

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE
INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
SUBDIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA
PROGRAMA DE POSGRADO

**Establecimiento aséptico y propagación in vitro de Erythrina fusca
y Erythrina poeppigiana por microestacas**

Tesis sometido a la consideración del comité técnico Académico del Programa de Estudios de Posgrado en ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de Magister Scientae.

por

Vilma Isabel Jiménez Bonilla

CATIE
Turrialba, Costa Rica
1990

Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la Coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE, y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE


COMITE ASESOR:



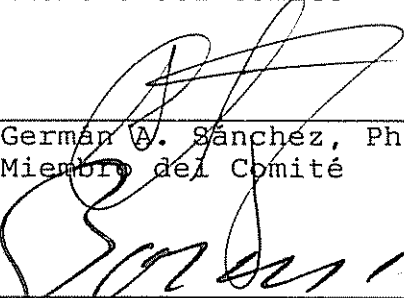
Marc Berthouly, Ph.D.
Profesor Consejero



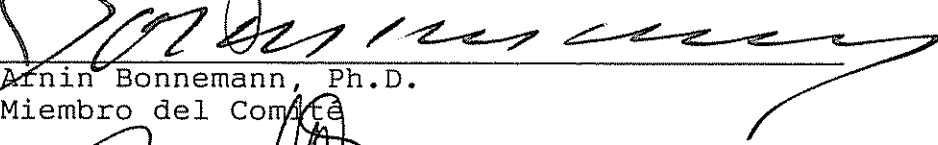
Víctor Vialobos, Ph.D.
Miembro del Comité



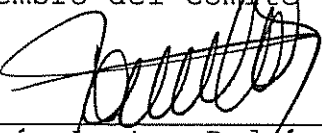
Jorge Sandoval, Mag.Sc.
Miembro del Comité



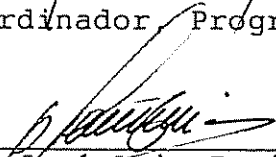
German A. Sánchez, Ph.D.
Miembro del Comité



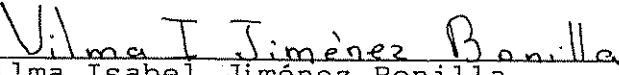
Arnin Bonnemann, Ph.D.
Miembro del Comité



Ramón Lastra Rodríguez, Ph.D.
Coordinador, Programa de Estudios de Posgrado



Dr. José Luis Parisi
Subdirector General Adjunto de Enseñanza



Vilma Isabel Jiménez Bonilla
Candidato

DEDICATORIA

A mis queridos hijos
José Andrés y Vilma Gabriela
quienes fueron mi estímulo
e inspiración.

A mis padres y hermanas
por su apoyo constante

AGRADECIMIENTOS

- Expreso mi más sinceros agradecimientos a Marc Berthouly Ph.D Director de esta tesis por sus enseñanzas, colaboración y orientación en la realización de este trabajo.
- A los miembros del Comité Asesor por la revisión y sugerencias aportadas en el manuscrito.
- Al Ing. Jorge Sandoval M.Sc por su valioso asesoramiento y sugerencias durante la elaboración del manuscrito.
- A mi hermana Hilda Jiménez por su desinteresada ayuda en la labor de mecanografía.
- A Jean Vicent Escalant, Ph.D. por la revisión y sugerencias aportadas al manuscrito.
- A Anabelle Sánchez por su trabajo de mecanografía.
- A Lissette Brenes y Rigoberto Aguilar por su colaboración y amistad.
- Al CIID por financiar mis estudios de posgrado.
- A todos y cada uno de mis compañeros de la Unidad de Biotecnología del CATIE por el apoyo, amistad y cariño brindado en el transcurso de mis estudios y realización de la tesis, gracias.

BIOGRAFIA

La autora, de nacionalidad costarricense, nació en San José, Costa Rica en diciembre de 1960.

Realizó sus estudios de Educación Secundaria en el Colegio Dr. Clodomiro Picado T. y los de Educación Superior en la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica.

En 1987 ingresó al Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE, obteniendo el grado de Magister Scientiae en junio de 1990.

CONTENIDO

Dedicatoria	iii
Agradecimiento	iv
Biografía	v
Resumen	ix
Summary	xi
Lista de cuadros	xiii
Lista de figuras	xv
1. INTRODUCCION	1
2. Revisión de literatura	3
2.1 Importancia	3
2.2 Clasificación taxonómica	3
2.3 Descripción del género	3
2.4 Especies utilizadas	4
2.4.1 <u>Erythrina poeppigiana</u>	4
2.4.2 <u>Erythrina fusca</u>	5
2.5 Propagación vegetativa	5
2.6 Cultivo <u>in vitro</u>	5
2.6.1 Micropropagación	6
2.7 Problemas en el establecimiento aséptico de los explantes	7
2.7.1 Contaminación bacterial	8
2.7.2 Contaminación fungica	8
2.7.3 Utilización de variaciones de pH para controlar bacterias	9
2.8 Reguladores de crecimiento	10
2.8.1 Auxinas	11

2.8.2	Citocininas	12
2.9	Cultivo de tejidos en especies forestales	12
3.	MATERIALES Y METODOS	16
3.1	Localización del estudio	16
3.2	Material experimental	16
3.3	Manejo y desinfección inicial de los explantes	16
3.3.1	Desinfección con etanol	17
3.3.2	Desinfección con hipóclorito de calcio	17
3.3.3	Desinfección con benlate	19
3.3.4	Uso de antibióticos	19
3.3.5	Efecto del pH	20
3.4	Medios de cultivo	20
3.4.1	Inoculación del material	20
3.5	Condiciones de crecimiento	22
3.6	Evaluación	22
3.7	Análisis estadístico	22
4.	RESULTADOS Y DISCUSION	23
4.1	Establecimiento de los explantes	23
4.2	Control de contaminación	23
4.2.1	Uso de hipoclorito de calcio y etanol	23
4.2.2	Utilización de hipoclorito de Calcio y uso de bomba al vacío	30
4.2.3	Efecto de antibióticos con benlate en el medio de cultivo sobre el desarrollo de bacterias	35
4.2.4	Utilización de antibióticos con benlate en el medio de cultivo	40
4.2.5	Efecto del pH sobre la contaminación bacterial	43
4.2.6	Oxidación fenológica	47

4.2.7	Metodología para el establecimiento aséptico de los explantes	48
4.3	Brotación <u>in vitro</u> de yemas laterales	49
5.	CONCLUSIONES	62
6.	LITERATURA CITADA	64
7.	ANEXO	69

JIMENEZ BONILLA, V.I. 1990. Establecimiento aséptico y propagación in vitro de Erythrina fusca y Erythrina poeppigiana por microestacas. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE.

Palabras claves: Erythrina, establecimiento aséptico, propagación in vitro, brotación.

RESUMEN

La investigación se realizó durante el periodo de enero a diciembre de 1989, en la Unidad de Biotecnología del CATIE (Laboratorio Cultivo de Tejidos). Los objetivos fueron: 1) determinar y contrarrestar los problemas que presenta el establecimiento del explante in vitro de Erythrina procedente de material de campo, 2) establecer una metodología para el cultivo in vitro de estacas de dos especies de Erythrina, 3) estudiar la posibilidad de obtener la multiplicación masiva en ambas especies.

Erythrina spp, es una leguminosa arborea conocida en nuestro medio como poró. Es ampliamente usada en Costa Rica para sombra en cafetales, cacaoales, así como para cercas vivas y como suplemento para la alimentación de vacunos y caprinos. Se propaga generalmente por estacas, ya que es un método rápido y exitoso, sin embargo no se pueden obtener gran cantidad de plantas a partir de un sólo árbol.

El cultivo de tejidos se presenta como una alternativa, para facilitar la rápida multiplicación de genotipos seleccionados. Entre los métodos de micropropagación, está la multiplicación por meristemas laterales, la cual consiste en estimular el desarrollo de las yemas localizadas en las axilas de las hojas; este método presenta la ventaja de que los individuos muestran gran estabilidad genética.

Se trabajó con Erythrina fusca y Erythrina poeppigiana. El explante utilizado fueron estacas de 2cm y 8 cm de longitud, con varios entrenudos; con presencia de yemas laterales latentes. Se ensayaron varios procedimientos de desinfección superficial previo al cultivo in vitro. Se realizaron pruebas para determinar la acidez (pH) que mejor inhiba el desarrollo de bacterias así como concentraciones de antibióticos en el medio de cultivo. Uno de los problemas principales fue la contaminación por hongo por lo que se probó adicionar fúngicida al medio de cultivo.

El medio usado fue el básico de Murashige y Skoog (MS) más 10 g de Polivinyl Pyrrolidone (PVP-sigma Chemical 36OR), sacarosa al 1%, y agar 0.7%.

En la etapa de inducción de yemas se trabajó con 0, 2, 4, 8 mg/l de benciladenina (BA) y 0, 0,1, 0,3, 0,5 mg/l de ácido indolbutírico (AIB). Los porcentajes de contaminación, sobrevivencia y explantes limpios variaron con la especie y tratamiento. Para Erythrina poeppigiana se alcanzó el menor porcentaje de contaminación fungica y bacterial de 30 y 12 por ciento

respectivamente y, para Erythrina fusca se encontró un 15 por ciento para contaminación fúngica y un 10 por ciento para bacteria.

Se concluyó que el mejor valor de pH que ayudó a controlar el desarrollo de bacterias fué 4,6.

El desarrollo de hongos se controló con 1 g/l de benlate adicionado al medio de cultivo.

El uso de 100 a 300 mg/l de ampicilina y tetraciclina controlaron el desarrollo de bacterias dependiendo de la cantidad de inóculo que presentara el material.

Los mejores tratamientos para el desarrollo de yemas fueron 2 ó 4 mg/l de BA para Erythrina poeppigiana y 8 mg/l de BA + 0.3 mg/l de AIB para Erythrina fusca siendo este un 76 y 92 por ciento respectivamente.

JIMENEZ BONILLA, V.I. 1990. Aseptic establishment and in vitro propagation by microcuttings of Erythrina fusca and Erythrina poeppigiana. Thesis Mag. Sc.

Key words: Erythrina, aseptic establishment, in vitro, propagation, shooting.

SUMMARY

The research was conducted from January to December, 1989 at CATIE's Biotechnology Unit (Tissue Culture Laboratory). The main objectives were: 1) To determine and to counteract the problems for the establishment of Erythrina in vitro explants from field material, 2) To establish an in vitro culture methodology for cuttings of two Erythrina species, 3) To study the possibility of obtaining massive multiplication of both species.

Erythrina spp is a leguminous species known commonly as "poró". It is widely used in Costa Rica for shade in coffee and cocoa plantations, as lifences and as food supplement for livestock. It usually propagates by stem culttings which is a rapid and successful method; nevertheless, only small quantities of plants can be obtained from one tree.

Tissue cultures appears as an alternative for a faster multiplication of selected genotypes. Among the micropropagation methods is the multiplication of lateral buds which consists in the growing stimulation of buds located on the leaves' axils. This method has the advantage that the individuals obtained through it have great genetic stability.

The species under study were Erythrina fusca and Erythrina poeppigiana. The explants were cunttings of 2 cm and 8 cm de lenght with a few internodes and dormant buds. Several surface disinfection methods were tried before the in vitro culture took place. Tests were done to determine the acidity (pH) which best inhibited bacteria development and antibody concentrations in the culture media. One of the major problems was the fungus contamination for which the addition of fungicides to the culture media was tried.

The culture media used was basic Murashige and Skoog (MS) with the addition of 10 g of Polivinyl Pyrrolidone (PVP-sigma Chemical 360R), sucrose at 1% and agar at 0.7%.

For the stage of shoots induction 0, 2, 4, 8 mg/l of bencyl adenine (BA) and 0, 0,1, 0,3, 0,5, mg/l of indolbutiric acid (IBA) were used. The contamination, survival and clean explants average varied according with the species and treatment. Erythrina poeppigiana showed the lowest percentage of fungal and bacteria contamination (30 and 12 percent, respectively); and Erythrina fusca showed of 15 and 10 percent of fungal and bacteria contamination, respectivilly.

It was concluded that the best pH value to control bacteria's development was 4,6.

The development of funge was done with 1 g/l of benlate added to the culture media.

The use of 100 to 300 mg/l of ampycline and tetracycline controlled the bacteria's development according to the inoculum's quantity on the material.

The best treatments for the development of buds were 2 or 4 mg/l of BA for Erythrina poeppigiana and 8 mg/l of BA plus 0.3 mg/l of AIB for Erythrina fusca showing of 76 and 92 porcent repectivily.

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro No.</u>		
1	Tipo de desinfectante, concentración y tratamientos con respecto al tiempo para la desinfección de estacas de <u>Erythrina fusca</u> y <u>Erythrina poeppigiana</u>	17
2	Tratamientos de desinfección con diferentes concentraciones de hipoclorito de calcio y tiempos de inmersión con y sin el uso de una bomba al vacío	18
3	Uso de tetraciclina y ampicilina en combinación con tratamientos de Benlate adicionado al medio de cultivo	19
4	Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS)	21
5	Supervivencia, causas y porcentajes de contaminación en estacas 2 cm de longitud de <u>Erythrina poeppigiana</u> después de cinco días de cultivo con relación a diferentes tratamientos de desinfección	25
6	Supervivencia, causas y porcentajes de contaminación en estacas de 2 cm de longitud de <u>Erythrina fusca</u> después de cinco días de cultivo con relación a diferentes tratamientos de desinfección	28
7	Supervivencia (%) y causas de contaminación después de cinco días de cultivo en estacas de 2 cm de longitud <u>Erythrina fusca</u> en relación con tratamientos de diferentes concentraciones de hipoclorito de calcio y tiempos de inmersión con y sin el uso de una bomba al vacío	32
8	Supervivencia (%) y causas de contaminación en estacas de 2 cm de longitud <u>Erythrina poeppigiana</u> después de cinco días de cultivo, con relación a tratamientos diferentes de hipoclorito de calcio y tiempos de inmersión con y sin el uso de bomba al vacío	34
9	Resultados de la utilización de ampicilina en cuatro concentraciones diferentes para el control de bacteria en estacas de 2 cm de longitud de <u>Erythrina poeppigiana</u> y <u>fusca</u> después de 20 días de cultivo	39
10	Resultados del uso de tetraciclina y ampicilina en combinación con benlate en el medio de cultivo a los 21 días de cultivo	42

11	Efecto del pH sobre la contaminación por bacteria, en estacas de 2 cm de longitud <u>Erythrina fusca</u> y <u>Erythrina poeppigiana</u> después de 20 días de cultivo	46
12	Brotación <u>in vitro</u> en estacas de <u>Erythrina poeppigiana</u> a los 21 días de incubación	51
13	Brotación <u>in vitro</u> en estacas de <u>Erythrina fusca</u> a los 26 días de incubación	59

En el anexo

	Abreviaturas	70
1A	Resultados de pruebas Ji-cuadrada para 10 tratamientos de desinfección de estacas de <u>Erythrina poeppigiana</u> y <u>Erythrina fusca</u>	71
2A	Resultados de pruebas Ji-cuadrada (X^2) para seis tratamientos de desinfección de estacas de <u>Erythrina poeppigiana</u> y <u>Erythrina fusca</u>	71
3A	Resultados Ji-cuadrada (X^2) en la utilización de ampicilina en cuatro concentraciones diferentes para estacas de <u>Erythrina fusca</u> y <u>Erythrina poeppigiana</u>	72
4A	Resultados Ji-cuadrada (X^2) sobre el efecto de pH en la contaminación de estacas de <u>Erythrina poeppigiana</u> y <u>Erythrina fusca</u>	72
5A	Resultados de Ji cuadrada (X^2) en tratamientos de brotación <u>in vitro</u> de estacas de <u>Erythrina poeppigiana</u> y <u>Erythrina fusca</u>	73

LISTA DE FIGURAS

Figura No.

1	Efecto de 10 tratamientos de desinfección en estacas de <u>Erythrina poeppigiana</u>	24
2	Efecto de 10 tratamientos de desinfección en estacas de <u>Erythrina fusca</u>	27
3	Efecto de 6 tratamientos de desinfección en estacas de <u>Erythrina fusca</u>	31
4	Efecto de 6 tratamientos de desinfección en estacas de <u>Erythrina poeppigiana</u>	33
5	Efecto de ampicilina en estacas de <u>Erythrina poeppigiana</u>	37
6	Efecto de ampicilina en estacas de <u>Erythrina fusca</u>	38
7	Uso de antibiótico en combinación con benlate en el medio de cultivo en estacas de <u>Erythrina poeppigiana</u>	41
8	Efecto del pH sobre la contaminación de estacas de <u>Erythrina fusca</u> en el medio de cultivo	44
9	Efecto del pH sobre la contaminación en estacas de <u>Erythrina poeppigiana</u> en el medio de cultivo	45
10	Brotación (%) <u>in vitro</u> obtenida en estacas de <u>Erythrina poeppigiana</u> a los 21 días de incubación	50
11	Estacas de <u>Erythrina</u> spp mostrando brotación tipo B (brotes en los cuales se observan las hojas trifoliadas bien desarrolladas)	53
12	Estacas de <u>Erythrina</u> spp mostrando brotación tipo A (brotes en los cuales todavía no están totalmente desarrolladas las hojas)	54
13	Estacas <u>in vitro</u> de <u>Erythrina poeppigiana</u> a los 15 días de cultivo. Obsérvese el desarrollo brotes tipo B	55

14	Brotación (%) <u>in vitro</u> en estacas de <u>Erythrina poeppigiana</u>	56
15	Brotación (%) <u>in vitro</u> obtenida en estacas de <u>Erythrina fusca</u> a los 26 días de incubación	58

1. INTRODUCCION

El género Erythrina conocido en nuestro medio como poró, es una leguminosa arbórea de amplio uso. Se le encuentra frecuentemente en asociación con café, cacao o en sistemas agroforestales. Se le utiliza también en cercas vivas y se investiga su uso como suplemento para la alimentación de vacunos y caprinos. (Importancia de la Erythrina..., 1989).

Posee la particularidad, al igual que otras leguminosas arbóreas de fijar nitrógeno, lo cual le confiere ventaja en su establecimiento ya que contribuye al mejoramiento de la fertilidad del suelo. (Combe y Gewald, 1979).

Su método de propagación es generalmente por estacas, sin embargo hay inconvenientes ya que en el caso de E. poeppigiana el enraizamiento es difícil lo que hace que no se tenga una alta eficiencia. Los árboles portadores de estacas deben estar lo suficientemente maduros para que se puedan obtener grandes cantidades de ellos a partir de una sola planta (Rao y Lee, 1982). Erythrina se propaga también por semilla. Aunque este sistema es eficiente, tiene la desventaja de ser una especie alógama, obteniéndose luego mucha variabilidad en la descendencia. (Krukoff, 1982).

Surge entonces la necesidad de buscar métodos alternativos de propagación, donde la micropropagación es una posibilidad.

La micropropagación consiste en cultivar asépticamente varias partes de la planta en un medio de cultivo y en virtud de la interacción (sinergismo, antagonismo) de los reguladores de crecimiento, estimular la formación y el desarrollo de brotes axilares o adventicios. La posterior diferenciación de los brotes en plantas completas y su trasplante a condiciones de invernadero son los dos pasos finales de este método.

Actualmente se reconoce la aplicabilidad de la micropropagación en las especies arbóreas y una de sus principales ventajas, además de la obtención de material limpio, es la capacidad de obtener multiplicaciones rápidas a partir de un ápice de una planta madre seleccionada.

No obstante, la investigación para la multiplicación in vitro en especies leguminosas es escasa y para el caso específico de Erythrina apenas se inicia, por tal motivo se planificó esta investigación con los siguientes objetivos:

- a. Determinar y contrarrestar los problemas que presente el establecimiento del explante in vitro de Erythrina procedente de material de campo.
- b. Establecer una metodología para el cultivo in vitro de microestacas de dos especies de Erythrina.
- c. Establecer la multiplicación en ambas especies.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Importancia

Erythrina es un género agroforestal muy atractivo, debido a su adaptabilidad a diversos usos como son: utilización para sombra de cafetales, cacaotales, construcción de cercas y barreras vivas. Al tener un rápido crecimiento y producir abundante biomasa, aporta nutrimentos al suelo, enriqueciéndolo y protegiéndolo contra escorrentía (Combe y Gewald, 1979).

Erythrina presenta la particularidad de poseer nódulos radicales (Allen y Allen, 1981), los cuales son formados como consecuencia de la asociación simbiótica con bacterias del género Rizobium, teniendo así alta capacidad de fijar nitrógeno atmosférico.

2.2 Clasificación taxonómica

Erythrina pertenece a la familia leguminosae, subfamilia Papilionaceae (Krukoff y Barneby, 1974). Tiene más de cien especies (Krukoff, 1982), en diferentes regiones del Viejo y Nuevo Mundo.

El género a su vez, se subdivide en cuatro subgéneros: Micropteryx, Erythrina, Chirocalyx y Erythraster (Krukoff, 1979).

2.3 Descripción del género

Generalmente, son árboles o arbustos deciduos, con hojas trifoliadas, alternas y con estipulillas glanduliformes (Lackey, 1981).

Las flores tienen cáliz acampanado, oblicuamente trunco o bilabiado; estandarte alargado, casi sécil alas cortas, quilla más corta o más larga que las alas, con sus pétalos libres o adheridos por el dorso; estambre vexiliar libre o

coherente con los demás que están unidos en su mitad inferior, ovario estipitado, con muchos óvulos, con estilo subulado, arqueado, con un estigma terminal pequeño y casi capitulado (Krukoff, 1979).

El fruto es una legumbre estipitada, lineal cilíndrica, atenuada hacia ambos extremos, bivalvada y dehiscente a lo largo de la sutura superior o indihiscente; semillas ovaladas o reniformes (Krukoff, 1982).

2.4 Especies utilizadas

2.4.1 Erythrina poeppigiana

En Costa Rica, esta especie es conocida como poró gigante o poró extranjero (Lozano, 1962). Es un árbol de crecimiento muy rápido que alcanza una altura media de 22 m (National Academy of Sciences, 1979), tiene un fuste limpio; las flores son anaranjadas rojizas, las cuales se presentan en el período más seco del año, cuando han caído las hojas por uno o dos meses (Lozano, 1962).

Es utilizado como árbol de sombra en cafetales y cacaotales, ya que aporta después de cada poda gran cantidad de biomasa, constituyendo las hojas un abono verde que contribuye a mantener la fertilidad del suelo (Russo, 1984).

Cuando Erythrina poeppigiana se asocia con especies forrajeras, estas contienen un porcentaje de proteína significativamente más alto. (Daccarety, 1967) en comparación con especies forrajeras que crecen bajo otras especies arbóreas no leguminosas.

2.5 Erythrina fusca

Recibe también el nombre de poró. Al igual que Erythrina poeppigiana es de crecimiento muy rápido. Tiene espinas en las ramas (Urquhart, 1963); se propaga vegetativamente.

Es extensamente utilizada como árbol de sombra de cacao, café y como productora de postes vivos para cercas.

Cadima y Alvin, (1967) observaron que las plantas de cacao que se encuentran alrededor de los árboles de Erythrina fusca producían más que las que crecían distantes de los mismos. Esta diferencia en producción aparentemente está relacionada con la influencia que esta leguminosa ejerce sobre algunos factores edafológicos relacionados con la producción de cacao.

2.5.1 Propagación vegetativa

La multiplicación vegetativa de las plantas se realiza a partir de una porción de ellas, ya sea raíz, tallo u hoja. (Brown y Sommer 1982). La propagación vegetativa es fundamentalmente utilizada en la conservación o reproducción de plantas o clones de interés (Bonga, 1982; Kester, 1981).

Müller y Krikorian (1985), definieron un clon como un conjunto de individuos (descendencia) procedentes por multiplicación asexual de una sola planta madre.

2.6 Cultivo in vitro

El cultivo de tejidos es un término usado para describir cualquier tipo de cultivo aséptico de protoplastos, células, tejidos u órganos, mantenido por más de 24 horas in vitro (Müller y Krikorian, 1985). La aplicación del cultivo de tejidos está basada en la característica de totipotencialidad que presenta la

célula vegetal y que la distingue de la célula animal (Krikorian y Berquam, 1969). Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden ser usadas en: (1) micropropagación, (2) obtención de plantas libres de virus y otros patógenos (3) conservación de germoplasma y (4) mejoramiento genético; (Villalobos y Thorpe, 1984).

2.6.1 Micropropagación

Entre los métodos de micropropagación está la multiplicación por meristemas laterales, la cual consiste en estimular el desarrollo de las yemas localizadas en las axilas de las hojas (que generalmente están inhibidas por la dominancia apical). Por este sistema el número de plantas obtenidas está determinado por el número de yemas axilares preexistentes en el explante. Presenta la ventaja de que los individuos multiplicados muestran mayor estabilidad genética, que los obtenidos mediante otros métodos facilitando la rápida multiplicación clonal de genotipos seleccionados. (Villalobos y Thorpe, 1984).

En el caso de especies arbóreas las técnicas de micropropagación han mostrado ser una importante alternativa para solucionar problemas de multiplicación y clonación, como son:

1. El número de plantas derivadas por genotipo puede ser incrementado aceleradamente (Beelen; Locy, 1984).
2. Se reduce el tiempo de multiplicación (Beelen; Locy, 1984; Villalobos y Thorpe, 1984).
3. Es factible multiplicar grandes cantidades en reducida superficie a bajos costos y por tiempo económicamente favorable (George y Sherrington, 1984; Villalobos *et al.*, 1983).

4. En las plantas propagadas hay un mayor control sobre la sanidad del material (Locy, 1984).
5. El material puede transportarse in vitro de un país a otro con menos restricciones aduanales (Villalobos y Thorpe, 1984).

No obstante para establecer el cultivo in vitro es necesario definir procedimientos que garanticen la limpieza de microorganismos del explante. A veces este paso presenta serias dificultades, y consecuentemente hay poco éxito en la micropropagación (Skirvin, 1981).

2.7 Problemas en el establecimiento aséptico de los explantes

Las plantas que crecen en el medio ambiente poseen en su superficie abundantes microorganismos, especialmente bacterias y hongos, que impiden el crecimiento y desarrollo de explantes in vitro. Por tanto, deben ser eliminados por medio de una desinfección superficial antes de que el tejido u órgano sea empleado como explante. El agente desinfectante más adecuado, así como su concentración y el tiempo de desinfección debe ser determinado experimentalmente para el material vegetativo con el que se trabaja (Hurtado y Merino, 1987).

En general se puede indicar que comúnmente se usan soluciones de hipoclorito de calcio o de sodio, pero se recomienda emplear unas gotas de algún detergente líquido, como por ejemplo "Tween 20" (Polyoxyethylene sorbitan Monolaurate), como surfactante. Los residuos de los agentes desinfectantes son posteriormente eliminados por medio de varios lavados con agua estéril (Biondi y Thorpe, 1982).

2.7.1 Contaminación bacterial

Aunque la mayoría de los microorganismos se encuentran en la superficie de los órganos vegetales existen evidencias de la presencia de algunos de ellos en la parte interna de las plantas (Hurtado y Merino, 1987). Así, se ha informado que existe una bacteria en los espacios intercelulares de las hojas de petunia (Petunia sp), lo cual trae como consecuencia una serie de problemas durante el cultivo, pues no puede ser eliminada por la desinfección superficial del tejido (Hurtado y Merino, 1987). Otro ejemplo, es la presencia de una bacteria sistémica encontrada en yemas axilares de vainilla (Vanilla planifolia) (Hurtado y Merino, 1987). Sin embargo, en este caso su presencia en el medio de cultivo puede controlarse con la adición de antibióticos. En este sentido, los antibióticos usados en medios de cultivos deben ser solubles en el medio, estables a la luz, compatibles con las sustancias del medio, no ser afectados a cambios de pH, sistémicos (Falkiner, 1990). Además deben tener un amplio espectro de actividad y no deben tener efectos secundarios. (Pollock, et al, 1982).

Los antibióticos menos tóxicos son los betalactams: ampicilina, carbenicilina y las cefalosporinas que pueden utilizarse para proporcionar un amplio espectro de control de la actividad bacteriana sin toxicidad significativa para las células de las plantas (Pollock, et al 1982).

2.7.2 Contaminación fungica

Los explantes usualmente presentan también infecciones provocadas por hongos superficiales y sistémicos que invaden y matan los tejidos (George y Sherrington, 1984). Para controlar estas infecciones se le realizan a los explantes tratamientos fúngidas previo cultivo in vitro o

mediante su adición al medio. Al igual que para el uso de los antibióticos cualquier agente fúngica que se utilice, no debe ser tóxico a los explantes y debe tener un amplio espectro de actividad (Shields, et al., 1984).

El Benlate es uno de los fungicidas más utilizados. Shields et al., (1984), afirmaron que el benlate es un fungicida que es tomado y translocado por células y órganos de la planta.

Además del efecto fungicida el benlate ha mostrado tener efecto similar a las citocininas, en callo de soya y citoledón de rábano. También causó, el crecimiento de tallo y raíz de espárragos (Asparragus officinalis). Estos hechos hacen que el benomyl sea efectivo para cultivo de tejidos. No obstante se reporta que causó efecto deletorio en ápices de Cymbidium y Colocasia esculenta. (Brown et al., 1982)

2.7.3 Utilización de variaciones de pH para controlar bacterias

Los medios de cultivo, se ajustan generalmente a un pH de 5.7 antes de su esterilización en la autoclave. Murashige y Skoog (1962), informaron que este valor es adecuado para mantener a todas las sales en forma soluble, con niveles altos y bajos de fosfato suficientes para permitir su movilidad, un rápido crecimiento y la diferenciación de los tejidos.

Hay variación de pH después de la esterilización, los cuales han sido evaluados por varios autores. Behagel (1971) consideró que estos cambios son debido a las muchas reacciones químicas como precipitación de ácidos, hidrólisis de proteínas, polisacáridos y ésteres, reacciones entre grupos carboxilos y aminos, polimerización de alcoholes y aldehidos. Singha (1982)

reportó un decrecimiento de 0,7 unidades en el pH después de la esterilización del medio.

También se conoce que el pH del medio puede ser un factor limitante para el crecimiento de patógenos (Crecimiento y reproducción de los fitopatógenos, 1986).

Hay variación en la severidad del ataque, entre muchas bacterias y hongos patógenos relacionados con el efecto de las distintas concentraciones del ion hidrógeno. El grado de variación para muchos de ellos, varía entre valores de pH de 3 y hasta pH 8, con un valor óptimo que varía considerablemente con la especie, variedad y biotipo del patógeno y la composición del medio (Cultivo de microorganismos, 1970).

2.8 Reguladores de crecimiento

El crecimiento en las plantas es un proceso dinámico, complejo y está rigurosamente controlado, en el que los reguladores del crecimiento vegetal, juegan un papel importante en el control del crecimiento, no únicamente dentro de las plantas como un universo, sino también a nivel de órgano, tejido y célula. Bidwell (1979), definió regulador de crecimiento a aquel compuesto orgánico distintos de los nutrimentos, que en pequeña cantidad estimula, inhibe o modifica de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas.

Actualmente se reconocen cinco tipos básicos de reguladores del crecimiento dividido en tres grupos principales. (Leopold y Kriedemann, 1975).

- a. Promotores del crecimiento: auxinas, citocininas y giberelinas.
- b. Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico.
- c. Etileno: maduración de frutos, abscisión prematura de las hojas, y otros fenómenos como inducción de floración.

2.8.1 Auxinas

El nombre auxina fue dado a la sustancia reguladora del crecimiento producida por el ápice del coleóptilo de avena (Wareing y Phillips, 1973).

El ácido indol acético (AIA) parece ser la auxina principal de las plantas superiores. De forma natural, las concentraciones más altas de auxinas se encuentran en los ápices de crecimiento (ápice del coleoptilo, yema y ápices de crecimiento de las hojas). Sin embargo, también se encuentran auxinas ampliamente distribuidas por toda la planta, sin duda provenientes de las regiones meristemáticas (Devlin, 1980).

Las auxinas participan ampliamente en la organización de los procesos vegetales, incluyendo la regulación de las proporciones del crecimiento diferencial y la regulación de fenómenos de diferenciación, los cuales son estimulados o inhibidos según la concentración auxínica presente en la célula o estructura vegetal. (Hurtado y Merino, 1987).

Hay una gran cantidad de datos sobre los efectos auxínicos en las plantas, siendo los principales aquellos que afectan el alargamiento y división celular (Beelen), la formación de brotes, raíces, tejido calloso, respiración, abscisión, partenocarpia, dominancia apical y embriogénesis. (Regulating, Growth and development, 1976).

Las auxinas más empleadas en cultivo de tejidos son el ácido indolacético (ANA), que es foto y termosensible y el ácido indolbutírico (AIB). Se utilizan en un rango de 0.1-10 mg/l; el ácido naftalenocético (AIA), y el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético que es efectivo en inducir callos, se utilizan en un rango de 0.001-10 mg/l (López; Beelen; Zaerry y Mapes, 1982).

2.8.2 Citocininas

Son sustancias químicas que promueven la división celular o citocinesis y organización de callos (Cytokins, 1975).

La utilización de las citocininas en cultivo de tejidos es para superar la dominancia apical permitiéndose así la proliferación de yemas axilares (Beelen; Georges y Sherrington, 1984; Zaery, Mapes, 1982, Nauery, Boswell, 1981). Se ha encontrado que en niveles altos agregados al medio causan la proliferación de yemas e inhiben el enraizamiento. (Zaery, Mapes, 1982).

Dentro de los reguladores del crecimiento tipo citocininas, uno de los más empleados es la benciladenina (BA). Esta, ha mostrado ser efectiva para estimular la brotación axilar y adventicia en un gran número de especies, cítricos, manzanos y ornamentales, son ejemplos. La cinétina y la zeatina son también citocininas que presentan características similares a la benciladenina. No obstante en el cultivo de tejidos de plantas su utilización es más restringida.

2.9 Cultivo de tejidos en especies forestales

Rao y Lee (1982) mencionaron que entre más joven sea la parte seleccionada de un árbol, mejor será su crecimiento al cultivarse in vitro. Biondi y Thorpe (1982) concluyeron que los tejidos y órganos provenientes de árboles adultos, tienen un potencial morfogénico limitado. Por esta razón en la mayoría de las investigaciones realizadas se ha trabajado con material germinado asépticamente. Sin embargo, otras investigaciones realizadas con leguminosas arbóreas usando directamente material de campo, muestran la factibilidad que existe de propagar y clonar árboles a partir de esta fuente de material.

Dhawan y Bhojwani (1985) establecieron un método de multiplicación in vitro para Leucaena leucocephala a partir de nudos cotiledonares de plántulas germinadas asépticamente, así como de nudos tomados de árboles adultos. Estos se inocularon en un medio basal (Murashige y Skoog) con una concentración de BA de 0.68 mg.l^{-1} y fueron incubados a una temperatura de 30°C , obteniendo así la formación de brotes múltiples. Estos autores lograron también la formación de raíces al transferir los brotes a un medio Murashige y Skoog que contenía AIA a una concentración de $0,88 \text{ mg.l}^{-1}$.

En árboles élités de Tamarindus indica se tomaron segmentos de nudos, se desinfectaron superficialmente y se inocularon en un medio basal MS + Kin (0,2) + BA (0,5) + Cal.Pant. 0.17 Biot (0.1) mg.l^{-1} . Con este medio se obtuvo la formación y multiplicación de brotes. Luego el enraizamiento se logró con una alta concentración de auxina en un medio W + BA (2.0) + AIB (2.0) + AIA (2.0) + ANA (2.0) mg.l^{-1} esto por 72 horas. Después, los brotes fueron transferidos a un medio MS fresco a la mitad de su concentración con auxina + 0.25 % de Carbón activado para el elongamiento de las raíces. (Mascarenas et al., 1982).

Mukhopadhyay y Bhojwani (1986) usaron nudos provenientes de árboles adultos de Dalbergia sissoo para iniciar su multiplicación clonal. Los nudos utilizados diferenciaron yemas axilares en un medio B5 + BA 0.22 mg.l^{-1} . Luego enraizaron con un 100% de éxito en un medio MS que contenía 0.2 mg.l^{-1} . AIB.

A partir de trozos de hojas y entrenudos tomados de árboles de Dalbergia latifolia inoculados en un medio MS que contenía auxinas y citocininas Rao et al. (1985), obtuvieron la formación de callos compactos, los cuales desarrollaron brotes cuando se transfirieron a un medio MS que

contenía 3 mg/l^{-1} de ANA y 1 mg/l^{-1} de BA. Se probaron varias concentraciones en los subcultivos siendo la más efectiva para su multiplicación BA 5 mg/l^{-1} y ANA 0.5 mg/l^{-1} .

Datta et al, (1983), obtuvieron múltiples brotes a partir del cultivo de nudos tomados de árboles de 30 años de edad de Dalbergia sissoo cuando fueron inoculados en un medio MS + Kn o BA (1 mg/l^{-1}). Estos fueron enraizados en un 100% cuando se transfirieron a un MS que contenía AIA (0.5 mg/l^{-1} + Kn 1.0 mg/l^{-1}).

Ravishamkar y Jagadish (1988) regeneraron plantas de Dalbergia latifolia a partir de callo de ápices y segmentos de tallo tomados de árboles de 50 años de edad, esto lo lograron cuando los callos fueron transferidos a un medio MS suplementado con 1 mg/l de ANA y 5 mg/l de BA. El enraizamiento de los brotes lo lograron transfiriendo éstos a un medio de White líquido, suplementado con AIA, AIB y ANA (1 mg/l) de cada uno por 48 horas, luego los transfirieron a un MS líquido a la mitad de su concentración y sin reguladores de crecimiento, formando éstos raíces a los 25 y 30 días.

A partir de nudos tomados de árboles de Prossopis juliflora inoculados en un medio MS que contenía la mitad de su concentración y suplementado con $0.5 \text{ }\mu\text{M}$ de BA con y sin $1 \text{ }\mu\text{M}$ de AIA, (Wainwright y England, 1985) obtuvieron a los 23 días brotes en ambos medios. Estos autores concluyeron que para la iniciación de los brotes no era necesaria la auxina y que la presencia de esta disminuía el tamaño de los brotes y provocaba la formación de callo alrededor del explante.

Actualmente hay muchos ejemplos de las aplicaciones de la Biotecnología en plantas (David, 1982). Muchas especies herbáceas, arbóreas

y otras han sido propagadas con éxito, no obstante en el caso específico del género Erythrina, muy poca investigación se ha llevado a cabo.

En Costa Rica por ejemplo, Berríos (1986) realizó un estudio con el propósito de obtener la propagación clonal in vitro de diferentes especies de poró. Este autor utilizó como explantes ápices y nudos cotiledonares, provenientes de semillas germinadas asépticamente. Para la fase de establecimiento usó el medio básico MS con BA y AIB. En el cultivo de ápices obtuvo únicamente diferenciación de raíces. El desarrollo de yemas cotiledonares sólo ocurrió con las especies E. berteriana en un medio MS más la adición de 2 o 4 mg.l^{-1} de BA y en E. costarricensis con un medio similar más 1 mg.l^{-1} de AIB y 8 mg.l^{-1} de BA. Berríos (1986) no investigó el establecimiento de la micropropagación a partir de microestacas.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización del estudio

La investigación se realizó en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica, en la Unidad de Biotecnología.

3.2 Material experimental

Del Huerto Latinoamericano de Arboles Fijadores de Nitrógeno (CATIE), se tomaron estacas de Erythrina fusca y Erythrina poeppigiana poco lignificadas de 10 a 12 cm de longitud, las cuales provenían de árboles, que por tener características de interés agroforestal como son: fuste erecto, rápido crecimiento, abundante producción de biomasa, y fácil adaptabilidad a diversas zonas, fueron clonados por medio de acodos; identificándose éstos como clon 2660 para Erythrina poeppigiana y clon 2449 para Erythrina fusca.

3.3 Manejo y desinfección inicial de los explantes

En el laboratorio las estacas se recortaron en dimensiones de 2 a 3 cm de longitud, se lavaron con agua y detergente. Posteriormente la realización de varias pruebas preliminares de limpieza superficial evidenciaron problemas de contaminación en los explantes. Fue necesario entonces diseñar otros experimentos. Para tal efecto, se trabajó con varias concentraciones de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e hipoclorito de calcio (CaOCl_2), además benlate (Benomyl) y antibióticos (ampicilina y tetraciclina) correspondientes a varios tratamientos.

Asimismo, se efectuaron evaluaciones del efecto de variaciones en el pH del medio de cultivo con respecto a la presencia de contaminantes de tipo bacterial.

3.3.1 Desinfección con etanol

Los explantes se sumergieron en etanol al 70% durante 30 segundos, 1, 5 y 10 minutos.

3.3.2 Desinfección con hipoclorito de Calcio

El hipoclorito de Calcio se usó al 8 y 10% durante 10, 15 y 20 minutos. Se experimentó usando una bomba al vacío y sin la utilización de ésta (Cuadros 1 y 2).

Cuadro 1. Tipo de desinfectante, concentración y tratamientos con respecto al tiempo para la desinfección de estacas de Erythrina fusca y Erythrina poeppigiana.

Desinfectante	Concentración	Tiempo en minutos
Hipoclorito de Calcio	10%	15-20
Hipoclorito de Calcio	8%	10-15

Cuadro 2. Tratamientos de desinfección con diferentes concentraciones de hipoclorito de calcio y tiempos de inmersión con y sin el uso de una bomba al vacío.

Tratamiento	Desinfectante	Concentración en %	Tiempo en minutos	
			Vacío	Sin vacío
1	Hipoclorito de Calcio	8%		15
		10	20	
2	Hipoclorito de Calcio	8%		10
		10	15	
3	Hipoclorito de Calcio	8%		15
		10%	10	
4	Hipoclorito de Calcio	8%		20
		10%		25
5	Hipoclorito de Calcio	10%		15
				20
6	Hipoclorito de Calcio	8%		10
		10%		15

3.3.3 Desinfección con benlate

El benlate se utilizó para realizar desinfección superficial de los explantes y también se adicionó al medio de cultivo. Cuando se trataron superficialmente los explantes se usó una concentración de 2 g/l durante 30 minutos, cuando se adicionó al medio de cultivo se trabajó con concentraciones de 1 a 2 g/l (Cuadro 3).

Cuadro 3. Uso de tetraciclina y ampicilina en combinación con tratamientos de Benlate adicionado al medio de cultivo.

Tipo de Antibiótico	Cantidad mg/l	Benlate Cantidad g/l
Ampicilina	100	1
	300	2
Tetraciclina	100	1
	300	2

3.3.4 Uso de antibióticos

Cuando no se usó en combinación con benlate el antibiótico evaluado fue ampicilina en concentraciones de 25, 50, 75, 100 mg/l. Para esto se utilizaron cápsulas que contenían de 200 a 500 mg del producto. Se tomó la cantidad requerida y por cada 100 mg de antibiótico se adicionó un mililitro de agua, y se colocó esta solución en agitación continua. Luego, se esterilizó la

solución mediante un filtro miliporo de 0.22 μm antes de agregarlo al medio de cultivo correspondiente.

3.3.5 Efecto del pH

Con la finalidad de determinar el posible efecto positivo de la variación del pH sobre la contaminación, especialmente por bacterias, se prepararon medios de cultivo con valores de pH de 4.6, 5, 5.6 y 6.

3.4 Medios de cultivo

En balones aforados, se adicionó, además de las sales minerales, alícuotas de soluciones madre de los compuestos orgánicos del medio MS (Cuadro 4), reguladores de crecimiento (AIB, BA), en concentraciones de 0 a 1 mg/l y 0 a 8 mg/l respectivamente, Polivinyl Pirrolidone (PV-Sigma Chemical 360^R) y benlate. Todos los compuestos fueron mezclados con la ayuda de un agitador magnético y se aforó al volumen deseado con agua destilada. Una vez adicionados los componentes requeridos se ajustó el pH a 4,6 con NaOH, 1 N. Los medios se esterilizaron en una autoclave a una presión de 1.05 Kg cm^{-2} durante 20 minutos. Luego, cuando la temperatura de la autoclave bajó de 50°C a 40°C, se tomó el medio y se llevó a la campana de flujo laminar donde se le agregó el antibiótico. Después, el medio fue distribuido en frascos tipo gerber de 9.5 cm de largo y 5 cm de diámetro, colocando alícuotas de 40 ml en cada recipiente.

3.4.1 Inoculación del material

La inoculación de los explantes se realizó en condiciones asépticas. Las estacas se colocaron en un plato de petri estéril de 14 cm de diámetro para cortar sus extremos aparentemente dañados por el tratamiento

Cuadro 4. Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS).

COMPONENTES	CANTIDAD mg / l
<u>Macroelementos</u>	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
<u>Microelementos</u>	
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .4H ₂ O	8,6
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
<u>Compuestos orgánicos</u>	
Inositol	100
Acido nicotínico	0,5
Piridoxina-HCl	0,5
Tiamina-HCl	0,1
Glicina	2

Fuente: Physiologia Plantarum 15:473-479, 1962.

desinfectante. La manipulación se efectuó con pinzas y bisturios esterilizados. Los explantes se sembraron en frascos de cultivo que contenían alícuotas de 40 ml de medio básico semisólido de Murashige y Skoog, suplementado con 7 g/l de agar (sigma chemical) y 10 g/l de sacarosa.

3.5 Condiciones de crecimiento

Los frascos inoculados con las estacas, se colocaron en un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 16 horas a una intensidad lumínica al nivel de los cultivos de 2000 lux. La fuente de luz la proporcionaron lámparas fluorescentes del tipo G.E. Gro & Sho. La temperatura se ajustó a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.6 Evaluación

Para cada tratamiento se evaluaron las siguientes variables: contaminación por bacteria (%), contaminación fúngica (%), oxidación (%), supervivencia y brotación (%). Esta evaluación se hizo a los cinco días después de la siembra, luego se realizaron cuatro evaluaciones más con intervalos de 5 días cada uno. También se observaron minuciosamente los cultivos en el transcurso de los meses con la finalidad de detectar posible contaminación crónica. Además, se tomó el tiempo transcurrido en días para la brotación inicial de yemas axilares y el número de yemas brotadas.

3.7 Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron trabajados estadísticamente mediante pruebas de Ji Cuadrada (X^2).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Etapa I. Establecimiento de los explantes

El material vegetativo traído del campo posee en la mayoría de su superficie una abundante microflora, que debe ser eliminada por medio de procedimientos de desinfección, para cumplir así con la inoculación aséptica del explante. De acuerdo con Murashige (1977) la desinfección es la fase número uno y fundamental en cualquier metodología de micropropagación:

En esta investigación, en la mayoría de los tratamientos se observaron los problemas comunes que se presentan cuando se pretende el establecimiento inicial de los explantes, especialmente cuando el material proviene directamente del campo, debido a la presencia de contaminación fúngica y bacterial. Los procedimientos experimentales ensayados para obviar este problema se discuten a continuación:

4.2 Control de contaminación

4.2.1 Uso de hipoclorito de calcio y etanol

La Figura 1 es el resultado de 10 tratamientos de desinfección (Cuadro 5); para estacas de Erythrina poeppigiana. En esta figura se observan altos porcentajes de contaminación por hongo que oscilaron desde un 70% en el tratamiento 1 hasta un 30% en el tratamiento 10. Según la prueba de Ji-cuadrado para el control del hongo, ninguno de estos tratamientos fueron significativos en su efecto; pero si comparamos los porcentajes de contaminación para cada tratamiento se observa que a mayor tiempo de inmersión en etanol menor es la contaminación fungica.

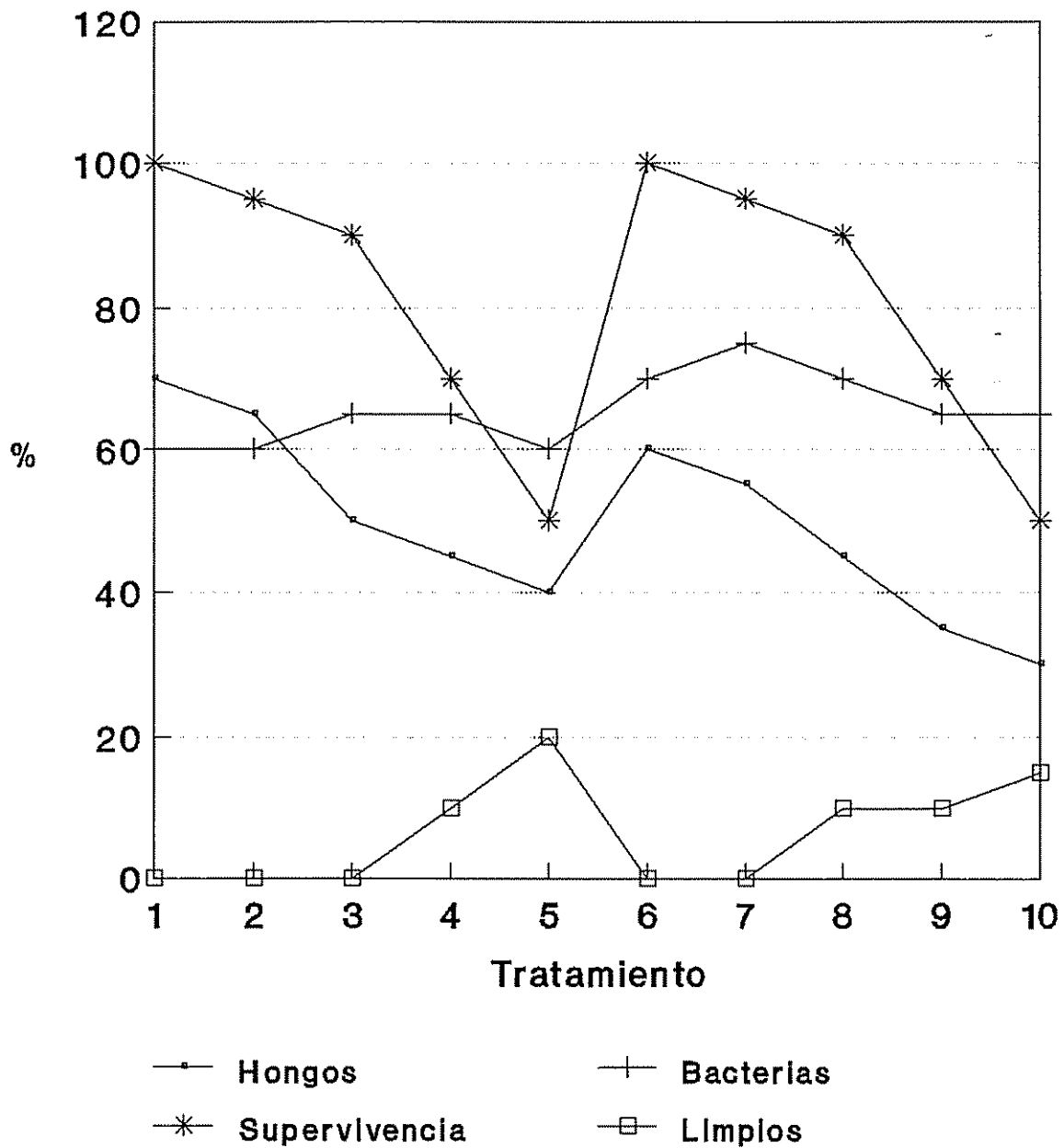


Figura 1. Efecto de 10 tratamientos de desinfección en estacas de Erythrina poeppigiana.

Cuadro 5. Supervivencia, causas y porcentajes de contaminación en estacas 2 cm de longitud de Erythrina poeppigiana después de cinco días de cultivo con relación a diferentes tratamientos de desinfección.

Tratamiento	Número de explantes inoculados	Supervivencia	% Contaminación			%de explantes limpios
			hongo	bacteria	bacteria+hongo	
1	20	100	40	30	30	0
2	20	95	40	35	25	0
3	20	90	35	50	15	0
4	20	70	25	45	20	10
5	20	50	20	40	20	20
6	20	100	30	40	30	0
7	20	95	25	45	30	0
8	20	90	20	45	25	10
9	20	70	25	55	10	10
10	20	50	20	55	10	15

- 1 Inmersión en hipoclorito de calcio al 10% por 15 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 10 minutos.
- 2 Inmersión en etanol por medio minuto + hipoclorito de calcio al 10% por 15 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 10 minutos.
- 3 Inmersión en etanol 70% por un minuto + hipoclorito de calcio al 10% por 15 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 10 minutos.
- 4 Inmersión en etanol al 70% por 5 minutos + hipoclorito de calcio al 10% por 15 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 10 minutos.
- 5 Inmersión en etanol al 70% por 10 minutos + hipoclorito de calcio al 10% por 15 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 10 minutos.
- 6 Inmersión en hipoclorito de calcio al 10% por 20 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 15 minutos.
- 7 Inmersión en etanol 70% por 1/2 minuto + hipoclorito de calcio al 10% por 20 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 15 minutos.
- 8 Inmersión en etanol 70% por 1 minuto + hipoclorito de calcio al 10% por 20 minutos + hipoclorito de calcio al 10% por 15 minutos.
- 9 Inmersión en etanol al 70% por 5 minutos + hipoclorito de calcio al 10% por 20 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 15 minutos.
- 10 Inmersión en etanol al 70% por 10 minutos + hipoclorito de calcio al 10% por 20 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 15 minutos.

Al aumentar el tiempo de desinfección con hipoclorito de calcio (tratamientos del 6 al 10) y mantener los mismos tiempos de inmersión en etanol se observa una disminución en la contaminación por hongo. (Figura 1).

No hubo diferencias marcadas en cuanto a la contaminación por bacteria en relación al tratamiento desinfectante utilizado. Así se nota que la contaminación se mantuvo de un 60 a un 75%. (Figura 1).

En cuanto a la supervivencia de los explantes la prueba de Ji-cuadrado fue significativa al 0,05% lo cual indica que hubo influencia de los tratamientos desinfectantes sobre el porcentaje de supervivencia. Así por ejemplo, se observa, que los tiempos de inmersión en etanol son posiblemente los que más detrimento causaron a los explantes, e inclusive su muerte, ya que de acuerdo con el comportamiento de la curva, para la variable supervivencia, el hipoclorito de calcio no presenta un efecto negativo sobre la sobrevivencia de las microestacas (Figura 1, Cuadro 5). El efecto detrimental del etanol se nota al comparar el tratamiento 1 con el 5 en los cuales la sobrevivencia fue del 100 al 50% respectivamente.

Los porcentajes de explantes limpios fueron de un 10 a un 20%. Observando la Figura 1 estos están relacionadas con los tiempos de inmersión en etanol.

En la Figura 2 se presentan los resultados de 10 tratamientos de desinfección (ver Cuadro 6) pero para estacas de Erythrina fusca. Se observa que el rango de contaminación por hongo fue de un 15 a un 60%. De acuerdo con el análisis de Ji-cuadrado hubo influencia significativa de los 10 tratamientos desinfectantes con relación a la contaminación por hongo. Estos resultados difieren de los encontrados para Erythrina poeppigiana pero al igual que en la Figura 1 se observa que al aumentar el tiempo de inmersión en etanol se reduce la contaminación fungica. Al aumentar el tiempo en la

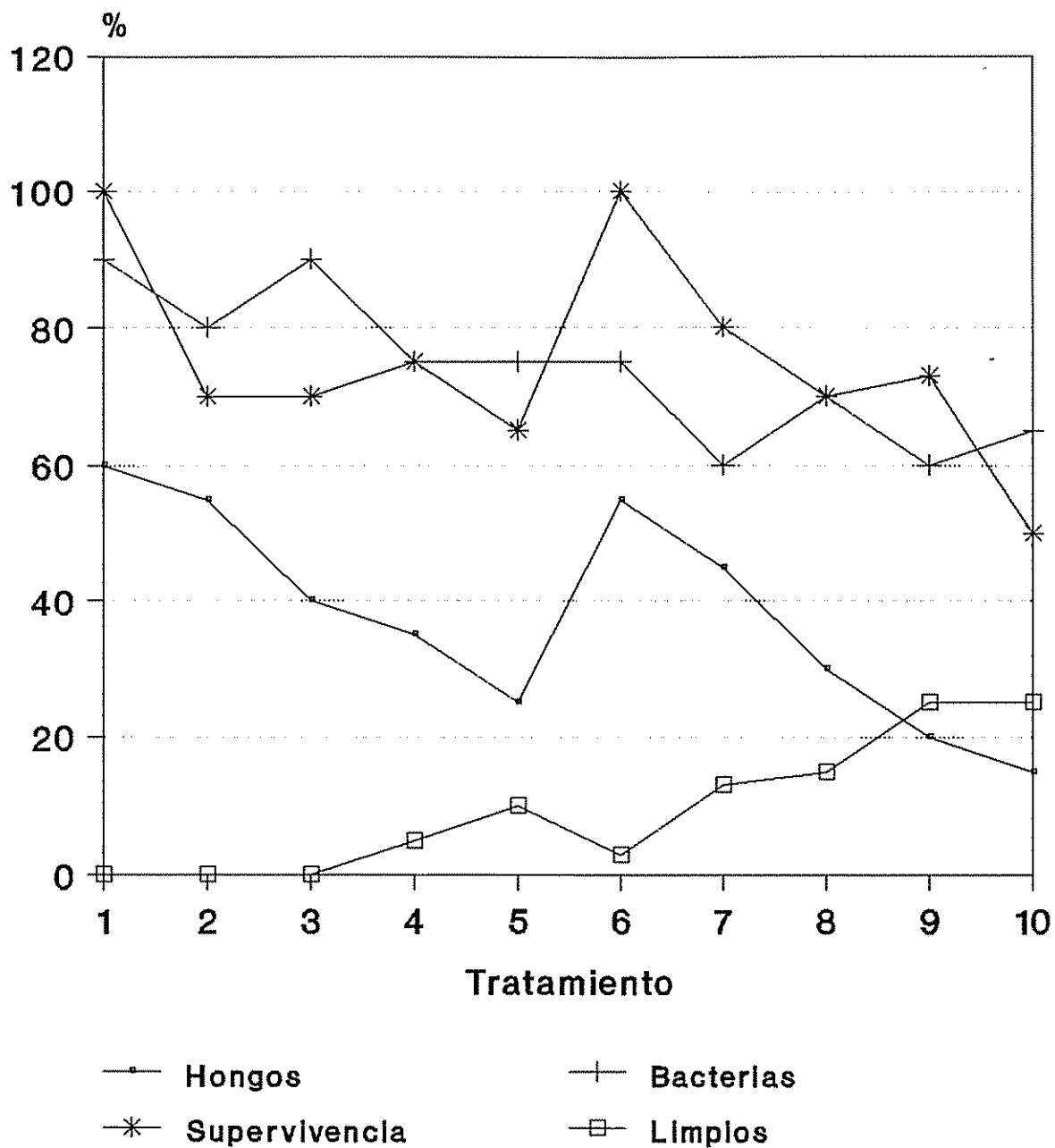


Figura 2. Efecto de 10 tratamientos de desinfección en estacas de Erythrina fusca

Cuadro 6. Supervivencia, causas y porcentajes de contaminación en estacas de 2 cm de longitud Erythrina fusca después de cinco días de cultivo con relación a diferentes tratamientos de desinfección.

Tratamiento	Número Explantos	Supervivencia %	% Contaminación			% explantes. limpios
			----- hongo	bacteria	bacteria +hongo	
1	20	100	10	40	50	0
2	20	70	20	45	35	0
3	20	70	15	60	25	0
4	20	75	20	60	15	5
5	20	65	15	65	10	10
6	20	100	20	40	35	3
7	20	80	15	32	30	13
8	20	70	15	55	15	15
9	20	73	15	55	5	25
10	20	50	5	55	10	25

- 1 Inmersión en hipoclorito de calcio al 10% por 15 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 10 minutos.
- 2 Inmersión en etanol por medio minuto + hipoclorito de calcio al 10% por 15 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 10 minutos.
- 3 Inmersión en etanol 70% por un minuto + hipoclorito de calcio al 10% por 15 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 10 minutos.
- 4 Inmersión en etanol al 70% por 5 minutos + hipoclorito de calcio al 10% por 15 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 10 minutos.
- 5 Inmersión en etanol al 70% por 10 minutos + hipoclorito de calcio al 10% por 15 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 10 minutos.
- 6 Inmersión en hipoclorito de calcio al 10% por 20 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 15 minutos.
- 7 Inmersión en etanol 70% por 1/2 minuto + hipoclorito de calcio al 10% por 20 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 15 minutos.
- 8 Inmersión en etanol 70% por 1 minuto + hipoclorito de calcio al 10% por 20 minutos + hipoclorito de calcio al 10% por 15 minutos.
- 9 Inmersión en etanol al 70% por 5 minutos + hipoclorito de calcio al 10% por 20 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 15 minutos.
- 10 Inmersión en etanol al 70% por 10 minutos + hipoclorito de calcio al 10% por 20 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 15 minutos.

desinfección con hipoclorito de calcio disminuye la contaminación por hongo. Al igual que en Erythrina poeppigiana la supervivencia se ve afectada por los tiempos de inmersión en etanol no así por los tratamientos con hipoclorito de calcio. La contaminación por bacteria fue de un 60 a un 90%. En los tratamientos 2 y 7 (Figura 2) se notó una disminución en la aparición de bacterias en los cultivos, lo cual sugiere que el hipoclorito de calcio es un agente desinfectante adecuado para limitar este problema. Sin embargo este efecto no fue tan notorio para la limpieza de bacterias en Erythrina poeppigiana.

Los resultados anteriores concuerdan con la utilidad del etanol para desinfectar tejidos vegetales. (Aseptic Techniques, 1984). Así como el uso del hipoclorito de calcio por otros autores (Berthouly y Guzmán, 1985).

Algunos trabajos han demostrado que la proporción de cultivos libres de contaminantes puede ser incrementado por inmersión del tejido en alcohol de un 45 a 50 por ciento en tratamientos de 3 a 5 minutos. (George y Sherrington, 1984)

Así por ejemplo, tratamientos de inmersión en etanol fueron efectivos para desinfectar yemas latentes de melocotón (Prunus persica) previo cultivo in vitro. Las yemas de melocotón necesitaron para estar libres de microorganismos de un procedimiento complejo de desinfección que se inició con inmersión en etanol 70% durante cinco minutos (George y Sherrington, 1984).

En esta investigación se observó que para Erythrina fusca y Erythrina poeppigiana, cinco minutos en inmersión en etanol, también fueron efectivos ya que, disminuyó la contaminación por hongo en un 15 a 35% respectivamente (Figuras 1 y 2, tratamiento 9). Asimismo, con este

tratamiento se lograron bajos porcentajes de mortalidad de explantes (Figuras 1 y 2, tratamiento 9).

El principio desinfectante del alcohol se fundamenta en que elimina o disuelve las grasas superficiales que están en el material vegetal (Hurtado y Merino, 1987), permitiendo así, una mejor penetración del agente desinfectante secundario, en caso de que se utilice. No obstante, hay que tener cuidado en su utilización ya que a mayor tiempo de inmersión puede ocurrir un aumento de mortalidad en los explantes como ocurrió en este experimento (Figuras 1 y 2).

En cuanto a los porcentajes de limpieza, en la Figura 2 se observa que fueron de 15 a 25%, al igual que en la Figura 1, están relacionados con los tiempos de inmersión en etanol.

4.2.2 Utilización de hipoclorito de Ca y uso de bomba al vacío

Si bien es cierto el porcentaje de explantes limpios tanto para Erythrina poeppigiana como Erythrina fusca no superan el 25%, con ellos se podría establecer la posterior multiplicación, sin embargo, otros procedimientos de desinfección fueron establecidos con la finalidad de superar estas cifras.

En cuanto al uso adicional de una bomba al vacío para el tratamiento de los explantes con hipoclorito de Calcio se observó en las Figuras 3 y 4 que cuando se usó por 15 y 20 minutos (Tratamientos 1 y 2) hubo un 100% de mortalidad de los explantes, pero a la vez se observó una baja contaminación fungica siendo esta altamente significativa para Erythrina fusca según prueba Ji-cuadrada. La bomba al vacío actúa sacando el aire de los tejidos del explante, dando lugar a que el desinfectante penetre más internamente en los tejidos, haciendo más efectiva la acción de los agentes desinfectantes. Sin

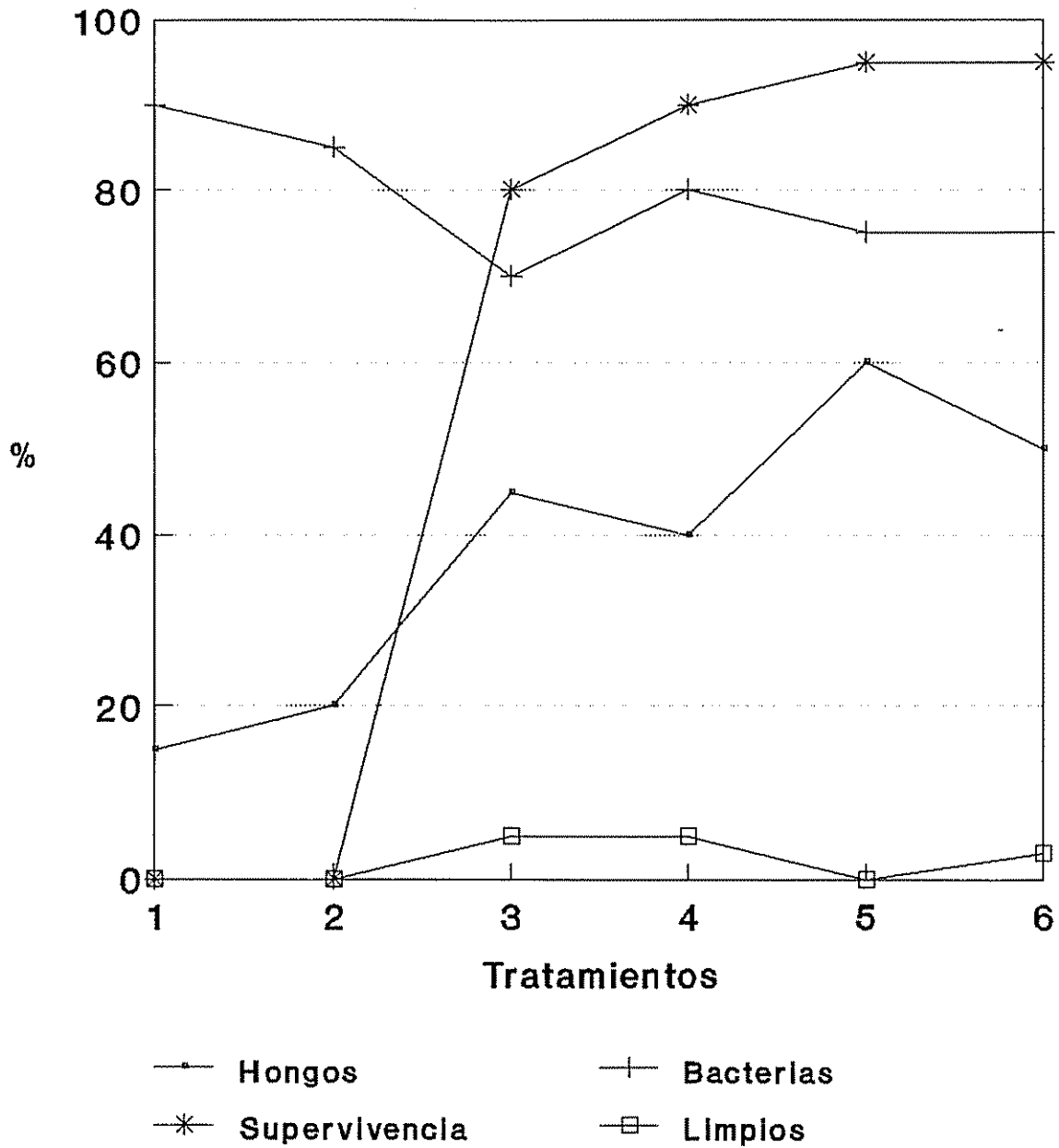


Figura 3. Efecto de 6 tratamientos de desinfección en estacas de Erythrina fusca

Cuadro 7. Supervivencia (%) y causas de contaminación después de cinco días de cultivo en estacas de 2 cm de longitud Erythrina fusca en relación con tratamientos de diferentes concentraciones de hipoclorito de calcio y tiempos de inmersión con y sin el uso de una bomba al vacío.

Tratamiento	Número Explantos inoculados	Supervivencia %	% Contaminación			% explantes. limpios
			hongo	bacteria	bacteria + hongo	
1	20	0	10	85	5	0
2	20	0	15	80	5	0
3	20	80	25	50	20	5
4	20	90	15	55	22	5
5	20	95	25	40	35	0
6	20	95	20	47	30	3

- 1 Inmersión en hipoclorito de calcio al 10% por 20 minutos al vacío + hipoclorito de calcio al 8% por 10 minutos.
- 2 Inmersión en hipoclorito de calcio al 10% por 15 minutos al vacío + hipoclorito de calcio al 8% por 15 minutos.
- 3 Inmersión en hipoclorito de calcio al 10% por 10 minutos al vacío + hipoclorito de calcio al 8% por 15 minutos.
- 4 Inmersión en hipoclorito de calcio al 10% por 25 minutos + hipoclorito al 8% por 20 minutos.
- 5 Inmersión en hipoclorito de calcio al 10 % por 15 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 10 minutos.
- 6 Inmersión en hipoclorito de calcio al 10% por 20 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 15 minutos.

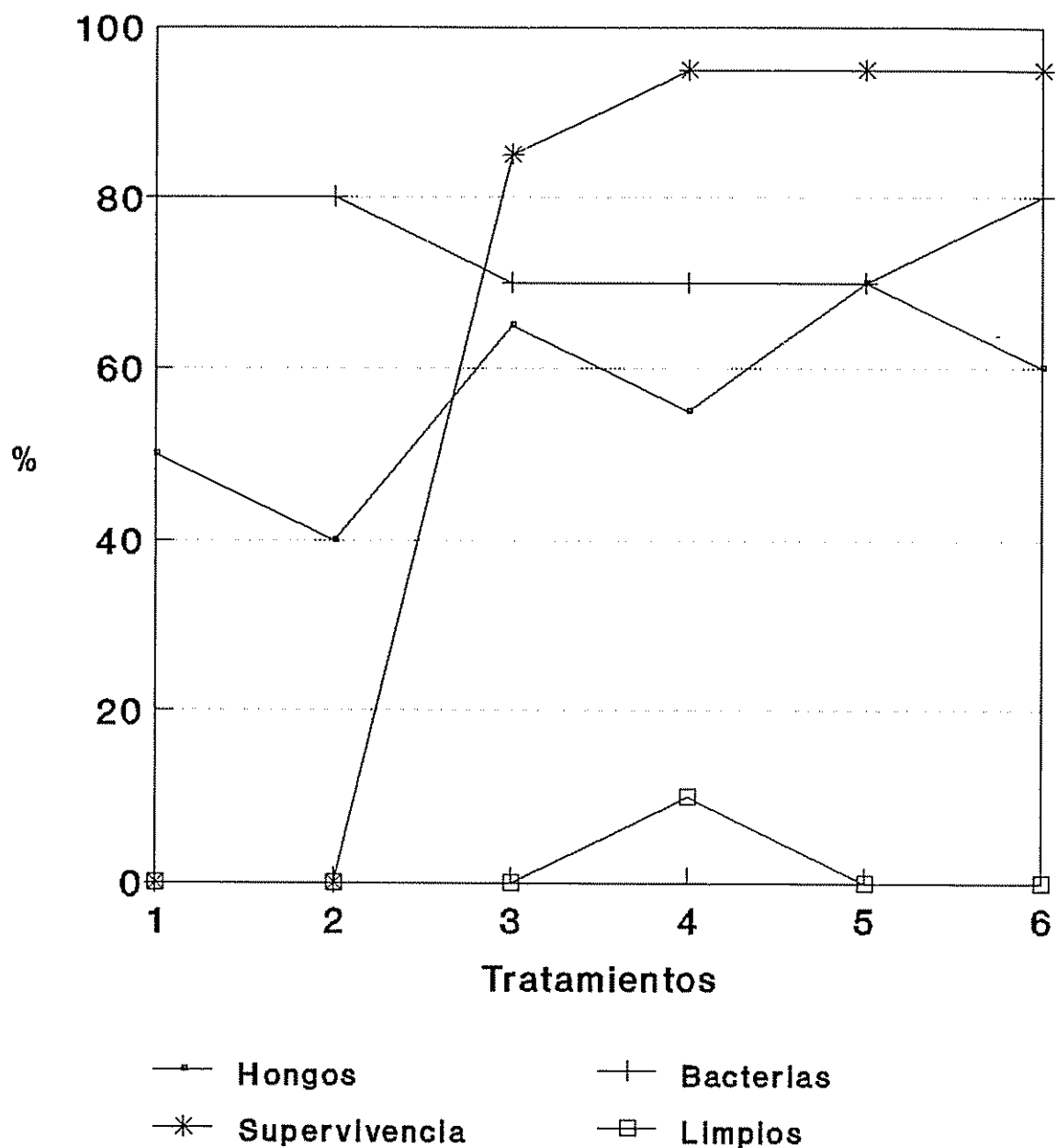


Figura 4. Efecto de 6 tratamientos de desinfección en estacas de Erythrina poeppigiana

Cuadro 8. Supervivencia (%) y causas de contaminación en estacas de 2 cm de longitud *Erythrina poeppigiana* después de cinco días de cultivo, con relación a tratamientos diferentes de hipoclorito de calcio y tiempos de inmersión con y sin el uso de bomba al vacío.

Tratamiento	Número Explantos inoculados	Supervivencia %	Contaminación			% explantes limpios
			----- hongo	bacteria	bacteria +hongo	
1	20	0	20	50	30	0
2	20	0	20	60	20	0
3	20	85	25	40	35	0
4	20	95	20	40	33	0
5	20	95	30	30	40	0
6	20	95	20	40	40	0

- 1 Inmersión en hipoclorito de calcio al 10% por 20 minutos al vacío + hipoclorito de calcio al 8% por 10 minutos.
- 2 Inmersión en hipoclorito de calcio al 10% por 15 minutos al vacío + hipoclorito de calcio al 8% por 15 minutos.
- 3 Inmersión en hipoclorito de calcio al 10% por 10 minutos al vacío + hipoclorito de calcio al 8% por 15 minutos.
- 4 Inmersión en hipoclorito de calcio al 10% por 25 minutos + hipoclorito al 8% por 20 minutos.
- 5 Inmersión en hipoclorito de calcio al 10 % por 15 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 10 minutos.
- 6 Inmersión en hipoclorito de calcio al 10% por 20 minutos + hipoclorito de calcio al 8% por 15 minutos.

embargo, algunos autores (Berthouly y Guzmán, 1985) opinan que esta mayor penetración, también puede maltratar a los tejidos y dependiendo del tiempo de inmersión y del material vegetal con que se esté trabajando, puede ser causa de muerte como ocurrió en este trabajo.

Al no utilizar la bomba al vacío pero al aumentar el tiempo de inmersión de los explantes en hipoclorito de calcio, Figuras 3 y 4 (tratamientos 4, 5 y 6) el porcentaje de supervivencia aumentó. No obstante también aumentaron los porcentajes de contaminación por hongo siendo estos de un 45 a 60 % para Erythrina fusca y de un 55 a un 70% para Erythrina poeppigiana. (Figuras 3 y 4).

La contaminación por bacteria se mantuvo entre un 75% a 90% para Erythrina fusca y un 73 a un 80% para Erythrina poeppigiana. En estos tratamientos se comprobó una vez más, lo efectivo que es el etanol para desinfectar material vegetal, (Figura 1 y 2) ya que al no utilizarlo en estas pruebas, se nota un considerable aumento de contaminación tanto por hongo como por bacteria.

4.2.3 Efecto de antibiótico en el medio de cultivo sobre el desarrollo de bacterias

Uno de los problemas más severos fue la presencia de bacterias, las cuales fueron más limitantes para establecimiento aséptico que la presencia de hongos. Por lo que se recurrió al uso de antibióticos y así un contrarrestar el poco efecto positivo de los tratamientos anteriormente descritos. Las bacterias se desarrollan rápidamente en el medio como saprófitos (Cultivo de microorganismos, 1970). Las exigencias de nutrimentos de las bacterias son en esencia las mismas que las de las plantas verdes ya que al igual que estas requieren macroelementos, microelementos y vitaminas

para desarrollarse y reproducirse, por tal razón, compiten con el explante en el medio de cultivo. (Crecimiento y reproducción de los fitopatógenos, 1968). Producen metabolitos fitotóxicos como ácido láctico y metabolitos bacteriales como ácidos orgánicos que reducen el crecimiento de los explantes y pueden causar hasta la muerte (Falkiner, 1990)

Con el objetivo de evaluar el efecto del antibiótico en el medio de cultivo se realizaron pruebas con cuatro concentraciones diferentes de ampicilina. Así los resultados fueron bastante notables tanto para, Erythrina fusca como para Erythrina poeppigiana donde se obtuvo disminución de la contaminación a medida que la concentración de antibiótico aumentó. (Figura 5 y 6).

Para Erythrina fusca la contaminación por bacteria en el tratamiento testigo fue de 75%. Luego este porcentaje disminuyó a 60, 50, 40, y 30% con respecto a concentraciones de antibiotico de 25, 50, 75 y 100 mg/l respectivamente (Figura 6). Respecto a Erythrina poeppigiana la contaminación por bacteria en el tratamiento testigo fue 75%, luego disminuyó a 55, 50, 40, y 30% con respecto a concentraciones de antibiótico de 25, 50, 75 y 100 mg/l, respectivamente. (Figura 5).

Estos resultados confirman que la actividad de la ampicilina, depende de la concentración a que se utilice y de la cantidad y tipo de inóculo que presente el material. A pesar de ser un antibiótico de amplio espectro, hay que tener presente que el material con el que se está trabajando proviene directamente del campo, el cual contiene gran variedad de bacterias de las cuales algunas son resistentes a la actividad de la ampicilina, ya que la ampicilina es muy activa para las bacterias Gram (+) pero menos efectiva para los organismos Gram (-) (Pollock, et al., 1982) por lo que siempre se tuvo aparición de bacterias que posiblemente son de naturaleza endógena. Es factible considerar que los tratamientos donde la contaminación fue mayor al

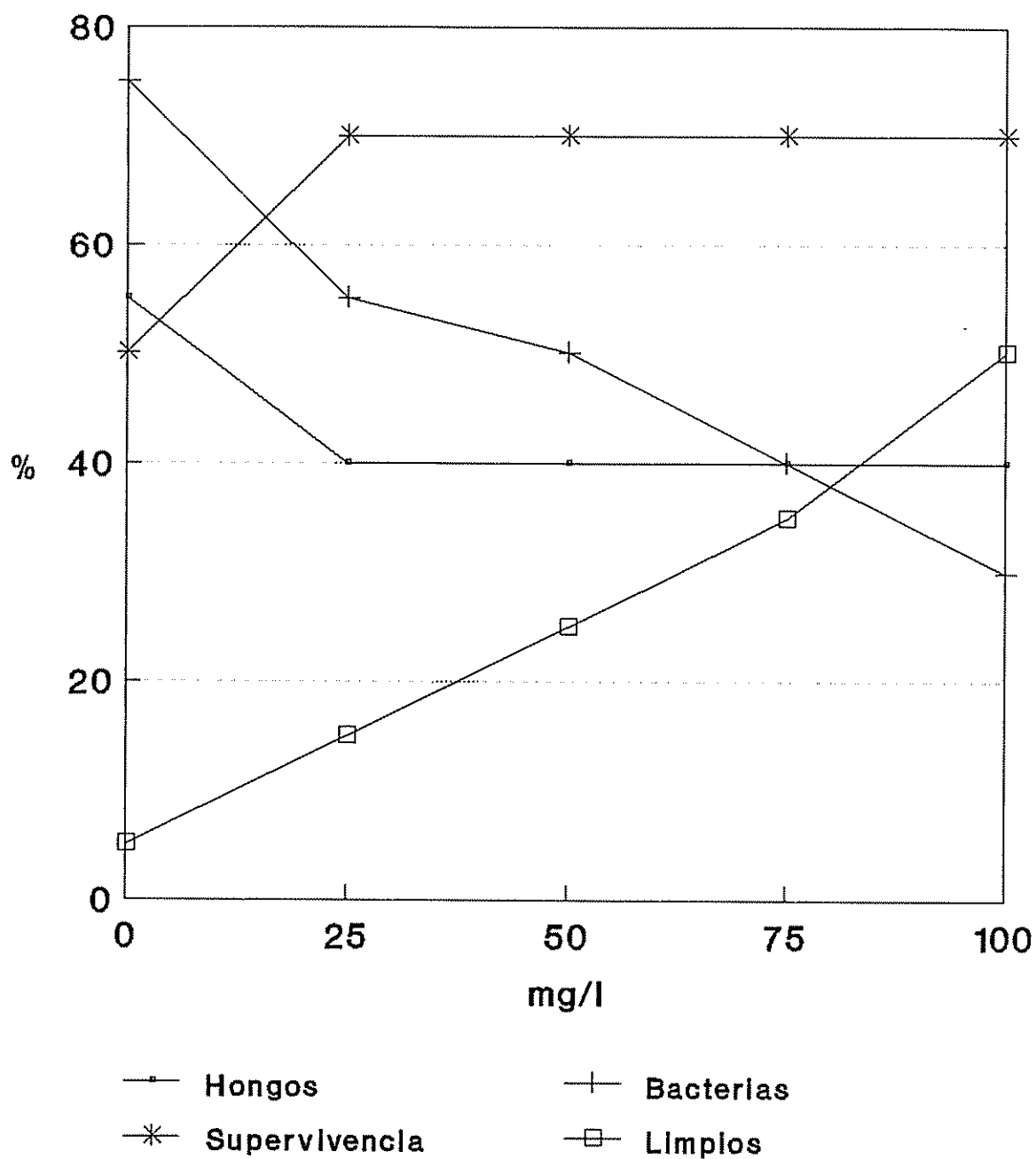


Figura 5. Efecto de ampicilina en estacas de Erythrina poeppigiana

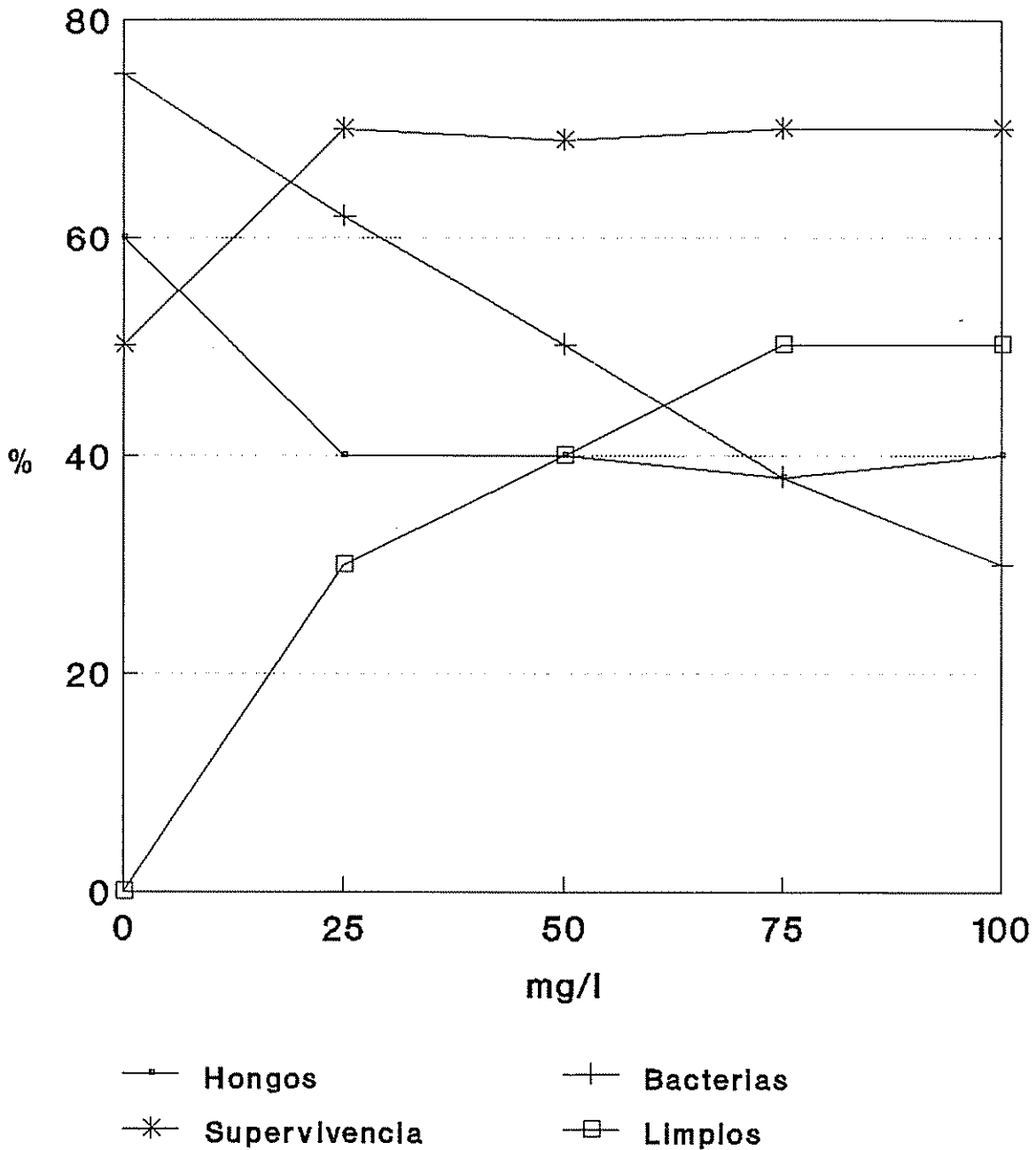


Figura 6. Efecto de ampicilina en estacas de Erythrina fusca

Cuadro 9. Resultados de la utilización de ampicillina en cuatro concentraciones diferentes para el control de bacteria en estacas de 2 cm de longitud de Erythrina poeppigiana y fusca después de 20 días de cultivo.

Especie	Número Explantos inoculados	Concen- tración antibiótico (mg)	Supervivencia	% Contaminación			% explantes limpios
				----- hongo	bacteria	bacteria +hongo	
<u>poeppigiana</u>	20	0	50	22	40	33	5
<u>poeppigiana</u>	20	25	73	30	48	10	15
<u>poeppigiana</u>	20	50	70	28	34	15	25
<u>poeppigiana</u>	20	75	72	26	28	16	35
<u>poeppigiana</u>	20	100	70	20	13	20	50
<u>fusca</u>	20	0	50	25	40	35	0
<u>fusca</u>	20	25	70	10	32	30	30
<u>fusca</u>	20	50	69	10	20	30	40
<u>fusca</u>	20	75	70	10	10	28	50
<u>fusca</u>	20	100	70	20	10	20	50

40% se deba al poco tiempo de actividad del antibiótico, debido a que éste es incorporado al medio pero posee cierto tiempo de duración de vida activa (Falkiner, 1990), o que la cantidad de inóculo fue tal que la concentración de antibiótico utilizada no contrarrestó la acción de la bacteria.

El antibiótico no causó efectos fitotóxicos visibles en los explantes con las concentraciones empleadas. El análisis de Ji-cuadrada para la supervivencia no indicó lo contrario. El uso de ampicilina mejoró la asepsia de los explantes, lo que se tradujo en un mayor porcentaje de explantes limpios. Desde este punto de vista el uso de antibióticos parece ser esencial (Figuras 5 y 6).

En cuanto a la contaminación fúngica, esta se mantuvo en la mayoría de los tratamientos en un 40% para ambas especies, no obstante en las Figuras 5 y 6 se observa que en el tratamiento 1 se presentó un 55% de contaminación fungica para Erythrina poeppigiana y un 60% para Erythrina fusca. Esto sugiere que lo sucedido no es efecto del tratamiento, si no, se debe al estado del material, ya que este es tomado al azar a la hora de la recolección y la cantidad de inóculo superficial puede ser diferente en cada uno de los explantes.

4.2.4 Utilización de antibióticos más la adición de benlate en el medio de cultivo

Con la finalidad de analizar la posibilidad de trabajar con explantes más grandes se efectuaron tratamientos de antibióticos (tetraciclina y ampicilina) más la adición de fúngicida (Benomyl). Ambos son productos sistémicos. (Brown et al., 1982).

En la Figura 7 se observa el efecto que tuvo el benlate en el medio de cultivo sobre el desarrollo de los hongos, se visualiza que al duplicar la concentración de benlate en los tratamientos 3, 4, 7 y 8 disminuyó el porcentaje de contaminación fungosa, en comparación con los tratamientos 1, 2, 5, 6 que

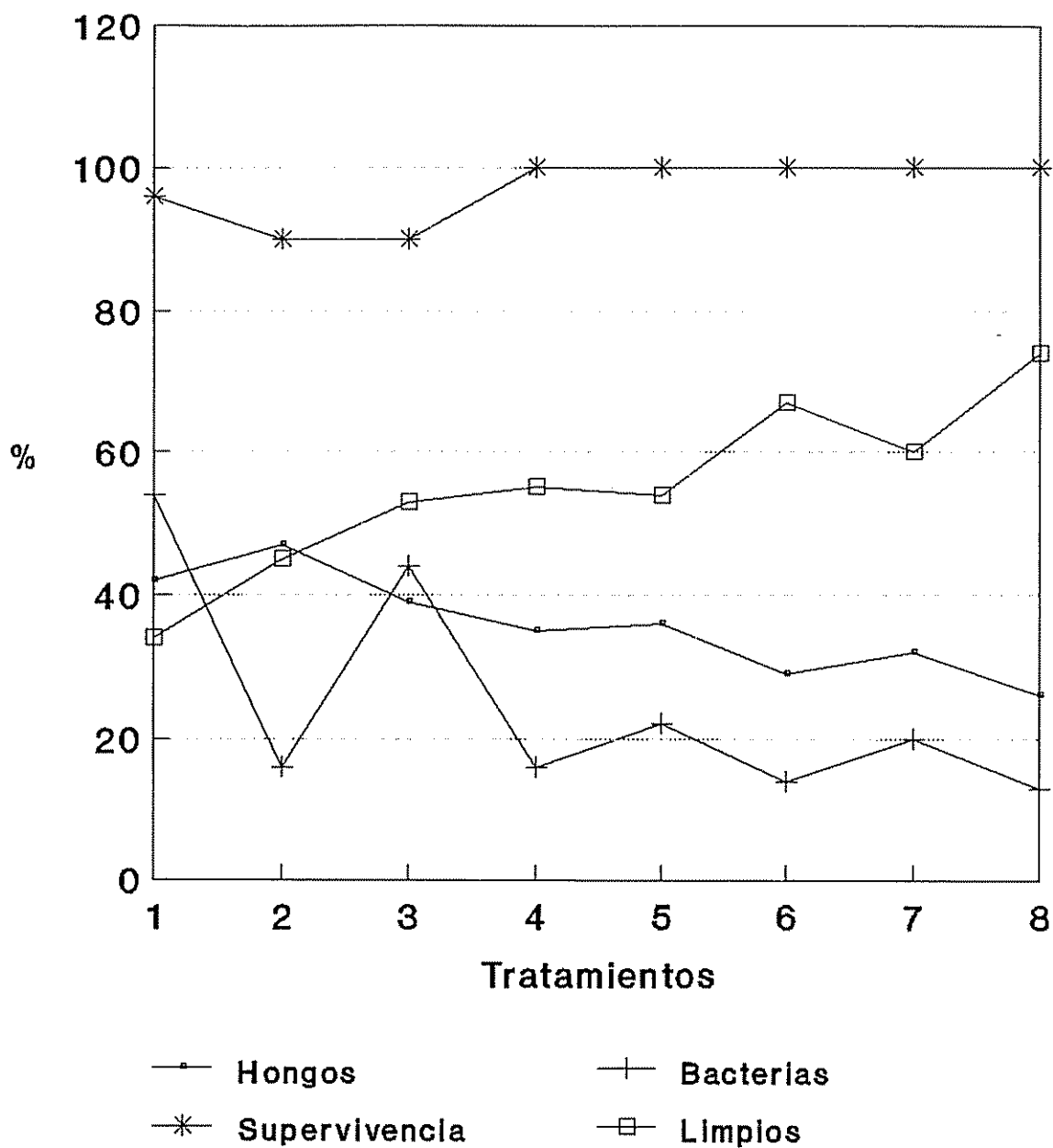


Figura 7. Uso de antibióticos en combinación con benlate en el medio de cultivo en estacas de Erythrina poeppigiana

Cuadro 10. Resultados del uso de tetraciclina y ampicilina en combinación con benlate en el medio de cultivo a los 21 días de cultivo.

Trata- miento	Hongo	Bacteria	Bact+hongo	Explantos		Total de brotes	Brotes desarro- llados	Brotes ini- ciando desa- rrollo
				limpio	Super- vivencia			
1	12	24	30	34	96	72	46	30
2	39	8	8	45	90	48	30	18
3	3	8	36	53	90	52	28	24
4	29	10	6	55	100	75	41	11
5	24	10	12	54	100	60	28	32
6	19	4	10	67	100	41	8	33
7	20	8	12	60	100	60	20	40
8	13	-	13	74	100	75	25	50

- 1 MS + 100 mg/l ampicilina + 1 gr benlate + 2 mg/l BA.
- 2 MS + 100 mg/l tetraciclina + 1 gr/l benlate + 2 mg/l BA.
- 3 MS + 100 mg/l ampicilina + 2 g/l benlate + 2 mg/l BA.
- 4 MS + 100 mg/l tetraciclina + 2 g/l benlate + 2 mg/l BA.
- 5 MS + 300 mg/l ampicilina + gr/l benlate + 2 mg/l BA.
- 6 MS + 300 mg/l tetraciclina + 1 gr/l benlate + 2 mg/l BA.
- 7 MS + 300 mg/l ampicilina + 2 gr/l benlate + 2 mg/l BA.
- 8 MS + 300 mg/l tetraciclina + 2 g/l benlate + 2 mg/BA.

fueron menos efectivos. En general en estos experimentos se observó que el menor porcentaje de contaminación fungica fué de un 26% con 2 g/l de benlate en el medio, lo que indica que los explantes portan hongos resistentes a esta concentración, ó que estos poseen una cantidad de esporas que el benlate no pudo prevenir la contaminación, como sucedió en semillas de orquídeas que fueron puestas a germinar in vitro (Brown, 1982). En cuanto al uso de los antibióticos se encontró que al triplicar la dosis de antibiótico disminuyó la contaminación bacterial. Comparando la acción de los dos antibióticos (tetraciclina y ampicilina) se tiene que los menores porcentajes de contaminación bacterial se obtuvieron con el uso de tetraciclina, tratamientos 2, 4, 6 y 8.

Al igual que la penicilina, la tetraciclina es de amplio espectro antibacterial, pero es tóxico a las plantas si se usa a largo plazo (Pollock et al., 1983). Además su actividad depende del pH siendo más activo a pH ácidos (Falkiner, 1990). En cuanto a la combinación de antibióticos con benlate se nota que el mejor tratamiento fue 300 mg/l de tetraciclina + 2 g/l de benlate (tratamiento 8) ya que con esta combinación se obtuvo un 74% de explantes limpios.

4.2.5 Efecto del pH del medio sobre la contaminación bacterial

El alimento que un patógeno pueda utilizar depende de sus enzimas y de las condiciones bajo las cuales estas operan. Un sustrato puede tener todos los nutrimentos necesarios, pero puede ser tan ácido o alcalino que impide al parásito utilizarlos.

En Cultivo de Microorganismos (1970) se mencionó que el crecimiento óptimo de las bacterias patógenas tiene lugar dentro de ciertos límites de pH, alrededor de la región neutra esto es 6.5 a 7.5 y que algunos microorganismos

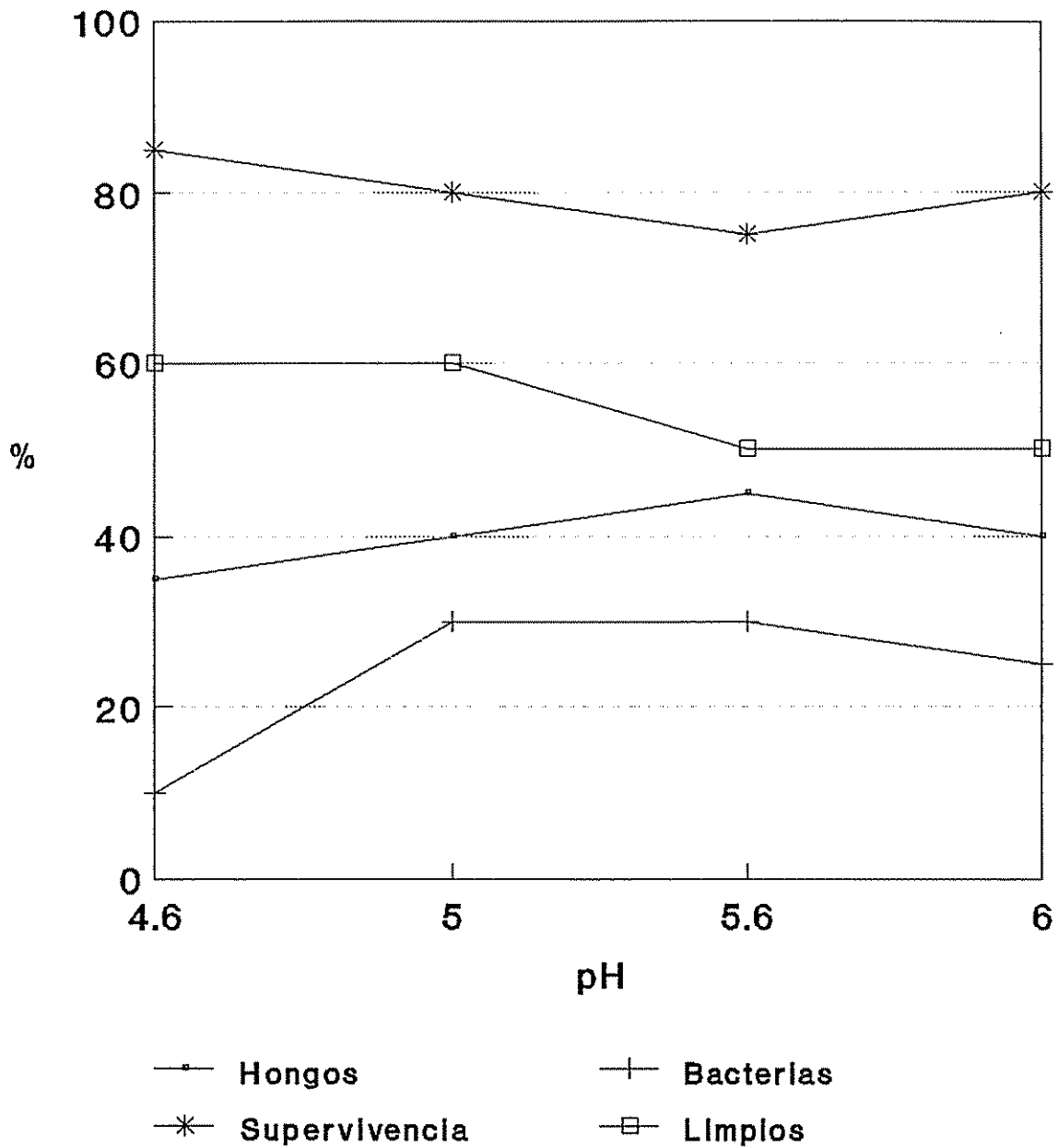


Figura 8. Efecto del pH sobre la contaminación de estacas de Erythrina fusca en el medio de cultivo

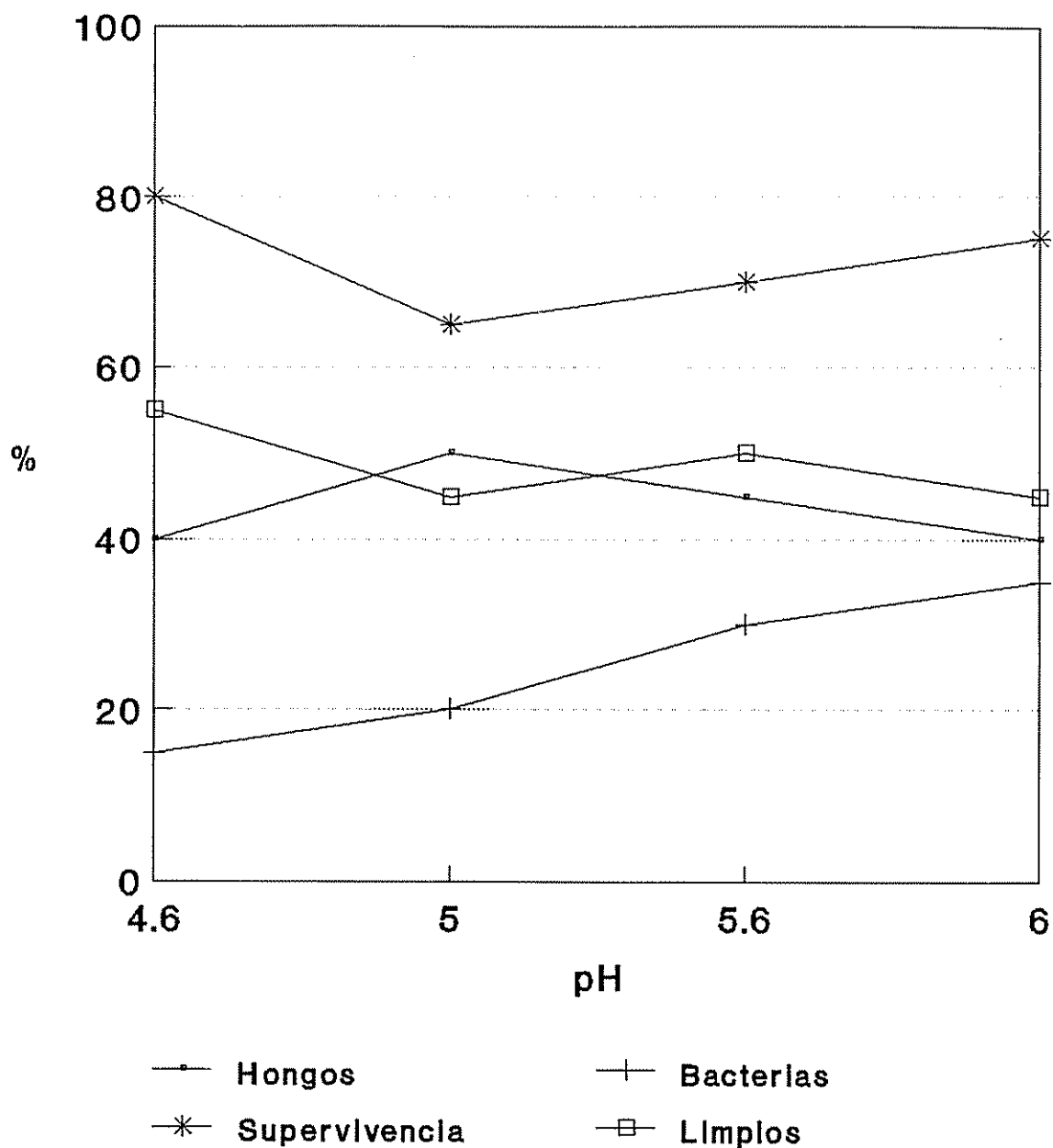


Figura 9. Efecto del pH sobre la contaminación en estacas de Erythrina poeppigiana en el medio de cultivo

Cuadro 11. Efecto del pH sobre la contaminación por bacteria, en estacas de 2 cm. de longitud Erythrina fusca y Erythrina poeppigiana después de 20 días de cultivo.

Especie	Número explantes	pH	Supervivenci %	% Contaminación			explantes limpios %
				----- hongo	bacteria	bacteria +hongo	
<u>poeppigiana</u>	20	6	76	20	15	20	49
<u>poeppigiana</u>	20	5.6	72	20	5	25	50
<u>poeppigiana</u>	20	5.0	65	30	5	20	45
<u>poeppigiana</u>	20	4.6	80	30	5	10	55
<u>fusca</u>	20	6	80	25	10	15	50
<u>fusca</u>	20	5.6	78	20	5	25	50
<u>fusca</u>	20	5.0	80	15	5	25	60
<u>fusca</u>	20	4.6	85	30	5	5	60

tienen un óptimo a pH ácido mientras que otros lo tienen en valores más alcalinos.

Con el objetivo de medir el efecto del pH sobre el desarrollo de bacterias, se realizaron varios ensayos. Como resultado de estas pruebas (Figuras 8 y 9) se obtuvo que a un pH 4,6 fue donde hubo los menores porcentajes de contaminación por bacteria, siendo esta un 10% para Erythrina fusca y 15% para Erythrina poeppigiana (Cuadro 6). Estos resultados concuerdan con el trabajo realizado por Zok (1983) en meristemas y ápices vegetativos cultivados in vitro de C. arabica L., el cual concluyó que el ámbito de pH 4,0 - 5,0 fue favorable para reducir las infecciones por bacterias. Cerón (1987) también demostró que con un pH de 4.6 a 4.8 se controlaba más efectivamente la bacteria en brotes axilares de Coffea arabica cultivados in vitro.

La supervivencia del explante no se afectó por las diferencias en los valores de pH, tampoco la contaminación por hongo ya que el porcentaje de contaminación se mantuvo en forma independiente con respecto al tratamiento. Lo cual no concuerda con el trabajo realizado por Valverde (1989) en embriogénesis somática de cacao (Theobroma cacao) en el cual, obtuvo altos porcentajes de mortabilidad en cotiledones cultivados in vitro a un pH 4.7.

Los porcentajes de explantes limpios fueron de un 58% para Erythrina poeppigiana y un 60% para Erythrina fusca (Figuras 8 y 9).

4.2.6 Oxidación fenológica

Uno de los principales problemas en el cultivo in vitro es la oxidación de compuestos fenólicos de coloración café, las cuales son tóxicas a los tejidos vegetales (Bonga, 1982).

En esta investigación se determinó que la oxidación no fue una variable de consideración, lo cual no concuerda con lo mencionado por Berrios (1986)

quien reportó que la oxidación fué la causa más importante en la pérdida de propágulos en la propagación in vitro de Erythrina poeppigiana y Erythrina fusca.

La oxidación ocurre debido a la formación de quinonas las cuales resultan por la acción de las enzimas de los tipos polifenoloxidasas y tirosinasas que se liberan o sintetizan cuando las plantas sufren heridas y oxidan a los fenoles presentes en las plantas (Bonga, 1982). George y Sherrington (1984) mencionaron que este fenómeno se puede prevenir modificando el potencial de óxido-reducción e inactivando así las enzimas, lo cual se consigue con el uso de agentes reductores o antioxidantes adicionados al medio de cultivo. Algunos de estos son, el ácido cítrico, el ácido ascórbico, la cisteína (George y Sherrington, 1984) y Polivinil y Pyrrolidone (PVP-Sigma 360^R) entre otros (Ravishankar y Jagadish, 1988; Mascarenas et al., 1982).

Durante esta investigación se controló la oxidación de los explantes con polivinil pyrrolidone (PV-Sigma chemical 360^R), a una concentración de 10 g/l. Este antioxidante se usó efectuando enjuagues a los explantes previo al establecimiento in vitro y adicionándolo al medio de cultivo.

4.2.7 Metodología para el establecimiento aséptico de los explantes

Finalmente, después de evaluar los ensayos de desinfección anteriormente mencionados, se logró establecer el siguiente procedimiento general.

En el Laboratorio el material vegetal fue manejado de la siguiente manera: las estacas se cortaron con una longitud de 3 y 8 cm, presentando dos y tres nudos. Después se sumergieron por 30 minutos en agua del tubo que corría continuamente. Luego, se colocaron en una solución de benlate (Benomyl) por 30 minutos. Seguidamente se llevaron a una campana de flujo laminar y se

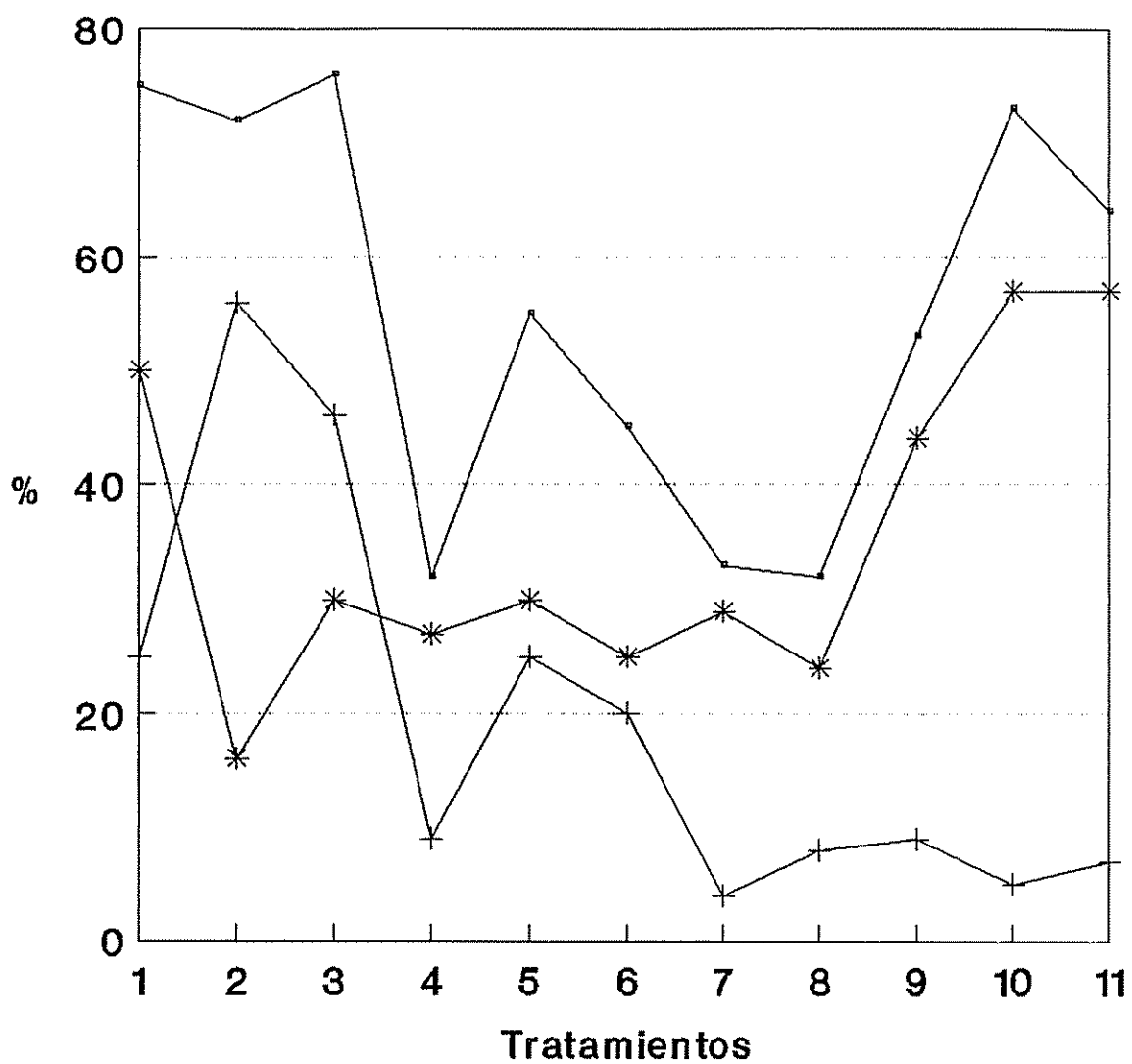
enjuagaron tres veces con agua esterilizada. Posteriormente, los explantes se sumergieron en etanol al 70% durante cinco minutos.

Seguidamente se realizó una primera inmersión de los explantes en hipoclorito de Calcio (Ca OCl_2) al 10% por 20 minutos. Se enjuagaron con agua estéril y también con una solución de Polivinyl Pyrrolidone (PVP-Sigma Chemical 360^R) a una concentración de 10 g/l. Después se practicó una segunda desinfección mediante la inmersión del material en hipoclorito de calcio al 8% durante 20 minutos. Por último, se practicaron dos lavados con agua estéril y uno con PVP-360^R por espacio de cinco minutos cada uno. Finalmente, los explantes fueron inoculados en su respectivo medio de cultivo.

4.3 Brotación in vitro de yemas laterales

La interacción y el balance entre los diferentes reguladores de crecimiento presentes en el medio controlan el crecimiento y la morfogénesis en el cultivo in vitro. No obstante, estas sustancias pueden reaccionar de forma diferente según la planta y parte utilizada como explante (George y Sherrington, 1984).

En esta investigación se encontró que en estacas de 2 cm de longitud no hubo respuesta morfogénica para la diferenciación de brotes. Por tal razón, se procedió a probar como explante estacas de 8 cm de longitud que presentaran poca lignificación, ya que Bonga (1982) indicó que entre más joven sea el explante más probabilidad de éxito tendrá la micropropagación. Villalobos y Thorpe (1982), manifestaron que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis. Se menciona que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido a sembrar, mejor será la respuesta in vitro. (Villalobos y Thorpe 1984).



—•— Total brotes —+— Brotes tipo B
 —*— Brotes tipo A

Figura 10. Brotación (%) *in vitro* obtenida en estacas de Erythrina poeppigiana a los 21 días de incubación

Cuadro 12. Brotación in vitro en estacas de Erythrina poeppigiana a los 21 días de incubación.

Trata- miento	AIB (mg/l)	BA mg/l (mg/l)	Número de explantos inoculados	Total de brotes producidos	Brotes tipo B**	Brotes tipo A*
1	0	0	25	75	25	50
2	0	2	25	72	56	16
3	0	4	25	76	46	30
4	0,1	0	25	32	9	27
5	0,1	2	25	55	25	30
6	0,1	4	25	45	20	25
7	0,3	0	25	33	4	29
8	0,3	2	25	32	8	24
9	0,3	4	25	53	9	44
10	0,5	2	25	73	5	57
11	0,5	4	25	64	7	57

* Brotes en los cuales aún no están totalmente desarrolladas las hojas.

** Brotes en los cuales se observan las hojas trifoliadas, bien diferenciadas.

Los resultados mostrados en la Figura 10 para Erythrina poeppigiana, indican que el mayor número de brotes tipo B**, (Figura 11 y 13) se obtuvo con 2 mg/l BA en ausencia de AIB. (Los niveles óptimos de BA para el desarrollo de las yemas fueron 2 y 4 mg/l de BA). También se observó que cuando se adicionó auxina al medio se redujo el número de yemas desarrolladas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Wright y England (1987), quienes concluyeron que para la iniciación in vitro los brotes de Prossopis juliflora no necesitaron la adición de auxina y que la presencia de ésta, disminuía el tamaño de los brotes. Para la mayoría de los casos documentados las auxinas no estimulan la diferenciación de yemas. (Regulating Growth and development, 1976).

Berrios (1986), obtuvo el desarrollo de yemas cotiledonares en Erythrina berteroana en un MS más 2 o 4 mg/l de BA.

En este experimento el BA estimuló la formación de brotes latentes. Estos resultados sugieren que la adición de citoninas es suficiente para obtener una propagación clonal de Erythrina a partir de microestacas o estacas de mayores dimensiones. Berrios (1986) también obtuvo neoformación de brotes mediante estímulo de citocininas pero a partir de segmentos de plántulas germinadas in vitro donde se podría cuestionar el grado de estabilidad genética del producto de brotación. Las auxinas se requirieron en concentraciones relativamente bajas.

Se observa, además en el Cuadro 12 que para Erythrina poeppigiana cuando el medio no contiene regulador de crecimiento hubo un 75% de brotes, pero que de este 75% sólo el 25% fueron brotes tipo B a los 15 días, mientras que el 50% restante presentó brotes tipo A* (Figura 12). Estos resultados indican que para la iniciación de los brotes no es necesaria la adición de reguladores de crecimiento. Posiblemente las concentraciones endógenas son

** en los cuales se observan las hojas trifoliadas bien desarrolladas.

* en los cuales aún no están las hojas totalmente desarrolladas.



Figura 11. Estacas de Erythrina spp mostrando brotación tipo B (brotes en los cuales se observan las hojas trifoliadas bien desarrolladas).

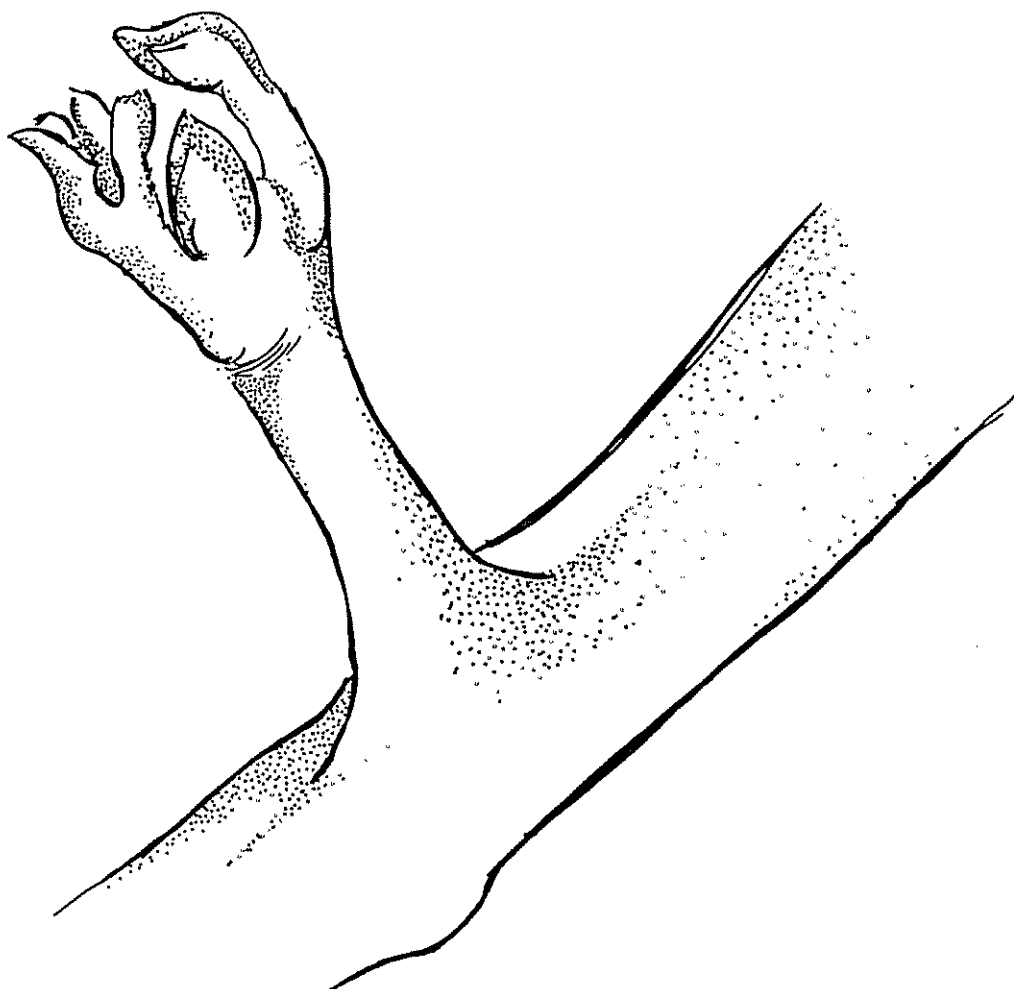


Figura 12. Estacas de Erythrina spp mostrando brotación tipo A (brotes en los cuales todavía no están totalmente desarrolladas las hojas).

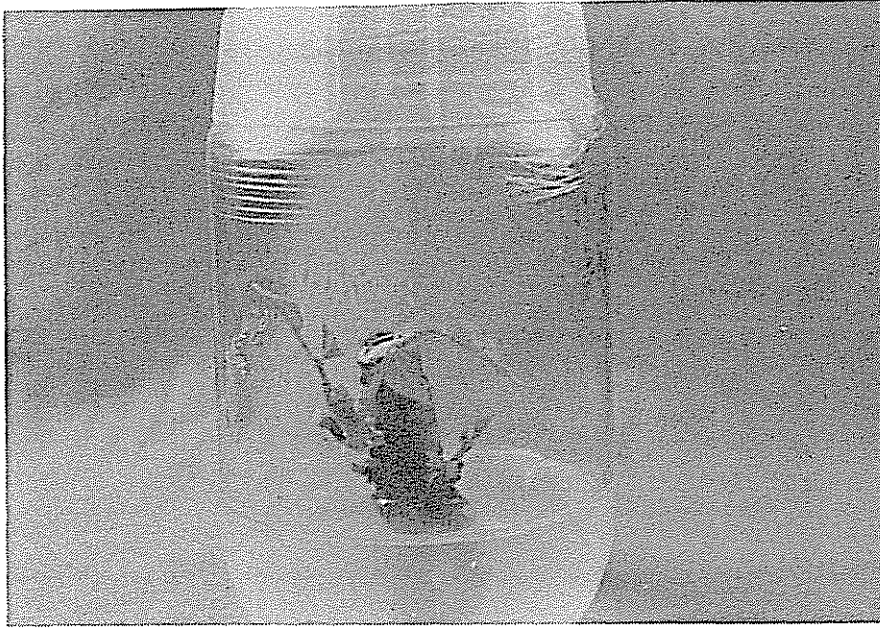


Figura 13. Estacas in vitro de Erythrina poeppigiana a los 15 días de cultivo. Obsérvese el desarrollo brotes tipo B.

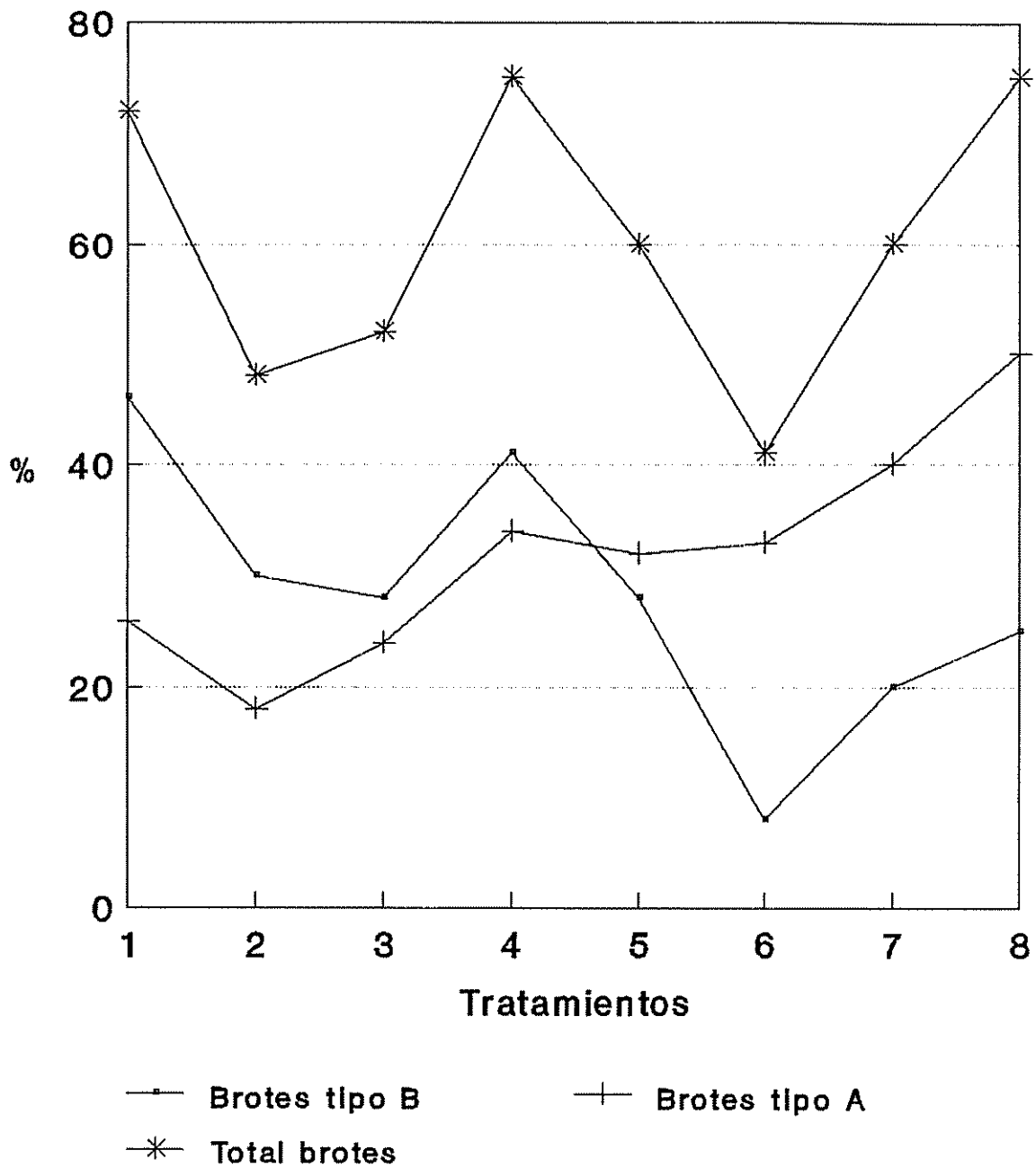


Figura 14. Brotación (%) in vitro en estacas de Erythrina poeppigiana

suficientes para estimular la diferenciación. Sin embargo, para obtener un mayor desarrollo de los brotes la adición de 2 mg/l de BA si es conveniente.

En la Figura 14 se observa que en general concentraciones de 300 mg/l de antibiótico en el medio de cultivo más la adición de 2 g/l de benlate Cuadro 10, no redujo el número de brotes pero si se nota un predominio de brotes tipo A*, posiblemente se deba al efecto de la combinación de ambos productos ya que Brown et al (1982), reportaron que combinaciones simialres retardan la expansión de hojas de trigo. No obstante en los tratamientos 6 y 8 los cuales contienen 300 mg/l de tetraciclina y, más 1 y 2 g/l de benlate respectivamente, se observaron efectos adversos sobre la morfología de la hoja como fué, la fusión de dos foliolos.

Según Brown et al. (1982) efectos deletorios en cultivo in vitro de ápices de Cymbidium y Colocasia esculenta se deban a inhibición metabólica o enzimática así como la inducción de aberraciones cromosomales producidas por el benlate. Además se ha reportado que en algunos casos que la actividad tóxica de la tetraciclina no se limita sólo a la bacteria (Falkiner, 1990).

En cuanto a Erythrina fusca los resultados fueron muy diferentes ya que se necesitó la combinación de auxina citocinina para lograr el desarrollo de los brotes. Además, la respuesta para obtener brotación en Erythrina fusca fue más tardía. Esta combinación fue 8 mg/l de BA + 0,3 mg/l AIB (Figura 16) tratamiento 8), con la cual se obtuvo un 90% de brotación de la cual el 60% fueron brotes tipo B (Figuras 12 y 16) y el 32% fueron brotes tipo A (Figura 12). Esto concuerda con lo informado en otros trabajos (Berríos, 1986; Zaerry y Mapes, 1982) donde han sido necesarias la adición de concentraciones relativamente alta de citocininas. Se observó que con concentraciones mayores de 0,3 mg/l de AIB disminuyó el número de brotes.

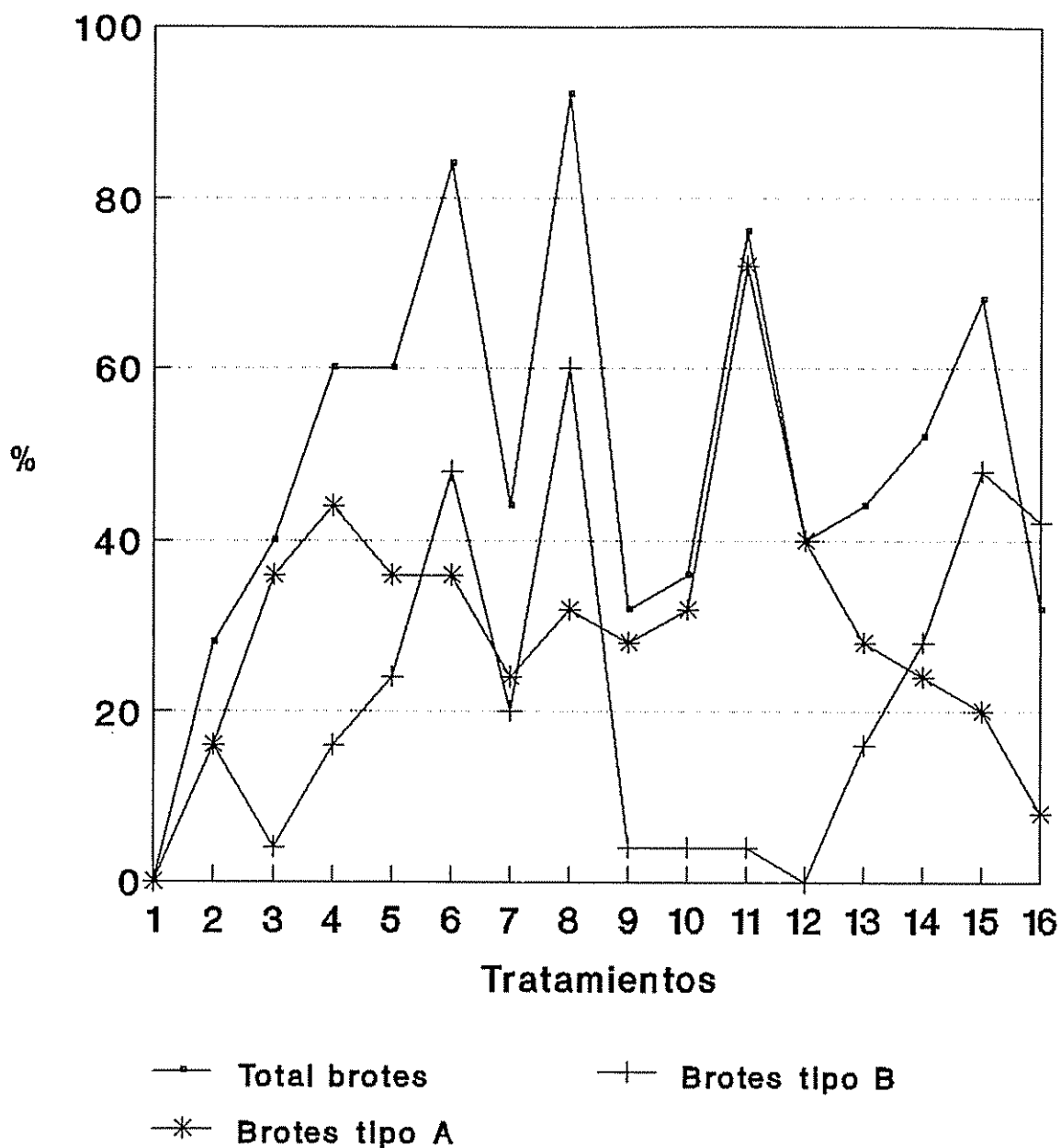


Figura 15. Brotación (%) in vitro obtenida en estacas de Erythrina fusca a los 26 días de incubación

Cuadro 13. Brotación in vitro en estacas de Erythrina fusca a los 26 días de incubación.

Trat	AIB (mg/l)	BA (mg/l)	Número de explantes inoculados	Total de brotes producidos	Brotes tipo B**	Brotes tipo A*
1	0	0	25	0	0	0
2	0	2	25	28	16	16
3	0	4	25	40	4	36
4	0	8	25	60	16	44
5	0,3	0	25	60	24	36
6	0,3	2	25	84	48	36
7	0,3	4	25	44	20	24
8	0,3	8	25	92	60	32
9	0,5	0	25	32	4	28
10	0,5	2	25	36	4	32
11	0,5	2	25	76	4	72
12	0,5	8	25	40	0	40
13	1	0	25	44	16	28
14	1	2	25	52	28	24
15	1	4	25	68	48	20
16	1	8	25	32	42	8

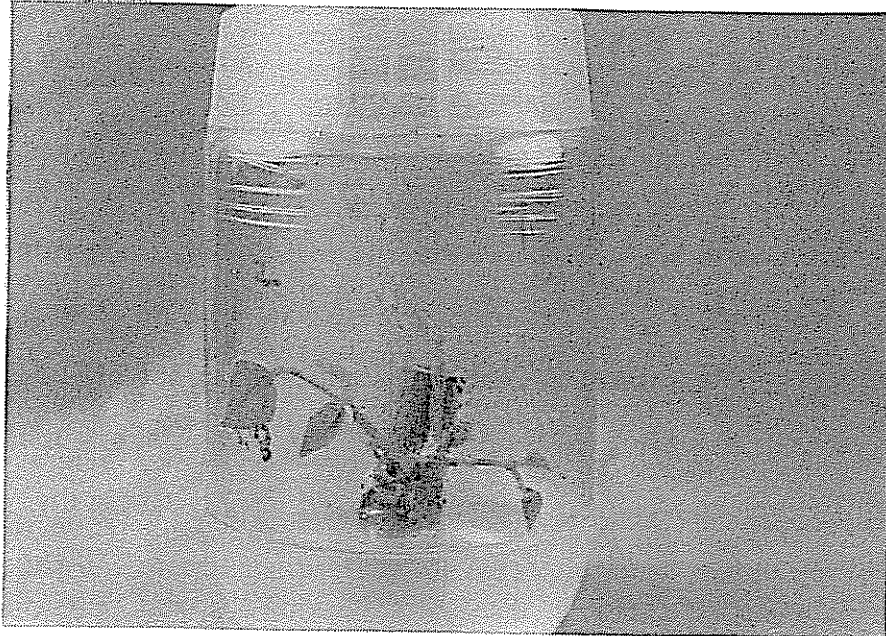


Figura 16. Estacas in vitro de Erythrina fusca a los 20 días de cultivo. Obsérvese el desarrollo del brote tipo B.

Esto sugiere que la respuesta in vitro puede ser muy diferente aún tratándose de plantas tan emparentadas como son dos géneros iguales, lo cual fue discutido por (David, 1982). Por tal razón, fue necesario ampliar el rango de tratamientos para Erythrina fusca, (Cuadro 13).

George y Sherrington (1984) afirmaron que el balance auxina citocinina es complejo. Villalobos et al (1983) explicaron que estas disparidades en el requerimiento hormonal reflejan diferencias en los niveles endógenos de los reguladores de crecimiento.

Además, para el caso de Erythrina el problema parece ser más complejo, ya que las especies tropicales presentan mayores dificultades metodológicas para su establecimiento in vitro que las especies de clima templado. Por la condición tropical en que se desarrollan las plantas, estas presentan más dificultades de limpieza, prerequisite para el establecimiento in vitro, más aún si se pretende trabajar con material directamente del campo, como fue el objetivo de esta investigación. No obstante, este trabajo demostró que después de obtener una desinfección superficial de los explantes (aunque no del 100%) fue posible establecer la micropropagación clonal ya que se partió de un explante con presencia de meristema axilar y por consiguiente con mayor estabilidad genética.

5. CONCLUSIONES

Considerando las condiciones experimentales en que se llevó a cabo esta investigación, es pertinente considerar las siguientes conclusiones.

1. El establecimiento aséptico de los explantes, de Erythrina poeppigiana y Erythrina fusca es factible, pero debido a que el material inicial proviene directamente del campo hubo dificultades con la presencia de agentes contaminantes como lo son bacterias y hongos.
2. La contaminación fungosa se pudo controlar de un 26 a un 32 por ciento por medio de una desinfección con etanol al 70% por 5 minutos más una inmersión de 30 minutos en benlate a una concentración de 1 g/l, así como, una doble desinfección con hipoclorito de calcio al 8 y 10 por ciento por 20 minutos cada una, más la adición de 1 ó 2 g/l de benlate en el medio de cultivo.
3. La contaminación por bacteria se pudo controlar de un 16 a un 24 por ciento por medio de la desinfección mencionada anteriormente más la adición de 100 a 300 mg/l de ampicilina o tetraciclina y un pH de 4,6.
4. La oxidación de los explantes no fue una variable de consideración, después de su control con polivinyl Pirrolidone (PVP-Sigma Chemical 360^R) el cual, se usó a una concentración de 10 g/l en enjuagues de los explantes previo a su inoculación y adicionandolo al medio en igual concentración.
5. El éxito de la brotación in vitro de Erythrina spp dependió de la selección adecuada del tamaño del explante ya que al usar estacas de 2cm de longitud no se observó respuesta morfogénica, lo cual se consiguió con estacas de 3 a 8 cm de longitud que presentaban de 2 a 3 nudos.
6. Hubo diferencias de desarrollo de yemas para las dos especies teniendo así dos tipos tipo A: brotes en los cuales aún no están las hojas totalmente desarrolladas y brotes de tipo B: en los cuales se observan claramente las hojas trifoliadas. Esto dependió de la concentración y combinación del regulador de crecimiento utilizado.
7. La brotación de estacas en Erythrina poeppigiana se inició en ausencia de regulador de crecimiento pero en este caso se tubo un predominio de brotes tipo A. No obstante para acelerar el desarrollo de estos se necesitó solamente la adición de citocinina (BA) a una concentración de 2 a 4 mg/l. Por lo que se concluyó que para esta especie es conveniente usar 2 procedimientos, uno inocular el material en un medio con cero regulador de crecimiento por 5 días y dos transferir el material a otro medio con 2 ó 4 mg/l de BA, obteniéndose así un mayor porcentaje de brotes tipo B.

8. Los mejores resultados de brotación en estacas de Erythrina fusca se obtuvieron con una concentración de 8 mg/l de BA más 0,3 mg/l de AIB. No se tubo respuesta morfogénica en los ensayos que no tenían regulador de crecimiento.

9. Se observó la existencia de un efecto genotípico sobre la inducción de brotes en Erythrina lo cual es debido posiblemente a un balance entre los reguladores de crecimiento auxina-citocinina.

6. LITERATURA CITADA

- ALLEN, O. N. y ALLEN, E. K. 1981. Leguminosae, a source book of characteristics, uses and nodulation. Madison, University of Wisconsin Press. 212 p.
- ASEPTIC TECHNIQUES. 1981. In Dodds, J. H.; Roberts, L. W. Experiments in plant tissue culture. Cambridge, University Press. p. 10-20.
- BEELEN, J. s.f. Introductory course on in vitro culture. Wageningen. International Agricultural Centre. 84 p.
- BEHAGEL, H.A. 1971. The effects of sterilization on components in nutrient media. In The pH and the sterilization of the media. Ed. by J. van Bragtj D. Mossel; R. Pierrk; H. Veldstra. Wageningen, Netherlands Agricultural University. p. 120-171p.
- BERTHOULY, M.; GUZMAN, N.; CHATELET, P. 1985. Propagación clonal in vitro de híbridos F1 por el método de microestacas. Turrialba, C.R., CATIE. 8 p. (mecnografiado)
Presentado en: Simposio sobre la Caficultura Latinoamericana (8, 1985, Granada, Nic.).
- BERRIOS PEREZ, A. A. 1988. Propagación clonal in vitro de diferentes especies de poró (Erythrina spp). Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., Programa UCR/CATIE. 81 p.
- BIDWELL, R.S.S. 1979. Fisiología vegetal. México, AGT.
Citado por; Hurtado, D.W.; Merino, E.M. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, D.F. p. 53.
- BIONDI, S.; THORPE, T.A. 1982. Clonal propagation of forest tree species. In International Symposium on Tissue Culture of Economically Important Plants (1981, Singapore). Proceedings. Ed. by A.N. Rao. Singapore, Committee on Science and Technology in Developing Countries, Asian Network for Biological Sciences. p. 197-204.
- BONGA, J. M. 1982. Tissue culture techniques. In Tissue culture in forestry. Ed. by J. M. Bonga; D.J. Durzan. La Haya, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk. p. 4-35.
- BROWN, C. L.; SOMMER, H.E. 1982. Vegetative propagation of dicotyledonous trees. In Tissue culture in forestry. Ed. by J.M. Bonga; D.J. Durzan. La Haya, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk. p. 109-149.
- BROWN, D. M.; GROOM, C. L.; CVITANIK, M.; BROWN, M.; COOPER, J. L.; ARDITTI, J. 1982. Effects of fungicides and bactericides on orchid seed germination and shoot tip cultures in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda) 1(3):165-180.

- CADIMA ZEVALLOS, A.; ALVIM, P. de T. 1967. Influencia del árbol de sombra Erythrina glauca sobre algunos factores edafológicos relacionados con la producción del cacaotero. Turrialba (C.R.) 17(3):330-336.
- CERON MARTI, F.A. 1987. Uso de reguladores de crecimiento vegetal en la inducción in vivo de yemas axilares latentes de Coffea arabica y establecimiento de los brotes vegetativos in vitro. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., Programa UCR/CATIE 101 p.
- COMBE, J; GEWALD, N. 1979. Guía de campo de los ensayos forestales del CATIE en Turrialba, Costa Rica. Turrialba, C. R., CATIE. 378 p.
- CRECIMIENTO Y reproducción de los fitopatógenos. 1968. In Stakman, E.C.; Harrar, J.G. Principios de patología vegetal. 2 ed. Buenos Aires, Editorial Universitaria. p. 97-127.
- CULTIVO DE microorganismos. 1970. In Baker, F. J. Manual de técnica bacteriológica. Trad. de la 2 ed. inglesa por Luis Olivares Baqué. Zaragoza, España, Acribia. p. 72-80.
- CYTOKININS. 1975. In Leopold, A. C.; Kriedemann, P. E. Plant growth and development. New York, McGraw-Hill. p. 155.
- DACCARETT, M. 1967. La influencia de los árboles leguminosos sobre el forraje que crece bajo ellos. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, IICA. 34 p.
- DATTA, S. K.; DATTA, K; PRAMANIK, T. 1983. In vitro clonal multiplication of mature trees of Dalbergia sissoo Roxb. Plant Cell Tissue and Organ Culture (Holanda) 2(1):15-20.
- DAVID, A. 1982. In vitro propagation of gymnosperms. In Tissue culture in forestry. Ed. by J. M. Bonga; D. J. Durzan. La Haya, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk. p. 87.
- DEVLIN, R.M. 1980. Fisiología vegetal Barcelona, España, Omega. 614 p.-
- DHAWAN, V.; BHOJWANI, S. A. 1984. Reduction in cost of tissue culture of Leucaena leucocephala (Lam) de Wit by replacing AR grade sucrose by sugar cubes. Current Science (India) 53(21):1159-1161.
- FAIKINER, F.R. 1990. The criteria for choosing and antibiotic for control of bacteria in plant tissue culture. International Association for Plant Tissue Culture. Newsletter. no. 60. p. 13-23.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Eversley, G.B., Exegetics. 709 p.
- HURTADO, D.V.; MERINO, E.M. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, D.F. 231 p.
- IMPORTANCIA DE la Erythrina como suplemento proteico 1989. Agroforestería (C.R.). no.2:1-4.

- KESTER, D. E. 1982. The clone in horticulture. HortScience (EE.UU.) 18(6):831-837.
- KRUKOFF, B.A. 1979. Notes on the species of Erythrina. 12. Annals of the Missouri Botanical Garden (EE.UU.) 66(3):421-445.
- _____. 1982. Notes on the species of Erythrina. Allertonia (EE.UU.) 3(1):121-154.
- KRIKORIAN, A.O.; BERQUAM, D.L. 1974. Plant cell and tissue cultures: the role of Haberlandt. Botanical Review (EE.UU.) 35(1): 59-88.
- LACKEY, J. A. 1981. Phaselaceae D.C. 1981. In Advances in legume systematics. Eds. R. M. Polhill; P. H. Raven. Kew England Royal Botanic Gardens. 1981. p. 301-327.
- LEOPOLDO, D.; KRIEDEMANN, C.A. 1975. Plant growth and development. 2. ed. USA, Book Co. 545 p.
- LOCY, R. D. 1984. Notes on principles and applications; state of the art. ATAS Bulletin (EE.UU.) 1:8-13.
- LOPEZ, C. s.f. Medios de cultivo. In Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Comp. Victor M. Villalobos. Turrialba, C.R., CATIE. p. 13-33.
- LOZANO, O.R. 1962. Postes vivos para cercas. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, IICA. 75 p.
- MASCARENAS, A. F.; GUPTA, P. K.; KULKARNI, V. M.; MEHTA, U.; IYER, R. S.; KHUSPE, S. S.; JAGANNATHAN, V. 1982. Propagation of trees by tissue culture. In International Symposium on Tissue Culture of Economically Important Plants (1981, Singapore). Proceedings. Ed. by A.N. Rao. Singapore, Committee on Science and Technology in Developing Countries, Asian Network for Biological Sciences. p. 175-179.
- MUKHOPADYAY, A.; BHOJWANI, S.S. 1986. Clonal multiplication and plant regeneration from atem callus of adult Dalbergia sissoo. In International Congress of Plant Tissue and Cell Culture (6, 1986, Minneapolis, Minn.). Abstracts. Minneapolis, University of Minnesota, International Association for Plant Tissue Culture. p. 112.
- MULLER, L.; KRIKORIAN, A.D. 1985. Glosario de los términos más frecuentemente empleados en el cultivo de tejidos vegetales. Turrialba, C.R., CATIE. s.p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum (Dinamarca) 15:473-497.
- _____. 1977. Manipulation of organ initiating in plant tissue cultures. Botanical Bulletin of Academia Sinica (Taiwan) 18:1-24.

- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, EE.UU. 1979. Tropical legumes: resources for the future. Washington, D.C. p. 5-9, 258.
- NAUER, E.M.; BOSWELL, S.B. 1981. Stimulating growth of quiescent citrus buds with 6-Benzyl Amino Purino. Hort Science (EE.UU) 16(2):162-163.
- POLLOCK, G, BARFIELD, O.G., SHIELDS, R. 1982. The toxicity of antibiotic to plant cell cultures. Plant Cell Reports (Alemania) 2:36-39.
- RAO, A. N.; LEE, S. K. 1982. Importance of tissue culture in tree propagation In International Congress of Plant. Tissue and Cell Culture (5th, 1982 Tokyo). Plant tissue culture 1982; proceedings. Ed. by A. Fujiwara. Tokyo, Japanese Association for Plant Tissue Culture. p. 715-718.
- RAO, K. S.; SITA, G. L.; VAIDYANATHAN, C. S. 1985. In vitro cloning of *Dalbergia latifolia* Roxb. (Indian rosewood). In Tissue culture in forestry and agriculture. Ed. by R. R. Henke; K. W. Hughes; M. J. Constantin; A. Hollaender. New York, Plenum Press. p. 346.
- RAVIS HANKAR, V, JAGADISH, S. 1988. In vitro regeneration of plantlets from shoot callus mature trees of *Dalbergia latifolia* Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda). 13:77-83.
- REGULATING GROWTH and development: the plant hormones. 1976. In Raven, P.H.; Evert, R.F.; Curtis, H. Biology of plants. 2 ed. New York, Worth Publishers. p. 483-496.
- RUSSO, R.O. 1983. Efecto de la poda de *Erythrina poeppigiana* (Walpers) O.F. Cook (poró) sobre la nodulación, producción de biomasa y contenido de nitrógeno en el suelo en un sistema agroforestal "café-poró". Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., Programa UCR/CA'TIE. 108 p.
- SHIELDS, R.; ROBINSON, S. J.; ANSLOW, P. A. 1984. Use of fungicides in plant tissue culture. Plant Cell Reports (Alemania) 3:33-36.
- SKIRVIN, R. M. 1981. Fruit crops. In Cloning agricultural plants via in vitro techniques. Ed. by B.V. Conger. Boca Raton, Fla., CRC Press. p. 51-139.
- URQUHART, D.H. 1963. Cacao. Trad. por J. Valerio. Turrialba, C.R., IICA. 322 p.
- VALVERDE CERDAS, M.L. 1989. Efecto del pH, la luz, la condición del medio y la concentración de sacarosa en la embriogénesis somática de cacao (*Theobroma cacao* L.) in vitro. Tesis Lic. Agr. Turrialba, C.R., Universidad de Costa Rica, Sede Universitaria Regional del Atlántico. 102 p.
- VILLALOBOS, V. M.; THORPE, T. A.; YEUNG, E. C. 1983. Aplicaciones del cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo (Méx.) 51:43-59.

- _____; THORPE, T. A. 1984. La micropropagación: conceptos, metodología y resultados. In *Fundamentos y aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura*. Ed. por W. Roca. Cali, Col, CIAT (en prensa)
- WAINWRIGHT, H; ENGLANDN, N. 1987. The micropropagation of *Prossopis juliflora*. In *Symposium on in vitro Problems Related to Mass Propagation of Horticultural Plants (1985, Gembloux, Bélgica)*. [Proceedings]. Ed. by P. Borus; P.E. Read; F.O. Riordain. Zaltbommel, Holanda, Commission of the European Communities, International Society for Horticultural Science. v.2, p 49-53.
- WAREING, R.F.; PHILLIPS, I.D.J. 1973. The control of growth and differentiation in plants. Gram Bretaña. Pergamon Press. p.
- Citado por: Hurtado, D.V.; Merino, E.M. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, D.F. p 49.
- ZAERR, J. B.; MAPES, M. O. 1982. Action of growth regulators. In *Tissue culture in forestry*. Ed. by J. M. Bonga; D. J. Durzan. La Haya, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk. p. 231-244.
- ZOK, S. 1983. Multiplication vegetative *in vitro* du cafeir (*Coffea arabica* L.) par culture de meristemes et de sommets vegetatifs. Thèse Ing. Agronomé. Montpellier, Francia, Ecole Supérieure d'Agronomie Tropicale de Montpellier. 49 p.

7. ANEXOS

Abreviaturas:

B5: medio de Gamborg, Miller y Ojima

MS: medio de Murashige y Skoog

W: medio de White

BA: 6-Bencilaminopurina

AIA: ácido indol acético

K: Cinetina

ANA: ácido naftalenacético

Biot.: biotina

Cuadro 1A Resultados de pruebas Ji-cuadrada (χ^2) para 10 tratamientos de desinfección de estacas de Erythrina poeppigiana y Erythrina fusca.

Especie	χ^2 hongo	χ^2 bacteria	χ^2 explantes limpios	χ^2 sobrevivencia
<u>E. poeppigiana</u>	15.70513*	1.817976*	17.2042**	44.70435**
<u>E. fusca</u>	26.30882**	15.04659*	25.55556**	22.40843**

* No significativa al 0.05

** Significativa al 0.05

Cuadro 2A Resultados de pruebas Ji-cuadrada (χ^2) para seis tratamientos de desinfección de estacas de Erythrina poeppigiana y Erythrina fusca.

Especie	χ^2 hongo	χ^2 bacteria	χ^2 explantes limpios	χ^2 sobrevivencia
<u>E. poeppigiana</u>	5.035202*	1.363636*	10.16949*	97.15629**
<u>E. fusca</u>	12.97297**	3.284211*	3.076923*	91.15629**

* No significativa al 0.05

** Significativa al 0.05

Cuadro 3A Resultados Ji-cuadrada (χ^2) en la utilización de ampicilina en cuatro concentraciones diferentes para estacas de Erythrina fusca y Erythrina poeppigiana.

Especie	χ^2	χ^2	χ^2 explantes	χ^2
	hongo	bacteria	limpios	sobrevivencia
<u>E. Poeppigiana</u>	1.468785*	9.2	12.6819**	3. X
<u>E. fusca</u>	5.548756*	9.763906**	26.19543**	4.074703*

* No significativa al 0.05%

** Significativa al 0.05%

Cuadro 4A Resultados Ji-cuadrada (χ^2) sobre el efecto de pH en la contaminación de estacas de Erythrina poeppigiana y Erythrina fusca.

Especie	χ^2	χ^2	χ^2 explantes	χ^2
	hongo	bacteria	limpios	sobrevivencia
<u>E. poeppigiana</u>	.5587302*	2.6666*	.550344*	1.253919*
<u>E. fusca</u>	.625*	2.968076*	7,81**	.625*

* No significativa al 0.05%

** Significativa al 0.05%

Cuadro 5A Resultados de Chi cuadrada (χ^2) en tratamientos de brotación in vitro de estacas de Erythrina poeppigiana y Erythrina fusca.

Espece	X2 brotación
<u>E. poeppigiana</u>	58.78406**
<u>E. fusca</u>	82.1685**

** Altamente Significativo al 0.05%