

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**“PRODUCCIÓN DE PLÁNTULAS *IN VITRO* DE CALAS
(*Zantedeschia sp.*) EN CAÑETE-LIMA”**

**TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL
PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERA AGRÓNOMA**

DENISSE VERONICA LA TORRE PONCE

LIMA-PERÚ

2022

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**“Producción de plántulas *in vitro* de calas
(*Zantedeschia* sp) en Cañete - Lima”**

Denisse Veronica La Torre Ponce

Trabajo de Suficiencia Profesional para optar el título de:

INGENIERA AGRÓNOMA

Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado:

.....
Ph. D. Liliana María Aragón Caballero María
PRESIDENTE

.....
Dr. Jorge Eduardo Jiménez Dávalos
ASESOR

.....
Ing. M. Sc. Sofía Jesús Flores Vivar
MIEMBRO

.....
Ing. Mg. Sc. Juan Carlos Jaulis Cancho
MIEMBRO

LIMA-PERÚ

2022

DEDICATORIA

A mis padres Alberto La Torre y Yolanda Ponce por su apoyo, sacrificio y cariño en toda mi carrera universitaria y en cada momento de mi vida.

AGRADECIMIENTO

Al profesor Jorge Jiménez por su asesoramiento para el desarrollo del presente trabajo.

A los miembros del jurado por su apoyo y tiempo brindado.

A la empresa Agrofloral Perú SAC por permitirme exponer la experiencia realizada.

A mis amigos que ayudaron y estuvieron conmigo en el proceso.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
III. ASPECTOS GENERALES	3
3.1. Origen.....	3
3.2. Descripción de la especie	3
3.3. Taxonomía.....	4
3.4. Morfología de la planta	4
3.4.1. Hojas.....	4
3.4.2. Raíz.....	4
3.4.3. Flor	4
3.4.4. Semillas	5
3.5. Cultivares	5
3.6. Aspectos climatológicos relacionados al desarrollo de la planta	6
3.6.1. Temperatura.....	6
3.6.2. Humedad Relativa	6
3.6.3. Luz.....	7
3.7. Requerimientos nutricionales	7
3.8. Métodos de Propagación	8
3.8.1. Por semilla.....	9
3.8.2. Por división de túberos	9
3.8.3. Por cultivo <i>in vitro</i>	9
3.9. Fenología del cultivo	9
3.9.1. Fase reproductiva.....	9
3.9.2. Senescencia.....	10
3.9.3. Dormancia	10
3.9.4. Cosecha y almacenaje.....	11
3.10. Enfermedades y plagas insectiles	11

3.10.1. Enfermedades	11
3.10.2. Plagas.....	12
3.10.2.1. Pulgones y Thrips	12
3.10.2.2. Virus.....	12
3.11. Comercialización.....	13
3.11.1. Mercado internacional de calas en crecimiento.....	13
3.11.2. Calas en el Perú	14
3.11.3. Variedades comerciales	15
IV. MANEJO AGRONÓMICO DEL CULTIVO	16
4.1. Preparación del terreno.....	16
4.2. Riego	16
4.3. Fertilización.....	17
4.4. Marcación.....	17
4.5. Plantación y densidad.....	17
4.6. Propagación.....	18
V. CULTIVO <i>IN VITRO</i>	19
5.1. Hormonas vegetales	20
5.2. Interacción entre citoquininas y auxinas	22
5.3. Antecedentes de uso de hormonas en cultivo <i>in vitro</i> en <i>Zantedeschia sp.</i> ...	22
5.4. Contaminación microbiana en cultivo <i>in vitro</i>	23
VI. DESARROLLO DE LA EXPERIENCIA PROFESIONAL.....	25
6.1. Laboratorio de cultivo <i>in vitro</i> en Cañete.....	25
6.1.1. Área de lavado y/o preparación de medios.....	26
6.1.2. Área de siembra y transferencia (cuarto de cultivo).....	27
6.1.3. Medios de cultivo	28
6.1.4. Determinación de dosis adecuadas de hormonas para el desarrollo de explantes de <i>Zantedeschia sp</i> en cultivo <i>in vitro</i>	29
6.1.5. Fases de crecimiento y desarrollo del cultivo <i>in vitro</i> en cañete	30
6.1.5.1. Preparación del material vegetal.....	30
6.1.5.2. Introducción	31
6.1.5.3. Multiplicación	32
6.1.5.4. Elongación	32

6.1.5.5. Enraizamiento	32
6.2. Aclimatación	34
6.3. Aportes a la experiencia laboral	36
VII. CONCLUSIONES	37
VIII. RECOMENDACIONES.....	38
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Clasificación Taxonómica de <i>Zantedeschia sp.</i>	4
Tabla 2: Absorción de nutrientes en <i>Zantedeschia elliotiana</i>	8
Tabla 4: Principales 16 especies de flores vendidas en subastas de Holanda 2002-2006... 14	
Tabla 5: Densidad de siembra según calibre	17
Tabla 6: Hoja de formulación del Murashige & Skoog.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Colores de inflorescencia de calas. A. <i>Zantedeschia rehmannii</i> . B. <i>Zantedeschia elliotiana</i> . C. Semillas de <i>Zantedeschia sp.</i>	5
Figura 2: Crecimiento y desarrollo de <i>Zantedeschia elliotiana</i>	10
Figura 3: Fase de crecimiento en cultivo <i>in vitro</i> de <i>Zantedeschia sp.</i>	33
Figura 4: Línea de tiempo sobre las fases de crecimiento en la producción <i>in vitro</i> de calas en Cañete	35

PRESENTACIÓN

En los últimos años la demanda de ornamentales ha tenido un crecimiento considerable y entre ellos el cultivo de calas (*Zantedeschia sp*) sobre todo en Europa; países como Holanda, Bélgica, Reino Unido, etc. (Prensa Libre, 2012). Sin embargo el cultivo de calas es muy vulnerable a enfermedades de suelo como *Erwina sp* si no se cuenta con un buen manejo agronómico. Este panorama ha requerido buscar métodos de propagación más eficientes y masivos, siendo uno ellos el cultivo *in vitro*, el cual permite producir principalmente plantas sanas libres de patógenos u enfermedades bacterianas. Por ello se convirtió en un reto lograr instalar un laboratorio de cultivo *in vitro* a mediana escala que sea rentable y económico considerando factores como espacio disponible, recursos logísticos, transporte, medio ambiente, mano de obra y capacidad de producción.

Si bien el proceso de la producción de plántulas *in vitro* de calas se trabaja con explantes en ambientes estériles como un laboratorio, cabe mencionar que la obtención de plantas madres se desarrolla en campo donde se obtiene los túberos para su introducción *in vitro* posteriormente.

Este trabajo presenta la experiencia profesional desarrollada con la empresa Agro Floral Perú Sac en el valle de Cañete, la cual permitió mejorar la introducción *in vitro*, multiplicación y capacidad logística para el funcionamiento del laboratorio y hacerlo más eficiente.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de *in vitro* consiste en aislar una porción de la planta (explante) y darle las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial natural o inducido (Roca, 1991). Esta técnica ha logrado dar una respuesta oportuna a las empresas interesadas en obtener grandes volúmenes de plantas de buena calidad, con el fin de cumplir con las exigencias del mercado nacional e internacional.

Las calas son monocotiledóneas ornamentales originarias del Sur de África. Las especies de calas y sus híbridos tienen flores con una variabilidad de colores que van desde rojo oscuro pasando por rosa, a naranja, amarillo y blanco (Funnell *et al.*, 1998). Su atractivo físico ornamental hacen que se un cultivo nuevo e interesante de propagar para empresas productoras.

Bajo módulos de invernaderos sencillos es común que el manejo y los métodos de propagación de *Zantedeschia* se den a través de semillas en programas de mejoramiento genético permitiendo la formación y selección de túbero, otra forma es a través de la división del túbero (practicada para incrementar el número y el tamaño de la floración). Sin embargo, los cultivos con división de túberos, están expuestos a pudrición blanda ocasionada por *Erwinia* sp. (Chen *et al.*, 2000) dicha bacteria puede causar pérdidas de hasta el 100% en la plantación (Etcheverría, 2002), por ello la micro propagación *in vitro* forma parte de los métodos eficientes de propagación.

El proceso *in vitro* para *Zantedeschia sp* en Agro Floral Perú Sac se realiza bajo condiciones asépticas que se dan en el laboratorio siendo sus etapas de desarrollo las siguientes: introducción, multiplicación, elongación y aclimatación obteniendo plantas limpias libres de hongos y bacterias.

II. OBJETIVOS

- Poner en funcionamiento el laboratorio de cultivo *in vitro* para la producción masiva de plántulas de calas.
- Desarrollar el sistema eficiente de producción de plántulas *in vitro* de calas.

III. ASPECTOS GENERALES

3.1. Origen

Según Soto (2014) el género *Zantedeschia* se cree que debe su nombre al italiano Giovanni Zantedeschi (1773-1846), físico y botánico que fue su descubridor. El género *Zantedeschia* fue citado por primera vez por Sprengel en 1826 y fue revisado posteriormente por diferentes especialistas como Engler (1915), Traub (1948), Letty (1973) y últimamente por Perry (1989).

Es una planta de origen sudafricano , naturalizado localmente en el sur y oeste de Europa conocida como cala, alcatraz, lirio de agua o cartucho; es una especie bulbosa, cuyo cultivo mundial es relativamente reciente (Funnell, 1994).

3.2. Descripción de la especie

Gracias a los programas de mejoramiento numerosos híbridos y cultivares se han dado paso en el cultivo, teniendo una gran variedad de color, tamaño y presentación (Pizano, 1999). Según su morfología, crecimiento y clima se distinguen en:

- Calas de Invierno. Sus órganos de almacenamiento son rizomas alargados, su follaje es perenne con frutos blancos de color amarillos a rojos. Generalmente sus flores blancas, sus hojas son no maculadas (Gonzales, 2003). Crecen y florecen desde el invierno hasta finales de primavera (*Zantedeschia*, 2015).
- Calas de Verano. Forman tuberos, en forma de discos o piriformes, frutos verdes y firmes, tienen hojas caducas maculadas. Generalmente sus flores son de color variado y de hojas caducas. Las hojas mueren completamente en invierno y florecen durante los meses de verano (*Zantedeschia*, 2015).

3.3. Taxonomía

Según Rodríguez, 2005 lo clasifica en:

Tabla 1: Clasificación Taxonómica de *Zantedeschia* sp.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Sub Clase:	Monocotiledonea
Orden:	Spadiciflorae
Familia:	Araceae
Tribu:	Zantedeschieae
Genero:	Zantedeschia
Nombre científico:	Zantedeschia sp
Nombre común:	Calas, cartucho enano

3.4. Morfología de la planta

3.4.1. Hojas

Las hojas pueden alcanzar alturas desde los 60 cm hasta los 120 cm (*Z. Aethiopica*), con formas que van desde óvalo-apuntadas o redondas. Pueden presentar manchas traslucidas, fenómeno que se conoce como “maculación”. Alcanzan una altura entre 80 centímetros y un metro (Pizano, 1999).

3.4.2. Raíz

Su raíz es fasciculada; la raíz principal deja de crecer quedando el sistema radicular formado por numerosas raíces delgadas que nacen en la parte superior del bulbo, de la base del tallo.

3.4.3. Flor

Su flor y parte comercial se trata de unas inflorescencias o hojas modificadas llamadas espatas; estas envuelven al espádice, al estigma y polen evitando ataques de insecto o aves.

El espádice es donde se produce la fecundación y formación de semillas. Las inflorescencias varían en colores desde blanco hasta morado oscuro, pueden llegar a producir 2 o 3 flores por cada túbero, cuentan con el cáliz en forma de embudo y espádice erecta. Son monoicas. Necesita abundante agua cuando está floreciendo, y poca luego de la floración. (Hernández, 2012).

3.4.4. Semillas

Sus semillas son ovoides, estriadas a costadas longitudinalmente, alargado, amarillento u ocre. Endospermo feculento y embrión recto (Castroviejo, 2008). En la Figura 1c se describe la forma de semilla.



A. *Zantedeschia rehmannii*. B. *Zantedeschia ellottiana*. C. Semillas de *Zantedeschia* sp.

Fuente : Hernández, 2012

Figura 1: Colores de inflorescencias de Calas

3.5. Cultivares

Para el cultivo de calas la flor es un factor importante por ello conocer los pigmentos que se encuentren en una planta en particular es necesario para el desarrollo de las nuevas

variedades, es así que encontramos que las antocianinas son el principal pigmento en los cultivares de flores rojas y rosadas, los carotenoides en cultivares de flores amarillas. Ambos pigmentos estaban presentes en cultivares anaranjados. Y por último en flores blancas predomina los flavonoides (Lora, 2011).

- Cultivares de flores blancas: *Zantedeschia aethiopica*.
- Cultivares de flores de diferentes colores: *Z. Albomaculata*, *Z. Elliottiana*, *Z. Jucanda*, *Z. Pentlandii*, *Z. Rehmanni*. (Zantedeschia, 2015).

3.6. Aspectos climatológicos relacionados al desarrollo de la planta

3.6.1. Temperatura

Las calas prefieren temperaturas templadas por ello requiere de suelos o sustratos ricos en nutrientes, que retengan la humedad y que a la vez tengan una buena capacidad de drenaje. Según Coig-O`Donnell, (2014) la temperatura óptima de cultivo se sitúa entre los 20-25°C diurnos y los 15-18°C nocturnos siendo estas temperaturas generalmente proporcionadas dentro de invernaderos como sugieren De Pascale, S; Fiorenza S; Martino, A. (2003). Puesto que tienen un mejor crecimiento que sembrándolas al aire libre porque temperaturas de suelo mayores a 23°C incrementan la vulnerabilidad de los bulbos a *Erwinia carotovora*.

Las temperaturas cálidas y la poca luz causan tallos para alargarse más allá de su capacidad para sostenerse, y las flores no durar tanto tiempo a temperaturas más cálidas regímenes. Estas plantas necesitan luz brillante y temperaturas frescas de la noche para evitar estirar y conseguir una floración de la más alta calidad (IFAS, 2001).

3.6.2. Humedad Relativa

La humedad adecuada permite el desarrollo normal de las plantas, con capacidad para absorber los nutrientes que necesita para su crecimiento. Un rango óptimo es entre 60-65%, valores inferiores pueden provocar abortos de flores y valores mayores de 80 a 85% junto con temperaturas elevadas pueden provocar ataques de *Erwinia carotovora* (Funnell, 1992).

3.6.3. Luz

Es uno de los factores más importantes del entorno vegetal, el cual actúa como un regulador de procesos fisiológicos en los vegetales. La luminosidad es determinante en zonas con poca luz, la intensidad luminosa adecuada beneficia la manifestación del color de la flor de calas; un sombreado de 90% a más causa alargamiento de hojas y etiolación. Cuando la iluminación es muy alta conduce a plantas más compactas y de tallos cortos, por eso en meses muy calurosos es necesario colocar una tela a modo de sombra en los invernaderos; sin embargo, sombras mayores del 40% causa una baja florescencia y colores menos intensos (Gómez, 2009)

Para obtener flores de alta calidad con un tallo floral firme y una espata de color brillante, los niveles de luz no deben ser altos, es así que la cala blanca enana tiene alto potencial como planta de maceta para interior ya que tienen una buena condición de flor con poca luminosidad. Esto no sucede con los híbridos de colores, que requieren altas tasas de luminosidad para expresar su color verdadero (Hernández, 2013).

3.7. Requerimientos nutricionales

Clark y Boldingh (1991), refieren que según la etapa de crecimiento y el ciclo de producción marcar una diferencia en cuanto a niveles de macro y micro nutrientes presentes en raíces, bulbos, tallos, peciolos y flores. Por ello entre la 5ta y 7ma semana después de siembra, un 20 a 56 % de los nutrientes almacenados en el bulbo, son removidos como soporte del nuevo crecimiento. Sin embargo, la removilización de Ca^{++} , Mn^{++} y Na^{+} desde los bulbos es mínima. El nitrógeno y el potasio son los nutrientes que se requieren en mayor cantidad. Para la 6ta a 16va semana ocurre una alta demanda de nutrientes ya que el peso seco y número de nutrientes aumenta al máximo. Finalmente a partir de la 16va semana en adelante, comienza la senescencia de tallos, e l peso seco de los bulbos empieza a disminuir lentamente en ausencia de vegetación y con ello la entrada al estado de dormancia (Clark et al, 1991).

Como se muestran en la tabla 2, los resultados obtenidos por Clark et al (1991) para absorción de nutrientes en *Z. elliotiana* variedad amarilla en un tercer ciclo de siembra.

Tabla 2: Absorción de nutrientes en *Zantedeschia elliottiana*

NUTRIENTE	Absorción máxima kg/ha	NUTRIENTE	Absorción máxima kg/ha
N	316	Na+	48
P	44	Mn++	3.5
K+	403	Zn++	1.7
Ca++	162	Fe++	1.3
Mg++	22	Cu++	0.008
S+	61	B	0.3

Fuente: Clark, 1991

Es así que la información disponible en cuanto a niveles críticos es general para *Zantedeschia* sp como se muestra en la Tabla 3, lo que dificulta poder establecer planes de fertilización adecuados a cada zona y tipo de sustrato utilizado para la siembra (Pizano, 1999).

Tabla 3: Niveles críticos foliares para *Zantedeschia* sp

Elemento	Deficiente	Bajo	Medio	Alto
Nitrógeno %	2.3	2.7	4	5
Fósforo %	0.15	0.2	0.5	0.6
Potasio %	2.5	3.5	4.05	5.5
Azufre %	0.15	0.2	0.5	0.7
Calcio %	0.5	0.6	1.8	2.5
Magnesio %	0.1	0.2	0.45	0.6
Hierro ppm	30	50	300	500
Manganeso ppm	35	50	300	500
Cobre ppm	4	6	24	50
Boro ppm	12	20	50	90
Zinc ppm	15	20	100	200
Sodio ppm	50	200	1000	3000

Fuente: Pizano, 1999

3.8. Métodos de Propagación

Según Lora et al, (2011) se utiliza determinados métodos de propagación para que la planta pueda sobrevivir conservando las mismas características física y genéticas de la planta madre; la propagación se puede dar por semilla, división de túberos y uso de un nuevo método como es el cultivo *in vitro*.

3.8.1. Por semilla

Se utiliza para mantener las líneas puras de cada variedad y mantener las mismas características morfológicas. (García, 2010). Se siembran en primavera finalizando en otoño con pequeños túberos.

3.8.2. Por división de túberos

Se da para tener la disposición de material vegetativo y características de la planta madre. Para hacer separación del bulbo de la planta madre se utiliza un cuchillo o cúter previamente estéril, con el fin de que al momento de realizar el corte no se introduzca ningún patógeno en cada corte. Se debe verificar que en cada corte se obtenga una yema latente (Basso, 2008).

3.8.3. Por cultivo *in vitro*

Se realiza con el fin de obtener plantas libres de patógenos favoreciendo la calidad y sobrevivencia de la planta antes de llevarla a campo, este método se da en ambientes asépticos en laboratorios (Lora *et al*, 2015).

3.9. Fenología del cultivo

El cultivo de *Zantedeschia* tiene la capacidad de multiplicarse vegetativamente en cada ciclo de producción, los túberos madres generan nuevos túberos que serán los responsables de soportar la producción siguiente y en términos económicos, representa el incremento en la producción de un ciclo a otro (Gómez, 2009).

3.9.1. Fase reproductiva

Se puede determinar que a partir de la semana 6 hasta aproximadamente la semana 12 se inicia el crecimiento de los tallos florales, de acuerdo a la especie y tamaño de los bulbos los tallos florales varían en cantidad. Las calas con flor de colores rojos y blancos tienen mayor cantidad de tallos florales, mientras que las variedades amarillas y naranjas tienen menor cantidad de tallos, pero éstos son más largos y robustos. En esta etapa se dan los mayores requerimientos de agua para el cultivo (Gómez, 2009). Bajo condiciones ambientales

favorables se induce la formación de flores a través de estímulos físicos que se transforman en estímulos químicos (Rojas, 1993), de tal forma que las hormonas como giberelinas y metabolitos en general forman parte del proceso de la floración (Weaver, 1996).

3.9.2. Senescencia

Luego de la floración comienza con el proceso de senescencia en donde la coloración de las hojas se torna opaco, amarillento y comienzan a caer, señal que indica cortar el riego y comienza la translocación de nutrientes hacia los túberos para completar la tuberización, este periodo puede durar entre 6 a 8 semanas con un crecimiento del bulbo entre 30 a 50% más, esto dependerá del bulbo inicial plantado y del manejo agronómico (Coig- O`Donnell, 2014).

3.9.3. Dormancia

Procede luego que las hojas hayan marchitado y los túberos están listos para ser cosechados y almacenados durante 6 a 8 semanas. En esta etapa la yema central o apical comienza a brotar señal de un nuevo ciclo de siembra. La dormancia se puede interrumpir debido a causas físicas como inmersiones en hormonas o factores como luz y temperaturas, puede ser prolongada almacenando los túberos en cuartos fríos a una temperatura de 8°C con una HR del 70%., de igual forma puede inducirse su rompimiento sometiendo los túberos a climas cálidos para acelerarla siembra nuevamente (Gómez, 2009). En la Figura 2 se muestra el crecimiento del cultivo.



Fuente: Gonzales, 2009

Figura 2: Crecimiento y desarrollo de *Zantedeschia elliothiana*

3.9.4. Cosecha y almacenaje

Productores holandeses recomiendan una temperatura de 25°C por 3 o 4 días con ventilación forzada para airear y extraer la humedad excesiva. Luego se baja la temperatura a 15°C por 3 a 4 semanas hasta que la cutícula del tubero se endurezca y tome un color café, recién entonces se podría eliminar raíces o tallos. Si se desea almacenar más de 6 meses se debe mantener a una temperatura de 8 a 10°C con una humedad relativa del 70%, temperaturas menores a 4°C provoca pérdida de floración del tubero (Seeman y Hoffens, 1999).

3.10. Enfermedades y plagas insectiles

3.10.1. Enfermedades

Una de las principales bacterias que ataca a la papa es *Erwinia carotovora*, esta penetra a la planta principalmente por heridas produciendo una podredumbre blanda, acuosa y maloliente. La planta se vuelve más susceptible cuando se presenta un ataque previo de un hongo patógeno, acompañado por altas temperaturas del suelo (> 23°C). Por eso para evitar la presencia de algún hongo, se debe utilizar tuberos sanos y bien desinfectados, además el sustrato debe tener un excelente drenaje y aireación a la vez.

Los hongos patógenos que atacan a nivel de tuberos y raíces también incluyen a: *Pythium*, *Fusarium* y *Rhizoctinia*, todos ellos atacan la raíz, los síntomas se presentan hasta 2 semanas después de la infección, hojas marchitas, amarillas, entorchadas son signo casi seguro del problema. Si estos problemas se descuidan la aparición de la bacteria *Erwinia* es casi inevitable, para su control un drench regular de amplio espectro (Guaqueta Trading Group, 2015).

Otros organismos que causan daño a la parte aérea son:

- *Phytophthora erythroseptica*: Produce tizón, necrosis, pérdida de turgencia y finalmente colapso de las hojas, los peciolo se decoloran y luego sufren una pudrición blanda inodora. Los márgenes de la espata se tornan amarillos y necróticos; sin embargo, los tuberos no son afectados.

- *Xanthomonas campestris*: Bajo condiciones de humedad se producen lesiones húmedas de las hojas, lo que resulta en un colapso de estas; en condiciones de sequedad se produce hay lesiones de clorosis y necrosis.
- *Alternaria spp*: Produce manchas negras en las espatas y márgenes de hojas.

Organismos que causan pudrición de túberos durante el almacenaje se encuentra *Penicillium sp*, este hongo produce un moho azul verdoso sobre la superficie del túbero; para poder controlarlo se deber tener buenas condiciones de almacenaje además de sumergir los túberos en solución fungicida antes de su almacenaje, la humedad relativa debería ser 70% con buena ventilación (Seeman y Hoffens, 1999).

3.10.2. Plagas

3.10.2.1. Pulgones y Thrips

- *Myzus sp.* afectan principalmente a las partes jóvenes de las plantas, provocando debilitamiento de tallos. Además de su presencia visible, podemos detectar la aparición de segregaciones pegajosas en los brotes.
- *Frankliniella occidentales*: Generalmente el daño lo ocasiona adultos y larvas, estos se alimentan del jugo de la planta sobre todo en las hojas, pero también en las panículas. Los síntomas de los ataques se muestran como placas decoloradas que cuando son abundantes dan un aspecto plateado (Seeman y Hoffens, 1999).

3.10.2.2. Virus

Los virus son transmitidos por trips y áfidos por lo tanto para prevenir las enfermedades virales se deben controlar estos vectores. Se ha podido identificar 2 tipos de daños que atacan al género de *Zantedeschia*; virus del mosaico y virus de marchitez y moteado del tomate. El virus de mosaico produce distorsión de las hojas y flores además de manchas circulares en las hojas; por otro lado, el virus de la marchitez y moteado del tomate produce manchas que puede ser de color amarillo o blanco en follaje y flores (Seeman y Hoffens, 1999).

Según Huang & Chang, (2005) la pudrición blanda bacteriana y las enfermedades virales son los factores limitantes para la producción de alcatraces en Taiwán, así como en otros países. Se ha informado que muchos virus infectan la cala, por ejemplo:

- *Virus del mosaico Dasheen* (DsMV), el virus más importante de las plantas aroides.
- *Virus del mosaico del pepino* (CMV),
- *Virus del mosaico de Konjak* (KoMV),
- *Virus del mosaico del amarillo del frijol* (BYMV),
- *Virus del marchitamiento manchado del tomate* (TSWV),
- *Virus de la mancha necrótica Impatiens* (INSV),
- *Virus del mosaico de la alfalfa* (AMV),
- *Virus del mosaico de Arabis* (ArMV),
- *Virus X de la papa* (PVX),
- *Virus del cascabel del tabaco* (TRV),
- *Virus del mosaico del nabo* (TuMV),

Recientemente se identificó en Taiwán un nuevo potyvirus que infecta el lirio de cala, el virus del mosaico leve de *Zantedeschia* (ZaMMV).

3.11. Comercialización

3.11.1. Mercado internacional de calas en crecimiento

Según Prensa Libre, (2012) las grandes regiones consumidoras de flor cortada del mundo son Europa occidental, Japón y Estados Unidos. Europa representa el 70% y Estados Unidos el 21% de la importación mundial de flores cortadas respectivamente. Le siguen a Estados Unidos, Alemania, y Reino Unido, también importan flores de corte Francia, Japón y Holanda, pero este último importa y realiza re-exportación principalmente en Europa. Debido a su gran cuota de mercado en el consumo total europeo, como se observa en el cuadro la tabla N° 4 las subastas de los Países Bajos pueden utilizarse como indicador de las especies de flores cortadas más vendidas en la UE. (CBI, 2009)

Tabla 3: Principales 16 especies de flores vendidas en subastas de Holanda 2002-2006

ESPECIES DE FLORES VENDIDAS EN SUBASTAS DE HOLANDA	
1. Rosas	9. Anturios
2. Crisantemos	10. Lirios (Alstroemeria)
3. Tulipanes	11. Amarilis (Hippeastrum)
4. Azucenas	12. Lisianthus
5. Gerbera (Girasol de las Asteraceas)	13. Lirios de agua (Zantedeschia)
6. Orquideas Cymbidium	14. Alboradas
7. Dendranthema	15. Rosas de San Juan (Hypericum)
8. Freesia	16. Claveles (Dianthus)

Fuente: CBI, 2009

La población se mueve progresivamente hacia las áreas urbanas, lo cual también favorecerá en el futuro el consumo de flores. El consumo de los tres grandes mercados consumidores crecerá entre el 4% y el 6% anualmente. Algunas de las actuales economías en desarrollo serán las estrellas del consumo en el futuro como: México, Argentina, Chile, Taiwán, Corea, Singapur, Europa del Este, Sudáfrica, entre otros. En el mercado europeo, las especies con mayor atractivo son la *Hortensia*, *Ranunculus*, *Liliumoriental* e *Hypericum*. En EE.UU, la hortensia presenta una situación similar, mientras que el *Tulipán*, *Zantedeschia*, *Peonía* o *Liliums* registran un atractivo medio. En Japón, las flores de corte con mayor atractivo son *Lisianthus* y *Leucadendron* así como *Zantedeschia* (Prensa Libre, 2012).

3.11.2. Calas en el Perú

En el Perú la más conocida es *Zantedeschia aethiopica* o cartucho blanco, es muy popular y casi la única que se encuentra en el mercado local. La Cala Blanca, se ha adaptado muy bien a nuestras condiciones es usual verla crecer en sierra entre 900 y 2500 m.s.n.m. como si se encontrara en su hábitat natural. Siendo el distrito de Matucana, provincia de Huarochirí, a 2600 msnm, el mayor productor de lima; en la zona existen veinte productores de esta flor, los cuales reducen sus labores a solo un aporque anual y una sola cosecha. Comercialmente venden el tallo y la flor, de acuerdo al tamaño de vara, clasificándolo en primera (115 cm), segunda (90 cm) y tercera (60 cm). La primera cosecha se logra casi al año de siembra y se obtiene un promedio de 1.6 flores por m² /semana (UNALM, 2008).

3.11.3. Variedades comerciales

Escobar (2009) menciona que existen 2 familias de flores, las protegidas y las libres. Las variedades protegidas son aquellas creadas como resultados de híbridos entre otras especies. Estos híbridos son de propiedad registrada o patentada por su creador, y para el cultivo de las mismas, es necesario no sólo pagar regalías, sino también contar con el permiso para cultivarlas. Lo que hace difícil para otros productores, penetrar al mercado con estas especies nuevas, que por lo general tienen una gran acogida entre los consumidores. Entre las variedades protegidas están las Regal, Ruby Sensation, Twilight, Fire Dancer y Lemonade. Las variedades libres, son las variedades no registradas, que todos los productores pueden cultivar sin necesidad de pedir autorización ni pagar regalías, pero por ser libres no son tan apetecidas en el mercado, aunque tienen una demanda constante a lo largo del año. Entre estas variedades libres están las Crystal Blush, Garnet Glow, Lavender Gem, Ruby Lite Rose, Flame, Sunshine y Fire Gold.

IV. MANEJO AGRONÓMICO DEL CULTIVO

El manejo agronómico que se le da a este cultivo en la empresa requiere de climas más cálidos por ello Salinger, (1991) menciona como mejores temperaturas 16°C-25°C y la falta de lluvias muestran mejores resultados a comparación del manejo en climas con presencia de lluvias, la cual podría afectar la producción. Por eso la preparación del suelo ayuda a obtener suelos francos arenosos, que retenga humedad y a que su vez tenga un buen drenaje para minimizar problemas de pudrición y más fértiles.

4.1. Preparación del terreno

Según García (1996) se busca tener los mejores terrenos es así que a través de la descompactación; la aireación, la infiltración de agua y la penetración de las raíces se pueden lograr. De igual. Los tuberos deben ser plantados en suelos muy bien drenados, arenosos o suelos franco-arenosos con un pH de 6.0-6.5 y rico en materia orgánica El cultivo crece muy bien en sustratos ricos en materia orgánica con permeabilidad lenta. Es aquí que con un arado de reja y grada se debe voltear la tierra de abajo hacia arriba a una profundidad de 40 cm., luego se pasa la grada que servirá para nivelar y picar los terrones. Posteriormente se procede con el parcelado que van a ser espacios libres de tránsito para realizar las labores de abastecimiento de productos y paso del tractor, asimismo el mercado y preparación de camas, la cuales por lo general pueden ser de 100 metros o en su defecto según se adecue al tamaño del terreno.

4.2. Riego

Un primer riego antes de la siembra es importante para ayudar a los suelos duros y lavar las sales que se tengan así como larvas o pupas que puedan existir. Debido a que los tuberos son propensos a las pudriciones en la base de las hojas s aconsejable regar solamente la tierra, sin mojar las hojas. El nivel de agua debe ser adecuado para prevenir infecciones de producción blanda (Baldwin, Welsh, 1989).

4.3. Fertilización

Tal y como menciona Funell, (1992) las semanas más demandantes de nutrientes son entre la 6ta y 12va semana después de la plantación por eso recomienda una fertilización inicial de 300kg/ha de N, 45 kg/ha de P y 400 kg/ha de K y en etapa de floración cuando se utiliza el sistema de fertirrigación se recomienda aplicar 15 kg/ha de N, 7 kg/ha P y 14 kg/ha de K, aplicándola dos veces por semana. Durante las primeras semanas de siembra el sombreado es un factor importante, por ello se realiza la colocación de mallas con 50% de sombra para evitar el estrés por exceso de radiación.

4.4. Marcación

Se marca con rafia y cal de obra las dimensiones de la cama, para luego realizar el encamado con máquina (primer arado con tractor). El encamado preferentemente debe ser de 100 mt., de longitud o en su defecto según se adecue al tamaño del terreno.

4.5. Plantación y densidad

Bajo nuestras condiciones climatológicas es recomendable la siembra en los meses de primavera donde las temperaturas comiencen a aumentar, la densidad dependerá del tamaño del tubero ya que una cama aproximadamente puede medir 80 metros lineales, con un ancho de 1.5 metros. Las camas se siembran a 20 cm de altura del suelo para favorecer el drenaje. Los siguientes tamaños estándar se utilizan para tubérculos de segundo y tercer ciclo.

Tabla 4: Densidad de siembra según calibre

Calibre de tuberos	Diámetro (cm)	Nº tuberos/m ²
12/14	3-4	6x5
14/16	4-5	5x6
16/18	5-6	3x8
18/20	6	4x4
20/22	6+	3x4

Fuente: Bloomz, 2011

4.6. Propagación

La fase de propagación dentro de la empresa abarca diferentes formas las cuales hacen más eficiente el cultivo:

- Por semilla

La plantación por semilla procede luego de una polinización asistida, las semillas son cosechadas, lavadas y desinfectadas para luego sembrarse en el suelo. El secado de las semillas debe ser muy riguroso para evitar sembrar semillas enfermas o contaminadas, el secado puede ser al aire libre.

- División de túberos

La división de túberos es otra manera por la cual se genera la propagación de las plantas ya que por su complicado proceso requiere más tiempo.

Se puede realizar de 2 formas:

- a) Por la mitad: El cual consiste en partir el tubero por la mitad, dejando puntos de crecimiento en cada mitad para su posterior emergencia en suelo.
- b) Extracción de yemas: Se realiza en túberos con buen tamaño, donde con un instrumento esterilizado se procede a retirar los puntos de crecimiento, convirtiéndolo en trozos.

V. CULTIVO *IN VITRO*

Es una técnica, desarrollada para la producción en masa de plantas, que ha sido utilizada con éxito desde los años 60. La principal ventaja de esta técnica es la multiplicación rápida de material clonal libre de enfermedades. Esta característica ha servido para introducir rápidamente en el mercado nuevas variedades de plantas obtenidas mediante selección, mutación, programas de mejora o manipulación genética; sin embargo, la industria de la micropropagación presenta serias limitaciones debido a los elevados costos de producción, reduciéndose la mayor parte de su actividad al sector de plantas ornamentales (Holdgate y Zandvoort, 1992); sin embargo, la aplicación de esta técnica va depender de los objetivos que se persigan es decir, se puede establecer un laboratorio de cultivos para investigación básica, para investigación aplicada y desarrollo de tecnologías o para producción comercial de material vegetativo de una especie en particular (Rojas, García y Alarcón, 2004).

Según Delgado (2012) menciona las siguientes ventajas del cultivo *in vitro*:

- Altos coeficientes de propagación: Los sistemas de multiplicación actuales pueden ofrecer elevadas tasas de propagación, pudiéndose obtener hasta un millón de plantas a partir de una sola en un período de 12 a 24 meses.
- Uniformidad en las plantas producidas: La micropropagación es básicamente una técnica de clonación siendo posible producir poblaciones uniformes de plantas.
- Elevadas producciones en espacios reducidos: como el manejo se da en condiciones controladas del laboratorio, sin influencia de la estación del año o el clima, y el material son brotes de plantas de reducidos tamaños; el número de plantas que se producen por área es mucho mayor que en invernaderos o campo.
- Mayor calidad del producto: se le da un valor agregado al tener plantas sanas libres de patógenos.

5.1. Hormonas vegetales

Ville (1996), sostiene que las hormonas son sustancias que regulan el crecimiento, la diferenciación de tejidos y órganos. Actúan en las plantas sobre el metabolismo, división celular y estimulan el crecimiento longitudinal de las células en los puntos de crecimiento de planta. Inicia el desarrollo de nuevas raíces, estimula la división celular en el cambium e inhiben la formación de regiones de corte, impidiendo así la caída de hojas y frutas. En las plantas existen tres tipos principales de hormonas vegetales actúan mutuamente para regular fenómenos biológicos específicos y están son:

a) Auxinas:

Las Auxinas son las más importantes de las hormonas vegetales, ejercen efectos muy notables en ordenar el crecimiento y junto con otros mensajeros químicos provoca la diferenciación de las células vegetales. (Ville, 1996). Influyen también en otros procesos fisiológicos, como son el desarrollo de frutos y la formación de raíces (Weaver, 1996).

Como menciona Jankiewicz (2003) algunas auxinas sintéticas más importantes son:

- Ácido indol-3-butírico (AIB)
- Ácido naftil - 1 - acético (ANA)
- Naftil-1- acetamida (NAAm)
- Ácido - 2 - naftoxiacético (ANOA)
- Ácido 2,4 - - diclorofenoxiacético
- Ácido 2,4,5 – triclorofenoxiacético, (2,4,5 – T)
- Ácido 2- metil-4-clorofenoxiacético (MCPA)

Con el uso del ácido indol-3-butírico (AIB) se ha mostrado que las plantas pueden convertir el AIA a AIB. En esta conversión participa la enzima AIB sintetasa, en una reacción reversible. Desde el punto de vista práctico es importante que el AIB sea metabolizado más lentamente que AIA y que sus conjugados no sean oxidados. Por esto el AIB posiblemente es más eficiente que el AIA en enraizamiento de estacas. Además, el nivel de AIB se eleva durante el sometimiento de las plantas a estrés (Jankiewicz, 2003).

c) Giberelinas:

Son las sustancias químicamente relacionadas con el con el ácido giberélico. Su diferencia principal es por la influencia en el alargamiento del tallo y mayor crecimiento de las plantas, (Sampietro, 2005). Una planta puede producir varias giberelinas, aunque no todas ellas sean activas, se forman en los ápices de tallos y raíces, hojas jóvenes, partes florales, semillas inmaduras y embriones en germinación, (Sampietro, 2005).

d) Citoquininas:

Son sustancias derivadas de la adenina o de aminopurinas. Se especializa fundamentalmente por su capacidad de intervenir en la división celular, (Sampietro, 2005) determina que se tiene los siguientes efectos fisiológicos:

- Promueven la división celular, la formación y crecimiento de brotes laterales (axilares).
- Promueven la movilización de los nutrientes hacia las hojas, maduración de los cloroplastos.
- Promueven la expansión celular en hojas y cotiledones. Retarda la senescencia de las hojas.

Algunas citoquininas sintéticas que se puede encontrar son la Cinetina y la Bencilaminopurina que muestran una alta actividad biológica, mientras que poco menos activa es la Tetrahidropiraniol. Además de las mencionadas, se han sintetizado 70 derivadas de la purina. Ya que estos compuestos tienen poca actividad biológica o son totalmente inactivas, raramente se les menciona. Otras hormonas como el tidiazurón (TDZ) muestran alta actividad de Citoquinina y encontró aplicación en el cultivo de tejidos. Tidiazurón es un componente de la preparación Dropp-50, el cual se aplica para la defoliación. (Jankiewicz, 2003).

5.2. Interacción entre citoquininas y auxinas

Berrios y Berthouly (1987) mencionan que la interacción de los reguladores reacciona de diferentes maneras en las plantas bajo condiciones controladas como el laboratorio. Es así que balance de Auxinas y Citoquininas se puede expresar de la siguiente manera: una concentración alta de auxina, combinada con una baja de Citoquinina, promueve la iniciación de raíces; la relación inversa conduce al desarrollo de yemas adventicias y laterales; concentraciones intermedias de ambos reguladores estimulan el origen de callos. La relación de concentración óptima entre los dos tipos de hormonas depende de la especie de planta cultivada *in vitro*, de las condiciones y de los compuestos usados en el cultivo, y de los niveles endógenos de reguladores de crecimiento de los tejidos en el momento de su introducción. Generalmente las interacciones encontradas son complejas y más de una combinación de las dos clases de sustancias puede producir óptimos resultados.

5.3. Antecedentes de uso de hormonas en cultivo *in vitro* en *Zantedeschia sp.*

Según Chang *et al.* (2003) se han propagado calas por micropropagación convencional en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) usando reguladores de crecimiento, como benciladenina y tidiazuron en *Zantedeschia albomaculata*. Otros reguladores de crecimiento como bencilaminopurina y kinetina también fueron utilizados para cultivos *in vitro* de *Zantedeschia sp.* (Jarquin & Flores, 2002).

La meta de este cultivo *in vitro* es obtener el mayor número de brotes laterales posibles y tasa de multiplicación eficiente de cada material vegetal obteniendo una producción inmediata de plantas homogéneas (Funnell *et al.*, 1998). Es por eso que Jarquin & Flores (2002) compararon las hormonas KIN y BAP en medio semisólido a 2.5 mg/l, demostrando que esta última citoquinina (BAP) tiene un efecto doble en cuanto a la multiplicación a diferencia de la kinetina (KIN); obteniendo de 4 a 6,6 brotes/explante, para KIN y 11 a 18 brotes/explante para BAP siendo una tasa de multiplicación promedio de 15; además de un mayor porcentaje de biomasa para BAP.

Otras investigaciones como Sanchez & Daquinta (2010) compararon el efecto de la citoquinina (BAP) en 3 diferentes variedades de calas: Majestic Red, Golden Affair y Treasure en un medio de cultivo Murashige skoog. Las dosis de hormonas usadas para cada

variedad fue de 4 mg L⁻¹ BAP para la var Treasure, 2 mg L⁻¹ BAP para Golden Affiar y 1 mg L⁻¹ BAP para Magistec Red, en diferentes formas de cultivo *in vitro*; semisólido, líquido en movimiento a 100 rpm y en sistemas de Inmersión Temporal (SIT). Siendo el mejor resultado 4 mg L⁻¹ BAP en la var Treasure con una tasa de multiplicación mayor, aunque con presencia de clorosis en brotes axilares.

5.4. Contaminación microbiana en cultivo *in vitro*

La contaminación microbiana es uno de los problemas más graves en la micropropagación de especies vegetales a nivel mundial, produce cuantiosas pérdidas de material, tanto en los trabajos de investigación como en la micropropagación comercial.

Según George & Leifert (1993), los contaminantes más frecuentes en condiciones *in vitro* son los hongos, las bacterias y levaduras, aunque también existen otros menos frecuentes como los virus. Estos organismos son aquellos que no son necesariamente dañinos para las plantas en el campo, pero SI causan daño al tejido *in vitro*.

Estos organismos compiten con el explante por los nutrientes del medio y les producen daños directos e indirectos por la colonización de sus tejidos o liberación al medio de metabolitos tóxicos, aunque en la actualidad no se encuentran muchos trabajos en la literatura científica que expliquen el mecanismo de acción de los contaminantes, que los hacen perjudiciales para las plantas *in vitro* (Leifert, 1993).

Entre las principales fuentes de contaminación bacteriana se citan los explantes, el ambiente de los locales de trabajo, los operadores y las técnicas deficientes de esterilización. Además, los microorganismos pueden diseminarse por ácaros, trips y hormigas (Pype, 1996). El ambiente de los locales de trabajo es una fuente de contaminación, ya sea directa o indirectamente. Se plantea que, a través de las corrientes de aire, las partículas del suelo cargadas de esporas y células de microorganismos son arrastradas y penetran por los acondicionadores de aire, son transportadas e introducidas por el hombre y permanecen en el ambiente por condiciones higiénicas inadecuadas.

En estudios llevados a cabo por Ruiz *et al*, (1998) sobre el establecimiento *in vitro* de cala reportan el 80% por contaminación bacteriana. También en una investigación similar

efectuado por Bernal y López en el 2001 obtuvieron porcentajes de contaminación cercanos al 90% en la fase de establecimiento *in vitro*.

VI. DESARROLLO DE LA EXPERIENCIA PROFESIONAL

6.1. Laboratorio de cultivo *in vitro* en Cañete

La introducción de calas a la micropropagación *in vitro* se debe principalmente a problemas sanitarios probablemente debido a los métodos de propagación convencionales donde ocurren los contagios de enfermedades fungosas o bacterianas. Es por ello, que se busca obtener buena calidad de planta a través del cultivo *in vitro*. En este sentido se decidió instalar un laboratorio de cultivo de tejidos. Al iniciar la experiencia laboral el laboratorio tenía 1 año de creación, con la infraestructura ya instalada; sin embargo, aún no había una producción masiva de plantas por la carencia de procedimientos y protocolos que se deben seguir dentro de todo laboratorio y/o estaban en proceso de elaboración, recién por ejecutarse

El manejo de un laboratorio *in vitro* necesita de una buena organización y comunicación sobre todo si es parte de la producción comercial donde las tomas de decisiones se debaten con el equipo a cargo, con el fin de cumplir los objetivos y metas de producción. Es así que las actividades, observaciones y decisiones deben quedar por escrito de manera explícita para que sea un registro a futuro y mejoren la gestión del manejo del laboratorio por eso se elaboró manuales, protocolos y/o procedimientos.

Si bien las indicaciones y directrices fueron establecidas por la empresa, éstas cambiaron según las necesidades del laboratorio y comportamiento del cultivo en *in vitro*. Por ello se elaboró protocolos los cuales serán guía para el cultivo *in vitro* en la empresa.

Un punto importante dentro del laboratorio fue el acceso a los insumos (minerales químicos) con los que se realiza los medios de cultivo para eso se buscó proveedores responsables que junto con el área logística de la empresa se coordinó y se hizo seguimiento del traslado de los insumos hasta Cañete.

A continuación, se menciona las áreas que cuentan el laboratorio y las actividades que se realizan diariamente.

El laboratorio comprende 2 áreas principales:

- Área de lavado y/o preparación de medios
- Área de siembra y transferencia

Actividades que se realizan diariamente son:

- Lavado y desinfección de materiales y ambientes
- Preparación de medios de cultivo
- Esterilización de medios
- Calibración de equipos
- Preparación de explantes y transferencia aséptica al área de siembra y transferencia

6.1.1. Área de lavado y/o preparación de medios

El área de preparación de medios está equipada con una refrigeradora común, la cual esta acondicionado de un display que mide la temperatura interior de refrigeración con el fin de guardar soluciones químicas preparadas y hormonas que necesiten temperaturas bajas. Se hace uso de equipos como: balanza de precisión, autoclave, anaqueles, conductímetro. Los materiales en su mayoría son de plásticos (probetas, pipetas, jarras medidoras, cucharas, jeringas, etc.) o reciclados como envases o botellas de vidrio previamente esterilizados para su uso.

No se usa contenedores como magentas, sino utilizamos contenedores de polipropileno en diferentes tamaños para colocar los medios de cultivo y sembrar los explantes.

Cabe mencionar que la sanitización y desinfección de ambientes así como de instrumentos usados dentro del laboratorio es un punto importante para evitar la contaminación *in vitro*, es así que estas labores y las condiciones han permitido tener % bajos de contaminación (10-15%)

6.1.2. Área de siembra y transferencia (cuarto de cultivo)

Aquí se encuentra toda la colección *in vitro* de calas donde se trata de tener las condiciones ambientales óptimas como: variaciones de temperaturas, intensidad lumínica, calidad de la luz, humedad y fotoperiodo que favorezcan el desarrollo de los explantes.

- Control de temperatura

La temperatura se controla con los equipos de aire acondicionado, el flujo del aire debe ser uniforme dentro del cuarto para poder conservar la misma temperatura en todos los puntos. Cuando se produce un cambio de estación (Ejemplo: de Invierno a Primavera) las temperaturas son afectadas con un margen de error de ± 2 °C; sin embargo, la temperatura promedio oscila entre 20°C a 22°C.

La humedad es controlada indirectamente con la instalación de los aires acondicionados. La humedad relativa (HR) menor a 50% causa pérdida de agua en los medios y precipitación de sales minerales en el medio; la HR mayor a 80% abre la posibilidad de ingreso de agentes contaminantes en los contenedores.

Para la medición de la temperatura y humedad se usa Termohigrómetros, los cuales se colocan en diferentes puntos del cuarto de cultivo y son calibrados por un equipo patrón periódicamente.

- Control de iluminación

Se utiliza estantes metálicos rodantes de 5 pisos, en cada piso están ubicados fluorescentes horizontales, los cuales mantienen una distancia moderada a las plantas y permite un correcto flujo de aire.

- Control del fotoperiodo

Es controlado por un dispositivo (timer), el cual es programado para 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Las cámaras de flujo laminar son ambientes que esterilizan y permiten propagar de forma aséptica; sin embargo en el laboratorio se cuenta con biocámaras que son pequeños espacios de vidrio (1x1m) transparentes, en estas biocámaras se colocan pequeños equipos de ozono de aire que descontaminan el ambiente. Esta forma de propagación permite que sea accesible a cualquier productor de determinado cultivo a comparación de la logística en laboratorios más sofisticados.

El cuarto de cultivo está aislado del ambiente exterior a fin de mantener la temperatura y HR apropiadas, por ello el ingreso es solo para personal autorizado.

6.1.3. Medios de cultivo

Se utiliza soluciones stocks preparados con insumos químicos previamente probados. Estas soluciones se resumen como:

$$\text{Stock A} + \text{Stock B} + \text{Stock C} = \text{MS al 100\%}$$

Donde:

Stock A: son macronutrientes

Stock B y C: micronutrientes y quelatos

Al igual que estas soluciones stock se recomienda usar soluciones de vitaminas ricas en azúcares para fortalecer los medios de cultivos, posteriormente el pH de los medios son regulados a 5.7.

Los insumos son adquiridos a proveedores de reactivos químicos. Las dosis usadas (Tabla N°6) en los stocks son equivalencias que son llevadas/ajustadas a un Murashige & Skoog, sin vitaminas.

Tabla 5: Hoja de formulación del Murashige & Skoog

Producto (mg/L)		Producto (mg/L)	
Nitrato de Amonio	1650	Sulfato de Manganeso	16.9
Ácido bórico	6.2	Ácido Molibdico.2H2O	0.25
Cloruro de Calcio, Anhidro	332.3	Ioduro de Potasio	0.83
Cloruro de cobalto. 6H2O	0.025	Nitrato de Potasio	1900
Sulfato de cobre.5H2O	0.025	Fosfato de Potasio monobásico	170
Na2EDTA.2H2O	37.26	Sulfato de Zinc.7H2O	8.6
Sulfato de Hierro	27.8		
Sulfato de Magnesio	180.7		

Fuente: Phytotechnology laboratories, 2007

- Preparación de medios

Las soluciones stock son refrigeradas a una temperatura 5 a 8 °C y diluidas en agua destilada para su preparación, el pH es ajustado a 5.7. Posterior a ello se agrega el gelificante (agar-agar). Es decir, el medio usado es el convencional de forma sólida. El costo de los medios de cultivo es mayor cuando los insumos como el gelificante son productos formulados, esto llevó a buscar sustitutos que sean soportes para la siembra de las plantas, es así que hoy en día se trabaja con un tipo de gelatina china de origen vegetal.

Finalizado la preparación se autoclava a una temperatura de 121 °C., luego dispensar (verter el contenido) el medio de cultivo en bolsas. Es necesario autoclavar las botellas con el medio y bolsas de polipropileno por separado para luego dispensarlo bajo biocámara. Las bolsas con el medio son dobladas herméticamente y selladas con clips en la parte superior.

6.1.4. Determinación de dosis adecuadas de hormonas para el desarrollo de explantes de *Zantedeschia sp* en cultivo *in vitro*

El método convencional de propagación *in vitro* fue el medio sólido, dando prioridad a la determinación de la dosis óptima de las hormonas, para multiplicar *Zantedeschia sp*. Es así, que según las pruebas de Jarquin & Flores (2002) mencionan el doble efecto que produce la

hormona Bencilaminopurina (BAP) a diferencia de Kinetina (KIN) por ello se estableció probar diferentes concentraciones (1mg/L, 2mg/L y 4mg/L) de BAP en MS + Vitaminas (Vitamina B) con 20 mg azúcar/L y un testigo (sin BAP) en un material de prueba. Teniendo como resultado que a 4mg/L los brotes en el medio de multiplicación muchos eran adventicios y estaban vitrificados caso contrario a 2 mg/L que se pudo observar menos brotes vitrificados. El testigo no presentó vitrificación alguna ni tampoco mayor presencia de brotes, es decir la relación de multiplicación era de 1:1. La tasa de multiplicación a 2 y 4mg/Lt no tenía diferencias significativas a pesar de que se esperaba mayores tasas a 4 mg.

Tras estas pruebas se determinó usar como dosis de BAP para la etapa de multiplicación la concentración de 2 mg/l. Durante el proceso *in vitro* y observaciones propias se vio la necesidad usar auxinas en combinación con citoquinina, tal y como menciona Berrios y Berthouly (1987) mejora la calidad de los brotes producidos por alguna citoquinina en cuanto al crecimiento, forma y altura. Siendo la hormona a usar ácido indolbutírico (IBA) la cual promueve la elongación y enraizamiento de los explantes. Gracias a las combinaciones de hormonas (citoquinina-auxina) se lograron producir cerca de 30000 explantes, llevando a aclimatar cerca de 22000 plantas en total con una tasa de multiplicación promedio de 2 a 3 aproximadamente y una eficiencia de micropropagación del 70%.

6.1.5. Fases de crecimiento y desarrollo del cultivo *in vitro* en cañete

El tiempo que permanece *Zantedeschia sp* en *in vitro* es de 1 año como máximo, teniendo aproximadamente 10 subcultivos durante toda su propagación, este límite se estableció con el fin de evitar acumulación de citoquininas en los explantes y/o posible aparición de bacterias endógenas latentes; sin embargo, el número de subcultivos puede variar según comportamiento de las plantas, es decir si se observa formación de callos se deja de someter a citoquininas.

6.1.5.1. Preparación del material vegetal

Después de la floración de la planta, los túberos deben permanecer en el suelo hasta que se complete el crecimiento y la planta entre en dormancia completamente. Posterior a ellos se procede a la cosecha de túberos. Los túberos deben tener una desinfección previa al ingreso en el laboratorio, en solución fungicida no mayor a 7-15 días previo a la introducción *in*

vitro. Es recomendable que los puntos de crecimiento estén brotados antes de la introducción.

6.1.5.2. Introducción

El tiempo de introducción que se necesita para desarrollarse dependerá del comportamiento de la variedad, es así que a veces puede durar hasta 8 semanas donde se recién se observa crecimiento.

El túbero es limpiado con agua y detergente utilizando una escobilla blanda, en caso de presencia de sustrato o polvo, sin dañar mecánicamente los puntos de crecimiento. Posteriormente se sumerge el túbero en una solución de hipoclorito al 2% por 20 min. Acabado el tiempo de inmersión se da un enjuague con agua corriendo, se deja secar y con un instrumento esterilizado con alcohol u otro desinfectante se procede a extraer las yemas (brotes) maduros. Se remueve la mayor cantidad de catáfilas externas que protegen a cada punto de crecimiento, hasta que aparezca un tejido blanco y verde limpio.

Luego se lleva a la biocámara las yemas cosechadas y tras desinfecciones con alcohol e inmersión de hipoclorito de sodio se procede a desinfectar las yemas y sembrarse en medio de cultivo de introducción. En esta etapa se hace un seguimiento visual de las yemas extraídas y su respuesta a la desinfección; algunas pueden secarse y otras contaminarse por hongos de ambiente; es aquí donde se hace una selección estricta de las yemas que seguirán en propagación, teniendo un porcentaje de éxito de introducción del 50% aproximadamente; sin embargo, se observó daños en el túbero por la inmersión en hipoclorito, por lo que se eliminó este paso.

- Test de bacterias

Al cabo de 1 mes aproximadamente en medio de introducción, se realiza un análisis de bacteria con medio líquido LB (luria broth) el cual consiste en extraer una porción de hoja en condiciones asépticas, con ayuda de bisturí desinfectado e insertarlo en el medio LB. Luego de 5 días de siembra a temperatura ambiente y un lugar iluminado y fresco con una temperatura aproximada de 26 °C se realiza una evaluación visual con el testigo, si el medio de cultivo se torna turbio y/o acuoso significa que el resultado es positivo. Se debe tomar en

cuenta que el resultado puede salir FALSO positivo ya que la muestra pudo ser contaminada al momento de realizar la siembra, por lo que se debe repetir el test. Si en el segundo test de bacteria resulta POSITIVO, el material y las yemas infectadas deberán ser eliminados.

6.1.5.3. Multiplicación

Después de 8 semanas en la etapa de iniciación aproximadamente, los nuevos brotes se desarrollan a partir de la yema introducida, se separan y se siembran en medio de multiplicación; este medio tiene mayor concentración de citoquininas y una baja concentración de auxinas; esta interacción de hormonas permite producir más brotes laterales pequeños por eso es importante reconocer de manera visual los brotes axilares, adventicios o callos ya que estos se eliminan y no se multiplican. La aparición de estos brotes y su comportamiento dependerá del material vegetal entregado al laboratorio ya que cada material vegetal posee citoquininas endógenas.

6.1.5.4. Elongación

En esta etapa la concentración de citoquininas disminuye y aumenta las auxinas, permitiendo que los pequeños brotes laterales sean sembrados en medio de elongación obteniendo brotes mejor formados y engordados.

6.1.5.5. Enraizamiento

En esta etapa se tiene como única hormona y en mayor concentración a la auxina ya que se busca formar raíces. Luego de 5 semanas aproximadamente de cultivo en el medio de elongación y dependiendo del número de explantes alcanzados, los brotes elongados se transfieren al medio de enraizamiento al igual que brotes de multiplicación.

En la Figura 3 se muestra la fase de crecimiento in vitro de *Zantedeschia sp.*



Fuente: Bloomz, 2011

Figura 3: Fases de crecimiento en cultivo *in vitro* de *Zantedeschia sp*

6.2. Aclimatación

La mejor época para sembrar plantas *ex vitro* en Cañete son los meses de primavera e inicios de verano, la aclimatación se da bajo módulos de invernadero donde las temperaturas y humedad son controladas a través de un termohigrómetro.

Luego de 4 semanas en el medio de enraizamiento *in vitro*, las plántulas debieran presentar follaje y raíces de 2 a 3 mm de largo. Una plántula equilibrada es el estado ideal para la aclimatación, lo que implica una planta individual, sin brotes laterales, de 3 a 4 hojas, y pequeñas raíces de 1 – 5 mm.

Se colocan los brotes enraizados *in vitro*, en un ambiente húmedo, fresco y bajo sombra a fin de evitar la deshidratación. Para esto se utiliza un contenedor con agua esterilizada a temperatura ambiente.

En un mesón de trabajo, de superficie no porosa y previamente sanitizado con etanol al 70%, se colocan las plántulas enraizadas, teniendo en cuenta de trabajar con un solo genotipo a la vez, para evitar mezcla entre ellos. Se elimina todo el agar o medio líquido, utilizando agua corriente, a temperatura ambiente (20 °C aproximadamente). Se elimina las hojas cloróticas o muertas. Se realiza un baño de 1 – 3 minutos en una solución de fungicida e insecticida de amplio espectro.

Posteriormente las plántulas *ex vitro* se siembran en cajas de turba+perlita; cada caja tiene una profundidad de 11 cm y es previamente humedecido con la misma solución fungicida más un enraizante. Las plántulas son ubicadas en túneles de invernadero y cubiertas por mallas antiafidas y agrivelos, estas permanecen por 4 semanas aproximadamente cubiertas para evitar deshidratación.

Permanecen en invernadero por un tiempo de 6 a 7 meses hasta senescer el follaje y formar microtúberos que posteriormente serán sembrados en campo.

En la Figura 4 se resume en una línea de tiempo el proceso productivo del cultivo de *in vitro* de *Zantedeschia sp.* en Cañete.

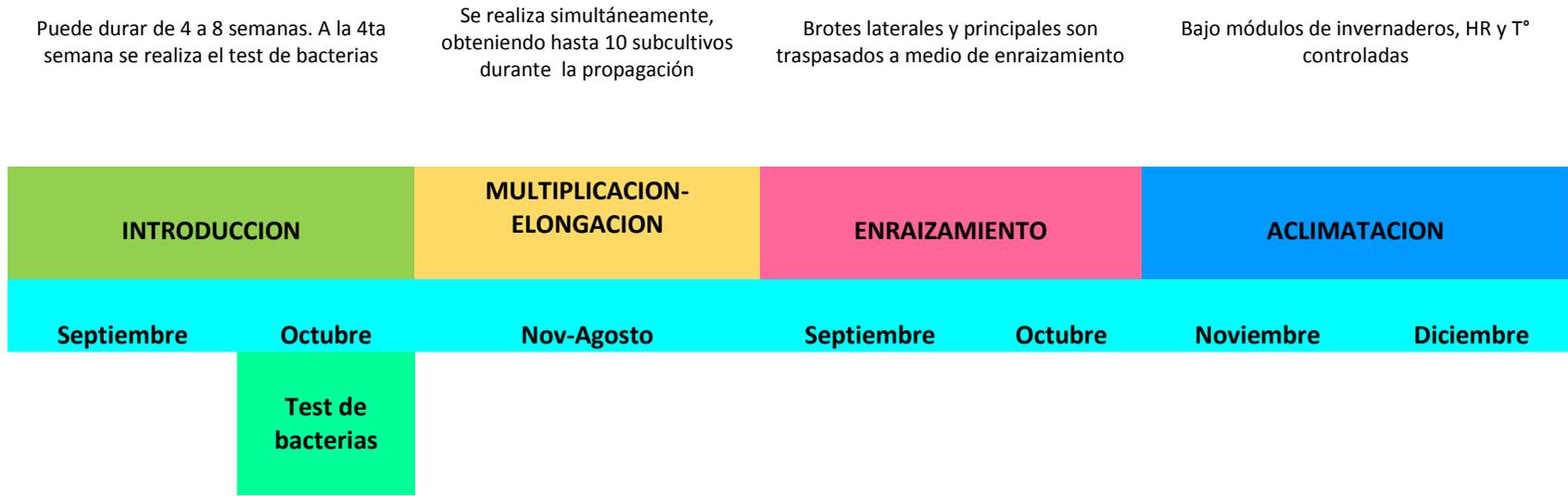


Figura 4: Línea de tiempo sobre las fases de crecimiento en la producción *in vitro* de calas en Cañete

6.3. Aportes a la experiencia laboral

- Se es más eficiente la comunicación entre áreas para mejorar el manejo del laboratorio a través de reuniones e informes con el directorio.
- Existe una mejora en la elaboración de procedimientos y protocolos para la propagación de *Zantedeschia sp*, las cuales son cumplidas con regularidad.
- Se cuenta con una etapa de introducción mejor ejecutada ya que se eliminó la inmersión del túbero en hipoclorito por 20 min debido a que se observó que los puntos de crecimiento eran dañados por la desinfección severa con lo cual se desperdiciaba yemas aptas para su introducción. Esto permitió aumentar el % de introducción promedio, en un 15%.
- El agregar auxinas al medio de multiplicación y por ende tener un mejor balance citoquinina-auxina ha permitido obtener mejores brotes laterales.

VII. CONCLUSIONES

- Se logró poner en funcionamiento el laboratorio de cultivo de tejidos *in vitro* para la producción de plántulas de cala en la empresa.
- Se desarrollaron los protocolos para la propagación eficiente de plántulas *in vitro* sanas de cala, a través de los experimentos realizados.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar futuras investigaciones con dosis menores a 2.0 BAP para ver el comportamiento del material vegetal y si se obtienen cambios significativos
- Probar otros tipos de medios diferentes al medio solido que permitan aumentar el % de eficiencia de propagación, y tasa de multiplicación ej: medios líquidos o semisólidos.
- Considerar otros parámetros además de la tasa de multiplicación para determinar la calidad de un explante.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AB Graf, (2009) Plants for a future. (En Red). Recuperado por <http://titanarum.uconn.edu/198500186.html>
2. Basso L., (2008), Producción de calas blancas (*Zantedeschia aethiopica*), universidad de chile, pp.1-13.
3. Berrios, A. Berthouly, M. (1987). Tecnología de cultivo de tejidos de café (*Coffea arabica*). 39 Pág
4. Bernal, M; López, E. (2001).” Contribución al estudio del control de la contaminación endogena con antibióticos y evaluación de la brotación lateral mediante 2 niveles de la hormona Bencil Amino Purina (BAP), en el cultivo "*in vitro*" de *Zantedeschia aethiopica*”.
5. Blomz New Zeland, (2011). Boletines Técnicos. <http://www.bloomz.co.nz/Products/Zantedeschia/Tech-Info>
6. Castroviejo Bolibar, Santiago & al. (2008).Flora ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Disponible en <https://bibdigital.rjb.csic.es/records/item/9971-redirect>
7. CBI. (2009). Market survey: The cut Flowers and Foliage Market in the EU.. <https://boletines.exportemos.pe/recursos/boletin/27230.P>.
8. Chang, H., D. Chakrabarty, E. Hahn & K. Paek. (2003). Micropropagation of Calla Lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. *In Vitro Cellular and Development Biology - Plant*. 36:129-134

9. Clark, C.J.; Bolding, H.L. Biomass and mineral nutrient partitioning in relation to seasonal growth of *Zantedeschia*. *Scientia Horticulturae*, 47(1991).doi: [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(91\)90034-V](https://doi.org/10.1016/0304-4238(91)90034-V)
10. Coig- O'Donnell, M. (2014). El cultivo de la cala coloreada (*Zantedeschia* spp.) en otros cultivos de Agoplaca. http://www.cultesa.com/news/cultivo_cala_coloreada
11. De Pascale, S., Fiorenza S., Martino, A. (2003). Control de floración en cala blanca (*Zantedeschia aethiopica*) con ácido giberelico. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IT2004061502>
12. Escobar. (2009). Mercados potenciales y alternativas de comercialización de *Zantedeschia* (mini calla). Colombia. https://repository.eia.edu.co/bitstream/handle/11190/1599/EscobarCamila_2009_MercadosPotencialesAlternativas.pdf?sequence=7&isAllowed=y
13. Funnell K, A. (1994). Calla growers' handbook. Disponible en http://www.callacouncil.org.nz/e_books.asp?id=list&s=&bID=1
14. García L, F. (2010). Efecto de la cepa bacteriana CAE-01 Y fumigación al suelo sobre la pudrición blanda en el cultivo de alcatraz en la perla, Veracruz, instituto de Horticultura, México, pg.1-71.
15. George, E. F. Plant propagation by tissue culture. Chapter 5, Part 1. 2nd. Ed., Exegetics Ltd, 1993, 130-143 p.
16. Gómez, S. (2009). Absorción de nutrientes de *Zantedeschia elliottiana* (Cala Lily) en diferentes Estados Fenológicos como Punto de Partida para la Determinación de Requerimientos Nutricionales del Cultivo en Condiciones del Eje Cafetero Colombiano. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/3217>.
17. Guaqueta U.S.A. (2007). Calendario Holidays 2008 - 2009. Estados Unidos.

18. Huang y Chang, (2005). *Zantedeschia mild mosaic virus*, un nuevo virus generalizado en el lirio de cala, detectado por ELISA, hibridación dot-blot e IC-RT-PCR, Taiwan. Disponible en <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-3059.2006.01485.x>
19. Hernández, E. (2013). Guía Básica del Cultivo de Alcatraz (*Zantedeschia sp*) y Nociones para su programación. México: Universidad Veracruzana.
20. Jankiewics, L. (2003). Reguladores de crecimiento, desarrollo y resistencia de plantas. 487 pág.
21. Jarquin & Flores. (2002). Establecimiento *in vitro* y micropropagación en medio semi-sólido de Cala (*Zantedeschia sp.*). Costa Rica Vol. 15 N° 4.
22. Leifert, C.; Morris, C. E. y Waites, W. M. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. Critical Reviews in Plant Sciences, 1994, vol. 13, p. 139-183.
23. Lora, P. e. (2015). Efecto de tres dosis de fertilizantes químicos y bioestimulantes en cartuchos amarillo bajo ambientes controlados. <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/787/3/TESIS%20DE%20CARTUCHO%20DE%20COLOR.pdf> [consulta 23 de diciembre de 2015].
24. Pizano De M, M. (1999). *Zantedeschia*. Calla Lily. Ediciones Hortitecna Ltda. Santafé de Bogotá, D.C., Colombia. 54 pp.1999.
25. Pype, J.; Everaert, K.; Debergh, P. Contamination by micro-artropods in tissue cultures. En: Casell, A. C. y Hayes, B. (Eds.). Abstracts of the Second International Symposium on Bacteria and Bacteria Contaminants of Plants Tissue Cultures, University College, Cork. 1996, 21p.
26. Rojas, M. (1993). Fisiología Vegetal Aplicada. Nueva editorial Interamericana S.A. de C.V. México.

27. Roca, W; Mroginski, L. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.
28. Salinger, J. P. (1991). Producción Comercial de Flores. Ed. Acribia S.A. Zaragoza. España. 795 pp.
29. Sampietro D. (2015) Alelopatías Concepto, características, metodología de estudio e importancia.
30. Sánchez, J. E. (2000). Multiplicación *in vitro* de brotes de tres variedades de calas (*Zantedeschia sp.*) empleando sistema de inmersión temporal.
31. Seeman, P., y Hoffen, K. (1999). Cultivo y manejo de plantas bulbosas ornamentales. In: Seemann P. y Andrade, N. (eds.). Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. Pp: 95-111.
32. UNALM, (2008). Estudio del efecto de dos reguladores de crecimiento AG3y BA y tres tamaños de rizomas sobre *Zantedeschia aethiopica*. Programa de ornamentals
33. Weaver, R. (1976). Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. México D.F., México. Trillas. 622 p.