

IV. RESULTADOS

1. Establecimiento de cultivos asépticos

Las observaciones y el registro de datos durante los 25 días de evaluación de los tratamientos de desinfección permitieron determinar diferencia altamente significativa entre los tratamientos. El Cuadro 2, muestra que el grupo de tratamientos con hipoclorito de calcio, presentó el mayor porcentaje de asepsia de los explantes con un valor promedio de 37,47%, con relación a los otros grupos. La comparación entre el hipoclorito de calcio y el hipoclorito de sodio, refleja una diferencia significativa ($\text{prob} > 0.022$); la cual se incrementa si se compara el efecto del hipoclorito de calcio con respecto al peróxido de hidrógeno ($\text{prob} > 0.0001$).

Cuadro 2. Comparación de la respuesta de los explantes nodales de Caoba a los diferentes grupos de desinfectantes en %. Comparación por Contrastes a un a 5%

| Producto | Hongos | Bacterias | Fenoles | Muertos | Asepticos | Prob> F |
|-----------------------|--------|-----------|---------|---------|-----------|---|
| Hipoclorito de Calcio | 15 | 29.1 | 6.6 | 10.8 | 37.47 | HC vs HS 0.022 |
| Hipoclorito de Sodio | 14.5 | 30.5 | 0.69 | 27.0 | 26.36 | HS vs H ₂ O ₂ 0.0008 |
| Peroxido de Hidrógeno | 34 | 46.5 | 2.7 | 4.16 | 12.47 | HC vs H ₂ O ₂ 0.0001 |

Prueba de HC= Hipoclorito de Calcio; HS= Hipoclorito de Sodio

El tratamiento con hipoclorito de sodio es efectivo para el control de contaminantes, manifestando una asepsia de los explantes del 26,36%. Sin embargo, tiene la desventaja de presentar el mayor número de explantes muertos (27%), debido a la quema de los explantes por el efecto del producto, a diferencia de los tratamientos con hipoclorito de calcio (10,8%) y con peróxido de hidrógeno (4.16%), donde se refleja claramente el efecto detrimental de este desinfectante sobre el explante.

En el grupo de tratamientos con peróxido de hidrógeno se observó que del 80,5% de explantes nodales contaminados, el 46,5% se debió a bacterias (Cuadro 2, Figura 4A) y el

34% fue ocasionado por hongos (Cuadro 2, Figura 4B). Asimismo, se observó un 2,7% de explantes fenolizados y el 4,16% de explantes muertos.

La Figura 2 muestra la relación entre tratamientos y entre grupos de desinfectantes. Claramente se identifica a los tratamientos 6, 16, 1, 3, 18 con los más altos niveles de asepsia.

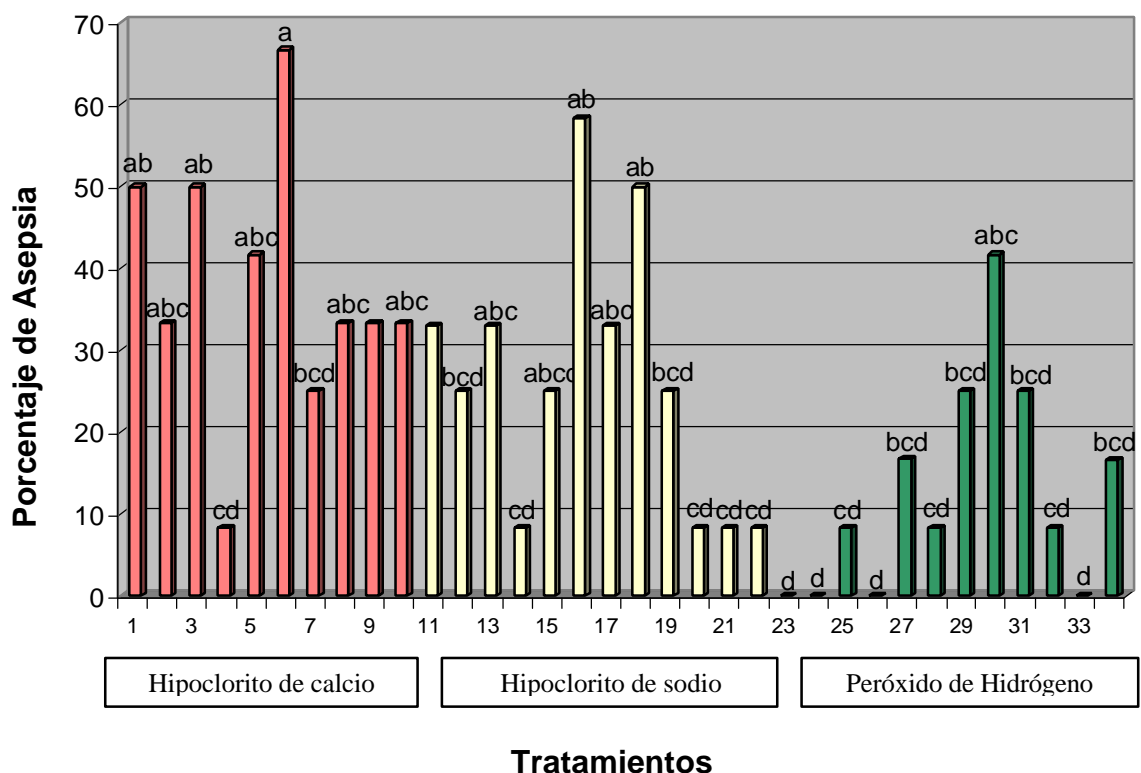


Figura 2. Porcentaje de asepsia de explantes nodales de Caoba tratados con diferentes desinfectantes superficiales. Letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba Duncan (a 5%).

En el grupo de tratamientos con hipoclorito de calcio está el tratamiento que tiene el mejor efecto. El hipoclorito de calcio al 10% en 20 minutos de inmersión y sin aplicación de bomba de vacío, presentó el nivel más alto de asepsia con 66,67% a los 25 días de la siembra (Tratamiento 6). En éste tratamiento la mayor contaminación se debió a bacterias con un 25%, asimismo se observó un 8,3% de explantes muertos no atribuibles a

contaminantes, no hubo incidencia de hongos ni fenoles. Los niveles de asepsia de 50% también son interesantes para tomar en cuenta (Tratamiento 1 y 3).

El hipoclorito de sodio, también fue efectivo para el control de contaminantes. El tratamiento 16 (NaClO al 50% con inmersión durante 15 minutos y sin bomba de vacío) fue el mejor del grupo y el segundo de todos los tratamientos evaluados, permitiendo un 58,3% de asepsia. En éste caso se observó un 25% de contaminación debido a bacterias; un 8,3% por hongos y además un 8,3% de explantes muertos, no hubo presencia de fenoles.

A diferencia de los desinfectantes anteriores, el peróxido de hidrógeno no mostró ser muy efectivo para la desinfección de explantes nodales de Caoba, debido a que manifestó los niveles más altos de contaminación por bacterias y hongos. Aunque la desinfección en peróxido de hidrógeno al 50% durante 25 minutos y sin bomba de vacío logró un 41,6% de explantes asépticos, la media del grupo (12,47%) está por debajo de lo deseado.

Se determinó que el hipoclorito de calcio controla con eficacia los contaminantes externos, no obstante, también se observó que la influencia de las bacterias endofíticas permanece latente, debido a que los explantes llevan internamente bacterias que cuando son establecidos en condiciones asépticas se manifiestan. Para los tres desinfectantes utilizados la presencia de bacterias fue casi el doble con respecto a los hongos (Cuadro 2).

La evaluación separada de tres antibióticos adicionados al medio de cultivo (agrimicin 3 g/l, sulfato de gentamicina 40 mg/l y sulfato de streptomicina 300 mg/l), permitió determinar que el agrimicin ejerció el mejor control de bacterias con solo un 12% de contaminación a los 15 días de establecido el ensayo, comparado al control sin antibiótico que presentó un 72% de explantes contaminados (Figura 3). Además, a pesar de que en el tratamiento con sulfato de streptomicina se presentó mayor contaminación bacterial (20%) que en el tratamiento con agrimicin, no se mostró diferencias significativas entre ambas. En este caso, la contaminación por hongos, fue estable con valores bajos lo cual refleja el efecto del hipoclorito de calcio utilizado como desinfectante (Cuadro 6 y 7, Anexo 2).

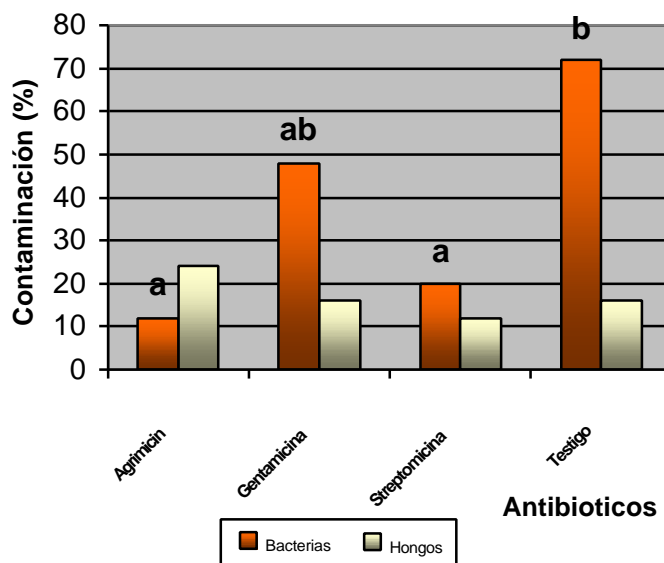


Figura 3. Porcentajes de contaminación bacteriana de explantes nodales de Caoba en presencia de diferentes antibióticos. Letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba Tukey (α 5%).

El cuadro 2, también muestra que la liberación de fenoles en el medio de cultivo no fue significativa y por tanto, no incidió sobre los niveles de asepsia. (Figura 4C).

En un corte histológico de los explantes se verificó la presencia de fenoles dentro del tejido de la planta a nivel de la epidermis y parénquima cortical. Sin embargo, no se registró la liberación de fenoles al medio de cultivo (Figura 5).

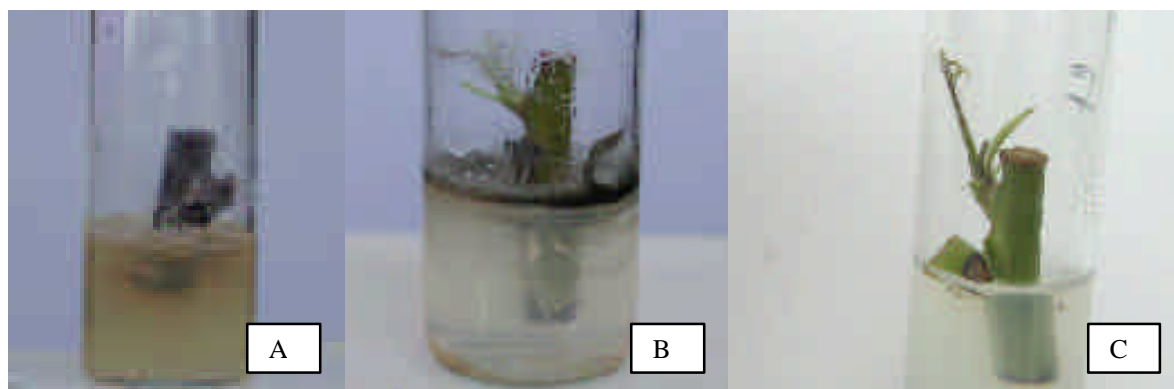


Figura 4. Contaminación de explantes nodales de Caoba causado por bacterias (A), hongos (B) y explante libre de contaminantes y sin presencia de fenoles (C).

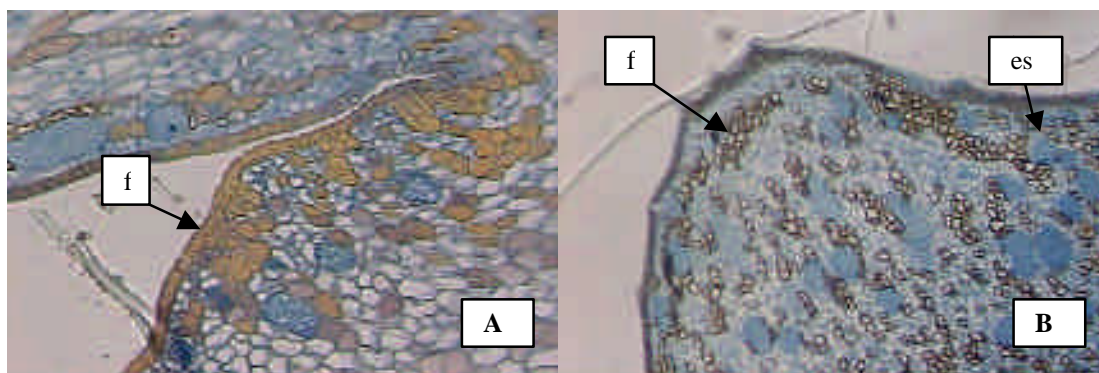


Figura 5. Histología de secciones longitudinales de explantes de Caoba. 5A. Región axilar del ápice de brote de Caoba, con presencia de fenoles (f). 5B. Meristemo apical de Caoba donde se muestra los fenoles (f) y estructuras secretoras (es)

2. Influencia del medio de cultivo básico

En la evaluación del efecto de las sales minerales del medio de Murashige y Skoog (MS), de Lloyd y McCown (WPM) y el de Shenk y Hildebrandt (SH) se utilizó como variables de respuesta, el número de brotes por unidad experimental y la longitud del brote en centímetros (Figura 6).

Con relación a la variable número de brote, se encontró diferencia significativa al analizar la interacción entre los factores medio de cultivo básico y sus concentraciones de 50 y 100% (prob.>0.0322). Lo que quiere decir que hay un medio de cultivo básico que es diferente pero a un cierto nivel de concentración (Cuadro 1, Anexo 3). Contrariamente, para la variable longitud de brotes, solo se detectó diferencia significativa (prob.>0.0119) entre las concentraciones utilizadas y no entre los medios de cultivo básico (Cuadro2, Anexo 3).

En la variable número de brotes un efecto significativo se presentó entre el medio de cultivo básico SH al 100% de su concentración y el medio WPM al 50%. No se observó diferencia significativa entre el medio de cultivo básico SH y MS en sus dos concentraciones, aunque el medio SH al 100% logró el mejor número de brotes (1,77). El medio WPM muestran los valores más bajos para ambas concentraciones.

Para la variable longitud de brote no se observa diferencia significativa entre medios de cultivo básico, sin embargo el medio SH al 100% tiene la mayor longitud promedio de brotes (1,25 cm) seguido del medio WPM al 100% (1,15 cm). El medio MS mostró los valores más bajos para esta variable.

Por lo tanto el medio SH al 100% tiene el mejor efecto para ambas variables (Cuadro 4, Anexo 3). La Figura 7, muestra el desarrollo de los brotes en presencia del medio WPM al 50% (A) y del medio SH al 100% (B). En el primer caso se observó la emisión un brote sin desarrollo del eje longitudinal y en el segundo caso se muestra un brote con crecimiento en longitud y desarrollo de hojas.

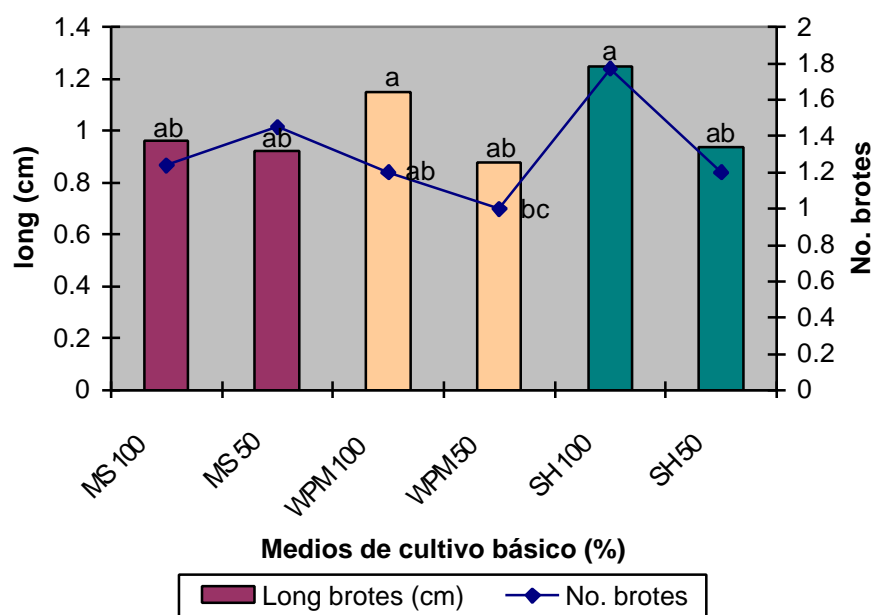


Figura 6. Número y Longitud (cm) de brotes obtenidos en la fase de iniciación durante el cultivo de explantes nodales de Caoba con diferentes medios. Letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba Duncan (a 5%).



Figura 7. Respuesta de los explantes a los medios de cultivo básico. A.Desarrollo del brote en presencia del medio WPM al 50% y B.Desarrollo del brote de una microestaca cultivado en el medio SH al 100%

3. Influencia de la Sacarosa

En este ensayo se utilizó el medio de SH al 100% con la adición de 300 mg/l de sulfato de streptomina. Entre las variables de respuesta evaluadas (longitud de brotes, número de brotes y altura de ápice), se determinó que sólo existen diferencias estadísticamente significativas para la altura del ápice (Figura 8). El mejor efecto fue obtenido con la concentración de 50 g/l de sacarosa, lo cual difiere significativamente del tratamiento con 10 g/l de sacarosa. No obstante, la concentración de 15 g/l de sacarosa, también manifiesta un valor medio para ésta variable nada despreciable comparativamente con la dosis de 50 g/l con el mejor tratamiento.

Asimismo, es en la concentración de 15 g/l de sacarosa donde se observó el mejor promedio para la longitud de los brotes (1.1780 cm).

Con respecto al número de brotes no se observó diferencia significativa entre tratamientos, sin embargo a concentraciones de 15, 40 y 50 g/l de sacarosa se logró la mejor respuesta (Figura 9).

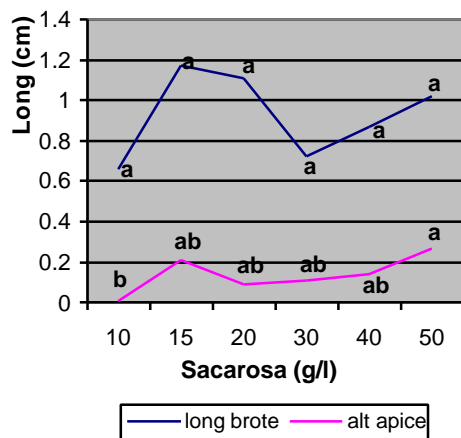


Figura 8. Desarrollo de los brotes axilares de Caoba (long. del brote, altura de ápice) en presencia de diferentes concentraciones de sacarosa. Letras iguales no son significativamente diferentes según Tukey a 5%.

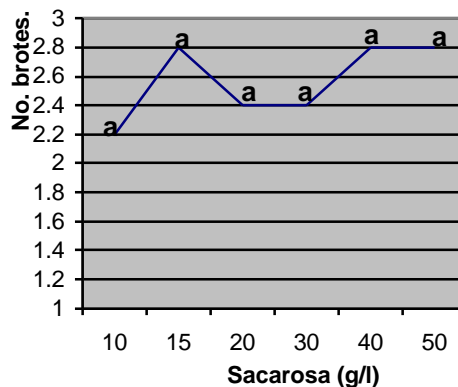


Figura 9. Número de brotes obtenidos en explantes nodales de Caoba cultivados en diferentes concentraciones de sacarosa. Letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba Tukey a 5%.

4. Influencia de Reguladores de Crecimiento

Las variables evaluadas en este experimento (número de brotes, longitud de brotes y altura de ápice) bajo diferentes niveles de 2-ip, AIB y sus interacciones, sólo mostraron diferencias significativas, para el número de brotes en presencia de AIB (Figura 10). El mayor número de brotes (3.8) se obtuvo utilizando 0,5 mg/l de AIB, mientras que el menor número se obtuvo en presencia de 2 mg/l del mismo regulador. Además, la concentración de AIB 0,5 mg/l resultó ser la mejor para las variables longitud de brote y altura de ápice, aunque no se presentan diferencias significativas con otros tratamientos (Figura 11 y 12).

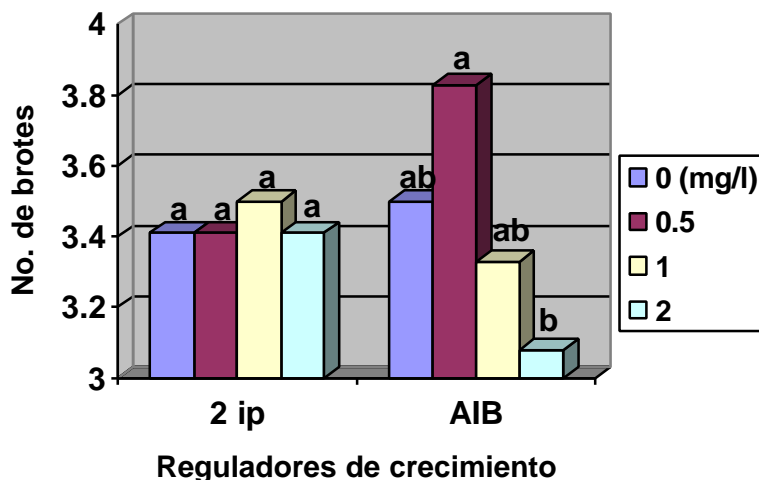


Figura 10. Respuesta de los explantes nodales de Caoba a las diferentes dosis de reguladores de crecimiento (2-ip y AIB) para la variable número de brotes. Letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba Duncan (α 5%).

Los tratamientos con 2-ip mostraron que la concentración de 1.0 mg/l presentó los mejores resultados, con un número de brotes de 3.5 (Figura 10) y con una altura de ápice promedio de 0,19 cm, (Figura 12). Este regulador de crecimiento no mostró efecto significativo sobre la variable longitud de brote (Figura 11), aunque se observó la presencia de algunas yemas dormantes sobre el eje longitudinal (Figura 14A).

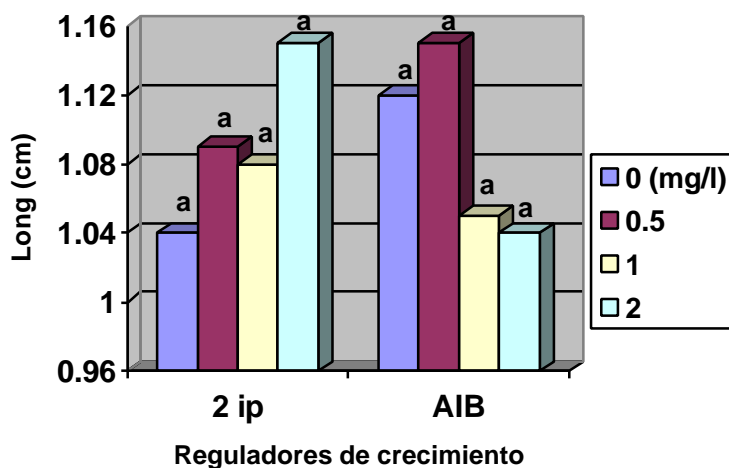


Figura 11. Respuesta de los explantes nodales de Caoba a las diferentes dosis de reguladores de crecimiento para la variable longitud de brotes. Letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba Duncan (α 5%).

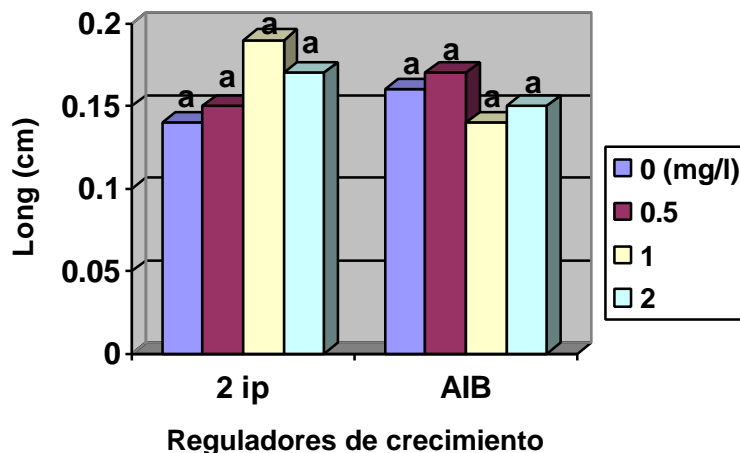


Figura 12. Respuesta de los explantes nodales de Caoba a las diferentes dosis de reguladores de crecimiento para la variable altura de ápice. Letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba Duncan (a 5%).

Se observa que aunque el análisis de la interacción entre la 2-ip y el AIB no manifestó diferencias significativas, se encontró que la combinación 1.0 mg/l de 2-ip con 0.5 mg/l de AIB permitió la mejor respuesta de desarrollo de los explantes (Figura 13); lo cual corresponde a la interacción de los mejores concentraciones individuales.

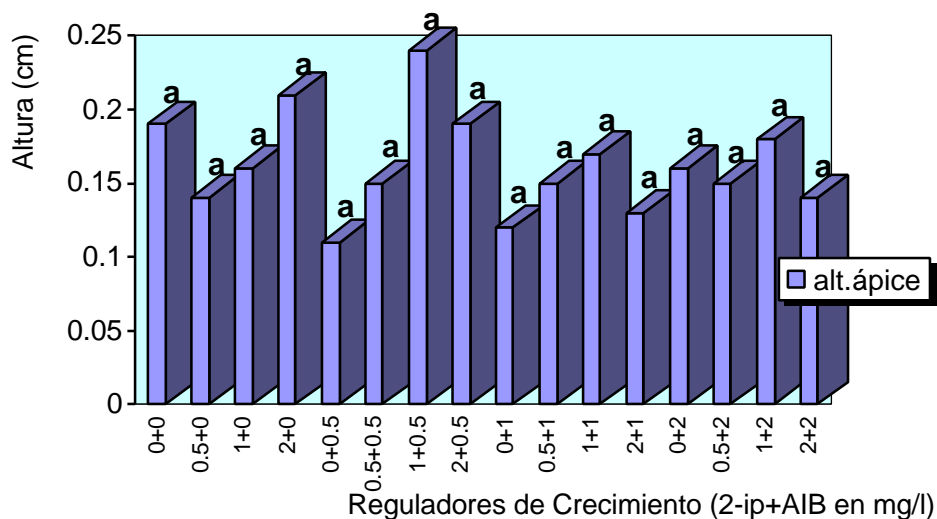


Figura 13. Respuesta de los explantes nodales de Caoba a diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento para la variable altura de ápice. Letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba Duncan a 5%

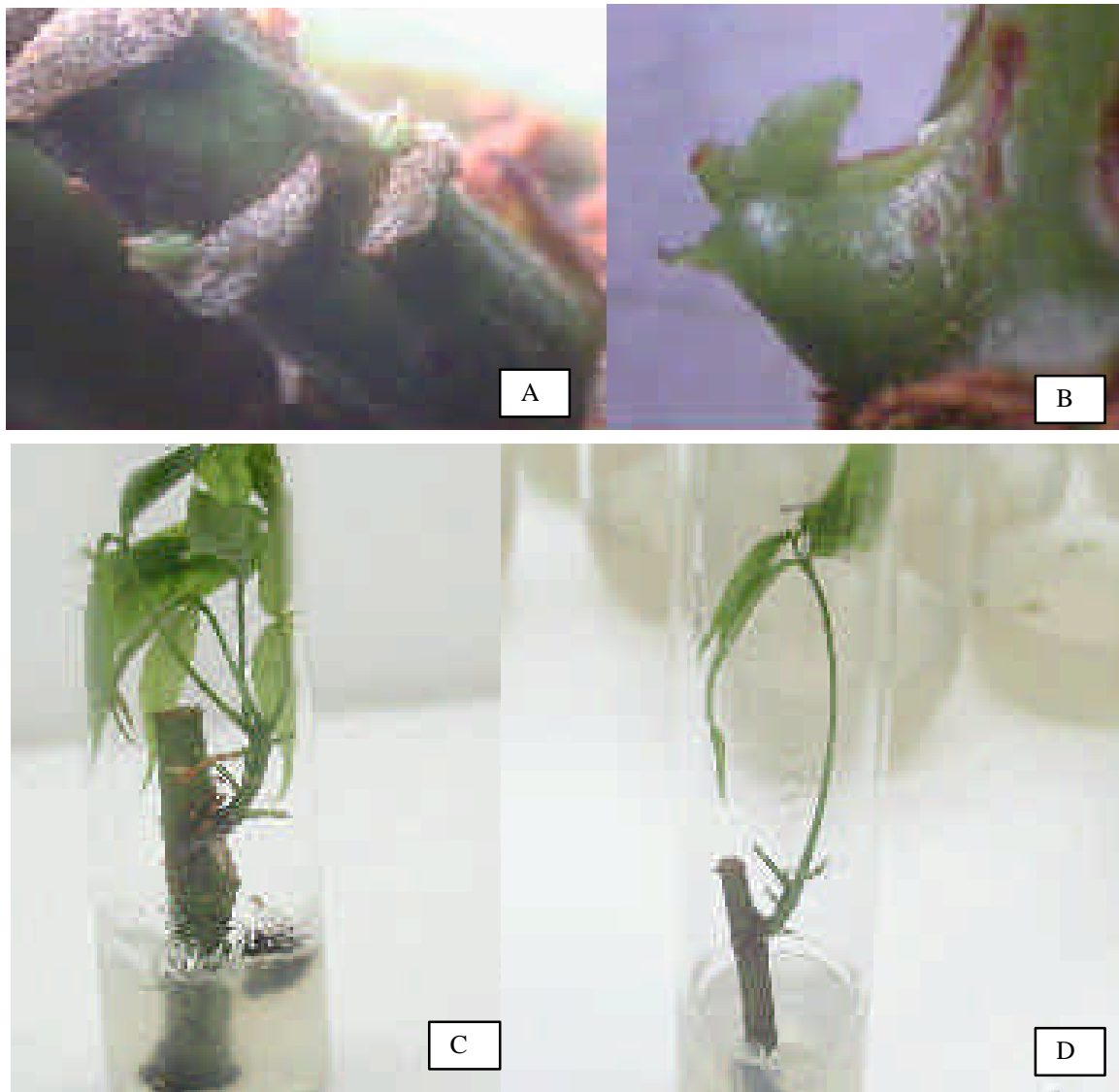


Figura 14. Desarrollo de yemas axilares de Caoba en presencia de reguladores de crecimiento (2-ip y AIB). A). Yemas axilares dormantes en brotes alargados, B). Apertura de las estípulas é iniciación del crecimiento de los primordios foliares, C). Alargamiento del ápice, D). Alargamiento del peciolo.

La Figura 14 muestra las diferentes respuestas observadas en el desarrollo de la yema axilar durante el cultivo de explantes nodales de Caoba bajo la interacción del 2-ip y el AIB. La Figura 14A muestra un brote poco alargado, portando varias yemas dormantes. Asimismo un detalle de una de esas yemas muestra la apertura de estípulas y la iniciación del crecimiento de los primordios foliares (Figura 14B). Las Figuras 14 C presenta el crecimiento longitudinal del brote con un crecimiento exagerado del peciolo en algunos casos (Figura 14 D).

5. Niveles de Citocininas

El desarrollo de brotes secundarios sobre explantes nodales primarios después del reciclaje, permitió mostrar la superioridad de la BAP en todas las concentraciones utilizadas, con respecto a la 2-ip y la Kinetina (Figura 15). La concentración de 0.5 mg/l de BAP produjo un promedio de 2,33 brotes por explante mostrando diferencias estadísticas significativas con respecto a los otros tratamientos (Cuadro 1 y 2; Anexo 6).

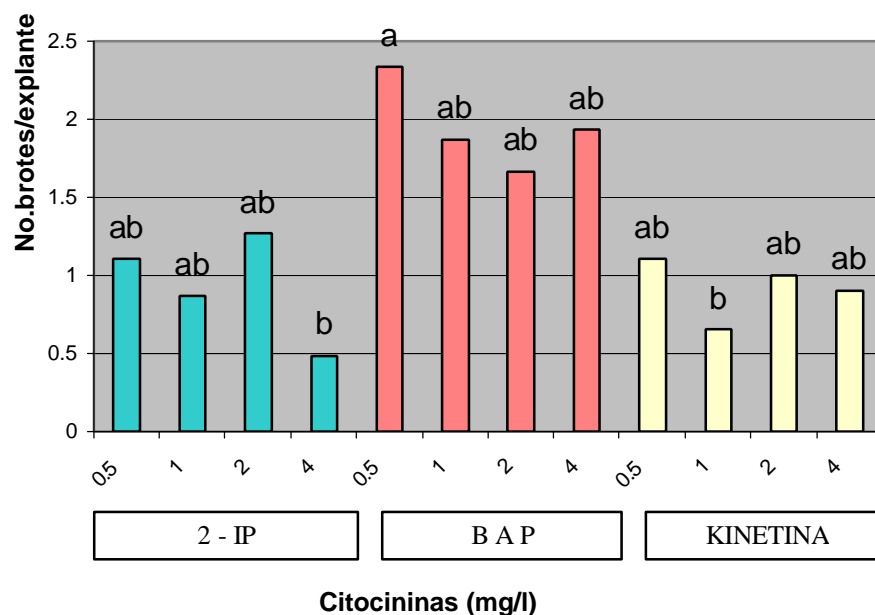


Figura 15. Respuesta de explantes nodales de Caoba para la emisión de brotes secundarios en presencia de diferentes citocininas y diferentes concentraciones de citocininas. Letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba Tukey a 5%

En la Figura 16 se muestra el desarrollo de brotes secundarios en explantes reciclados en presencia de Kinetina (Figura 16 A) y bajo el efecto del 2-ip (Figura 16 B). Asimismo, en las Figuras 16 C y D se observa claramente la superioridad del efecto de la BAP sobre el número de brotes, así como sobre el desarrollo de los mismos. Independientemente de la citocinina utilizada, cabe destacar la importancia de la práctica de reciclaje de explantes primarios, la cual permitió en algunos casos la obtención de más de dos brotes por explante así como el desarrollo de brotes más vigorosos con entrenudos alargados (Figura 18 D y E). Este desarrollo por un lado, permite continuar con la fase de multiplicación y por otro hace posible trabajar en la etapa de enraizamiento de los brotes y aclimatación de las vitroplantas enraizadas.

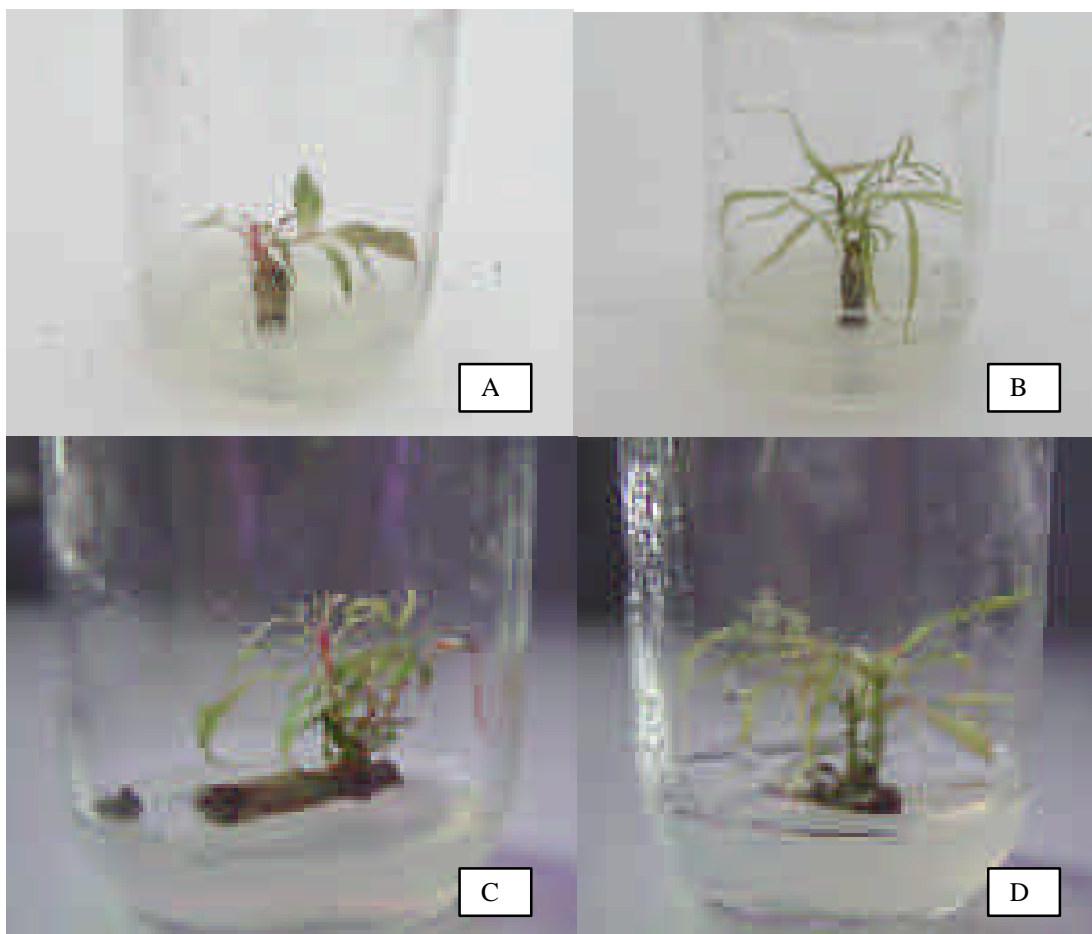


Figura 16. Emisión de brotes secundarios en explantes nodales de Caoba después del reciclaje del explante primario y su cultivo en diferentes concentraciones de BAP, 2-IP y KINETINA. Respuesta del explante a la Kinetina (A). Respuesta del explante al 2-ip (B). Respuesta de los explantes nodales secundarios de Caoba a la BAP a 0.5 mg/l de concentración (C y D).

