

III. MATERIALES Y METODOS

1. Localización del estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del CATIE, en el periodo comprendido entre enero y Octubre del 2001.

2. Material vegetal

Para el establecimiento de los ensayos de laboratorio, se utilizaron explantes tomados de plantas donantes de Caoba, establecidas en el invernadero. De estas plantas, se tomaron como explantes, segmentos nodales o microestacas de 3 cm de longitud. Los brotes primarios obtenidos de estos explantes constituyen la base de las etapas posteriores de la micropropagación.

Estas plantas son derivadas de semilla certificada procedente del Banco Latinoamericano de Semillas Forestales del CATIE. Las plantas donantes se establecieron en el invernadero hace 6 años y constituyen la fuente de rebrotes utilizados como explantes primarios. De la planta donante se tomaron estacas de 25 a 30 cm. portadoras de 3 a 4 yemas laterales (Figura 1 CyD). Alternativamente se tomaron explantes de plantas de 1.5 años de edad establecidas en macetas en el invernadero.

3. Metodología

3.1 Manejo de Plantas donantes en invernadero

Las plantas donantes en invernadero (PDI) fueron tratadas con aplicaciones de fertilizante granular (10-30-10) a razón de 30 g/pl cada 6 meses. Las plantas fueron podadas cada 2 meses para garantizar el suministro de explantes para los ensayos de laboratorio y el riego se aplicó 2 veces por semana

Para el control fitosanitario de las PDI, se utilizó Benomyl (Benlate) a dosis de 3 g/l como fungicida sistémico y el bactericida Agrimicin a dosis de 3,5 g/l. Estas aplicaciones se realizaron con una frecuencia de 15 días, así como tres días antes de la colecta de los explantes.

El control fitosanitario de las plantas de 1,5 años en invernadero (Figura 1B), se realizó a través de la aplicación semanal de Benomyl (Benlate 3 g/l) y Streptomicina+terramicina (Agrimicin 3,5 g/l) y riego diario a nivel de sustrato.

Estas condiciones garantizaron el suministro de explantes con buena asepsia en forma permanente, ya que después de una colecta de material (Fig. 1 C y D), a los 25 días se tiene nuevamente disponibilidad de explantes.



Figura 1. Fuentes de material para introducir al laboratorio. A). Planta donante establecida en el suelo. B). Planta donante establecida en macetas. C). Colecta de estacas. D). Explante nodal listo para la desinfección.

3.2 FASE DE INICIACIÓN

3.2.1 Establecimiento de cultivos asépticos

La limpieza de los explantes se realizó en el laboratorio mediante un lavado de las estacas con agua y jabón, seguido del aislamiento de los explantes nodales de 2 a 2.5 cm. de long. (Figura 1D).

La determinación de la desinfección superficial de los explantes se realizó evaluando 34 tratamientos de desinfección realizados en forma simultánea (Anexo 2). Estos tratamientos permitieron evaluar el efecto de tres desinfectantes:

- Hipoclorito de Calcio [$\text{Ca}(\text{ClO})_2$], se evaluó en doble desinfección al 10% y al 8% durante 20 y 15 minutos respectivamente, seguido de 3 enjuagues en agua destilada estéril después de cada desinfección. Esta doble desinfección se repitió aumentando los tiempos de inmersión en hipoclorito a 30 min.(10%) y 20 min. (8%) respectivamente.

- Hipoclorito de Sodio (NaClO): se evaluó su efecto en una simple desinfección con tres concentraciones, al 25, 50 y 75% (v/v) y dos tiempos de inmersión durante 15 y 25 minutos, seguidos de 3 lavados en agua destilada estéril.

- Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2): su efecto se evaluó en una simple desinfección a concentraciones de 25, 50 y 75% durante 15 y 25 min. de inmersión, seguido de tres enjuagues en agua destilada estéril.

Para todos los casos y en forma alterna se evaluó el efecto del tratamiento de 15 minutos en bomba de vacío durante la inmersión en el desinfectante, con el fin de mejorar su acción (Anexo 2).

Asimismo, se evaluó el efecto de diferentes antibióticos sobre la contaminación bacteriana para lo cual se estableció un ensayo que permitiera estudiar la eficiencia de antibióticos como el Agrimicin (3 g/l); el Sulfato de Gentamicina (40 mg/l) y Sulfato de Streptomicina (300 mg/l).

3.2.2 Selección del medio de cultivo básico

Para el cultivo de microestacas se utilizó tres formulaciones de sales minerales básicas en dos niveles de concentración. Se utilizó las sales de los medios MS (Murashige y Skoog, 1962), WPM (Lloyd y Mc Cown 1980), SH (Shenk y Hildebrandt 1972) en concentraciones del 50 y 100% de su formulación original en macronutrientes, micronutrientes y vitaminas (Anexo1). Además se adicionó sacarosa al 0,15% como fuente de carbono y agar-agar como gelificante 7 g/l. Todos los medios fueron ajustados a un pH de 5.8

3.2.3 Influencia de la Sacarosa

Con el fin de determinar el nivel óptimo de la fuente de carbono se evaluó concentraciones de sacarosa de 10, 15, 20, 30, 40 y 50 g/l. En todos los tratamientos se utilizó el medio SH completo, antibióticos y 7 g/l de agar como gelificante. El pH fue ajustado a 5.8

3.2.4 Reguladores de Crecimiento

Para determinar el nivel óptimo de los reguladores de crecimiento durante la fase de iniciación, se realizó un diseño factorial auxina-citocinina con concentraciones crecientes de AIB (ácido indolbutírico) y 2-ip [6-(?,?-Dimethylallylamino) purine] (Cuadro 1).

Cuadro 1. Combinaciones de diferentes concentraciones de los reguladores del Crecimiento el 2-ip y el AIB en el medio de cultivo de explantes nodales de Caoba en la Fase de Iniciación (mg/l).

2-ip \ AIB	0	0.5	1.0	2.0
0	1	5	9	13
0.5	2	6	10	14
1.0	3	7	11	15
2.0	4	8	12	16

Cada unidad experimental consta de 4 explantes con 3 repeticiones, en total 12 explantes por tratamiento.

3.3 FASE DE MULTIPLICACIÓN

3.3.1 Efecto de las Citocininas

En la fase de multiplicación se evaluó el efecto individual de tres citocininas de uso frecuente, el 2-ip; la BAP y la Kinetina en concentraciones de 0,5; 1,0; 2,0 y 4,0 mg/l. Los cultivos se realizaron en frascos gerber los cuales contenían 30 ml de medio de cultivo. Los explantes fueron inoculados en posición horizontal sobre el medio de cultivo.

En ésta fase se utilizó el medio básico de SH, se adicionó sulfato de streptomycin (300 mg/l), para controlar la acción bacteriana, sacarosa al 3% y agar (0,07%) como gelificante. El pH fue ajustado a 5.8. Además, se procedió a reciclar o volver a cultivar el explante nodal inicial o

primario después del desarrollo de la yema axilar en brote. Este brote primario fue aislado y el explante inicial fue puesto en cultivo para dar origen a una segunda generación de brotes.

3.4 Condiciones físicas de cultivo

Los cultivos se colocaron en cuartos de crecimiento con intensidad lumínica de 2000 lux generados con tubos fluorescentes, tipo luz blanca, por un fotoperiodo de 12 horas. La temperatura en el día se registró en $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa fue de $75 \pm 3\%$

3.5 Histología

Se tomó muestras de explantes de diferentes tratamientos en cultivo *in vitro*, para determinar la presencia de fenoles en las diferentes etapas de cultivo y su posible efecto en el desarrollo y multiplicación de los brotes.

Todas las muestras fueron fijadas en una solución de FAA (etanol 95°, agua destilada, formalina y ácido acético, en proporciones de 10:7:2:1), luego fueron deshidratadas en una serie ascendente de alcohol etílico (50-70-80-90-95-100-100) permaneciendo una hora en cada alcohol, seguido de la infiltración en Historesina (Reichert-Jung) a 4°C durante toda la noche. Finalmente se hicieron bloques que fueron cortados a 4 μm de grosor y teñidos con la técnica Schiff- Naphthol Blue Black (CIRAD 1989).

3.6 Análisis estadístico

3.6.1 Diseño experimental

Para cada ensayo se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con o sin diseño factorial de los tratamientos y se realizó un análisis de variancia (ANDEVA) para comparar medias. En algunos casos se utilizó el análisis de Polinomios Ortogonales para hacer comparaciones entre grupos y las pruebas de Comparaciones Múltiples de Duncan ó Tukey y LSMeans. Se utilizó el procedimiento GLM del programa estadístico SAS para analizar los datos.

3.6.2 Variables de estudio.

Las variables evaluadas en los diferentes ensayos experimentales son las siguientes:

i). Asepsia de explantes

Se realizaron observaciones cada 5 días para determinar el porcentaje de incidencia de hongos, bacterias y fenoles hasta los 25 días. Para determinar la presencia de contaminantes fúngicos se basó en la identificación visual de estructuras algodonosas generalmente sobre el medio de cultivo, las bacterias se identifican por su apariencia lechosa y se manifiestan dentro del medio de cultivo, los fenoles se caracterizan porque provocan un cambio de coloración al medio de cultivo a un color bronceado.

ii). Número de brotes por explante

Se registró el número de brotes por cada explante y se promedió por la unidad experimental

iii). Longitud de brote

Se midió desde la inserción del brote hasta el extremo superior, incluyendo el peciolo de la hoja, se tomó el promedio de la unidad experimental. En este caso no hubo crecimiento longitudinal del brote, aunque si hubo desarrollo de hojas.

iv). Altura de ápice

Se midió desde la inserción del brote hasta el extremo apical en centímetros para aquellos brotes que mostraron crecimiento longitudinal con formación de entrenudos alargados y hojas.