

Instituto Tecnológico de Costa Rica
Escuela de Biología
Centro de Investigación en Biotecnología
Informe de Proyecto de Investigación

Micropropagación de especies forestales.
Terminalia amazonia y validación y afinamiento del
protocolo desarrollado para *Vochysia* spp.

Dra. Ana Abdelnour Esquivel

Con la colaboración de
Ing. Laura Sánchez e Ing. Karol Jiménez

2012

Tabla de Contenido

TÍTULO DEL PROYECTO.....	4
PALABRAS CLAVE.....	4
INTRODUCCIÓN.....	4
OBJETIVOS.....	7
<i>TERMINALIA AMAZÓNICA</i>	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
Material procedente del invernadero.....	8
Brotación.....	10
Material recolectado en campo.....	11
Brotación.....	13
Multiplicación.....	15
Introducción de semillas.....	15
RESULTADOS.....	16
Material procedente del invernadero.....	16
Material recolectado en campo.....	21
Brotación.....	23
Multiplicación.....	25
Introducción de semillas.....	25
RESULTADOS.....	26
Introducción <i>in vitro</i>	26
Brotación.....	27
Multiplicación.....	28
Introducción de semillas.....	28
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	32
<i>VOCHYSIA GUATEMALENSIS</i>	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34

Introducción de material <i>in vitro</i>	34
Desinfección <i>in vitro</i>	36
Brotación.	36
Elongación.....	38
Evaluación del Sistema de Inmersión Temporal (RITA).....	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
Introducción del material <i>in vitro</i>	46
Desinfección <i>in vitro</i>	49
Brotación.....	50
Elongación.....	52
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	54
AGRADECIENTOS.....	55
BIBIOGRAFÍA.....	56

Título del proyecto: Micropropagación de especies forestales. *Terminalia amazonia* y validación y afinamiento del protocolo desarrollado para *Vochysia* spp.

Autores: Dra. Ana Abdelnour Esquivel. Coordinadora

Colaboradoras: Ing. Laura Sánchez
Ing. Karol Jiménez

RESUMEN

En Costa Rica varios programas de reforestación y de aprovechamiento del recurso forestal han dirigido los esfuerzos al estudio del comportamiento en plantación de algunas especies nativas, entre ellas las *vochysias* (*V. guatemalensis*) y el amarillón (*Terminalia amazonia*). La multiplicación *in vitro* permitiría la creación de plantaciones forestales, que a su vez, disminuirían la presión existente sobre el bosque natural, el funcionamiento de los procesos ecológicos, paisajísticos, de protección de suelos, agua y acumulación de carbono. El objetivo de esta investigación fue contribuir con los programas de conservación, mejoramiento genético, por medio del desarrollo de investigación conducente al establecimiento de protocolos de propagación masiva *in vitro*. Se evaluaron varios procedimientos de desinfección, antioxidantes, medios de cultivo y reguladores de crecimiento para el establecimiento aséptico de estacas de invernadero y campo y semillas. Se evaluaron combinaciones de medios de cultivo y reguladores de crecimiento para la inducción de la brotación, elongación y multiplicación del material. Se determinó que el uso de carbón activado o PVPP en el medio de cultivo y la exclusión del Fe permitieron controlar el grado de oxidación de los explantes. Tanto el medio de cultivo MS como WPM enriquecidos con BA (15 y 30 mg/l para *T. amazonia*) y AG₃ (hasta 100mg/l para *V. guatemalensis*), indujeron la brotación de los explantes, su elongación y la multiplicación de ambas especies. Con la utilización del sistema de inmersión temporal (RITA) en *V. guatemalensis* se obtuvieron brotes más numerosos y vigorosos, que al ser transferidos a medio semisólido fueron capaces de elongarse. Se recomienda continuar la investigación en el uso de medios líquidos con el sistema de inmersión temporal y evaluar nuevos desinfectantes recientemente disponibles en el mercado.

Palabras clave: Micropropagación, desinfección, especies maderables, cultivo *in vitro*, *Vochysia* spp, *Terminalia amazonia*, botarrama, roble coral.

INTRODUCCIÓN

Costa Rica es un país con gran diversidad tanto de flora como de fauna. Según la lista oficial de especies publicada por el Sistema de Información de Recursos Forestales (SIREFOR), nuestro país cuenta con más de 1500 especies forestales registradas y

debidamente localizadas por zonas geográficas (SINAC-Gerencia de Manejo de Recursos Naturales, 2012).

En la actualidad, las especies forestales presentan una problemática a nivel nacional, principalmente debido a la tala excesiva, al uso de semillas de mala calidad, de características poco deseables, de muy poco valor genético cuyas características se transmiten de generación en generación (Oficina Nacional de Semillas, 2003). Bien entendido el hecho de que el aprovechamiento desmedido del recurso forestal, especialmente de las especies consideradas endémicas, raras o amenazadas, ha resultado en la disminución de individuos, que en muchos casos eran catalogados como excelentes árboles reproductores y que de seguir el mismo camino, se perdería el potencial de utilización de éstos recursos en forma comercial y ecológica, ya que durante la explotación comercial tradicional se seleccionan los mejores árboles para el aprovechamiento, dejando individuos poco vigorosos en el campo y a medida que transcurre el tiempo se provoca que la especie decline en su capacidad reproductiva y en la alteración del medio en que se desarrolla, lo cual repercute directamente en el aprovechamiento futuro de estas especies, ya que la disponibilidad de material genético de calidad para programas de mejoramiento sería escaso o inexistente (Quesada, 2004).

Por esta razón, se han estudiado técnicas biotecnológicas que permitan la multiplicación clonal del material, con el fin de conservar las características de interés de las especies forestales y que reduzca los tiempos necesarios para obtener árboles adultos y productivos.

La multiplicación *in vitro* de especies forestales posee gran relevancia porque permitirían la creación de plantaciones forestales, que a su vez, disminuirían la presión existente sobre el bosque natural; además de contribuir significativamente en el funcionamiento de los procesos ecológicos, paisajísticos, de protección de suelos, agua y acumulación de carbono (Alice *et al.* 2004).

En Costa Rica, varios programas de reforestación y de aprovechamiento del recurso forestal para el inicio de plantaciones comerciales han dirigido los esfuerzos al estudio del comportamiento en plantación de algunas especies nativas que se han mostrado muy promisorias para este fin. Entre estas especies se destacan las *Vochysias* (*V. guatemalensis* y *V. ferruginea*) y la *Terminalia amazonia*, que presentan gran capacidad de adaptación, rápido crecimiento y las características de su madera son

comparables a las que presentan otras especies valiosas pero introducidas, como la teca (*Tectona grandis*). Por los problemas arriba citados y de acuerdo con técnicos de FUNDECOR, estas especies presentan pocos individuos sobresalientes, además la semilla es escasa y no es producto del cruce controlado, por lo que no se podría asegurar el mantenimiento de las características élite de algunos de los individuos seleccionados.

FUNDECOR (Fundación de Cordillera Volcánica Central), es una organización no gubernamental (ONG) establecida para promover la conservación y el uso sostenible de los recursos naturales de la Cordillera Volcánica Central utilizando estrategias de mercado, conocimiento científico y tecnologías de punta para mejorar las políticas públicas de conservación. Han encontrado aliados para el cumplimiento de sus funciones en varias organizaciones e instituciones estatales, entre las cuales destacan las universidades públicas, de ahí su acercamiento al ITCR, buscando investigadores con experiencia en el campo del estudio y manejo de recursos genéticos. Especialmente buscando experiencia en propagación vegetativa masiva, modalidad de propagación que cumplen las técnicas del cultivo *in vitro*, en particular la micropropagación.

Durante los últimos años FUNDECOR ha colaborado activamente con el CIB para el desarrollo de metodologías para la micropropagación de botarrama (*Vochysia*) y otras especies relacionadas de este género. A partir de esta colaboración se han obtenido resultados acerca del manejo y la selección del mejor material para el establecimiento *in vitro* de las especies: desinfección, brotación y elongación. Por lo cual estos resultados deben ser validados. A la vez, los resultados han motivado a las partes involucradas a continuar con otras especies, como es el caso de *Terminalia amazonia*.

Como respuesta a ello, el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, ha unido esfuerzos con la Fundación para el Desarrollo de la Cordillera Volcánica Central (FUNDECOR), con el fin de establecer un protocolo de cultivo *in vitro* de plantas élite de especies como *Vochysia guatemalensis* y *Terminalia amazonia*, para su conservación y multiplicación a gran escala, manteniendo las características deseables observadas en campo.

Objetivo general

Contribuir con los programas de conservación, mejoramiento genético y establecimiento de plantaciones comerciales de primera calidad, por medio del desarrollo de protocolos de propagación masiva *in vitro* de especies forestales nativas.

Objetivos específicos

Desarrollar investigación conducente a promocionar la elongación y multiplicación de *Terminalia amazonia*. Se evaluará el efecto de varios medios de cultivo, reguladores de crecimiento y otras sustancias relacionadas para tratar de inducir la respuesta deseada.

Desarrollar investigación conducente a inducir la elongación y multiplicación de *Vochysia* spp. Se evaluará el efecto de varios medios de cultivo, reguladores de crecimiento y otras sustancias relacionadas para tratar de inducir la respuesta deseada.

Terminalia amazonia

Materiales y métodos

Material procedente de invernadero

En este documento se trató de resumir los principales procedimientos empleados. Debido a que no siempre se contó con el material de campo, se mantuvo en invernadero un número de plantas que permitieran realizar inicialmente la investigación. Se detallan las principales pruebas realizadas y sus resultados, a continuación sólo se abarcarán los principales resultados.

El objetivo principal de este trabajo fue determinar las condiciones necesarias para el establecimiento *in vitro* de *T. amazonia*, siendo una parte del proyecto de micropropagación de especies forestales desarrollado en el CIB con el apoyo inicial de FUNDECOR y MICIT-CONICIT durante los años 2010 y 2011 y durante esta ampliación (2012) apoyada por FUNDECOR.

Se trabajó con plantas de campo y de invernadero, a estas últimas se les establecieron las condiciones sanitarias típicas de las plantas donadoras mantenidas en invernadero (aspersiones bisemanales con fungicidas y bactericidas, fertilizantes y riego diario). Posteriormente se evaluó el efecto de dos agentes desinfectantes, hipoclorito de sodio y cloruro de mercurio, en diferentes concentraciones y tiempos de exposición (Cuadro 1). Además, se utilizaron una serie de antioxidantes, como ácido cítrico, ácido ascórbico, L-cisteína, PVPP, carbón activado y DTT, también se empleó un tratamiento frío a 4°C con el objetivo de inhibir la fenolización de los explantes (Cuadro 2).

Cuadro 1: Soluciones desinfectantes evaluadas para el establecimiento aséptico *in vitro* de estacas de *T. amazonia* proveniente de invernadero.

Agente desinfectante	Concentración (%)	Tiempo de exposición (min)
NaOCl	1,5	10
		15
	3	10 15
	3 + 1,5	5 + 10
HgCl ₂	0,001	2,5
		5
	0,002	2,5
		5
	0,005	7
		10
	0,006	7
		10
	0,025	10
	0,03	10
0,035	10	
0,045	10	
0,05	7	
0,1	7	

Los antioxidantes evaluados se presentan a continuación.

Cuadro 2: Tratamientos antioxidantes utilizados para el establecimiento *in vitro* de estacas de *Terminalia amazonia* mantenidas en invernadero.

Tratamiento	Agente antioxidante	Concentración	Tiempo
1	Choque térmico a 4°C	----	2 h
2	PVPP	0.01%	10 min
3	PVPP	0.05%	10 min
4	PVPP	0.1%	10 min
5	Cisteína	0.01%	10 min
6	Cisteína	0.05%	10 min
7	Cisteína	0.1%	10 min
8	Ácido cítrico + ácido ascórbico	0.01%	10 min
9	Ácido cítrico + ácido ascórbico	0.5%	10 min
10	Ácido cítrico + ácido ascórbico	0.1%	10 min
11	DTT*	0.01%	10 min
12	DTT*	0.05%	10 min
13	DTT*	0.1%	10 min
14	Carbón activado (medio de cultivo semisólido)	500mg/l	----
15	Carbón activado (medio de cultivo semisólido)	250mg/l	----
16	PVP (medio de cultivo semisólido)	5g/l	----
17	PVP (medio de cultivo semisólido)	10g/l	----
18	PVP (medio de cultivo líquido)	5g/l	----
19	PVP (medio de cultivo líquido)	10g/l	----
20	Control	----	----

*DTT: dithiothreitol

Brotación

En cuanto a la brotación de esta especie se establecieron dos ensayos. El medio de cultivo evaluado en fue el mismo utilizado en la introducción: MS sin Cobre, sin Hierro, con un pH de 5.1, complementado con 500 mg/l de Carbón activado, y con distintos reguladores.

Las citocininas evaluadas para la brotación de microestacas de *T. amazonia* y sus concentraciones, se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Citocininas evaluadas para la inducción de la brotación *in vitro* en microestacas de *Terminalia amazonia*.

Regulador	Concentración (mg/l)
BAP	10
	20
	30
KIN	10
	20
	30
2 ip	10
	20
	30
TDZ	0,1
	0,25
	0,5

Material recolectado en campo

Cuando se inició el estudio con material recolectado en el campo, prácticamente se tuvo que iniciar la investigación en establecimiento *in vitro* de estos materiales. Se realizaron un total de 17 pruebas de desinfección que permitieran introducir material de *Terminalia amazonia* libre de contaminación a condiciones *in vitro*. Dichos protocolos incluyeron el uso de hipoclorito de sodio, alcohol, cloruro de mercurio, peróxido de hidrógeno, agroquímicos, entre otros agentes desinfectantes, diversas combinaciones entre ellos y variaciones en los tiempos de exposición a los mismos. Los detalles de cada tratamiento se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Tratamientos empleados para la desinfección de estacas de *Terminalia amazonia* provenientes de campo, previo a su introducción al cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Sembrados	Descripción de la desinfección		
		Desinfectante	Concentración	Tiempo
TT0	43	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	15 min
		Alcohol	70%	2 min
		HgCl ₂	0,10%	16 min
TT1	20	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	15 min
		Zerotolerance 80%	80% v/v	3 min
		HgCl ₂	0,10%	16 min
TT2	16	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	15 min
		Zerotolerance	80% v/v	3 min
		Alcohol	70%	10 min
TT3	28	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	15 min
		Alcohol	70%	2 min
		Zerotolerance	80%	3 min
TT4	23	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	15 min
		Zerotolerance	80%	3 min
		HgCl ₂	0,10%	16 min
TT5	27	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	15 min
		Zerotolerance	80%	5 min
TT6	80	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Alcohol	70%	2 min
TT7	80	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	3% v/v	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	1,5% v/v	15 min
		Alcohol	70%	2 min
TT8	120	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	10 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Alcohol	70%	2 min
		Zerotolerance	50%	3 min
TT9	93	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	10 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Alcohol	70%	2 min
		HgCl ₂	0,10%	5 min

Tratamiento	Sembrados	Descripción de la desinfección		
		Desinfectante	Concentración	Tiempo
TT10	36	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	5min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	10 min
		Zerotolerance	50%	3 min
TT11	39	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	5min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	10 min
		Alcohol	70%	1 min
		Zerotolerance	30%	2 min
TT12	40	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	20% v/v	7 min
		Alcohol	70%	1 min
		Zerotolerance	40%	3 min
TT13	40	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	20% v/v	7 min
		Zerotolerance	50%	3 min
TT14	36	Lavado con agua y jabón		
		Secado		
		Hipoclorito de Sodio + HCl	1:1	6 min
TT15		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	5min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	10 min
		Alcohol	70%	lavado
		Zerotolerance	50%	3 min
TT16	21	Lavado con agua y jabón		
		Agroquímicos		1 hora
		Secado		
		Hipoclorito de Sodio + HCl	1:1	6 min
TT17	23	Lavado con agua y jabón		
		Agroquímicos		1 hora
		Secado		
		Hipoclorito de Sodio + HCl		6 min
		Zerotolerance®	50%	3min

Brotación

Aquellos explantes que fueron introducidos *in vitro* de manera satisfactoria y libre de contaminantes, se sometieron a dos ensayos de brotación en medio semisólido y líquido. Los tratamientos en medio semisólido consistieron en el medio básico M&S (1962) al 100% + 3% sacarosa + 500mg/l de carbón activado, y diferían entre sí en la combinación de reguladores de crecimiento (Cuadro 5).

Cuadro 5. Medios de cultivo empleados en el ensayo de brotación de *Terminalia amazonia* empleando medio semisólido para el subcultivo de las estacas *in vitro*.

Tratamiento	Medio de Cultivo	Explantos sembrados
BT1	2 ip: 3mg/l AIA: 0,5mg/l	25
BT2	BAP :30 mg/l	25
BT3	Kinetina: 10mg/l	25
BT4	Zeatina: 0,5mg/l	25
BT5	BAP: 1mg/l PaCa: 50ml/l AgNO ₃ : 5mg/l	25
BT6	MS (-Cu-Fe) BAP: 15 mg/l	25

Adicionalmente, se realizó un ensayo empleando medio inmersión temporal, mediante el sistema de RITA's. Cada tratamiento consistió en dos RITA's una colocada en el cuarto frío ($17\pm 2^{\circ}\text{C}$) y otra en el cuarto caliente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), cada una con cinco explantes. Los detalles del medio de cultivo se muestran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Medios de cultivo empleados en el ensayo de brotación de *Terminalia amazonia* empleando Sistema de Inmersión Temporal para el subcultivo de las estacas *in vitro*.

TTR1	TTR2	TTR3	TTR4
Sales MS 100%	Sales MS 100%	Sales MS 100%	Sales MS 100%
Vitaminas MS	Vitaminas MS	Vitaminas MS	Vitaminas MS
BAP: 30mg/l	Kinetina: 10mg/l	Zeatina: 0.5mg/l	2-iP: 3mg/l AIA: 0,5mg/l
3% sacarosa	3% sacarosa	3% sacarosa	3% sacarosa

Multiplicación

Las estacas de *Terminalia amazonia* brotadas, tanto las provenientes de invernadero como de campo, fueron y se sembraron en medio M&S (1962) + 3% sacarosa + 0,05mg/l de BAP pH 5,7 para inducir la elongación y por ende la multiplicación.

Posteriormente, los explantes fueron subcultivados en medio de cultivo semisólido con sales M&S (1962) al 100%, 3% sacarosa + 200mg/l de caseína hidrolizada + 0.5 mg/l de BAP. Para ello, se cortaron las hojas y la parte basal del tallo, para obtener una mayor absorción de nutrientes.

Introducción de semilla

Se introdujo semilla de *Terminalia amazonia* colectadas en campo, en la zona de Sarapiquí.

Inicialmente, se redujeron las semillas, cortando los extremos de las mismas y se realizó un lavado con agua. Luego, se lavaron con agua y jabón durante 10 minutos en agitación. Se retiró por completo el jabón y se realizó un último lavado con solución antioxidante (1g/l de ácido ascórbico y 0,5g/l de ácido cítrico). Seguidamente se desinfectaron las semillas en cámara de flujo laminar siguiendo cinco protocolos diferentes:

- ST1: Cloro comercial (3,5% ia) al 50% v/v durante 10 minutos (solución preparada de manera estéril)
- ST2: Cloro comercial (3,5% ia) al 30% v/v durante 10 minutos (solución preparada de manera estéril)
- ST3: Agroquímicos 30 min (preparados con solución antioxidante) y Cloro comercial (3,5%ia) al 30% v/v durante 10 minutos (solución preparada de manera estéril)
- ST4: Cloro comercial (3,5% ia) al 40% v/v durante 10 minutos
- ST5: Cloro comercial (3,5% ia) al 50% v/v durante 10 minutos

Se sembraron las semillas con y sin testa. Todos los tratamientos se colocaron en medio de cultivo M&S (1962) al 100% + 500mg/l de carbón activado + 3% sacarosa en condiciones de oscuridad y en el cuarto frío (17±2°C).

Resultados

Material procedente de invernadero

Con base en los resultados obtenidos trabajando con el material experimental de *T. amazonia* mantenido en invernadero, se logró identificar una metodología eficiente para el establecimiento *in vitro* de este tipo de explante (Cuadros 7, 8 y 9). El tratamiento que mostró el mayor control de contaminación se observó en los ensayos realizados con hipoclorito de sodio. La doble desinfección con hipoclorito de sodio al 3% por 5 minutos de inmersión y luego al 1,5% por 10 minutos de inmersión, presentó un nivel medio de asepsia con 62% a los 15 días de la siembra y un menor porcentaje de explantes muertos debido a oxidación (50%). En este tratamiento la mayor contaminación se debió a hongos con un 37,5%.

Cuadro 7: Evaluación de los tratamientos de desinfección con NaOCl en el medio de cultivo MS con 15 días de cultivo expresado en porcentajes de la cantidad de explantes.

	NaOCl 1,5% 10 min				NaOCl 1,5% 15 min				NaOCl 3% 10 min				NaOCl 3% 15 min				NaOCl 3% 5 min + 1,5% 10 min			
	H	B	Ox	M	H	B	Ox	M	H	B	Ox	M	H	B	Ox	M	H	B	Ox	M
Introducción 1	50,0	33,3	66,7	66,7	50,0	50,0	50,0	50,0	0,0	50,0	100	100	100	0,0	100	100	---	---	---	---
Introducción 2	57,1	28,6	100	100	57,1	42,9	100	100	71,4	28,6	100	100	85,7	14,3	100	100	---	---	---	---
Introducción 3	57,1	28,6	100	85,7	71,4	28,6	100	100	71,4	14,3	100	100	57,1	42,9	100	100	---	---	---	---
Introducción 4	0	33,3	33,3	33,3	66,7	0	66,7	66,7	100	0	100	100	100	0	100	100	---	---	---	---
Introducción 5	---	---	---	---	76,9	15,4	69,2	53,8	---	---	---	---	53,8	46,2	69,2	53,8	---	---	---	---
Introducción 6	---	---	---	---	50,0	25,0	75,0	50,0	---	---	---	---	---	---	---	---	37,5	37,5	62,5	37,5
MEDIAS	41,1	31,0	75,0	71,4	62,0	27,0	76,8	70,1	60,7	23,2	100	100	79,3	20,7	93,8	90,8	37,5	37,5	62,5	37,5

Nota: H=hongo, B=bacteria, Ox=oxidación y M=mortalidad

Cuadro 8: Evaluación de los tratamientos de desinfección con NaOCl después de 15 días de cultivo, expresado en porcentajes de la cantidad de explantes.

	NaOCl 1,5% 10 min				NaOCl 1,5% 15 min				NaOCl 3% 10 min				NaOCl 3% 15 min				NaOCl 3% 5 min + 1,5% 10 min			
	H	B	Ox	M	H	B	Ox	M	H	B	Ox	M	H	B	Ox	M	H	B	Ox	M
Introducción 1	50,0	33,3	66,7	66,7	50,0	50,0	50,0	50,0	0,0	50,0	100	100	100	0,0	100	100	---	---	---	---
Introducción 2	57,1	28,6	100	100	57,1	42,9	100	100	71,4	28,6	100	100	85,7	14,3	100	100	---	---	---	---
Introducción 3	57,1	28,6	100	85,7	71,4	28,6	100	100	71,4	14,3	100	100	57,1	42,9	100	100	---	---	---	---
Introducción 4	0	33,3	33,3	33,3	66,7	0	66,7	66,7	100	0	100	100	100	0	100	100	---	---	---	---
Introducción 5	---	---	---	---	76,9	15,4	69,2	53,8	---	---	---	---	53,8	46,2	69,2	53,8	---	---	---	---
Introducción 6	---	---	---	---	50,0	25,0	75,0	50,0	---	---	---	---	---	---	---	---	37,5	37,5	62,5	37,5
MEDIAS	41,1	31,0	75,0	71,4	62,0	27,0	76,8	70,1	60,7	23,2	100	100	79,3	20,7	93,8	90,8	37,5	37,5	62,5	37,5

Nota: H=hongo, B=bacteria, Ox=oxidación y M=mortalidad

Con respecto al uso de cloruro de mercurio (HgCl_2), se observó que conforme se aumentó la concentración del cloruro de mercurio el porcentaje de explantes asépticos aumentó, sin embargo; también aumentó el porcentaje de oxidación y por ende la mortalidad (Cuadro 9).

Cuadro 9: Evaluación de los tratamientos de desinfección con HgCl₂ después de 15 días de cultivo, expresado en porcentajes de la cantidad de explantes.

	2,5 min				5 min				7 min				10 min			
HgCl ₂	H	B	Ox	M	H	B	Ox	M	H	B	Ox	M	H	B	Ox	M
0,001%	50	50	83,3	83,3	50	33,3	83,3	83,3	57,1	28,6	100	75	57,1	42,9	100	100
0,002%	66,7	16,7	83,3	83,3	83,3	16,7	66,7	66,7	71,4	28,6	100	66,7	85,7	14,3	100	75
0,005%									71,4	14,3	85,7	71,4	57,1	42,9	100	85,7
0,006%									57,1	28,6	85,7	85,7	71,4	28,6	85,7	100
0,025%													0	0	100	33,3
0,030%													0	0	100	66,7
0,035%													0	0	100	66,7
0,045%													0	0	100	100
0,050%									30,8	7,7	76,9	84,6	0	0	87,5	62,5
0,100%									38,5	30,8	84,6	92,3				
MEDIAS	58,35	33,35	83,3	83,3	66,65	25	75	75	54,4	23,1	88,8	79,3	30,1	14,3	97,0	76,7

Nota: H=hongo, B=bacteria, Ox=oxidación y M=mortalidad

Al evaluar los tratamientos antioxidantes, después de un día de cultivo, se observó algún grado de oxidación en el 100% de los explantes. En la Figura 1 se muestra el grado de oxidación, expresado como el porcentaje de explantes en cada una de las clases cualitativas evaluadas para cada tratamiento. Los menores porcentajes de oxidación se presentaron en los tratamientos con los antioxidantes adicionados al medio de cultivo, en especial con la adición de carbón activado (500mg/l) con un 53,3% de explantes clasificados con un bajo índice de oxidación u oxidación leve. También se pudo apreciar como los tratamientos con DTT reflejaron los mayores porcentajes de explantes con altos índices de oxidación (73.3%) Los tratamientos con PVPP antes de la desinfección o la combinación de ácido cítrico y ácido ascórbico presentaron los mayores porcentajes de oxidación clase intermedia con bajos niveles clasificados como leves o graves, (73,3% y 60% respectivamente).

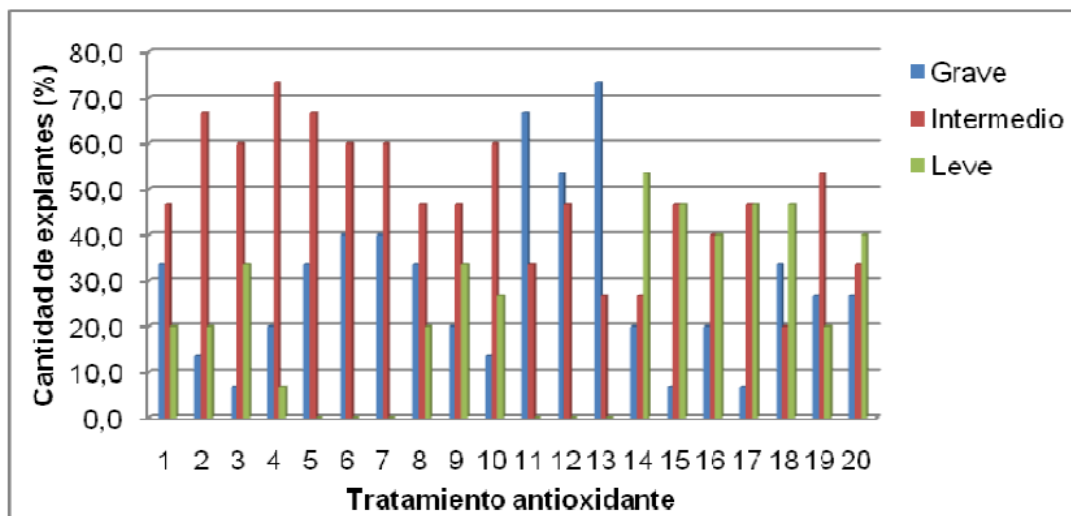


Figura 1: Efecto de los diferentes tratamientos antioxidantes en la intensidad de la oxidación en explantes de *Terminalia amazonia* (amarillón) después de 24 horas de cultivo *in vitro*.

La evaluación de la oxidación a los 15 días de cultivo, mostró que el porcentaje de explantes clasificados como graves e intermedios aumentó en todos los tratamientos y por ende disminuyó el porcentaje de explantes categorizadas con oxidación leve. En la Figura 6 se puede apreciar como tratamientos como el 6 y 7 (con L-cisteína) y 11 (con DTT) mostraron 100% de explantes clasificados como graves, resultando así un 0% de sobrevivencia para los tratamientos con L-cisteína (Figura 2).

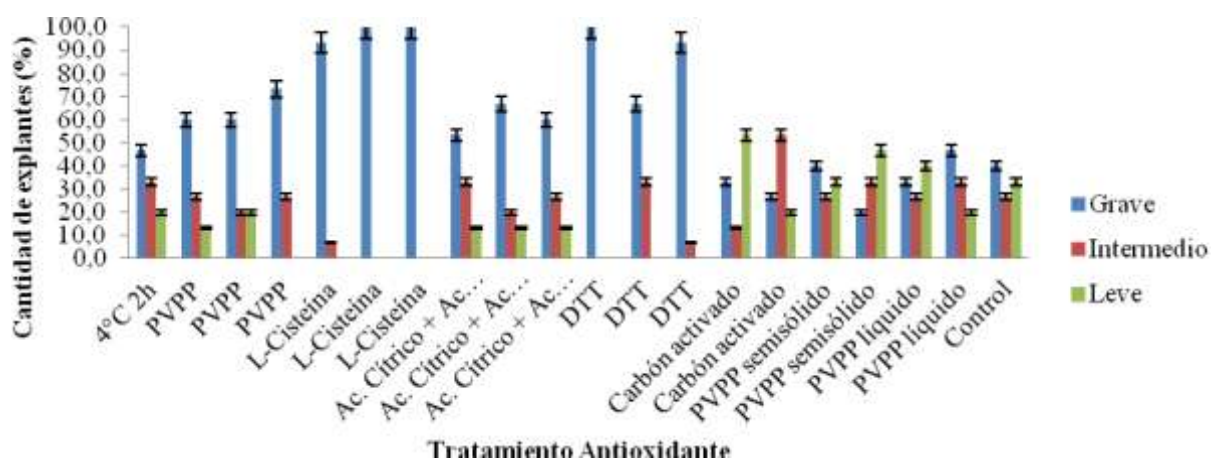


Figura 2. Grado de oxidación presentado en los explantes de roble coral (*Terminalia amazonia*) después de la aplicación de distintos tratamientos antioxidantes después de 15 días de cultivo *in vitro*.

Según los resultados obtenidos, se decidió que el protocolo a seguir para la desinfección de estacas de *T. amazonia* es el que se presenta a continuación:

1. Corta las estacas y colocarlas de inmediato en Solución Antioxidante (ácido cítrico 0,5 g/l y ácido ascórbico 1 g/l a un pH de 4.5).
2. Colocarlas 15 minutos bajo el agua del tubo, para remover impurezas.
3. Lavar con agua destilada y detergente Bactex, en agitación.
4. Colocarlas en Agrimycin y Benomil 5-8 g/l, disuelto en Solución Antioxidante, durante 2 horas.
5. Realizar la doble desinfección, con hipoclorito de sodio al 1,5% durante 12 minutos, y después de un lavado, se colocarlas en hipoclorito al 3%, durante 8 minutos.
6. Enjuagar tres veces con agua destilada estéril y cultivar en medio MS sin Cobre, sin Hierro, con un pH de 5.1, complementado con 500 mg/l de Carbón activado.
7. Mantener durante 1 mes en oscuridad, a 20°C.

La figura 3 muestra algunas imágenes que muestran los mejores resultados obtenidos durante etapa de la investigación en desinfección, control de la oxidación de material de invernadero.

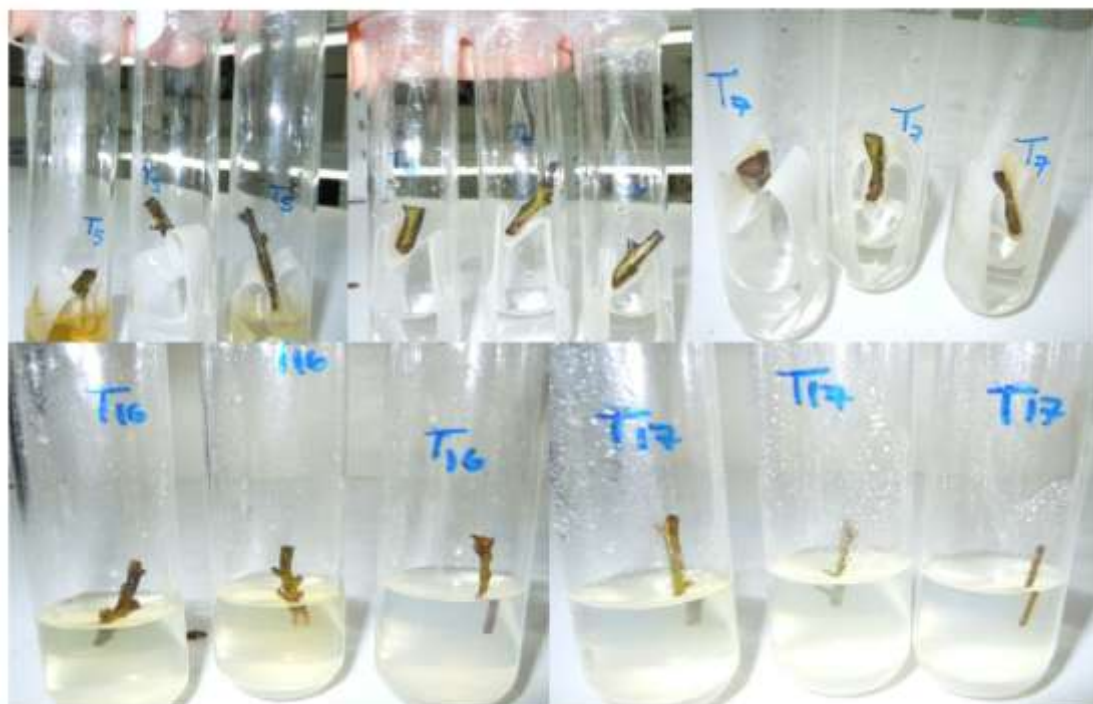


Figura 3: Explantes de *Terminalia amazonia* sobrevivientes al proceso de desinfección durante la etapa de introducción al cultivo *in vitro*.

Los resultados mostraron baja brotación de las microestacas en las dos concentraciones de las citocininas evaluadas: 30 mg/l de BAP y 10 mg/l de KIN, pero con explantes verdes y vigorosos (figura 4).



Figura 4: Brotes obtenidos a partir de los explantes de *Terminalia amazonia* en medio de cultivo con citocininas.

Material recolectado en campo

Introducción in vitro

Se realizaron un total de 17 pruebas de desinfección que permitieran introducir a condiciones de cultivo *in vitro* material de *Terminalia amazonia* libre de contaminación. Dichos protocolos incluyeron el uso de hipoclorito de sodio, alcohol, cloruro de mercurio, peróxido de hidrógeno, agroquímicos, entre otros agentes desinfectantes, diversas combinaciones entre ellos y variaciones en los tiempos de exposición a los mismos. Los detalles de cada tratamiento se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 10. Tratamientos empleados para la desinfección de estacas de *Terminalia amazonia* provenientes de campo, previo a su introducción *in vitro*.

Tratamiento	Sembrados	Descripción de la desinfección		
		Desinfectante	Concentración	Tiempo
TT0	43	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	15 min
		Alcohol	70%	2 min
		HgCl ₂	0,10%	16 min
TT1	20	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	15 min
		Zerotolerance 80%	80% v/v	3 min
		HgCl ₂	0,10%	16 min
TT2	16	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	15 min
		Zerotolerance	80% v/v	3 min
		Alcohol	70%	10 min
TT3	28	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	15 min
		Alcohol	70%	2 min
		Zerotolerance	80%	3 min
TT4	23	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	15 min
		Zerotolerance	80%	3 min
		HgCl ₂	0,10%	16 min
TT5	27	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	15 min
		Zerotolerance	80%	5 min
TT6	80	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Alcohol	70%	2 min
TT7	80	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	3% v/v	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	1,5% v/v	15 min
		Alcohol	70%	2 min
TT8	120	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	10 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Alcohol	70%	2 min
		Zerotolerance	50%	3 min
TT9	93	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	10 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	15 min
		Alcohol	70%	2 min
		HgCl ₂	0,10%	5 min

Tratamiento	Sembrados	Descripción de la desinfección		
		Desinfectante	Concentración	Tiempo
TT10	36	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	5min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	10 min
		Zerotolerance	50%	3 min
TT11	39	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	5min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	10 min
		Alcohol	70%	1 min
		Zerotolerance	30%	2 min
TT12	40	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	20% v/v	7 min
		Alcohol	70%	1 min
		Zerotolerance	40%	3 min
TT13	40	Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	20% v/v	7 min
		Zerotolerance	50%	3 min
TT14	36	Lavado con agua y jabón		
		Secado		
		Hipoclorito de Sodio + HCl	1:1	6 min
TT15		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	30% v/v	5min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia)	10% v/v	10 min
		Alcohol	70%	lavado
		Zerotolerance	50%	3 min
TT16	21	Lavado con agua y jabón		
		Agroquímicos		1 hora
		Secado		
		Hipoclorito de Sodio + HCl	1:1	6 min
TT17	23	Lavado con agua y jabón		
		Agroquímicos		1 hora
		Secado		
		Hipoclorito de Sodio + HCl		6 min
		Zerotolerance®	50%	3min

Brotación

Los explantes que fueron introducidos *in vitro* de manera satisfactoria y libre de contaminantes, se sometieron a dos ensayos de brotación en medio semisólido y líquido.

Los tratamientos en medio semisólido consistían sales M&S al 100% + 3% sacarosa + 500mg/l de carbón activado, y diferían entre sí en la combinación de reguladores de crecimiento (Cuadro 11).

Cuadro 11. Medios de cultivo empleados en el ensayo de brotación de *Terminalia amazonia* empleando medio semisólido para el subcultivo de las estacas *in vitro*.

Tratamiento	Medio de Cultivo	Explantos sembrados
BT1	2 ip: 3mg/l AIA: 0,5mg/l	25
BT2	BAP :30 mg/l	25
BT3	Kinetina: 10mg/l	25
BT4	Zeatina: 0,5mg/l	25
BT5	BAP: 1mg/l PaCa: 50ml/l AgNO ₃ : 5mg/l	25
BT6	MS (-Cu-Fe) BAP: 15 mg/l	25

Adicionalmente, se realizó un ensayo empleando medio inmersión temporal, mediante el sistema de RITA's. Cada tratamiento consistió en dos RITA's una colocada en el cuarto frío ($17\pm 2^{\circ}\text{C}$) y otra en el cuarto caliente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), cada una con cinco explantes. Los detalles de los medio de cultivo se muestran en el cuadro 12.

Cuadro 12. Medios de cultivo empleados en el ensayo de brotación de *Terminalia amazonia* empleando Sistema de Inmersión Temporal para el subcultivo de las estacas *in vitro*.

TTR1	TTR2	TTR3	TTR4
Sales MS 100%	Sales MS 100%	Sales MS 100%	Sales MS 100%
Vitaminas MS	Vitaminas MS	Vitaminas MS	Vitaminas MS
BAP: 30mg/l	Kinetina: 10mg/l	Zeatina: 0.5mg/l	2-iP: 3mg/l AIA: 0,5mg/l
3% sacarosa	3% sacarosa	3% sacarosa	3% sacarosa

Multiplicación

Las estacas de *Terminalia amazonia* brotadas, tanto de invernadero como de campo, se multiplicaron y se sembraron en medio descrito por Murashige y Skoog (M&S, 1962) + 3% sacarosa + 0,05mg/l de BAP pH 5,7. Posteriormente, los explantes fueron subcultivados en medio de cultivo semisólido con sales M&S al 100%, 3% sacarosa + 200mg/l de caseína hidrolizada + 0.5 mg/l de BAP. Para ello, se cortaron las hojas y la parte basal del tallo, para obtener una mayor absorción de nutrientes.

Introducción de semilla

Se introdujo semilla de *Terminalia amazonia* colectadas en campo, en la zona de Sarapiquí. Inicialmente, se redujeron las semillas, cortando los extremos de las mismas y se realizó un lavado con agua. Luego, se lavaron con agua y jabón durante 10 minutos en agitación. Se retiró por completo el jabón y se realizó un último lavado con solución antioxidante (1g/l de ácido ascórbico y 0,5g/l de ácido cítrico).

Seguidamente se desinfectaron las semillas en cámara de flujo laminar siguiendo cinco protocolos diferentes:

- ST1: Cloro comercial (3,5% ia) al 50% v/v durante 10 minutos (solución preparada de manera estéril)
- ST2: Cloro comercial (3,5% ia) al 30% v/v durante 10 minutos (solución preparada de manera estéril)
- ST3: Agroquímicos 30 min (preparados con solución antioxidante) y Cloro comercial (3,5%ia) al 30% v/v durante 10 minutos (solución preparada de manera estéril)
- ST4: Cloro comercial (3,5% ia) al 40% v/v durante 10 minutos
- ST5: Cloro comercial (3,5% ia) al 50% v/v durante 10 minutos

Se sembraron las semillas con y sin testa. Todos los tratamientos se colocaron en medio de cultivo M&S (1962) al 100% + 500mg/l de carbón activado + 3% sacarosa en condiciones de oscuridad y en el cuarto frío ($17\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Resultados

Introducción in vitro

Se evaluaron los diferentes tratamientos de desinfección de material tomando en cuenta la cantidad de explantes con bacteria, hongo, ambos contaminantes y la oxidación de los mismos. La figura 5 muestra los porcentajes de limpieza de explantes en los diferentes tratamientos empleados. A pesar de que los tratamientos denotados desde el TT0 hasta TT9 presentan buenos porcentajes de limpieza, la mayoría de los explantes mostraron oxidación, es decir, coloración café oscura en tallos y yemas, por lo cual se descartaron como tratamientos viables, debido al daño provocado por los desinfectantes en el tejido vegetal.

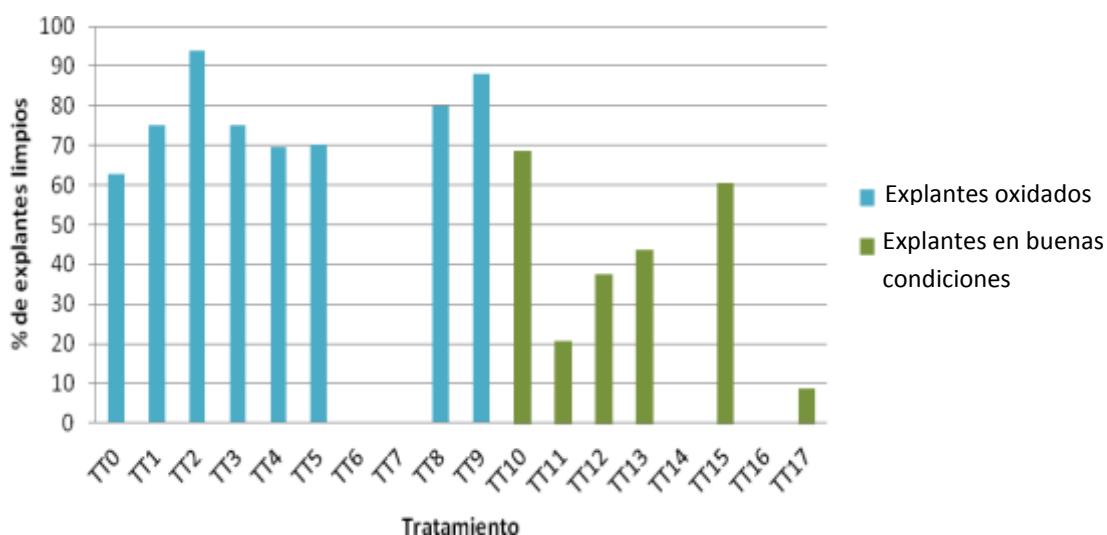


Figura 5. Porcentajes de explantes de *Terminalia amazonia* limpios después de los diferentes tratamientos de desinfección.

Tomando como referencia los tratamientos TT10 al TT17, en los cuales los explantes se mantuvieron verdes y saludables, se realizó un análisis ANOVA con un 95% de confianza, y se determinó que existen diferencias significativas entre tratamientos.

La prueba Tukey, mostró que los mejores tratamientos empleados son el TT10, TT13 y TT15, entre los cuales no se presentaron diferencias significativas.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se decidió repetir el ensayo empleando los tratamientos TT10 y TT13 con material de la misma procedencia, lo cual permitiría

tomar una decisión acerca del mejor tratamiento para la introducción, evaluando a la vez la capacidad de brotación de los explantes una vez sometidos a ambos tratamientos de desinfección.

Brotación

Inicialmente, en ninguno de los tratamientos evaluados se observó brotación de las yemas, a pesar de que las estacas introducidas permanecieron verdes y con apariencia saludable. En la mayoría de los casos, con el tiempo las estacas se oxidaron sin mostrar la presencia de brotes (figura 6). Por lo anterior, fue necesario variar los tipos, combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento empleados con el fin de generar la señal hormonal necesaria para la brotación de las yemas axilares, tomando en cuenta la concentración endógena que tienen los explantes y el nivel relativamente alto de citocininas vs. auxinas que generalmente se requiere para que el tejido manifiesta la formación de nuevos brotes (Jordán y Casaretto, 2006).



Figura 6. Estacas de Terminalia amazonia oxidadas después de 20 días en medio de brotación

En los siguientes ensayos evaluados se presentó brotación en el medio suplementado con 15 mg/l de BAP, sin embargo, por el bajo porcentaje de brotación y por no ser una respuesta significativa, su repetitividad debe ser confirmada (figura 7).

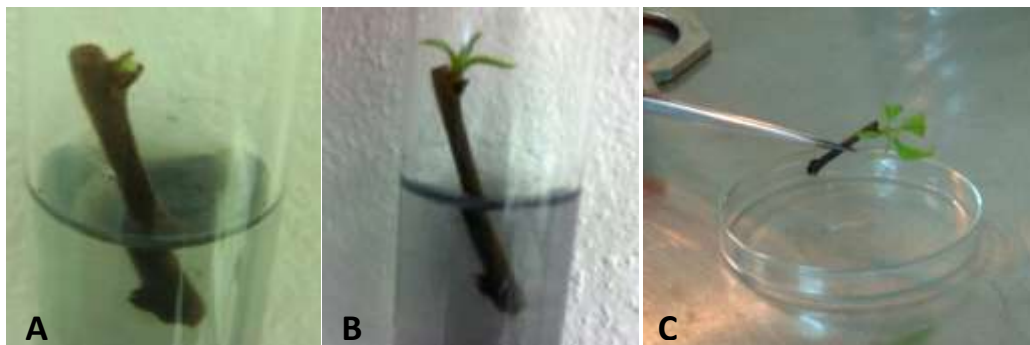


Figura 7. Estaca de *T. amazonia* brotada en medio de cultivo suplementado con 15mg/l de BAP. A: Brotación a los 15 días de subcultivo. B: Brotación a los 21 días de subcultivo. C: Brote a los 28 días de *subcultivo*

En cuanto al cultivo de los explantes de *T. amazonia* en el sistema de inmersión temporal (RITAs), se observó una alta oxidación de los explante y no se evidenció la presencia de brotes.

Multiplicación

Las estacas de *Terminalia amazonia* multiplicadas y sembradas en medio M&S + 3% sacarosa + 0,05mg/l de BAP (pH 5,7) mostraron buenas condiciones, sin embargo su crecimiento no ha sido del todo satisfactorio, debido a que el crecimiento es muy lento, lo que ha retrasado la multiplicación rutinaria de las estacas (figura 8).



Figura 8. Estacas de *T. amazonia* subcultivadas en medio semisólido suplementado con 0,05mg/l de BAP

Introducción de semilla

Los tratamientos de desinfección de semilla mostraron altos porcentajes de éxito, tomando en cuenta la baja incidencia de hongos y bacterias. Los resultados se muestran en la figura 9.

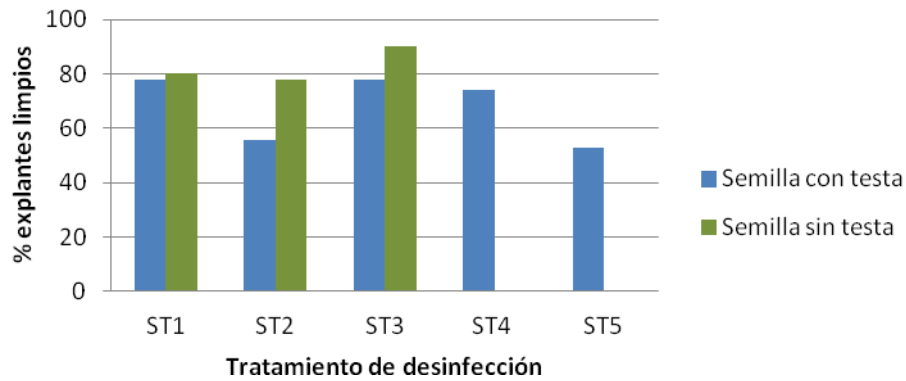


Figura 9. Porcentaje de limpieza obtenido en mediante tres tratamientos de desinfección de semillas de *Terminalia amazonia*

Los análisis estadísticos realizados mostraron que no existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de desinfección, ni entre semillas con y sin testa que empleaban el mismo tratamiento de desinfección (en el caso de ST1, ST2 y ST3).

A pesar de que se informó a los investigadores acerca de la baja viabilidad de las semillas previo a la introducción, se obtuvo germinación en condiciones *in vitro*, la mayoría ellas cultivadas con testa y una sin ella, tal como se muestra en las figuras 10 y 11.

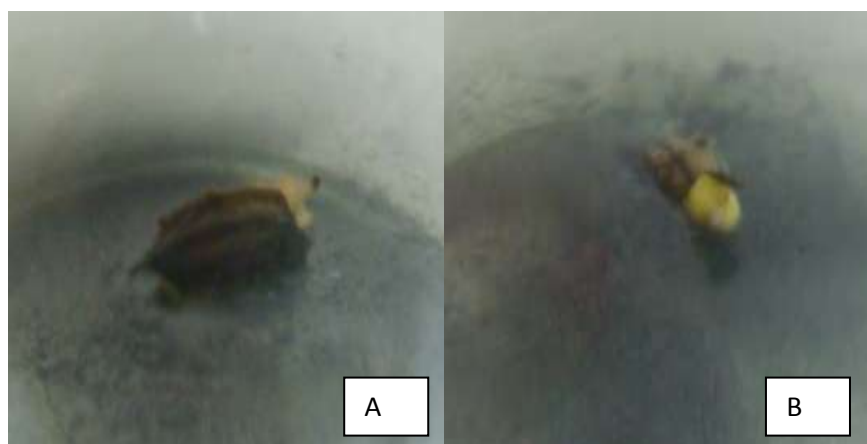


Figura 10. Semillas de *T. amazonia* en proceso de germinación. A: Semilla con testa. B: Semilla sin testa



Figura 11. Plántulas de *Terminalia amazonia* germinadas *in vitro*.

Discusión

Esta investigación indicó que el manejo del material vegetal en invernadero, tratando de darle las condiciones sanitarias que reduzcan el inóculo de contaminantes, antes de su desinfección superficial para introducirlo a condiciones *in vitro*, permitiría el uso de desinfecciones menos drásticas y aumenta la posibilidad de lograr explantes asépticos. Además, la doble desinfección con NaClO al 3% y 1,5%, durante 5 y 10 minutos respectivamente fue el mejor tratamiento para controlar la oxidación de los explantes de *T. amazonia*, al combinar las respuestas esperadas: una contaminación baja y una baja mortalidad de los explantes por oxidación. La selección del tratamiento antioxidante depende de la especie con se trabaje. *Terminalia amazonia* posee una gran cantidad de taninos y fenoles, que rápidamente pueden ser oxidados. También presenta pubescencia o tricomas que favorecen y aumentan la oxidación del explante por requerir una fuerte desinfección. Durante este estudio, la evaluación de una variedad de antioxidantes permitió descartar compuestos que dañaron el material, o que no influyeron en la reducción de la oxidación, se logró incluso seleccionar el método más apropiado de adición, al igual que el método de desinfección que causó menor daño al tejido y mayor porcentaje de explantes asépticos. En general, los resultados obtenidos parecen indicar que el uso de las citocininas BAP y Kinetina es el camino a seguir para promover la brotación de yemas en explantes de *Terminalia amazonia* y que sería conveniente evaluar otras concentraciones y mezclas de citocininas.

Los compuestos fenólicos son exudados por la herida del tejido hacia el medio, a la vez son atrapados por el gelificante y acumulados formando un área negra alrededor del explante, resultando la inhibición del crecimiento (Monzon, 2005). No todos los compuestos que se producen son inhibidores del crecimiento, pero frecuentemente se encuentra que, una vez producida la decoloración, el crecimiento se inhibe y los tejidos se mueren, a no ser que se tomen medidas oportunas.

La extensión de la oxidación y la inhibición del crecimiento depende mucho del genotipo, este influye en la cantidad de sustancias fenólicas producidas así como en su toxicidad y es especialmente problemático en especies que contienen niveles altos de taninos y otros hidroxifenoles (Chinchilla, 2008), como es el caso del roble coral.

El ácido ascórbico inhibe la oxidación reduciendo el complejo fenólico, este compuesto en la micropropagación puede actuar en dos formas como reductor o como vitamina, en los resultados reportados en roble coral (Figura 6) este compuesto en combinación con el ácido cítrico actuó como reductor de la oxidación, observándose porcentajes

intermedios de explantes con una fenolización grave (53,3%, 66,7% y 60%). Resultados similares obtuvo Cisne *et al* (sf) en mora, el ácido ascórbico no tuvo ningún efecto estimulador sobre las variables evaluadas, aunque este pudo haber tenido cierto efecto sobre la inhibición de sustancia fenólicas.

Por otro lado el ácido cítrico es un ácido tricarbóxico muy común en las plantas, es utilizado en la preparación de explantes y medios, siendo uno de los compuestos claves del ciclo de Krebs (Monzon, 2005). Es aplicado generalmente en concentraciones que varían en el rango de 0.5 a 2 % (p/v) para la prevención del oscurecimiento en frutas y vegetales, por ejercer un efecto inhibitorio sobre la PPO (polifenol oxidasa) por disminución del pH, así como por su efecto quelante sobre el cobre en el sitio activo de la enzima (Romero, 2004).

La combinación de ambos antioxidantes en roble coral tuvo resultados similares a los obtenidos por Concepción *et al* (2005) en guayaba (*Psidium guajaba*) y Alonso (2002) en geranio (*Pelargonium sp*), los cuales reflejaron una reducción de la oxidación pero no de manera eficiente. Se reporta que el ácido ascórbico es sólo efectivo durante un corto periodo de tiempo ya que se puede convertir rápidamente en un oxidante muy fuerte (Alonso, 2002).

Otro de los compuestos antioxidantes utilizados fue la L-cisteína, aminoácido que en una solución neutra, se ha usado en el cultivo *in vitro* de mora (*Rubus glaucus*), donde se comprobó que resulta tóxico al ser utilizado en concentraciones mayores a los 100mg/l, provocando la muerte de las plantas aún y cuando se esterilizó en la autoclave (Cisne *et al*, sf). Este resultado fue similar al obtenido con las tres concentraciones evaluadas en *T. amazonia*, en la cual a los 15 días de cultivo la oxidación fue casi del 100% causando la muerte de los explantes.

En cuanto al DTT o reactivo de Cleland, se ha utilizado para retardar la oxidación, especialmente de grupos -SH, ya que reduce disulfidos cuantitativamente (Monzon, 2005), igualmente este antioxidante ha sido utilizado *Parakmeria lotungensis*, *Pinus virginiana* y *Strelitzia reginae* (Ziv & Halevy, 1983) citados por Azofeifa (2009); sin embargo, este reactivo no resultó eficiente en *T. amazonia* en las concentraciones evaluadas.

En cuanto a los antioxidantes más empleados dentro del medio de cultivo se menciona el carbón activado, este compuesto no es tóxico y teóricamente se puede adicionar en cualquier cantidad al medio cultivo. En esta investigación, las concentraciones utilizadas con roble coral (0.5 y 0.25 g/l); generaron resultados positivos para la

reducción de la fenolización en los explantes. Resultados similares reportó Borges & Sosa (2008) para el cultivo *in vitro* del ñame, al evaluar cuatro concentraciones diferentes (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 g/l) observaron que las de menores concentraciones presentaron los mejores resultados sin presentar diferencias significativas entre ellos.

El carbón activado no solo reduce la oxidación, sino también en concentraciones bajas promueve el crecimiento o desarrollo en algunas especies como reporta Pedroza & Alonso (2009) en orquídeas, donde además de favorecer los procesos de crecimiento en las orquídeas, se menciona que potencializa el efecto de los fitorreguladores.

El último agente antioxidante evaluado para la introducción del roble coral fue la polivinylpolipirrolidona (PVPP), la absorción de esta sustancia química es más limitada, debido a la complejidad del fenol. Con el uso de PVPP tanto en el medio líquido como semisólido se obtuvieron los mejores resultados en cuanto al control de la oxidación y por ende la sobrevivencia de los explantes de *T. amazonia*. Resultados similares reporta Concepción *et al* (2005) con la introducción de guayaba y el uso de 500mg/l y 250mg/l de PVPP, obteniendo un 100% de las yemas sin síntomas de fenolización, mencionando que los resultados se debieron a sus características de polímero, que le confieren funciones de absorción específicas para determinadas moléculas de compuestos orgánicos, como son los fenoles, los cuales son adsorbidos por el PVPP a través de las moléculas de hidrógeno, previniendo así su oxidación y polimerización (Concepción *et al*, 2005).

Existen varias técnicas para inhibir la oxidación del tejido vegetal una vez introducido al cultivo *in vitro*, entre esas técnicas se encuentra el tratamiento con bajas temperaturas o choque térmico, como se reporta para dos especies africanas de carácter medicinal (*O. bullata* y *W. salutaris*), las cuales fueron mantenidas a 4°C durante 24 horas, en una solución antioxidante de ácido cítrico y con ácido ascórbico a un pH de 4.5, esta combinación de tratamientos fue efectivo para *O. bullata* mientras que para *W. salutaris* la necrosis de los explantes fue mayor que sin este tratamiento (Kowalski & Van Staden, 2001). Los resultados obtenidos con *W. salutaris* fueron similares a los expresados por roble coral con este mismo tratamiento, la disminución de la temperatura no causó efecto positivo en la inhibición de la oxidación.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, se concluyó que el manejo del material vegetal en invernadero, tratando de darle las condiciones sanitarias que reduzcan el inóculo de contaminantes, antes de su desinfección

superficial para introducirlo a condiciones *in vitro*, permite el uso de desinfecciones menos drásticas y aumenta la posibilidad de lograr explantes asépticos. Además, tomar en cuenta las condiciones climáticas a la hora de realizar la introducción es importante, ya que condiciones secas reducen el inóculo de organismos contaminantes, lo que favorece el éxito en la desinfección. Así mismo el uso del cloruro de mercurio como desinfectante resultó ser altamente tóxico, el cual causó daños en el tejido vegetal de *Terminalia amazonia* causando una mayor oxidación del explante y por consiguiente su muerte. Por otro lado el hipoclorito de sodio, fue un desinfectante gentil con el tejido vegetal del roble coral y no así con los hongos o bacterias presentes en el material vegetal. Además, la doble desinfección con NaClO al 3% y 1,5%, durante 5 y 10 minutos respectivamente fue el mejor tratamiento para controlar la oxidación de los explantes de *T. amazonia*, al combinar las respuestas esperadas: una contaminación baja y una baja mortalidad de los explantes por oxidación. En cuanto a los antioxidantes, los tratamientos que incluyeron de L-cisteína y DTT en las tres concentraciones evaluadas causaron daños en el tejido vegetal provocando la muerte del explante. Por otra parte los tratamientos con el antioxidante dentro del medio de cultivo produjeron una mejor respuesta al reducir la fenolización, siendo los tratamientos de PVPP a 10g/l en medio semisólido y PVPP a 5g/l en medio líquido, los mejores tratamientos para *Terminalia amazonia*.

La selección del tratamiento antioxidante depende de la especie con se trabaje. *Terminalia amazonia* posee una gran cantidad de taninos y fenoles, que rápidamente pueden ser oxidados. También presenta pubescencia o tricomas que favorecen y aumentan la oxidación del explante por requerir una fuerte desinfección. Durante este estudio, la evaluación de una variedad de antioxidantes permitió descartar compuestos que dañaron el material, o que no influyeron en la reducción de la oxidación, se logró incluso seleccionar el método más apropiado de adicionarlos, al igual que el método de desinfección que causó menor daño al tejido y mayor porcentaje de explantes asépticos. Mencionar también que existen medidas para la reducción de la oxidación como el uso de medios de cultivo libres de cobre y hierro, la colocación de los explantes una vez introducidos en el cuarto de crecimiento frío en oscuridad por dos semanas y realizar varios subcultivos, todas estas medidas se hicieron para el establecimiento *in vitro* de roble coral con el objetivo de contribuir a la reducción de la fenolización. Además así se permite llegar a algunas recomendaciones que se han de considerar en los ensayos subsecuentes. Para la realización de este trabajo la mayor dificultad presentada fue la fuente del material vegetal, por lo que se recomienda tener suficiente material en el invernadero para mantenerlo con las condiciones de sanidad establecidas en este trabajo y facilitar los procesos de desinfección obteniendo mayor

cantidad de explantes libres de contaminantes exógenos. Así mismo se recomienda el establecimiento de un protocolo de desinfección diferente para los explantes provenientes del campo, debido a que están cargados con una mayor cantidad de contaminantes exógenos que son más resistentes a la desinfección con NaClO. Sin importar el origen del explante, ya sea que provenga del invernadero o del campo es recomendable realizar pruebas con antibióticos para disminuir o eliminar la presencia de las bacterias endógenas. Igualmente debido a la ausencia de brotes durante este periodo de introducciones se recomienda realizar un ensayo con reguladores de crecimiento para estimular la brotación del explante (se está trabajando en este aspecto actualmente). Al tener determinado el antioxidante con mejor respuesta de sobrevivencia, se debe realizar una mayor cantidad de ensayos para tener repetitividad y garantizar la efectividad del tratamiento. Por lo tanto, los ensayos se han continuado, tanto en búsqueda de un control máximo de la contaminación y de la oxidación así como implementando en el medio de cultivo diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento a fin de acelerar y optimizar la respuesta de brotación de los explantes.

Vochysia guatemalensis

Materiales y métodos

Introducción de material in vitro

Se realizaron nueve introducciones *in vitro* con material proveniente de campo, suministrado por FUNDECOR, específicamente de fincas ubicadas en Sarapiquí. Con el fin de evaluar el mejor tratamiento para obtener material clonal de *V. guatemalensis* de plantas élite, libre de contaminantes como hongos y bacterias se han probado doce tratamientos diferentes, los cuales se detallan en el cuadro 13.

Para cada tratamiento se redujo el material proveniente de campo, y se realizaron dos lavados durante 10 minutos en agitación orbital con jabón antibacterial. Posteriormente se removió por completo el jabón y se sometieron los explantes a diferentes desinfectantes de acuerdo al tratamiento empleado.

Cuadro 13. Tratamientos de desinfección de estacas de *Vochysia guatemalensis* para su establecimiento *in vitro*.

Tratamiento	Sembrados	Desinfección	
		Desinfectante	Tiempo
VT0	790	Agroquímicos	2 horas
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia) 10%	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia) 30%	15 min
		Alcohol 70%	3 min
		HgCl ₂ 0,1%	16 min
VT1	16	Agroquímicos	2 horas
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia) 10%	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia) 30%	15 min
		Zerotolerance 80% 4 min +	4 min
		Alcohol 70%	3 min
VT2	71	Agroquímicos	2 horas
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia) 30%	15 min
		HgCl ₂ 0,2%	15 min
VT3 (invernadero)	10	Agroquímicos	2 horas
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia) 30%	10 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia) 10%	10 min
		Alcohol 70%	3 min
		Zerotolerance 50% (estéril)	4 min
VT4	81	Agroquímicos	1 hora
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia) 10% (estéril)	10 min
		Alcohol 70%	30 seg
		Secado en flujo de la cámara	20 min
		Hipoclorito de Sodio (5%ia) + HCl 6N (1:1)	10 min
Tratamiento	Sembrados	Desinfección	
		Desinfectante*	Tiempo
VT5	29	Agroquímicos	1 hora
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia) 30% (estéril)	5 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia) 10% (estéril)	10 min
		Alcohol 70%	30 seg
		Zerotolerance 50% (estéril)	3 min
VT6	10	Agroquímicos	1 hora
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia) 10% (estéril)	10 min
		Alcohol 70%	30 seg
		Zerotolerance 100%	30 seg
VT7	9	Agroquímicos	1,5 hora
		Alcohol 70%	30 seg
		Hipoclorito de Sodio (5%ia) + HCl 6N (1:1)	12 min
		Zerotolerance 50% (estéril)	3 min
VT8	37	Agroquímicos	1,5 hora
		Alcohol 70%	30 seg
		Hipoclorito de Sodio (5%ia) + HCl 6N (1:1)	12 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia) 30% (estéril)	10 min
		Zerotolerance 30% (estéril)	2 min
VT9	12	Agroquímicos	1,5 hora
		Alcohol 70%	30 seg
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia) 30%	10 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia) 10%	15 min

		Zerotolerance 50% (estéril)	3 min
VT10	182	Tradicional	
		Alcohol antes del cloro	
VT11	61	Agroquímicos	2 horas
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia) 30% (estéril)	15 min
		Hipoclorito de Sodio (3,5%ia) 10% (estéril)	15 min
		Alcohol 70%	3 min
		Zerotolerance 50% (estéril)	3 min

*Agroquímicos: Agry-Gent Plus 8WP, Afungil 50WP y Zetarán 76WG (4g/l de cada uno) + amoxicilina (500mg/l).

Una vez finalizada la etapa de desinfección los explantes se sembraron en medio de cultivo líquido con sales WPM al 50%, vitaminas WPM, 3% de sacarosa, pH 5.8 dispensado en tubo y empleando el sistema de puente con papel filtro para soporte el explante y ascenso del medio por capilaridad.

Desinfección in vitro

Debido al alto porcentaje de contaminación en los explantes de *Vochysia guatemalensis* después de la introducción, se buscó un protocolo que permitiera desinfectar los explantes *in vitro*, o bien, controlar la contaminación principalmente por bacteria. Para ello, los cada uno de los explantes fue retirado del tubo de cultivo y sumergido de manera individual, durante 3 minutos, en la solución desinfectante respectiva que, a su vez fue preparada en condiciones de asepsia, con agua destilada estéril. Posteriormente se realizaron tres lavados y se sembraron los explantes en el mismo medio de introducción (WPM 50% + 3% sacarosa, pH 5.8).

Se evaluaron tres soluciones del desinfectante comercial Zerolence[®]27SL (peróxido de hidrógeno), al 100%, 50% y 30% v/v. Se sembraron 10 explantes por tratamiento y se evaluaron a las seis semanas de realizado el experimento.

Brotación

Con el objetivo de obtener un medio de cultivo que permitiera la brotación de los explantes de *Vochysia guatemalensis* se probaron seis tratamientos con sales WPM 50%, 30g/L de sacarosa, pH 5,8 y con diferentes concentraciones de kinetina (kin) y ácido giberélico (AG₃), los cuales se detallan en el cuadro 14.

Cuadro 14. Tratamientos de brotación de estacas de *Vochysia guatemalensis* en condiciones *in vitro*

Tratamiento	Composición
E1	1mg/l de kinetina
E2	3mg/l de kinetina
E3	1mg/l de kinetina + 60mg/l de AG ₃
E4	3mg/l de kinetina + 60mg/l de AG ₃
E5	60mg/l de AG ₃
E6	Control sin reguladores de crecimiento

Debido a los resultados obtenidos, principalmente, las buenas condiciones mostradas en los explantes cultivados en el tratamiento E1, se decidió repetir el ensayo y realizar modificaciones. Para ello, se conservó siempre el número de clon, se cortó la base del explante y se colocaron en tres diferentes medios de cultivo detallados en el cuadro 15.

Cuadro 15. Efecto del ácido giberélico (AG₃) y kinetina (kin) en el subcultivo de estacas brotadas de *Vochysia guatemalensis*.

Tratamiento	Descripción	# Sembrados
E1	1mg/l de Kin	16
E1 A	1mg/l de kin + 100mg/l de AG ₃	18
E7	100mg/l de AG ₃	17

Elongación

En la etapa anterior de proyecto, los brotes de *V. guatemalensis* lograron su elongación al ser cultivados durante un mes en el medio de cultivo enriquecido con 100 mg/l AG₃. La figura 12 muestra los brotes después de cuatro semanas de cultivo (imágenes superiores) y ocho semanas (imágenes inferiores) después de haber sido retiradas del medio con giberelinas.



Figura 12: Botes de *Vochysia guatemalensis* en etapa de elongación. Brotes después de cuatro semanas de cultivo (imágenes superiores) y ocho semanas después de haber sido retiradas del medio con giberelinas (imágenes inferiores).

A pesar de haber obtenido la elongación de los brotes, la calidad de los mismos dirigió la investigación a optimizar este proceso. Como se observa en la figura 12, las hojas son poco desarrolladas. Se realizó un ensayo con tres tratamientos para elongación de material de *Vochysia guatemalensis* en medio semisólido, empleando los medios detallados en el cuadro 16.

Cuadro 16. Composición de los medios de cultivo empleados para elongación de los brotes de *Vochysia guatemalensis*.

Tratamiento	Descripción del medio
SS1	WPW 50% + 1mg/l kin + 3mg/l AG3
SS2	WPW 50% + 1mg/l kin + 50mg/l AG3
SS3	WPW 50% + 1mg/l kin + 100mg/l AG3

Evaluación del Sistema de inmersión temporal (RITA)

Para la disponibilidad de material para el trabajo en RITA[®] se inició con una introducción de *Vochysia guatemalensis* proveniente del invernadero del CIB, para lo cual se modificó el protocolo de introducción de clones de esta especie, el cual se muestra a continuación junto con la modificación propuesta.

Se recolectó material mantenido en invernadero. El material se recortó en estacas de uno o dos nudos. Las estacas se lavaron con agua destilada y jabón antibacterial Bactex[®] dos veces, con una duración de 15 min por lavado en agitación. Se realizaron lavados con abundante agua destilada hasta eliminar la espuma. Los explantes se incubaron en una solución de agroquímicos conteniendo Agrymicin, Benomil y Zetarán (5 g/l de cada una) + 0.5 g/l de Amoxicilina. En cámara, se realizaron 4 lavados con agua destilada estéril. Seguidamente los explantes fueron incubados en una solución de NaOCl al 10% durante 10 min. Se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril y se incubaron de nuevo en la misma solución desinfectante pero al 30% por 10 min. Los explantes se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Se incubaron los explantes una solución de etanol al 70% durante 2 min y de nuevo se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril. Para la desinfección se agregó a los explantes una solución de HgCl₂ al 0.1% durante 15 min. Pasado este periodo, se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril. Finalmente, las estacas fueron cultivadas en medio WPM líquido al 50% con puentes de papel filtro.

Se sembraron un total de 37 explantes, los cuales fueron colocados a 25±2 °C y luz directa y fueron subcultivados cada tres semanas. Del total de explantes iniciales, se obtuvo un remanente de 2 estacas, siendo la mayor causa de pérdida la contaminación por hongo.

El medio de introducción correspondió a sales y vitaminas WPM al 50%, sin reguladores, al 3% de sacarosa y un pH de 5.8; por otra parte, el medio de subcultivo consistió en sales y vitaminas WPM al 50%, suplementado con 5 mg/l de kinetina, 10 mg/l de BAP y 100 mg/l de pantotenato de calcio, al 3% de sacarosa y un pH de 5.8.

Al ser insuficiente la brotación generada con el medio de subcultivo original, se procedió a plantear 5 tratamientos de inmersión temporal en RITA[®] con la finalidad de promoverla, los cuales se presentan en el cuadro 17; cabe destacar que por RITA[®] se colocaron 200 ml de medio de cultivo. Para todos los casos el medio contenía 3% de sacarosa y un pH de 5.8.

Cuadro 17. Composición de los tratamientos propuestos para promover la brotación de explantes de *Vochysia guatemalensis*.

Tratamiento	Sales y vitaminas	Suplementos	Clon/explante
T1	WPM, 50%	50 mg/l pantotenato de calcio 50 mg/l de AG_3	2 clones 104-3
T2	WPM, 50%	1 mg/l kinetina 50 mg/l de AG_3	1 clon 4-14 / 1 explante invernadero
T3	WPM, 50%	1 mg/l kinetina 50 mg/l de AG_3 3 ml/l PPM	1 clon 101-3
T4	WPM, 50%	50 mg/l Pantotenato de calcio 1 mg/l kinetina 3 ml/l PPM	1 clon 104-3
T5	M&S 100%	100 mg/l pantotenato de calcio 7 mg/l $AgNO_3$	1 clon 101-3

El tiempo de inmersión para los tratamientos 1 y 2 se estableció en 2 minutos en un intervalo de 12 horas, mientras que se cambió a 1 minuto cada 12 horas para los tratamientos 3, 4 y 5. La evaluación de los tratamientos de brotación se realizó transcurridas un cinco semanas desde la colocación de los explantes, con lo cual se evidenció que los explantes colocados en T1, T3 y T4 no presentaron un incremento en la brotación, el explante en T2 se contaminó con hongo y bacteria y el explante en T5 fue el único que mostró una respuesta positiva en cuanto a brotación, tal y como se presenta en la figura 13.

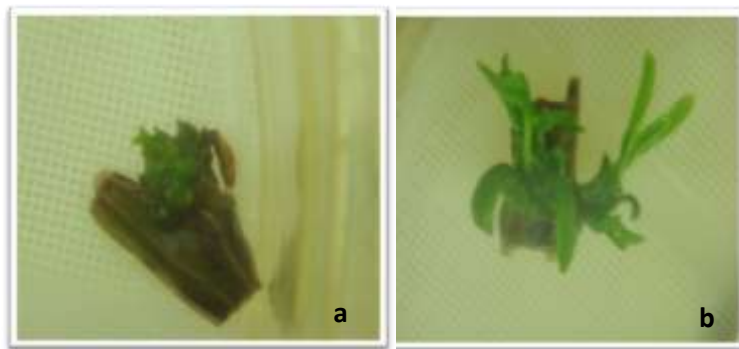


Figura 13. Explantes de *Vochysia guatemalensis* en RITA[®]: a) Clon 101-3 en medio T3 (1 mg/l kinetina + 50 mg/l de AG_3 + 3 ml/l PPM , b) Clon 101-3 en medio T5 (MS + 100 mg/l pantotenato de calcio + 7 mg/l $AgNO_3$).

La concentración de nitrato de plata en el medio T5 se mostró como el suplemento favorecedor de la brotación de *V. guatemalensis*, y su utilización en este ensayo respondió a la sugerencia de los autores Parimalan, Giridhar y Ravishankar (2011), para la elongación de brotes de *Bixa Orellana* (achiote), en una concentración de 40 μ M en medio M&S, es decir, aproximadamente 7 ml/l. El nitrato de plata es una sal inorgánica, que actúa como antiséptico y desinfectante.

Una vez concluido el tiempo del ensayo de brotación, se procedió a trasladar los explante de T3 y T4 al medio T5, para promover la brotación, mientras que con el explante procedente de T5 se realizó una prueba de cambio de medio para corroborar si con la adición de BAP como regulador, era posible promover la elongación de los brotes. Además ya se contaba con nuevos explantes brotados provenientes de introducciones y subcultivos anteriores de clones, por lo que en el cuadro 15 se muestra la distribución de los mismos. Los explantes fueron sometidos a una inmersión de 1 minuto cada 12 horas en 200 ml de medio de cultivo.

La evaluación de los explantes en proceso de brotación y elongación se realizó a las cinco semanas después de montados los tratamientos, y los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 15.

El medio S1T5 consistió de sales y vitaminas M&S al 100%, 1 mg/l de BAP y 100 mg/l de pantotenato de calcio, al 3% sacarosa y un pH de 5.8. No obstante este tratamiento (RITA 6) generó una multibrotación, probablemente debido a que la benzilaminopurina (BAP) es una citocinina que promueve la formación de brotes (Vilchez *et al.*, 2009). Lo anterior se respalda con las imágenes de la figura 9.

Cuadro 15. Distribución de clones de *Vochysia guatemalensis* en RITA® con medio de brotación T5 y medio S1T5.

RITA®	Medio	Clon/Explante
1	T5	2 de invernadero
2	T5	2 clones 19-8
3	T5	2 clones 36-1
4	T5	2 clones 119-2
5	T5	2 clones 101-3
6	S1T5	1 de clon 101-3 en dos partes, proveniente de T5
7	T5	1 clon 41-3
8	T5	1 clon 119-8
9	T5	2 clones 104-3

Cuadro 16. Resultados del tratamiento de brotación T5(MS + 100 mg/l pantotenato de calcio + 7 mg/l AgNO₃) y medio S1T5 (M&S al 100%, 1 mg/l de BAP y 100 mg/l de pantotenato de calcio, al 3% sacarosa y un pH de 5.8) en explantes de *Vochysia guatemalensis* en RITA®.

RITA®	Resultado de la evaluación
1	Brotación alta
2	Brotación media
3	Brotación baja
4	Contaminación con hongo
5	Oxidación de explantes
6	Multibrotación
7	Contaminación con hongo
8	Brotación baja
9	Oxidación de explantes

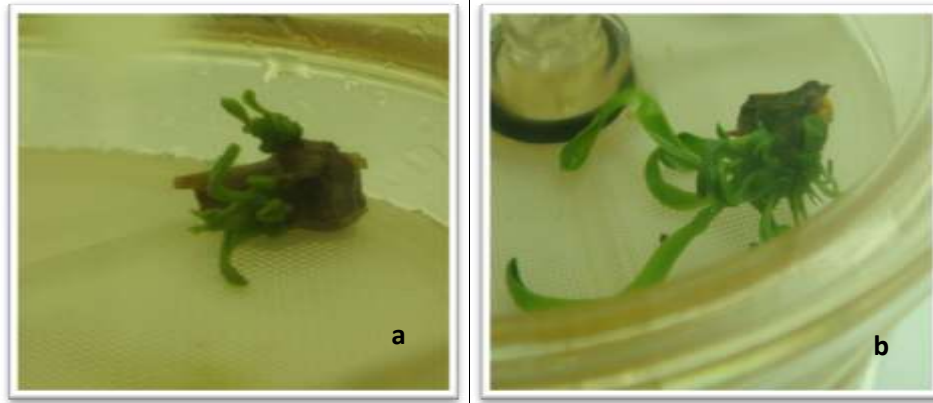


Figura 14. Explantes de *Vochysia guatemalensis* en RITA 6 con medio de S1T5: a) Explante al inicio del tratamiento, b) Explante al final del tratamiento.

En las figuras 15, 16, 17 y 18 se muestran las imágenes comparativas entre la apariencia de los explantes en las RITA 1, 2, 3 y 8 al inicio del tratamiento y al concluir el mismo.

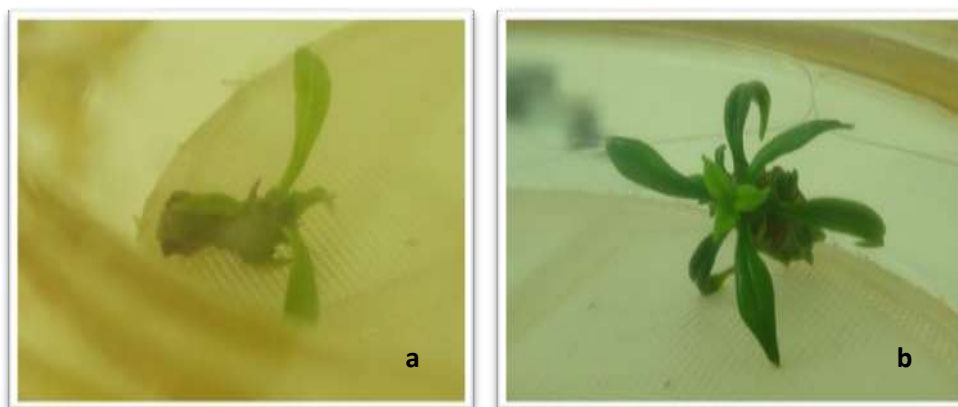


Figura 15. Explantes de *Vochysia guatemalensis* en RITA 1 con medio de T5: a) Explante al inicio del tratamiento, b) Explante al final del tratamiento.

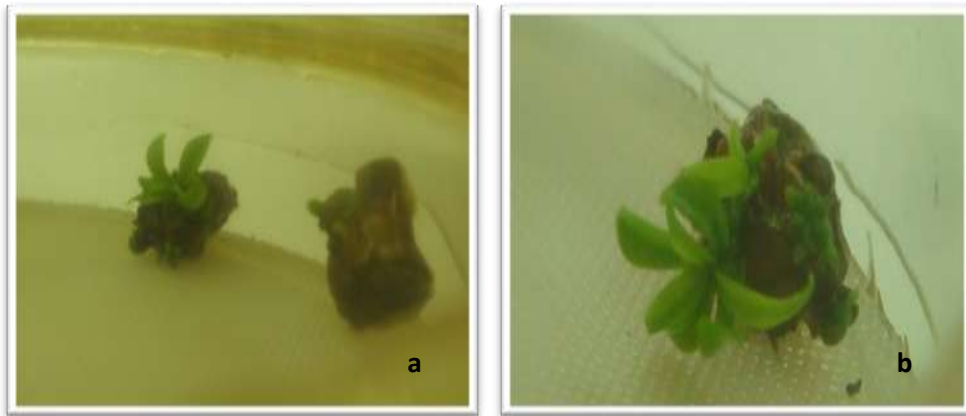


Figura 16. Explantes de *Vochysia guatemalensis* en RITA 2 con medio de T5: a) Explante al inicio del tratamiento, b) Explante al final del tratamiento.

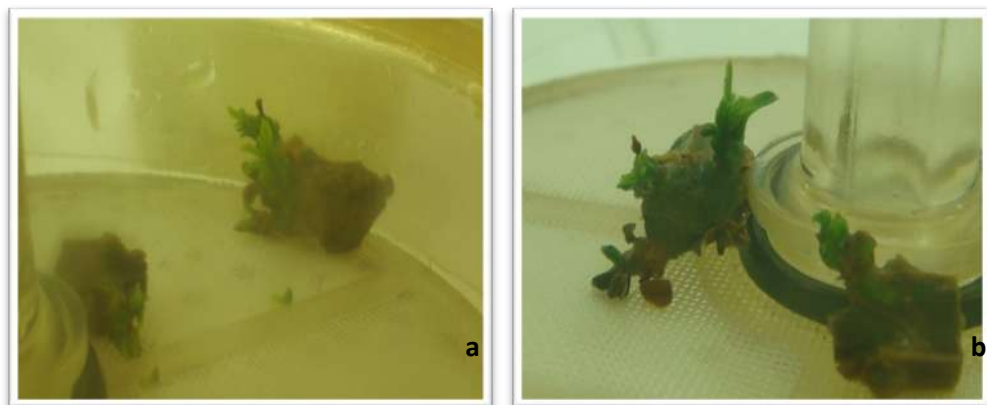


Figura 17. Explantes de *Vochysia guatemalensis* en RITA 3 con medio de T5: a) Explante al inicio del tratamiento, b) Explante al final del tratamiento.

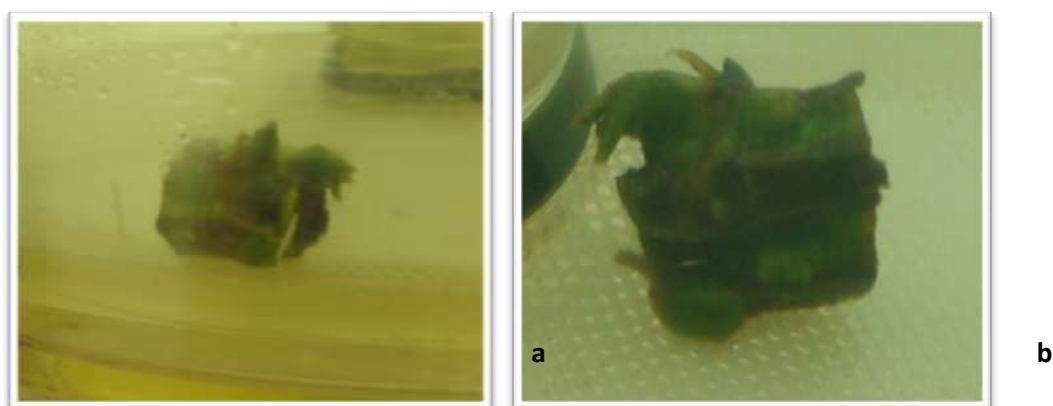


Figura 18. Explantes de *Vochysia guatemalensis* en RITA 8 con medio de T5: a) Explante al inicio del tratamiento, b) Explante al final del tratamiento.

Una vez concluido el período de cinco semanas para la promoción de la brotación, los explantes sobrevivientes se emplearon en el montaje de tres tratamientos en RITA[®] para la elongación de los brotes, como se detalla en el cuadro 16. Estos explantes serán evaluados en cinco semanas para corroborar la respuesta generada. Al igual que en tratamientos anteriores, por RITA[®] se colocaron 200 ml de medio de cultivo y la inmersión es de 1 minuto cada 12 horas. Además todos los medios contienen 3% de sacarosa y pH de 5.8.

Cuadro 16. Composición de los tratamientos propuestos y distribución de clones para promover la elongación de explantes de *Vochysia guatemalensis* en RITA[®]

RITA [®]	Procedencia de explantes	Medio	Sales y vitaminas	Suplementos
10	RITA 1	S2T5	MS 100%	50 mg/l de pantotenato de calcio 10 mg/l de AG ₃
12	RITA 3			
11	RITA 2	S3T5	MS 100%	50 mg/l de pantotenato de calcio 10 mg/l de AG ₃ 1 mg/l AgNO ₃
13	RITA 6			
14	RITA 8	S4T5	MS 100%	50 mg/l de pantotenato de calcio 0.5 mg/l de BAP 1 mg/l AgNO ₃

Estos explantes serán evaluados en términos de elongación en un período de cinco semanas. Se esperaría lograr una adecuada brotación reduciendo los niveles de hormonas en el medio, con respecto a los tratamientos de brotación, incluso un resultados muy positivo sería lograr la elongación de los explantes en un medio completamente libre de reguladores, por lo que parte de este último ensayo consiste en evaluar en un período también de cinco semanas, la respuesta de dos explantes, uno de la RITA 1 (invernadero) y otro de la RITA 6 (101-3), en tubos de ensayo con 20 ml de medio semisólido M&S al 100% de sales y vitaminas, pH 5.7 y 3% sacarosa, como se muestra en la figura 18.

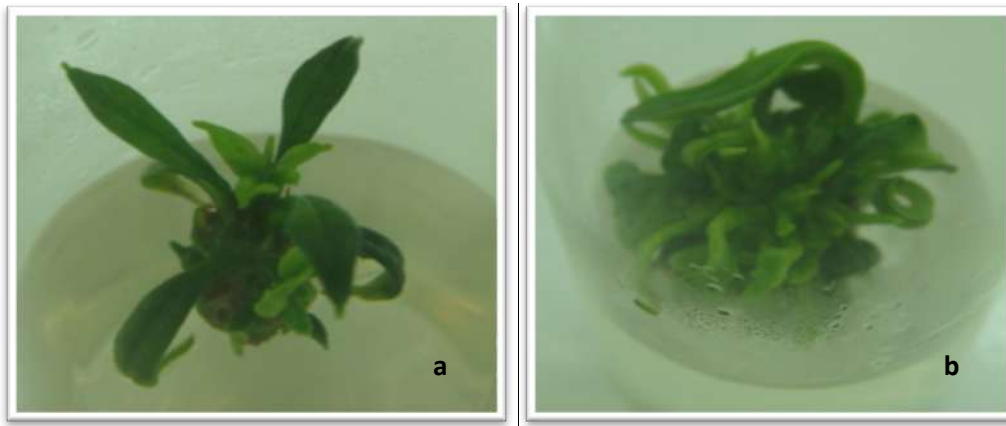


Figura 18. Explantes de *Vochysia guatemalensis* en medio M&S semisólido sin reguladores: a) Explante proveniente de RITA 1, b) Explante proveniente de RITA 6.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Introducción de material in vitro

De los tratamientos evaluados, no se ha logrado obtener material completamente limpio, ya que la mayor parte del mismo se presentó una bacteria con el tiempo de cultivo. Se han presentado contaminantes por hongo y bacteria las primeras semanas después de la introducción, mientras que en algunos casos, el material que aparentemente se encontraba limpio en las primeras evaluaciones (de los siete a los 21 días), evidenció la contaminación después de este periodo de cultivo, principalmente bacteriana, por lo cual se catalogaron como contaminantes endógenos.

En el cuadro 17 se muestran los resultados de los diferentes tratamiento de desinfección de estacas de *Vochysia guatemalensis* evaluados a los 21 días de cultivo responsables de las mayores pérdidas por contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas (Carranza *et al.* 2003).

Cuadro 17. Evaluación de tratamientos de desinfección para introducción de estacas de *V. guatemalensis*.

Tratamiento	Sembrados	Contaminación			Oxidación	Remanente	% Éxito
		%H	B	HB			
VT0	790	37,34	3,67	-	52,28	53	6,71
VT1	16	18,75	12,50	-	68,75	0	0,00
VT2	71	47,89	4,23	-	42,25	4	5,63
VT3*	10	50,00	30,00	-	20,00	0	0,00
VT4	81	35,80	35,80	2,47	25,93	0	0,00
VT5	29	55,17	17,24	10,34	10,34	2	6,90
VT6	10	60,00	-	20,00	10,00	1	10,00
VT7	9	66,67	22,22	-	11,11	0	0,00
VT8	37	45,95	18,92	8,11	16,22	4	10,81
VT9	12	8,33	41,67	25,00	8,33	2	16,67
VT10	182	36,26	19,78	4,40	35,71	7	3,85
VT11	61					0	

* Material proveniente de invernadero.

Las principales limitantes del establecimiento *in vitro* de explantes procedentes de plantas leñosas son presencia de microorganismos contaminantes y la oxidación de los explantes causada tanto por el efecto de los desinfectantes causado directamente sobre el material vegetal, como por la liberación de compuestos fenólicos provocada por el estrés del proceso de esterilización y corte de los segmentos introducidos (Biasi *et al.*, citado por Borges *et al.*, 2004; Azofeifa, 2009) (figura 19)

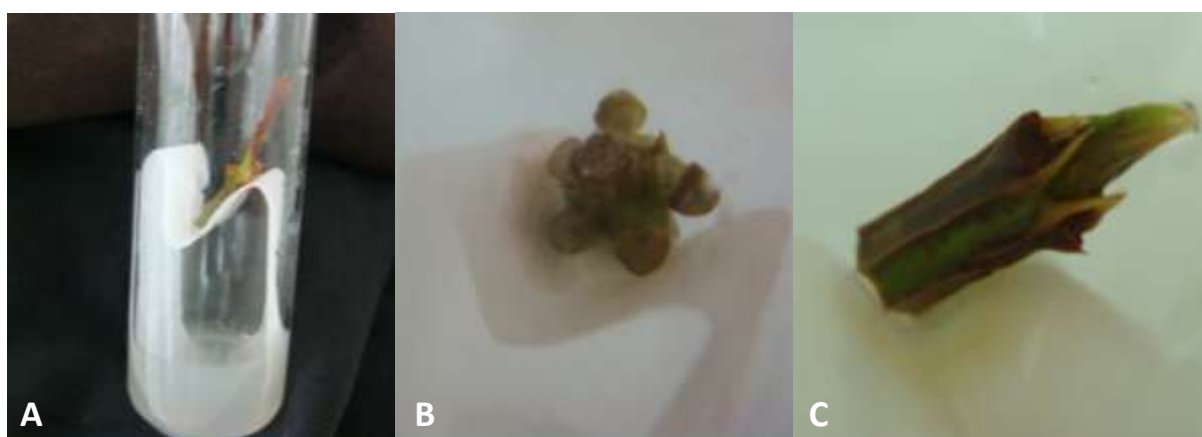


Figura 19. Principales limitantes del proceso de introducción de *V. guatemalensis*. A: Contaminación con bacteria endógena en el medio de cultivo. B: Hongo sobre el soporte. C: Oxidación del explante.

La presencia de bacterias endógenas en el cultivo de *V. guatemalensis* es esperado desde la perspectiva de que este tipo de contaminantes son frecuentes en cultivos *in vitro* iniciados a partir de explantes tomados de árboles adultos crecidos en campo; en el caso de las bacterias, pueden tardar en aparecer en el cultivo debido a que generalmente se mantienen latentes por semanas o incluso meses, hasta que los mecanismos de resistencia de las plantas *in vitro* se debiliten o surjan cambios en el medio ambiente del frasco de cultivo que favorezcan su crecimiento visible, incluso se reporta que la presencia de citocininas puede inhibir su crecimiento (Carranza *et al.* 2003 y Marín *et al.*, 2011).

Como respuesta a la presencia de contaminantes endógenos en los explantes, se proponen prácticas de cultivo que permitan reducir la carga de contaminantes, tales como el subcultivo frecuente y por períodos cortos de los explantes.

Además, Marín *et al* (2011), lograron inhibir por completo el crecimiento microbiano en una variedad de manzano, mediante tres subcultivos sucesivos de los ápices en medio de cultivo con antibiótico (cefotaxima concentración de 150 mg/l), a partir de los cuales no se detectó ningún crecimiento bacteriano en el medio ni en placas PYGA.

La adición de antibióticos al medio de cultivo, es una práctica viable que puede probarse en *V. guatemalensis* como mecanismo para reducir la carga bacteriana o bien eliminar la contaminación, tomando en cuenta las variaciones en los métodos de desinfección que se han realizado en los últimos ensayos (George *et al.* 2008).

Para ello deben realizarse ensayos de aislamiento de las bacterias endógenas más comunes en la especie y sensibilidad a antibióticos (Reed *et al.*, 1995).

Es importante mencionar que se obtuvo brotación en las estacas introducidas *in vitro*, inclusive en medio sin reguladores de crecimiento y que la presencia de bacteria endógena limita la aparición de brotes (figura 20).



Figura 20. Estacas de *Vochysia guatemalensis* introducido *in vitro* en proceso de brotación a los 15 días de realizada la introducción.

Desinfección *in vitro*

La desinfección del material introducido *in vitro*, empleando el producto comercial Zerotolerance® 27SL, redujo la carga bacteriana en los explantes, sin embargo, no logró eliminar por completo la contaminación endógena presente en los mismos. Los resultados de la evaluación se muestran en el cuadro 18.

Cuadro 18. Resultado de los tratamientos de desinfección de explantes de *Vochysia guatemalensis* establecidos *in vitro* a las 6 semanas de realizado.

Tratamiento	Descripción	Total sembrados	Éxito de la desinfección	Explantos limpios	
				Brotación	Oxidación
D1	Zt 100% 3 min + Lavado	11	64%	29%	43%
D2	Zt 50% 3 min + Lavado	10	50%	80%	20%
D3	Zt 15% 3 min + Lavado	10	20%	100%	0%

El Zerotolerance®, posee como ingrediente activo el peróxido de hidrógeno (27%), el cual actúa como fungicida, alguicida y bactericida de amplio espectro. Su actividad antimicrobiana está basada en su potente poder oxidante, que le permite reaccionar con grupos sulfhidrilo y dobles enlaces en proteínas y lípidos, afectando por lo tanto a la membrana citoplasmática. Puede además inducir la formación de radicales libres que actúan contra el ADN, lípidos y otros componentes celulares esenciales (Block, citado por Perera *et al.*, 2012).

Estos resultados muestran que, si bien el tratamiento D1 presenta un mayor porcentaje de desinfección, se reduce el porcentaje de brotación de los explantes y aumenta la oxidación de los mismos. Esto puede deberse a la acción fitotóxica del agente desinfectante sobre el explante, que es en muchas ocasiones, el responsable de acentuar el problema de oscurecimiento en los mismos (Aliyu, 2005). Es importante mencionar que los explantes, ya fueron sometidos a otro tratamiento de desinfección previo, con detergentes, como el hipoclorito de sodio y alcohol que remueven las ceras naturales que protegen el explante, permitiendo una mayor absorción de los desinfectantes pero a la vez haciéndolos más susceptibles a los daños por oxidación (Lallana *et al* 2006).

Por otra parte, el tratamiento D3 muestra un porcentaje de desinfección bajo (20%), y brotación de 100%, de lo cual se puede inferir que los microorganismos contaminantes no afectan específicamente la etapa de brotación de los explantes, sin embargo, el objetivo del proyecto es contar con material limpio por completo de los mismos.

Como consecuencia, el tratamiento D2, muestra un mejor balance entre la cantidad de explantes libres de contaminantes y la brotación de los mismos, es decir, el proceso de desinfección no provoca un daño profundo en las yemas que impida su posterior brotación.

Con los subcultivos, se notó que la aparición de una bacteria endógena en todos los tratamientos, lo cual indica que la desinfección superficial reduce la carga bacteriana, pero no es suficiente para obtener material libre de contaminantes.

Brotación

Los tratamientos denotados como E1 (suplementado con 1mg/l de Kinetina) y E5 (60mg/l de AG₃) mostraron los mejores resultados de brotación con porcentajes de 63,6 y 66,6% respectivamente según se muestra en el cuadro 19.

Cuadro 19. Evaluación del ensayo de brotación de estacas de *Vochysia guatemalensis* en condiciones *in vitro*

Tratamiento	Brotos	Oxidación	Pérdidas	Total	%Brotación
E1	7	4	0	11	63,6
E2	4	4	3	11	50,0
E3	5	5	0	10	50,0
E4	5	6	0	11	45,4
E5	4	2	0	6	66,6
E6	2	6	0	8	25,0

Los explantes provenientes del tratamiento E1 se muestran en mejores condiciones, es decir, con brotes más desarrollados y, en apariencia, más saludables, por lo cual se decidió repetir el ensayo y realizar modificaciones (figura 21). Para ello, se conservó siempre el número de clon, se cortó la base del explante y se colocaron en tres diferentes medios de cultivo detallados en el cuadro 20.

Cuadro 20. Evaluación del efecto de la kinetina (kin) y el ácido giberélico (AG₃) en la brotación de estacas de *Vochysia guatemalensis* en condiciones *in vitro*

Tratamiento	Descripción	# Sembrados	% Brotación	% Brotes grandes *	% Elongación
E1	1mg/l de Kin	16	68,75	12,50	0
E1 mod	1mg/l de kin + 100mg/l de AG ₃	18	66,67	16,67	0
E7	100mg/l de AG3	17	64,71	11,76	0

* Con más de tres hojas formadas. Todos los medios se prepararon con las sales WPM al 50% + PPM 3ml/L + 3% sacarosa

Mediante el análisis estadístico ANOVA empleando el programa Minitab 15.1.0.0, se determinó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, es decir, la presencia de AG₃ en el medio de cultivo no provoca cambios significativos en la brotación de los explantes.



Figura 21. Brotes de *Vochysia guatemalensis* en explantes introducidos *in vitro* en medio de cultivo con sales WPM 50% + 5mg/l de kinetina + 10 mg/l de BAP.

Elongación

Con base en los resultados obtenidos se puede inferir que el uso de RITA's para la obtención de brotes saludables sería muy recomendable. Una vez obtenidos los brotes, los cuales mostraron una calidad sobresaliente, su transferencia a medio semisólido para la elongación sería lo recomendable.

En cada uno de los medios de cultivo evaluados, los brotes conservaron su coloración verde y apariencia saludable, sin embargo no se obtuvo elongación de los mismos, es decir, crecen similares a rosetas y no se obtienen entrenudos alargados como se muestra en la figura 22.



Figura 22. Estacas de *V. guatemalensis* en medio de elongación. Crecimiento de los brotes en roseta.

Este comportamiento pudo deberse a la ausencia de la señal hormonal necesaria para desencadenar la división celular de las células en el meristemo respectivo o bien, el crecimiento de las células de la zona de elongación.

Por lo general, las auxinas son las fitohormonas que influyen tanto la división, como el crecimiento y diferenciación celular sin embargo, la elongación de los tallos, requiere de un balance en la concentración hormonal en el medio de cultivo, principalmente de auxinas y citocininas, ya que los explantes poseen niveles endógenos de reguladores del crecimiento, especialmente poliaminas, los cuales actúan como cofactores morfogénicos (Sánchez *et al.*, 2002; Jordán y Casaretto, 2006). En algunas ocasiones,

se dificulta encontrar el tipo de hormona y la concentración exógena necesaria para la elongación de los brotes en condiciones *in vitro*, ya que altas concentraciones pueden causar un efecto inhibitorio de este proceso, mientras que la reducción de los niveles, ya sea de auxina o citoquinina, tiene efectos distintos Sánchez *et al.*, 2004).

Por otra parte, la presencia de bacterias endógenas en el cultivo puede afectar tanto el crecimiento de brotes como a la organogénesis de brotes y raíces adventicias; como en el caso de manzano, donde se determinó que el inhibir el crecimiento bacteriano por medio de antibióticos, mejora el crecimiento en los brotes y la expansión de las hojas (Marín *et. al.*, 2011).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en este año de investigación en *Terminalia amazonia* y *Vochysia guatemalensis* mostraron la factibilidad de introducir, brotar las estacas e inducir la elongación de los brotes producidos. Sigue siendo la etapa de establecimiento *in vitro* de las especies la más limitante. El material de campo, por coexistir por años con otros organismos en su ambiente natural, desarrollan relaciones estrechas con ellos y esto resulta en la necesidad de aplicar desinfecciones muy drásticas a los explantes, lo que conduce a daños severos y fuertes oxidaciones. Por lo anterior es importante lograr un equilibrio entre concentración y tipo de desinfectantes y daño al explante, de manera que un porcentaje razonable de material experimental resulte aséptico, con oxidación de moderada a leve y sea capaz de brotar. Estas consideraciones son importantes ya que no siempre es posible mantener el material de interés en invernadero.

Debido a que una vez establecidos *in vitro*, después de un mes o más de cultivo, los explantes muestran contaminación por hongos, pero principalmente por bacterias, la desinfección *in vitro*, utilizando los desinfectantes estériles, combinado este procedimiento con subcultivos sucesivos y por períodos cortos en medio de cultivo con antibióticos con lo cual podría eliminarse la bacteria endógena que se presenta.

El uso de otros sistemas de cultivo, adicionales al medio semisólido y líquido sobre puente de papel filtro, por ejemplo, el sistema de inmersión temporal en el periodo de elongación y multiplicación de brotes es recomendable para *Vochysia guatemalensis*, no así para *Terminalia amazonia*, que por su alta susceptibilidad a la oxidación no resistió este tipo de sistema de cultivo.

Se logró la elongación y multiplicación de los brotes de *Terminalia amazonia*, utilizando diferentes reguladores de crecimiento y sus combinaciones, sin embargo, el lento crecimiento de estos brotes parece direccionar la investigación a acelerar el periodo de crecimiento de la especie. También fue factible la desinfección de semillas de *Terminalia amazonia* empleando hipoclorito de sodio en concentraciones bajas, lo cual no afectó la viabilidad de las mismas y permitió tener material para realizar ensayos de multiplicación y cultivo *in vitro* de esta especie. Lo más recomendable en esta etapa de la investigación es la adquisición de semillas con mayores porcentajes de viabilidad, ya que esta especie parece tener semilla recalcitrante. En estos casos es importante la manipulación de las mismas desde el momento de la cosecha a su

ingreso al laboratorio, ya las semillas recalcitrantes pierden su capacidad de germinación en pocos días.

AGRADECIMIENTO

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), a la Fundación para el Desarrollo de la Cordillera Volcánica Central (FUNDECOR) y al MICIT-CONICIT por el apoyo financiero para el desarrollo de esta investigación. A los Estudiantes-asistentes del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del ITCR por su ayuda en las múltiples labores rutinarias que se requirieron durante el periodo de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Alice, F., Montagnini, F., Montero, M. 2004. Productividad en plantaciones puras y mixtas de especies forestales nativas en la estación biológica La Selva, Sarapiquí, Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 28(2):61-71
- Aliyu, O. 2005. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: An appraisal. *African Journal of Biotechnology* 4(13): 1485-1489.
- Alonso, M.M. 2002. Biotecnología aplicada a mejora de *Pelargonium* sp. Trabajo de graduación para optar por el grado de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175
- Borges, M., Ros, C., Castellanos, Y., Milanes, S., Velásquez, R. 2004. Efecto de diferentes métodos de desinfección en el establecimiento *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth. *Biotecnología Vegetal* Vol. 4, No. 4: 237 - 242
- Carranza, D., Herrera, L., Mollinedo, N, Suárez, N., Arboláez, I. 2003. Detección de contaminantes bacterianos y fúngicos endógenos en el establecimiento de *Musa* spp. *Biotecnología vegetal* 3(1): 49-52
- Chinchilla, I. 2008. Establecimiento y cultivo *in vitro* de *Pouteria sapota* (Jacquin) H.E. Moore & Stearn. Trabajo final de graduación para optar por el grado de Licenciada, Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología.
- Cisne, J.D; I, Muñoz & H, Reyes. *sf*. Reguladores de crecimiento, L-cisteína y ácido ascórbico en el cultivo *in vitro* de mora (*Rubus glaucus* Benth). Disponible en: <http://cenida.una.edu.ni/calera/calera8/tema10.pdf>. Consultado el 1 de junio de 2011.
- Concepción, O; L, Nápoles; A, Pérez; M, Hernández; N, Peralta & R, Trujillo. 2005. Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.), relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. *Revista Cultivos Tropicales*. Vol 26. No 1. pp 33 – 39.
- George, E; Hall, MA; De Klerk, G. 2008. *Plant propagation by tissue culture*. 3 ed. Springer. Netherlands p. 1-3.

- Jordán, M., Casaretto, J 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. EN: Fisiología Vegetal. F.A. Squeo, L. Cardemil. La Serena, Chile. Ediciones Universidad de La Serena. Cap 15 (s.p.)
- Lallana M C., Billard, CE., Elizalde, J H., Lallana, V H. 2006. Breve revisión sobre características de la cutícula vegetal y penetración de herbicidas. Ciencia, Docencia y Tecnología 33:229-241.
- Marín, J.A., Boudabous, M., Lorente, P., García, E , Andreu, P., Arbeloa, A. 2011. Saneamiento *in vitro* de 'Douce de Djerba', una variedad de manzano micropropagada. Oficina Nacional de Semillas. 2003. En línea. Consultado el 28 de diciembre, 2013. Disponible en http://www.ofinase.go.cr/index.php?option=com_content&view=article&id=91&Itemid=131
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15: 473-497
- Perera, S., Hernández, J., Piedra Buena, A., Duque, M. 2012. Eficacia *in vitro* del peróxido de hidrógeno sobre especies fúngicas componentes del complejo de la pudrición de corona (*crown rot*) del plátano. En línea. Consultado 30 de enero, 2013. Disponible en http://www.agrocabildo.org/publica/Publicaciones/subt_447_corona_pl%C3%A1tano.pdf
- Reed, B., Buckley, P., DeWilde, T. 1995. Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. 31(1): 53-57
- Sánchez, M., Ríos, D., Revilla, M., Rodríguez, R. 2002. Participación de poliaminas endógenas en el desarrollo de injertos y brotes epicórmicos de nogal. *Agrociencia*. 17 (2):215-219.
- Sánchez, M. Ríos, D., Pedraza, M., Pereira, G., Castellanos, H., Escobar, R. 2004. Propagación *in vitro* de *Nothofagus procera* ((Poepp. et Endl.) Oerst.) a partir de embriones aislados. Bosque (Valdivia). 25(1):123-128.
- SINAC-Gerencia de Manejo de Recursos Naturales. 2012. En línea. Disponible en http://www.sirefor.go.cr/index.php?option=com_content&view=article&id=34&Itemid=63 Consultado el 04 de febrero, 2013.

- Kowalski, B & J. van Staden. 2001. *In vitro* culture of two threatened South African medicinal trees – *Ocotea bullata* and *Warburgia salutaris*. *Plant Growth Regulation* 34: 223–228.
- Monzon, J. 2005. Propagación *in vitro* de pinabete (*Abies guatemalensis* Rehder) por medio de la multiplicación de ápices de brote. Trabajo de Graduación para optar por el grado de Licenciado, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Quesada, R. 2004. Consideraciones silviculturales de ocho especies forestales con poblaciones reducidas o en peligro de extinción en la provincia de Guanacaste. (en línea). Kurú: Revista Forestal. 1(1): 1-15. Consultado 22 de noviembre de 2005. Disponible en <http://www.itcr.ac.cr/publicaciones/revistakuru/pdfQUESADA>.
- Romero, D. 2004. Cultivo *in vitro* de Guayaba (*Psidium guajava* L). Proyecto de Investigación, Universidad Autónoma Chapingo, México