

1. INTRODUCCIÓN

El Ave de paraíso *Strelitzia reginae* es una planta ornamental que se cultiva en Guatemala, de crecimiento herbáceo y perenne, originaria de Sudáfrica, que pertenece a la familia de las musáceas, se cultiva en el jardín y se explota comercialmente. La belleza de esta planta son sus flores, exportándose gran parte de ésta a países como Estados Unidos, Canadá y Belice, siendo un producto no tradicional que genera divisas. En el año 2,000, se reportó un total de exportación de 80,089 kg. con un ingreso de Q702, 817.50 (aproximadamente US \$ 91,275.00) (10). Esto ha hecho que los productores se interesen en la misma, originando su expansión. En la actualidad se ha reportado que existe un total de 23.48 ha. sembradas en Guatemala, lo cual ha proporcionado fuentes de trabajo a personal calificado y no calificado de las regiones, solventando la situación económica de muchas familias de escasos recursos.

Para su producción se requiere tomar en cuenta rígidas normas de calidad y sanidad como libres de plagas y enfermedades y muy importante que sean vigorosas. La parte de la producción que no cumple con algunos requisitos de las normas establecidas por el mercado internacional se comercializa en el mercado local en floristerías poco exigentes de nuestro país.

Esta planta es utilizada ampliamente para adornar jardines por su bella anatomía y sus colores vistosos.

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. La investigación constó de 2 etapas: la primera etapa fue el establecimiento o iniciación del cultivo en la cual se evaluó la fase del control de la contaminación por bacterias en la cual se realizó un tratamiento a plantas madres con antibióticos y fungicidas sistémicos durante 2 meses cada 6 días y la desinfección a nivel de laboratorio para poder determinar su efecto en la propagación *in vitro*. La otra fase fue controlar el oscurecimiento oxidativo en el establecimiento del cultivo *in vitro* evaluando diferentes antioxidantes: ácido cítrico, carbón activado y L-cisteína a diferentes niveles y así poder determinar el mejor y la dosis adecuada que proporcionara el mayor porcentaje de sobrevivencia y buen desarrollo, utilizando un diseño completamente al azar con 10 tratamientos y 10 repeticiones. En la segunda etapa se evaluaron diferentes combinaciones de ácido indolbutírico y bencilaminopurina para la inducción a la formación de brotes múltiples y enraizamiento, para ello se utilizó un diseño completamente al azar con 7 tratamientos y 3 repeticiones pero en ella no se obtuvieron resultados significativos. Se tuvo un ambiente controlado con adecuada temperatura, aireación, fotoperíodo.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La micropropagación de *Strelitzia reginae* ha tenido escaso éxito debido a dos problemas principales, uno de ellos, son los altos niveles de contaminación bacteriana en las plantas que son fuente de tejido de inóculo, ya que los órganos de crecimiento tienen contacto con el suelo y bacterias. Esto influye principalmente en la capacidad de regenerarse y no permite la micropropagación de la especie siendo una limitante.

El otro de los problemas es la oxidación fenólica del tejido de inóculo, debido a la alta tasa de la respiración, provocada por la liberación de energía para las actividades de la planta mediante la oxidación de algunos compuestos de carbono; lo que induce en la producción de compuestos fenólicos en la herida del tejido, los cuales son exudados dentro del medio atrapados en el agar y acumulados formando un área negra alrededor del explante interfiriendo sobre la absorción de nutrientes e inhibición del crecimiento, por lo tanto la difícil adaptación de los explantes en la etapa de iniciación (32). El exudado café se difunde en el medio de cultivo el cual es perjudicial para el desarrollo de los explantes, que eventualmente se vuelven necróticos y mueren (16). Este proceso está influido por enzimas monofenol oxidasa (tirosinasa) y la polifenol oxidasa (catecol oxidasa) convirtiendo los fenoles liberados en la herida a quinonas.

La oxidación se realiza como un mecanismo de defensa natural de las plantas contra el ataque de cualquier organismo que invade el tejido, lo cual tiende a formar fenoles que al oxidarse son sustancias muy tóxicas. La consecuencia de la herida que se produzca, es la reversión de ciertas células al estado meristemático seguido por la formación de callo y la curación o la reparación de la herida y regeneración del tejido.

Meira & Halevy (35), quienes estudiaron la respuesta de *Strelitzia reginae* Banks ex Dryand a la micropropagación *in vitro* observaron que la capacidad de esta especie presenta una respuesta baja a la propagación debido al proceso oxidativo, catalogado como el factor limitante.

Dada las circunstancias anteriores se hace necesario buscar fases metodológicas para reducir el efecto de estas dos limitantes, y adaptar el cultivo en la etapa de iniciación lo cual permitirá en futuros estudios, procedimientos para su multiplicación masiva.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. MARCO CONCEPTUAL

3.1.1. Generalidades del cultivo

El ave de paraíso pertenece a la familia de las Musáceas género *Strelitzia*. De este género se conocen siete especies como plantas ornamentales que son: *Strelitzia reginae* que es originaria de Cabo de Buena Esperanza; *Strelitzia augusta* que tiene flores blancas y parecidas a la *reginae*; *Strelitzia parniflora* que es una especie no cultivada; *Strelitzia kewensis*, que es un híbrido de *augusta* y *reginae*, planta que alcanza 5 pies de altura, *Strelitzia nicolai*, planta muy parecida a la *augusta*; *Strelitzia caudata* y *Strelitzia porvifolia juncea* (34). Algunas especies son arborescentes y pueden alcanzar hasta 7.5 metros de altura en estado silvestre (28).

La única especie que conviene cultivar para la producción de flores es la *Strelitzia reginae* porque sus flores son muy solicitadas en el mercado por su aspecto raro así como por su larga duración una vez cortadas (34). Esta planta posee gran belleza ornamental se le cultiva en el jardín y se explota comercialmente de gran demanda en floristerías y mercado de flores (11).

3.1.1.1. Clasificación Botánica

Reino: plantae

Subreino: Embryobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Zingiberidae

Orden: Zingiberales

Familia: Musácea

Género: *Strelitzia*

Sp. *Strelitzia reginae*

FUENTE: BAILEY LIBERTY, H.

3.1.1.2. Origen

El ave de paraíso es una planta ornamental de crecimiento herbáceo y perenne originaria de Sudáfrica y que fue introducida a Europa hace más de 200 años. Su nombre se debe a su vistosa forma y variados colores. También se le conoce con el nombre de *Strelitzia* el cual proviene de una familia Alemana Meclimburg Strelitz, protector de botánicos y horticultores.

En nuestro país se cultiva en forma comercial desde hace unos 42 años aunque en pequeña escala (34).

Se le conoce comúnmente como Ave de Paraíso, siendo cultivada en nuestro país a intemperie y bajo cubierta.

3.1.1.3. Descripción de la Planta

Esta planta posee raíces fasciculadas son gruesas, carnosas profundizan y se extienden mucho en el terreno, en las principales se acumulan gran cantidad de sustancias de reserva. Las hojas son ovaladas alargadas y coriáceas, con los bordes algo onduladas parecidas a la del plátano pero más pequeña de color verde grisáceo, éstas miden de 30 a 38 centímetros de longitud y 8 a 15 centímetros de anchura provistas de un pecíolo cilíndrico que alcanza a veces unas 80 pulgadas (11, 28, 34). Posee un ápice generalmente cóncavo, su forma y dimensión varían mucho según individuos y plantaciones, pudiendo ser ovals, lanceoladas, elípticas, etc.

La vara floral tiene mas o menos la misma longitud que las hojas; con flores de morfología exótica encerradas de 4 a 10 en cada espata (protege la inflorescencia) que da la apariencia de la cabeza de un pájaro, color naranja con el pico azul, pedúnculo de 1 a 1.20 metros que nace en las axilas de las hojas inferiores (11, 28, 34). Cada flor consta de ovario inferior, que ocupa una porción inferior con respecto a la flor de forma alargada de sección triangular, con tres cavidades y 70 ó 90 óvulos. Las flores adoptan posición vertical y emergen de la bráctea. La bráctea en forma de quilla, mide unos 20 centímetros, cáliz constituido por dos sépalos, lanceolados, pentaloideos, de color amarillo naranja intenso, que alcanza un tamaño de 4 a 6 pulgadas; corola de color azul formada por 3 pétalos soldados en posición horizontal en una pieza que se abre por su parte superior dejando ver en su interior los estambres y el estilo (11, 28). Estambres en número de 5 en forma filiforme de 1.5 a 2 pulgadas de largo (34). Un solo estilo filiforme de 3 a 4 pulgadas de largo terminando en un largo estigma más grueso que el estilo y muy viscoso.

Posee anteras lineales de 5 centímetros de largo, adheridas al extremo de la alabarda de la corola (11, 28). El fruto es una cápsula dehiscente trilobular es decir con tres cavidades, que contiene la semilla en número que varía entre 70 y 90. Las semillas son de forma esférica o ligeramente globales de un diámetro de $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ pulgada y pesan entre 0.25 y 0.50 gramos cada unidad, por lo que un gramo tiene 4 semillas (28).

3.1.1.4. Época de Floración

De abril hasta fines de año y no florece con luz inadecuada (11).

3.1.1.5. Condiciones Ecológicas

El ave de paraíso se desarrolla bien en nuestro país en clima cálido, templado y frío a altitudes entre los 3,500 y los 5,500 pies sobre el nivel del mar a temperaturas entre los 20 a 24 grados centígrados durante el día y de 16 a 18 grados centígrados durante la noche, es muy sensible al frío (34). En cuanto a humedad ambiental demanda un 30 a 35% y buena circulación de aire. Necesita luz intensa, con al menos tres o cuatro horas diarias de luz solar directa (28).

3.1.1.6. Proceso de producción del cultivo

A. Suelo

En cuanto a las condiciones edáficas, debido a que sus raíces son gruesas, carnosas y profundizan bastante necesitan suelos profundos. Suelos franco, franco arenoso, arcillo arenoso con buen contenido de materia orgánica y un pH de 6.0-7.0 (11).

Es una planta sensible al encharcamiento de agua, que suele ocasionar problemas por ataques de *fusarium*, por lo tanto deben realizarse las siembras en suelos que posean buen drenaje.

En caso de ser recipientes de cultivo, estos deben ser suficientemente amplios, y el suelo muy nutritivo, compuesto por turba, mantillo de hierba, estiércol de bovino y arena (13).

Añadir una parte de grava gruesa para facilitar un rápido drenaje del agua sobrante.

B. Propagación

La propagación del ave de paraíso se efectúa tanto por semilla (sexual) como por división de rizomas (asexual). El primer sistema se emplea cuando se desea establecer una plantación grande, porque el costo resulta más bajo que por medio de rizomas aunque presenta el inconveniente de que hay que esperar de 4 a 5 años para que se inicie su producción floral, y se obtienen plantas desiguales por la tendencia al polimorfismo de la especie (34).

El segundo sistema, es un método bastante caro pues los rizomas o parte de éstos, (macollas) ya que los adultos adquieren un alto valor en el mercado y a veces son difíciles de conseguir, pero tiene la ventaja de que la plantación entra pronto en producción (2 a 3 años), y además las plantas son más uniformes y floríferas, en el caso de que la selección de las plantas a reproducir se haya hecho correctamente. Sin embargo, este método se ha ido extendiendo de tal forma que hoy es el más común y prácticamente el único usado por los cultivadores que se inician en este cultivo (34).

a. Propagación por semilla

El primer problema que se encuentra para reproducir la *Strelitzia* por este método es la obtención de semilla, pues no producirá semillas sin la intervención del hombre. En su medio natural, la fecundación de esta planta la realiza el colibrí, por lo que es autoestéril donde no vive éste. La polinización puede ser directa o cruzada, aunque es más aplicado este último sistema. La formación del fruto y la maduración del mismo dura aproximadamente unos ocho a diez meses. En cada flor se formará uno a tres frutos que contendrán en su interior la semilla. La semilla pierde con rapidez su poder germinativo, por lo que se debe sembrar pronto (1-3 meses después de la obtención) ya que se observa un porcentaje de germinación de 40-50% después de 10 a 12 meses de la obtención.

Para la propagación por semilla lo primero que hay que hacer es el semillero, el cual debe estar bajo cubierta porque las plantas necesitan bastantes cuidados. Las semillas tienen una borra algodonosa que debe quedar para arriba a la hora de sembrarlas. Estas se colocan a 2 X 2 ó 3 X 3 pulgadas en la mesa de propagación y su período de germinación es muy variable; pero cuando las plantas alcanzan de 3 a 4 pulgadas de desarrollo se trasladan a bolsas de polietileno de 10 centímetros de diámetro y 15 centímetros de profundidad en donde deben permanecer hasta los 2 años, trasplantándose al terreno definitivo al término de ese tiempo (34).

La época ideal para la plantación es a finales de invierno o principios de primavera, porque la planta dispone de varios meses de calor para adaptarse al nuevo terreno.

b. Propagación por división de rizomas

Lo primero que hay que hacer es la selección de las plantas madres, escogiéndose para ello las más productivas y sanas de una plantación ya establecida, procurando que las plantas al quitarles los hijos no queden muy despobladas.

Seleccionada la planta, se atan sus hojas y se descubren los rizomas procurando hacer el menor daño posible. La separación se hace por medio de un cuchillo u otro implemento que facilite dicha labor, teniendo cuidado de realizarla de la manera más limpia posible. Ya cortados los hijos, deben espolvorearse los cortes con cal apagada o algún fungicida apropiado de los que se encuentran en el comercio, para evitar pudriciones y secamientos tanto de los hijos como de la planta madre (34). Los retoños jóvenes son capaces de florecer a partir del tercer año.

Esta división se realiza del mes de marzo a mayo. Los rizomas se siembran a 60 centímetros sobre hileras separadas a 1.5 metros o 50 pulgadas entre plantas. Es aconsejable utilizar tutores en cada planta para evitar el contacto de las hojas con el suelo (34). También se puede sembrar al tresbolillo y no menor de 1 x 1 metro.

C. Riego

Abundante de dos a tres veces por semana en la época seca, aplicando un mínimo de 1 galón por planta. Es necesario mantener limpia de malas hierbas y de basuras la plantación, podando hojas que se sequen o estén en contacto con el suelo (34, 11).

D. Plagas y Enfermedades

a. Plagas

El Ave de paraíso no es muy atacada por insectos. En pequeña escala aparecen en las plantaciones:

i. Araña Roja (*Tetranychus urticae*)

Ataca en verano principalmente en aquellos invernaderos que no ventilan adecuadamente, como en el caso de las cochinillas. Se combaten alternando ésteres fosfóricos, y tratando de no aplicar en época de floración ya que se manchan las flores.

ii. Cochinillas: *Ceroplastes*, *Pseudococcus*, y *Chyrompeles*.

Su presencia provoca el debilitamiento de plantas y su aspecto clorótico. Se combaten con ésteres fosfóricos en preparación oleosa y abriendo los invernaderos en verano.

iii. Trips, pulgones, saltamontes, grillos y gusanos taladradores.

Para este último se combaten aplicando los riegos con disoluciones de Aldrín y dieldrín.

iv. Nemátodos

Es importante realizar un análisis nematológico. El género *Heterodera*, es el que más ataca siendo necesaria la desinfección del suelo previo a la plantación.

b. Enfermedades

En cuanto a enfermedades el ave de paraíso es atacada por hongos siendo las más importantes en nuestro medio los siguientes:

i. *Alternaria Alternaria sp.*

Este hongo ataca las hojas manifestándose en pequeñas manchas de color amarillo a blanquecino y borde (aureola) oscuro (34).

ii. Ascoquita *Ascochyta pasiflorae*

Ataca las hojas, manifestándose en manchas de color marrón oscuro (34).

iii. Mancha Negra de la Flor *Gloesporium sp.*

Se manifiesta en pétalos y sépalos por una gran cantidad de manchitas negruzcas del tamaño de la cabeza de un alfiler que deprecia la calidad de la flor.

iv. Fumagina *Capriodidium sp.*

Puede atacar la “negrilla”, recubriendo la parte aérea, hojas y flores de un polvillo, que afea la planta y deprecia la flor. Solo ataca cuando la cochinilla ha invadido la planta, debido a la melaza que esta excreta y que sirve de excelente medio de propagación del hongo. Se combate aplicando fungicidas como captan.

v. *Fusarium moniliforme*

Ataca el sistema radicular. Si el terreno se mantiene excesivamente húmedo debido a un drenaje deficiente causándole pudrición. Su ataque es más intenso en suelos ácidos y pocos aireados, siendo su control muy difícil cuando el hongo ya está establecido porque no hay tratamiento específico. Por lo tanto, la mejor medida es la prevención que consiste en esterilizar las semillas antes de la siembra por cualquiera de los métodos conocidos, aconsejándose un tratamiento con agua caliente pues la enfermedad se transmite a través de las semillas, además evitar suelos ácidos y arcillosos (34). Se puede constarrestar regando con una solución de benomyl.

E. Fertilización

La *Strelitzia* por ser una planta perenne, que permanece muchos años en el terreno y tener raíces muy profundas, necesita una buena preparación del terreno antes de su plantación.

Se deben aplicar 20 kg. m² de estiércol y para el abonado mineral realizar un análisis de suelo. Se puede incorporar además 800 kg. de superfosfato de calcio y 200 kg. de sulfato de potasio por Ha.

A los 10 a 15 días después de sembrados los rizomas aplicar 8 gramos por planta de fertilizante 12-24-12 ó 15-15-15 retirado a 6 cms de la base y enterrado a 5 cms.

A los 60 días después, aplicar 8 gramos por planta de urea 46% o nitrato de amonio, retirado a 8 cms de la base de los tallos.

A los 90 días después de la segunda aplicación suministrar ½ onza por planta de 12-12-17, retirado a 10 cms de la base del tallo. Para plantaciones de más de un año mantener el siguiente plan:

Abril: 1 onza de fertilizante 12-12-17 distribuido a 10-15 cms de la base de los tallos.

Mayo: 1 onza de urea 46% o nitrato de amonio por planta,

Agosto: 1 onza de 12-12-17 ó 15-15-15 por planta.

Noviembre: 1 onza de urea 46% o nitrato de amonio por planta.

Para mantener los niveles de micronutrientes en el suelo aplicar 2 veces al año, regado al pie de los tallos la solución de 2 onzas de fertilizante por cada 4 galones de agua.

Aplicar abonos líquidos cada 15 días durante período de crecimiento activo únicamente (34).

F. Producción

La producción comienza a los 16 meses posteriores al trasplante y a los 2 años se manifiesta en forma creciente, esto se cree que es debido al sistema de reproducción por semilla.

En consecuencia, se encuentra lo siguiente:

| | |
|--------------------------------------|---|
| Período de germinación en vivero: | de 1 ½ a 2 meses |
| Período de vivero al trasplante: | de 1 a 2 años |
| Período del trasplante a producción: | 1 a 4 años |
| Período que se obtiene: | tallos de calidad nacional y de exportación Así como semillas para viveristas. |

G. Ciclo de producción

Una vez iniciada la producción de tallos o pseudotallos, se continúa hasta el séptimo u octavo año y entre el octavo y noveno iniciar los aclareos de rejuvenecimiento, deteniéndose la

producción por un lapso de un año, para después continuar, con apoyo de las reposiciones de plantas.

H. Madurez

Las inflorescencias se doblan conforme llegan a la madurez, y el tallo asume un ángulo de 90 grados. Los tallos pueden ser cosechados en la etapa de botón antes de que broten las primeras flores. En esta etapa la florescencia se hincha y hay una ligera apertura anaranjada en la superficie superior. La inflorescencia está madura en la etapa de botón y es en la etapa óptima para cosechar bajo el punto de vista de la facilidad de manejo y de la longevidad de la flor.

I. Época de cosecha

Los tallos de las flores generalmente se arrancan en lugar de cortarlos. Un movimiento de un lado a otro y halándolas para soltar el tallos de la base de la planta, aunque la inflorescencia puede arrancarse si se hala muy vigorosamente.

Bajo intemperie, la cosecha es todo el año, bajando el volumen de producción durante el verano y se incrementa en primavera. En invernadero es constante y se puede programar la producción en los meses de mayor demanda.

El ave de paraíso cuando se siembra por semilla comienza a producir comercialmente a los cinco años, dando de 5 a 7 flores al año por planta, cantidad que va en aumento con relación a su edad. Así, una planta bien cuidada produce de 20 a 25 flores a los 10 años. Una planta de 20 años produce más de 40 flores al año. En nuestro medio la mayor producción de flores se concentra en los meses de octubre a mayo (34).

J. Producción de semilla

Una planta madre produce de 1 a 2 kg. de semilla por año. En el cuadro 1 se presenta el rendimiento de tallos por año de una planta en producción:

Cuadro 1 Rendimiento tallos por año por planta de Ave del Paraíso *Strelitzia reginae* 2,000.

| EDAD CRONOLÓGICA (AÑOS) | No. TALLOS/PLANTA/AÑO | No. PLANTAS Ha. | PRODUC. TOTAL (Kg) |
|--------------------------------|------------------------------|------------------------|---------------------------|
| a) INTEMPERIE: | | | |
| 3 ½ | 4 | 9,250 | 37,000 |
| 4 | 9 | 9,250 | 83,250 |
| 5 | 12 | 9,250 | 111,000 |
| 6 | 20 | 9,250 | 185,000 |
| 7 | 22 | 9,250 | 203,500 |
| b) INVERNADERO | | | |
| 1 ½ | 4 | 9,250 | 37,000 |
| 2 | 7 | 9,250 | 64,750 |
| 3 | 14 | 9,250 | 129,500 |
| 4 | 18 | 9,250 | 166,500 |
| 5 | 20 | 9,250 | 185,000 |
| 6 | 24 | 9,250 | 222,000 |
| 7 | 24 | 9,250 | 222,000 |

Fuente: Entrevista.

Nota: se estima que existe un incremento del 15% en la producción, además de la precocidad en la misma.

k. Clasificación y Separación de Racimos

Generalmente se separan los tallos de las flores en tres diferentes clasificaciones de acuerdo al largo de los tallos y el tamaño de la inflorescencia. Las tres clasificaciones son grande, medio y pequeño. La primera mide 19 cms de espádice y 80 cms de largo vara floral, para la segunda 16 y 70 cms, y la tercera 13 y 50 cms respectivamente. Para mejor calidad de flores, las bolsas de campo son reemplazadas con nuevas bolsas. Cinco tallos juntos se ciñen apretadamente en dos puntos con las inflorescencias viendo hacia la misma dirección. Los extremos de los tallos se cortan del mismo largo, realizando esta actividad con la ayuda de una guillotina. El envoltorio de papel se pone alrededor de las florescencias en racimos para una protección mayor de las flores.

L. Calidad de la Producción

La calidad está diferenciada por el tipo de mercado y control de calidad y no por variedades.

a. CALIDAD DE EXPORTACIÓN: Debe de estar libre de pudriciones fungosas y plagas, en etapa de botón cerrado, con tallos vigorosos y homogéneos de 0.8 m. de longitud por $\frac{1}{2}$ "ó $\frac{3}{4}$ " de diámetro. Se exige certificado de sanidad.

b. CALIDAD NACIONAL: libre de plagas, se aceptan ligeras manchas fungosas, el tallo puede ir en botón cerrado o en botón abierto. El tallo es más delgado siendo su longitud mínima de 0.7 m, tamaños inferiores se desechan o bien se venden a florerías locales poco exigentes.

M. Vida en Florero

Como flor de corte se emplea en arreglos florales, presentando un ciclo de vida posterior al corte de:

- a) **A botón cerrado:** dura 8 días en condiciones ambientales normales, sin abrir el botón, una vez abierto el botón dura 15 días.
- b) **A botón abierto:** en condiciones normales un tallo cortado a botón abierto, dura 8 días en promedio.

En refrigeración se estima que su vida puede alcanzar hasta 6 meses, aunque se carece de información científica que corrobore plenamente lo anterior.

N. Corte

El corte de las flores debe hacerse en las primeras horas de la mañana y se hace a todas aquellas inflorescencias cuya primera flor se encuentra abierta.

Con el objeto de evitar deshidrataciones por calentamiento al momento del corte del tallo, se recolectan en cubetas de plástico y se llevan directamente al sitio donde se empacarán.

El corte en forma resumida consiste en:

- a) El empleo de tijera de mano
- b) Se seleccionan los tallos ligeramente mayores de 1 m (para exportación) ó de 60 cm de longitud (nacional).
- c) El botón o espádice muestra una ligera inclinación hacia un lado con un tinte verde-anaranjado, cuando está cerrado y cuando está abierto se observa un color anaranjado más encendido y la presencia de las brácteas u hojas llamativas.

O. Soluciones químicas

Los tallos de la flor deben ser tratados después de la cosecha con un fungicida para prevenir la *botritis*. Se puede aumentar sustancialmente la longevidad de la flor al pulsar los botones o las flores durante 24 horas (48 horas es aún mejor) con una solución que contiene el 10% de sucrosa, 250 ppm de 8-citrato de hydroxiquinolina (8-CHQ), y 150 ppm de ácido cítrico.

P. Empaque

Las bolsas de papel parafinado en cada inflorescencia y el envoltorio de papel en cada racimo dan una protección amplia contra el daño de manejo y de la desecación. Como son muy pesados, los tallos de Ave del paraíso deben empacarse en cajas de cartón no muy profundas. Se colocan manojos de 10 tallos por bonsche dependiendo del tipo de clasificación en cada caja se introducen 50 tallos, es decir 5 bonsche, con un peso neto de 25 libras.

Q. Almacenamiento

Los tallos se almacenan a 8 grados centígrados (46 grados F) y entre 85 y 90% de H.R.

Los almacenados a menos de 8 grados centígrados por períodos prolongados no se abren apropiadamente. Se forman lesiones café de congelamiento inducido en las brácteas de dichas flores almacenadas.

Las flores de *Strelitzia* pueden tener una duración de vida hasta de 14 días y si los tallos cosechados en la etapa de botón cerrado son tratados con fungicida, envueltos en papel para prevenir la disecación y almacenados a 8 grados centígrados (46 grados F) y de 85 y 90% H.R. Pueden durar cuatro semanas en almacenamiento.

3.1.2. Aspectos Generales sobre Biotecnología

Según Villalobos (31), entre los avances y desarrollos más recientes de la ciencia, la Biotecnología ha logrado los de mayor importancia, principalmente en la Medicina y Agronomía.

En la Agronomía, los métodos modernos de la Biotecnología ha contribuido al incremento de la producción, a mejorar la calidad de los productos y se prevee, en un corto plazo, avances significativos en la resistencia a plagas y enfermedades y factores ambientales adversos. La Biotecnología se define como “Cualquier técnica que utiliza organismos vivos o partes de los mismos para mejorar plantas o animales, modificar productos o desarrollar microorganismos para aplicaciones científicas”.

3.1.2.1. Micropropagación

Cuando se considera que la mayoría de las plantas que se propagan mediante el cultivo aséptico se originan generalmente en pequeños esquejes, se puede apreciar rápidamente que no hay nada fundamentalmente nuevo acerca de la multiplicación de las plantas por medio del cultivo de tejidos. La palabra micropropagación, utilizada por primera vez en 1968 por Hartmann y Kester en su conocido libro sobre propagación de plantas, parece haber ganado una amplia aceptación como término general para designar varias de las técnicas utilizadas en la multiplicación in vitro.

Originalmente, la micropropagación se definió como “Cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación, en las plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente.

La micropropagación clonal implica que cada una de las plántulas que se produce pueda crecer y ser fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta original de la que se deriva.

Hasta el momento, las puntas de tallos y las yemas laterales han sido los explantes más comúnmente utilizados para la etapa de iniciación y establecimiento (17).

3.1.2.2. Historia de la Micropropagación

La técnica de generar plantas nuevas en un medio de crecimiento artificial y en condiciones asépticas, se inició con investigaciones sobre fisiología vegetal. Asimismo estas investigaciones tomaron auge cuando Sacks, en 1860, y Knops, 1861, observaron que los principales nutrientes de las plantas eran compuestos orgánicos, para lo cual prepararon una solución que contenía una mezcla de ellos. Esta mezcla se utilizó posteriormente por casi todos los investigadores que siguen este campo de estudio. En 1878, Vockting aportó más información de nuevas yemas y raíces, o de yemas axilares de las cuales se colocaron en una cámara al vacío (15).

Haberlandt, en 1902, aisló y cultivó tejido vegetal, utilizando asepsia (7) y vaticinó que podría ser posible cultivar células somáticas en medios de cultivo. White, en los años 1934 y 1939, cultivó raíces de tomate in vitro agregándole al medio extracto de vitaminas, levadura, etc.

Gautheret y Nobecout, conjuntamente con otros colaboradores, indujeron el crecimiento de callo en un medio sintético (7).

En la década de los 50-60, Skoog descubrió que cultivando callo de tabaco se proliferaba en un medio que tenía como uno de sus ingredientes ADN que provenía de semen de pescado.

Este compuesto responsable del crecimiento fue identificado como cinetina reconociendo su función como regulador en la iniciación de la división celular. En 1962, Murashige y Skoog desarrollan un medio nutritivo con el que logran crecimiento rápido de tejidos en tabaco que posteriormente fue útil para muchas especies de plantas. Este medio es ampliamente utilizado en cultivo in vitro (15).

Después de estos descubrimientos y avances en las investigaciones de cultivo de tejidos, se han realizado innumerables trabajos aplicando técnicas de cultivo in vitro, en muchas especies de plantas y utilizando diversos explantes. Todos estos trabajos se han orientado más que todo a la citología, fusión de protoplastos, fitomejoramiento, propagación, mutagénesis, formación de híbridos interespecíficos, etc.

3.1.2.3. Fases de la Micropropagación

Existen tres pasos importantes, que deben tomarse en cuenta en la micropropagación, según lo expuesto por Murashige en 1974.

A. Asepsia del Cultivo

Los medios de cultivo pueden provocar la proliferación de microorganismos en donde pueden crecer y desarrollarse, compitiendo con el cultivo, es por eso que es necesario que todos los explantes deban estar debidamente limpios y desinfectados. Las sustancias más comunes para desinfectar los explantes son: el hipoclorito de sodio o de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloruro de mercurio y el alcohol etílico en diferentes concentraciones (7, 15).

B. Multiplicación

En ésta etapa sucede la formación de nuevas células por división, o por aumento en tamaño. En esta etapa está influenciada por las condiciones in vitro y la ganancia en peso seco da como resultado la diferenciación de novo.

C. Enraizamiento de brotes y trasplante

Para que se dé esta etapa se debe trasladar el cultivo a otro medio con menos cantidad de sales inorgánicas y cambios en el balance hormonal, es decir, disminuir las citocininas y aumentar las auxinas. La última etapa de la micropropagación es el período de endurecimiento o aclimatación en el cual la planta deberá colocarse en condiciones normales para su desarrollo total. Para lograr ésta fase se deberá lavar la planta y eliminar los restos del medio de cultivo que pudieran quedar en las raíces y luego sembrarlas en suelo estéril, cubriéndolas con bolsas plásticas a las cuales se le abrirá agujeros para aclimatarlas poco a poco en su nuevo habitat (9).

3.1.2.4. Propagación in vitro

A. Ventajas

Los métodos disponibles para la propagación de plantas in vitro son una extensión de aquellos ya desarrollados por propagación convencional. Las técnicas in vitro tienen las siguientes ventajas sobre los métodos tradicionales:

- a. Los cultivos se comienzan con piezas muy pequeñas de plantas (explante) y después de eso, pequeños brotes o embriones son propagados (de aquí el término micropropagación para describir los métodos in vitro). Sólo una pequeña cantidad de espacio es requerido para mantener las plantas o para incrementar grandemente su número.
- b. La propagación es idealmente aséptica libre de patógenos. Una vez los cultivos han sido empezados debería no haber pérdidas por enfermedades y las plántulas finalmente producidas deberían estar libres de bacterias, hongos, virus y nematodos (esto no siempre se cumple).
- c. Los métodos están disponibles para plantas libres de enfermedades por virus. Providencialmente estas técnicas son empleadas o el material libre de virus es usado para iniciar cultivos, plantas certificadas libres de enfermedades pueden ser producidas en gran cantidad.
- d. Un ajuste más flexible de factores influyentes en la regeneración vegetativa es posible tales como niveles de nutrientes y reguladores del crecimiento, luz y temperatura. La tasa de propagación es por esto, mucho más grande que en la macropropagación y muchas más plantas pueden ser producidas en un tiempo dado. Esto puede facilitar nuevamente variedades seleccionadas para ser hechos disponibles rápidamente y en gran cantidad, ya que numerosas plantas pueden ser producidas en un corto tiempo. La técnica es muy conveniente cuando un alto volumen de producción es esencial.
- e. Puede ser posible producir clones de algunas plantas que de otra forma sería más lento y difícil(o incluso imposible) propagar vegetativamente.
- f. Las plantas pueden adquirir una nueva característica temporal a través de la micropropagación en la cual las hace más deseables para crecer, que el método convencionalmente utilizado. Un hábito espeso (lo que se busca en plantas ornamentales) y la formación e incrementación de brotes nuevos (fresas) son dos ejemplos.
- g. La producción puede ser continuada a lo largo de todo el año y es independiente de los cambios estacionales.
- h. El material reproducido vegetativamente puede ser almacenado por largos períodos de tiempo.
- i. Se requiere menos energía y espacio para los propósitos de propagación y para el mantenimiento de inventarios de plantas.

- j. El material vegetal necesita poca atención entre subcultivos y no hay labor o requerimientos de materiales para irrigación, control de malezas, rociadoras, etc. La micropropagación es más ventajosa ya que el costo es menor que los métodos tradicionales de multiplicación (9).

B. Enraizamiento in vitro

a. Etapas en el proceso de enraizamiento

Pocas plantas son convenientes para enraizamiento como brotes, pero en la mayoría de especies los brotes al ser enraizados in vitro están cortados separadamente y, después que las hojas basales han sido eliminadas para luego ser plantadas en un medio proporcionado hasta que las raíces han sido formadas. Muchos factores influyen en el éxito de esta operación, algunos son muy simples, tales como la observación de que el enraizamiento solo toma lugar efectivo cuando los explantes han alcanzado un tamaño mínimo, otros son más complejos. Aparte generalmente se encuentra 4 fases que pueden ser distinguidas en el proceso de enraizamiento (Moncousin, 1986):

- i. Una fase de inducción: cuando la capacidad para la formación de raíz es determinada.
- ii. Una fase de iniciación: cuando ocurren cambios citológicos visibles.
- iii. Una fase de organización: cuando la raíz principal puede ser vista para ser producida histológicamente.
- iv. Una fase de crecimiento (elongación de la raíz): cuando se desarrolla hacia raíces.

Los tratamientos que promueven una de estas actividades pueden no ser óptimos para Aquellas que los pueden o siguen (9).

b. Desventajas del enraizamiento in vitro

Una de las mayores desventajas del enraizamiento in vitro es la dificultad de inducir un sistema de raíces el cual será efectivo completamente cuando las plantas son transferidas al terreno, las raíces producidas en in vitro frecuentemente les faltan pelos secundarios, conexiones vasculares y posiblemente no comiencen a desarrollar un cambium secundario hasta que sea removido del tubo de cultivo. Debergh y Maene (1981) encontraron que cuando las plantas eran examinadas alrededor de las dos semanas después de plantadas, las raíces producidas en el cultivo, en la mayoría de los casos había muerto y algunas nuevas habían empezado a desarrollarse. Las raíces que han crecido in vitro también tienen probabilidad de ser dañadas ya que las plántulas son removidas del cultivo (particularmente si estas necesitan ser lavadas para remover el agar) o como estas son plantas fuera, esto incrementa las posibilidades de infecciones fungosas o bacterianas (9).

3.1.2.5. Factores que influyen en la Micropropagación

A. Medio de cultivo

a. Agua

Los medios de cultivo de tejidos están constituidos en su mayor parte por agua; por lo tanto, es necesario utilizar agua de intercambio iónico o agua destilada, ya que el agua natural incluye algunas sustancias que pueden causar influencia negativa para el crecimiento de las plantas *in vitro*.

b. Componentes inorgánicos

Los componentes inorgánicos son importantes para el crecimiento de las plantas. Si escasean estos elementos aparecen los síntomas característicos correspondientes a la deficiencia de cada elemento.

i. Nitrógeno

El nitrógeno es componente de aminoácidos (proteínas), vitaminas y ácidos nucleicos.

Mientras la planta está en crecimiento activo, necesita gran cantidad de nitrógeno. Este se encuentra en forma de NH_4NO_3 y KNO_3 y en gran cantidad adecuada según la especie de planta.

Existen varias influencias de nitrógeno. En concentraciones altas promueven enraizamiento, mientras que, en concentraciones bajas, promueve el desarrollo de callo. Dos fenómenos semejantes son causados mediante la función de NH_4^+ .

ii. Fósforo

El fósforo es uno de los elementos necesarios para el metabolismo de las plantas. Principalmente, es utilizado para sintetizar ATP como fuente de energía. Dentro de los medios de cultivo, las plantas lo absorben en forma de PO_4^{-3} .

iii. Potasio

Existe relación entre potasio iónico y la diferenciación de órganos.

iv. Calcio

El calcio es componente de la pared celular.

v. Magnesio

El magnesio es un componente importante de la molécula de clorofila.

vi. Hierro

Para los vegetales el hierro es importante, particularmente ya que es un componente de la clorofila. Normalmente se da en forma de quelato (Fe-EDTA) en los medios de cultivo, en otra forma se precipitaría.

vii. Microelementos

Se adicionan manganeso (Mn), cobre (Cu) zinc (Zn) molibdeno (Mo) y boro (B) a los medios de cultivo como microelementos.

c. Componentes orgánicos

i. Vitaminas

Según la especie de planta, así se adiciona tiamina (vitamina B₁), pyridoxina (vitamina B₆) y ácido nicotínico.

ii. Mio-inositol

Se sabe que el agua de coco incluye componentes que promueven la producción de células u órganos, y la diferenciación de los mismos. Mio-inositol es uno de estos componentes.

iii. Aminoácidos

A cerca de la función de los aminoácidos, se sabe que estos promueven la producción y diferenciación de células y tejidos, sin embargo, algunas veces, pueden ocurrir inhibiciones en el crecimiento de las vitroplantas cuando se adiciona uno solo al medio de cultivo. En tal caso, se debe incluir combinaciones de varias clases para que se activen conjuntamente.

iv. Componentes naturales

Los más utilizados son la pulpa de plátano, agua de coco, emulsión de pescado, jugo de naranja, extracto de malta, hidrolizado proteico (caseína), jugo de tomate, extracto de levadura, etc.

En varios casos, estos compuestos inducen diferenciación y la producción de células y tejidos eficazmente. Sin embargo, debido a que son componentes muy complejos, no son productos estables y homogéneos, es mejor evitar su uso sobre todo en trabajos de investigación.

d. Otros componentes

i. Fuente de Carbono

Originalmente, las plantas pueden producir azúcar como fuente de energía a través de la fotosíntesis. Sin embargo, las vitroplantas casi no realizan fotosíntesis debido a la baja intensidad de luz en la que se desarrollan y aunque lo hagan producirían muy poca azúcar. A causa de esto, es necesario adicionar cierta cantidad de azúcar como fuente de energía. Por lo general esta cantidad varía entre 1 – 3% de sacarosa o glucosa que se agrega al medio de cultivo.

ii. Agentes gelificantes para solidificar el medio de cultivo

-Agar

Como un gelificante del medio de cultivo, el agar se utiliza más que otros agentes. Sin embargo, no se puede usar una corriente como se ofrece en el mercado, ya que este es impuro y puede inhibir el crecimiento de las vitroplantas. Por consiguiente, se debe utilizar uno con alto grado de pureza. Normalmente, se adicionan entre 0.6 a 1% al medio de cultivo.

iii. pH (potencial del ión hidrógeno)

La concentración de ión hidrógeno produce un efecto en la absorción iónica, en los medios de cultivo. La acidez y la alcalinidad extremas inhiben el crecimiento de las vitroplantas. Por lo general, se utiliza el pH apropiado entre el 5.4 a 6.0, HCl y NaOH ó KOH, según la especie de planta que se va a micropropagar (29).

B. Ambiente de cultivo

Las condiciones del ambiente influyen sobre varios aspectos sobre el desarrollo de las vitroplantas, sobre todo en la diferenciación de órganos y formación de embriones adventicios; por lo tanto, es importante comprender las relaciones entre los factores del ambiente y su influencia sobre las plantas de cultivo in vitro.

a. Los Efectos de la Luz

i. Etiolación

Aunque la fotosíntesis provee carbohidratos necesarios para la iniciación y el crecimiento de la raíz manteniendo brotes micropropagados (o solamente las bases del brote) en la oscuridad durante la fase inductiva es generalmente favorable para el enraizamiento. Es común porque las auxinas endógenas o exógenamente aplicadas son metabolizadas menos rápidamente en la oscuridad que en la claridad (Norton y Boe. 1982), aunque la oscuridad parece resultar en incremento de la actividad peroxidativa (Fabijan *et al.*, 1981). Posiblemente una rápida degradación de auxinas por peroxidasa cuando los cortes son movidos de la luz, inicia rápidamente la inducción y crecimiento de la raíz.

La consecuencia del crecimiento de plantas o partes sin luz, o luz de baja intensidad o de corta duración, es llamada etiolación. Esto generalmente supone que la etiolación favorece la inducción de la raíz aunque excepcionalmente. Druart *et al.* (1982) reportaron que la oscuridad promovía la formación in vitro de brotes de manzana en el período de iniciación de raíz más que durante la inducción de la raíz. Ambos indirecta o directamente, la formación de la raíz es promovida por la etiolación y la estimulación puede ser observada en pequeños explantes, callo y un cultivo grande de brotes. La etiolación del material de una planta puede ser inducida por la luz de baja intensidad y, más confiable con tratamientos en la oscuridad, para la promoción de enraizamiento in vitro puede ser posible que:

- ❖ En la fase II la etiolación de los brotes cultivados después de los microcortes son mermados.
- ❖ Todos los tratamientos de los microcortes en la oscuridad o luz de baja intensidad, o:
- ❖ Asegurar que sólo la base del tallo se corte en la oscuridad.

Cualquier método ha sido usado con éxito: el tratamiento de cultivar todos los cortes es más común cuando los brotes van a ser enraizados in vitro; la base del brote es colocada en la oscuridad cuando los brotes son colocados en un sustrato durante el enraizamiento in vitro.

Aunque la etiolación es generalmente promovida, muchas plantas son capaces de producir un adecuado número de raíces adventicias cuando los brotes son detenidos en la luz o alta irradiación su capacidad para mejorar el cultivo en el ambiente. De Fossard *et al.* (1978) notó

que *Eucalyptus ficifolia* formaba callo y raíces en la luz si las vitaminas eran omitidas en el medio de enraizamiento.

ii. Influencia del Fotoperíodo y longitud del día

La irradiación y longitud del día en la cual los grupos de plantas han crecido pueden afectar el potencial de los explantes para formar raíces directamente. Esto es porque la significancia de la poca práctica de la micropropagación, excepto que la longitud del día a la cual los cultivos de la etapa II han sido sujetos pueden esperar la influencia de enraizamientos subsecuentes de brotes.

iii. Baja irradiación y días cortos

Los días cortos y la baja irradiación originan la inducción de raíz, en una manera similar a la oscuridad. Por ejemplo De Fossard *et al.* (1978) Notaron que un bajo nivel de luz ($10 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) conducía al enraizamiento del Eucalipto en una manera similar a la oscuridad, en donde $300 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) era claramente inhibitoria. Los rizomas de *Alstroemeria* eran mejor enraizados en la luz de 7 W m^{-2} .

iv. Alta irradiación y días largos

Puede ser que algunas plantas donde el enraizamiento será inducido manteniendo brotes cultivados en días largos. Hansen (1987) describió el efecto de mantener un grupo de plantas en varios períodos de tiempo sobre la subsecuente habilidad de enraizar en los cortes tomados a partir de ellos. Los tratamientos de días largos fueron sometidos por Hansen que inducía enraizamiento de *Salix*, un clon de *Begonia x cheimantha*, *Vigna radiata* y *Rhododendron*.

Aunque la oscuridad usualmente promueve la inducción de raíces la iniciación de crecimiento de raíces es promovida por la luz incidente sobre el follaje y es usualmente mejorada cuando la radiación es incrementada. Los brotes de *Leucospermum*, por ejemplo, enraizaron mas satisfactoriamente in vitro, bajo 210 umol m^{-2} que cuando se cultivó bajo 110 o $150 \text{ umol m}^{-2} \text{ S}^{-1}$ (Tat *et al.* 1999).

v. Calidad de la luz

Efectos de longitud de onda de la luz incidente sobre el enraizamiento, confirmando los resultados sobre *Vitis* y *Prunus* obtenidos por Chee y Pool y Baraldi *et al.*; Rossi *et al.* (1993) han mostrado que el enraizamiento del *Prunus insititia* es promovida por luz infrarroja. La proporción de brotes que enraizaron con luz de diferentes colores, mostró que éstos enraizaron en la ausencia de auxina en luz infrarroja, los autores, notaron que el más grande número de raíces por brote ocurrió cuando la auxina fue suministrada durante el tratamiento con luz infrarroja.

vi. Iluminación durante la elongación de la raíz

Vinterhalter *et al.* (1990) han mostrado que en *Dracaena fragans*, la velocidad de elongación de raíz aumenta en un fotoperíodo de 16 horas cuando la irradiación de luz se incrementa de 1 a 17 $\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$. La *Dracaena* es capaz de producir fotosíntesis a bajas radiaciones y así el efecto de luz aquí, puede ser debido a la producción, a través de la fotosíntesis, de un producto necesario para el crecimiento de la raíz, pero probablemente un carbohidrato como elongación no era independiente de sucrosa en el medio.

b. Temperatura

El enraizamiento *in vitro* es usualmente favorecido cuando la temperatura en la zona de enraizamiento es mas alta que la que está expuesta al ambiente. La inducción de raíz *in vitro* es generalmente promovida cultivando brotes a relativamente altas temperaturas e incluso brotes de especies adaptadas a climas fríos son inducidas a formar raíces más rápidamente a temperaturas a varios grados debajo de las temperaturas normales (pero hay excepciones). El óptimo para el subsecuente crecimiento de raíz puede hacer algo menos, Gautheret (1969) notó que las raíces formadas más efectivamente en *Helianthus* en segmentos de 26 grados centígrados, pero, una vez iniciados, las raíces podrían crecer a temperaturas más bajas. Si la temperatura fluctuaba alrededor del óptimo, la iniciación de raíz era estimulada.

Brotes de manzana resultantes por micropropagación, enraizaron mejor a 28 grados centígrados durante el día 22 grados centígrados en la noche, y si las temperaturas del cultivo

eran reducidas a 27/17 o 18/12 centígrados, había reducciones progresivas en el número de raíces formadas (Lane, 1978). La inducción o enraizamiento de brotes de ciruela *Mirobalan* durante un tratamiento en la oscuridad inicial e dos semanas ocurrió más rápidamente a 26 grados centígrados que a 21 grados centígrados (Hammerschlarg, 1981, 1982). Las raíces que se formaron a la temperatura más alta eran también las más largas que aquellas que se formaron a 21 grados centígrados, aunque el porcentaje de brotes que produjeron raíz era similar (Hammerschlarg, 1982). Las raíces fueron inducidas a formarse *in vitro* de *Phlox paniculata* a 30 grados centígrados, pero, para la elongación de raíz, los cultivos se movían a 22 grados centígrados (Schanabelrauch y Sink, 1979). Brotes de *Carica papaya* guardándose a temperatura nocturna de 25 grados centígrados se encontró que la raíz se formaba más efectivamente a temperatura de día cuando era incrementada de 22, a 27, ó 29 grados centígrados. Las raíces producidas a 29 grados centígrados eran más finas y tenían raíces laterales que aquellas producidas a otras temperaturas (Drew y Miller, 1989).

Pierik (1972) descubrió que segmentos de pecíolo de *Lunaria annua* formaron pocas raíces a 25 grados centígrados pero enraizaron bien a esta temperatura en la presencia de auxina si habían sido previamente guardados por 20 semanas a 5 grados centígrados. El tratamiento frío tuvo el mismo efecto que la permanencia de los explantes en la oscuridad.

vii. Enraizamiento a Temperaturas más bajas

Hay reportes de varias plantas que forman raíces más satisfactoriamente a temperaturas más bajas que aquellas usadas por micropropagación. Brotes de *Digitalis lanata* multiplicadas a 24 grados centígrados fueron enraizadas en la presencia de 10 uM AIB a 19 grados centígrados (día) y 14 grados centígrados (noche) (Schoner y Reinhard, 1986), mientras brotes de *Aconitum carmichaeli* produjeron más raíces a 20 grados centígrados que a 25 grados centígrados (Hatano et al. 1988). Comparativamente temperaturas bajas parecen ser preferidas para el enraizamiento de algunas coníferas. Douglas notó que brotes de Abeto eran enraizados mejor a 19 grados centígrados. Menos raíces pero más callos se produjeron a 24 grados centígrados (Cheng y Voqui, 1977); relativamente pocos brotes de *Pseudotsuga menziesii* enraizaron a 24 grados centígrados, pero muchos más enraizaron a 19 grados centígrados pero fueron mas satisfactoriamente más establecidos en condiciones normales (Cheng, 1979) (9).

c. Aireación

Aunque normalmente las plantas producen oxígeno a través de la asimilación de bióxido de carbono y realizan la fotosíntesis las vitroplantas, debido a las condiciones en que se encuentran, no se realizan eficientemente. Además, hay posibilidades de que se forme gas etileno que inhibe la diferenciación y promueve la callosidad. Por consiguiente, es necesario que se mantenga oxígeno lo cual se puede lograr sin cerrar herméticamente los recipientes de cultivo (29).

C. Aclimatización

El medio ambiente artificial del laboratorio es diferente al que está en el interior (humedad, temperatura, gases, nutrimentos, intensidad de luz). Por consiguiente las plántulas se deben adaptar al medio ambiente a través de la fase de aclimatación para su transferencia al campo.

Para esta fase existen varios nombres (adaptación, aclimatación). Aclimatación es la adaptación del medio ambiente artificial al medio ambiente natural. Existen varias técnicas para lograr la aclimatización de las plántulas del laboratorio, al invernadero y de este al campo.

Esta técnica es muy importante para lograr que las plantas se adapten sin reducir su cantidad, ni afectar su crecimiento (29).

3.1.3. La microbiota del suelo

3.1.3.1. Diversidad

Pocos ambientes tienen tan gran variedad de microorganismos como el suelo, es una mezcla microscópica formada por miles de millones de bacterias, hongos, algas, protozoos y virus. La diversidad de la microbiota representa un obstáculo para calcular la población de una muestra de suelo.

Los métodos de cultivo sólo revelan los tipos fisiológicos y nutritivamente compatibles con el ambiente del medio de cultivo (20).

3.1.3.2. Variabilidad

La gran diferencia en la composición de los suelos, con las diferencias de sus características físicas y las prácticas agrícolas por las cuales son cultivados, producen también grandes diferencias en la densidad de la población microbiana, y en la clase de microorganismos que forman esta población. Las condiciones descritas y que influyen en el desarrollo de los microorganismos en cultivos de laboratorio son aplicables al suelo. Con especial referencia al suelo, dichas condiciones se puede resumir como sigue:

- A. Cantidad y tipo de sustancias nutritivas
- B. Humedad disponible
- C. Grado de aireación
- D. Temperatura
- E. pH
- F. Prácticas y sucesos en los que contribuyen gran cantidad de organismos como el riego y abono de los suelos.

A. Bacterias

La población de bacterias del suelo sobrepasa a todos los demás grupos de microorganismos, tanto en número como en variedad. En el suelo existe gran variedad nutricional y fisiológica de los tipos de bacterias que se hallan en el suelo y que ninguna situación de cultivo, por si sola, puede proporcionar un medio y alimentos adecuados para soportar el desarrollo de todas las distintas células viables de una muestra. En el suelo se encuentran bacterias autótrofas, heterótrofas, mesófilas, termófilas y psicófilas, aerobias y anaerobias, degradadoras de celulosa y oxidantes del azufre; fijadoras de nitrógeno y degradadoras de proteínas, y otros tipos (20).

a. Tipos de bacterias

Las bacterias sometidas al método de Gram pertenecen a dos grupos:

Bacterias grampositivas que retienen el cristal violeta y aparecen de color violeta profundo; las bacterias gramnegativas que pierden el cristal violeta y por el contraste de la safranina aparecen rojas. Las gramnegativas contienen un porcentaje más alto de lípidos que las bacterias grampositivas. Las grampositivas son, por lo general, más susceptibles a la penicilina y menos a la desintegración por métodos mecánicos o exposición a algunas enzimas que las gramnegativas.

b. Bacterias patógenas de las plantas

Pseudomonas producen manchas en las hojas, marchitamiento y enfermedades similares.

Xanthomonas sp. Son generalmente patógenas para las plantas y producen necrosis. La mayoría produce colonias amarillas, unas pocas producen colonias desde blanquecinas a color crema.

Agrobacterium sp. Viven en el suelo, las raíces o tallos de las plantas en las que producen agallas.

Corynebacterium es un género que incluye parásitos y microorganismos patógenos de plantas y animales. Los microorganismos patógenos de los vegetales se encuentran en el suelo y en plantas enfermas.

Erwinia sp. Invade los tejidos de las plantas vivas produciendo necrosis seca, agallas, marchitamiento y reblandecimiento de las raíces.

Streptomyces sp. Son responsables de la roña de las patatas y de la enfermedad de las raíces y raicillas de las patatas dulces (camote, batata).

3.1.4. Métodos de control de contaminación

3.1.4.1. Antibióticos

Los antibióticos son una clase especial de agentes quimioterapéuticos, obtenidos generalmente de organismos vivos. La palabra antibiótico se refiere a un producto metabólico de un organismo que es perjudicial o inhibitorio, en muy pequeñas cantidades para otros microorganismos.

A. Tipos de antibióticos

a. Las penicilinas

El primero de los antibióticos modernos y aún el más útil, la penicilina, la producen *Penicillium notatum*, *P. crisogenum* y otras especies de mohos. La penicilina es selectiva para bacterias grampositivas, algunas espiroquetas y diplococos gramnegativos (*Neisseria*).

b. Estreptomicina

La estreptomicina es producida por *Streptomyces griseus*, un organismo del suelo aislado por Schatz, Bugie y Waksman, quienes comunicaron su actividad antibiótica en 1944. Este descubrimiento fue muy importante porque la estreptomicina inhibe muchos organismos resistentes a las sulfonamidas y a la penicilina. Tiene un espectro antibacteriano amplio que abarca bacterias gramnegativas como *Francisella tularensis* y algunos organismos del grupo de las salmoneras. Tiene también un efecto inhibitorio sobre varias especies de *Mycobacterium* entre estas *M. tuberculosis*.

c. Eritromicina

La eritromicina es activa contra bacterias grampositivas, algunas gramnegativas y espiroquetas patógenas. En cuanto a su espectro antibacteriano y su utilidad clínica es semejante a la penicilina. También es activa contra organismos que se han hecho resistentes a la penicilina y a la estreptomicina.

d. Cloramfenicol (Cloromicetina)

El cloramfenicol es un antibiótico de amplio espectro contra muchas bacterias grampositivas y gramnegativas.

e. Tetraciclinas

Clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina son los nombres genéricos para tres antibióticos que tienen propiedades biológicas y químicas similares. Como grupo se les llama comúnmente tetraciclinas. *Streptomyces aureofaciens*, produce la oxitetraciclina. Se les considera como antibióticos de amplio espectro (20).

3.1.5. La oxidación fenólica en el cultivo de tejidos

Vulsteke (32) indica que el ennegrecimiento del explante es causado por la oxidación de compuestos fenólicos, en la herida del tejido. Estos compuestos son exudados dentro del medio, son atrapados por el agar y acumulados, formando un área negra alrededor del explante. Esta puede interferir con la absorción de nutrientes, resultado la inhibición del crecimiento.

El paso de un electrón de una molécula a otra produce una reacción de óxido-reducción. Oxidación significa que la molécula pierde un electrón. En los sistemas biológicos esto casi siempre corresponde a la eliminación de un átomo de hidrógeno completo. Cuando este átomo de hidrógeno se elimina, va acompañado de un electrón. La reducción se presenta cuando se adicionan electrones de una molécula. De nuevo lo más frecuente es que esto suceda cuando se agrega a la molécula un átomo de hidrógeno acompañado de un electrón.

Así:



Bidwell (2) menciona que la compresión o tensión parecen tener poco efecto, doblar la hoja tiene más y el cortarla o fracturarla parece estimular al máximo la respiración.

El herir o romper los tejidos estimula mucho la respiración por tres razones: la primera es la rápida oxidación de los compuestos fenólicos que tiene lugar cuando la organización, que mantiene a éstos substratos separados de sus oxidasas, se rompe. La segunda, son los procesos normales de glicólisis y catabolismo oxidativo que aumentan conforme la disrupción de la célula o células causa una mucho mayor accesibilidad de los substratos a la maquinaria enzimática de la respiración. Tercero, la consecuencia general de la herida es la reversión de

ciertas células al estado meristemático, seguido por la formación de callo y la “curación” o la reparación de la herida. Tales células y tejidos en crecimiento activo tienen tasas respiratorias muy superiores a los tejidos maduros o en descanso.

La tasa de respiración por célula o por unidad de proteína de algunos componentes de tejidos, como tallos (es decir, las células de compañía del floema, del cambium o del parénquima), puede ser muy alta.

En la actividad metabólica de respiración se libera energía para las actividades de la planta mediante la oxidación de algunos compuestos de carbono; y la síntesis de varios tipos, tales como la producción de alimentos complejos a partir de azúcares simples, o la síntesis de otras sustancias y del protoplasma mismo.

Se conocen varias enzimas que oxidan a los fenoles dando como producto las quinonas. Dos de las más importantes son la monofenol oxidasa (tirosinasa) y la polifenol oxidasa (catecol oxidasa) convirtiendo los fenoles liberados en la herida a quinonas. El color café en la herida, (por ejemplo cuando a un tubérculo de papa o una manzana se le hace un corte o se golpea) es un resultado de dicha reacción. Es evidente, por la rápida reacción que ocurre al herir, que tanto la enzima como en sustrato, los cuales parecen ser solubles, deben haber estado apartados uno del otro en la célula normal, aprisionados en diferentes compartimientos celulares.

Las labores siguientes son necesarias para mantener vivo el material en el cultivo (2):

a. Pretratamiento de los explantes con un antioxidante por inmersión en una solución estéril de cisteína, ácido ascórbico o ácido cítrico (solos o en combinación), antes de la inoculación en el medio.

b. Incluir antioxidantes en el medio de cultivo. La adición de carbón activado tiene también el propósito de prevenir el ennegrecimiento, como en el caso del cultivo de *M. balbisiana*.

c. Transferir frecuentemente los cultivos a un medio fresco. Cuando el ennegrecimiento es severo, el cultivo podría ser transferido semanalmente, si éste viene en menor grado la transferencia puede ser cada 3 ó 4 semanas.

Se ha observado ocasionalmente que el ennegrecimiento se incrementa cuando niveles de citocinina son aumentados para estimular la proliferación del brote.

3.1.5.1. Problemas de iniciación y mantenimiento de cultivos

A. Oxidación

a. Oxidación en etapa I

El ennegrecimiento de corte de muchos explantes comienza a decolorar justo después de la excisión. Los explantes, o partes de ellos, frecuentemente continúan oscureciendo cuando son introducidos dentro del medio de cultivo, donde pueden también exudar sustancias coloreadas oscuras hacia el medio. Este tipo de ennegrecimiento es asociado con la cortadura. No todos los compuestos producidos son inhibitorios, pero con frecuencia se ha encontrado que una vez ocurre la decoloración, el crecimiento es inhibido y los tejidos pueden morir a menos que se tomen medidas para remediarlo.

Los explantes pueden también producir pigmentos (rosado, rojo, café, café-rojizo, negro o azul) algunas veces después de la excisión, los cultivos pueden brotar durante el crecimiento subsecuente. En algunos casos, la formación en esta etapa es debido al daño o vejez de algunas células, causado por un ambiente de cultivo no apropiado. La secreción de sustancias por cultivos establecidos es menos molesta que la decoloración que ocurre al poco tiempo del aislamiento del explante pero, cuando ocurre, el crecimiento es generalmente (pero no invariablemente) prevenido (9).

b. Decoloración y exudado del explante

El daño resultante de la producción de pigmentos oscuros es usualmente más severo durante las etapas iniciales de un cultivo, y cesa de ser un problema cuando los explantes han comenzado el crecimiento. Por tanto los resultados obtenidos por Garton y Moses (1986) con vástagos y brotes laterales de *Alnus oregona* son típicos. Estos explantes exudaron sustancias, lo cual significó la pérdida de 4/5 de los cultivos durante las primeras 10 semanas, únicamente cuando la multiplicación de yemas comenzó después de 22 semanas, esto dejó de ser un problema (9).

i. Efecto de genotipo

El grado de ennegrecimiento e inhibición del crecimiento que ocurre en cultivos es muy dependiente del genotipo, siendo especialmente severo en géneros que naturalmente contienen altos niveles de taninos u otros hidroxifenoles, tales como *Castanea*, *Hamamelis*, *Juglans*, *Quercus*, *Paeonia*, *Rhododendron* y muchas coníferas. Diferencias también son encontradas entre especies del mismo género y cultivos dentro de especies por ejemplo: más exudado fenólico fue producido por explantes de *Aconitum napellus* que por aquel de *A. noveboracense* (Cervelli, 1987). Y cultivos de *Sorghum bicolor*, seleccionados por sus altos contenidos de taninos, cedieron tan grandes cantidades de fenólicos pigmentados, que el medio oscurecido y los cultivos prontamente se volvieron necróticos. No todos los cultivos se comportaron en la misma forma porque hubo variaciones en el color de los pigmentos y en la intensidad con la cual estos mancharon el medio (Cai & Butler, 1990).

Diferentes genotipos no solamente difieren en la cantidad de sustancias fenólicas producidas, si no las sustancias liberadas también varían en su toxicidad, o las plantas demuestran diferentes susceptibilidades. Así, entre las altas variedades de tanino de *Sorghum* mencionadas anteriormente diferencias en la tolerancia a los pigmentos fueron observadas (Cai y Butler , loc. cit) (9).

ii. Origen de explantes

Tejidos jóvenes son con frecuencia menos propensos al encafecimiento sobre la excisión que otros más viejos. Este fue el caso en *Rosa Pauls Scarlet* (Muhitch y Fletcher, 1984), pero explantes muy jóvenes de café son más propensos a mostrar oxidación fenólica que aquellas tomadas de tejidos más viejos (Duhem et al. 1988). En aceite de Palma, hojas jóvenes proporcionaron los mejores explantes pero la extensión del encafecimiento fue muy sensitiva a la presencia de auxina en el medio (Rabechault y Martín, 1976). Mientras que Haramaki (1971) pudo cultivar puntas de vástagos de *Gloxinia*, brotes axilares no proporcionaron buenos explantes porque se oxidaron muy rápidamente (9).

-Efecto de rejuvenecimiento Tejidos cortados provenientes de brotes fuertemente podados y etiolados de plantas leñosas son con frecuencia menos propensos a encafecimiento que aquellos

tomados de partes adultas de la planta. Explantes cortados de brotes débiles oscurecidos de vides crecidas en campo fueron menos propensos a sufrir encafecimiento en aislamiento que otros removidos de brotes normales (Yu y Meredith, 1986). El encafecimiento ocurrió mas frecuentemente en puntas de brotes de *Pistacia* tomadas de plantas que crecieron en invernadero que en explantes derivados de semilleros asépticamente germinados (Alderson y Barghchi, 1982) (9).

iii. Época del año

Un factor adicional influyente en la extensión del encafecimiento puede ser la época del año en la cual los tejidos son explantados. En *Hamamelis*, la intensidad del encafecimiento fue más grande cuando en el hemisferio norte, los explantes fueron muestreados en mayo, y el más bajo en julio y agosto (Christiansen y Fønnesbech, 1975). Puntas de brotes de explantes de manzana “Espia del norte” fueron menos propensos a tornarse café si se recolectan a mediados de primavera o verano (Hutchinson, 1982 a). La proporción de cultivos de *Quercus robur* “Fastigiata” que mostraron oxidación fenólica incrementaron muchos dobleces cuando los explantes fueron tomados al final de junio, al contrario que los tomados al principio de mayo (Howard y Marks, 1987) y la secreción fenólica de las puntas de brotes de *Acer rubrum* fue especialmente marcada, cuando fueron tomados en julio-agosto. Según el crecimiento del árbol declinó (Welsh *et al.*, 1979). Sin embargo el encafecimiento fue observado en brotes laterales de *Acer saccharum* recolectados en primavera, pero no aquellos recolectados en invierno (Kerns y Meyer, 1988) y una observación similar fue hecha por Biederman (1987) quien encontró que explantes de capullos axilares de *Magnolia*, tenían una fuerte tendencia al ennegrecimiento si fueron cosechados antes del florecimiento (abril) y durante la subsecuente temporada de crecimiento, pero que éstos eran mucho menos de un problema cuando el muestreo fue realizado durante diciembre a marzo (9).

iv. Decoloración de cultivos establecidos

La decoloración también puede ocurrir en tejidos cultivados después de un período de crecimiento. Algunas plantas (e.g. *Sorghum* –Davis and Kidd, 1980) *Parthenium hysterophorus*-Wickham *et al.* 1980) producen un callo que es especialmente propenso a

decolorarse al volverse necrótico después de que ha sido cultivado por cierto tiempo.

Callos embriogénicos de Rosa híbrida se tornaron café cuando se subcultivaron y crecieron muy lentamente (De Wit *et al.*, 1990). La formación de compuestos fenólicos fue asociada con la declinación de compuestos de células de Rosa Pauls Scarlet (Nash & Davies 1972). Las suspensiones de *Pinus taeda* cesaron de crecer después de varios pasos se tornó café y los compuestos fenólicos fueron producidos y acabaron en breve (Heyser y Moth (1980). La tasa de declinación fue menos pronunciada si las líneas de células eran subcultivadas a intervalos de 2-3 semanas (9).

B. Las causas de oscurecimiento

El ennegrecimiento del tejido ocurre a través de la acción de las enzimas oxidasa del contenido de cobre (Catechol oxidasa), con frecuencia llamadas polifenol oxidasas, fenolasa y tirosinasa (monofenol oxidasa) (Lerch, 1981) las cuales son liberadas, sintetizadas o presentadas con sustratos apropiados y condiciones oxidativas cuando los tejidos son cortados. Los sustratos para estas enzimas, los que varían en diferentes tejidos son comúnmente tirosina u o-hidroxifenoles tales como ácido clorogénico. Las enzimas, normalmente latentes en las membranas de la célula y sustratos retenidos, dentro de las vacuolas de la célula, vienen juntas cuando las células son lastimadas o se vuelven moribundas.

a. La naturaleza de exudados

La característica del oscurecimiento (usualmente café o negro) producida por las plantas casi nunca ha definido con claridad aunque se conoce que generalmente son mezclas de sustancias fenólicas complejas. La toxicidad está definida que cuando ocurre los fenoles son agregados al revés a proteínas que se juntan con el hidrógeno y por su oxidación a quinonas siendo muy activas y que se cambian en forma cíclica a polimerasas y/o proteínas oxidasas para formar compuestos que se incrementan a compuestos melánicos. (Harms *et al.*, 1983), que a veces se llaman polifenoles en literatura. Las quinonas también pueden ser producidas de fenoles por la acción de enzimas peroxidasas que pueden catalizar su oxidación en la presencia de peróxido.

Este y otros radicales libres están liberados durante el proceso de daño. Las sustancias fenólicas producidas por *Cattleya orchid* se difundieron en un medio y eran rojizas e identificadas como ácido eucómico y tiramina.

Aunque parece ser que los exudados poseen la misma apariencia, los producidos por plantas de diferentes géneros no son de la misma composición química. Esto está demostrado por veracidad que los productos liberados de brotes de *Rubus*, *Hibiscus*, y *Rhododendron* no tenían un efecto en *Tabacum* cuando callos crecieron en un medio conteniendo exudados, por el contrario los compuestos liberados por los brotes de *Juglans nigra* y *Euphorbia lathrys* eran inhibitorios.

Los compuestos fenólicos pueden inhibir la actividad de enzimas. Extracto de hojas de Carnation inhibió la actividad de B-glucuronidase (GUS) en plantas de tabaco transgénicas, pero la inhibición fue controlada si el extracto de hoja era pretratado con PVPP (Vainstein *et al.*, 1992) (9).

C. Prevención de oxidación

Si la exudación de explantes está acompañada por un crecimiento satisfactorio o morfogénesis, no hay necesidad de tomar precauciones. Solo cuando la oxidación de tejidos y el medio son asociados con pobre establecimiento (y esto es la situación más usual), es necesario tratar de prevenirlo. Diferentes maneras son posibles:

- a. Minimizar el daño causado al explante
- b. Remover los compuestos fenólicos producidos
- c. Modificar el ambiente físico
- d. Modificando el potencial redox
- e. Reduciendo la actividad fenolasa y sustrato disponible
- f. Alterando la composición del medio y los reguladores de crecimiento usados.

a. Minimizando daño

La cantidad de oxidación puede ser disminuida por la reducción del tamaño de los explantes susceptibles que están dañados o heridos durante la excisión o esterilización.

En varias especies, los esterilizantes usados para descontaminar explantes son responsables por acentuar la oxidación de explantes. Donde la oxidación presenta un problema severo sería necesario experimentar cambiando una solución estéril con otra (9).

b. Removiendo las sustancias fenólicas

La presencia de sustancias fenólicas dañinas muchas veces provoca que el explante produzca mas exudados, i.e. producción puede ser auto catalítica. Removiendo o dispersando las sustancias cuando ya están formadas es un método efectivo de control.

i. Lixiviación o Dispersión

En especies donde los exudados negros pueden ser un problema, un pretratamiento del material de la planta puede ayudar a obtener un explante viable. Primeramente, es necesario no tocar alrededor del exudado del tejido alrededor con otro durante la excisión (Tulecke *et al.* 1988).

Después, realizar un lavado para remover los productos liberados de las células dañadas es frecuentemente efectivo. Los explantes deben ser lavados o sumergidos en agua estéril por 2 ó 3 horas después, aislarlo y transferido a un medio de cultivo (Cresswell y Nitsch, 1975; Lane, 1978; Vieitez y Vieitez, 1980b; Chevre *et al.*, 1983). Por ejemplo, semillas de nuez y *Corylus* son muchas veces sumergidos en agua en movimiento por 16-24 horas para remover fenoles antes que estén esterilizadas y germinadas *in vitro* (Rodríguez, 1982b; Pérez *et al.*, 1985; Peñuela *et al.*, 1988).

Después de la esterilización también es necesario para eliminar los químicos usados para descontaminación. Si no son removidos de manera correcta o totalmente puede provocar la síntesis de fenoles. Lavando los explantes esterilizados también sirve para remover fenoles oxidados que han empezado a acumularse (9).

-Transferencias frecuentes El crecimiento de explantes puede ser limitado por metabolitos tóxicos aunque haya ausencia de oxidación. Si los explantes no demuestran signos de crecimiento después de 3 – 4 semanas sus probabilidades para sobrevivir pueden ser ayudadas por transferencia a un medio fresco. Las rápidas transferencias son importantes si el medio

alrededor del explante empieza a tornarse oscuro. La oxidación es muchas veces visible en un medio sólido donde los exudados están atrapados por el agar concentrados en el explante.

Probablemente el método más usado para prevenir oxidación de tejido es realización de subcultivos de explantes frecuentemente, colocándolos en un medio fresco después de solo unos pocos días. El intervalo entre transferencias necesita ser ajustado acorde la severidad del problema. Muchas veces es necesario mover los explantes cada 1-7 días, pero ocasionalmente el período puede ser extendido (e.g. a 20 días por *Vitis rotundifolia* Sudarsono y Goldy, 1991).

Transferencias frecuentes conforme el tiempo constituye un proceso caro que no debe ser hecho para una situación comercial, si pueden ser usadas otras técnicas alternativas. Sin embargo generalmente solo es necesario por cortos períodos de tiempo con explantes nuevamente aislados y el número de frascos de cultivo, en este tiempo es generalmente bajo.

El uso de estas transferencias frecuentes para prevenir la oxidación es común, y muchas veces está descrito. Broome y Zimmerman (1978) descubrieron que fue exitoso con brotes de mora, pero el ácido ascórbico, ácido cítrico e hipocloride de cisteína eran perjudiciales si eran agregados a un medio usado para brotes de higo por lo que se oxidaron después de 2 días, los explantes eran transferidos a un medio fresco y otra vez seguidamente a intervalos semanales, para minimizar posibles efectos inhibitorios (Muriithi *et al.*, 1982) (9).

-Cortando tejido oxidado Transfiriendo los explantes a un medio fresco o cortar cualquier tejido que ha empezado a decolorar es importante porque si este no es removido es probable que el daño pueda expandirse. Cortando explantes de café en cultivo de callos de *Musa*, previno la expansión de decoloración (Fichet, 1990b) (9).

-Uso de medio líquido Explantes expuestos a oxidación son menos frecuentes si están cultivados en un medio líquido es donde los fenoles pueden disminuir fácilmente, es entonces muy común encontrar la primera etapa de una secuencia de un cultivo (9).

-Efecto de agentes gelificantes El grado de crecimiento de brotes nuevamente formados a veces pueden ser elevado si, después de que se cultivaron en un medio con agar, eran transferidos a un cultivo líquido en agitación.

Pueden ser varias razones, uno que es posible la dispersión de metabolitos tóxicos en líquido (Simmonds y Werry, 1987).

Aunque el agar a veces ha sido descubierto que causa oxidación cuando otros agentes gelificantes no (9).

-Cultivo en poros sustrato La tendencia de producir fenoles durante enraizamiento *in vitro* de *Ephedra fragilis* fueron en un medio agar. Pero si los brotes eran cultivados en Sorbarods con ½ MS conteniendo 1% de sucrosa, éstos crecieron más rápidamente y los fenoles eran dispersados dentro del medio en lugar de acumularlo en la base del explante (O'Dowd y Richardson, 1993) (9).

c. Absorción con carbón activado

Adicionando carbón activado a un medio de cultivo es a veces posible evitar el crecimiento de fenoles inhibitorios pero, el carbón activado también puede absorber reguladores de crecimiento y otros compuestos del medio, por lo que debe ser usado con precaución. El carbón activado puede ser tóxico para unos tejidos (e.g. a explantes de *Pinus sylvestris*-Hohtola, 1988). Bon *et al.* (1988) asumieron que el carbón activado previno la acumulación de polifenoles en un medio porque detuvo su síntesis en brotes de *Sequoiadendron giganteum* durante 6 semanas de elongación *in vitro*. No fue claro si era porque los fenoles eran absorbidos por las raíces podían ser polimerizados, porque los polifenoles eran absorbidos después de la formación, o porque algún otro compuesto esencial para la formación de polifenol (e.g. auxina) era eliminado.

Este material es muy común aplicar al medio de cultivo porque el mismo no es tóxico.

Teóricamente se puede aplicar en cualquier cantidad. Esta sustancia tiene la propiedad de absorber cualquier sustancia química e inhibe el funcionamiento de las fitohormonas. El producto es bastante fino. Es usado cuando ocurre el oscurecimiento del tejido in vitro, decoloración del medio de cultivo, formación de callo en la fase de enraizamiento de propágulos o cuando el crecimiento es inhibido. Absorbe productos provenientes del metabolismo, así como sustancias hormonales y vitaminas. Se sugiere en algunos casos aumentar la concentración de auxina, en la presencia de carbón activado. Por esta razón, normalmente se aplica dentro del rango de 6.0 a 1.0 g/l.

La pureza de este producto es variable. Se debe aplicar antes de calibrar el pH porque este sube con su aplicación (27).

d. Modificando el ambiente

La actividad de las enzimas que están involucradas en biosíntesis (M:E: Davies, 1972^{a,b}) y la oxidación de fenoles está incrementado por la luz (Creasy, 1968). Extractos de hojas de *Eucalyptus* han mostrado a tener un contenido más alto de compuestos fenólicos especialmente flavonoides cuando eran extractados en la luz en vez de oscuridad (Durand-Cresswell *et al.*, 1985) (9).

i. Etiolación de plantas

La oxidación del tejido es menos en explantes derivados de plantas crecidas en oscuridad o luz de baja intensidad, en unos casos días cortos (Durand-Cresswell *et al.*, 1985).

En *Quercus robur*, *Acer platanoides* y *Garrya elliptica* fue considerablemente reducido si los explantes eran derivados de plantas crecidas en oscuridad o debajo de plástico en donde había solo 1% de luz del día, pero cuando se cultivaron brotes de *Hamamelis* fue mejor si las plantas se habían introducido en completa oscuridad (Marks *et al.*, 1987 ; Marks y Simpson, 1990). Los autores descubrieron que los explantes fueron exitosamente aislados de plantas etioladas, excepto *Quercus robur* que continuaron creciendo sin la aparición de productos de oxidación.

En *Quercus* el beneficio de etiolación fue de corta duración y una liberación perjudicial de polifenoles ocurridas en un 70% de cultivos iniciados a 56 días después de que las cubiertas de luz fueron removidas (9).

ii. Cultivo en oscuridad o en luz de baja irradiación

-Manteniendo nuevamente aislados explantes en oscuridad Los cultivos muchas veces son iniciados más rápidamente si los tejidos nuevamente explantados son mantenidos en la oscuridad (Durand-Cresswell y Nitsch, 1977). Por ejemplo, el cultivo de brotes de *Carya illinoensis* eran mantenidos en oscuridad por las primeras dos semanas y después en un fotoperíodo de 16 horas (Lazarte, 1984). Brotes de *Mahonia* necesitaron estar en la oscuridad por 21 días en un medio MS con 1g/l de carbón activado que fue agregado (Daguin *et al.*, 1992).

La oxidación es realmente reducida o prevenida con este tratamiento de oscuridad y a veces el crecimiento subsecuente esta promovido aunque la decoloración del tejido no está observada (Meyer, 1982). Los explantes pueden ser trasladados a luz normal después de un tratamiento en oscuridad, aunque el traslado a luz de baja intensidad (e.g. 7-15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ca. 500-1,000 lux) puede ayudar a prevenir oxidación (9).

-Manteniendo cultivos establecidos en oscuridad La incubación en oscuridad también puede ser efectiva cuando los exudados negros son producidos en el crecimiento del cultivo. La oxidación de callos de *Musa*, (50 mg/l ácido ascórbico, 75 mg/l ácido cítrico, 0.01% PVP y 0.5% carbón activado) fue reducido si el tejido era cultivado en oscuridad (Drew, 1986).

Callos de *Parthenium argentatum* iniciados en una densidad de 0.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, continuó a producir brotes múltiples si eran mantenidos en esta irradiación, pero luego se oxidaron y murieron si eran trasladados a 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Finnie *et al.*, 1989) (9).

iii. Tratamientos a temperaturas bajas

Manteniendo explantes nuevamente establecidos a 2 grados centígrados por una etapa corta ayudó a prevenir oxidación de cultivo de Café (Duhem *et al.*, 1988).

Similarmente la producción de exudado café de tejidos de *Eucalyptus* fue reducido si el material de las plantas eran sometidos a tratamiento frío de 5 grados centígrados por varios días antes de la disección del explante (Durand-Cresswell *et al.*, 1985).

La oxidación también puede ser prevenida si se mantiene el material de plantas a una temperatura un poco más bajo que lo normal, mientras todavía obteniendo crecimiento y/o morfogénesis. Había menos exudación de sustancias café–negro de *Alstroemeria*, si los segmentos de rizomas eran incubados a 18 grados centígrados que los que fueron mantenidos a 21 grados centígrados ó 24 grados centígrados (Pierik *et al.*, 1988b) y la oxidación que ocurrió durante el enraizamiento de brotes de *Vicia faba* a 22 grados centígrados, fue reducida si cultivos eran mantenidos a 14-18 grados centígrados, durante este proceso. El carbón activado fue esencial a prevenir oxidación a 22 grados centígrados pero no fue necesario a las temperaturas más bajas (9).

e. Composición del medio

Si la atención a la manera en que los explantes son tratados no soluciona el problema de oxidación, la atención debe ser dada a la naturaleza del medio que está usando. La oxidación es muchas veces más obvia en un medio que en otro, demostrando que puede ser causado por nutrientes inapropiados (Apavatjirut y Blake, 1977).

La oxidación es muchas veces menos severa en un medio diluido que un medio con altas sales como MS. Uosukainen (1987) previno la oxidación de brotes de explantes de varias plantas madereras estableciéndolos en un medio conteniendo solo un décimo de sales de MS y sin auxina. Solo cuando los explantes estaban establecidos eran trasladados a un medio con niveles más altos de sales. *Camellia japónica* en el cultivo, los brotes crecidos en MS o ½ MS demostraron oxidación progresiva de las hojas y necrosis de brotes, pero no ocurrió en medios suplementados con un 1mM se sulfato de amonio (Samartin, 1989) (9).

i. Nitrógeno y Potasio Anderson (1975) sugirió que la oxidación de tejidos de explantes de *Rhododendron* fue acentuada por niveles altos de potasio en medio MS. La oxidación no ocurrió en un medio con la mitad de la concentración normal de KNO_3 . Una reducción de la concentración de nitrógeno ha sido efectiva en prevención de oxidación en otras plantas. En *Dioscorea opposita*, donde normalmente es un problema la oxidación no ocurrió si el cultivo de callos eran iniciados en un medio MS en donde las concentraciones de NH_4NO_3 y KNO_3 ambos habían sido reducidos a 10 mM (Kuginuki y Nishimura, 1989). Similarmente explantes de *Pinus sylvestris* se oxidaron y murieron en un medio MS pero crecieron satisfactoriamente cuando concentraciones de NH_4NO_3 y KNO_3 y CaCl_2 eran reducidos por 50% y cuando concentraciones de KH_2PO_4 eran doblados (Hohtola, 1988). En este estudio, los explantes pudieron tolerar un incremento de 20 veces en la concentración de micronutrientes MS sin producir daño.

Una reducción en la oxidación de cultivos de *Ribes* fue cuando se elevó del pH inicial de el medio de 5.7 a 7.0-8.0 (gunning y Lagerstedt, 1986). Abajo de esas condiciones debe aceptarse que será reducido a iones de nitrato (9).

i. Otros constituyentes

La oxidación de cultivo de *Pistacia vera* ocurrió cuando la incorporación de el medio no fue adecuado por el crecimiento rápido (Bargchi y Alerson, 1983). Barghchi (1986^a) descubrió que la oxidación de brotes de explantes de meristemo podía ser casi eliminada si FeSO_4 fue omitido inicialmente del medio. El compuesto podía ser repuesto más tarde sin efectos perjudiciales. Similarmente la exclusión temporal de cobre de los micronutrientes puede ser considerado durante 1 ó más subcultivos. En *Pistacia atlántica* la oxidación fue directamente proporcional a la concentración de nitrato de calcio en el medio y fue descubierto ser relacionado a la concentración de iones de calcio. Mejores resultados fueron obtenidos en la presencia de 1.7 meq/l Ca^{2+} , para este aunque brotes vigorosos con entrenudos largos fueron producidos en la presencia de 3.4-10.2 meq/l, era probable que oxidaron y sufrieron necrosis apical (Mederos Molina y López Carreño, 1991) (9).

f. Reguladores de crecimiento

La formación de polifenoles de explantes como recientemente cortados puede ser influenciada por reguladores de crecimiento, pero los resultados no son consistentes y los compuestos que han inducido oxidación en una especie están sin efectos en otro.

i. Citocininas Niveles altos de kinetina fueron necesarios por el crecimiento de brotes de *Pelargonium*, pero el medio agar oscureció si era presente más de 1 mg/l kinetina .

El porcentaje de sobrevivencia de explantes fue incrementado considerablemente cultivándolos en la primera semana en un medio basal sin reguladores y después en un medio con citocinina y auxina (Debergh y Maene, 1977). La oxidación de brotes de cultivo de *Vitis rotundifolia* fue descubierto que esta relacionado con la adición de TDZ al medio a promover proliferación de brotes. Si los subcultivos eran realizados cada 20 días el problema podía ser controlado.

ii. Auxinas La oxidación en muchas veces está asociado con el uso de 2,4D, especialmente si las concentraciones altas están agregadas al medio. Sustancias fenólicas fueron producidas en callos de *Aconitum heterophyllum* iniciados en un medio conteniendo 1 mg/l 2,4D y 0.5 mg/l de

kinetina y 10% de agua de coco, pero la oxidación no fue un problema cuando callos iniciados con 5 mg/l de NAA y 1 mg/l de BAP (Giri *et al.*, 1993). Cultivos de *Borago officinalis* son susceptibles a oxidación, aunque embriogénesis somática fue efectivamente inducida por 22.6 μ M 2,4D y era necesario usar solo 4.5-9 μ M en investigaciones subsecuentes.

En brotes de *Chrysosplenium americanum* la oxidación ocurrió si 2,4D y/o BAP había sido agregado al medio pero no si eran adicionados IAA, NAA, kinetina o zeatina. La proliferación de brotes fue lograda con 0.5 mg/l NAA plus 1-5 mg/l zeatina (Brisson *et al.*, 1988). Explantes de raíces de *Comptonia peregrina* formaron brotes adventicios en la presencia 0.5 μ M BAP, pero adicionando NAA al medio causó que los explantes se oxidaran (Louis y Torrey, 1991) (9).

g. Modificando el potencial redox

La tendencia de compuestos disolventes a ser oxidados o reducidos depende de la oxido-reducción (redox) potencial de la solución.

i. Antioxidantes

Siegel y Porto (1961) definieron un antioxidante como un electrón donado que inhibe la oxidación de sustratos con una eficiencia estequiométrica. Los antioxidantes incluyen agentes de reducción que quitan oxígeno de otras moléculas y también compuestos que accionan por mecanismos alterativos, desactivando iones reaccionando con intermediarios en una oxidación redox equilibrando y reaccionando como un catalítico de transporte de electrones.

Los agentes de reducción que bajen el potencial redox de la solución son efectivos en prevención de la oxidación de tejidos de plantas aislados o extractos de plantas y muchas veces se asume que previenen la oxidación de fenoles. Según Loomis y Battaile (1966) esto no es verídico, al contrario accionan removiendo cualquier quinona que está formado. La presencia de agentes de reducción puede activar la o-hidroxilación de monofenoles con consecuencias perjudiciales.

Los tejidos de explantes de plantas que son disponibles a oxidación muchas veces son lavados en una solución de antioxidantes después de la esterilización, cortando en papel remojado con un antioxidante y/o sumergido en solución de un antioxidante inmediatamente después de cortar. Los compuestos que han sido usado para esto incluyen ácido

ascórbico (e.g.0.1%), ácido cítrico, L-cisteína (Jarret *et al.*, 1985^a; Visseur, 1987) o hidrocloreto de cisteína, ditioneitol (Han & Liu, 1990) mercaptoetanol y tiosulfato de sodio (1 g/l) (Han y Liu, 1990).

Haramaki (1971) aisló ápices de brote de *gloxinia* en una solución antioxidante hasta después que eran desinfectados en cloro, después eran lavados en una solución estéril antioxidante. Ziv (1983) disectó brotes de *Ruscus* en papel filtro impregnadas con 1% de ácido ascórbico. Lavando los explantes en una solución de 50 mg/l de cisteína previno la oxidación de brotes de *Musa* (Jarret *et al.*, 1985^a).

Algunas especies tienen una tendencia de oxidación desde el inicio del cultivo. En estos casos, puede ocurrir necrosis (muerte de células) o inhibición del crecimiento. La toxicidad por oxidación se cree que ocurre a través de algún complejo químico de fenol orgánico metabólico.

Para evitar éste fenómeno se sugieren los pasos siguientes.

-Aplicar absorbente de materia orgánica metabólica (9).

- Mezclas ácido cítrico/ascórbico Una solución de ácido ascórbico y cítrico es usada comúnmente para lavar explantes recientemente aislados para detener el proceso de oxidación.

Posiblemente el ácido cítrico actúa como un agente chelating, absorbiendo iones de metal que son necesarios para activar enzimas oxidativas pudiendo detener la descomposición de ácido ascórbico, y ha sido demostrado a ser oxidado a dehydro-ascórbico entre 0.8-3 horas dependiendo más que todo en la concentración de cobre y hierro en el medio (Elmore *et al.*, 1990). El ácido tartárico que en ambos es un agente de reducción y un agente chelating para iones de Cu_2 , puede ser más efectivo pero parece que no ha sido tratado para este propósito.

En el cuadro 2 se mencionan unos ejemplos, donde explantes han sido lavados en una mezcla de ácido cítrico y ácido ascórbico (9).

Cuadro 2 Estudios realizados con mezclas de ácido cítrico y ácido ascórbico

| Planta | Ácido cítrico mg/l | Ácido ascórbico mg/l | Referencia |
|----------------------------|--------------------|----------------------|--------------------------|
| <i>Aechmea fasciata</i> | 100 | 150 | Jones y Murashige (1974) |
| <i>Musa textilis</i> | 1500 | 1000 | Mante y Tepper(1983) |
| <i>Phoenix dactylifera</i> | 150 | 150 | Tisserat et al. (1979b) |
| <i>Rhododendron</i> | 150 | 150 | Anderson(1975) |

Fuente: GEORGE, E.F. 1993.

- Adicionando antioxidantes al medio Antioxidantes también han sido incorporados en el medio de cultivo. El ácido ascórbico es a veces adicionado al medio por este propósito pero debe ser esterilizado con un filtro, y no en autoclave. Incluyendo ácido ascórbico en el medio usado para aislamiento de brotes de *Equisetum* previno la oxidación cuando los explantes eran tratados a un medio regular después de 3 días (Wetmore y Morl, 1949). Adicionando 50 mg/l al medio ayudó a prevenir la oxidación de cultivo de Café (Duhem et al., 1988). Elmore et al, (1990) descubrió que en medio de cultivo enjuagando ácido ascórbico el tejido se oxidaba muy rápidamente a dehydro-ácido ascórbico, que también desapareció del medio durante un período de 11 horas. Cuando la oxidación está prevenida por la adición de ácido ascórbico al medio tiene que actuar por medio de:

- a. un efecto inmediato de la molécula intacta
- b. el compuesto (o dehydro-ácido ascórbico) siendo absorbido rápidamente por tejidos o,
- c. Un producto de oxidación de ácido ascórbico siendo responsable por los efectos observados.

Una descomposición del producto ácido ascórbico ha sido descubierta de ser el responsable por morfogénesis en unas especies. El ácido cítrico también se adiciona al medio pero esto es frecuentemente por otros propósitos que por la prevención de oxidación, porque puede actuar ambos como un protector y como un nutriente pero varios trabajos han incorporado una mezcla similar de ácido cítrico y ácido ascórbico a un gel que es usado por pretratamientos de explantes, descubriendo que la combinación de los 2 compuestos tienen la tendencia a reducir la ocurrencia de oxidación. Por ejemplo, la oxidación de callo de *Vigna radiata* ha sido

reportado a ser prevenido durante subcultivos por la adición de 100 mg/l, ambos de ácido cítrico y ácido ascórbico al medio (Mathews, 1987). Mante y Tepper (1983) suplementaron a su medio en la primer etapa con 100 mg/l de ácido ascórbico, 150 mg/l de ácido cítrico (y 2 mg/l cisteína) para prevenir la oxidación de explantes de *Musa textilis*. Por otro lado, Gupta (1986^a) descubrió que la adición de solamente 25 mg/l de ácido ascórbico en filtro estéril fue más efectiva que el ácido cítrico o carbón activado en prevención de oxidación fenólica de explantes de banano y plátano (10). En la figura 1 y 2 se presentan las fórmulas estructurales de los antioxidantes ácido cítrico y L-cisteína.

-Ácido cítrico

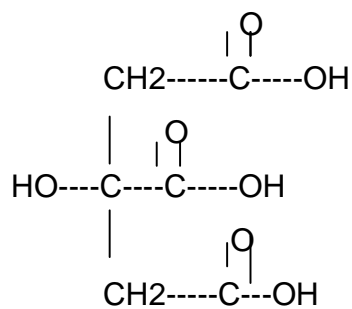


Figura 1. Ácido cítrico

FW.192.12

Fórmula: C₆H₈O₇

L-Cisteína

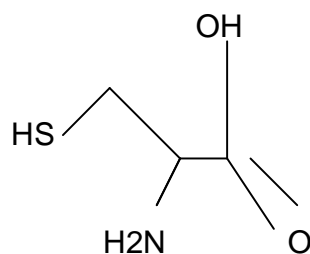


Figura 2. L-cisteína

M=121.13 g/mol.

Fórmula: C₃H₇NO₂S

-Otros antioxidantes Para obtener proliferación de explantes de nudos de oliva, Rugini y Fontanazza (1981) agregaron 200 mg/l de glutatone reducido a un medio conteniendo ½ MS.

Sin glutatone, el cultivo de oliva ha sido descubierto que se oxida (Rugini, 1986) y el largo de los brotes significativamente reducido. Pero However Cañas y Benbadis (1988) no descubrieron oxidación como un problema en cultivos de callos de oliva, estipulando que IBA fue usado como una auxina en vez de 2,4 D.

Para prevenir oxidación en tejidos de café, Monaco *et al.* (1977) y Söndhal y Sharp (1977^a) fortificó su medio con 10-50 mg/l L-cisteína HCL. Este compuesto fue usado juntos con ácido ascórbico y ácido cítrico, en el medio usado por cultivo de *Musa textilis* (Mante y Tepper, 1983) agregando 20 mg/l cisteína a el medio minimizó la oxidación de explantes de *Dioscorea* (Ng, 1988).

Otros antioxidantes que han sido usado incluyen dithiotheitol (0.4 g/l) que ZIV y Halevy (1983) introdujeron a un medio líquido, y rosmanol (un antioxidante natural aislado de *Salvia canariensis*), que suprimió la oxidación de brotes de *Hypericum canariensis* (Mederos Molina, 1991) (9).

h. Actividad fenolasa y disponibilidad de sustrato

La actividad de oxidación fenólica va a ser menos rápida si hay una reducción en la actividad de enzimas oxidativas o si hay menos sustrato disponible para oxidación.

i. Elementos involucrados en reacciones oxidativas

Uno o dos iones son especialmente asociados con la actividad de enzimas oxidativas: el cobre es esencial para el crecimiento y no puede ser omitido del medio por períodos largos sin efectos perjudiciales. Antes de disminuir el rendimiento de plantas, la deficiencia de cobre obtuvo cambios en las cantidades relativas de compuestos fenólicos liberados por las paredes de las células (Robson *et al.*, 1981). Banerjee y De Langhe (1985) omitieron cobre y zinc de un medio MS cuando cultivando brotes de *Musa*: la oxidación del tejido era un problema particular en este género. Deberg (1983) descubrió que la adición de 6 gr/l Difco Bacto agar introducido 60-100 veces a más que el cobre esta presente en un medio MS.

Este Fe^{3+} también puede ser involucrado en oxidación de fenoles, es surgido por la observación de Barghchi (1986^a) que la omisión de FeSO_4 del medio bajó considerablemente la oxidación de los explantes (9).

-Alterar el pH

Como la actividad de polifenol oxidasa se maximiza de 6.5 y se va disminuyendo al pH más bajo (Ichihashi y Kako, 1977) en plantas aisladas “sujetos difíciles” puede ser mejorados con el uso temporal de más ácido al medio, remojando los explantes en una mezcla de ácido ascórbico y ácido cítrico sirve para exponer éste a agentes de reducción y también para bajar el pH.

i. Medidas prácticas para prevenir oxidación

Solo un método no es efectivo en todas las especies y en algunas plantas el problema puede ser producido de forma más severo. En *Anigozanthos* el extento de decoloración en brotes depende de la variedad. Donde era un problema ninguno de los antioxidantes ácido cítrico, PVP, dithiotheitol, ni cera de albumen de bovino obtuvo una prevención efectiva (McComb y Newton, 1981).

Donde existe dificultad es recomendable que una combinación de tratamientos sea adoptado. Este puede influir la omisión de cobre y hierro en el medio hace que el explante sea establecido; evitando el uso de agar durante este período, eliminar la probabilidad de introducción de cobre al medio, el uso de antioxidantes; el uso de un químico absorbente en soluciones de lavado en el medio. La combinación más popular de las medidas preventivas es el uso de un antioxidante y transferencias frecuentes.

D. Declinación de vigor

a. Declinación de cultivo de brotes

Como el cultivo de brotes de unas plantas declinan, cesan de crecer y proliferar después de un período de tiempo (e.g. estudio de *Prunus persica* x *P. davidiana*- Reeves et al., 1983 y semillas de variedades de *Pseudotsuga menziesii*- Boulay y Francllet, 1986).

En unas ocasiones la declinación es asociada con la producción de sustancias fenólicas y en otros casos puede ser asociada con vitresence, habituación o el fallo de el cultivo de brotes a ser rejuvenecidos. Frecuentemente la causa no ha sido descubierta. En otras ocasiones la declinación ha sido elevadamente observada a una inadecuada aplicación en los compuestos nutricionales, reguladores en el medio. Una pérdida del vigor de brotes de cultivos de *Vitis* fue descubierto a hacer causada por la presencia de 1% de sucrosa en el medio. Los brotes que habían sido deteriorados en calidad en un nivel de sucrosa más alto, proliferaron raíces insuficientemente e inconstantemente (Cheée y Pool ,1988) (9).

b. Declinación durante iniciación

Brotes de nueces demostraron clorosis, abscisión de hojas y una falta de crecimiento durante los primeros meses de cultivo, excepto cuando fueron trasladados frecuentemente y sus bases fueron cortadas. Se necesitaron transferencias frecuentes cada 3 días y el corte de la base más regular a cada 6 días. Después de 3-4 meses hubo un cambio en la morfología de los brotes y se volvieron más tractable en el cultivo (McGranahan *et al.*, 1988).

A veces la degeneración puede ser prevenida por subcultivar antes. Por ejemplo: muchos cultivos de *Eucalyptus ficifolia* crecidos por De Fossard y Bourne (1976) fueron reportados de crecer muy bien por 2 meses y después declinar rápidamente. Luego se subcultivó a un medio fresco y previno este problema. Este tratamiento no siempre es efectivo como en *Persea americana* donde después de 6 meses de subcultivo con traslados mensuales (Lloyd y MxCowm (1981) en medio WPM conteniendo 30 g/l de sucrosa y 0.1 mg/l IBA y 0.3 mg/l BAP, los brotes tenían nudos cortos y cesó la multiplicación de brotes axilares (9).

3.1.6. Reguladores de Crecimiento

Se reconoce actualmente que la mayor parte de la actividad fisiológica de las plantas está regulada por un complejo de sustancias químicas llamadas hormonas (3). Este término fue acuñado por los especialistas en fisiología animal y a partir de allí han surgido confusiones considerables en cuanto a la terminología de las sustancias de crecimiento (31).

Los reguladores de las plantas se definen como compuestos orgánicos que, en pequeñas cantidades, fomentan, inhiben o modifican de alguna manera cualquier proceso fisiológico vegetal.

Las hormonas de las plantas o fitohormonas, son reguladores producidos por las mismas plantas o que, en bajas concentraciones, regulan los procesos fisiológicos de aquellas y por lo general se desplazan de un lugar de producción a un sitio de acción (31).

Thiman (25) definió a las hormonas del crecimiento como “sustancias que siendo producidas en una parte de un organismo son transferidas a otra y en ésta influyen un proceso fisiológico específico”.

En realidad es muy difícil definir el término hormona vegetal con toda precisión. Muchas sustancias del tipo hormonal pueden actuar en su lugar de síntesis, actúan al parecer de modo no específico o actúan a nivel genético como inductor o represor. A menudo se prefiere el término fitoregulator, refiriéndose a compuestos naturales o sintéticos que inducen respuestas en el crecimiento, desarrollo o metabolismo (2).

En micropropagación, principalmente se utilizan citocininas y auxinas como reguladores de crecimiento. Lo más importante es la proporción y cantidad de las mismas.

Funciones:

Para formación de yemas adventicias

Promoción: auxina < citocinina

Inhibición: auxina > citocinina

Para formación de raíces adventicias

Promoción: auxina > citocinina

Inhibición: auxina < citocinina

Para diferenciación de callo

Promoción: auxina > citocinina

Inhibición: auxina < citocinina

3.1.6.1. Auxinas

Se utilizan para promover la división celular y la diferenciación de raíces (29).

Las auxinas promueven la formación de callo y controlan la morfogénesis.

Thiman (25) define a las auxinas como sustancias orgánicas que promueven el crecimiento (aumentando en volumen) a lo largo del eje longitudinal, en concentraciones aproximadas de 10^{-3} molar. Todos los compuestos que tienen actividad auxínica poseen hidrógeno y oxígeno en proporciones y disposiciones diferentes y algunos de ellos contienen, además nitrógeno y cloro; tienen estructuras simples, pero la mayoría son complejos (33).

Los compuestos auxínicos presentan, en general, tres características que imparten a una molécula actividad auxínica; ellos son: radical ácido o fácilmente convertible a ácido, un anillo de uno a cuatro carbonos entre el radical ácido y el anillo.

A. Mecanismo de acción

La acción de las auxinas dependerá de los siguientes aspectos:

- a. Clase de crecimiento o desarrollo requerido.
- b. Niveles naturales de auxina del tejido o sea en forma endógena cuando es disectado.
- c. Capacidad de los tejidos cultivados para sintetizar la auxina en forma natural.
- d. La interacción de las auxinas aplicadas en forma exógena en las auxinas producidas en forma endógena.

Las auxinas promueven el crecimiento de la siguiente forma:

- a. Promueven la liberación de protones y acidifican la pared celular y esta acidificación produce un rompimiento de lípidos en la pared, y al romperse ésta ocurre la entrada de agua y las células aumentan de tamaño, es decir se da una elongación celular.
- b. Hay una estimulación de ARN mensajero, lo cual provoca la síntesis de proteínas para el crecimiento.

Heyn en 1931, citado por Weaver (33) expuso una de las primeras teorías de que la auxina incrementa las plasticidades de las paredes celulares.

Cuando se incrementa la flexibilidad de las paredes, disminuye la presión de éstas alrededor de la célula y la presión de esta turgencia causada por las fuerzas osmóticas en la savia vacuolar, hace que el agua entre a la célula, provocando su expansión (33).

Según Hurtado y Roca (15, 22) las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común, la capacidad de producir un agrandamiento celular; se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos.

Roca (22) refiere que en algunos casos, la adición de una de las auxinas al medio basal puede ser suficiente para iniciar y sostener el crecimiento.

Hurtado (15) menciona que las auxinas participan ampliamente en la organización de los procesos vegetales, incluyendo la regulación de los fenómenos de diferenciación, los cuales son estimulados o inhibidos según la concentración auxínica presente en la célula o estructura vegetal.

Thiman (1969) sugirió que las auxinas pueden funcionar mediante la activación de un tipo de mensajero de RNA, que provoca la síntesis de enzimas específicas (33).

Las auxinas parecen tener dos efectos principales en el proceso de alargamiento celular, aumentan la plasticidad de la pared y participan directa o indirectamente en las reacciones mediante las cuales se depositan nuevas moléculas de celulosa dentro de las paredes; sin embargo, el efecto directo sino como una posible expresión final de un proceso metabólico condicionado o regulado por la hormona.

Hay pruebas abundantes de que las auxinas actúan primariamente como agentes catalíticos o reguladores en alguna fase del metabolismo de los carbohidratos.

B. Efectos Biológicos

Las auxinas desempeñan una función importante en la expansión de las células del tallo y coleóptilos (22). También estimulan la división celular; por ejemplo, frecuentemente fomentan el desarrollo de callos, de los que se desprenden crecimientos similares a raíces.

Las auxinas son muy efectivas en iniciar la formación de raíces de varias especies vegetales.

Esta respuesta fue base de la primera aplicación práctica en agricultura, de sustancias de crecimiento. Las auxinas pueden iniciar la floración (por ejemplo en piña) e inducir al amarre de frutos y su desarrollo en algunas especies, sobre todo en especies con frutos de muchas semillas como son los pigmentos y las cucurbitáceas (33).

La aplicación de auxinas realiza con frecuencia la dominancia apical. Las auxinas estimulan también las actividades cambiales y pueden afectar los fenómenos de abscisión y diferenciación de capas de abscisión; aunque con frecuencia retardan el desarrollo.

Las auxinas actúan en tres fenómenos: aumento en el alargamiento celular; incremento de la respiración y del metabolismo energético; cambio en el tipo de ARN. Las enzimas y proteínas son la base de muchos efectos auxínicos, que son los más notables a primera vista y los más importantes en agricultura (3).

Las auxinas desempeñan un papel importante en la fase de alargamiento en muchos órganos. En general, se considera que el alargamiento celular se produce únicamente en presencia de auxinas y que cuando hay un aumento en la concentración de estas, aumenta también el alargamiento, siempre que no actúen otros factores limitantes. Los límites máximos de concentración para el alargamiento celular varían grandemente con los diferentes tejidos y las concentraciones, relativamente, por lo general, ejercen efectos inhibitorios sobre esta fase del crecimiento (5).

C. Producción y síntesis de auxinas en los vegetales

Las auxinas parecen encontrarse universalmente en los vegetales y su existencia ha sido concretamente demostrada en una amplia gama de especies, más aún, las auxinas no son específicas en su acción. La misma auxina, químicamente hablando, que habitualmente tiene influencia sobre los fenómenos del crecimiento en una especie, también influyen sobre los mismos fenómenos y otros similares en otras. Las auxinas se encuentran en las células vegetales en varias formas diferentes: libres o ligadas o como precursoras (5).

Las formas en que la auxina se encuentra en la planta son: una llamada auxina libre o difusible, que escapa del ápice del talluelo o coleóptilo, cuando estos tejidos son puestos en agar y otra llamada ligada o no difusible que sólo puede extraerse con éter (5).

D. Papel de las auxinas en la formación de raíces

Se debe distinguir claramente entre el efecto de las auxinas sobre la formación de las raíces y su efecto sobre el alargamiento radicular. En general las concentraciones requeridas para el primero de estos procesos son mucho mayores que para el segundo.

Un efecto importante de la auxina, que también implica división de células, es el de provocar la iniciación de raíces laterales y adventicias en la raíz y en el brote. Este efecto tiende a correlacionar el grado de ramificación del sistema radical con el grado de desarrollo de yemas de brote. Más aún, debido al transporte polar hacia abajo, la auxina tiende a acumularse justamente arriba de cualquier sitio dañado en el tallo o en el sistema radical. Esta acumulación estimula la iniciación de raíces adventicias en el lugar dañado, con lo que promueve la regeneración de las raíces perdidas y aumenta las probabilidades de supervivencia de las partes aéreas de una planta después que haya sufrido una lesión abajo o al nivel del suelo (5).

E. Efecto de las Auxinas en el cultivo de Tejidos

- a. Inducción de callo
- b. Inhiben la formación de clorofila
- c. Controlan la morfogénesis
- d. Inducen formación de embriones somáticos
- e. Cultivo de órganos.

a. Ácido Indolbutírico (IBA)

Entre los reguladores de crecimiento que comúnmente se utilizan, uno de los mejores estimulantes del enraizamiento es la auxina IBA. Esta tiene una actividad auxínica débil y los sistemas de enzimas destructores de auxinas lo destruyen en forma relativamente lenta, por lo que resulta muy eficaz como estimulante de raíces. Debido a que el IBA se desplaza muy poco, se retiene muy cerca del sitio de aplicación. Los reguladores de crecimiento que se desplazan con gran facilidad pueden causar efectos indeseables de crecimiento en la planta propagada.

El IBA presenta ventajas sobre otras auxinas sintéticas formadoras de raíces como el NAA, ya que este compuesto es mucho más tóxico que el IBA y deben evitarse las

concentraciones excesivas de NAA por el peligro de provocar daño a la planta, y las dos auxinas anteriores resultan más activas en la inducción de enraizamiento que el IAA, ya que este es más inestable en las plantas y se descompone rápidamente en presencia de la luz solar (33).

El IBA produce sistemas radiculares fuertes y fibrosos, mientras que otros reguladores de crecimiento, como los ácidos fenoxiacéticos, a menudo producen sistemas de raíces atrofiados y matosos, compuestos de raíces dobladas y gruesas (33).

En general el AIB se utiliza en concentraciones que varían entre 0.001 a 10 mg/l, con un punto óptimo de 0.1 a 10 mg/l. En la figura 3 se presenta la fórmula estructural del ácido indolbutírico.

MW: 203.24 g/mol.

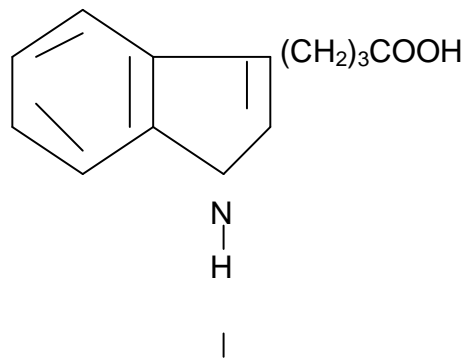


Figura 3. Estructura molecular del ácido indolbutírico

3.1.6.2. Citocininas

Según Bidwell (2) las citocininas son un tipo de hormonas endógenas naturales, que al parecer controlan la germinación de las semillas, probablemente a nivel del sistema de transcripción de DNA-RNA. En algunas plantas estos compuestos pueden anular la acción del ABA (ácido abscísico), en la inhibición de la acción de la giberelina.

La diferenciación de un meristemo en un primordio de raíces es el primer paso en la formación de éstas últimas. Skoog y colaboradores (33) demostraron que el tipo de diferenciación que se produzca dependerá de la proporción entre auxinas y citocininas u otras sustancias como la adenina, que estimulan la división celular. Aún cuando estimulan el

desarrollo de los brotes y se oponen al enraizamiento, se han presentado algunos informes en el sentido de que las bajas concentraciones de citocinina estimulan la iniciación de raíces.

Perea (21) menciona que en cultivos "*in vitro*", las citocininas han permitido grandes progresos especialmente en la división celular y la diferenciación de los explantes.

Hurtado (15) indica que la concentración de citocininas usada varía de 0.03 a 30 mg/l.

A. Mecanismo de Acción

Hurtado, Perea y Roca (15, 21, 22) dan el nombre genérico de citocininas a aquellas sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular o citocinésis.

Las citocininas estimulan la síntesis de proteínas, la proliferación de brotes de un esqueje, y el rompimiento de la dominancia apical. Los sitios de biosíntesis se realizan en los ápices de las raíces.

B. Efectos Biológicos

Se adicionan al medio de cultivo para promover la división celular y la diferenciación de yemas y brotes adventicios de callos y órganos (29).

La inducción "*in vitro*" de órganos por las citocininas está encaminada a la formación de yemas, las cuales son obtenidas con base a una proporción citocinínica alta con respecto a las auxinas. En el cultivo, estas yemas no se inhiben recíprocamente en su desarrollo, debido a que se anula la dominancia apical, hecho que puede extrapolarse a las plantas intactas, pues las citocininas aplicadas exógenamente en general activan el crecimiento de las yemas laterales (15).

Weaver (33) dice que estas hormonas del crecimiento parecen ser activas para estimular la germinación de las semillas. Las citocininas pueden estimular la germinación y superar la latencia por temperaturas elevadas de semillas, como la lechuga.

C. Producción y síntesis de las citocininas naturales en los Vegetales

Las citocininas se encuentran donde existe alta división celular activa (en frutos jóvenes recién formados como membrillos, manzana ciruela, durazno, pera, tomate y semillas en germinación de cebada, lechuga, frijol, sandía y calabaza).

En algunas plantas se han encontrado en los exudados que emanan como por ejemplo tabaco uva y girasol. Las auxinas se producen en las raíces y son translocadas a toda la planta, favoreciendo a fase juvenil.

D. Efecto de las citocininas en el cultivo de tejidos

- Promueven la división celular
- Formación de brotes adventicios
- Promueve la embriogénesis somática
- Aplicación en el cultivo de brotes

a. Bencilaminopurina (BAP)

La citocinina mas utilizada en el mercado es la BAP (6-bencilaminopurina) por su bajo costo. Tiene su punto óptimo en cuanto a concentración más utilizada de 0.1 a 2 mg/l.

Var Overbeck y Lueffler (1962) demostraron que al aplicar 6-bencilaminopurina en lechuga se prolonga la vida en el almacén (mantiene fenilidad). En la figura 4 se presenta la fórmula estructural de la bencilaminopurina.

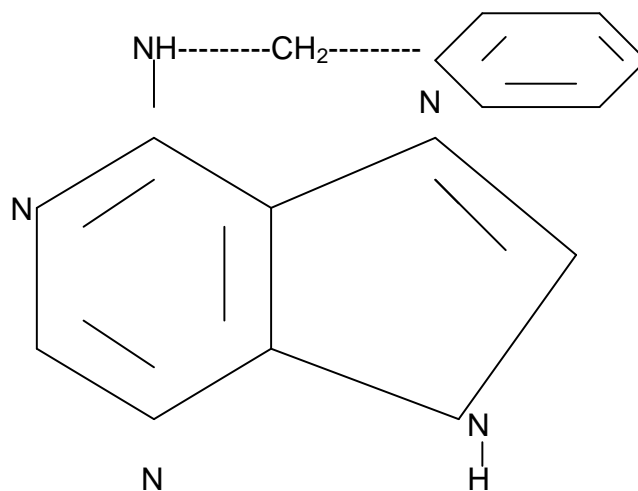


Figura 4. Estructura molecular de bencilaminopurina

MW: 225.26 g/mol.

3.2. MARCO REFERENCIAL

3.2.1. Área Experimental

3.2.1.1. Localización

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, campus central, zona 12. El laboratorio está ubicado en el salón C-16, tercer nivel del edificio T-8 en la ciudad universitaria, zona 12 ciudad de Guatemala. El laboratorio se encuentra implementado con las instalaciones, el equipo y las condiciones de luz, temperatura y aislamiento adecuados para llevar a cabo la investigación.

Según el INSIVUMEH, la ciudad universitaria se localiza geográficamente en las coordenadas 14 grados, 35 minutos y 11 segundos, latitud Norte, y 90 grados 35 minutos y 58 segundos longitud Oeste y una altitud media de 1,502 m.s.n.m.

3.2.2. Material Vegetal

3.2.2.1. Variedades de *Strelitzia reginae*

Esta planta tiene tendencia al polimorfismo, sobre todo en cuanto a la altura, forma y dimensión de las hojas, largo del tallo floral, tamaño de la flor, etc. De tal forma se puede decir que cada individuo reproducido por semilla presenta sus propias características.

La reproducción posterior por división de matas de algunos de ellos, con caracteres muy definidos, ha dado lugar a diversas variedades clasificadas incluso por algunos autores como especies. Entre ellas se cita a las variedades siguientes: *Pumila* (*S. Pumila*), *S. Reginae* variedad *Humilis*, de porte más bajo y flores en general más pálidas; *Flava* (*S. Reginae* vr. *Citrina*) con sépalos de colores muy pálidos; *Ovata*, con hojas ovales, *Lemoinieri* de sépalos de color amarillo oro; *Macrophylla* de hojas grandes; *Prolifera*, que produce dos inflorescencias sobre un mismo escaño floral orientadas opuestamente, aunque no se trata de un carácter fijo y común de todas las flores de la planta, si no que son plantas que tienden a dar flores dobles las cuales, por cierto tienen menos valor comercial e incluye cepas muy floríferas.

3.2.3. Estudios Realizados en Ave de Paraíso *Strelitzia reginae*

En el cuadro 3 se presenta el estudio publicado por ZIV & HALEVY (1983) sobre el Ave de paraíso utilizando varios tipos de explantes.

Cuadro 3 Estudio realizado en Ave de paraíso *Strelitzia reginae* Banks ex Dryand utilizando varios tipos de explantes en la Universidad Hebrea de Jerusalem Israel, 1983 (35).

| Planta | Explante | Resultados | Medio | pH | Sucrosa/ glucosa g/l. | Agar/líquido (gr/l) | Note | Reguladores de crecimiento (mg/l) | Autores |
|------------------|----------------------|--|----------------------|-----|-----------------------------|------------------------|------|---|---------------------|
| <i>S.reginae</i> | Tallo | Tratamiento antioxidante | ZIV Y HALEVY (1983) | 4.5 | 0 | líquido | Y | Ninguno | ZIV Y HALEVY (1983) |
| <i>S.reginae</i> | Nudo de tallo | Pretratado con antioxidante Proliferación de brote y callo Enraizado | PIERIK et. Al (1974) | 5.8 | 30 | Agar | Y | (1)NAA+(2.5)IBA+(0.5)2,4D+(5)KIN | ZIV Y HALEVY (1983) |
| <i>S.reginae</i> | Agrupamiento de nudo | Crecimiento de brote | PIERIK et. Al (1974) | 5.8 | 30 | Líquido(sup) | Y | (5)IBA+(1)BAP | ZIV Y HALEVY (1983) |
| <i>S.reginae</i> | Agrupamiento de nudo | 4 horas de agitación antes del enraizamiento | Acuoso | | | | | | ZIV Y HALEVY (1983) |

Compuesto antioxidante: ditioteitol

FUENTE: GEORGE, E.F. 1987.

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

4.1.1. Establecer un procedimiento para contrarrestar la contaminación por bacterias y la inhibición del crecimiento por oxidación de fenoles en la etapa de inicio de la micro-propagación de *Strelitiza reginae*.

4.2. ESPECÍFICOS

4.2.1. Determinar un tratamiento que ayude a contrarrestar la contaminación por bacterias en el tejido inicial de *Strelitzia reginae*.

4.2.2. Determinar el antioxidante y la dosis que produzca el mayor porcentaje de supervivencia.

4.2.3 Determinar el antioxidante y la dosis que produzca el mayor porcentaje de explantes con buen desarrollo.

4.2.4. Determinar la combinación de bencilaminopurina y ácido indolbutírico que produzca brotación múltiple y enraizamiento.

5. HIPÓTESIS

- 5.1. El tratamiento con antibióticos a las plantas madres y en laboratorio contrarresta la contaminación por bacterias en el tejido inicial de *Strelitzia reginae*.
- 5.2. Existe un antioxidante a una dosis que produce mayor porcentaje de sobrevivencia.
- 5.3. Existe un antioxidante a una dosis que produce mayor porcentaje de explantes con buen desarrollo.
- 5.4. Existe una combinación de bencilaminopurina y ácido indolbutírico que produzca brotación múltiple y enraizamiento.

6. METODOLOGÍA

6.1. Localización del experimento

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala campus central.

6.2. Medio de Cultivo

El medio nutritivo artificial que se utilizó fue el MS (Murashige & Skoog) (1962).

6.3. Manejo del experimento

6.3.1. Preparación de la solución madre

6.3.1.1. Materiales y equipo

Reactivos químicos

Agua destilada

Recipientes de vidrio

Boleta de cálculos

Probeta

Balón para aforar

Papel para pesar

Soluciones de KOH o NaOH 1N y HCL 1 N

Alcohol etílico 96%

Balanza electrónica

Refrigeradora

Calculadora

A. Procedimiento

1. Se seleccionó la concentración y volumen que va a utilizar determinada solución concentrada.

Macronutrientes "A" 10X (1 litro)

Macronutrientes "B" 10X (1 litro)

Micronutrientes "A" 1000X (250 ml)

Micronutrientes "B" 100 X (250 ml)

Solución Fe 100 X (250 ml)

Solución Vitaminas 1000 X (100 ml)

Mio-inositol 100X (250 ml)

2. Se realizaron los cálculos necesarios de la cantidad del componente o componentes de la solución concentrada, se anotó la información en la boleta correspondiente y se procedió a pesar con precisión cada uno de los siguientes reactivos químicos y juntarlos en un beaker.

| Reactivo | cantidad (mg /l) |
|---------------------------------------|-------------------------|
| 1. Macronutrientes "A" | |
| NH ₄ NO ₃ | 1650 |
| KNO ₃ | 1900 |
| .CaCl ₂ .2H ₂ O | 440 |
| KH ₂ PO ₄ | 170 |
| 2. Macronutrientes "B" | |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 370 |
| 3. Solución Fe | |
| Na ₂ -EDTA | 37.3 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 27.8 |

4. Micronutrientes “B”

| | |
|--------------------------------------|------|
| H ₃ BO ₃ | 6.20 |
| MnSO ₄ .4H ₂ O | 22.3 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8.60 |

5. Micronutrientes “A”

| | |
|--|-------|
| KI | 8.3 |
| Na ₂ .MoO ₄ .2H ₂ O | 0.25 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.025 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.025 |

6. Mio-inositol 100**7. Solución Vitaminas**

| | |
|------------------|-----|
| Glicina | 2.0 |
| Acido nicotínico | 0.5 |
| Piridoxina | 0.5 |
| Tiamina | 0.5 |

3. Los microelementos, macroelementos, vitaminas y quelatos de hierro son completamente solubles en agua. En el caso de estos componentes se agregó el 30-40% del volumen requerido de agua destilada (para disolver el producto) en el beaker.

4. Se agregaron los componentes y se mantuvo en agitación, hasta su completa disolución, añadir las que tienen posibilidad de precipitar.

5. Se utilizaron frascos de vidrio según el volumen preparado, vertiendo el contenido de la solución concentrada y ajustando hasta el volumen deseado con agua destilada. Los recipientes de los cuales se vertieron las soluciones se lavaron 2 veces con agua destilada, añadiendo esta agua a la probeta con que se mide el volumen, esto para que no quedaran remanentes en el recipiente.

6. Cada solución concentrada se guardó en envases separados y asegurándose que quedaran bien ajustada la tapa, previamente rotulados anotando la siguiente:

- a. tipo de solución concentrada y concentración
- b. cantidad de solución concentrada
- c. fecha de elaboración y vencimiento
- d. cantidad a agregar por litro de medio
- e. iniciales de la persona que la preparó.

Los envases conteniendo las soluciones concentradas se almacenaron en la refrigeradora a una temperatura entre 2 – 6 grados centígrados.

6.3.2. Preparación del medio de cultivo M & S. (1 litro)

6.3.2.1. Materiales y equipo

Sales de macroelementos (soluciones concentradas)

Sales de microelementos

Quelatos de hierro

Vitaminas

Fuente de Carbono

Antioxidantes

Agar

Agua destilada

Soluciones 1N de HCL y NaOH

Probeta

Balón para aforar

Pipetas

Beakers

Plancha con agitador magnético

Balanza electrónica

Potenciómetro

Horno microondas

Autoclave

Boleta de cálculos

Para la elaboración de este medio se tuvo que preparar la cantidad requerida para posteriormente distribuirlos en los frascos de vidrio de cultivo. Cada frasco contenía 20 ml del medio.

A. Procedimiento

1. Se depositó un volumen de agua destilada en un beaker, apropiado.
2. Se colocó dentro del recipiente una barra magnética y se puso sobre el agitador-calentador magnético.
3. Se adicionó el volumen necesario de cada solución madre y en el siguiente orden:

Macronutrientes "A" 50 ml.

Macronutrientes "B" 50 ml

Se agregó el 50% de los macronutrientes como una medida de evitar la oxidación del material (dosis recomendada).

Micronutrientes "A" 1 ml

Micronutrientes "B" 10 ml

Solución Fe 10 ml

Vitaminas 1 ml

Mio-inositol 10 ml

4. Se agregó la cantidad necesaria de sacarosa 3% (30000 mg) La agitación es importante para lograr una adecuada homogeneidad.
5. Se agregaron los respectivos antioxidantes (carbón activado, L-cisteína, ácido cítrico a sus diferentes niveles).
6. Se transfirió a una probeta y agregó agua destilada hasta completar exactamente el volumen requerido.
7. Se reguló el pH entre 5.7-5.8 agregando una solución de HCL al 1 normal, y KOH o NaOH al 1 normal, según sea necesario reducir o aumentar la acidez, con cada gota, de las soluciones reguladoras, revolver mediante agitador magnético o barra de vidrio.

Este ajuste del pH se realizó debido a que la actividad de la fenolización del explante disminuye cuando este se encuentra por debajo de 6.5, ya que la tendencia de disolución de los componentes del medio para oxidarse o reducirse depende del potencial de oxidación-reducción de la solución.

8. Se agregó la cantidad necesaria de agentes gelificantes (agar) y se calentó antes de verter para disolver el gelificante al 0.8% (8,000 mg).
9. Después de disolver completamente el agente gelificante mediante calentamiento y agitación, en horno microondas durante 8 a 10 minutos/l. se distribuyeron en frascos el volumen necesario (20 ml) y sellarlos con papel aluminio, previamente rotulados con la siguiente información:
Código del medio
Fecha de elaboración
Tratamiento
Repetición
10. Se esterilizó en autoclave a 120 grados centígrados, por un tiempo de 15 a 25 minutos a una presión de 15 lbs. por pulgada cuadrada.
11. Se colocaron los recipientes con medio estéril en lugar adecuado a temperatura ambiente hasta que solidificara y enfriara. Finalmente se almacenaron en el refrigerador hasta su uso.

6.4. Metodología uso de la cámara de flujo laminar

1. Se lavan las manos y antebrazos con agua y jabón antibacterial.
2. Se enciende la cámara media hora antes de trabajar.
3. Se prepara un volumen de 0.5 l. Con alcohol al 70% atomizando y limpiando el área interna con papel toalla, además se roció y limpió todo tipo de material instrumental y cristalería antes de introducirlos a la cámara.

6.5. Metodología de disección y siembra del tejido inicial (ápices) e inicio del cultivo *in vitro*

1. Se sumergió la pinza y bisturí (hoja y mango) en alcohol 70% para luego flamearlo con la ayuda del mechero por lo menos 2 veces y se dejó enfriar.
2. Se procedió a eliminar todo el tejido envoltorio de los explantes (vainas foliares y hojas) reduciendo el explante a un tamaño de 7 mm en una caja de petrí estéril conteniendo ácido cítrico 150 mg/l.
3. Se quitó la tapa de aluminio de los medios de cultivo con una pinza, procediendo a sembrar el respectivo explante, flameando con movimiento circular la boca del recipiente y la tapa que une a esta, para así sellar y colocar papel parafilm la unión entre estas, para transferirlas al cuarto de crecimiento.

6.6. Etapa de establecimiento o iniciación del cultivo aséptico

6.6.1. Fase Control de la contaminación por bacterias del tejido inicial

6.6.1.1. Tratamiento fitosanitario de las plantas madres

Se aplicó fungicida-bactericida sistémico (sulfato de cobre pentahidratado inorgánico 24%) y antibiótico bacteriostático (estreptomina, terramicina oxytetraciclina 16.5% WP) en forma alternada a razón de 2 cc/l y 1gr/l respectivamente, además adherente a una dosis de 1cc/l. Para que hubiera mayor absorción del fungicida-bactericida sistémico (24%) se bajó el pH a 4.5 aplicándole 0.1 cc/l de ácido fosfórico H_3PO_4 .

Estas aplicaciones se realizaron cada 6 días para evitar contaminación en los medios de cultivo por organismos endógenos.

A las 6 semanas de haber iniciado la primera aplicación de los fungicidas-bactericidas, se trasladó el material experimental de la Finca Primavera ubicada en San Miguel Dueñas al umbráculo de la Facultad de Agronomía ubicado en el CEDA, se sembraron y continuaron las aplicaciones cada 6 días.

6.6.1.2. Selección de los materiales y desinfección en laboratorio

1. Se seleccionó las plantas vigorosas y que no mostraron signos y síntomas de enfermedades.
2. Se realizó un lavado del material con agua corriendo y jabón neutral durante 10 minutos, para eliminar impurezas provenientes del campo, cortando y eliminando las hojas de los explantes y

reduciéndolo a un tamaño de 20 centímetros, éstos se sumergieron en una solución de benomyl 0.15% y antibiótico bacteriostático (estreptomina, terramicina, oxytetraciclina) 0.1%, durante 24 horas a 2 grados centígrados.

3. Luego se eliminó todo el tejido envolvente de éstos, reduciendo el explante a 4 cms. y se sumergieron en una solución de 0.1% de antibiótico bacteriostático (estreptomina, terramicina y oxytetraciclina), 0.15% benomyl, 0.4% de ácido cítrico, 0.2% de ácido ascórbico, 500 mg/l, de cloranfenicol y 500mg/l de tetraciclina, durante 1 hora, en movimiento con barra magnética (4).

4. Se realizó dos lavados con agua estéril durante 5 minutos cada uno.

5. Se sumergieron los explantes en alcohol al 70% durante 2 minutos, luego de transcurridos se introdujeron en la cámara de flujo laminar y sumergiéndolos en una solución de cloro al 2% durante 5 minutos.

6. Se realizó 3 lavados con agua estéril durante 5 minutos cada uno para eliminar los residuos de cloro.

7. Los explantes luego de ser lavados se introdujeron en una solución estéril de ácido cítrico a una concentración de 150 mg/l.

A. Variable respuesta

a. Porcentaje de explantes contaminados

6.6.2. Fase de Control de la oxidación en el tejido inicial

Se utilizó un diseño completamente al azar en el cual se evaluaron 10 tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento, los cuales sumaron 100 unidades experimentales. Los aspectos que se evaluaron en esta fase fue el de minimizar los niveles de oxidación del explante y la observación del crecimiento de los explantes en la fase de iniciación. En el cuadro 4 se presenta la distribución de los tratamientos con respectivos antioxidantes.

Cuadro 4 Distribución de Tratamientos con antioxidantes.

| TRATAMIENTO | NOMENCLATURA | NIVELES % |
|-------------|--------------|-----------|
| 1 | TESTIGO | 0 |
| 2 | A1 | 0.01% |
| 3 | A2 | 0.015% |
| 4 | A3 | 0.02% |
| 5 | B1 | 0.5% |
| 6 | B2 | 1% |
| 7 | B3 | 1.5% |
| 8 | C1 | 0.01% |
| 9 | C2 | 0.015% |
| 10 | C3 | 0.02% |

A = ácido cítrico

B = carbón activado

C = L-cisteína

6.6.2.1. Condiciones ambientales de incubación

Los materiales que se sembraron en el medio de cultivo se trasladaron a un cuarto de crecimiento 10 días en oscuridad. Luego de transcurrido este tiempo se incubaron a temperatura de 24 C, una intensidad lumínica estimada de 3,000 lux, proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

6.6.2.2. Unidad Experimental

La unidad experimental estuvo constituida por un tubo de ensayo de 15 cm. de largo y 2.2 cm de diámetro, al cual se le agregó 20 ml del medio de cultivo, sembrándole un explante.

A. Variables respuesta

Como indicadores del efecto de las antioxidantes a evaluar se determinaron las siguientes variables respuesta:

- a. Porcentaje de explantes oxidados 7, 15, 21, 30 días.
- b. Porcentaje de sobrevivencia 7, 15, 21 y 30 días.
- c. Porcentaje de explantes con buen desarrollo.

d. Tiempo de oxidación

6.7. Etapas multiplicación y enraizamiento de vitroplantas

Se evaluaron 7 tratamientos y 3 repeticiones por tratamiento, los cuales sumaron 21 unidades experimentales. El número de repeticiones estuvo en función de los tratamientos y disponibilidad del material vegetal. Para esta fase fueron cultivados explantes en el medio nutritivo MS, al cual se le agregó el mejor antioxidante, su dosis ya que se estableció que los explantes producían fenoles en el medio de cultivo en pequeñas cantidades y se le agregaron además diferentes combinaciones de auxina (IBA) y citocinina (BAP), las cuales promueven brotación y enraizamiento. El solvente que se utilizó para la disolución de estos reguladores de crecimiento fue NaOH 1N. Una vez adaptado el material al medio de cultivo en la fase de establecimiento que presentaba sobrevivencia se utilizó en estas etapas. En el cuadro 5 se presentan los diferentes niveles de ácido indolbutírico y bencilaminopurina en mg/l.

Cuadro 5 Distribución de los tratamientos utilizados para brotación y enraizamiento.

| Tratamiento | IBA (mg/l) | BAP(mg/l) |
|-------------|------------|-----------|
| 1 | 0 | 0 |
| 2 | 1 | 3 |
| 3 | 1 | 5 |
| 4 | 3 | 3 |
| 5 | 3 | 5 |
| 6 | 5 | 3 |
| 7 | 5 | 5 |

6.7.1. Condiciones ambientales de incubación

Los materiales que se sembraron en el medio de cultivo se trasladaron a un cuarto de crecimiento. Luego se incubaron a temperatura de 24 C, una intensidad lumínica de 3,000 lux, proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

6.7.2. Unidad Experimental

La unidad experimental estuvo constituida por un recipiente de que mide 12 cm de largo y 6 cm de diámetro, al cual se le agregó 50 cc del medio de cultivo, sembrándole un explante.

6.8. Análisis de la Información

Debido a las características de la investigación, se realizó en análisis descriptivo ya que no fue factible aplicar estadísticos paramétricos solo porcentajes de las variables respuesta, detallando de forma precisa cada uno de los eventos realizados para poder cumplir con los objetivos de la investigación. Ya que no se pretendió medir las diferencias entre tratamientos evaluados, si no solo conocer la respuesta de la especie a los diferentes antioxidantes y a la aplicación de antibióticos para determinar si promueven su establecimiento para la propagación *in vitro*.

7. RESULTADOS

7.1. Etapa de establecimiento o iniciación del cultivo aséptico

7.1.1. Fase control de contaminación del tejido inicial

7.1.1.1. Porcentaje de explantes contaminados

Cuando se empezó la ejecución de esta fase se sabía que la contaminación era un problema en la etapa de establecimiento o iniciación del cultivo aséptico de la especie. Se realizaron varias pruebas para contrarrestar este fenómeno.

En el primer ensayo que se realizó, se utilizó la metodología para la desinfección de algunas especies como banano y plátano, la cual fue de la siguiente manera:

Selección de plantas vigorosas sin signos ni síntomas de enfermedades, lavado del material con agua corriendo y jabón neutral durante 10 minutos, la reducción del tamaño de la planta eliminando hojas superficiales hasta que quedara de un tamaño de 20 centímetros y se sumergieron en solución de benomyl 0.15%, se lavaron los explantes repetidamente y se agitó el recipiente con las manos, enseguida se cubrió el recipiente con una tapadera, y se ingresaron al laboratorio, se redujo el explante a 4 cms y se sumergieron en alcohol etílico 70% por 2 minutos, lavando con agua estéril una vez y luego en una solución de cloro comercial 2% más Tween-20 al 1% durante 10 minutos. Inmediatamente se lavaron 3 veces con agua estéril para eliminar los residuos de cloro. (5 minutos cada lavado) Luego se extrajo el explante propiamente dicho dentro de la campana de flujo laminar.

Al quinto día se observó que la contaminación fue de un 100%, detectándose que era por bacterias y hongos.

En el segundo ensayo se realizó la metodología que se mencionó anteriormente, con la diferencia que se le agregó al medio de cultivo 25 mg/l de benomyl, 5 mg/l de cloranfenicol (filtrado) y 5 mg/l de oxytetraciclina (filtrado) (35), metodología que propone ZIV & HALEVY. La contaminación se manifestó a los 15 días obteniéndose un porcentaje de 90% por bacterias, metodología que no funcionó para esta especie.

Amador, sugirió la protección de las plantas contra la lluvia y el control fitosanitario dentro de invernadero para contrarrestar este problema, por lo que se comenzaron las aplicaciones de antibióticos y bactericidas fungicidas sistémicos durante un período de 30 días. Se realizó un tercer ensayo preliminar utilizando la metodología y desinfectantes del primer ensayo. El

resultado fue que hubo un 85% de contaminación, porcentaje no significativo debido al poco tiempo de aspersión a las plantas madres.

Se recomendó ampliar la aplicación de antibióticos y bactericidas fungicidas sistémicos por un período de 2 meses y utilizar una solución con antibióticos en laboratorio, y desinfectantes que se utilizaron en ápices de caña de azúcar con resultados significativos, metodología que se validó ya que se observó que hubo 4% de contaminación porcentaje bastante aceptable que incrementa la precisión de los resultados ya que se contó con mayor cantidad de material disponible para evaluar.

De este porcentaje todos fueron contaminados por bacteria. Aumentando el período de aplicación de antibióticos se reduce significativamente la contaminación en los medios de cultivo.

La contaminación por bacterias como lo menciona Sandoval (23) se caracterizó por que en la base del explante se observó un halo blanco detectándose al quinto día de haber inoculado los explantes.

La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incubaron los cultivos conformaron un ambiente propicio para la proliferación de bacterias compitiendo con el explante, las cuales destruyen el medio de cultivo y lo modifican. Evitar contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tomar en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su ulterior incubación y manipulación (22).

Los explantes pueden llevar contaminadores en su superficie (microorganismos exógenos) o en su interior (microorganismos endógenos) o en ambas partes. Los que lleva sobre su superficie se pueden eliminar mediante la desinfección, pero es permitido aclarar que la concentración de la solución desinfectante y el tiempo de exposición típicamente dependen del material a ser tratado; los que se encuentran dentro del tejido son difíciles de eliminar. Los explantes fueron extraídos de plantas previamente tratadas. Explantes provenientes del campo vienen completamente infectados de microorganismos. Los antibióticos fueron efectivos al rociar a las plantas madres y la desinfección en laboratorio ya que se observó un nivel bajo de contaminación. Cosme (2001) utilizó la técnica de tratamiento fitosanitario con antibiótico bacteriostático (terramicina, estreptomina, oxytetraciclina) a plantas madres en zarzaparrilla *Smilax spinosa* y la desinfección a nivel de laboratorio para contrarrestar la contaminación por bacterias obteniendo resultados significativos, técnica que se valida en el cultivo de Ave de paraíso. Makmilan (2000) quien trabajó en caña *Sacharum officinarum* utilizó una solución de 0.1% de antibiótico bacteriostático (terramicina, estreptomina y oxytetraciclina),

0.15% de benomyl, 500 mg/l de cloranfenicol y 500 mg/l de tetraciclina en agitación con barra magnética para contrarrestar la contaminación por bacterias en el medio de cultivo, metodología que también se valida para este cultivo. Dado que la desinfección y/o esterilización del tejido influye no solo en la contaminación o no del mismo sino en su capacidad de regenerarse en el medio de cultivo, la técnica de desinfección utilizada debe estar orientada a lograr un mínimo de contaminación y oxidación prematura del explante por efectos de plasmólisis (22). En la figura 5 se presenta los porcentajes de explantes contaminados y explantes no contaminados.

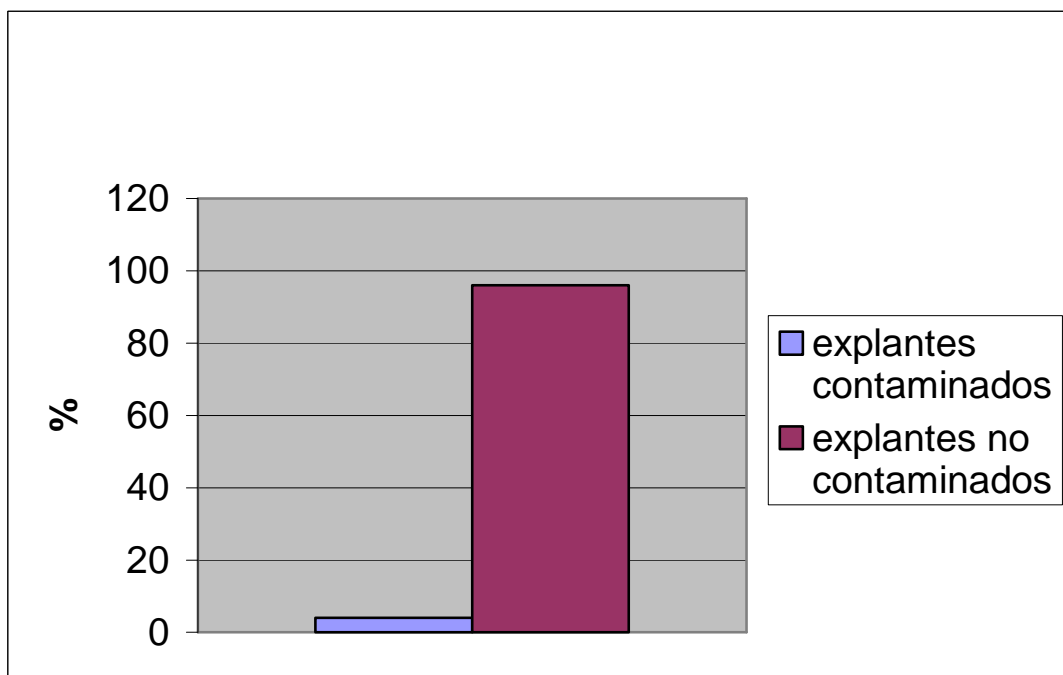


Figura 5. Porcentaje de explantes contaminados.

7.1. 2. Fase control de oxidación

7.1. 2.1. Porcentaje de explantes oxidados

En primer término se observó que el problema era la contaminación, pero se observó claramente que también era la oxidación, ya que al inocularse se contaminaba y oxidaba. Luego de haber superado la fase de contaminación era necesario controlar la oxidación. Se consultaron referencias bibliográficas sobre varias especies de la familia de las musáceas (misma familia del ave del paraíso) y poder controlar la oxidación, por lo que fue necesario evaluar las cantidades investigadas. Se realizó un ensayo agregándole 50 mg/l de cisteína, (utilizado en *Musa sp* evaluado por Jarret *et al.* 1985) observándose el 100% de oxidación a los 15 días, estudio que no coincidió con el presente. Al observar este comportamiento se realizó otro ensayo utilizando niveles evaluados en *Musa textilis* (Mante y Tepper 1,983) que suplementaron su medio en primera etapa con 200 mg/l de cisteína y 150 mg/l de ácido cítrico pero la oxidación siempre fue severa y continuó manifestándose, por lo que tampoco coincidió. Se evaluó también el carbón activado a una concentración de 0.1%, por lo que no hubo respuesta significativa. Es por ello que se evaluaron niveles más altos de L-cisteína, ácido cítrico y carbón activado y observar su comportamiento en cuanto a oxidación. Para el caso del testigo (sin antioxidante) la oxidación fue de un 100% a los 21 días de haber inoculado los explantes. Se observó este comportamiento ya que no se le aplicó ningún antioxidante que evitara el proceso de liberación de compuestos fenólicos, tratamiento que mostró la peor respuesta. Para este tratamiento el medio de cultivo se tornó de un color negro oscuro y se difundió grandemente en este. Los resultados obtenidos por Garton y Moses (1986) con vástagos y brotes laterales de *Alnus oregona* exudaron sustancias sin la aplicación de antioxidantes, lo cual significó la pérdida de 4/5 (80%) de los explantes durante las primeras 10 semanas, es decir que se requiere de un tratamiento antioxidante para evitar este problema, similarmente para el Ave del paraíso.

Similarmente fue el caso para ácido cítrico 0.01% que el porcentaje de oxidación fue del 100% pero la liberación de compuestos fenólicos sobre el agar fue un poco más lenta ya que se observó que el total de los explantes se oxidaron completamente hasta los 30 días. El tratamiento con ácido cítrico 0.015% mantuvo un 90% de oxidación y ácido cítrico 0.02% un 80% oxidándose a los 30 días.

Para el caso de los tratamientos con ácido cítrico el medio de cultivo se tornó de un color café claro, posteriormente de un color rojizo. Los exudados provenientes de la oxidación se difundieron en todo el medio de cultivo.

El tratamiento con carbón activado 0.5% mostró un 30% de oxidación, y los tratamientos con carbón activado 1% y 1.5% se comportaron de igual manera con un 20% de oxidación o sea que fue un 10% menor que el tratamiento con carbón activado 0.5%, es decir que los niveles mas altos de carbón activado disminuyen la oxidación, dejando de ser un problema a los 15 días de haber sido inoculado los explantes absorbiendo los compuestos fenólicos que el explante liberó.

Gupta (1986) descubrió que la adición de solamente 25 mg/l de ácido ascórbico en filtro estéril fue más efectiva que el ácido cítrico o carbón activado en prevención de oxidación fenólica de explantes de banano y plátano. Pero la adición de carbón activado previene el ennegrecimiento como en el caso de *Musa balbisiana*.

Bon *et al.* Asumió que el carbón activado previno la acumulación de polifenoles en un medio porque detuvo su síntesis en brotes de *Sequoiadendron giganteum* durante 6 semanas de elongación *in vitro*, pero no fue así en explantes de *Pinus sylvestris*, por lo que fue tóxico.

El tratamiento con L-cisteína 0.01% se comportó igual que el testigo y ácido cítrico 0.01% con un 100% de oxidación. Estos tratamientos no mostraron ser eficientes para el control de oscurecimiento oxidativo ya que se mostraron abajo de los demás tratamientos. Se observó además que los niveles mas altos de L-cisteína promueven más rápidamente la oxidación ya que en el tratamiento con L-cisteína 0.015% y L-cisteína 0.02% se oxidaron completamente a los 21 días y el tratamiento con L-cisteína 0.01% se oxidaron completamente a los 30 días liberando compuestos fenólicos sobre el medio de cultivo tornándose de un color negro azulado.

Mante y Tepper (1,983) agregaron 20 mg/l de cisteína al medio y minimizó la oxidación de explantes de *Dioscorea*. Monaco *et al.* (1977) y Sondhal y Sharp (1977) previno la oxidación en tejidos de café fortificando su medio con 10-50 mg/l de L-cisteína HCL, investigaciones que también no coinciden con la presente. El grado de ennegrecimiento e inhibición del crecimiento que ocurre en cultivos es muy dependiente del genotipo, además existen diferencias entre especies del mismo género y cultivos dentro de especies y hasta variedades. Al realizar el análisis se manifiesta que los dos mejores tratamientos fueron carbón activado 1% y 1.5%, por obtener los menores porcentajes de oxidación (20%). Estos dos tratamientos permitieron el mejor establecimiento de los explantes en la etapa de iniciación. Se observó claramente que en

la primera semana los porcentajes fueron muchos mas altos que en las próximas semanas, lo cual se comprueba que la oxidación ocurre mayormente después del corte del explante.

El proceso de oxidación provocó la liberación de fenoles en el medio de cultivo después de la excisión, lo cual inhibió el crecimiento y por lo tanto la muerte del explante.

La oxidación del explante comenzó cuando liberó compuestos en el medio de cultivo luego que estos se difundieron y quedaron atrapados en el agar, después se oxidó la base para luego oxidarse totalmente degradando el tejido y la posterior muerte. Se tomó como explante oxidado aquel que presentaba una coloración oscura y necrosis totalmente. El exudado se difundió sobre el medio de cultivo que eventualmente se volvieron necróticos y murieron. La oxidación del explante siendo severa no permitió que estos absorbieran los nutrientes necesarios para el crecimiento y adaptación posterior.

La oxidación se manifestó inicialmente en el corte del explante y cuando estos fueron introducidos dentro del medio de cultivo se difundió inhibiendo el crecimiento. Frecuentemente la oxidación continuó y se difundió sobre el explante, necrosándolo y provocando la muerte del tejido. El daño provocado resultó de la producción de un exudado de compuestos fenólicos, que se inició principalmente en el corte del explante, esto fue muy grave durante la fase inicial del cultivo. En la figura 6 se presentan los porcentajes de oxidación acumulada en función del tiempo en Ave del paraíso.

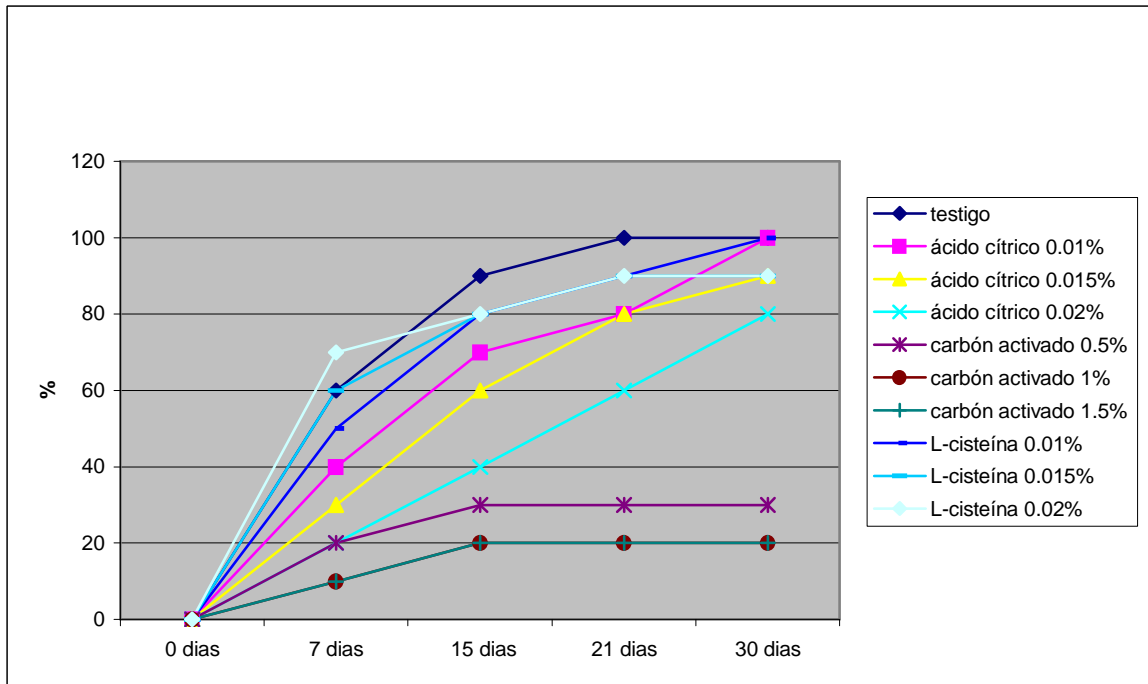


Figura 6. Porcentaje de oxidación acumulada por efecto de los tratamientos en función del tiempo.

7.1. 2.2. Porcentaje de sobrevivencia de los explantes

Se tomó como sobrevivencia aquel explante que no presentaba el fenómeno de oxidación, y que se mantuvo de un color amarillo claro. En el caso del tratamiento 1 Testigo (sin antioxidante) mostró un 0% de sobrevivencia a los 15 días.

El tratamiento con ácido cítrico 0.01% obtuvo un 0% de sobrevivencia a los 21 días.

Los tratamientos con ácido cítrico 0.015% y 0.02% obtuvieron un 10% de sobrevivencia a los 30 días después de la siembra comportándose mejor que los dos primeros tratamientos, es decir que se requieren niveles más altos de ácido cítrico para poder aumentar la sobrevivencia.

Los tratamientos con carbón activado mostraron ser mejores ya que el tratamiento con carbón activado 0.5% mostró un 70% de explantes vivos, un 80% para carbón activado 1% y 70% para carbón activado 1.5%, es decir que se comportó de igual manera el tratamiento con carbón activado 0.5% y carbón activado 1.5%. Para los tratamientos con carbón activado no se realizaron transferencias frecuentes, es decir no podría constituir un proceso caro para una situación comercial. Esto no coincide con trabajos realizados en *Vitis rotundifolia* ya que generalmente son necesarias transferencias frecuentes de 1 a 7 días y en el caso de mora a intervalos semanales para que exista sobrevivencia. El tratamiento con carbón activado 1% mostró el mayor porcentaje de sobrevivencia, ya que obtuvo un 10% más que los tratamientos con carbón activado 0.5% y 1.5%.

La sobrevivencia se mantuvo constante con estos tratamientos a partir de los 15 días. El tratamiento con L-cisteína 0.01% mostró 0% de sobrevivencia, a los 21 días. Para los tratamientos con L-cisteína 0.015% y 0.02% se comportó de igual manera que el testigo, ya que obtuvieron un 0% de sobrevivencia a los 15 días. Estos dos niveles más altos muestran que la sobrevivencia disminuye mucho más rápidamente siendo los tratamientos menos eficientes. En la figura 7 y cuadro 6 se presentan los diferentes porcentajes de sobrevivencia por efecto de los diferentes tratamientos evaluados.

ZIV & HALEVY (35) utilizaron como antioxidante ditioteitol (0.4g/l) agregado a un medio líquido y obtuvo un 95% de sobrevivencia, porcentaje arriba del mejor tratamiento (carbón activado 1% con un 80%).

Significa que la oxidación es inversamente proporcional a la sobrevivencia, ya que niveles altos de oxidación, presenta niveles bajos de sobrevivencia, es decir que la causa de la muerte de los explantes es la oxidación.

Los explantes vivos comenzaron a tornarse de un color verde brillante a los 42 días de haber iniciado la fase de control de oxidación, es decir a los 12 días después de haber tomado la última lectura.

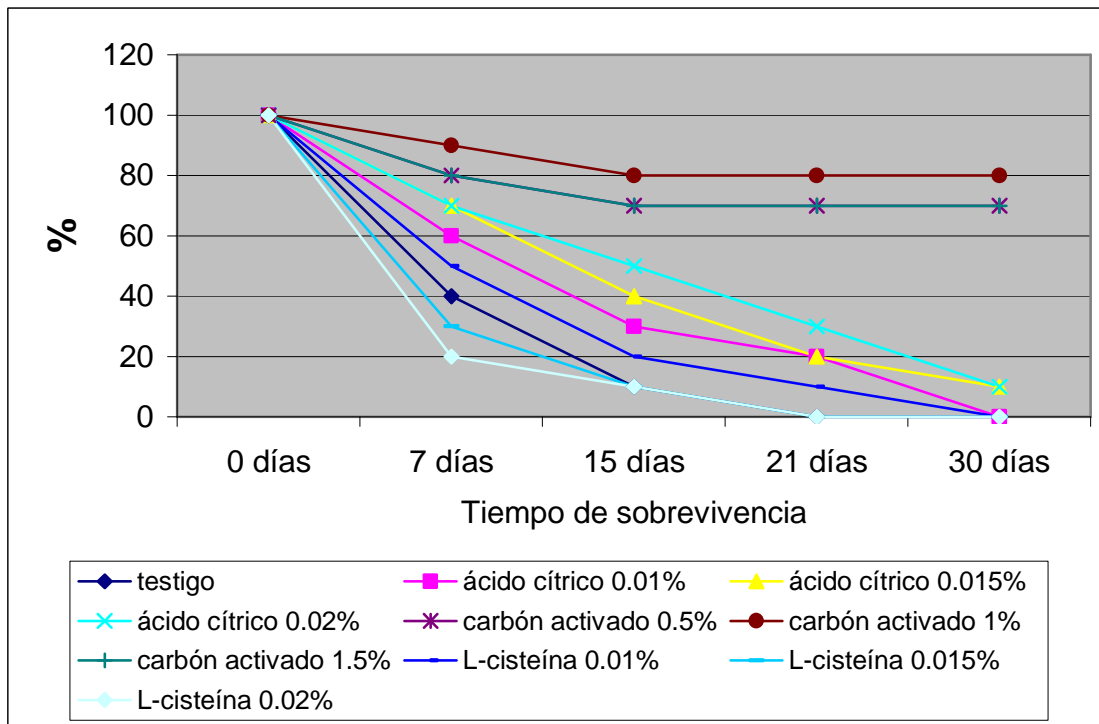


Figura 7. Porcentaje de sobrevivencia por efecto de los tratamientos en función del tiempo.

Cuadro 6 Resultados de la oxidación, sobrevivencia y contaminación en porcentaje en Ave del Paraíso *Strelitzia reginae*.

| Trat. | Niveles% | O X I D A C I O N | | | | | S O B R E V I V E N C I A | | | | | % Contaminación |
|-------|-----------|-------------------|---------|---------|---------|-------------------|---------------------------|---------|---------|---------|-----------------------|-----------------|
| | | 7 días | 15 días | 21 días | 30 días | % Total oxidación | 7 días | 15 días | 21 días | 30 días | % Total sobrevivencia | |
| 1 | TESTIGO | 60 | 30 | 10 | 0 | 100 | 40 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | AC 0.01 | 40 | 30 | 10 | 20 | 100 | 60 | 30 | 20 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | AC 0.015 | 30 | 30 | 20 | 10 | 90 | 70 | 40 | 20 | 10 | 10 | 0 |
| 4 | AC 0.02 | 20 | 20 | 20 | 20 | 80 | 70 | 50 | 30 | 10 | 10 | 10 |
| 5 | CA 0.5 | 20 | 10 | 0 | 0 | 30 | 80 | 70 | 70 | 70 | 70 | 0 |
| 6 | CA 1 | 10 | 10 | 0 | 0 | 20 | 90 | 80 | 80 | 80 | 80 | 0 |
| 7 | CA 1.5 | 10 | 10 | 0 | 0 | 20 | 80 | 70 | 70 | 70 | 70 | 10 |
| 8 | L-C 0.01 | 50 | 30 | 10 | 10 | 100 | 50 | 20 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | L-C 0.015 | 60 | 20 | 10 | 0 | 90 | 30 | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| 10 | L-C 0.02 | 70 | 10 | 10 | 0 | 90 | 20 | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 |

7.1.2.3. Porcentaje de explantes con buen desarrollo

Para la recopilación de datos de estas variables se comenzó a observar después de los 42 días, ya que es en ese momento cuando los explantes comenzaron a tornarse de color verde brillante, se dice que en este período los explantes permanecieron en estado de letargo. Se observó durante 45 días el comportamiento de estos, por lo que hubo diferencias entre tratamientos, los explantes con buen desarrollo y escaso desarrollo los primeros se manifestaron por un crecimiento de tallo y desarrollo de hojas, una coloración verde oscura, presentando dominancia apical, pero este proceso fue demasiado lento, los de escaso desarrollo se manifestaron con ensanchamiento en la parte basal, y una coloración verde. Para establecer esta diferencia se tomó la longitud de cada explante, tomándose estos datos a los 90 días de haber establecido esta fase.

En el tratamiento con ácido cítrico 0.015% se obtuvo 10% de explantes con escaso desarrollo con una longitud de 1.0 cms, comportándose de igual manera para ácido cítrico 0.02%.

Esto pudo influir en que los medios de cultivo contenían alrededor del explante compuestos fenólicos lo cual inhibió el crecimiento de éstos. Esto tiene relación con las especies *Juglans nigra* y *Euphorbia lathyrus* ya que los compuestos de estas son inhibitorios en el medio de cultivo.

En el tratamiento con carbón activado 0.5 % se obtuvo 20% de explantes con escaso desarrollo con una longitud promedio de 1.4 cms y 50% de explantes con buen desarrollo con una longitud promedio de 4.5 cms los cuales se manifestaron a los 69 días.

Para el caso de carbón activado 1% a los 71 días de haber realizado el ensayo de esta fase, comenzaron a formar hojas y a presentar una dominancia apical. Se obtuvo un 60% de explantes con buen desarrollo con una longitud promedio de 4.5 cms, comportándose de igual manera a el tratamiento anterior y un 20% de explantes con escaso desarrollo con una longitud promedio de 1.3 cms, 0.1 cms menor que el tratamiento anterior.

Para el caso de carbón activado 1.5% presentó un 40 % de explantes con buen desarrollo con una longitud promedio de 4.0 cms, longitud menor que los dos primeros tratamientos con carbón activado 0.5% y 1% y un 30% de explantes con escaso desarrollo con una longitud promedio de 1.3 cms similarmente al anterior, manifestándose a los 75 días. Para este tratamiento se observa que si comparamos el tratamiento con carbón activado 1% y 0.5%, posee menor porcentaje en cuanto a explantes de buen desarrollo y una longitud menor, y un porcentaje mayor para explantes con escaso desarrollo, posiblemente porque el carbón activado a altas concentraciones produce absorción de sustancias químicas hormonales, vitaminas y otros compuestos del medio por lo que el crecimiento fue inhibido y además mientras mayor es la concentración de carbón activado la proliferación de hojas y crecimiento del explante fue mucho mas tarde.

El carbón activado influyó en la longitud de los explantes elongados ya que al observar los tres tratamientos con este antioxidante se dice que carbón activado 0.5% y 1% fueron los que obtuvieron explantes más grandes (buen desarrollo) y el tratamiento con carbón activado 1.5% el menor, inhibiendo nutrientes del medio de cultivo. En los cuadros 7, 8 y figuras 8 y 9 se presentan los diferentes porcentajes de explantes con buen desarrollo y explantes con escaso desarrollo, así como sus respectivas longitudes expresadas en centímetros.

Cuadro 7

Porcentaje de explantes con buen desarrollo y escaso desarrollo en función de los tratamientos en Ave del Paraíso *Strelitzia reginae*.

| Tratamiento | Niveles % | Explantes con buen desarrollo | % | Explantes con escaso Desarrollo | % |
|-------------|-----------|-------------------------------|----|---------------------------------|----|
| 1 | Testigo | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | AC 0.01 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | AC 0.015 | 0 | 0 | 1 | 10 |
| 4 | AC 0.02 | 0 | 0 | 1 | 10 |
| 5 | CA 0.5 | 5 | 50 | 2 | 20 |
| 6 | CA 1 | 7 | 60 | 1 | 20 |
| 7 | CA 1.5 | 4 | 40 | 3 | 30 |
| 8 | L-C 0.01 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | L-C 0.015 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | L-C 0.02 | 0 | 0 | 0 | 0 |

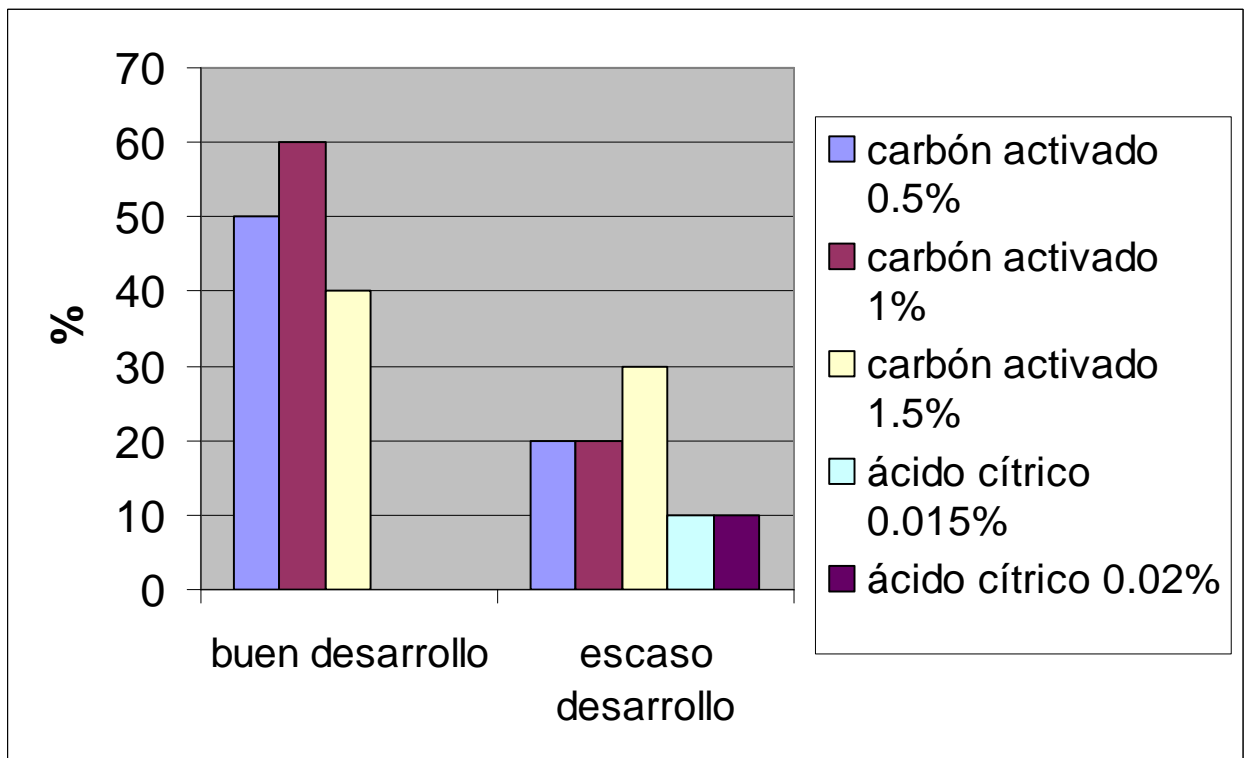


Figura 8. Porcentaje de explantes con buen desarrollo y escaso desarrollo por efecto de los tratamientos evaluados en Ave del paraíso *Strelitzia reginae*.

Cuadro 8

Longitud promedio de en centímetros de explantes con buen desarrollo y escaso desarrollo en Ave del paraíso *Strelitzia reginae* por efecto de los tratamientos.

| Tratamiento | Explantes buen desarrollo (cm) | Explantes escaso desarrollo (cm) |
|----------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Acido cítrico 0.015% | 0 | 1.0 |
| Acido cítrico 0.02% | 0 | 1.0 |
| Carbón activado 0.5% | 4.5 | 1.4 |
| Carbón activado 1% | 4.5 | 1.3 |
| Carbón activado 1.5% | 4.0 | 1.3 |

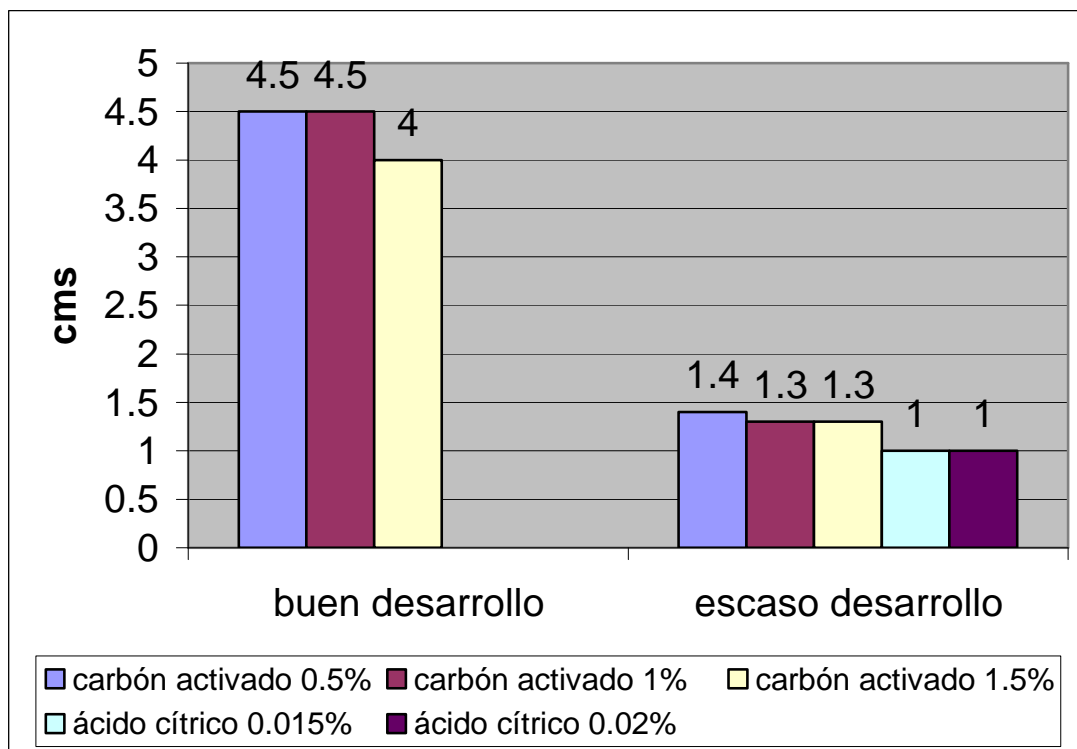


Figura 9. Longitud promedio en centímetros de explantes de buen desarrollo y escaso desarrollo en Ave del paraíso por efecto de los tratamientos.

7.1. 2.4. Tiempo de oxidación

En el inicio de la investigación se consideró en primer término la manera de evitar el fenómeno de oxidación adicionando los siguientes antioxidantes: ácido cítrico, L-cisteína y carbón activado. En el medio de cultivo donde se adicionó ácido cítrico se observó que la oxidación comenzó a hacerse visible a las 6 horas de haberse inoculado. En el medio de cultivo donde se adicionó L- cisteína fue mucho más severo, ya que se aceleró este proceso observándose a 50 minutos de inocularse, en el caso del testigo, a los 30 minutos de haber sido inoculado. Con el carbón activado se observó que la oxidación fue más lenta y se pudo estimar que ocurrió a las 48 horas, es decir que el carbón activado inhibe los compuestos fenólicos mucho más rápido que los demás antioxidantes, evitando así que se oxiden los explantes de una forma acelerada.

Los compuestos fenólicos se expelieron alrededor en la base del explante producto de la degradación del tejido y en los casos más severos en todo el medio, como fue el caso del testigo y L-cisteína.

ZIV & HALEVY (35) observaron que la oxidación de los explantes utilizando como antioxidante ditioteitol (0.4 g/l) comenzaba justo después del corte, se reducía a las 12 y 24 horas y se aumentaba, desde las 48 horas y 52 horas, para luego mantenerse constante.

7.2. Etapas de multiplicación y enraizamiento de vitroplantas

A los explantes que presentaron sobrevivencia durante la etapa de establecimiento se utilizaron en esta etapa a los cuales se les agregaron diferentes combinaciones de niveles de IBA y BAP, con el fin de inducir a la brotación y enraizamiento, pero no se obtuvo ninguna respuesta a las 8 semanas de haber establecido esta etapa. Posiblemente fue porque las concentraciones evaluadas no fueron las idóneas para que dicha respuesta se manifestara en la especie en estudio. Las concentraciones evaluadas en el presente estudio se consideraron debido a algunas referencias bibliográficas en las que se ha obtenido algún tipo de respuesta satisfactoria.

Los niveles óptimos que se han utilizado en cultivo de tejidos son: BAP entre 0.1 a 2 mg/l e IBA entre 0.1 a 5 mg/l. El único estudio que se ha publicado propuesto por ZIV y HALEVY (1983) sobre *Strelitzia reginae Banks ex Dryand* los cuales utilizaron como explante nudo de tallo y el medio pierik líquido y ditioteitol como antioxidante, agregaron 2.5 mg/l de IBA para proliferar

brote y enraizar callos, y niveles de 5 mg/l de IBA y 1 mg/l de BAP para inducir al crecimiento de brotes, estudio que no coincide con el presente. Además estudios en banano *Musa sp* (especie del misma familia con Ave del Paraíso) han utilizado 5 mg/l de BAP y 1 mg/l de IBA, provocando proliferación de yemas y raíces a los 50 días y 15 días respectivamente, investigación que también no coincide. El factor más idóneo que no produjo respuesta fue el que el carbón activado es un agente inhibitorio de reguladores de crecimiento, por lo que se deben elevar los niveles de auxina (27).

En esta fase no se mostró oxidación ni muerte de los explantes, es decir que estos reguladores de crecimiento no inducen a la oxidación, pero siempre continuó la liberación de compuestos fenólicos, los cuales fueron absorbidos por el carbón activado.

8. CONCLUSIONES

1. La aplicación de antibióticos y fungicidas sistémicos (estreptomina, terramicina oxytetraciclina y sulfato de cobre) fueron efectivos al tratar a las plantas madres previo a su uso en el cultivo *in vitro* y la desinfección en laboratorio, permitiendo el 96% de establecimiento de los explantes en los medios de cultivo.
2. El tratamiento que reportó el mayor porcentaje de sobrevivencia fue carbón activado 1% con un 80%.
3. El tratamiento que produjo el mayor porcentaje de explantes con buen desarrollo fue carbón activado 1% con una longitud promedio de 4.5 cms a los 90 días.
4. Con la metodología propuesta y el mejor tratamiento para controlar la oxidación en los explantes (carbón activado 1%) no se realizaron transferencias frecuentes para evitar la oxidación, lo que significa que para un proceso comercial será una forma viable de reducir los costos y una manera eficiente de micropropagarlos.
5. En el ensayo realizado con la combinación de una citocinina (bencilaminopurina BAP) y una auxina (ácido indolbutírico IBA) no se obtuvieron datos significativos ya que se estableció que el carbón activado además de controlar la oxidación, inhibe la respuesta de los tejidos absorbiendo sustancias químicas, hormonales, vitaminas y otros compuestos del medio, que favorece el crecimiento de los tejidos.

9. RECOMENDACIONES

1. Los resultados obtenidos para el control de bacterias sugieren aplicar antibióticos y fungicidas sistémicos (estreptomina, terramicina, oxytetraciclina y sulfato de cobre) a las plantas madres por un período de 2 meses y a nivel de laboratorio para evitar la contaminación en los medios de cultivo.
2. Los resultados obtenidos para el control de la oxidación de los tejidos por fenoles sugieren aplicar carbón activado 1% al medio de cultivo ya que no se realizaron transferencias y produjo el menor porcentaje de oxidación, mayor porcentaje de sobrevivencia y explantes con buen desarrollo.
3. Realizar otras investigaciones en Ave del Paraíso *Strelitzia reginae* a nivel *in vitro* para establecer metodologías para la brotación múltiple y enraizamiento de los mismos que faciliten la multiplicación masiva de la especie.

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. BAILEY LIBERTY, H. 1949. Manual of cultivated plants. New York, USA , MacMillan. 1,116 p.
2. BIDWELL, R.G.S. 1983. Fisiología vegetal. Trad. Guadalupe Jerónimo Cano y Manuel Rojas Garcidueñas. México, A.G.T. Editor. 784 p.
3. COLL BARCELO, J. *et.al.* 1980. Fisiología vegetal. Madrid, España, Pirámide. 750 p.
4. CRUZ SIC, M. 2000. Informe de servicios realizados en el centro guatemalteco de Investigación y capacitación de la caña de azúcar. Cengicaña. Informe EPSA. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 42 p.
5. DEVLIN, R.M. 1980. Fisiología vegetal. Trad. Xavier Lilimona Pages. 3 ed. España, Omega. 517 p.
6. DODDS, H.; ROBERTS, L. 1986. Experiments in plant tissue culture. 2 ed. USA, Cambridge University Press. 232 p.
7. DUCREUX, G.; ROSSIGNOL, L.; ROSSIGNOL, M. 1986. La patata. La Recherche (Francia) no. 57:409-423.
8. EVANS, D. *et al* 1983. Hadbook of plant and cell culture. USA, MacMillan Publishing. v. 3-5.
9. GEORGE, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. 2 ed. USA, Editorial Exegetics limited 1,574 p.
10. GUATEMALA. BANCO DE GUATEMALA. 2000. Exportaciones realizadas por país, enero diciembre 2000. Guatemala, Departamento de Estadísticas Económicas. p. 50.
11. GUDIEL, V. M. 1987. Manual de floricultura Superb. Guatemala, Productos Superb. 257 p.
12. GRAY, D.; HUGHES, J.C. 1978. Tuber quality In:The potato crop. New York, USA, Halisted Press. p. 504-544.
13. HAAGER, J. 1991. Plantas del interior. 3 ed. Madrid, España, Susaeta. p. 19.
14. HARTMAN, H.T.; KESTER, D.E. 1989. Propagación de plantas; principios y prácticas. Trad. Antonio Marino Ambrosio. México, CECSA. 760 p.
15. HURTADO, M.D.; MERINO, M.E. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 232 p.
16. JANICK, J.; MOORE, J.N. 1975. Advances in fruit breeding; subtropical fruits. Indiana, USA, Purdue University Press. 210 p.

17. KRIKORIAN, A.D. 1991. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed. William Roca y Luis A. Mroginski. Colombia, CIAT. p. 41-69.
18. LIZARRAGA, R. *et al.* 1987. Cultivo de tejidos para la eliminación de patógenos. Guía de Investigación CIP (Perú) no. 3:1-23.
19. LOSOYA SALDAÑA, H. 1990. Fundamento teórico-práctico del cultivo de tejidos vegetales. Trad. por Cadmo H. Rosell y Victor M. Villalobos. Roma, Italia, FAO. 112 p.
20. PELCZAR, M.; REID, D.; CHAN, E.C.S. 1982. Microbiología. 4 ed. México, McGraw-Hill. 826 p.
21. PEREA, D.; NAVARRO, A.W. 1988. Técnicas in vitro para la producción y mejoramiento de plantas. Costa Rica, Universidad Nacional de Heredia. 105 p.
22. ROCA, W.; MROGINSKI, L.A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT. 970 p.
23. SANDOVAL, J.A. 1991. Micropropagación de plátano y banano (*Musa* AAB, AAA) en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 24 p.
24. SHIDE RENTSCHLER, L.; SHMIEDICHE, P.E. 1984. El cultivo de tejidos su pasado presente y futuro. CIP Circular (Perú) 12(1):1-12.
25. THIMAN, K.U. 1963. Plant growth substances: past, present and future. Ann Rev. Plant Physiol (Inglaterra) 14:1-8.
26. THORPE, T.A. 1987. Plant tissue culture and applications in agriculture. New York, Academic Press. 177 p.
27. TORRES, A.C. ; TEIXEIRA FERREIRA, A.; CAMPOS DE ARAUJO, M. 1986. Medio de cultivo. Brasilia, Brasil, Centro Brasileiro Argentino de Biotecnología. p.21.
28. UN JARDÍN dentro de casa. 1983. México, Selecciones del Readers Digest. 480 p.
29. USUI, K.U.; OKABE, K. 1986. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, ICTA y Japan Overseas Cooperación Volunteers. 166 p.
30. VETRHEL, L. 1984. Introduction to *in vitro* propagation. USA, Publishing Group. 86 p.
31. VILLALOBOS, V.M. Fundamento teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Chapingo, México, Centro de Genética, Laboratorio de Biotecnología. 160 p.

32. VULSTEKE, D.R. 1989. Shot-tip culture for de propagation, conservation and exchange of *musa* germoplasm. Roma, Internacional Board for Plant Genetic Resources. 56 p.
33. WEAVER, R.J. 1985. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. Trad. Agustín Contin. México, Trillas. 622 p.
34. YURRITA ELGUETA, R. 1978. Cultivo comercial de flores. Guatemala, Disel. 126 p.
35. ZIV, M.; HALEVY, A.H. 1983. Control de oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae*. Hortscience (USA). 18(4):434-436.

12 .APÉNDICE.

Cuadro A

Modelo de etiqueta Soluciones Madre.

| | |
|--|--|
| Tipo de Solución Concentrada y Concentración | |
| Cantidad de Solución Concentrada | |
| Fecha de Elaboración y Vencimiento | |
| Cantidad a agregar por litro de medio | |
| Iniciales de la persona que la preparo | |

Cuadro B

Modelo de etiqueta Medio de cultivo

| | |
|----------------------|--|
| Código del medio | |
| Fecha de Elaboración | |
| Tratamiento | |
| Repetición | |

Diseño Completamente al azar

| R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | R6 | R7 | R8 | R9 | R10 |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| 3 | 6 | 5 | 1 | 7 | 8 | 9 | 2 | 4 | 10 |
| 2 | 5 | 8 | 7 | 6 | 10 | 3 | 1 | 9 | 4 |
| 9 | 10 | 4 | 2 | 1 | 6 | 5 | 3 | 7 | 8 |
| 7 | 8 | 6 | 4 | 10 | 5 | 2 | 9 | 1 | 3 |
| 1 | 3 | 7 | 5 | 4 | 9 | 10 | 8 | 2 | 6 |
| 10 | 4 | 1 | 3 | 2 | 7 | 8 | 5 | 8 | 9 |
| 6 | 1 | 2 | 9 | 3 | 4 | 7 | 10 | 6 | 5 |
| 5 | 7 | 3 | 8 | 9 | 2 | 4 | 6 | 10 | 1 |
| 8 | 2 | 9 | 10 | 5 | 1 | 6 | 4 | 3 | 7 |
| 4 | 9 | 10 | 6 | 8 | 3 | 1 | 7 | 5 | 2 |

