquellos explantes que regeneraron algún tipo de tejido somático incluyendo tejido callogénico y/o rizogénico.

Los explantes que resultaron contaminados, oxidados o con tejidos necrotizados fueron evaluados de acuerdo a su grupo respectivo, excluyéndolos de los explantes que regeneraron algún tejido somático.

El promedio total de supervivencia de explantes fue de 55% (Cuadro 8), el cual incluye formación callogénica, formación rizogénica o la combinación de ambos. El resto de los explantes fue afectado por contaminación (26%), oxidación (13%) y necrosis (0.5%) y fueron evaluados de acuerdo al problema que presentaron.

Cuadro 8. Efecto del BAP y 2,4-D en porcentaje de supervivencia de explantes foliares durante el establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento		Supervivencia
(mg/l)		
2,4-D [‡]	BAP [§]	
0	0	49 ^{e1}
	1.5	49 ^e
	3	18 ^g
	6	0 ^h
0.2	0	69 ^c
	1.5	82 ^a
	3	62 ^c
	6	46 ^e
0.4	0	42 ^e
	1.5	82 ^a
	3	77 ^b
	6	38 ^f
0.8	0	54 ^d
	1.5	73 ^b
	3	74 ^b
	6	65 ^c

¹ abcdefgh Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia estadística significativa (P<0.05)

[§] 6-Bencil aminopurina

[‡] Acido 2,4-Diclorofenoxiacético.

Se observó un mayor porcentaje de supervivencia de explantes (82%) al utilizar 1.5 mg/l de BAP combinado con 0.2 y 0.4 mg/l de 2,4-D (Cuadro 8).

El tratamiento que resultó con menor porcentaje de explantes supervivientes (0%) fue el de 6.0 y 0 mg/l de BAP y 2,4-D, respectivamente; esta baja sobrevivencia se debió al alto nivel de oxidación observado al utilizar estos niveles de hormonas.

3.3.5 Contaminación

El tratamiento con 6.0 y 0.2 mg/l de BAP y 2,4-D, respectivamente fue el que mayor porcentaje de contaminación (54%) presentó en todo el experimento (Cuadro 9). Hubo muchos tratamientos estadísticamente iguales en cuanto al menor porcentaje de

contaminación que tuvieron sin embargo, los tratamientos donde se utilizó 1.5 mg/l de BAP combinado con 0.2 y 0.4 mg/l de 2,4-D presentaron el menor porcentaje de contaminación (18%).

Cuadro 9. Efecto del BAP y 2,4-D en el porcentaje de contaminación de explantes durante el establecimiento *in Vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento (mg/l)		Contaminación
2,4-D [‡]	BAP [§]	
0	0	31 ^{ab₁}
	1.5	29 ^{ab}
	3	31 ^{ab}
	6	28 ^{ab}
0.2	0	31 ^{ab}
	1.5	18 ^b
	3	31 ^{ab}
	6	54 ^a
0.4	0	46 ^{ab}
	1.5	18 ^b
	3	23 ^b
	6	46 ^{ab}
0.8	0	23 ^b
	1.5	27 ^{ab}
	3	26 ^{ab}
	6	23 ^b

[‡] ab Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia estadística significativa (P<0.05)

[§] 6-Bencil aminopurina

[‡] Acido 2,4-Diclorofenoxiacético.

Los porcentajes de contaminación no dependieron de la interacción de ambas hormonas. Según Herman (1996) muchas bacterias, hongos y virus que son patógenas *in vivo*, pueden permanecer latentes en las mismas plantas durante un período indeterminado de tiempo. Es posible que el patógeno no presente los síntomas visibles durante la siembra del explante o incluso en las primeras semanas en la cámara de crecimiento. Por esa razón, se realizó un análisis que determina los días promedio en la que el patógeno presentó sus síntomas característicos (Cuadro 10).

Hubo nueve tratamientos que estadísticamente generaron contaminación en menor tiempo, sin embargo, en los tratamientos con 0 mg/l de BAP combinado con 0 y 0.8 mg/l de 2,4-D se observó contaminación a los 17 días en promedio después de la siembra, independientemente del tipo de contaminación generada.

El tratamiento que tuvo la tendencia a presentar contaminación en un tiempo mayor fue aquel en el que se uso 6.0 y 0.8 mg/l de BAP y 2,4-D respectivamente.

Cuadro 10. Efecto del BAP y 2,4-D en los días promedio a contaminación durante el establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento (mg/l)		Contaminación
2,4-D [‡]	BAP [§]	
0	0	17 ^{c1}
	1.5	22 ^b
	3	19 ^{bc}
	6	18 ^c
	0	18 ^c
0.2	1.5	20 ^{bc}
	3	22 ^b
	6	31 ^a
	0	18 ^c
	1.5	19 ^c
0.4	3	29 ^a
	6	23 ^b
	0	17 ^c
	1.5	27 ^{ab}
	3	18 ^c
0.8	6	32 ^a

¹ abc Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia estadística significativa (P<0.05)

[§] 6-Bencil aminopurina

[‡] Acido 2,4-Diclorofenoxiacético.

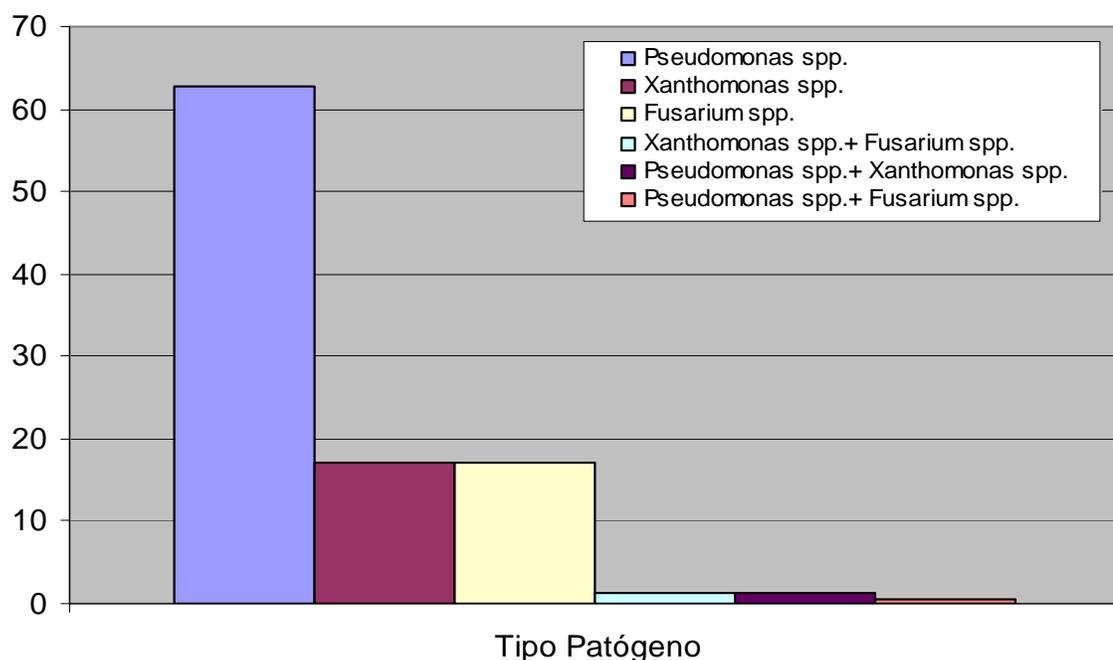
Los frascos contaminados fueron analizados en el Laboratorio de Microbiología de Zamorano y en el Laboratorio de Fitopatología en Zamorano para poder determinar que tipo de contaminantes surgieron en la Etapa I de establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia* y así tener conocimiento y poder tomar medidas de control para aumentar la producción de esta especie. Se presentaron tres diferentes tipos de patógenos: las bacterias *Pseudomonas spp.* y *Xanthomonas spp.* y el hongo *Fusarium spp.*

Las bacterias *Pseudomonas spp.* y *Xanthomonas spp.* son bacterias gram negativas que tienen la capacidad de sobrevivir las altas temperaturas que el autoclave y los mecheros puedan generar durante el proceso de esterilización.

El origen de estos patógenos puede ser de diferentes fuentes, desde el campo o durante el proceso de siembra. Estudios realizados por Herman (1996), revelaron datos sorprendentes de la contaminación: el etanol al 95% que se usa para la limpieza de las cámaras y de las herramientas de trabajo, con frecuencia pueden albergar hongos y

bacterias. Estos contaminantes no siempre son destruidos en su totalidad al flamear los instrumentos.

De los 624 frascos sembrados en esta etapa, el 26% resultó contaminado con los tres patógenos mencionados anteriormente (Gráfica 2).



Gráfica 2. Porcentajes de contaminación según los patógenos identificados durante el establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

El mayor contaminante que se observó en todo el experimento (63%) fue el patógeno *Pseudomonas spp.* Del 26% total de contaminación que hubo en el experimento, el 17% resultó de la interacción de los patógenos *Xanthomonas spp.* y *Fusarium spp.* y el 3% de la combinación de los tres patógenos visualizados.

3.3.6 Oxidación

La oxidación es un proceso bioquímico generado por la liberación de compuestos fenólicos que tiene el explante hacia el medio de cultivo. Una vez en el medio de cultivo, estos compuestos fenólicos reaccionan con los azúcares que se encuentran y producen la oxidación (Fotografía 5).

De acuerdo a Martínez (2005), los niveles de oxidación dependen de muchos factores tanto de la planta con la que se trabajó (tipo de explante, cortes del explante), así como de los compuestos que el medio de cultivo contenga. Dependiendo de esos factores, las

características del proceso de oxidación se visualizaran en un corto o prolongado tiempo luego de su siembra

El tratamiento con 6.0 y 0 mg/l de BAP y 2,4-D respectivamente fue el que mostró mayores porcentajes de oxidación (72%) en el experimento. El tratamiento que tuvo la tendencia a generar menor porcentaje de oxidación (8%) fue donde se usó 3.0 y 0.2 mg/l de BAP y 2,4-D respectivamente (Cuadro 11).

Cuadro 11. Efecto del BAP y 2,4-D en el porcentaje de oxidación de explantes foliares durante el establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento (mg/l)		Oxidación
2,4-D [‡]	BAP [§]	
0	0	21 ^{b₁}
	1.5	23 ^b
	3	51 ^a
	6	72 ^a
0.2	0	-
	1.5	-
	3	8 ^b
	6	-
0.4	0	12 ^b
	1.5	-
	3	-
	6	15 ^b
0.8	0	23 ^b
	1.5	-
	3	-
	6	12 ^b

[†] ab Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia estadística significativa (P<0.05)

[§] 6-Bencil aminopurina

[‡] Acido 2,4-Diclorofenoxiacético.

3.3.7 Necrosis

La necrosis es la muerte de tejidos los cuales no responden a las reacciones del medio de cultivo, cuando a veces responde a las interacciones de las fitohormonas, el tejido puede morir sin causa alguna (Fotografía 6). A diferencia de la oxidación, en la necrosis no se presenta la coloración oscura que se presenta en el medio de cultivo las cuales son provocadas por reacciones químicas entre el tejido y el medio.

Los tejidos necrotizados no representaron gran problema en este experimento, ya que solamente 0.5% del total de explantes sembrados resultó con tejido necrotizado en el experimento.

El 0.5% de explantes con tejido necrotizado estuvieron distribuidos en los tres tratamientos en los que se utilizó 0 mg/l de BAP combinado ya sea con 0, 0.2 ó 0.8 mg/l de 2,4-D.

3.4 EXPERIMENTO 2: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE 2,4-D Y BAP EN MULTIPLICACIÓN DE EXPLANTES FOLIARES (ETAPA II) DE *ZAMIOCULCAS ZAMIIFOLIA*

3.4.1 Tipo de regeneración

El 100% de los explantes transferidos a Etapa II siguieron regenerando tejido callogénico.

El tejido rizogénico no siguió desarrollando luego de ser transferido a Etapa II, seguramente por que una vez generado el callo, estando el explante en un nuevo medio de cultivo, tiende a diferenciar en brotes (Fotografía 7) o en microtubérculos (Fotografía 8).

En cuanto a la regeneración de brotes, no hubo diferencias estadísticas, sin embargo se observó una tendencia mayor de formación de brotes (69%) al utilizar 3.0 y 0 mg/l de BAP y 2,4-D respectivamente (Cuadro 12).

La aparición de microtubérculos, fue de igual valor estadístico en dos tratamientos, pero se observó una tendencia mayor de formación de microtubérculos con (87%) al utilizar 3.0 y 0.4 mg/l de BAP y 2,4-D respectivamente.

Cuadro 12. Efecto del BAP y 2,4-D en la categorización de formación de brotes y microtubérculos a partir de tejido calogénico procedente de explantes foliares en la etapa de multiplicación *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

Tratamiento (mg/l)		Vía de regeneración (%)	
2,4-D [‡]	BAP [§]	Brotes	Microtubérculos
0	0	53 ^{a1}	-
	1.5	56 ^a	-
	3	60 ^a	-
	6	52 ^a	-
0.2	0	-	7 ^g
	1.5	-	12 ^g
	3	-	31 ^{ef}
	6	-	59 ^c
0.4	0	-	76 ^b
	1.5	-	82 ^a
	3	-	87 ^a
	6	-	50 ^{cd}
0.8	0	-	30 ^{ef}
	1.5	-	-
	3	-	-
	6	-	-

¹ abcdefg Promedios seguidos por letras diferentes representan diferencia estadística significativa (P<0.05)

[§] 6-Bencil aminopurina

[‡] Acido 2,4-Diclorofenoxiacético.

3.4.2 Supervivencia de vitroplantas

Para este experimento de Etapa II hubo un 100% de supervivencia de vitroplantas, por lo que no existieron contaminaciones, oxidaciones ni tejidos necrotizados, esto se debe a que las vitroplantas ya han superado la etapa de establecimiento.

4. CONCLUSIONES

El mejor procedimiento de desinfección al que respondieron los explantes foliares fue donde se usó un primer enjuague con 0.5% de ingrediente activo de NaOCl con 15 minutos de exposición, seguido de tres lavados con agua destilada estéril de dos minutos cada uno. Luego se utiliza una segunda solución desinfectante con 0.4% de ingrediente activo de NaOCl con cinco minutos de exposición, seguido de cuatro lavados con agua destilada estéril de un minuto cada uno (Anexo 2).

El mejor tipo de explante seleccionado en la etapa de establecimiento fueron los explantes foliares, ya que tuvieron mejor respuesta a los procedimientos de desinfección y mostraron una menor incidencia de contaminación en comparación con las yemas rizomatosas (Anexo 3).

La formación callogénica categoría 3 (mayor a 67% de formación de tejido callogénico cubriendo el explante foliar) es el mejor tipo de regeneración callogénica ya que a mayor cantidad de tejido callogénico hay potencialmente una mayor multiplicación de vitroplantas al final del proceso. Las hormonas que tuvieron mejor tendencia a responder a la inducción de tejido callogénico categoría 3, fueron 3.0 y 0.8 mg/l de BAP y 2,4-D respectivamente (Anexo 4) presentando un 54% de formación callogénica.

Los mejores niveles de hormonas para la estimulación de brotación a partir de tejido callogénico fueron 3.0 y 0 mg/l de BAP y 2,4-D respectivamente (Anexo 5).

Los mejores niveles de hormonas para inducir la tuberización *in vitro* a partir de tejido callogénico fueron 3.0 y 0.4 mg/l de BAP y 2,4-D respectivamente (Anexo 6).

5. RECOMENDACIONES

Encontrar la concentración más adecuada de BAP y 2,4-D para la formación de tejido callogénico, brotación y microtuberización.

Se recomienda evaluar el efecto de la kinetina en la inducción de brotes a partir de tejido callogénico, comparándola con los tratamientos utilizados en el experimento de Etapa II.

Continuar realizando y evaluando diferentes pruebas para inducir la tuberización *in vitro* a partir de tejido callogénico.

Evaluar el tipo y nivel de hormonas más adecuado para la inducción organogénica a partir de microtubérculos.

Evaluar las tasas de multiplicación en la producción de vitroplantas tanto a partir de brotes como de microtubérculos.

Realizar y evaluar experimentos de inducción fotoperiódica sometiendo a condiciones de obscuridad los explantes foliares durante la etapa de establecimiento y/o el tejido callogénico durante la etapa de multiplicación.

Repetir el experimento para justificar los valores estadísticos obtenidos en esta investigación.

Realizar estudios de formación de raíces a partir de los brotes inducidos durante la etapa de establecimiento.

Realizar un estudio de costos.

6. BIBLIOGRAFÍA

Barba, A.; Luna, B.; Romero, J. 2001. Micropropagación de plantas. Edit. Trillas. México D.F., México. 107 p.

Desert-Tropicals. 2004. Aroid Palm. Consultado el 18 de noviembre de 2004 (en línea). Disponible en: http://www.desert-tropicals.com/Plants/Araceae/Zamioculcas_zamiifolia.html

Espinal, D. 2004. Guía para la producción *in vitro* de cultivos: Fundamentos y Prácticas de Laboratorio. Zamorano, Honduras. 79 p.

Herman, E. 1996. Recent Advances in Plant Tissue Culture IV: Microbial Contamination of Plant Tissue Cultures. Agritech Consultants, Inc. Mohegan Lake, New York, United States. 73 p.

Hurtado, D.; Merino, M. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Edit. Trillas. México D.F., México. 232 p.

Instituto Nacional de Aprendizaje (INA). 1994. Propagación clonal *in vitro* de diferentes especies vegetales en el laboratorio del INA. San José, Costa Rica. 27 p.

International Aroid Society. 2004. Micropropagation of Aroids. Consultado el 17 de noviembre de 2004 (en línea). Disponible en: <http://www.aroid.org/horticulture/tculture.html>

Martínez, A. 2005. Establecimiento *in vitro* de caña de azúcar, variedad CP 72-2086 a partir de yemas axilares y explantes foliares. Proyecto especial para el programa de Ingeniería en Ciencia y Producción Agropecuaria, Zamorano, Honduras. 30 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.

Ruíz, B. 2000. Efecto del BAP y 2,4-D en la inducción de organogénesis indirecta *in vitro* de *Anthurium andreanum* L. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 36 p.

7.0 ANEXOS

7.1 Fotografías

Fotografía 1. Plantación madre de *Zamioculcas zamiifolia* en el vivero Tukan Agroexport ubicado en Yojoa, Honduras. 2005.



Fotografía 2. Planta madre de *Zamioculcas zamiifolia*. El Zamorano, Honduras, 2005.



Fotografía 3. Tejido callogénico generado a partir de explantes foliares durante el establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*. El Zamorano, Honduras, 2005.



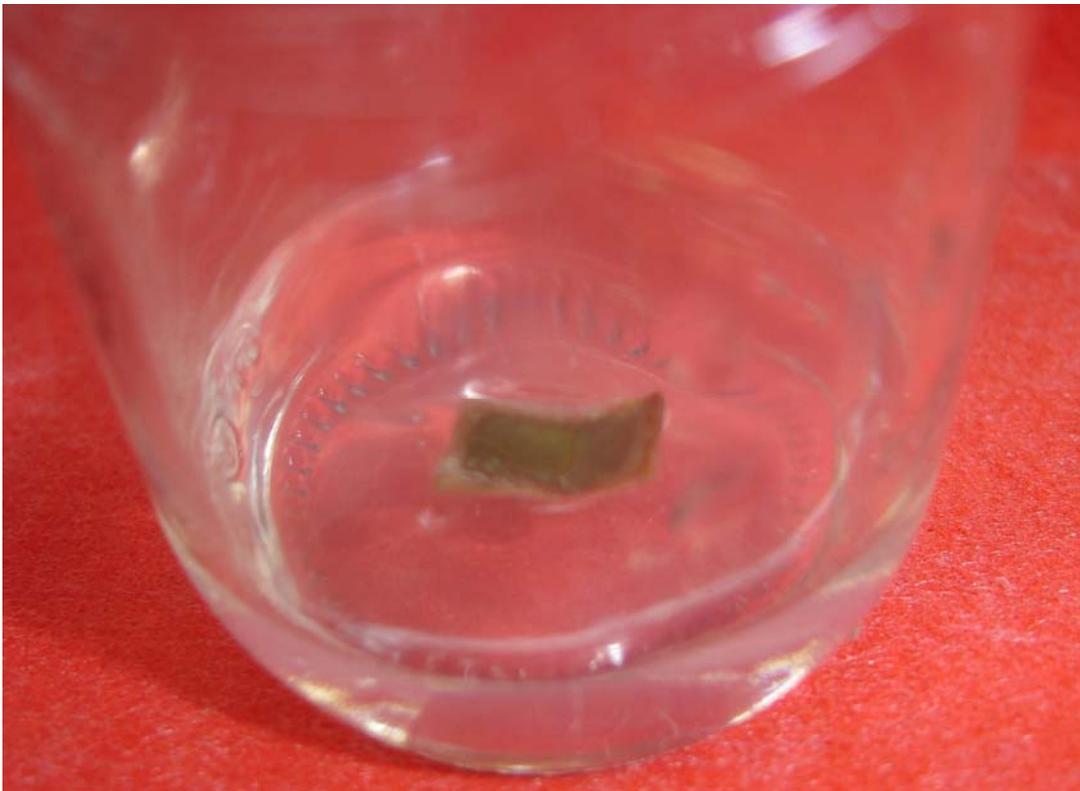
Fotografía 4. Tejido rizogénico generado a partir de tejido callogénico durante el establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*. El Zamorano, Honduras, 2005.



Fotografía 5. Oxidación observada durante el establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*. El Zamorano, Honduras, 2005.



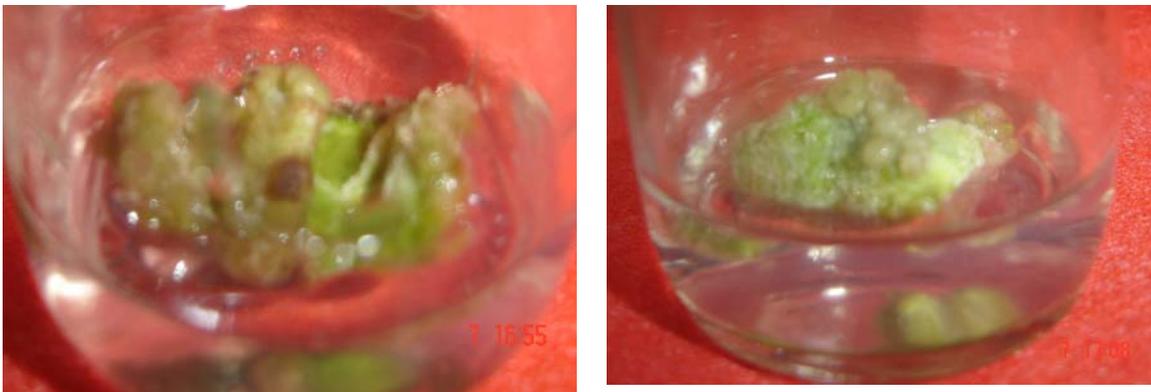
Fotografía 6. Necrosis observada durante el establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*. El Zamorano, Honduras, 2005.



Fotografía 7. Formación de brotes durante la etapa de multiplicación de *Zamioculcas zamiifolia*. El Zamorano, Honduras, 2005.



Fotografía 8. Formación de microtubérculos durante la etapa de multiplicación de *Zamioculcas zamiifolia*. El Zamorano, Honduras, 2005.



7.2 Anexos

Anexo 1. Taxonomía de la *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
Super-división	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Sub-clase:	Arecidae
Orden:	Arales
Familia:	Araceae
Sub-familia:	Aroideae
Tribu:	Zamioculcadeae
Género:	<i>Zamioculcas</i>
Especie:	<i>zamiifolia</i>

Fuente: International Aroid Society, 2004. Micropropagation of Aroids.

Anexo 2. Protocolo de desinfección de explantes foliares para el establecimiento *in vitro* de la *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

1. Selección de hojas sanas, de color verde oscuro, sin deficiencias nutricionales y de aproximadamente 3 A 4 cm. de largo sin importar la ubicación a lo largo del tallo.
2. Para remover las suciedades provenientes del campo las hojas se lavan superficialmente con jabón desinfectante y agua, utilizando un cepillo de cerdas suave que no dañen las hojas. Hacer varios lavados con agua normal para eliminar el exceso de jabón.
3. Las hojas se sumergen durante 15 minutos y en agitación constante en la primera solución de hipoclorito de sodio(NaOCl) al 0.5% de ingrediente activo mas dos gotas del agente humectante Tween 80 por cada 100 ml. de solución desinfectante.
4. A nivel de la cámara de flujo laminar, se hacen tres enjuagues con agua destilada estéril de dos minutos cada uno para eliminar residuos del agente humectante y de NaOCl.
5. Se cortan los bordes, pecíolos y ápices de las hojas para eliminar los tejidos dañados en el proceso de agitación.
6. Las láminas foliares se sumergen en la segunda solución desinfectante de 0.4% de ingrediente activo de NaOCl durante cinco minutos, mas dos gotas del agente humectante Tween 80 por cada 100 ml. de solución desinfectante.



7. Se hacen cuatro lavados con agua destilada estéril de un minuto cada uno para remover los excesos de desinfectante y del agente humectante.



8. Nuevamente se cortan los bordes de las láminas foliares lavadas para eliminar los daños mecánicos ocasionados en el proceso de agitación.



9. Las láminas foliares se cortan en explantes de 1cm^2 cada uno.



10. Los explantes foliares se siembran en los medios de cultivo elaborados para la Etapa I de establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia* (Anexo 4).



11. Los contenedores se sellan con parafilm para evitar la entrada de patógenos. Luego los contenedores son transferidos a la cámara de crecimiento.



Anexo 3. Protocolo de multiplicación de explantes foliares para el establecimiento *in vitro* de la *Zamioculcas zamiifolia*, El Zamorano, Honduras, 2005.

1. Seleccionar los tejidos que tengan formación callogénica abundante, formación de yemas o brotes que sean aptos para la transferencia.
2. Desinfectar la cámara de flujo laminar, herramientas de trabajo y de los recipientes que contienen los tejidos a ser transferidos a Etapa II.
3. Remover la cobertura de aluminio que sella el frasco, flamearla para eliminar contaminantes.
4. Extraer el tejido del frasco y se llevarlo a un plato de Petri, luego con el uso de pinzas y bisturí #21 se cortan secciones de tejido callogénico de aproximadamente 1.5×1.5 cm. que se siembran en el nuevo medio preparado.
5. Sellar los contenedores con parafilm para evitar la entrada de patógenos. Luego los contenedores son transferidos a la cámara de crecimiento.



Anexo 4. Formulación nutritiva para la iniciación de tejido callogénico durante el establecimiento *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia* a partir de explantes foliares. El Zamorano, Honduras, 2005.

Etapas I. Establecimiento *in vitro* a partir de explantes foliares

Compuesto	mg/l
Macroelementos (1/2 MS)	
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	825.000
Nitrato de potasio (KNO ₃)	950.000
Cloruro de calcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	220.000
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	185.000
Fosfato potásico (KH ₂ PO ₄)	85.000
Microelementos	
Acido bórico (H ₃ BO ₃)	6.200
Sulfato de manganeso monohidratado (MnSO ₄ ·H ₂ O)	16.900
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	8.600
Yoduro de potasio (KI)	0.830
Molibdato de sodio (NaMoO ₄ ·2H ₂ O)	0.250
Sulfato de cobre (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.025
Cloruro cobáltico (CoCl ₂ ·6H ₂ 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
Fitohormonas	
2,4-D	0.800
BAP	3.000
Phytigel	1800.000
pH = 6.0	

Anexo 5. Formulación nutritiva para la estimulación de brotación a partir de tejido callogénico durante la multiplicación *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*. El Zamorano, Honduras, 2005.

Etapa II. Brotación a partir de tejido callogénico

Compuesto	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
Fitohormonas	
BAP	3.000
Phytigel	1800.000
pH = 6.0	

Anexo 6. Formulación nutritiva para la estimulación de microtuberización a partir de tejido callogénico durante la multiplicación *in vitro* de *Zamioculcas zamiifolia*. El Zamorano, Honduras, 2005.

Etapa II. Microtuberización a partir de tejido callogénico

Compuesto	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
Fitohormonas	
2,4-D	0.400
BAP	3.000
Phytigel	1800.000
pH = 6.0	