

V. DISCUSIÓN

Establecimiento de cultivos asépticos.

La efectividad del hipoclorito de calcio en la desinfección de materiales vegetales según lo sugerido por Montoya Henao (1991), fue confirmado en el curso de ésta investigación. En Caoba, este desinfectante manifestó la mejor respuesta con un 66,66% de asepsia de los explantes nodales a los 25 días al ser comparado con el hipoclorito de sodio y el peróxido de hidrógeno. Este mismo desinfectante también dio buen resultado con otras especies leñosas como en *Hevea brasiliensis* (Enjalric 1982) y Abedul (*Betula sp*) donde se utilizó en concentraciones al 7% (Welandar 1993). En microestacas de cacao mostró gran efectividad cuando se utilizó al 10% durante 40 minutos (Lardet *et al.* 1998).

El hipoclorito de sodio, al igual que el anterior, también es utilizado para la desinfección de explantes de muchas especies arbóreas como *Protea repens*, donde secciones de brotes fueron tratadas con hipoclorito de sodio al 2% (Rugge, 1995). En *Larix decidua* Mill, se desinfectó yemas dormantes de ramas de árboles (Diner 1995) y en *Morus cathayana*, *M. Ihou* y *M. serrata*, se desinfectó brotes jóvenes de plantas adultas (Pattnaik 1997).

Para la desinfección de brotes apicales de *Ficus carica* L. (Deshpande 1998) y *Ficus religiosa* L. (Kumar 1998), también se utilizó hipoclorito de sodio al 1% y 10% respectivamente, lográndose valores del 95% de brotes asépticos en el primer caso.

En el caso de explantes nodales de Caoba, se logró valores del 58% de asepsia, niveles nada despreciables en otras especies. Sin embargo, el problema observado con este desinfectante, es que provoca un mayor número de explantes muertos (27%) con relación al hipoclorito de calcio (10.8%).

Con respecto al peróxido de hidrógeno, los resultados de 12,47% de asepsia a los 25 días, muestran el bajo control de este desinfectante sobre contaminantes fúngicos y bacteriales. No obstante, algunos autores recomiendan complementar su uso con otras sustancias como cloruro de mercurio é hipoclorito de sodio (Diner 1995). Esta combinación fue utilizada

con éxito en yemas de ramas dormantes de *Larix decidua* Mill (Dinner 1995), en brotes de árbol del pan (*Artocarpus* sp) y en *Populus* sp. (Bonga y Durzan 1982).

Es importante destacar que los niveles de asepsia logrados en la fase inicial de cultivo responden al manejo de las plantas donantes en el invernadero con aplicaciones preventivas de Benlate (3 g/l) y Agrimicin (3.5 g/l). Esto permitió el control de contaminantes endofíticos, lo cual se manifestó en la baja incidencia de contaminantes microbiales *in vitro*. Sin embargo, la recolección de explantes en época lluviosa, aumentó la expresión de contaminantes, especialmente bacterias, a pesar de los tratamientos preventivos. Rugege (1995), encontró que en *Protea repens*, el tratamiento a las plantas madres en condiciones controladas de invernadero disminuyó significativamente la incidencia de hongos y bacterias hasta valores del 14% con aplicaciones preventivas de fungicidas de acción sistémica.

En nuestro caso, la adición de antibióticos al medio permitió reducir los niveles de contaminación bacterial del 72% en el testigo hasta valores del 12% en el tratamiento con el agrimicin. No obstante es interesante observar que la streptomycin permitió un 68% de asepsia, superior al agrimicin, lo cual es satisfactorio para continuar con las etapas posteriores de la micropropagación. Sin embargo, es bien conocido los efectos nocivos del uso de antibióticos en cultivo *in vitro*. Algunas bacterias permanecen “latentes” *in vitro*, y sólo son detectadas después de que una gran cantidad de plantas han sido propagadas. Asimismo el uso frecuente y en altas concentraciones pueden causar problemas y modificar la respuesta de los explantes (Leifert *et al.* 1991)..

Pollock *et al* 1983, mencionan que el grupo de antibióticos aminoglicósidos (Streptomycin, Neomicin, Gentamicin, Vancomycin, etc) comprende bactericidas de amplio espectro para bacterias Gram positivas y Gram negativas. Sin embargo, éstos antibióticos, aunque son efectivos pueden presentar diferentes grados de toxicidad hasta provocar la muerte del explante, siendo la streptomycin el menos tóxico de ellos.

Influencia de los medios de cultivo.

En el desarrollo de la fase inicial del cultivo de microestacas de Caoba, no hay una marcada influencia de los tres medios de cultivo utilizados, excepto para la variable, número de brotes, donde se manifiesta diferencias significativas en beneficio de las sales SH y MS. Esta respuesta refleja posiblemente la sensibilidad de estos explantes a medios con altas concentraciones de sales minerales, tal es el caso de los medios MS y SH. Algunos autores recomiendan la dilución de éstos medios a niveles del 50 y 25% de su concentración inicial, debido a que contienen altos contenidos de sales minerales especialmente N y K (Bonga y Von Aderkas 1992). Diferencias de respuesta a los medios de cultivo y su concentración han sido obtenidos en otras especies. Por ejemplo, en *Acacia mangium*, los brotes más altos fueron inducidos por concentraciones de dos tercios de SH y de tres cuartos del medio B₅, después de cuatro semanas de cultivo (Bon *et al.* 1998). Asimismo, el cultivo de embriones de *Quercus suber* L. fue superior utilizando los macronutrientes del medio SH combinado con micronutrientes del medio MS (García-Martín 2001).

Sin embargo, en otras especies se ha observado que la adición de sales minerales no es suficiente por lo que es necesario suplementar los medios con reguladores del crecimiento que permita obtener respuestas morfogénicas de los explantes.

En explantes nodales de *Ficus carica* L. cv. *gular* aunque se probó los medios de cultivo MS, B₅ y SH, no hubo desarrollo de brotes sin adición de reguladores de crecimiento aún después de 3 meses de cultivo. (Kumar *et al.* 1998).

De igual forma en *Azadirachta excelsa* (neem), aunque se evaluó el cultivo de segmentos nodales en las sales minerales básicas de los medios B₅, WPM y MS, solo la combinación del medio MS con 0.5 mg/l de BAP permitió el desarrollo de los brotes (Kamis y Abd Shukor 1997).

Contenido de Sacarosa

La influencia de la concentración de azúcar en el medio de cultivo *in vitro*, está relacionada a la edad y al tipo de explante, así como a la fase de cultivo. Embriones jóvenes, requieren una alta concentración de azúcar, mayor al 3%, durante la fase de maduración, no así otro

tipo de explantes (Sherrington y George 1984). En Caoba se asume que al utilizar explantes nodales con yemas axilares predeterminadas se cuenta con reservas propias que permitirán la emergencia de la yema. Esto ayuda a explicar porque no hay diferencias significativas entre concentraciones de sacarosa de 1.5% y de 5%. En otras especies como *Betula sp* (Welandar 1993) y el *Zanthoxylum rhetsa* (Augustine y D'Souza 1997), se adicionó, también un 2% de sacarosa en un medio MS y de igual manera se desarrolló con éxito el establecimiento de las etapas iniciales de la micropropagación, utilizando bajas concentraciones de sacarosa (2%).

García-Martín (*et al.* 2001) trabajando con brotes de *Quercus suber* coinciden al no encontrar diferencias significativas en concentraciones de sacarosa de 30 y 15 g/l, tampoco encontraron diferencias significativas en cuanto al desarrollo de brotes. Estos autores afirman que las bajas concentraciones de sacarosa inducen a un metabolismo autotrófico y favorecen la morfología normal de brotes. Dublín (1991), ya había manifestado que una disminución de los contenidos de sacarosa es a menudo favorable para el cultivo *in vitro*.

Reguladores de Crecimiento

George y Sherrington (1984), recomiendan el uso de altas concentraciones de citocinina y bajas concentraciones de auxina para promover la proliferación de brotes axilares. Esta relación concuerda con los resultados obtenidos en este estudio para la Caoba donde una relación 2:1 citocinina-auxina permitió la mejor respuesta en el crecimiento de brotes axilares. Aunque, Orellana (1997), utilizó solo un regulador de crecimiento para promover el alargamiento de los brotes obtenidos durante el cultivo de microestacas provenientes de semillas germinadas *in vitro*. Este autor logró un número promedio de 3,2 brotes por explante con altura promedio de 3.8 cm. cuando utilizó dosis de 0.5 mg/l de 2-ip en la fase de iniciación.

Smigocki y Owens (1999), manifiestan que el efecto de las auxinas y las citocininas sobre la morfogénesis de tejidos cultivados es relativo. La propagación de células de plantas en cultivo de tejidos requiere de ambos, auxinas y citoquininas y en muchos casos, la organogénesis es regulada por una total relación de citocinina-auxina, donde una alta

relación induce brotes y una baja relación induce raíz. De esta manera las citocininas promueven el desarrollo de brotes axilares al romper la dominancia apical regulada por la actividad auxínica del ápice. En concentraciones altas (1 a 10 mg/l) inducen la formación de brotes adventicios pero inhiben la formación de raíces (Beyl 2000).

Niveles de Citocininas

Esta etapa de la experimentación fue muy importante porque se logró por primera vez en el cultivo de explante nodales de Caoba, el desarrollo de brotes secundarios sobre el explante inicial. Esto se debió a varios factores; en primer lugar, se contó con una fuente alterna de plantas donantes en el invernadero mantenidas bajo condiciones fitosanitarias adecuadas, lo cual permitió la disponibilidad de explantes durante todo el periodo de experimentación. Además, la calidad superior de plantas donantes en el invernadero se reflejó en los bajos niveles de contaminación y la calidad superior de los brotes obtenidos en el laboratorio.

Es bien conocido que el buen manejo de plantas en el invernadero favorece el vigor de las mismas y las respuestas en la micropropagación, a través del buen uso de la luz, la temperatura, la fertilización y el control adecuado de plagas y enfermedades (Bonga y Von Aderkas 1992).

Asimismo, el suministro exógeno de citocininas contribuyó a obtener estas respuestas posiblemente con efecto sinérgico sobre la buena condición fisiológica de los explantes. Al utilizar diferentes citocininas (BAP, 2-ip, Kinetina) en concentraciones también diferentes, se observó la presencia de brotes en todos los casos. No obstante, que el número de brotes y la calidad de los mismos fue mayor para todos los tratamientos con BAP, la mejor relación se logró a la dosis de 0,5 mg/l de BAP. Respuestas interesantes han sido obtenidas en otras especies, donde concentraciones similares o mayores de 0,5 mg/l de BAP han propiciado el desarrollo de un buen número de brotes. De esta manera, Gamboa y Abdelnour, (1999), evaluaron el efecto de concentraciones BAP en microestacas de *Gmelina arborea* y encontraron las mejores respuestas a concentraciones de 0,5 y 1,0 mg/l. Asimismo, en *Zanthoxylum rhetsa* Roxb. especie forestal, Augustine y D'Souza (1997), encontraron que la concentración de 0.5 mg/l de BAP permitió un promedio de 1 brote por cada explante, de igual forma que la Kinetina. Sin embargo, a una concentración de 2.5 mg/l la Kinetina proporcionó 1.29 brotes mientras que la BAP produjo en prom. 1 brote.

La respuesta de la BAP como una citocinina que promueve la proliferación de brotes por explante en el nivel 0.5 mg/l. no es un resultado inesperado. Zaerr y Mapes (1985), ya mencionaban que la BAP es mucho más efectiva que la Kinetina, además de ser estable, barata y disponible en seguida. La razón para la gran efectividad del BAP puede estar en la habilidad del tejido vegetal para metabolizar la hormona, o bien en que la BAP podría inducir la producción de hormona natural tal como la Zeatina desde el interior del tejido.

Onay (2000), utilizó esquejes brotados de ramas terminales de plantas maduras de Pistachio (*Pistacia vera* L.), observando que la concentración de 1.0 mg/l de BAP fue la mejor con 3.8 brotes por explante.