



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGIA

DIFERENCIACION DE BROTES
ADVENTICIOS DE CAOBA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MARIA GUADALUPE BONILLA GONZALEZ



MEXICO, D. F.



2826

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

Mat. Margarita Elvira Chávez Cano
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Diferenciación de brotes adventicios de caoba"

realizado por María Guadalupe Bonilla González

con número de cuenta 9021592-6, pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Ing. Ma. Teresa de J. Olivera Flores

Propietario M. en C. Ignacio Javier Espinosa de los Reyes Bolaños

Propietario Biól. José Luis Busto Sánchez

Suplente Biól. Mario Gutiérrez Rodríguez

Suplente Biól. Josefina Herrera Santoyo

Consejo Departamental de Biología

Edna M. Suárez Díaz

Edna M. Suárez Díaz

DEDICATORIA

A mi madre que siempre me ha apoyado para lograr mis metas.

A toda mi familia , y a una persona muy especial: Raúl.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Mayte, que confió en mí para la realización de este proyecto, por sus enseñanzas e interés mostrados.

A todos mis compañeros del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales: Tere, Marina, Víctor, Gina, Laura, Anita, y Félix, por toda la ayuda brindada.

A los biólogos Josefina Herrera, José Luis Busto y Mario Gutiérrez, por su revisión y sugerencias para la realización de este trabajo.

Al Ing. Ignacio Espinosa por su comprensión y ayuda para la finalización de esta tesis.

A todos aquellos que me brindaron su ayuda.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS UTILIZADAS.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES.....	68
LITERATURA CONSULTADA	69
ANEXO.....	72

RESUMEN

Debido a que la caoba es una de las principales especies forestales del país, con un ciclo de vida largo y que presenta problemas fitosanitarios, además de ser sobreexplotada, resulta prioritario el estudio de diversas estrategias que permitan la obtención y multiplicación de esta planta.

El cultivo de tejidos, que es una rama de la biotecnología, permite dar una alternativa para la solución de estos problemas. Con el presente trabajo, se pretende dar un primer paso dentro de este campo, determinando las condiciones apropiadas, tanto para el establecimiento del cultivo aséptico, como del medio de cultivo, evaluando las respuestas organogénicas *in vitro*, tanto de ápices, como de cultivo de callos (provenientes de segmentos de hoja).

Durante el presente trabajo, se evaluó el número de brotes obtenidos, así como el porcentaje de oxidación presentado utilizando tres medios de cultivo distintos, el de Murashige & Skoog (1962), el de Heller (1953) y el de Lloyd & McCown (1981), (citados por Edwin y Sherrington, 1984), suplementados con las citocininas BAP y 2-ip con concentraciones de 4.3 a 14.3 y, 0.12 a 3.3 mg.L⁻¹, respectivamente.

Se logró la obtención de callo libre de oxidación a partir de segmentos de hoja, probando distintas soluciones como antioxidantes y diferentes tipos de envases.

Se determinó el tipo de auxina y la relación auxina/citocinina más favorable para la obtención de pequeñas estructuras radiculares en cultivos de callo.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

A.A.	Ácido Ascórbico
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenacético
BAP	6-bencilaminopurina ó benciladenina
C.A.	Carbón Activado
Kg cm ⁻²	Kilogramos por centímetro cuadrado
M	Molar
M&S	Medio de Murashige y Skoog (1962)
mg L ⁻¹	Miligramos por litro
mM	Milimolar
msnm	Metros sobre el nivel del mar
N	Normal
WPM	Medio de Lloyd y McCownm (1981)
μE m ⁻² s ⁻¹	Micro Einsteins por metro cuadrado por segundo
μM	Micromolar
2-ip	6-(γ, γ-dimetilalilamino) purina.

1. INTRODUCCIÓN

En México como en otros países existe un gran interés en reproducir especies arbóreas, debido a su alta demanda.

La técnica de micropropagación, resulta una alternativa viable para la obtención y mejoramiento de dichas especies, ya que éstas al tener un ciclo de vida muy largo, desde la siembra de la semilla hasta la floración, han hecho muy difícil el mejoramiento genético convencional de estas especies, además de que es muy difícil la continuidad de proyectos a largo plazo.

La reproducción por estaca ha sido uno de los procedimientos para la multiplicación de individuos sobresalientes; por ejemplo en Japón se ha practicado por siglos la propagación clonal de *Cryptomeria japonica* y en Alemania occidental y Finlandia se llevan a cabo otros importantes programas de este tipo con *Picea*. La experiencia con este tipo de programas, indica que en términos generales, el comportamiento de las estacas tiene mucho que ver con características fisiológicas del árbol como edad, vigor, lugar de corte de la estaca en el árbol y la estación del año en que se cortan. Se ha encontrado que entre más viejas son las estacas es más difícil su enraizamiento.

La diferenciación de brotes adventicios *in vitro*, puede ser una herramienta para la propagación de especies arbóreas como lo es la caoba. Esta diferenciación de brotes adventicios puede darse mediante una organogénesis directa o una organogénesis indirecta.

Posteriormente estos brotes adventicios pueden enraizarse y así formar plantas completas. Sin embargo existen varios factores que determinan la diferenciación de estos brotes. Algunos de los más importantes son: la fuente del inoculo, el medio de cultivo y los factores físicos.

Con este trabajo se pretende abrir el camino en la investigación de la caoba, ya que a partir del establecimiento de un cultivo *in vitro*, ya sea desde células indiferenciadas (callos) o la obtención de brotes adventicios, que posteriormente pueden dar origen a plantas completas, se puede realizar un mejoramiento genético obteniéndose así plantas resistentes a diversos patógenos, y alcanzar el desarrollo óptimo de esta especie que se ve afectada grandemente, por una sobreexplotación y por algunos insectos como lo es *Hypsipyla grandella*.

OBJETIVO GENERAL:

Establecer las condiciones adecuadas para el establecimiento de un cultivo *in vitro* que permita la diferenciación y multiplicación de brotes adventicios de caoba (*Swietenia macrophylla*).

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Establecer el cultivo aséptico *in vitro* de la caoba.
2. Determinar el mejor medio de cultivo en cuanto a sales inorgánicas y reguladores de crecimiento para el cultivo *in vitro* de ápices y segmentos de hoja.
3. Seleccionar las condiciones *in vitro* idóneas para evitar la oxidación de los dos distintos explantes.
4. Seleccionar el tipo de explante ideal (hoja ó ápice) para la obtención de brotes adventicios.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 LA CAOBA.

2.1.1 Importancia.

Sin duda la caoba es una de las especies mejor cotizadas por la industria forestal de las zonas tropicales de México, su madera se emplea en carpintería para la fabricación de muebles finos, decorado de interiores, muebles para instrumentos científicos de precisión, así como para instrumentos musicales (pianos), escultura, yates, chapas para madera contrachapada de alta calidad, hélices de avión. La caoba se utiliza como planta medicinal, ya que su corteza tiene propiedades astringentes, tónicas y febrífugas. En el estado de Nayarit se toma una infusión a partir de semillas para el dolor pecho. (Barrosa, *et al*, 1992 y Niembro, 1990).

La caoba además de tener una gran importancia económica, tiene gran importancia ecológica, ya que a partir del auge de la exportación de su madera, ha provocado una intensa tala de sus bosques, con lo cual estos se han visto reducidos y alterado la composición de sus especies, ésto también ha conducido a su empobrecimiento, ya que gran parte de la fertilidad de un bosque estriba en sus componentes vivos. La tala de una gran cantidad de árboles sin reforestación conduce a la larga a una disminución del número de especies y a la erosión del suelo. Por ejemplo los bosques de coníferas sembrados recientemente en algunas partes de los trópicos se encuentran en condiciones especialmente difíciles. Con el tiempo estos bosques extraerán todos los nutrientes del suelo sin restituir ninguno y la tierra quedará inutilizable para cultivos posteriores (Vickery, 1987, Colegio de Postgraduados, 1994).

La alta demanda de esta especie, y su poca reintroducción, la han llevado en algunos estados, como Tabasco, a estar en vías de extinción (Barrosa, *et al*, 1992).

2.1.2 Origen y distribución.

El término caoba en sentido estricto, se aplica a los miembros del género *Swietenia* de la familia Meliaceae, el cual comprende tres especies, todas nativas del neotrópico: *S. humilis*, *S. mahagoni* y *S. macrophylla* que es la más importante (Leakey R. R. B. and Newton, A. C. 1994).

Estas tres especies tienen distribuciones geográficas distintas. *Swietenia macrophylla*, llamada caoba de hoja ancha o caoba americana, tiene la distribución más amplia extendiéndose desde el paralelo 23° N en Veracruz (Vertiente del Golfo) hasta los 18° S en Bolivia, comprendiendo bosques de México, Centroamérica, Venezuela, Colombia, Perú, Ecuador, Brasil y Bolivia. En la vertiente del pacífico, se dispersa en una faja costera, que se extiende desde Sinaloa en México hasta Costa Rica. *Swietenia humilis*, tiene una distribución más limitada encontrándose sólo en la costa del pacífico en México y Centroamérica. *Swietenia mahagoni*, también llamada de hoja pequeña o del occidente de la india, también cubre un área limitada, desde el sur de Florida hasta las Islas de las Bahamas y las Antillas, excepto en Puerto Rico (Figura 1) (Lamb, 1966).

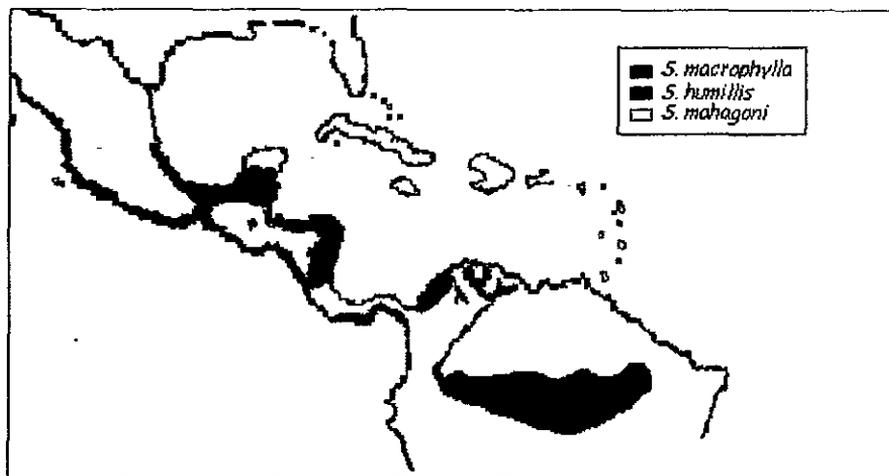


Fig.1. Distribución de las tres especies pertenecientes al género *Swietenia* en América.

2.1.3 Clasificación Taxonómica.

La caoba pertenece a la siguiente clasificación taxonómica (Martínez, 1997):

Reino:	Vegetal
División:	Embriofita
Subdivisión:	Angiosperma
Clase:	Dicotiledoneas
Orden:	Geraniales
Familia:	Meliaceae
Genero:	<i>Swietenia</i>
Especie:	<i>Swietenia macrophylla</i> , G. King.

Nombres Comunes de *S. macrophylla*.

Camacho (1988) y Pennington y Sarukhan (1968) mencionan que este árbol es conocido con diferentes nombres en México tales como:

Caobo

Cóbano: Tabasco.

Kanak-ché : Yucatán (lengua Maya).

Maccochucquiui: El Tajín, Veracruz (lengua Totonaca).

Mo-uá: (chinanteco).

Puná: (lacandon)

Punab: Yucatán (lengua Maya).

Rosadillo

Tsulsul: Chiapas (lengua Tzeltal).

Tutzul: Chiapas (lengua Tzeltal).

Tzopilo-cuáhuítl: lengua Azteca.

Tzopilotsontecomacuáhuítl: lengua Azteca.

Tzopilotzontecomatl: lengua Azteca.

Tzopiltzontecomatl: (náhuatl).

Tzulzul: Selva lacandona, Chiapas.

Zopilotl.

2.1.4 Descripción Botánica:

Tallo:

Tiene un fuste recto y cilíndrico, ligeramente acanalado con contrafuertes bien formados hasta de 2 a 3 metros de altura; es de copa ancha y redonda con ramificación robusta y bien distribuida, su follaje es denso, y mide 45 metros de altura, aunque Pennington y Sarukhan (1968), mencionan que puede llegar hasta los 70 metros de altura. Su diámetro normal va de 2 a 3.5 metros, su corteza es áspera, con ciertas escamas separadas de color marrón grisáceo en arboles viejos y gris claro en los jóvenes, internamente es rosada o roja, fibrosa de sabor amargo y astringente, el grosor total de la corteza va de 10 a 25 milímetros (Barrosa, *et al.*, 1992 y Pennington y Sarukhan, 1968).

La albura puede ser de color blanco a rosado, con vasos muy grandes, a veces abundantes, y bandas espaciadas de parénquima apotraqueal. La madera tiene un olor fragante muy característico (Pennington y Sarukhan, 1968).

Hojas:

Se encuentran dispuestas en espiral, paripinadas y algunas veces imparipinadas de 15 a 45 centímetros de largo, consta de foliolos de 3 a 6 pares, de 5 por 2 centímetros a 12 por 5 centímetros, lanceolados y ovalados muy asimétricos con el margen entero, ápice agudo, hasta finalmente acuminado, su base es asimétrica, generalmente aguda, raramente obtusa. El haz es de color verde amarillento o verde oscuro, mientras que el envés es verde pálido, ambas superficies son glabras y coriáceas, los peciolo son pulvinados, de 3 a 9 milímetros, glabros, las hojas son caducifolias en las zonas más secas donde se distribuye (Barrosa, *et al.*, 1992).

Flores:

Las flores de ambos sexos se encuentran en la misma inflorescencia, las masculinas son más abundantes que las femeninas, pero ambas dulcemente perfumadas. Las inflorescencias son panículas axilares de hasta 15 centímetros de largo, glabras. Las flores masculinas son actinomorfas, de 6 a 8 milímetros de diámetro; cáliz verde amarillento, muy pequeño, cortamente cupular, con 5 lóbulos redondeados, con 5 pétalos verde amarillentos, de 4 a 5 milímetros de largo, oblongos u oblongo-obovados. Con el ápice redondeado, con 10 estambres de color crema, de 4 mm de largo, los filamentos se encuentran unidos en un tubo estaminal campanulado, con el margen agudamente 10-lobulado; anteras incluidas en el cuello del tubo; nectario anaranjado, pateliforme lobado, rodeando la base

del ovario; ovario rudimentario, 5 a 6-locular, cada lóculo con numerosos óvulos muy pequeños; estilo grueso, llegando a la base del tubo estaminal, terminado por un gran estigma peltado. Las flores femeninas son muy parecidas a las masculinas, pero con las anteras muy pequeñas, indehiscentes y sin polen y un ovario muy grande y ovoide que llena el tubo estaminal, con óvulos bien desarrollados; toda la flor excepto el nectario es glabra en ambos sexos. Florece de abril a junio (Pennington y Sarukhan, 1968 y Barrosa *et al.*, 1992).

Frutos:

Son cápsulas leñosas de color gris claro y corteza lisa de forma ovoide u oblongas que contienen de 45 a 70 semillas. Miden de 10 a 18 centímetros de largo y de 8 a 10 centímetros de diámetro, valvadas, dehiscentes desde la base, su pedúnculo va de 10 a 20 centímetros de longitud y un centímetro de diámetro. Las semillas, son de color rojo amarillento, esponjosas, frágiles y aladas. Su tamaño es de 1 centímetro de largo, con un ala de 6 a 7 centímetro de largo, y de 2 a 2.5 centímetros de ancho. El endospermo tiene entre 1.5 y 2.8 centímetros de largo y se aloja en la masa esponjosa que tienen sabor amargo y astringente. Los frutos maduran de noviembre a marzo (Barrosa, *et al.*, 1992, Pennington y Sarukhan, 1968 y Niembro, 1990).

2.1.5 Requerimientos ambientales de la caoba:

La caoba forma parte de selvas altas o medianas perenifolias o subperenifolias, se distribuye irregularmente, ya que en ciertos lugares sólo se encuentra un árbol cada 2 ó 3 hectáreas. Es una especie que requiere de luz para crecer rápidamente (Barrosa, *et al.*, 1992).

Clima:

Alcanza su desarrollo óptimo en condiciones climáticas de las selvas altas perenifolias o subperenifolias, con temperatura media anual de 24°C y precipitación anual entre 2000 a 4000 milímetros, soporta bien sequías estacionales prolongadas sobre suelos con un manto freático al alcance de las raíces durante todo el año, su distribución altitudinal va desde el nivel del mar hasta 750 msnm (Barrosa, *et al.*, 1992 y Pennington y Sarukhan, 1968).

Topografía y suelos:

Esta especie crece en tierras bajas tropicales, donde la selva se inunda periódicamente durante la época de lluvia de noviembre a febrero, con suelo húmedo durante toda la época del año. Los árboles adquieren su mejor desarrollo en las selvas altas perenifolias, las cuales presentan ciertas elevaciones de hasta 1000 msnm, con suelos permeables y firmes de origen calizo aluvial (Barrosa, *et al.*, 1992).

2.1.6 Plagas, enfermedades y factores limitantes de la caoba:

Esta planta en vivero se ve afectada tanto por hongos, como por artrópodos.

El "damping off" o mal de almácigo es una enfermedad frecuente en los primeros días de desarrollo de la planta, las enfermedades de la raíz son causadas por *Fusarium spp.*, *Fomes oxysporium*, *Alternaria spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Pythium spp.*, *Phitophthora spp.*, *Diplodia spp.* y *Pestalotia spp.*, las cuales se pueden combatir con un buen control de la humedad al aplicarse los riegos.

Entre los patógenos que causan daños foliares se encuentra la roya que afecta tallos y ramas jóvenes, los más comunes son del género *Cronartium spp.* y *Puccinia spp.* El patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* es responsable de antracnosis asociada con el manchado de la hoja y marchitamiento de renuevos.

También se ha identificado en plantaciones de caoba un microorganismo de la familia Stilbellaceae, el cual ocasiona defoliaciones, debilitamiento y marchitez en la planta (Barrosa, *et al.*, 1992).

Hypsipyla grandella Zeller, que es un lepidóptero es desde el punto de vista económico la plaga más importante que se reporta en las meliaceas en América latina, y es uno de los principales factores que ha impedido realizar a gran escala plantaciones comerciales. La duración de la oviposición es de 30 a 45 días antes del inicio del periodo de lluvias, que es cuando comienzan a emerger las larvas, la hembra adulta ovoposita, principalmente sobre las cicatrices de las hojas que se han caído o en los lugares próximos a los extremos de las ramas que han brotado, en la base de nuevos rebrotes y en las axilas de los peciolo de las hojas de las plantas jóvenes, ocasionando que el tallo se bifurque y pierda su valor económico. (Barrosa *et al.*, 1992).

2.1.7 Propagación:

La propagación de esta planta se puede realizar tanto sexualmente como asexualmente.

2.1.7.1 Sexual

El éxito de la producción de planta por medio de la semilla, depende de un adecuado manejo de las semillas antes de sembrarse.

La formación del fruto, se inicia en junio y julio y su maduración es de noviembre a marzo. La colecta debe efectuarse de febrero a marzo.

Una vez colectado el fruto, se exponen al sol sobre mantas o sacos de henequén o bien en cajas de base amplia y poca altura y se abren las cápsulas para liberar la semilla. Las semillas recién colectadas tienen un elevado poder germinativo que va del 80 al 90 por ciento, pero éste se pierde rápidamente si la semilla no se almacena adecuadamente, por lo que debe guardarse en recipientes metálicos de cierre hermético y depositarlas en una cámara fría a temperaturas de 3 a 7°C. bajo estas condiciones se pueden tener porcentajes de 70 u 80 por ciento de viabilidad aproximadamente durante 1.5 a 2 años.

El sustrato que se usa para producir plantas en vivero, requiere de ciertas características que permitan su manejo y una textura adecuada para facilitar la germinación de la semilla. El sustrato se prepara con tierra de monte o aluvión y arena de río en proporción de 4:1 esta mezcla se cierne posteriormente con la finalidad de darle una textura uniforme, inmediatamente después debe ser desinfectado usando vapor de agua.

Con el sustrato preparado se forman camellones de 0.20 metros de altura, 1.20 metros de ancho y longitud variable, dependiendo de la planta que se desee producir.

Preparado el almácigo, se siembra la semilla desalada, colocándose en forma vertical e inclinándola hacia su lado cóncavo y con la parte donde estaba el ala hacia arriba, para facilitar la emergencia del embrión y evitar deformaciones en la plántula. La semilla no requiere de ningún tratamiento previo a la siembra que le permita una buena germinación. Se recomienda techar los almácigos para evitar la deshidratación de las plántulas.

La germinación de las semillas inicia entre 15 y 20 días después de la siembra, pero se puede prolongar hasta el día 30. Una vez que las semillas han germinado, se transplantan a bolsas de polietileno negro de 12 centímetros de diámetro por 25 centímetros de largo, previamente llenas con el sustrato, con características semejantes al sustrato de los almácigos, sólo que a éste se le agregan 10 gramos de urea por bolsa, con la finalidad de darle a la planta el vigor necesario para el establecimiento en su lugar definitivo.

El trasplante debe de realizarse después de cinco u ocho días de nacidas las plántulas, es decir de 40 a 45 días después de la siembra, que es cuando las plántulas tienen una coloración rojiza. Si a causa de cualquier contratiempo, las plántulas se dejan más tiempo en el almácigo, el trasplante se debe de efectuar teniendo la precaución de cortar las raicillas, dejándoles una longitud que puede oscilar entre 5 y 8 centímetros; esta operación se hace con la finalidad de que al colocar la planta en la bolsa, no queden raicillas dobladas, ya que esto ocasiona deformaciones que retardan su crecimiento.

En esta etapa que va de 18 a 22 días, también es recomendable dar sombra a la planta, para protegerlas de la luz solar directa, pero evitando la sombra excesiva, ya que esto crea las condiciones necesarias para el desarrollo del gusano barrenador (*Hypsipila grandella*).

Para el control de enfermedades en el vivero, se debe de desinfectar la semilla con compuestos mercuriales o hipocloritos en vaporizaciones y tener cuidado con el gusano barrenador, dando aplicaciones de arseniato de plomo al 1.5 por ciento con una frecuencia de dos a cuatro veces por mes.

Sembrando las semillas en febrero, las plántulas alcanzarán buen tamaño y vigor para ser transplantadas finalmente en su destino al inicio de las lluvias, durante los meses de junio y julio (Barrosa, *et al.*, 1992).

2.1.7.2 Asexual

La propagación asexual es el método utilizado para multiplicar especies y variedades de planta por medio de segmentos de tallo, ramas, yemas o hijuelos. De esta forma el método vegetativo es diferente a la propagación sexual, es decir a través de semillas, mediante las cuales se obtiene variabilidad genética. En la propagación asexual, el genoma se transmite idéntico a los descendientes.

La utilización de este método, ofrece algunas ventajas en comparación con la reproducción sexual, ya que ayuda a la conservación de fenotipos valiosos para su uso en varias generaciones, es útil en el establecimiento de huertos clonales semilleros, en estudios de fenología y cuando interesa saber heredabilidad al exponer a individuos de un clon a diferentes condiciones ambientales y así conocer en que proporción la variabilidad en la expresión de un carácter es debida a causas genéticas (Margara, 1988).

En los trabajos reportados sobre propagación vegetativa de caoba, se ha utilizado principalmente el método de enraizamiento de estacas.

Rendon (1945), menciona la posibilidad de la propagación de la caoba, por medio de estacas. Este autor sembró estacas provenientes de árboles de 3 años de edad, las cuales emitieron brotes que formaban ramas. También observaron que del periciclo, nacieron raicillas que a su tiempo formaron un conjunto radical. Estas estacas tenían de diámetro ente 2 y 5 cm, y una longitud de 35 cm. Sin embargo la limitante en este experimento fue la oxidación de las estacas.

2.2 BIOTECNOLOGIA

La biotecnología se define, desde el punto de vista industrial, como el conjunto de tecnologías nuevas y tradicionales que involucran la aplicación de los procesos de los sistemas biológicos y/o las actividades metabólicas de los seres vivos, en la producción de los bienes y servicios que repercuten en una mejoría de la calidad de vida del hombre, en sectores tales como la agricultura, el ambiente y las industrias farmacéutica de los alimentos y química (Martínez R.R., 1997). Dentro de la Biotecnología encontramos a la técnica del cultivo de tejidos vegetales, que ha sido involucrada en la resolución de problemas de propagación asexual.

2.2.1 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de células tejidos y órganos vegetales es una de las ramas de la Biotecnología, de la que nuestro país podría obtener grandes beneficios a corto y largo plazo, ya que permite:

- 1.- La micropropagación de cultivares a gran escala.
- 2.- La preservación de germoplasma agronómico y silvestre
- 3.- El mejoramiento genético.

Mediante la técnica de cultivo de tejido vegetales se puede estudiar diferentes fenómenos morfogénéticos que ayuden a entender cuáles son los factores fundamentales que intervienen en la morfogénesis y diferenciación de partes aisladas de la planta. Se pueden cultivar varios tipos de tejidos como primordios florales, meristemos apicales y laterales, así como también óvulos y protoplastos.

2.2.2 Cultivo *in vitro* de meristemos y ápices de tallo:

Los meristemos apicales han sido los inóculos más efectivos para la producción de plantas completas en una amplia gama de cultivos económicamente importantes. Los meristemos pueden regenerar plántulas completas más rápidamente que los tejidos de otras fuentes, las plantas regeneradas usualmente retienen las mismas características genéticas de los progenitores, lo que se debe a la naturaleza diploide de las células meristemáticas

El cultivo de meristemos puede ser considerado como un microesquejado y fue utilizado por primera vez por Morel y Martín (1952, 1955), citado en Margara (1988), con la dalia y la patata, para la reconstitución de clones sanos a partir de plantas infestadas de virus. Como utiliza puntos vegetativos preexistentes, el único problema que plantea, es la rizogénesis y la continuidad en el crecimiento normal del meristemo separado.

Sin embargo, a partir de las observaciones de Morel (1960) citado en Margara (1988) sobre las orquídeas y de diversos autores sobre la posibilidad de desencadenar la proliferación de yemas axilares a partir del ápice cultivado inicialmente, resulta que el cultivo de meristemos o de ápices, además de su interés fitosanitario, puede permitir la multiplicación con un coeficiente muy elevado (Margara, 1988).

2.2.3. Cultivo *in vitro* de hojas:

El establecimiento de un cultivo *in vitro* a partir de hojas, se ha utilizado para diferentes fines, como lo es, estudiar el desarrollo completo de la hoja bajo condiciones ambientales controladas, estudiar la formación de esporangios en helechos para determinar el tamaño al cual un primordio se convierte en hoja, así como conocer hasta donde se llega en su desarrollo normal en condiciones *in vitro* y qué propiedades del medio de cultivo contribuyen a su desarrollo, además de conocer que tan rápido se inicia una hoja en posición y se convierte en una hoja verdadera. El cultivo de hojas también se ha utilizado en la propagación masiva, por ejemplo, en el cafeto se emplean secciones de hoja con la finalidad de obtener embriones somáticos vía formación de un callo intermediario, también se han hecho experimentos con segmentos de hoja de violeta africana para obtener

brotos y posteriormente enraizarlos para una multiplicación clonal rápida (Hurtado y Merino,1994).

El cultivo de hoja, que es un órgano diferenciado, nos permite la obtención de callo, mediante la desdiferenciación de sus células, las cuales presentan posteriormente una proliferación continua, acelerada y con apariencia desorganizada. Esta masa celular resultante, es decir el callo, puede presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según la apariencia externa, textura y composición celular. Algunos callos son masas celulares compactas y duras, con células íntimamente unidas, mientras que otras forman tejidos esponjosos con una gran cantidad de espacios intercelulares.

La coloración de este tejido también varía, aún derivando de la misma especie, lo cual es provocado por factores nutricionales y ambientales y se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas, etc (Hurtado y Merino, 1994).

Estudios microscópicos, han demostrado que los tejidos de tipo calloso generalmente son heterogéneos en su composición celular; es decir, un mismo callo puede presentar varios tipos celulares. La diversidad celular presente en un callo depende de muchos factores como son el origen del tejido, la edad de los cultivos y la composición de los medios de cultivo.

El callo está generalmente constituido por una alta proporción de células en las que las vacuolas son predominantes, similares a las células del parénquima, presentando una gran diversidad de formas, que van desde la esférica hasta la espicular.

Desde el punto de vista morfogénico, la característica más importante del callo es la totipotencialidad de sus células, ya que con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces embriones, etc., los cuales pueden llegar a formar plantas completas.

Una de sus desventajas de este tejido es que puede presentar algún daño o modificación a nivel del núcleo, pudiéndose presentar aberraciones cromosómicas, mutaciones puntuales o diferentes tipo de ploidías, así como irregularidades cariocinéticas. Se ha observado que estas anomalías se presentan con mayor frecuencia conforme aumenta la edad del cultivo.

Un callo puede formar brotes, raíces, embriones, o simplemente continuar proliferando como callo, dependiendo de las concentraciones de auxinas y citocininas suministradas. Cuando la concentración de citocininas con respecto a las auxinas es mayor se inicia la formación de yemas de brotes, mientras que proporciones similares de los dos grupos hormonales, pueden producir un incremento en el callo. Un balance a favor de las auxinas, inducirá el inicio de primordios radiculares (Hurtado y Merino, 1994).

Según Hurtado y Merino (1994), el cultivo de callo se puede dividir en cuatro etapas:

- **Inducción:** en esta etapa las células del inóculo inicial comienzan su crecimiento, tanto en número como en tamaño.
- **Proliferación celular:** durante esta fase el tejido calloso aumenta su masa celular al máximo.
- **Inducción de la diferenciación:** en esta fase se obtienen meristemos, tanto apicales como radiculares, embriones, tejido vascular, etc., a partir de la masa celular del callo.
- **Envejecimiento y pérdida de la capacidad de crecimiento acelerado.**

2.2.3.1 Regeneración de plantas por neoformación de yemas y de raíces sobre un callo.

La producción espontánea de yemas adventicias es relativamente rara bajo condiciones naturales. Una de las aportaciones de la técnica de cultivo *in vitro*, asociada desde su origen al empleo de los reguladores del crecimiento, ha sido la de explotar en numerosas especies la potencialidad no expresada de neoformar yemas después de incitar la dediferenciación celular. Este resultado proviene esencialmente de la utilización de citocininas y auxinas equilibradas, así como de medios minerales adaptados (Margara 1988).

2.3.MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación es una técnica mediante la cual, se busca multiplicar una especie. Esta multiplicación se logra mediante la obtención de una planta

completa a partir de pequeñas porciones de órganos, tejidos o células cultivadas en un medio de cultivo enriquecido con los nutrientes necesarios, bajo condiciones controladas y condiciones asépticas. Esta técnica se fundamenta en la totipotencia de las células; es decir, la propiedad que tienen de contener toda la información genética necesaria para regenerar a un organismo completo (Robert y Loyola, 1985, Pierik, 1988).

2.3.1 Antioxidantes en la micropropagación

Los antioxidantes, son sustancias que se agregan al medio de cultivo para evitar que el explante se oxide, ya que existen muchas plantas que son ricas en compuesto polifenólicos que al sufrir un daño o escisión cuando son sembrados, liberan esos compuestos, los cuales pueden oxidarse, provocando que el tejido tome una coloración café o negra.

Los productos de oxidación, oscurecen el medio de cultivo, inhiben la actividad enzimática, llegando a veces a matar el explante.

Algunos de los procedimientos para evitar la oxidación son:

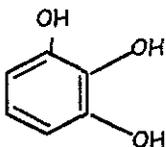
- a) Añadir antioxidantes al medio,
- b) Remojar los explantes en una solución de antioxidantes antes de sembrarlos,
- c) Incubar el explante en su etapa inicial bajo luz reducida,
- d) Realizar subcultivos frecuentes.

Los antioxidantes comúnmente utilizados en la micropropagación son: ácido ascórbico, ácido cítrico y cisteína, además de que los compuestos con alta afinidad por sustancias fenólicas como la polivinilpirrolidona, pirogalol y carbón activado (Edwin y Sherrington, 1984).

2.3.1.1. Pirogalol

El pirogalol, es un compuesto perteneciente a la familia de las proantocianidinas, de origen fenólico provenientes de algunas plantas. Estos compuestos tienen la capacidad de formar complejos con proteínas ricas en prolina y mucopolisacáridos. (Haslam, 1989).

Presenta la siguiente estructura química:



Su fórmula condensada es: $C_6H_6O_3$

Peso molecular: 126.11

Propiedades físicas y químicas:

Son cristales blancos, inodoros, con un punto de fusión de 131-133°C. Soluble en agua, alcohol y éter; insoluble en benceno, cloroformo y disulfuro de carbono. Es un buen reductor y se ha utilizado para absorción de oxígeno en análisis de gases.

Proviene del galato y generalmente son productos provenientes de flavonoides, taninas y lignina en plantas (Uribe, 1998).

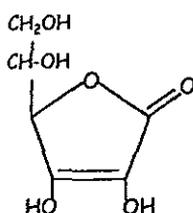
2.3.1.2 Carbón activado

El carbón activado además de ser un buen adsorbente, presenta la capacidad de activar y promover la elongación en brotes, y la embriogénesis en algunas especies, aunque se ha encontrado que en *Sequoiadendron spp.* inhibe el enraizamiento. Para el uso de este antioxidante se debe tener en cuenta que puede remover algunos químicos importantes del medio, como lo son las auxinas, citocininas, ácido abscísico, tiamina, y ácido nicotínico (Edwin y Sherrington 1984).

2.3.1.3 Ácido ascórbico

El ácido ascórbico es una lactona de un azúcar-ácido. Es un potente reductor, que pierde con facilidad átomos de hidrógeno para transformarse en ácido deshidroascórbico y es un compuesto sensible a la temperatura (Lehninger.1982)

Presenta la siguiente estructura química:



Fórmula condensada: $C_6H_8O_6$

Peso molecular: 176.12

Propiedades físicas y químicas:

Son cristales monoclinicos, generalmente aplanados, de sabor ácido agradable, su punto de fusión es de 190-192°C. $pK_1 = 4.17$, $pK_2 = 11.57$. U.V máx, 245nm. Soluble en agua, moderadamente soluble en alcohol y glicerol. Insoluble en éter,

cloroformo, benceno, aceites, grasas y solventes de carácter graso. Posee un fuerte poder reductor (Uribe 1998).

2.4. REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Los reguladores del crecimiento vegetal o también llamados hormonas vegetales, son compuestos orgánicos, distintos a los nutrientes, que se sintetizan en alguna parte de la planta y que se translocan a otra parte, en donde a concentraciones muy bajas causan una respuesta fisiológica (Salisbury y Ross, 1996). Cabe mencionar que esta respuesta no necesariamente tiene que ser promotora, ya que algunas hormonas como el ácido abscísico pueden inhibir algún proceso fisiológico.

Como se sabe, el crecimiento en las plantas es un proceso dinámico, complejo y que está rigurosamente controlado, por los reguladores del crecimiento vegetal, los cuales juegan un papel muy importante, no únicamente dentro de las plantas como un universo sino también a nivel de órgano, tejido y células (Hurtado y Merino, 1994).

Los reguladores de crecimiento, generalmente tienen lugares de síntesis y acción distintos, siendo en algunos de los casos activos en el mismo sitio de formación, por lo que en general presentan un área y un espectro de acción muy amplio y diverso, pues además pueden influir en múltiples procesos, totalmente distintos al mismo tiempo y en partes diferentes de la planta.

Actualmente se conocen cinco tipos básicos de reguladores de crecimiento, auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno, los cuales se pueden subdividir en tres grupos principales (Hurtado y Merino, 1994).

- a) Promotores del crecimiento: auxinas, citocininas y giberelinas.
- b) Inhibidores el crecimiento: ácido abscísico.
- c) Etileno: promotor de madurez y la senescencia.

2.4.1 Auxinas

Al igual que las citocininas, son sustancias promotoras, que estimulan principalmente el alargamiento celular. El nombre auxina (del griego *auxein*, crecer), fue dado a la sustancia reguladora del crecimiento producida en el ápice del coleóptilo de avena, sin embargo, en la actualidad se sabe que las auxinas están universalmente presentes en las plantas superiores (Hurtado y Merino, 1994)

El ácido indol-3-acético (AIA) es una auxina que se ha encontrado en muchísimas especies vegetales, y se piensa que es la auxina principal de las plantas superiores, aunque existen otras sustancias que también poseen actividad auxínica. Estas otras sustancias, la mayoría de las veces son indoles, muy relacionados químicamente con el AIA.

En general, la biosíntesis del AIA es a partir del triptofano, compuesto con un grupo indol y que está universalmente presente en los tejidos vegetales, ya sea en forma libre o incorporada.

De forma natural, las concentraciones más altas de auxinas se encuentran en los ápices de crecimiento, como lo es el ápice del coleóptilo, yemas 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, 1982).

La translocación de las auxinas, desde sus puntos de síntesis, básicamente es basipétala, es decir hacia abajo, por dos métodos: uno que depende de la energía metabólica, es decir en contra de un gradiente de concentración, y el otro que se realiza a favor de la difusión simple, el cual es a velocidades sumamente altas y es el que se lleva a cabo en condiciones anaerobias. Se ha encontrado que este transporte polarizado se ve afectado (inhibido) por la falta de oxígeno, incrementado por la luz, y que es sensible a la temperatura.

Los efectos auxínicos en las plantas, son muchos y muy variados, siendo los principales los que afectan el alargamiento y división celular, la formación de brotes, raíces y tejido calloso, la respiración, abscisión, partenocarpia, dominancia apical y embriogénesis.

Se ha encontrado que las auxinas actúan de modo diverso en el crecimiento por alargamiento celular, como es incrementando el contenido osmótico de la célula y la permeabilidad al agua, reduciendo la presión de la pared o aumentando la síntesis de ARN, proteínas específicas (enzimas) y aún de la misma pared, lo que provoca un aumento en la plasticidad de la pared celular, que trae como consecuencia su extensión y con ello un crecimiento por alargamiento (Hurtado y Merino, 1994).

2.4.2 Citocininas

El nombre genérico de las citocininas es empleado para aquellas sustancias químicas, promotoras del crecimiento, que pueden estimular principalmente la división celular o citocinesis.

Existen citocininas tanto naturales como sintéticas entre las cuales podemos encontrar a la Bencilaminopurina, la 2-ip, y la cinetina

Casi todas las citocininas conocidas, tanto naturales como sintéticas son derivados de la adenina, en las cuales el grupo amino, lleva determinados sustituyentes en la posición seis.

El descubrimiento de estos reguladores proviene de los trabajos realizados por Haberlandt (citado en Safisbury y Ross, 1996), quien demostró, cultivando embriones y tejido *in vitro*, que existía un factor difusible, el cual afectaba a las células parenquimatosas de la papa revirtiéndolas a un estado meristemático.

Se sabe, que estas sustancias se encuentran en tejidos con crecimiento activo, como lo son los frutos jóvenes en desarrollo, en semillas, en embriones, hojas y predominantemente en raíces, que parecen ser la fuente principal de citocininas de las plantas, desde las cuales son transportadas a los brotes. A pesar de que no son tan móviles como las auxinas y las giberelinas, su translocación es acropétala, es decir desde la base hacia las partes aéreas.

Al igual que los otros reguladores del crecimiento, las citocininas tienen un intervalo amplio de efectos regulatorios. Éstas promueven la división celular y el efecto tiene lugar con concentraciones tan bajas como 5×10^{-11} M; generalmente inhiben el crecimiento de las raíces, pudiendo estimularlas a muy bajas concentraciones (5×10^{-8} M), además inhiben el alargamiento del tallo, pero estimulan el alargamiento de las hojas, actúan en el retraso de la senescencia, en la dominancia apical y tienen un papel fundamental en la organogénesis ya que pueden ser inductoras de yemas en tejidos *in vitro* de callo, hojas, raíces cotiledones o piezas de tallo.

La inducción *in vitro* de órganos por las citocininas, está encaminada a la formación de yemas, las cuales son obtenidas con base en una proporción citocinínica alta con respecto a las auxinas, debido a que se anula la dominancia apical.

2.5 ANTECEDENTES DEL CULTIVO *in vitro* DE LA CAOBA

Debido a que no se encontró información alguna de estudios realizados *in vitro* de *Swietenia macrophylla*, se optó por realizar una búsqueda sobre géneros pertenecientes a la familia de las meliaceas, con alguna similitud con la caoba, entre los cuales se encuentran: el árbol del Nim, el cedro, y *Khaya*.

Martínez R. (1997), logró la propagación de brotes de *Azadirachta indica* (árbol del Nim) a partir tanto de yemas axilares como de ápices, obteniendo en promedio 115 plantas por 10 explantes sembrados en 14 semanas, desde la siembra del explante, hasta la obtención de una planta aclimatada al medio. Dichos resultados se lograron utilizando como medio básico las sales del medio M&S al 100 %, adicionado con 0.5 a 1.0 mg L⁻¹ de BAP. El enraizamiento de estos brotes se logró utilizando 0.1 mg.L⁻¹ de BAP y 3.0 mg.L⁻¹ de AIA.

Enríquez (1985) al utilizar concentraciones que iban de 1.0 a 30.0 mg L⁻¹ de BAP, alcanzó el promedio mayor de brotes formados por explante y en segundo lugar utilizando de 3.0 a 30.0 mg.L⁻¹ de 2-ip para *Cedrela odorata* (cedro rojo) determinó que las yemas apicales promovían la formación de un número mayor de brotes producidos que las yemas axilares.

Leakey y Newton (1994) mencionan que para *Khaya*, que es un género muy parecido a la caoba en cuanto a su desarrollo y formación de madera, pero que habita en África, la formación de brotes adventicios se consigue utilizando concentraciones altas de BAP (10 mg.L⁻¹) complementadas con 2-ip (en concentraciones de 3.5 mg.L⁻¹).

Además de estos antecedentes relacionados con la caoba por pertenecer a la misma familia, se han encontrado algunos trabajos en especies forestales, tales como en *Alnus*, *Salix*, *Pseudotsuga menziesii*, *Platanus*, *Populus*, *Quercus* y *Ulmus*, entre otros, en los cuales se utilizan como medio básico las sales del medio M&S, Heller y WPM (Evers, et al., 1988 y Bonga y Aderkas, 1992).

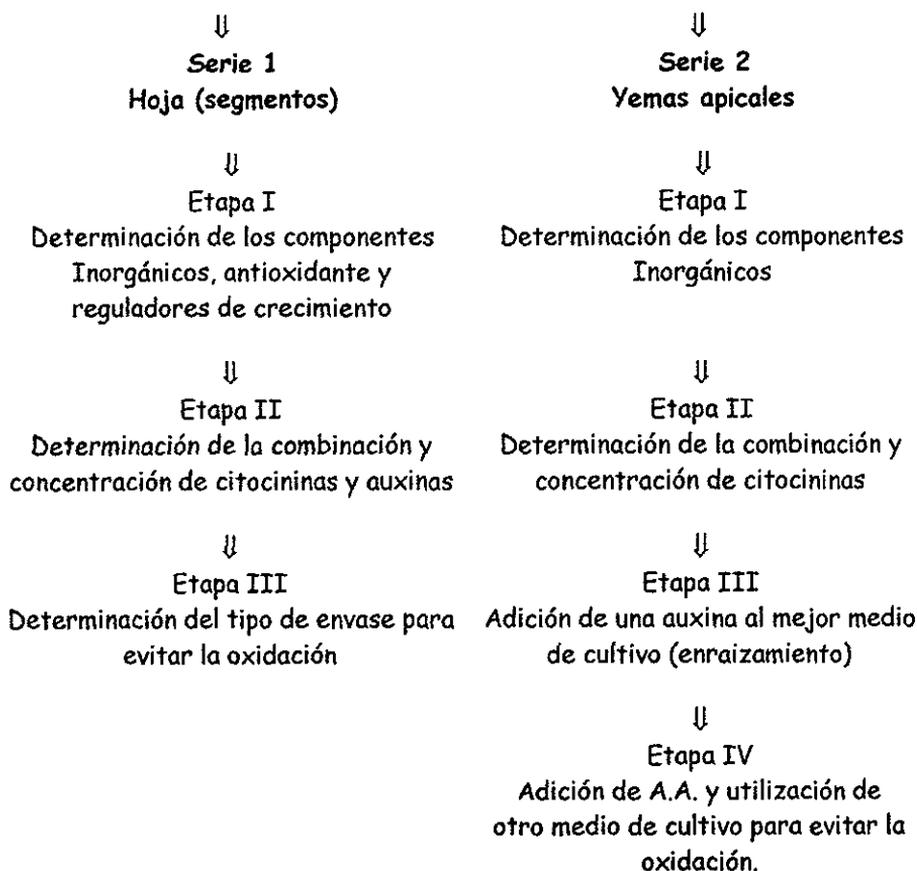
Uribe (1998) utilizó varias sustancias como antioxidante y determinó que el pirogalol en concentraciones de 12.6 y 25.2 mg.L⁻¹ eran las mejores para evitar la oxidación en los ápices de ceiba (*Ceiba pentandra*). También determinó que el mejor medio era el M&S, para la obtención de brotes adventicios

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales del Departamento de Bioquímica, División de Estudios de Postgrado, de la Facultad de Química perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para el cumplimiento de los objetivos del presente trabajo, se realizaron dos series de ensayos, en los cuales se probaron hojas y yemas apicales como fuente de explante según se presenta en el siguiente esquema:

Establecimiento del cultivo aséptico



3.1 MATERIALES

3.1.1 Material Biológico:

Las plantas utilizadas para la obtención de material vegetativo de la caoba se trajeron de dos sitios distintos teniéndose así, tres fuentes de explante, una del estado de Chiapas y dos del estado de Veracruz, las cuales se depositaron en el invernadero de la Facultad de Química, donde estuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y humedad.

Los explantes fueron obtenidos después de 45 días de haber aclimatado las plantas en el invernadero. Se extrajeron yemas de aproximadamente 0.5 a 1.0 cm de altura y hojas que se encontraban en la parte apical, ya que éstas eran las más jóvenes y presentaban mejores condiciones para su utilización *in vitro*.

3.1.2 Medio de cultivo.

Como medio básico se emplearon las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), las sales del medio Heller (1953) y las sales del medio Lloyd (1981), al 100% (Anexo) (citadas en Edwin y Sherrington, 1984), adicionándoles vitaminas y aminoácidos, así como distintos reguladores del crecimiento, según cada ensayo. Estos medios fueron suplementados con sacarosa (azúcar comercial) al 3.8 %. Se utilizó como agente gelificante Gellan, el pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 , con HCl y NaOH 0.1 N.

Como antioxidantes se utilizaron pirogalol, ácido ascórbico, H₂O alcalina, carbón activado y en el último ensayo ácido ascórbico.

Así mismo se probaron distintos envases, como se señala en cada ensayo:

- ° cajas petri de plástico con una capacidad de 20 ml (#1)
- ° cajas petri de vidrio con una capacidad de 38 ml (#2)
- ° frascos de vidrio de 45ml (#3)
- ° frascos de vidrio de 180 ml (#4)
- ° tubos de ensayo de 20 ml (#5)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Mantenimiento de las Plantas:

Para la aclimatación de las plantas, éstas se mantuvieron durante treinta días en el invernadero, dándoles solamente riegos con agua, posteriormente, se fertilizaron 2 veces por semana con una solución compuesta con sales inorgánicas del medio M&S al 50%, así como vitaminas del mismo medio y BAP, a una concentración de 5 y 15 ml.L⁻¹, respectivamente (ver anexo), para favorecer la formación de yemas. Estas plantas se mantuvieron bajo observación para prevenir o detectar alguna enfermedad.

3.2.2 Preparación de medios de cultivo.

Los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas 100x en un matraz de Erlenmeyer con agua desionizada estéril, en agitación constante, se vertió la cantidad necesaria de dichas sales, así como aminoácidos, vitaminas y reguladores del crecimiento para finalmente adicionar, la fuente de carbono (azúcar), y el antioxidante; posteriormente se midió y ajustó el pH a 5.7 ± 0.1 con hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1 N y ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N, se agregó el Gellan y se aforó con agua desionizada estéril para obtener el volumen deseado (Anexo).

Se vertieron de 10 a 20 ml del medio de cultivo según el envase. Los tubos de ensaye se taparon con papel aluminio. Tubos, frascos y cajas petri conteniendo el medio de cultivo se esterilizaron en autoclave vertical a una temperatura de 121 °C y 1.2 Kg.cm² de presión durante 18 minutos. Posteriormente se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente.

El material de cristalería, así como pinza y bisturí que se utilizaron en la siembra del explante, se esterilizó en autoclave vertical a una temperatura de 121 °C y 1.2 Kg/cm² de presión durante 30 minutos.

3.2.3. Condiciones de incubación

Todos los cultivo se mantuvieron bajo un ambiente controlado en un cuarto de incubación, el cual tenía una temperatura promedio de 27°C durante el día y 25°C durante la noche, con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas de oscuridad, con una intensidad lumínica de 29 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}$.

3.2.4. Establecimiento del cultivo aséptico.

El material vegetativo (tanto segmentos de hoja como ápices) se desinfectó de la siguiente manera:

Método de Esterilización 1:

- 1.- Se lavó con una solución de agua corriente y jabón durante 20 minutos.
- 2.- Posteriormente el material, se trasladó a la campana de flujo laminar, donde se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial (cloralex) al 10% (v/v) + Microdyn (5ml.L^{-1}) + Tween 20 (1.6 ml. L^{-1}), durante 10 minutos.
- 3.- Se enjuagaron 4 veces con agua desionizada estéril, es decir se sumergieron los explantes en agua. Cada enjuague fue de 5 minutos.

Método de Esterilización 2:

En base a los resultados anteriores se realizaron otros dos ensayos, siguiendo los mismos pasos, pero, se eliminó completamente el Tween 20.

Método de Esterilización 3:

Para este ensayo se decidió seguir los mismos pasos que el ensayo anterior, es decir sin Tween 20, pero además se redujo la concentración del Microdyn a la mitad, es decir a 2.5 ml.L^{-1} .

Después de esterilizar los explantes, éstos fueron colocados en una solución de ácido ascórbico y ácido cítrico (100 mg.L^{-1} de cada uno), previamente esterilizada en autoclave durante 18 minutos.

Para realizar la siembra de las hojas, primeramente se les eliminó el margen y posteriormente se seccionó en pequeños trozos de 1 cm^2 aproximadamente, los cuales se colocaron por pares sobre el medio de cultivo, procurando que la mayor área posible estuviera en contacto con el medio, teniéndose así 20 repeticiones por medio utilizado.

Para la siembra de los ápices, se hizo un corte a 45° en la base del tallo, y se sembraron uno por frasco, teniéndose 10 frascos por medio utilizado.

Se evaluaron varias características, dependiendo del explante. En los segmentos de hoja, se evaluó, el porcentaje de oxidación y el de callo producido, así como la formación de algún órgano. En los ápices, se evaluó el incremento en altura, el número de brotes producidos y el porcentaje de oxidación.

3.2.5. ENSAYO CON SEGMENTOS DE HOJA

3.2.5.1 Determinación de los componentes inorgánicos, antioxidante y reguladores del crecimiento.

Durante esta etapa se realizaron 3 ensayos.

Ensayo 1.

Se utilizaron los componentes inorgánicos tanto del medio Heller, como del medio M&S, los cuales fueron suplementados con diferentes reguladores del crecimiento, a distintas concentraciones y con distintos compuestos como antioxidantes, como lo son el carbón activado, el pirogalol y el agua alcalina, según se muestra en la tabla 1. El agua alcalina se utilizó para disolver las sales y aforar el medio en lugar del agua desionizada estéril.

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para la determinación de los componentes inorgánicos, antioxidante y reguladores el crecimiento en el cultivo de segmentos de hoja

Medio		Heller (HI)	Heller (HC)	Heller (HP)	Heller (HM)	Heller (HA)	M&S (CM)
Reguladores Del crecimiento	BAP (mg.L ⁻¹)	3.0	3.0	3.0	1.0	3.0	1.0
	ANA (mg.L ⁻¹)	1.5	1.5	1.5	0.23	1.5	---
	AIA (mg.L ⁻¹)	---	---	---	---	---	0.5
Antioxidante	C.A. (mg.L ⁻¹)	---	0.5	---	---	---	---
	Pirogalol (mg.L ⁻¹)	---	---	12.6	---	---	12.6
	H ₂ O Alcalina	---	---	---	✓	✓	---

Ensayo 2

En base a los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se probaron cinco medios distintos suplementados con dos auxinas y diferentes concentraciones de BAP (Tabla 2).

Tabla 2. Distintos medios utilizados para la determinación de los componentes inorgánicos, antioxidante y reguladores el crecimiento en el cultivo de segmentos de hoja.

Medio		Heller (HP)	M&S (MI)	M&S (MA)	M&S (MX)	M&S (MY)
Reguladores del crecimiento	BAP (mg.L ⁻¹)	3.0	1.0	1.0	2.0	2.0
	2-ip (mg.L ⁻¹)	----	0.23	----	----	4.0
	ANA (mg.L ⁻¹)	1.5	----	----	1.0	----
	AIA (mg.L ⁻¹)	----	----	0.5	----	----
Antioxidante	Pirogalol (mg.L ⁻¹)	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2
Otros	Microdyn (ml.L ⁻¹)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

Ensayo3.

Para este único ensayo, se utilizó el método de esterilización 3, en el cual la concentración de Microdyn era la mitad que en los otros ensayos; y se utilizaron los mismos medios de cultivo que en el ensayo anterior es decir:

Tabla 3. Distintos medio utilizados para la determinación de los componentes inorgánicos, antioxidante y reguladores el crecimiento en el cultivo de segmentos de hoja, utilizando el método de esterilización No.3.

Medio		Heller (HI)	M&S (MI)	M&S (MA)	M&S (MX)	M&S (MY)
Reguladores Del Crecimiento	BAP (mg.L ⁻¹)	3	1.03	1.0	2.0	2.0
	2-ip (mg.L ⁻¹)	----	0.23	----	----	4.0
	ANA (mg.L ⁻¹)	1.5	----	----	1.0	----
	AIA (mg.L ⁻¹)	----	----	0.5	----	----
Antioxidante	Pirogalol (mg.L ⁻¹)	25.2	25.2	25.2	25.2	25.2
Otros	Microdyn (ml.L ⁻¹)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

3.2.5.2. Selección de la combinación y concentración de citocininas y auxinas

Para este ensayo se utilizaron los dos mejores medios de la etapa anterior así como otros variando las concentraciones de las auxinas: 0.5, 1.0 y 1.5 mg.L⁻¹ y conservando las mismas concentraciones de BAP, como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Distintos medios utilizados para la selección de la combinación y concentración de citocininas y auxinas.

Medio		M&S (MX1)	M&S (MX2)	M&S (MX3)	M&S (MA1)	M&S (MA2)	M&S (MA3)
Reguladores del crecimiento	BAP (mg.L ⁻¹)	2.0	2.0	2.0	1.0	1.0	1.0
	ANA (mg.L ⁻¹)	0.5	1.0	1.5	----	----	---
	AIA (mg.L ⁻¹)	----	----	----	0.5	1.0	1.5
Antioxidante	Pirogalol (mg.L ⁻¹)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

3.2.5.3. Determinación del tipo de envase para evitar la oxidación

Para esta etapa se utilizaron los mismos medios de cultivo y concentraciones de auxinas y citocininas que en la etapa anterior, pero se probaron 3 diferentes envases, para ver si existía alguna relación del envase con la oxidación de los tejidos.

Tabla 5. Medios utilizados en el envase No. 1 (cajas petri de plástico con una capacidad de 20 ml) para evitar la oxidación.

Medio		M&S (MX1)	M&S (MX2)	M&S (MX3)	M&S (MA1)	M&S (MA2)	M&S (MA3)
Reguladores del crecimiento	BAP (mg.L ⁻¹)	2.0	2.0	2.0	1.0	1.0	1.0
	ANA (mg.L ⁻¹)	0.5	1.0	1.5	----	----	---
	AIA (mg.L ⁻¹)	----	----	----	0.5	1.0	1.5
Antioxidante	Pirogalol (mg.L ⁻¹)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Otros	Envase No.1	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Tabla 6. Medios utilizados en el envase No. 2 (cajas petri de vidrio con una capacidad de 38 ml) para evitar la oxidación.

Medio		M&S (MX1)	M&S (MX2)	M&S (MX3)	M&S (MA1)	M&S (MA2)	M&S (MA3)
Reguladores Del Crecimiento	BAP (mg.L ⁻¹)	2.0	2.0	2.0	1.0	1.0	1.0
	ANA (mg.L ⁻¹)	0.5	1.0	1.5	----	----	---
	AIA (mg.L ⁻¹)	----	----	----	0.5	1.0	1.5
Antioxidante	Pirogalol (mg.L ⁻¹)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Otros	Envase No. 2	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Tabla 7. Medios utilizados en el envase No. 4 (frascos de vidrio con una capacidad de 180 ml) para evitar la oxidación.

Medio		M&S (MX2)	M&S (MA1)
Reguladores del crecimiento	BAP (mg.L ⁻¹)	2.0	1.0
	ANA (mg.L ⁻¹)	1.0	---
	AIA (mg.L ⁻¹)	---	0.5
Antioxidante	Pirogalol (mg.L ⁻¹)	2.5	2.5
Otros	Envase No.4	✓	✓

3.2.6. ENSAYOS CON APICES

3.2.6.1. Determinación de los componentes inorgánicos.

Dentro de esta etapa se utilizó el método de esterilización 2 de hojas, para obtener material libre de patógenos y sembrarlo en 5 medios distintos, con distintas concentraciones de BAP y 2-ip (Tabla 8).

Tabla 8. Distintos medios utilizados en ápices para la determinación de los componentes inorgánicos.

Medio		Heller (HI)	Heller (HII)	M&S M&SI	M&S (M&SII)	M&S (M&SIII)
Reguladores Del Crecimiento	BAP (mg.L ⁻¹)	3.0	5.0	14.3	10.3	8.3
	2-ip (mg.L ⁻¹)	----	----	1.3	2.3	3.3
Antioxidante	Pirogalol (mg.L ⁻¹)	----	----	----	----	----

3.2.6.2. Determinación de la concentración y combinación de citocininas.

Dentro de esta etapa se realizaron varios ensayos:

Ensayo 1:

Se utilizó la concentración más baja de BAP del medio M&S probada en ensayos anteriores pero la relación BAP/2-ip cambio, es decir a una concentración alta de BAP, una concentración alta 2-ip, a diferencia de lo que se había utilizado que era a una concentración alta de BAP una concentración baja de 2-ip, manteniéndose una relación 3.6:1 de las dos citocininas.

Tabla 9. Distintos medios utilizados en ápices para la determinación de la concentración y combinación de citocininas.

Medio		M&S (M&SIII)	M&S (M&SIV)	M&S (M&SV)
Reguladores Del Crecimiento	BAP (mg.L ⁻¹)	8.3	6.3	4.3
	2-ip (mg.L ⁻¹)	2.3	1.7	1.2
Antioxidante	Pirogalol (mg.L ⁻¹)	25.2	25.2	25.2

Ensayo 2 Para este ensayo se utilizaron las mismas concentraciones de BAP, pero se redujo la concentración de 2-ip a un 10% durante el primer mes, para saber el papel que juega el 2-ip:

Tabla 10. Distintos medios utilizados en ápices para la determinación de la concentración y combinación de citocininas.

Medio		M&S (M&SIII1.10)	M&S (M&SIV1.10)	M&S (M&SV1.10)
Reguladores Del Crecimiento	BAP (mg.L ⁻¹)	8.3	6.3	4.3
	2-ip (mg.L ⁻¹)	0.23	0.17	0.12
Antioxidante	Pirogalol (mg.L ⁻¹)	25.2	25.2	25.2

Ensayo 3

Para comprobar que la relación y la presencia de 2-ip en el medio con la BAP, es determinante para la diferenciación de brotes adventicios, se decidió eliminar el 2-ip para este ensayo, utilizando las mismas concentraciones de BAP que en el ensayo anterior.

Tabla 11. Distintos medios utilizados en ápices para la determinación de la concentración y combinación de citocininas.

Medio		M&S (M&SIV.)	M&S (M&SV.)	M&S (M&SVI.)
Reguladores del Crecimiento	BAP (mg.L ⁻¹)	6.3	4.3	2.3
	2-ip (mg.L ⁻¹)	----	----	----
Antioxidante	Pirogalol (mg.L ⁻¹)	25.2	25.2	25.2

3.2.6.3 Adición de una auxina al mejor medio

Al mejor medio se le adicionó 1.5 mg.L⁻¹ de una auxina, ANA, para determinar si ésta interactuaba con otros reguladores de crecimiento y favorecía el número de brotes adventicios formados (Tabla 12).

Tabla 12. Adición de una auxina al mejor medio de ápices.

Medio		M&S (M&SV)	M&S (M&SVA)
Reguladores del crecimiento	BAP (mg.L ⁻¹)	4.3	4.3
	2-ip (mg.L ⁻¹)	1.2	1.2
	ANA (mg.L ⁻¹)	----	1.5
Antioxidante	Pirogalol (mg.L ⁻¹)	25.2	25.2

3.2.6.4 Adición de ácido ascórbico a los dos mejores medios y la utilización de las sales inorgánicas del medio WPM.

Ensayo 1:

En base a los ensayos anteriores se decidió utilizar los dos mejores medios para la formación de brotes y adicionarlos con ácido ascórbico para evitar la oxidación.

Tabla 13. Medio utilizados para determinar el papel del ácido ascórbico en la oxidación.

Medio		M&S (M&SV)	M&S (M&SVAA)	M&S (M&SIV)	M&S (M&SIVAA)
Reguladores del crecimiento	BAP (mg.L ⁻¹)	4.3	4.3	6.3	6.3
	2-ip (mg.L ⁻¹)	1.2	1.2	1.7	1.7
Antioxidante	A.A. (mg.L ⁻¹)	----	100.0	----	100.0
	Pirogalol (mg.L ⁻¹)	25.2	25.2	25.2	25.2

Ensayo 2.

Para este ensayo se decidió utilizar las sales del medio WPM, con 4.3 mg.L⁻¹ de BAP y 1.2 mg.L⁻¹ de 2-ip:

Tabla 14. Medios utilizados para determinar el papel de las sales inorgánicas del medio WPM en la oxidación

Medio		M&SV	WPM
Reguladores Del Crecimiento	BAP (mg.L ⁻¹)	4.3	4.3
	2-ip (mg.L ⁻¹)	1.2	1.2
Antioxidante	Pirogalol (mg.L ⁻¹)	25.2	25.2

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.Establecimiento del cultivo aséptico tanto para hoja como para ápices.

Ensayo 1

El método empleado en el ensayo uno para la esterilización de los brotes y hojas resultó efectivo al encontrarse un 2.8 % de contaminación, al final de los 55 días, durante los cuales se evaluaron. Sin embargo, los explantes resultaron muy afectados, observándose decoloración y muerte en algunas zonas del tejido, además de que se presentó un alto porcentaje de oxidación, lo cual se puede atribuir o no, al Tween 20 que es un detergente que al romper la tensión superficial permite la penetración de los desinfectantes (como lo son el Microdyn y el cloro), al interior de del tejido, lo cual lo puede dañar, y manifestarse como oxidación del tejido (Hurtado y Merino, 1994 y Brock 1979).

Ensayo 2

Debido a los resultados obtenidos en el ensayo uno, se decidió realizar un segundo ensayo, en el cual se omitió la utilización del Tween 20. Se encontró que los cambios efectuados afectaron un poco los resultados esperados, ya que se encontró un 4.2 % de contaminación, pero un menor daño en el tejido.

Ensayo 3

Con este ensayo lo que se intentó fue mejorar el método de esterilización, reduciendo la concentración de Microdyn a la mitad (2.5 ml.L-1). Se encontró que los cambios, no afectaron la efectividad del método, ya que de igual forma se encontró un 4.2 % de contaminación en las repeticiones.

Los tres ensayos realizados para la esterilización del material vegetal, es decir, tanto hojas como ápices, no presentaron una diferencia significativa, al realizarse la Prueba de ANOVA a los resultados, lo cual, permite elegir el tercer ensayo, ya que es el que reduce los costos en la técnica y obtenemos los mismos resultados en cuanto a contaminación de explantes que en el ensayo dos, mientras que el ensayo uno se descarta, debido al problema de la oxidación que presentaron los explantes, debido quizás, al Tween 20.

En la siguiente figura (No.2) se puede observar, el porcentaje promedio de contaminación de los explantes a través del periodo de evaluación.

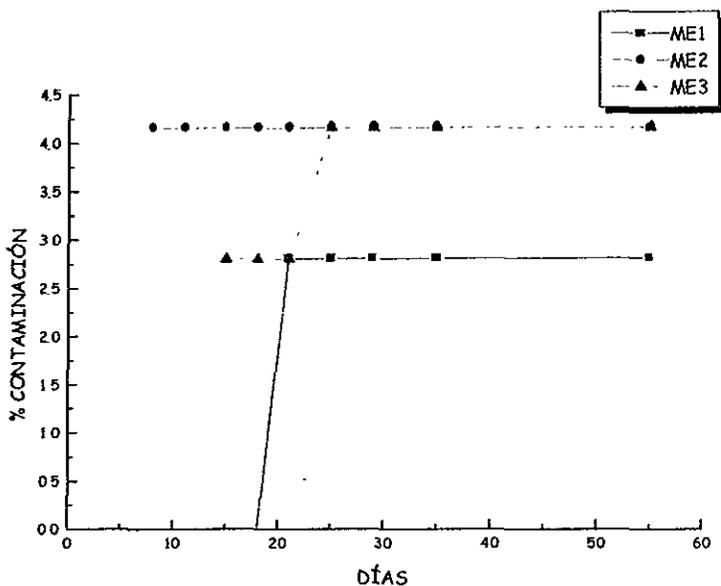


Figura 2. Porcentaje de contaminación por hongos y/o bacterias presentada durante los 55 días de observaciones en los tres diferentes ensayos, donde: ME1= Método de Esterilización 1 (1.6 mL⁻¹ de Tween 20 + 5.0 mL⁻¹ de microdyn), ME2= Método de esterilización 2 (5.0 mL⁻¹ de microdyn), ME3 = Ensayo 3 (2.5 mL⁻¹ de microdyn).

4.2. Ensayos con segmentos de Hoja

4.2.1. Determinación de los componentes inorgánicos, antioxidante y reguladores del crecimiento.

Ensayo 1

Dentro de este ensayo se evaluaron seis diferentes medios de cultivo, los cuales variaron por contener distintas sustancias como antioxidante, de los cuales cinco contenían las sales inorgánicas del medio Heller y sólo uno estuvo compuesto con las sales del medio M&S. Se encontró que el mejor antioxidante fue el pirogalol, ya que tanto el medio Heller que contenía pirogalol (HP) y el medio M&S que contenía también pirogalol (CM), fueron los dos medios en los cuales los explantes presentaron una menor oxidación a través del tiempo. A estos dos medios los siguieron en cuanto efectividad el medio Heller que no tenía ninguna sustancia como antioxidante (HI), el medio que contenía carbón activado (HC) y al final los dos medios Heller que contenían H₂O alcalina (ver figura 3)

En cuanto a los componentes inorgánicos y reguladores del crecimiento, el medio M&S (CM) que estaba suplementado con BAP (1.0 mg. L^{-1}) y AIA (0.5 mg. L^{-1}), resultó ser el mejor, ya que fue el único medio en el cual se produjo una cantidad significativa de callo (19%) (figura 4), siguiéndole el medio HM con un 4% de callo, el cual contenía 1.03 mg. L^{-1} de BAP y 0.23 mg. L^{-1} de ANA, esto indica que para la formación de callo de la caoba a partir de hoja, se requieren de concentraciones bajas de las hormonas, ya que en los otros medios de cultivo (HI, HC, HP y HA), al tener altas concentraciones de las hormonas (BAP 3.0 mg. L^{-1} y ANA 1.5 mg. L^{-1}), se vió inhibida la formación de callo, presentando como máximo un 2%.

Comparando los dos medios que dieron mejores resultados (CM y HM) como se puede observar en la figura No.4, existe una gran diferencia en cuanto al porcentaje de callo presentado (19% para el M&S y 4% para el Heller), con lo cual se puede pensar que otro factor que afectó la producción de callo a parte de la concentración de las hormonas fueron las sales inorgánicas del medio.

Para la micropropagación de especies forestales se han recomendado varios medios como lo son el medio M&S y el Heller, entre otros. Estudios realizados para *Alnus*, han llevado a la conclusión de que el medio Heller, para el cultivo de brotes, es el que ha dado los mejores resultados por su baja concentración de sales (Evers, et al. 1988), sin embargo este medio no dio los mismos resultados para la caoba, que aun cuando es una especie forestal, ésta, pertenece otra familia de las angiospermas, y puede ser por esto que requiere de una concentración de sales mayor que las gimnospermas.

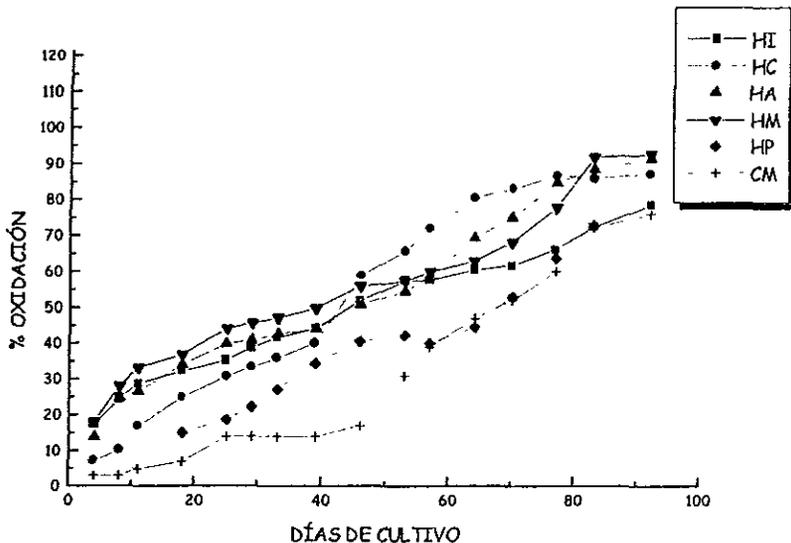


Figura 3. Porcentaje de oxidación, presentado en los 6 diferentes medios, evaluados durante el periodo de estudio, donde: HI = Testigo (sin antioxidante) BAP 3.0 mg. L⁻¹ y ANA 1.5 mg. L⁻¹, HC= Carbón activado + BAP 3.0 mg. L⁻¹ y ANA 1.5 mg. L⁻¹, HP = Pirogalol + BAP 3.0 mg. L⁻¹ y ANA 1.5 mg. L⁻¹, HM = H₂O alcalina + BAP 1.03 mg. L⁻¹ y ANA 0.23 mg. L⁻¹, HA = H₂O alcalina + BAP 3.0 mg. L⁻¹ y ANA 1.5 mg. L⁻¹ y CM = Pirogalol + BAP 1.0 mg. L⁻¹ y AIA 0.5 mg. L⁻¹.

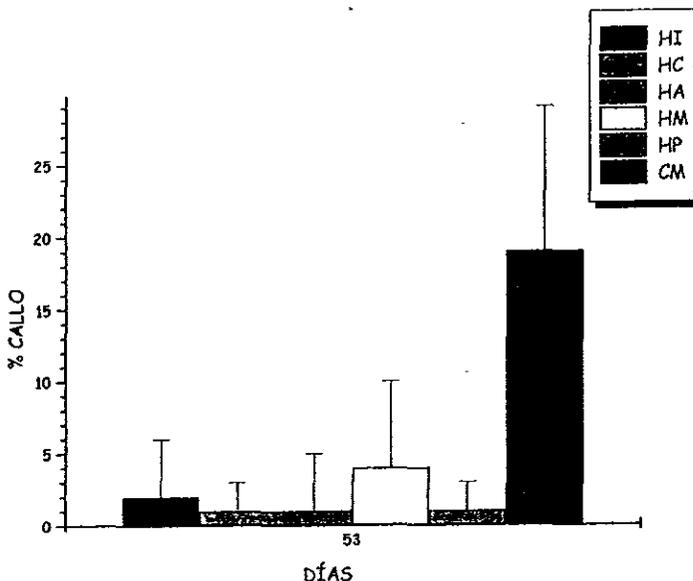


Figura 4. Porcentaje de callo producido por los explantes a los 53 días de haber sido sembrados, donde: HI = Testigo (sin antioxidante) BAP 3.0 mg.L⁻¹ y ANA 1.5 mg.L⁻¹, HC= Carbón activado + BAP 3.0 mg.L⁻¹ y ANA 1.5 mg.L⁻¹, HP = Pyrogalol + BAP 3.0 mg.L⁻¹ y ANA 1.5 mg.L⁻¹, HM = H₂O alcalina + BAP 1.03 mg.L⁻¹ y ANA 0.23 mg.L⁻¹, HA = H₂O alcalina + BAP 3.0 mg.L⁻¹ y ANA 1.5 mg.L⁻¹ y CM = Pirogalol + BAP 1.0 mg.L⁻¹ y AIA 0.5 mg.L⁻¹.

Ensayo 2

Debido a que el mejor medio en el ensayo anterior fue el M&S con BAP y AIA a una concentración de 1.0 mg.L⁻¹ y 0.5 mg.L⁻¹ respectivamente (CM), se decidió montar un segundo ensayo probando el medio M&S con dos distintas auxinas (AIA y ANA) combinadas con un citocinina (BAP), utilizando dos citocininas juntas (BAP y 2-ip) y evaluando nuevamente el medio Heller como comparación.

En la siguiente figura (No.5) se observa que los explantes sembrados en los medios M&S; es decir, los medios MA, MX, MY y MI, presentaron una menor oxidación que los sembrados en el medio Heller, esto puede deberse tal vez a los componentes inorgánicos del medio, los cuales no favorecieron el desarrollo del callo y, esto provocó que el tejido se oxidara, ya que todos los medio fueron adicionados con la misma concentración de pirogalol (25.2 mg.L⁻¹).

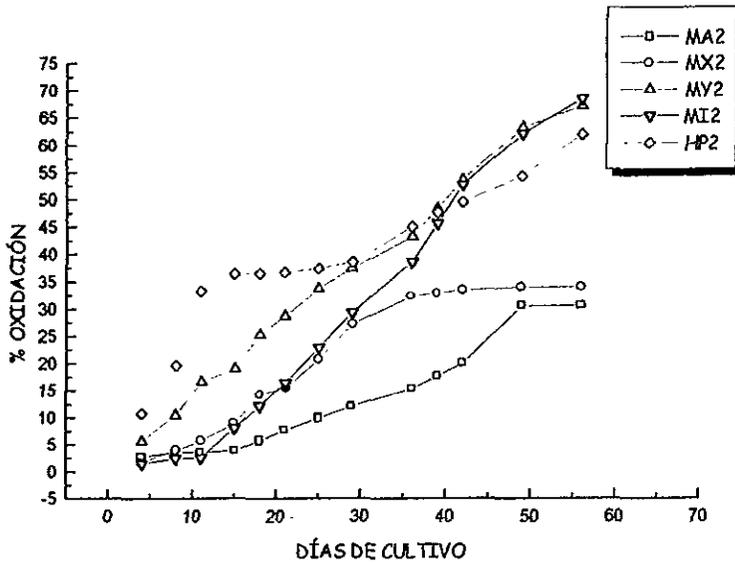


Figura 5. Porcentaje de oxidación presentado a través del tiempo en los 5 distintos medios evaluados, donde: MA = BAP 1.0 mg. L⁻¹ y AIA 0.5 mg.L⁻¹, MX = BAP 2.0 mg. L⁻¹ y ANA 1.0 mg. L⁻¹, MY = BAP 2.0 mg. L⁻¹ y 2-ip 4.0 mg. L⁻¹, MI = BAP 1.03 mg. L⁻¹ y 2-ip 0.23 mg. L⁻¹ HP = BAP 3.0 mg. L⁻¹ y ANA 1.5 mg. L⁻¹.

Al evaluar la formación de callo en los diferentes medios en la figura No.6, se puede observar que el medio que resultó mejor fue el medio MX, el cual tenía 2.0 mg. L⁻¹ de BAP y 1.0 mg. L⁻¹ de ANA, seguido por el medio MA, que tiene a la mitad la concentración de la citocinina y además fue suplementado con una auxina más débil, la AIA a una tercera parte.

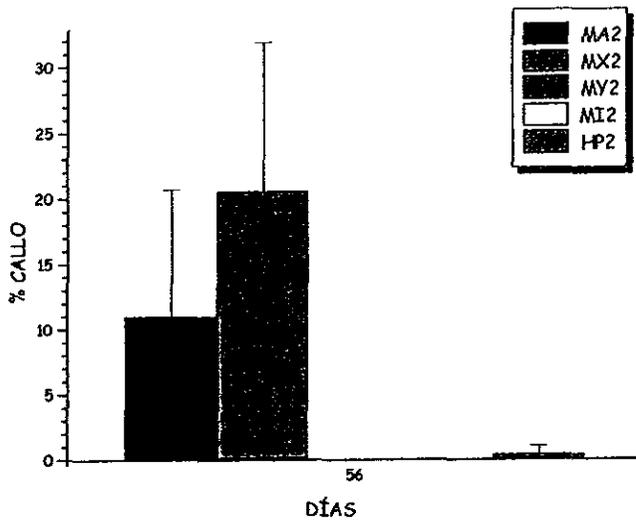


Figura 6. Porcentaje de callo producido, en los 5 distintos medios a través de tiempo, donde: MA = BAP 1.0 mg.L⁻¹ y AIA 0.5 mg.L⁻¹, MX = BAP 2.0 mg.L⁻¹ y ANA 1.0 mg.L⁻¹, MY = BAP 2.0 mg.L⁻¹ y 2-ip 4.0 mg.L⁻¹, MI = BAP 1.03 mg.L⁻¹ y 2-ip 0.23 mg.L⁻¹ HP = BAP 3.0 mg.L⁻¹ y ANA 1.5 mg.L⁻¹.

Ensayo 3:

Para este ensayo se utilizaron los mismo medios que en el ensayo anterior pero se utilizó otro medio de esterilización, el No.3. Se compararon los 10 medios de cultivo.

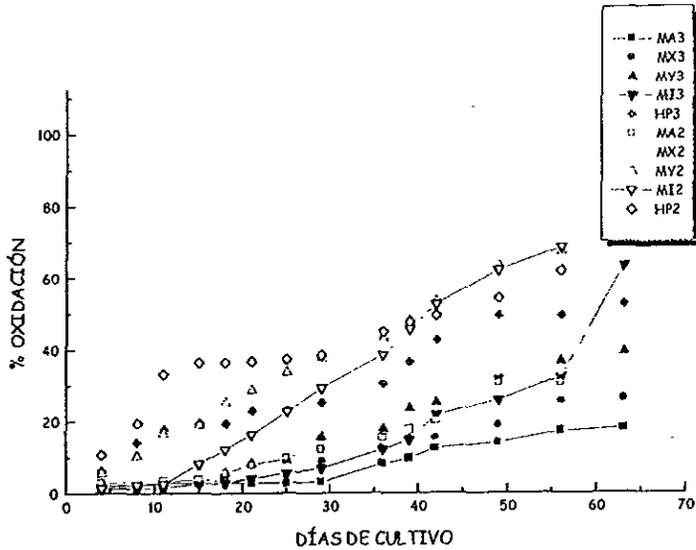


Figura 7. Comparación entre los porcentajes de oxidación presentado en 5 medios distintos, con explantes provenientes de 2 distintos métodos de esterilización, donde 2 = Explantes sometidos al método de esterilización 2 (5.0 mg. L⁻¹ de Microdyn) y 3 = explantes sometidos al método de esterilización 3 (2.5 mg. L⁻¹ de Microdyn).

Se encontró que en los 5 medios, la oxidación disminuyó al reducir la concentración de Microdyn en el proceso de esterilización a la mitad, es decir a 2.5 ml.L⁻¹, como se puede observar en la gráfica anterior (Fig.7). Esto puede ser debido a que el Microdyn está compuesto por sales de plata, las cuales funcionan como un germicida y al estar en contacto con las células del explante, en concentraciones altas, puede afectarlas, ya que son muy irritantes y caústicos (Pérez *et al.*, 1990 y Brock 1979.). Estas concentraciones altas aumentan el daño que sufre el explante, que posteriormente se manifiesta como oxidación del tejido.

Por otro lado algo interesante que se encontró al comparar los dos medios de esterilización (Fig. 8) fue que, la producción de callo se vio reducida en los dos mejores medios (MX y MA) por la disminución de Microdyn en el método de esterilización, ya que éste es un antagonista del etileno y provocó una menor división celular y por lo tanto un porcentaje menor de callo producido (Edwin y Sherrington, 1984).

Estos resultados, llevan a buscar otra forma de evitar la oxidación sin tener que disminuir, la concentración de microdyn, ya que esto afecta en la obtención del callo, el cual se requiere para inducir una morfogénesis.

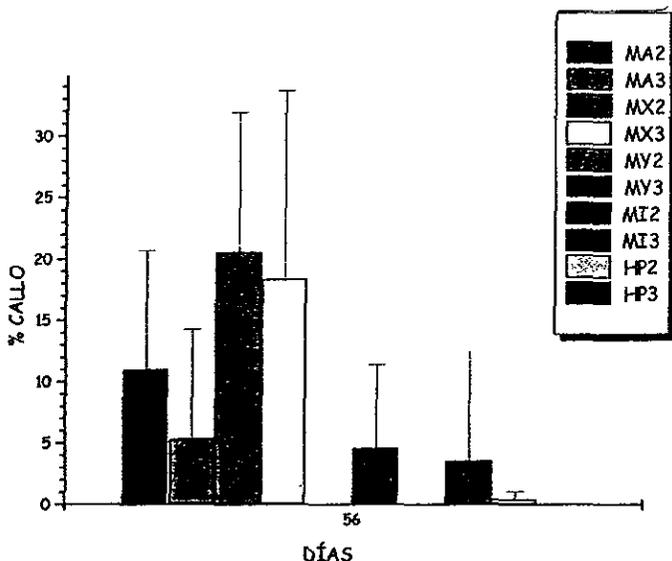


Figura 8. Porcentaje de callo que se obtuvo al final de la evaluación en los explantes sometido a los 2 distintos medios de esterilización y distinto medio de cultivo, donde 2 = Explantes sometidos al método de esterilización 2 (5.0 mg.L^{-1} de microdyn) y 3 = explantes sometidos al método de esterilización 3 (2.5 mg.L^{-1} de microdyn).

4.2.2. Selección de la combinación y concentración de citocininas y auxinas

Como los mejores resultados en cuanto a callo se presentaron en el medio adicionado con 2.0 mg.L^{-1} de BAP y 1.0 mg.L^{-1} de ANA (MX) y en el medio adicionado con 1.0 mg.L^{-1} de BAP y 0.5 mg.L^{-1} de AIA (MA) se decidió tomar estos como testigos y modificarles la concentración de la auxina, teniéndose 6 medios distintos en total.

En la figura 9 se puede observar el porcentaje de oxidación presentado en los 6 diferentes medios utilizando las cajas petri de plástico, como envase.

En la figura 10 se puede observar el porcentaje de callo presentado en cada uno de los seis diferentes medios de cultivo.

Los resultados de este ensayo se discutirán en conjunto con los resultados obtenidos en el ensayo 4.2.3.

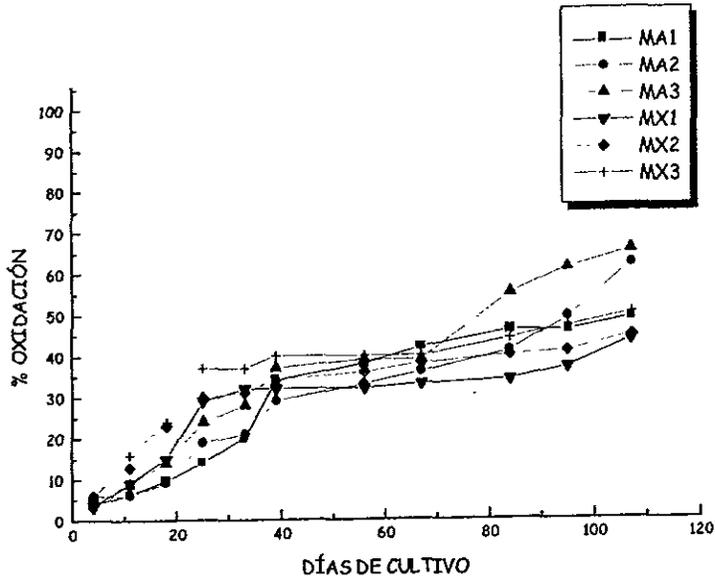


Figura 9. Porcentaje de oxidación presentado durante el periodo de evaluación en los 6 diferentes medios probados, donde MA1 = BAP 1.0 mg.L⁻¹ + AIA 0.5 mg.L⁻¹, MA2 = BAP 1.0 mg.L⁻¹ + AIA 1.0 mg.L⁻¹, MA3 = BAP 1.0 mg.L⁻¹ + AIA 1.5 mg.L⁻¹, MX1 = BAP 2.0 mg.L⁻¹ + ANA 0.5 mg.L⁻¹, MX2 = BAP 2.0 mg.L⁻¹ + ANA 1.0 mg.L⁻¹, MX3 = BAP 2.0 mg.L⁻¹ + ANA 1.5 mg.L⁻¹.

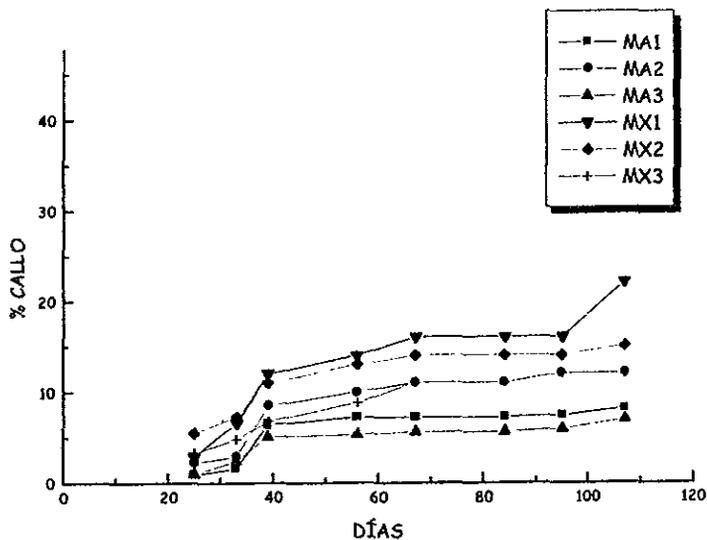


Figura 10. Porcentaje de callo presentado durante el tiempo en los 6 distintos medios evaluados, donde MA1 = BAP 1.0 mg.L⁻¹ + AIA 0.5 mg.L⁻¹, MA2 = BAP 1.0 mg.L⁻¹ + AIA 1.0 mg.L⁻¹, MA3 = BAP 1.0 mg.L⁻¹ + AIA 1.5 mg.L⁻¹, MX1 = BAP 2.0 mg.L⁻¹ + ANA 0.5 mg.L⁻¹, MX2 = BAP 2.0 mg.L⁻¹ + ANA 1.0 mg.L⁻¹, MX3 = BAP 2.0 mg.L⁻¹ + ANA 1.5 mg.L⁻¹.

4.2.3. Determinación del tipo de envase para evitar la oxidación

Ensayo 1:

Para este ensayo se realizaron los mismos medios que en el ensayo anterior, pero en cajas petri de vidrio que son más grandes (envase No.2) y en frascos de 180 ml (envase No.4, llamado frasco Gerber), para tratar de evaluar la relación que podría, existir entre el porcentaje de oxidación y el espacio libre entre el envase y el medio. Se compararon los resultados del ensayo anterior con los de este ensayo.

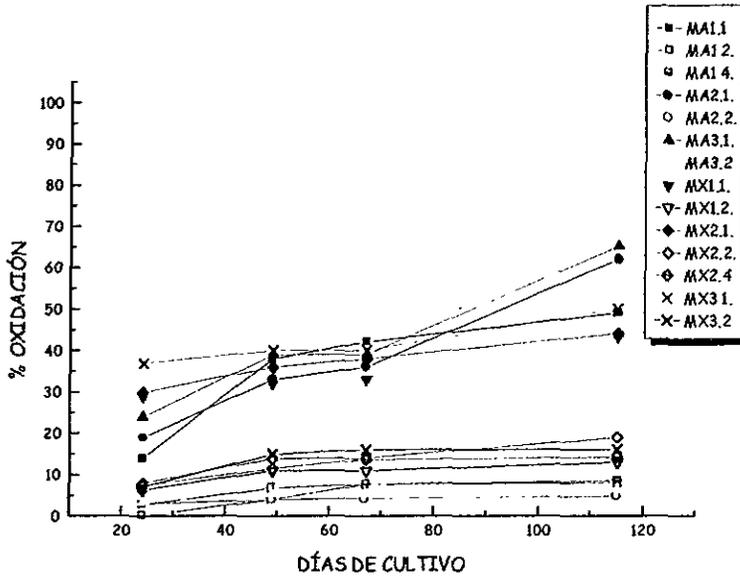


Figura 11. Porcentaje de oxidación presentado durante el tiempo de evaluación en los tres diferentes medios, en distintos envases, donde (1)= Envase No. 1 (20ml), (2)= Envase No. 2 (38 ml) y (4) = Envase No.4 (180 ml).

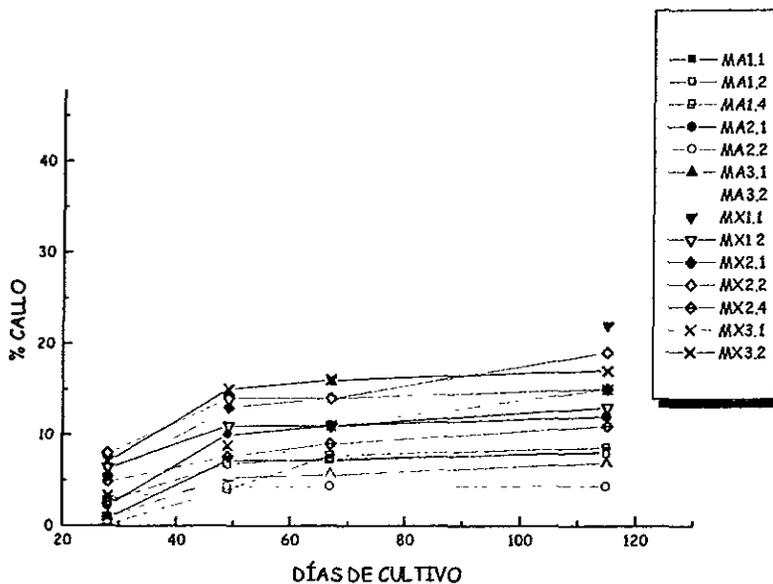


Figura 12. Porcentaje de callo presentado durante el tiempo de evaluación en los tres diferentes medios, en distintos envases, donde (1)= Envase No. 1 (20ml), (2)= Envase No. 2 (38 ml) y (4) = Envase No.4 (180 ml).

Tabla 15. Porcentaje de callo presentado al final del periodo de evaluación en los 6 diferentes medios en distintos envases.

Medio /Envase	No.1	No.2	No.4
MA1	8.13	8.0	8.6
MA2	12.0	4.4	--
MA3	6.9	6.4	--
MX1	22.0	13.0	--
MX2	15.0	19.0	11.0
MX3	15.0	17.0	--

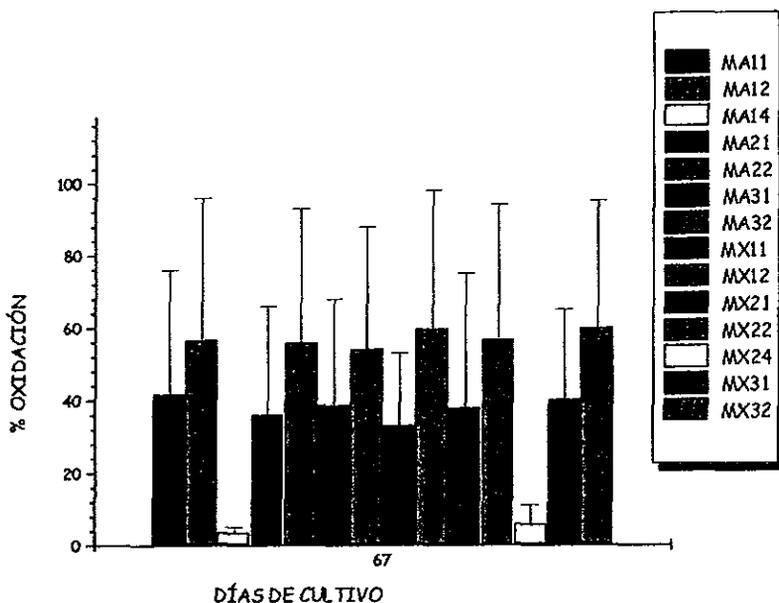


Figura 13. Comparación del porcentaje de oxidación a los 67 días de haber sido sembrados, explantes en dos distintos envases, donde (1)= Envase No. 1 (20ml), (2)= Envase No. 2 (38 ml) y (4) = Envase No.4 (180 ml).

En la gráfica 12 y en la tabla 15 se puede observar que el medio donde se obtuvo mayor porcentaje de callo fue en el medio MX1.1, siguiéndole el medio MX2.2, el MX3.2, MX2.1, MX3.1, MX1.2, todos suplementados con ANA y BAP; finalmente se encontró que los medios MA presentaron un porcentaje de callo muy bajo. Con estos resultados se puede deducir que para la inducción de callo a partir de segmentos de hoja son necesarias concentraciones que van de 0.5 a 1.5 mg.L⁻¹ de ANA y altas concentraciones de BAP (2.0 mg.L⁻¹), ya que no se presentó una gran diferencia entre los tres medios MX.

Al comparar los medios MA y MX en los primeros, no se obtuvieron los mismos resultados, ya que en estos medios se utilizó una hormona más débil y la concentración de BAP a la mitad que en los medio MX, por lo cual no hubo esa inducción para la proliferación celular.

Se encontró que al utilizar los frascos de vidrio de 180 ml (Gerber, envase No. 4), se obtuvo la mejor respuesta de los explantes a la oxidación y en segundo lugar las

cajas petri de plástico (envase No1). A pesar de que los medios MA2, MA3, MX1 y MX3, no se evaluó el envase No.4, la proporción de la oxidación, se conserva, siendo menor para el envase No.1 y mayor para el envase No. 2. No se encontró una relación entre el volumen del envase libre y el porcentaje de oxidación ya que el frasco gerber tenía un volumen de 160 ml libres del medio, seguido de las cajas petri de plástico con 10 ml y finalmente las cajas petri de vidrio con 23 ml libres.

Cabe mencionar que durante la evaluación se encontró con dos tipos distintos de callo producidos en el explante, uno de color verde y blanco muy delgado, el cual se presentó en los envases del número 4 del medio MX, y otro tipo de callo que al principio era también verde y blanco, pero posteriormente tenía un color crema amarillento el cual al pasar los días se tornaba negruzco, por lo cual se manejaba como parte del explante oxidado; este tipo de callo fue el que se presentó en los medio MX y MA, principalmente en el envase No.1. Este tipo de callo, aproximadamente a los 100 días de haber sido sembrados los explantes, formó estructuras radiculares.

Con esto se ve que el tipo de envase sí influyó en el tipo de callo que se formó, resultando el mejor envase las cajitas de petri de plástico de 20 ml, seguidas de las cajas petri de vidrio y finalmente los frascos de 180 ml (Gerber), en los cuales el callo no pasaba al segundo tipo de callo, es decir al crema amarillento. Esto tal vez fue debido al espacio libre entre el medio de cultivo y el envase ó a la cantidad de medio por envase ya que esto podría modificar las concentraciones de los diversos gases que se encuentran en el envase o de los compuestos fenólicos que se encuentran en el medio, dando como resultado la rizogénesis. Margara, J. 1988, menciona que la rizogénesis se ve aumentada por diferentes factores como una buena oxigenación e iluminación o una concentración de compuestos fenólicos.

2. Ensayos con ápices

2.1 Determinación de los componentes inorgánicos

Para este ensayo se utilizaron dos medios básicos: el medio M&S utilizado en la mayoría de las investigaciones en cultivos de tejidos y el medio Heller, utilizado para algunas especies forestales. Estos dos medios fueron suplementados con dos concentraciones distintas de una citocinina: el medio Heller con 3 y 5 mg.L⁻¹ de BAP (HI y HII respectivamente), y el medio M&S con 14.3, 10.3 y 8.3 mg.L⁻¹ de BAP y 1.3, 2.3 y 3.3 mg.L⁻¹ de 2-ip, respectivamente (MSI, MSII y MSIII). Los resultados obtenidos se presentan en las siguientes gráficas (14 y 15)

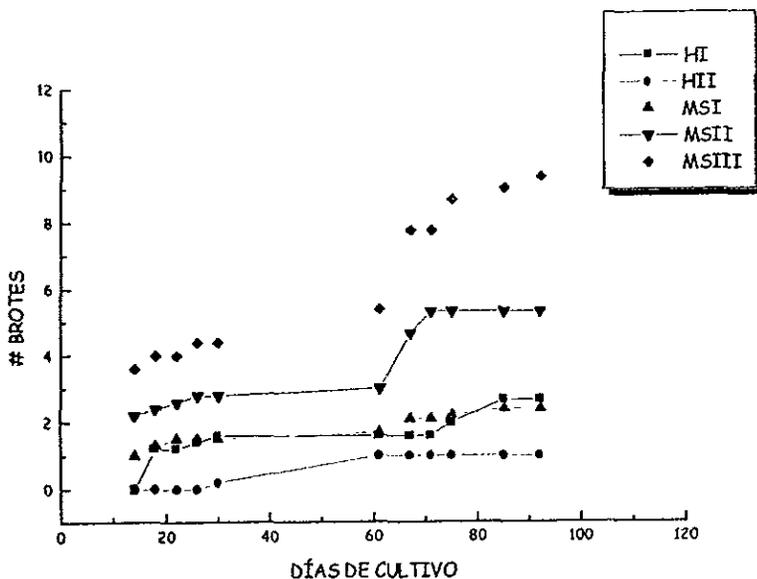


Figura 14. Número promedio de brotes obtenidos por explante, durante los primeros 92 días, en los 5 diferentes medios, donde HI = medio Heller + 3.0 mg L⁻¹ de BAP, HII= medio Heller + 5.0 mg L⁻¹ de BAP, MSI= M&S + 14.3 mg.L⁻¹ de BAP + 1.3 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSII= M&S + 10.3 mg.L⁻¹ de BAP + 2.3 mg.L⁻¹ de 2-ip, y MSIII= M&S + 8.3 mg.L⁻¹ de BAP + 3.3 mg.L⁻¹ de 2-ip.

Tabla 16. Número promedio de brotes obtenidos y porcentaje de oxidación presentado en cada uno de los cinco diferentes medios, aproximadamente a los 60 días.

Var/medio	HI	HII	M&SI	M&SII	M&SIII
No. Brotes	1.6	1	2.1	3	5.4
% Oxidación	65.5	75	87.9	91	52.5

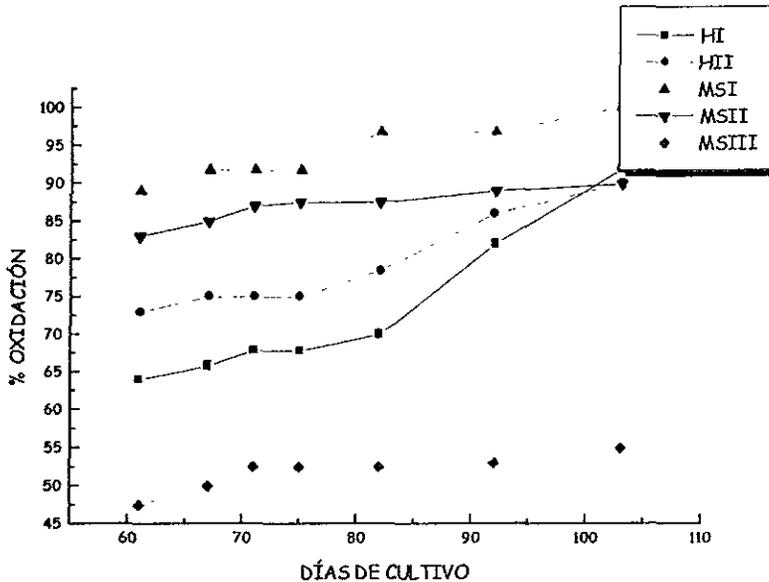


Figura 15. Porcentaje de oxidación presentado en los explante a partir de los 67 días, de haber sido sembrados en los cinco diferentes medios, donde HI = medio Heller + 3.0 mg.L⁻¹ de BAP, HII= medio Heller + 5.0 mg.L⁻¹ de BAP, MSI= M&S + 14.3 mg.L⁻¹ de BAP + 1.3 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSII= M&S + 10.3 mg.L⁻¹ de BAP + 2.3 mg.L⁻¹ de 2-ip, y MSIII= M&S + 8.3 mg L⁻¹ de BAP + 3.3 mg.L⁻¹ de 2-ip.

En la figura 14 y en tabla 16 se puede observar que los medios donde hubo una mejor respuesta en cuanto a la formación de brotes totales fueron los medios suplementados con las sales inorgánicas del medio M&S (5.4, 3 y 2.1).

El medio donde hubo una mayor formación de brotes (5.4) por explante a los 61 días fue en el medio M&S adicionado con 8.3 mg.L⁻¹ de BAP y 3.3 mg.L⁻¹ de 2-ip (MSIII), siguiéndolo el medio de cultivo M&SII con una mayor concentración de

BAP (10.3 mg.L^{-1}) pero una menor concentración de 2-ip (2.3), existiendo entre estos dos medios una diferencia de 2.4 brotes por explante, lo que permite observar que la mejor respuesta se da a una baja concentración de BAP.

Esta respuesta puede ser debida a que existe una concentración óptima para cada una de las hormonas, en la cual las células responden, y aunque se aumente la concentración de la hormona, las células no pueden responder.

En la figura 15 se observa que el medio M&S que proporcionó la mejor respuesta en cuanto a número de brotes (MSIII), también nos da la mejor respuesta en cuanto a oxidación, es decir es el medio que presenta un porcentaje de oxidación menor, siguiendolo los medios de cultivo HI, HII, M&SII y finalmente el que presenta una mayor oxidación es el medio MSI.

Comparando el medio Heller con el medio M&S, el primero presenta varias desventajas tales como, que contiene como única fuente de nitrógeno, el nitrato de sodio y no presenta iones amonio que juegan un papel muy importante en la activación de la enzima nitrato reductasa y para la formación de la pared celular. Este medio al carecer de sales de amonio, produce una disminución en la actividad de las enzimas nitrato y nitrito reductasa, ocasionando una acumulación de nitritos en el medio, los cuales son tóxicos para las plantas (Uribe, 1998).

Otra desventaja es que no contiene molibdeno, el cual está presente en varias enzimas, ocasionando una disminución en estas enzimas tales como la nitrito reductasa, ocasionando también una acumulación de nitritos en el medio, alcanzando estos niveles tóxicos.

Este medio también contiene una alta concentración de cloruros, que a pesar de ser esenciales para las plantas en pequeñas proporciones, ya que participan en el proceso fotosintético, se ha demostrado que cuando excede su concentración, es un compuesto tóxico para muchas plantas, afectando en especial a muchas especies forestales (Uribe, 1998).

2.2 Determinación de la concentración y combinación de citocininas

Ensayo 1:

Como se observó que se obtienen mejores respuestas en cuanto a número de brotes y porcentaje de oxidación, utilizando concentraciones menores de BAP, se realizó el

siguiente experimento, donde se disminuyó la concentración de BAP y de 2-ip, obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 17. Número de brotes promedio obtenido y porcentaje de oxidación presentado en los diferentes medios aproximadamente a los 61 días.

Var/medio	M&SIII	M&SIV	M&SV
No. De Brotes	2.44	3.0	4.83
% de Oxidación	63.2	58.8	14.8

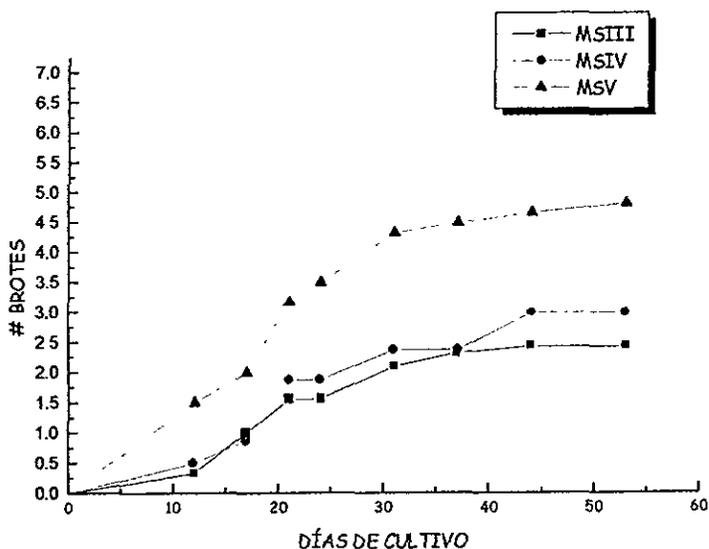


Figura 16. Numero de brotes promedio obtenidos por explante hasta el día 53, en los tres diferentes medios, donde MSIII= M&S + 8.3 mg.L⁻¹ de BAP y 2.3 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSIV = M&S + 6.3 mg.L⁻¹ de BAP y 1.7 mg.L⁻¹ de 2-ip, y MSV = M&S + 4.3 mg.L⁻¹ de BAP y 1.2 mg.L⁻¹ de 2-ip.

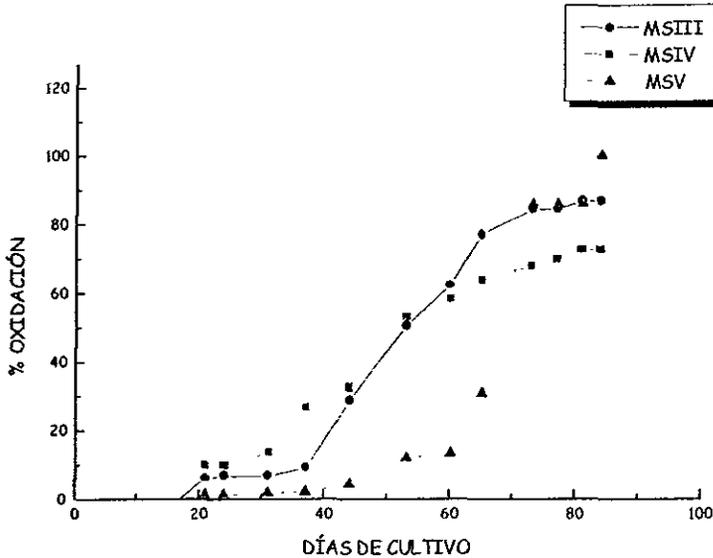


Figura 17. Porcentaje de oxidación presentado a partir de la siembra de los explantes hasta el día 84, donde MSIII= M&S +8.3 mg.L⁻¹ de BAP y 2.3 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSIV = M&S +6.3 mg.L⁻¹ de BAP y 1.7 mg.L⁻¹ de 2-ip, y MSV = M&S + 4.3 mg.L⁻¹ de BAP y 1.2 mg.L⁻¹ de 2-ip.

En la figura 16 se puede observar que el medio que presenta una mayor formación de brotes es el medio en el cual, la concentración de BAP es la menor (4.3 mg.L⁻¹), siguiendo el medio adicionado con 6.3 y por último el medio adicionado con 8.3, confirmando que a una baja concentración de BAP, se obtiene una mejor respuesta en la formación de brotes. Otro punto importante es que si comparamos la figura 16 y la 14, donde también utilizamos el medio MSIII adicionado con 8.3 mg.L⁻¹ de BAP, pero una concentración de 3.3 mg.L⁻¹ de 2-ip se encuentra que al disminuir la concentración de 2-ip (a 2.3 mg.L⁻¹), el promedio de brotes por explante obtenidos, también baja, teniéndose una diferencia de casi 3 brotes por explante.

Con este punto se puede decir que la relación BAP/2-ip, afecta la respuesta morfológica de los explantes, debiéndose esto, tal vez a que estas dos citocininas, al tener una estructura molecular distinta, trabajan por separado y provocan las dos al mismo tiempo una inducción de brotes adventicios, por lo cual, sí bajamos la concentración del 2-ip, se disminuye el número de brotes producidos.

En cuanto a la oxidación podemos ver que el medio que presentó la mejor respuesta en cuanto a número de brotes (MSV) también presenta la mejor respuesta en cuanto a la oxidación (como se aprecia en la figura 17) hasta el día 65, a partir del cual da un salto de 30 % de oxidación a 85 %. El segundo lugar en cuanto a la oxidación es el medio MSIV que es el intermedio en cuanto a la concentración de BAP (6.3 mg.L^{-1}). Por último el que presentó un mayor porcentaje de oxidación fue el medio suplementado con 8.3 mg.L^{-1} de BAP.

En la figura 17 también se puede observar que conforme se disminuye la concentración de BAP, también disminuye el porcentaje de oxidación, esto debido tal vez, a que el explante no puede utilizar concentraciones altas de citocininas, quedando éstas en el medio de cultivo, lo que puede provocar la oxidación del explante (Edwin y Sherrington, 1984).

Ensayo 2:

Para evaluar la relación BAP/2-ip, se realizaron los 2 siguientes ensayos. Para empezar se redujo la concentración de 2-ip a un 10% de lo que se había utilizado en el ensayo anterior, obteniéndose los siguientes resultados.

En la figura y tabla 18 se observa que el medio donde hubo un mayor número de brotes fue en el medio de cultivo M&SIV.10, seguido por el M&SV.10 y por último el medio MSIII.10.

En la figura 19 se observa que el medio que presentó la mejor respuesta en cuanto a número de brotes, también presentó una menor oxidación (medio M&SIV.10) seguido del medio M&SV.10. Estos resultados se discutirán en conjunto con los del ensayo número tres.

Tabla 18. Número de brotes promedio obtenido y porcentaje de oxidación presentado en los diferentes medios, a los 61 días.

Var/medio	M&SIII.10	M&SIV.10	M&SV.10
No. de Brotes	1.4	3.1	2.5
% de oxidación	41.0	17	40.0

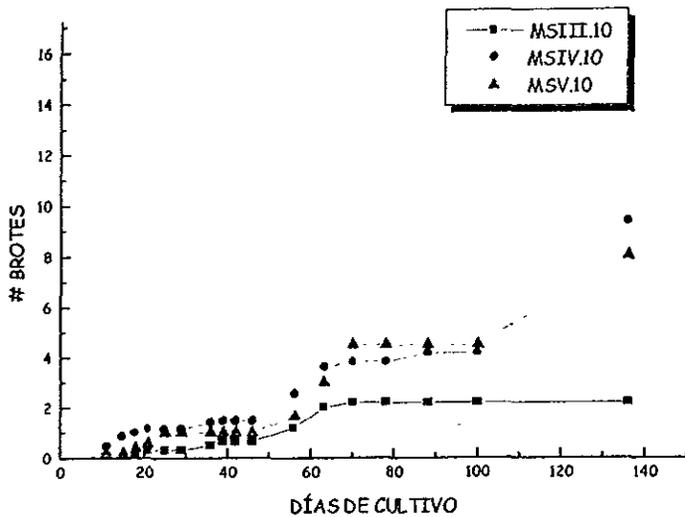


Figura 18. Número de brotes obtenidos a través del tiempo de estudio en 3 diferentes medio, donde MSIII. = M&S + 8.3 mg.L⁻¹ de BAP y 0.23 mg.L⁻¹ de 2-ip. , MSIV. = M&S + .3 mg.L⁻¹ de BAP y 0.17 mg.L⁻¹ de 2-ip, y MSV= M&S + 4.3 mg.L⁻¹ de BAP y 0.12 mg.L⁻¹ de 2-ip.

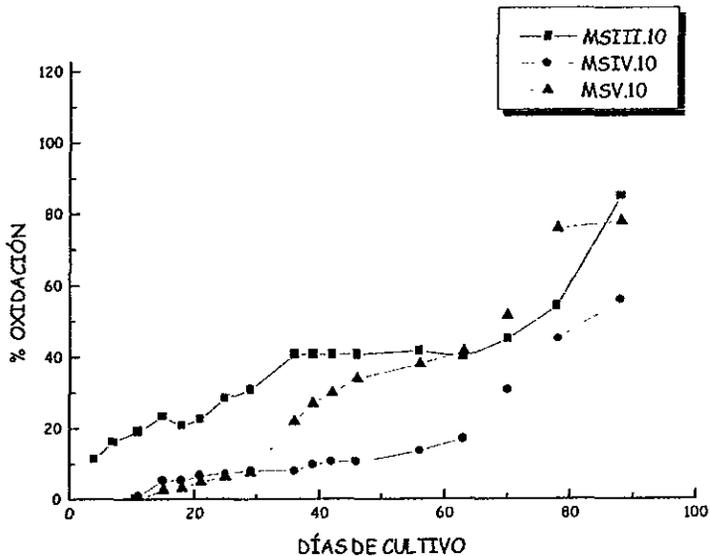


Figura 19. Porcentaje de oxidación presentado durante el periodo de estudio en los tres diferentes medios utilizados.

Ensayo 3:

En este ensayo se decidió eliminar por completo una de las citocininas, el 2-ip, para determinar el papel que juega en el medio.

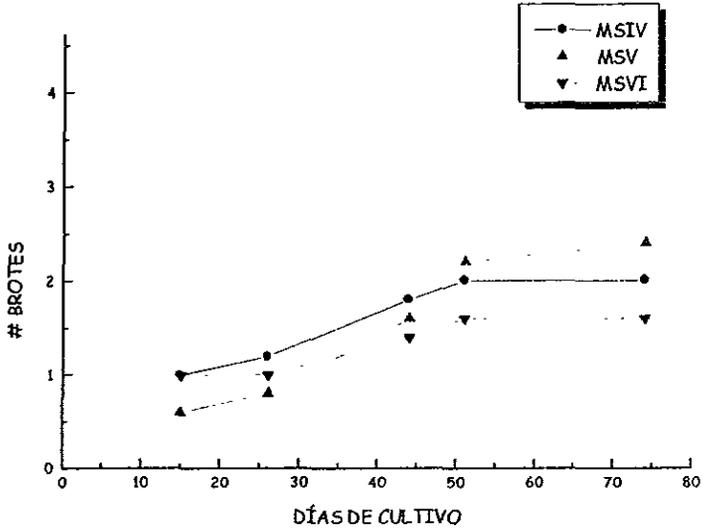


Figura 20. Número de brotes obtenidos en los tres diferentes medios, los cuales carecen totalmente de 2-ip, donde: MSIV= 6.3 mg.L⁻¹ de BAP, MSV= 4.3 mg.L⁻¹ de BAP, MSVI= 2.3 mg.L⁻¹ de BAP.

Tabla 19. Número promedio de brotes diferenciados y porcentaje de oxidación presentado en cada uno de los tres medio utilizados durante este ensayo, a los 61 aproximadamente.

Var./ medio	M&SIV.	M&SV.	M&SVI.
No. Brotes	2.0	2.3	1.6
% Oxidación	53.0	27.0	32.5

En la figura anterior (No.20) se puede observar que la mejor respuesta en cuanto a número de brotes se obtiene al aplicar 4.3 mgL^{-1} de BAP, posteriormente con 6.3 y finalmente con 2.3 . Esto nos indica que existe una concentración óptima de la citocinina BAP en la cual se obtiene mejores resultados y si esta concentración es excedida (utilizando 6.3 mg.L^{-1}) o no alcanzada (con 2.3 mg.L^{-1}), la respuesta disminuye.

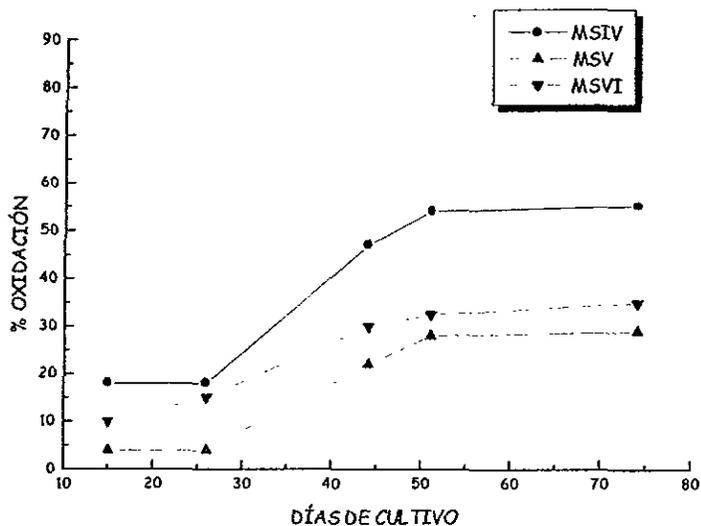


Figura 21. Porcentaje de oxidación presentado en los tres diferentes medios, que carecen totalmente de 2-ip.

En la figura 21 se puede observar que de igual forma que en los ensayos anteriores, el medio que presenta una mejor respuesta en cuanto al número de brotes es el que presenta una menor oxidación, seguido por el medio que contenía la menor concentración de BAP y finalmente el que contenía la concentración máxima de BAP (6.3 mgL^{-1}).

Para poder determinar la concentración y combinación óptima de las dos citocininas para la formación de brotes adventicios y porcentaje de oxidación, se compararon los resultados obtenidos en los tres diferentes ensayos que conformaron la

presente etapa, pudiéndose comparar así cuatro concentraciones distintas de BAP con diferentes concentraciones de 2-ip.

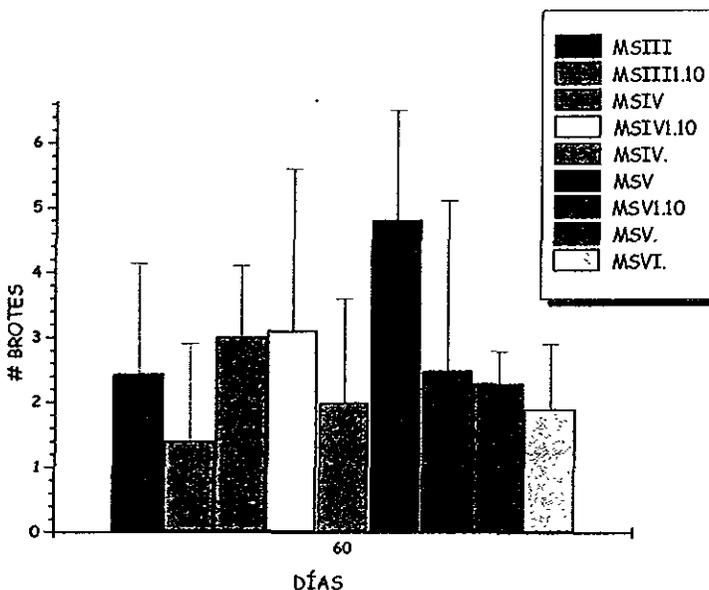


Figura 22. Número de brotes obtenidos aproximadamente en el día 60 de los explantes sometidos a los tres ensayos que conformaron la etapa 2. Determinación de la concentración y combinación de citocininas, donde; MSIII = 8.3 mg.L⁻¹ de BAP y 2.3 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSIII.10 = 8.3 mg.L⁻¹ de BAP y 0.23 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSIV = 6.3 mg.L⁻¹ de BAP y 1.7 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSIV.10 = 6.3 mg.L⁻¹ de BAP y 0.17 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSV = 6.3 mg.L⁻¹ de BAP, MSV = 4.3 mg.L⁻¹ de BAP y 1.2 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSV.10 = 4.3 mg.L⁻¹ de BAP y 0.12 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSV. = 4.3 mg.L⁻¹ de BAP, MSVI. = 2.3 mg.L⁻¹ de BAP.

Comparando los resultados de los tres ensayos, se puede observar, que la mejor respuesta en cuanto el número de brotes adventicios formados, es en el medio MSV con 4.3 mg.L⁻¹ de BAP y 1.2 mg.L⁻¹ de 2-ip, y conforme se disminuye la concentración de 2-ip en el medio (M&SV1.10 y M&SV.) se disminuye el número de brotes formados.

El segundo mejor medio fue el MSIV1.10 con 6.3 mg.L⁻¹ de BAP y 0.17 mg.L⁻¹ de 2-ip. Se puede observar que sí a este medio se le aumenta la concentración de 2-ip de 0.17 mg.L⁻¹ a 1.7 mg.L⁻¹ (M&SIV) o se elimina por completo (M&SIV.), el número de brotes disminuye.

Estos resultados indican que existe una concentración óptima de las citocininas, que viene dada, tanto por la concentración de BAP como de 2-ip, y que al disminuirse o aumentar esta concentración, ya sea por el aumento o la disminución de alguna de las dos citocininas, se ve afectado el número de brotes adventicios formados.

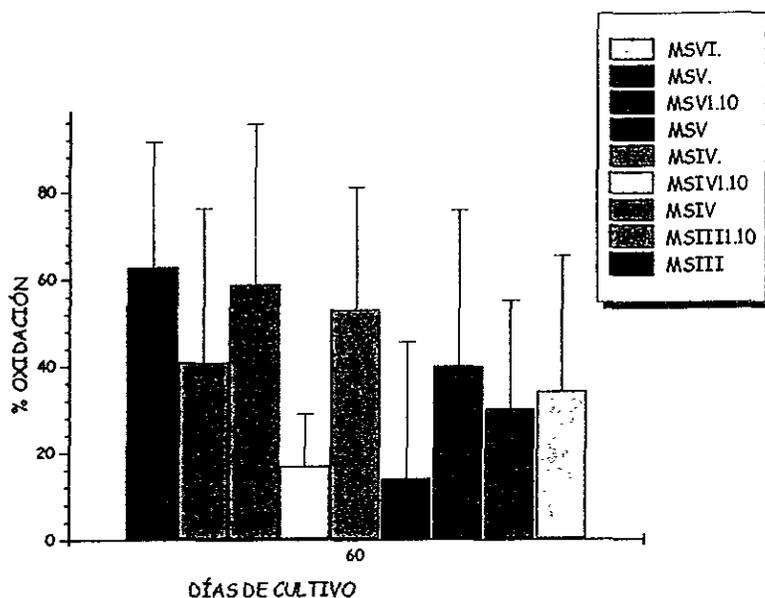


Figura 23. Porcentaje de oxidación presentado en los diferentes medios, aproximadamente a los 65 días de haber sido sembrados, donde, MSIII = 8.3 mg L⁻¹ de BAP y 2.3 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSIII.10 = 8.3 mg L⁻¹ de BAP y 0.23 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSIV = 6.3 mg.L⁻¹ de BAP y 1.7 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSIV.10 = 6.3 mg.L⁻¹ de BAP y 0.17 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSIV = 6.3 mg.L⁻¹ de BAP, MSV = 4.3 mg.L⁻¹ de BAP y 1.2 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSVI.10 = 4.3 mg.L⁻¹ de BAP y 0.12 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSV = 4.3 mg.L⁻¹ de BAP, MSVI = 2.3 mg.L⁻¹ de BAP.

En cuanto al porcentaje de oxidación (Fig.23) se puede ver que éste tiene una relación con la concentración de las citocininas, y que al ir disminuyendo esta concentración también disminuye el porcentaje de oxidación.

2.3 Adición de una auxina al mejor medio

En el presente ensayo se utilizó 4.3 mg.L^{-1} de BAP, (ya que esta fue la concentración óptima que se encontró para esta citocinina), como testigo y se utilizó otro medio, empleando la misma concentración de BAP pero utilizando una auxina, la ANA a una concentración de 1.5 mg.L^{-1} , con el fin de evaluar si esto podría mejorar la producción de brotes adventicios o la inducción al enraizamiento.

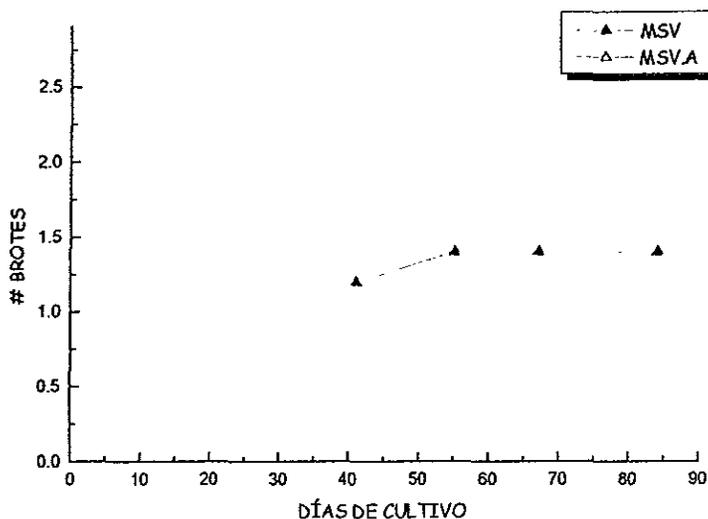


Figura 24. Número de Brotes obtenidos en los dos diferentes medios, donde MSV = M&S + 4.3 mg.L^{-1} de BAP y MSV A= M&S + 4.3 mg.L^{-1} de BAP + 1.5 mg.L^{-1} de ANA.

En la figura 24 se puede ver que la adición de la auxina (ANA) a una concentración de 1.5 mg.L^{-1} al medio no promovió la formación de brotes adventicios ni al enraizamiento, al contrario, la formación de estos brotes fue nula en este medio, ya que lo único que se presentó fue la formación de callo. Esto puede ser debido a que el ANA, al ser una auxina lo que provocó fue división celular y alargamiento que se reflejó en la formación del callo, lo cual no había ocurrido en ninguno de los otros medio utilizados (Hurtado, 1994).

En cuanto al enraizamiento que se esperaba que ocurriera, no se logró. Robledo P.A. (1987) logró enraizar tan solo un 3% de sus brotes de pino con el AIB a concentraciones de 3.0 mg.L^{-1} , por lo cual podemos pensar que la concentración suministrada al medio (1.5 mg.L^{-1} de ANA) fue muy alta además de que esta hormona es más fuerte que la utilizada por Robledo.

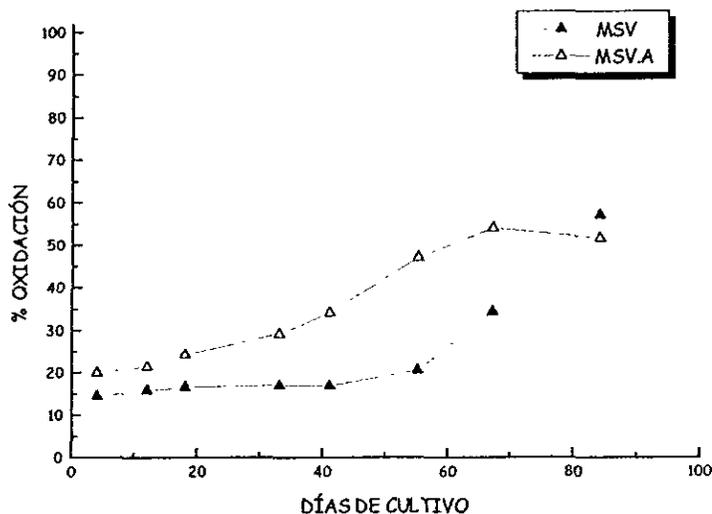


Figura 25 Porcentaje de oxidación presentado a través del periodo de evaluación en los explantes sembrados en los dos diferentes medios, donde MSV = M&S + 4.3 mg.L^{-1} de BAP y MSV.A = M&S + 4.3 mg.L^{-1} de BAP + 1.5 mg.L^{-1} de ANA.

Al evaluar el parámetro de oxidación como se observa en la figura 25, este fue mayor en el medio con ANA, que en el control, que no contenía.

2.4 Adición de ácido ascórbico a los dos mejores medios y la utilización del medio WPM, para la disminución de la oxidación en los explantes.

Dentro de esta etapa se realizaron 2 ensayos.

Ensayo1: Para este ensayo se utilizaron 4 diferentes medios: a dos de ellos se les agregaron 4.3 y a otros dos 6.3 mg.L⁻¹ de BAP, con la diferencia de la adición de ácido ascórbico a dos de los medios.

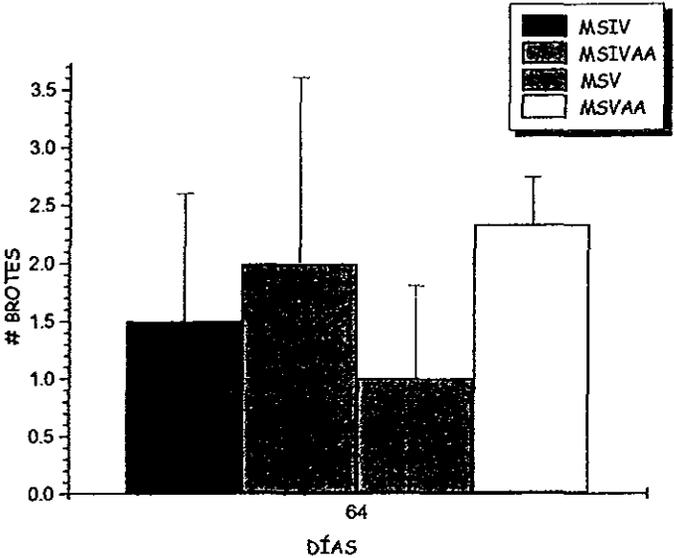


Figura 26 Número de brotes obtenidos en los 4 diferentes medios de cultivo, donde MSIV= M&S + 6.3 mg.L⁻¹ de BAP+ 1.7 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSIVAA = M&S + 6.3 mg.L⁻¹ de BAP+ 1.7 mg.L⁻¹ de 2-ip + 100.0 mg.L⁻¹ de Acido ascórbico, MSV = M&S + 4.3 mg.L⁻¹ de BAP+ 1.2 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSVAA: = M&S + 6.3 mg.L⁻¹ de BAP+ 1.7 mg.L⁻¹ de 2-ip + 100.0 mg.L⁻¹ de Acido ascórbico.

Como se puede observar en la figura 26, la formación de brotes se vio favorecido al adicionar a los dos mejores medios ácido ascórbico.

Uribe, L.I. (1998) menciona que al utilizar 300 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico, obtuvo los mejores resultados en cuanto a crecimiento y porcentaje de oxidación de brotes adventicios de ceiba. En este ensayo con 100 mg.L⁻¹ de ácido ascórbico se obtuvieron buenos resultados aumentando de 1.5 a 2.0 brotes obtenidos en los primeros 64 días utilizando el medio M&SIV y de 0.9 a 2.3 brotes, utilizando el

medio M&SV, debido a que este compuesto, que es ampliamente utilizado en el cultivo de tejidos, como antioxidante, suprime la formación de callo e incluso se sabe que induce la formación de brotes adventicios. Aunque no se conoce su mecanismo de acción se cree que al descomponerse en ascorbato, ofrece cierta protección al tejido de sustancias endógenas como fitohormonas y fenoles (Uribe, 1998)

En cuanto a la oxidación a los 64 días, ésta se redujo, al adicionar ácido ascórbico, al medio, debido a que este compuesto es un antioxidante.

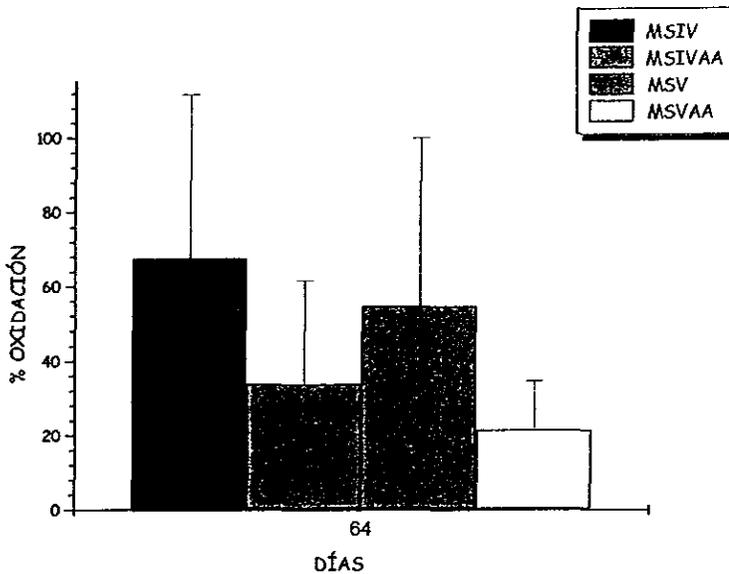


Figura 27 Porcentaje de oxidación presentado en los 4 diferentes medios, donde MSIV= M&S + 6.3 mg.L⁻¹ de BAP+ 1.7 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSIVAA = M&S + 6.3 mg.L⁻¹ de BAP+ 1.7 mg.L⁻¹ de 2-ip + 100.0 mg.L⁻¹ de Ácido ascórbico, MSV = M&S + 4.3 mg.L⁻¹ de BAP+ 1.2 mg.L⁻¹ de 2-ip, MSVAA:= M&S + 6.3 mg.L⁻¹ de BAP+ 1.7 mg.L⁻¹ de 2-ip + 100.0 mg.L⁻¹ de Ácido ascórbico.

Ensayo 2:

Para este ensayo solo se utilizó la mejor concentración encontrada para la producción de brotes adventicios, 4.3 mg.L⁻¹ de BAP + 1.2 mg.L⁻¹ de 2-ip con dos diferentes sales, las del medio M&S y las del medio WPM.

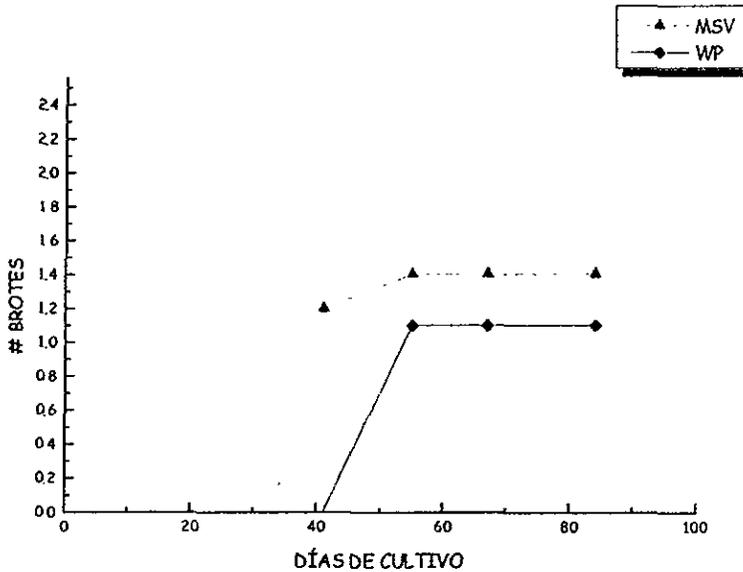


Figura 28. Número de brotes obtenidos en los dos diferentes medios, donde: MSV= M&S + 4.3 mg.L^{-1} de BAP + 1.2 mg.L^{-1} de 2-ip, y, WP= medio WP + 4.3 mg.L^{-1} de BAP + 1.2 mg.L^{-1} de 2-ip.

En la figura anterior (No. 28) se puede observar que se obtuvieron mejores resultados en cuanto al número de brotes adventicios formados utilizando el medio M&S, debido tal vez a que existen grandes diferencias entre las sales inorgánicas de estos dos medio como que el medio WPM no tiene KNO_3 mientras que le medio M&S tiene 1900.0 mg.L^{-1} , la concentración de NH_4NO_3 en el medio M&S es de 1650.0 mg.L^{-1} y en el medio WPM es de 400 mg.L^{-1} , además de que el CaCl_2 en el medio M&S es de 440.0 mg.L^{-1} y en el medio WPM es de 96.0 mg.L^{-1} y el medio M&S carece de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ mientras que el medio WPM tiene 556 mg.L^{-1} .

En conclusión el nitrógeno esta más limitado en el medio WPM, el cual estimula

la organogénesis, así como la embriogénesis somática (Hurtado, 1994), además de que se ve limitado el crecimiento de los brotes.

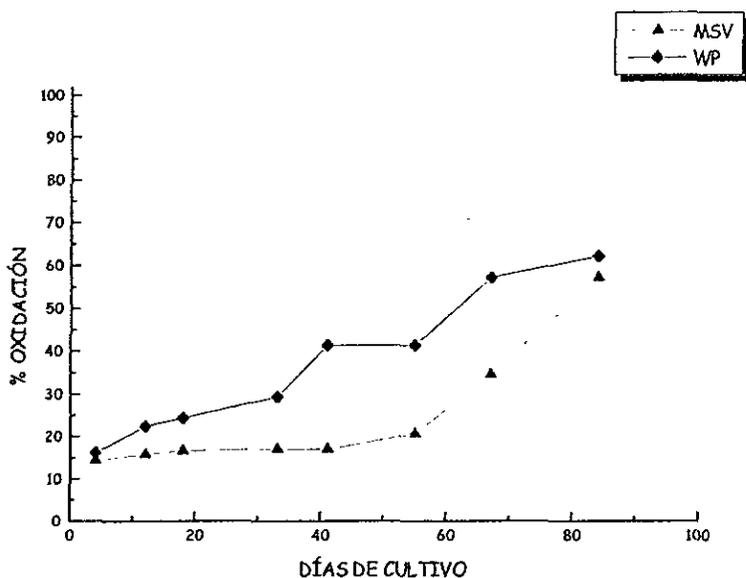


Figura 29 Porcentaje de oxidación presentado en los dos diferentes medios de cultivo durante el periodo de estudio, donde: MSV= M&S + 4.3 mg.L⁻¹ de BAP + 1.2 mg.L⁻¹ de 2-ip, y, WP= medio WP + 4.3 mg.L⁻¹ de BAP + 1.2 mg.L⁻¹ de 2-ip.

Se puede observar en la figura 29 que la oxidación no disminuyó utilizando el medio WPM, ni aumento el número de brotes, así que se decidió seguir trabajando con el medio M&S.

Como podemos observar a lo largo de los ensayos con ápices, por lo general, cuando se disminuyó la concentración de BAP, se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la inducción de la formación de brotes adventicios que fue el objetivo del presente trabajo, pero existe el problema, de que el número máximo que se obtenía en cada ensayo aplicando una menor concentración de la citocinina, nunca se volvió a alcanzar el máximo que fue de 5.33 brotes por explante que se obtuvieron en el primer ensayo donde se utilizaba 8.3 mg l⁻¹ de BAP y 2.3 mg l⁻¹ de 2-ip, lo que nos lleva a pensar que existe una gran variabilidad de respuesta por explante, y sí a

esta variabilidad le sumamos, que las plantas donadoras de los explantes provenían de 3 distintas localidades, aunque se trataba de que tuvieran la misma edad al ser procesadas, creó que esto fue uno de los factores que afectaron en gran medida, las respuesta que se obtuvo en cada uno de los ensayos. Leakey y Newton (1994) mencionan este mismo problema, con *Khaya* que es un género que también pertenece a la familia de las meliaceas. Como sabemos todos los organismos somos únicos y respondemos de una forma muy variada a situaciones aparentemente semejantes.

Ensayos realizados con especies forestales han demostrado que el tamaño de la semilla, la localidad donde fue colectada, las condiciones de almacenamiento, los tratamientos pregerminativos, la fecha de siembra, la fertilización sin mencionar la carga génica que posee cada organismo, afectan grandemente en el desarrollo de las plántulas, que nos origina una gran variabilidad en la respuesta del explante.

CONCLUSIONES

Se determinaron las condiciones adecuadas para el establecimiento del cultivo *in vitro* que permitió la diferenciación y multiplicación de brotes adventicios de caoba. Primero, se logró el establecimiento del cultivo aséptico *in vitro* de ambos explantes utilizando dos agentes desinfectantes: el hipoclorito de sodio (Cloralex) al 10% y de 2.5 a 5.0 ml.L⁻¹ de Microdyn, durante 10 minutos.

La utilización de un detergente como el Tween 20 ó altas concentraciones de Microdyn, ocasionó daños en ambos explantes, provocando la muerte del tejido.

Como mejor medio de cultivo en cuanto a sales inorgánicas para el cultivo tanto de hojas como de ápices resultó ser el medio M&S.

En cuanto a reguladores del crecimiento para la obtención de callo a partir de segmentos de hoja se encontró que la utilización del ANA a concentraciones de 0.5 a 1.5 mg.L⁻¹ y de 2.0 mg.L⁻¹ de BAP, promovió la formación del callo e indujo a la rizogénesis utilizando envases pequeños (cajas petri de 20 ml). La utilización de altas concentraciones de Microdyn durante la esterilización del explante promovió una mayor formación de callo.

La adición de una auxina (ANA) al mejor medio del cultivo para ápices, provocó la formación de callo en la base de estos y no se formó ningún brote, ni raíz.

Para la formación de brotes adventicios, a partir de ápices, se requirieron concentraciones de 4.3 mg.L⁻¹ de BAP y de 1.2 mg.L⁻¹ de 2-ip, consiguiendo en promedio 4.9 brotes por explante.

La utilización de pirogalol + ácido ascórbico, dio como resultado una menor oxidación de ápices, además de que el número de brotes adventicios formados aumento en más de un 100% con la utilización del ácido ascórbico.

De los dos tipos de explante utilizados (segmentos de hoja y ápices), el que resultó ser el ideal para la obtención de brotes adventicios fueron los ápices.

LITERATURA CONSULTADA

Barrosa C., J.T., Hernández P., L. y De la Cruz P., E. 1992. Producción de planta y establecimiento de plantaciones de la caoba en el Estado de Tabasco. Folleto Técnico No. 13. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos, México.

Bonga, J.M y Von Aderkas, P. 1992. In vitro culture of Trees. Forestry Sciences, Volume 38, Klumer Academic Publishers.

Brock, T.D. 1979. Biology of microorganisms. Prentice - Hall, New Jersey. 801 p.

Camacho, U.D. 1988. La madera: estudio anatómico y catálogo de especies mexicanas. Instituto Nacional de Antropología e Historia, México.

Colegio de Postgraduados. 1994. Resúmenes del Simposio y II Reunión Nacional de Silvicultura y Manejo de Recursos Forestales: retos y perspectivas. (6-9 de septiembre de 1994).Unidad de Congresos del Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.

Devlin, R. M.1982. Fisiología Vegetal. Omega, España.

Edwin. F.G. y P.D. Sherrington.1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics Limited, Inglaterra. 709 p.

Enríquez del Valle, J.R. 1985. Propagación *in vitro* de Cedro Rojo (*Cedrela odorata* L.). Tesis Profesional, Universidad Autónoma de Chapingo. 93 p.

Estrada L., A. A. 1988. Producción de brotes e injertación in vitro de seis especies de nopal (*Opuntia* spp.) originarias del altiplano potosino-zacatecano. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. 160 p.

Evers, P.W., Donkers, A., Prat, A., y Vermeer E. 1988. Micropropagation of Forest Trees Through Tissue Culture. Pudos Wageningen, Netherlands. 84p

Hartman H.T., Kester D.E. 1987. Propagación de Plantas. Principio y Prácticas. Prentice Hall, México.

Haslam E. 1989. *Chemistry and Pharmacology of Natural Products. Plant Polyphenols vegetable Tannins revisited*. Cambridge University Press.

Hurtado, D. V. y Merino, M. E. 1994. *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Trillas, México. 232 P.

Lamb, F. B. 1966. *Mahogany of Tropical America: Its ecology and management*. The University of Michigan Press.

Leakey R. R. B. and Newton, A. C. 1994. *Tropical trees: the potential for domestication and the rebuilding of forest resources*. Institute of Terrestrial Ecology, London. 284 p

Lehninger, A.L. 1982. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*. Omega, Barcelona. 1117p.

Margara, J. 1988. *Multiplicación Vegetativa y Cultivo in vitro. Los meristemos y la organogénesis*. Ediciones Mundo Prensa, Madrid. 232 p

Martínez, M. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*.

Martínez, R.R. 1997. *Organogénesis y Embrigénesis somática in vitro en Nim *Azadirachta indica* A.JUSS*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chapingo, México.

Niembro, R. A. 1989. *Semillas de plantas leñosas. Morfología Comparada*. LIMUSA, México. 285 p.

Niembro, R. A. 1990. *Árboles y arbustos útiles de México*. LIMUSA, México. 206 p.

Pennington T., D. y Sarukhán, J. 1968. *Manual para la identificación de Campo de los Principales Árboles Tropicales de México*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, México. 176 p.

Pérez M.J.A., Suárez G.F. y Flores C. R. 1990. *Bacteriología General*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México. 398 p.

- Pierik, R.L.M. 1988. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Mundi Prensa, España.
- Rendon T. 1945. *La producción de la caoba en México*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Robert, M.L. y Loyola V.M. 1985. *El cultivo de Tejidos Vegetales en México*. Centro e Investigación Científica de Yucatán, CONACYT, México.
- Robledo, P. A. 1987. *Diferenciación de Brotes Adventicios en cotiledones de Pinus maximartinezii Rzedowski Cultivados in vitro*. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala UNAM, México.
- Salisbury, F.B. Y Ross C.W. 1996. *Fisiología Vegetal*. Iberoamérica, México. 759 p.
- Takeuchi, M. 1973. *Método de Cultivo de Tejidos Vegetales*. Colegio de Postgraduados ENA, Chapingo, México.
- Uribe, F. L. I., 1998. *Influencia de distintos antioxidantes sobre la brotación y crecimiento in vitro en ceiba (Ceiba pentandra)*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 69p.
- Vickery, M.L. 1987. *Ecología de Plantas Tropicales*. LIMUSA, México. 232 p.

ANEXO

Medio MS * (Murashige & Skoog, 1962)

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 100 mM.l ⁻¹
		Mg.l ⁻¹	mM.l ⁻¹	
Solución I				
NH ₄ NO ₃	80.040	1650	20.6	2060
KNO ₃	101.108	1900	18.8	1880

Solución II				
MgSO ₄ *7H ₂ O	246.480	370.0	1.5	150
MnSO ₄ *H ₂ O	169.010	16.9	1x10 ⁻²	1
ZnSO ₄ *7H ₂ O	287.540	8.6	3x10 ⁻²	3
CuSO ₄ *5H ₂ O	249.680	2.5x10 ⁻²	1x10 ⁻²	1

Solución III				
CaCl ₂ *2H ₂ O	147.020	440.00	3	300
KI	166.010	0.83	5x10 ⁻³	5x10 ⁻¹
CoCl ₂	237.930	2.5x10 ⁻²	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻²

Solución IV				
KH ₂ PO ₄	136.090	170.00	1.25	125
H ₃ BO ₃	61.860	6.20	1x10 ⁻³	1x10 ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ * H ₂ O	241.950	2.5x10 ⁻¹	1x10 ⁻³	1x10 ⁻¹

Solución V				
FeSO ₄ *7 H ₂ O	278.028	27.80	1x10 ⁻¹	10
EDTA*2 H ₂ O	372.028	37.30	1x10 ⁻¹	10

Fuente de carbono				
Sacarosa	342.310	30.0	87.63	

Medio WPM* (Lloyd & McCownm, 1981)

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 100 mM.l ⁻¹
		Mg.l ⁻¹	mM.l ⁻¹	
Solución I				
NH ₄ NO ₃	80.040	400	4.99	499
Ca (NO ₃) ₂ *4H ₂ O	190.08	556	2.92	292
Solución II				
MgSO ₄ *7 H ₂ O	246.48	370	1.5	150
MnSO ₄ * H ₂ O	169.01	22.3	1.3x10 ⁻¹	13.19
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	287.54	8.6	3x10 ⁻¹	30
CuSO ₄ * 5H ₂ O	249.68	2.5x10 ⁻¹	1x10 ⁻³	1x10 ⁻¹
Solución III				
CaCl ₂ *2H ₂ O	147.08	96	0.652	65.2
Solución IV				
KH ₂ PO ₄	136.09	170	1.25	125
H ₃ BO ₃	61.86	6.2	7x10 ⁻³	7x10 ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	241.95	2.5x10 ⁻¹	1x10 ⁻³	1x10 ⁻¹
Solución V				
FeSO ₄ *7H ₂ O	278.02	27.80	1x10 ⁻¹	10
Na ₂ EDTA*2H ₂ O	372.02	37.30	1x10 ⁻¹	10
Fuente de carbono				
Sacarosa	342.31	30.00	87.63	

Medio Heller* (1953)

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 100
		Mg.l ⁻¹	mM.l ⁻¹	mM.l ⁻¹
Solución I				
NaNO ₃	85	600	7.05	705

Solución II				
MgSO ₄	246.480	250	1.014	101.42
MnSO ₄ *H ₂ O	169.010	7.6x10 ⁻²	4.5 X10 ⁻⁴	4.5x10 ⁻²
ZnSO ₄ *H ₂ O	287.540	1	3.47x10 ⁻³	3.4x10 ⁻¹
CuSO ₄ *5H ₂ O	249.680	3x10 ⁻²	1.2x10 ⁻⁴	1.2x10 ⁻²

Solución III				
KCl	74.56	750	10.06	1006
CaCl ₂	237.930	4.7x10 ⁻²	1.97x10 ⁻⁴	1.97x10 ⁻²
MgCl ₂	95.22	2.1x10 ⁻²	2.2x10 ⁻⁴	2.2x10 ⁻²
KI	166.010	1x10 ⁻²	6.02x10 ⁻⁵	6.02x10 ⁻³

Solución IV				
H ₃ PO ₄	61.86	1	1.6x10 ⁻²	1.6
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	137.99	125	0.905	90.58

Solución V				
FeCl ₂ *6 H ₂ O	243.85	1	4.1x10 ⁻³	4.1x10 ⁻¹

Fuente de carbono				
Sacarosa	342.310	30.00	87.63	

Vitaminas R-2* (1962)

COMPUESTO	PM (g)	CONCENTRACIÓN		STOCK 100 mM.l ⁻¹
		Mg.l ⁻¹	mM.l ⁻¹	
Mio-inositol	180.16	100	0.55	55.5
Tiamina	327.36	0.1	3.05×10^{-4}	3.05×10^{-2}
Ácido nicotínico	123.11	0.5	4.06×10^{-3}	0.406
Piridoxina*HCl	205.64	0.5	2.43×10^{-3}	0.243

PREPARACIÓN DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO

BAP	10 mg/100ml disolver en 2 gotas de HCl 1 N
2-ip	10 mg/100ml disolver en 2 gotas de HCl 1 N
ANA	10 mg/100ml disolver en 2 gotas de NaOH 1 N
AIA	10 mg/100ml disolver en 2 gotas de NaOH 1 N

* Medios citados en Edwin y Sherrington, 1984.