

U N I V E R S I D A D D E C O N C E P C I O N
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
Departamento Silvicultura



**EL MICROINJERTO COMO METODO DE REVIGORIZACION VEGETAL:
APLICACION EN CLAVEL (*Dianthus caryophyllus*)**

MEMORIA PARA OPTAR
AL TITULO DE
INGENIERO FORESTAL.

**CONCEPCION - CHILE
2000**

"EL MICROINJERTO COMO METODO DE REVIGORIZACION VEGETAL:

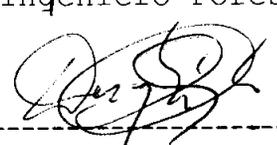
APLICACIÓN EN CLAVEL (*Dianthus caryophyllus*)".

Profesor Asesor



Manuel Sánchez Olate
Profesor Asistente;
Ingeniero Forestal; Dr.

Profesor Asesor



Darcy Ríos Leal
Profesor Asociado;
Prof. Biol. y Quím.; Dra.

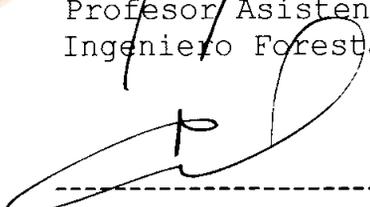
Director
Departamento Silvicultura





Manuel Sánchez Olate
Profesor Asistente;
Ingeniero Forestal; Dr.

Decano Facultad de
Ciencias Forestales



Fernando Drake Aranda
Profesor Asociado;
Ingeniero Forestal.

Calificación de la memoria de título:

Manuel Sánchez: cien puntos.
Darcy Ríos : cien puntos.



A Dios
A mis padres
A mis hermanos

Agradecimientos

A mis profesores Manuel Sánchez y Darcy Ríos por sus enseñanzas, su constante apoyo y comprensión durante ésta etapa.

A proyecto FONDEF D97-F1059.

A Francisco Gallardo por proporcionarme el material vegetal que fue la base de mi trabajo.

A mis hermanos Maca y Pablito, y a Sussan por estar siempre a mi lado en forma incondicional con cariño y preocupación.

A mis queridos amigos, Lorena, Paulo, Piolo, Mauricio, Hernán y Marcos, que durante estos años universitarios aprendimos a conocernos y a darnos cuenta que los verdaderos amigos existen.

A un amigo muy especial por estar conmigo en todo momento.

INDICE DE MATERIAS

CAPITULOS	PAGINA
I INTRODUCCION.....	1
1.1 Partes de una planta involucrada en el microinjerto.....	2
1.2 Obtención de patrones.....	3
1.3 Función del medio de cultivo.....	3
II MATERIALES Y METODOS.....	6
2.1 Material de origen.....	6
2.2 Limpieza del material vegetal.....	6
2.2.1 Aplicación de fungicida.....	6
2.2.2 Asepsia material vegetal.....	6
2.3 Medio de cultivo.....	7
2.4 Repique del material cultivado.....	7
2.5 Descripción de la técnica de microinjerto.	8
2.5.1 Patrón con un microinjerto.....	8
2.5.2 Patrón con tres microinjertos.....	8
2.5.3 Fotoperíodo de los explantes microinjertados.....	9
2.6 Diseño experimental.....	9
2.6.1 Patrón con un microinjerto.....	9
2.6.2 Patrón con tres microinjertos.....	10
III RESULTADOS Y DISCUSION.....	11

3.1	Efectos del método de asepsia utilizado en los meristemas de material adulto.....	11
3.1.1	Necrosis de material adulto por asepsia inadecuada.....	11
3.1.2	Viabilidad de explantes para el repique de material.....	12
3.2	Patrón con un microinjerto.....	14
3.2.1	Crecimiento de la púa.....	14
3.2.2	Número de verticilos nuevos.....	19
3.2.3	Número de brotes nuevos.....	23
3.3	Patrón con tres microinjertos.....	27
3.3.1	Crecimiento de la púa.....	27
3.3.2	Número de verticilos nuevos.....	31
3.3.3	Número de brotes nuevos.....	34
3.4	Viabilidad de microinjerto simple y triple.....	37
3.4.1	Viabilidad de la púa.....	37
3.4.2	Viabilidad del patrón.....	39
IV	CONCLUSIONES.....	41
V	RESUMEN.....	42
VI	SUMMARY.....	43
VII	BIBLIOGRAFIA.....	44
VIII	APENDICE.....	46

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	PAGINA
<u>En el Apéndice</u>	
1 Porcentaje de contaminación en el cultivo de material adulto, en un medio con y sin reguladores de crecimiento.....	47
2 Porcentaje de explantes vivos, vivos sanos, contaminados con hongos y/o bacteria, y viables para el repique, de material adulto cultivado en un medio MS con reguladores de crecimiento.....	47
3 Datos de crecimiento (mm), para injertos simples con distintas condiciones de luz, a los 21 y 40 días realizado el injerto.....	48
4 Modelo lineal general utilizado para definir las diferencias significativas de los distintos tratamientos, para crecimiento en injerto simple.....	48
5 Test múltiple de Duncan, para la variable crecimiento, con un alfa de 0,05, y grado de libertad 18, en injerto simple.....	49

6	Datos de número de nuevos verticilos, para injertos simples con distintas condiciones de luz, a los 21 y 40 días realizado el injerto.....	49
7	Modelo lineal general utilizado para definir las diferencias significativas de los distintos tratamientos, para número de verticilos en injerto simple.....	50
8	Test múltiple de Duncan, para la variable número de verticilos, con un alfa de 0,05, y grado de libertad 18, en injerto simple.....	50
9	Datos de número de nuevos brotes, para injertos simples con distintas condiciones de luz, a los 21 y 40 días realizado el injerto.....	51
10	Modelo lineal general utilizado para definir las diferencias significativas de los distintos tratamientos, para número de brotes en injerto simple.....	51
11	Test múltiple de Duncan, para la variable número de brotes, con un alfa de 0,05, y grado de libertad 18, en injerto simple.....	52
12	Datos de crecimiento (mm), para injertos triples con distintas condiciones de luz, a	

	los 21 y 40 días realizado el injerto.....	52
13	Modelo lineal general utilizado para definir las diferencias significativas de los distintos tratamientos, para crecimiento en injerto triple.....	53
14	Test múltiple de Duncan, para la variable crecimiento, con un alfa de 0,05, y grado de libertad 18, en injerto triple.....	53
15	Datos de número de nuevos verticilos, para injertos triples con distintas condiciones de luz, a los 21 y 40 días realizado el injerto.....	54
16	Modelo lineal general utilizado para definir las diferencias significativas de los distintos tratamientos, para número de verticilos en injerto triple.....	54
17	Test múltiple de Duncan, para la variable número de verticilos, con un alfa de 0,05, y grado de libertad 18, en injerto triple.....	55
18	Datos de número de nuevos brotes, para injertos triples con distintas condiciones de luz, a los 21 y 40 días realizado el injerto.....	55

19	Modelo lineal general utilizado para definir las diferencias significativas de los distintos tratamientos, para número de brotes en injerto triple.....	56
20	Test múltiple de Duncan, para la variable número de brotes, con un alfa de 0,05, y grado de libertad 18, en injerto triple.....	56
21	Viabilidad de la púa en los distintos tratamientos, para injerto simple como para injerto triple, en la sexta semana de medición.....	57
22	Viabilidad de los patrones en los distintos tratamientos, tanto para injerto simple como triple, en la sexta semana de medición.....	57

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	PAGINA
<u>En el texto</u>	
1 Porcentaje de contaminación de explantes cultivados en medio MS, con y sin hormonas....	12
2 Porcentaje de explantes viables sanos y contaminados con bacterias, y los no viables contaminados con hongo, a 15 y 30 días realizado el cultivo.....	13
3 Crecimiento de la púa en los distintos tratamientos según su posición sobre el patrón (apical, medio y basal) y por condiciones de luz (L1, luz; L0, oscuridad), a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.....	15
4 Distintas posiciones de púas sobre patrones a los 40 días realizado el microinjerto. a) apical en luz; b) apical en oscuridad; c) media en luz; d) media en oscuridad; e) basal en luz; f) basal en oscuridad.....	16
5 Crecimiento de la púa por posición sobre el patrón (apical, medio y basal) a los 21 y 40 días de realizado el microinjerto.....	17

6	Crecimiento de la púa por factor luz, L1 (16 h fotoperíodo) y L0 (oscuridad), a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.....	18
7	Número de nuevos verticilos de la púa en los distintos tratamientos por posición del injerto en el patrón y condiciones de luz (L1, L0), a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.....	20
8	Tratamientos de la púa en distintas posiciones sobre el patrón, y expuestas o no a la luz. a) apical con luz; b) apical en oscuridad; c) media con luz; d) media en oscuridad; e) basal con luz; f) basal en oscuridad.....	21
9	Número de nuevos verticilos de la púa por posición del injerto en el patrón a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.....	22
10	Número de nuevos verticilos de la púa por factor luz (L1; L0), a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.....	23
11	Número de brotes de la púa en los distintos tratamientos por injerto y por luz (L1; L0), a los 21 y 40 días realizado el microinjerto....	24
12	Tratamientos de la púa en distintas posiciones sobre el patrón, y expuestas o no a la luz. a)	

	apical con luz; b) apical en oscuridad; c) media con luz; d) media en oscuridad; e) basal con luz; f) basal en oscuridad.....	25
13	Número de brotes de la púa por posición del injerto en el patrón a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.....	26
14	Número de brotes de la púa por factor luz (L1; L0), a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.....	27
15	Crecimiento de la púa en distintas posiciones sobre el patrón y condiciones de luz a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.....	28
16	Tratamientos de la púa en distintas posiciones sobre un patrón común, expuestas a la luz y en oscuridad. a) patrón con púas injertadas en posición apical, media y basal en 16 h luz; b) patrón con púas injertadas en posición apical, media y basal en oscuridad.....	29
17	Crecimiento de la púa según posición del injerto, a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.....	30
18	Crecimiento de la púa según condiciones de luz, L1 y L0 a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.....	31

19	Número de nuevos verticilos de la púa en distintas posiciones sobre el patrón a distintas condiciones de luminosidad, L1 y L0, a los 21 y 40 días realizado el microinjerto..	32
20	Número de nuevos verticilos de la púa según posición sobre el patrón, a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.....	33
21	Número de nuevos verticilos de la púa según condiciones de luz, L1 y L0, a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.....	34
22	Número de brotes de la púa en distintas posiciones sobre el patrón con exposiciones de luz, L1 y L0, a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.....	35
23	Número de brotes de la púa según posición sobre el patrón, a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.....	36
24	Número de brotes de la púa según condiciones de luz, L1 y L0, a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.....	37
25	Porcentaje de viabilidad de la púa en patrones con injertos simples y triples, para las distintas condiciones de luz (L1 y L0), al final del período de medición (6ª semana).....	38

26 Porcentaje de viabilidad del patrón con injertos simples y triples, para distintas condiciones de luz (L1 y L0), al final del período de medición (6^a semana)..... 40



I INTRODUCCION

Una de las técnicas utilizadas actualmente para realizar ensayos de revigorización es el microinjerto. El que es definido por Kyte (1996), como una versión microscópica de injerto, que ocupa patrones propagados vegetativamente *in vitro*, al que se le injertan pequeñas porciones de tejidos, que pueden ser un meristema o ápice del vástago, los que se denominan púas, esto se realiza en recipientes cerrados con condiciones óptimas de ambiente y en un medio de cultivo adecuado para la especie.

Esta técnica tiene capacidad potencial para inducir reversión de características fenotípicas del estado adulto, a estados más juveniles; haciendo posible la recuperación de explantes que, facilitan la manipulación de sus capacidades morfogénicas (Pacheco, 1995a). Esto último es debido a que el establecimiento de explantes *in vitro* y la inducción de embrioides y órganos adventicios, están enormemente influenciados por el estado de desarrollo del tejido usado como explante primario, teniendo esto por objetivo clonar materiales adultos seleccionados (Hackett y Murray, 1993). Estos mismos autores plantean que la obtención de material juvenil desde plantas maduras puede estar enfocado a dos vías, al uso de partes juveniles de plantas maduras, o al rejuvenecimiento de partes maduras de plantas.

Además de revigorizar, ésta técnica ha sido utilizada como una metodología eficaz para la recuperación de plantas

libre de virus. Y debido al desarrollo de procedimientos de microinjerto de ápices caulinares, actualmente se utiliza en programas de limpieza de material vegetativo de cítricos.

Según Pacheco (1995a), la técnica del microinjerto es una metodología vigente, debido, tanto al contenido práctico, como de investigación básica que se le ha otorgado en estos últimos años. La aplicación de esta técnica en el área hortofrutícola es importante, existiendo una serie de investigaciones basadas en ella.

1.1 Partes de una planta involucradas en el microinjerto.

Según Pacheco (1995b), las partes involucradas de una planta en el microinjerto, son:

- La púa, que corresponde a una yema de 3-5 mm, la cual debe estar libre de enfermedades.
- El patrón, es el soporte, donde se inserta la púa.
- El cambium, tejido delgado de la planta situado entre el floema y xilema. Compuesto por células meristemáticas.
- El callo, masa de células de parénquima que se desarrollan alrededor de tejidos vegetales lesionados, importantes para el proceso de cicatrización.

Es esencial que el cambium de la púa se coloque en contacto con el cambium del patrón, debido a que sus células meristemáticas son capaces de dividirse y formar nuevas células. En el sitio de contacto entre la púa y el patrón, se forma una masa de células de parénquima denominado

callo, el cual es importante en la cicatrización de un injerto exitoso (Hartmann y Kester, 1998).

1.2 Obtención de patrones.

Los patrones se obtienen a partir de la técnica de micropropagación *in vitro*. La micropropagación se define, según Debergh y Read (1991), como las técnicas de cultivo *in vitro* desarrolladas para la producción en masa de plantas, seleccionadas genotípicamente, a un precio competitivo. Esto es, la producción de plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o células cultivadas asépticamente en un recipiente en que se puedan controlar estrictamente las condiciones del ambiente y la nutrición (Hartmann y Kester, 1998).

La propagación vegetativa, cualquiera sea su modalidad, implica una reanudación de la mitosis y, favoreciendo la desdiferenciación de células de parénquima, producen centros de actividad meristemática, lo que permite la expresión de potencialidades normalmente reprimidas en las distintas especies (Margara, 1988).

Teóricamente, un explante simple puede producir un infinito número de plantas. Los meristemas usados para obtener explantes deben estar libre de virus (Kyte, 1996).

1.3 Función del medio de cultivo.

Según Hartmann y Kester (1998), existen dos funciones principales del medio de cultivo. La primera es proporcionar los nutrientes básicos para el crecimiento

continuado de los explantes aislados y los propágulos subsiguientes. La segunda es dirigir el crecimiento y desarrollo mediante control hormonal.

El medio de cultivo que resulta satisfactorio para el cultivo de tejidos de muchas especies de plantas con fines de micropropagación, es el medio mineral Murashige y Skoog (1962), conocido como medio MS, el cual es el más utilizado en trabajos de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Además, generalmente es necesario una aplicación de reguladores de crecimiento en los medios de cultivo, en la regeneración *in vitro* de brotes y subsecuente micropropagación de plantas. Pero es posible que esta aplicación estimule el desarrollo anormal al alterar el balance endógeno de fitohormonas (Dantas de Oliveira, 1996).

Los reguladores de crecimiento, producidos en la yema, inducen la formación de tejidos vasculares en el callo. Más aún, el estímulo de esos ápices para producir xilema puede ser reemplazado por concentraciones apropiadas de hormonas como auxinas, citoquininas y giberelinas, así como azúcares (Hartmann y Kester, 1998).

Se utilizará la especie *Dianthus caryophyllus* debido a la capacidad de propagación a gran escala cultivando *in vitro* explantes de puntas de tallo, para conocer las técnicas de microinjerto *in vitro*, como método de rejuvenecimiento, debido a la capacidad para revertir los procesos de maduración bajo ciertas condiciones. Esto hace posible la

recuperación de explantos adultos a jóvenes de muchas especies de importancia económica, los que facilitan la manipulación de sus capacidades morfogénicas, con el objeto de clonar materiales adultos seleccionados.



II MATERIALES Y METODOS

El trabajo experimental se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Forestal de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Concepción.

2.1 Material de origen.

Para la investigación se utilizaron claveles maduros de un invernadero de la octava región. Se seleccionaron claveles de una variedad conocida siendo estos genéticamente iguales.

2.2 Limpieza del material vegetal.

2.2.1 Aplicación de fungicida. Los tallos de clavel, se sumergieron sin hojas, en agua con fungicida Benomilo (2 gl^{-1}) durante 2 horas, posteriormente se lavaron con agua corriente.

En una primera instancia los tallos, antes de realizar la asepsia, fueron mantenidos durante aproximadamente 48 horas en agua corriente. Teniendo en cuenta la baja viabilidad de éstos, en los próximos tallos de clavel, se realizó la asepsia inmediatamente después de aplicado el fungicida.

2.2.2 Asepsia material vegetal. En la cámara de flujo laminar se procedió a realizar la asepsia superficial del material vegetal. Se sumergieron los tallos en alcohol al 10% v/v por cinco minutos en agitación continua, luego se procedió a lavar tres veces con agua destilada estéril por cinco, tres y dos minutos cada lavado. Inmediatamente

después, los tallos fueron inmersos en una solución de hipoclorito de sodio al 15% v/v que contiene un 2% de cloro activo adicionándoseles unas gotas de Tween 20 como surfactante, esto se mantiene en constante agitación por 10 minutos. Posteriormente se procedió a lavar tres veces en agua destilada estéril, en tiempos de cinco, tres y dos minutos cada uno. En un último cambio de agua, se dejan los tallos para el inicio de los cultivos.

2.3 Medio de cultivo.

El medio de multiplicación contiene sales inorgánicas complementado con 3% w/v de sacarosa (MS-30), reguladores de crecimiento en las siguientes concentraciones: $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ de AIB, $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ de BAP, ajustado a un pH 5,8 con NaOH y HCl 0,1 N, para adicionarles 7% w/v de agar-agar como agente gelificante, antes del autoclavado. Las condiciones de cultivo para los segmentos nodales, fueron 25°C y fotoperíodo de 16 h con luz blanca fría, con una intensidad lumínica de $45 \mu\text{fm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

El medio nutritivo fue esterilizado por 20 minutos a 121°C , y a 1 atm de presión.

2.4 Repique del material cultivado.

El material obtenido del cultivo de meristemas de material adulto de clavel fue repicado para obtener la máxima cantidad de material utilizado como patrón para poder posteriormente microinjertar. Este material debe estar lo suficientemente elongado, 10 mm a lo menos, como para poder realizar incisiones e insertar una púa; el material

repicado debe estar libre de contaminación antes de ser utilizado como patrón. En este caso se tomaron medidas de asepsia para el explante, para los instrumentos ocupados y para el cultivador, el que debe cumplir con las normas de asepsia y de seguridad del laboratorio. Al tener material elongado, en un número tal que cumpla con el diseño experimental propuesto, empieza la etapa de microinjerto.

2.5 Descripción de la técnica de microinjerto.

Se realizaron injertos con una púa y con tres púas sobre el patrón.

2.5.1 Patrón con un microinjerto. Se realizan cortes en los tallos a nivel internodal, en donde se inserta la púa, que tendrá posición apical, medio o basal, con diámetro similar al patrón. Esta debe tener el meristema apical hacia arriba, y el corte de la púa hacia abajo en contacto con el corte del patrón.

2.5.2 Patrón con tres microinjertos. Se realizaron tres cortes sobre el patrón para injertar la púa, en posición apical, media y basal. Estas deben estar en forma helicoidal sobre el patrón para que no se produzca intersección del flujo de nutrientes entre los injertos.

Para ambos casos, la región cambial, tanto del patrón como de la yema debe tomar estrecho contacto, además el ápice de las yemas de la púa deben quedar hacia fuera del patrón, para que resulte un injerto exitoso (Hartmann y Kester, 1998).

2.5.3 Fotoperíodo de los explantes microinjertados. Los explantes que se encuentran bajo condiciones de oscuridad (LO), son aquellos que los primeros 21 días realizado el microinjerto se encuentran en total oscuridad, luego desde el día 22 al 40, son traspasados a 16 h luz por día. Aquellos explantes bajo condición luz (L1), son los que durante los 40 días están bajo un fotoperíodo de 16 horas.

El nuevo tejido de callo originado de la región cambial está formado por células de pared delgada, turgente, que con facilidad pueden secarse y morir, por lo tanto, es importante mantenerlos en el laboratorio bajo condiciones óptimas de humedad y temperatura y conservarlos libre de organismos patógenos.

2.6 Diseño experimental.

El diseño experimental utilizado fue el diseño factorial aleatorio, para cada una de las etapas.

2.6.1 Patrón con un microinjerto. Se evaluaron los siguientes tratamientos a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.

AL1: Injerto con posición apical expuesto a luz.

ALO: Injerto con posición apical en oscuridad.

ML1: Injerto con posición media expuesto a luz.

MLO: Injerto con posición media en oscuridad.

BL1: Injerto con posición basal expuesto a luz.

BLO: Injerto con posición basal en oscuridad.

2.6.2 Patrón con tres microinjertos. Se analizan los tratamientos de las distintas posiciones de la púa sobre el patrón bajo condición luz y oscuridad, los que fueron evaluados a los 21 y 40 días realizado el microinjerto.

Para ambos casos, las unidades muestrales fueron grupos de tres tubos de cultivo, cada uno con cuatro repeticiones. Si existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos, éstas se identificaron mediante el test de Duncan (Steel y Torrie, 1995).



III RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Efectos del método de asepsia utilizado en los meristemas de material adulto.

Antes del cultivo de meristemas de material adulto sobre el medio, estos son esterilizados. Esta se realiza mediante la destrucción química de los microorganismos, utilizando compuestos esterilizantes (Pierik, 1990). Además, es necesario conocer el tiempo que requiere la especie tanto para conservarla en remojo con agua corriente, y las adecuadas concentraciones de alcohol y cloro, para no dañar los tejidos y obtener un cultivo exitoso.

3.1.1 Necrosis de material adulto por asepsia inadecuada.

Mantener los tallos de clavel por un tiempo de aproximadamente 48 horas en agua corriente, para su conservación, y una posterior asepsia con elevadas concentraciones de alcohol y cloro, como se muestra en la Figura 1, resultó ser que de un total de 30 explantes cultivados en MS sin reguladores de crecimiento luego de siete días, sólo el 0,8% se encuentra sano, lo que quiere decir que el 99,2% está contaminado, con bacterias u hongos, y necrosados. Algo similar ocurre al cultivar en medio MS con reguladores de crecimiento en donde el 100% de los tubos está contaminado con bacterias, y el 45% presenta necrosis total. Estos resultados pueden ser explicados por Jensen y Salisbury (1988), al mencionar que las células vegetales, absorben agua hasta igualar el potencial hídrico interno y del medio, quedando estas turgentes, luego al ser sumergidas a alguna solución con el potencial hídrico

menor, existe una salida de agua, y una entrada de soluto, en este caso, alcohol y cloro, lo que provoca intoxicación del tejido.

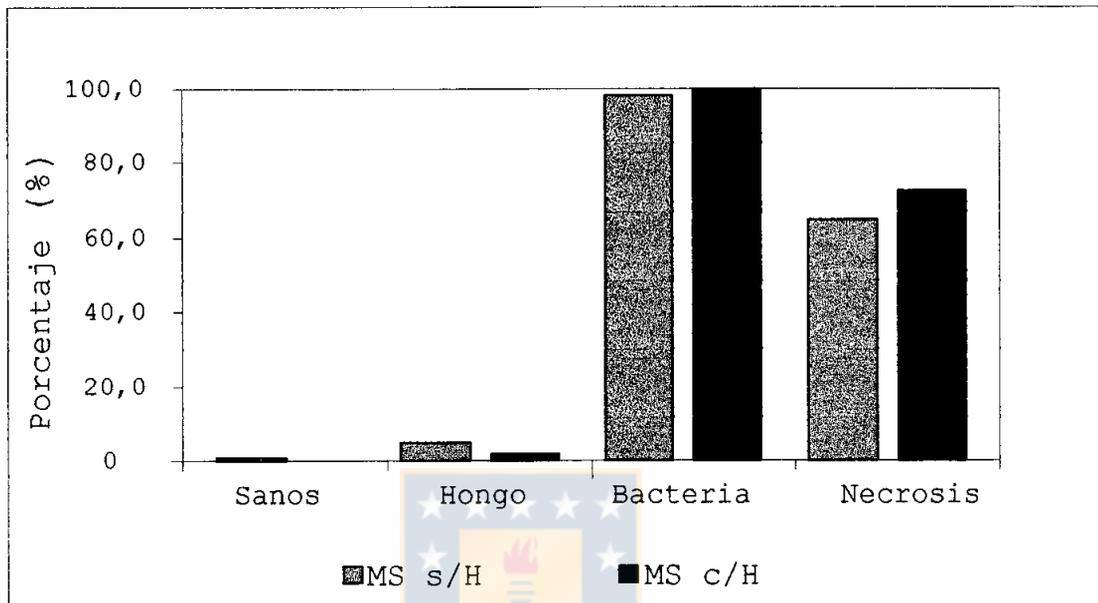


FIGURA 1. Porcentaje de contaminación de explantes cultivados en medio MS, con y sin hormonas (Apéndice 1).

De estos cultivos no se obtuvieron resultados. Posteriormente se utilizó como medio para cultivar patrones MS con reguladores de crecimiento.

3.1.2 Viabilidad de explantes para el repique de material.

La aplicación del método de asepsia con una concentración de alcohol al 10% v/v y una solución de cloro al 15% v/v, luego de un remojo de dos horas en fungicida de 2 gl^{-1} , como se observa en la Figura 2, a los 15 días de cultivo se midió el porcentaje de explantes vivos, dando un 81,8% considerando los explantes sanos o contaminados con bacterias u hongos. De éstos el 40,5% está contaminado con bacterias, y el 9,1% contaminado con hongo. Los que están

contaminados con bacteria, se dejan para que sigan elongando, y así poder realizar un corte sobre la superficie de contacto del explante con la bacteria, y sanarlo. No así los que están contaminados con hongo, estos son desechados. Por lo tanto, el 60,3% es posible repicarlos, involucrando a los sanos y contaminados con bacterias.

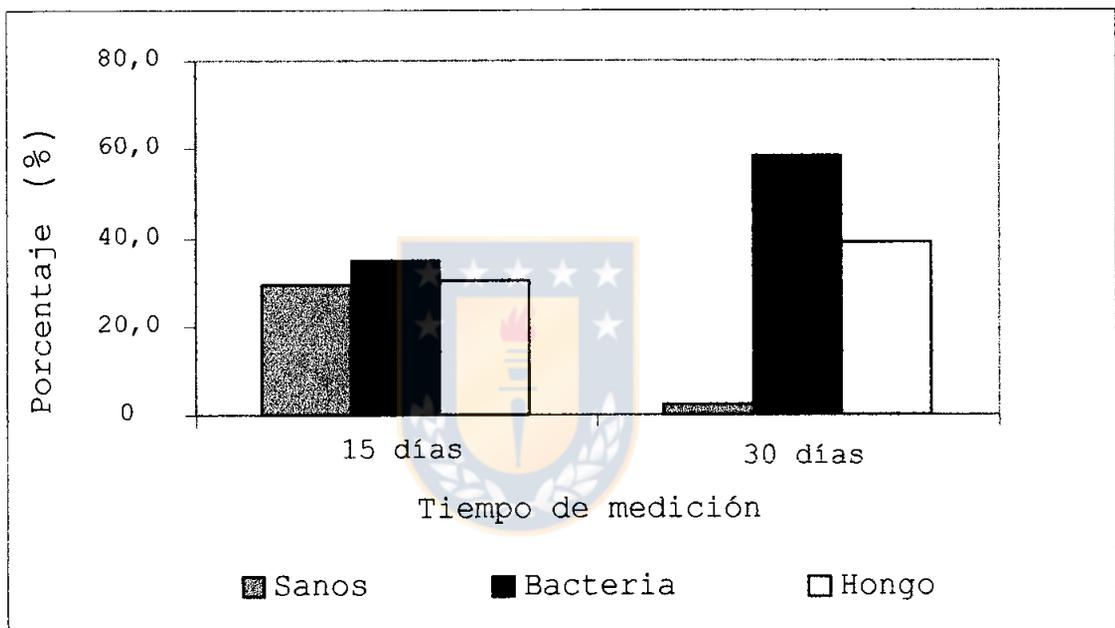


FIGURA 2. Porcentaje de explantes viables sanos y contaminados con bacterias, y no viables contaminados con hongo, a 15 y 30 días realizado el cultivo (Apéndice 1).

Luego de 30 días de cultivo se encontró que del total de explantes cultivados el 60,0% estaba vivo. De éstos el 95,7% son explantes que pueden ser repicados, estén sanos o contaminados con bacterias. Se repica tantas veces como sea necesario para la obtención de un número tal de explantes libres de contaminación, que cumplan con el diseño experimental propuesto.

3.2 Patrón con un microinjerto.

El material vegetal libre de contaminación, obtenido en la etapa de repique, a los 30 días de cultivo han alcanzado una longitud promedio de 39,3 mm, con un rango entre 55 y 19 mm, siendo apropiados para usar como patrones. De éstos se cortan trozos de tallo, y se realiza el microinjerto los que se cultivan en un medio MS con reguladores de crecimiento.

3.2.1 Crecimiento de la púa.

Del análisis estadístico de los promedios del incremento en longitud de la púa (Apéndice 1), se obtuvieron resultados con el test de Fischer y con el test de Duncan. Estos muestran, como se ve en la Figura 3, el comportamiento del crecimiento de la púa a los 21 y 40 días, realizado el microinjerto, de todos los tratamientos. Se puede observar que existe diferencia significativa del injerto basal con respecto a los otros tratamientos, sin existir diferencia significativa con el factor luz.

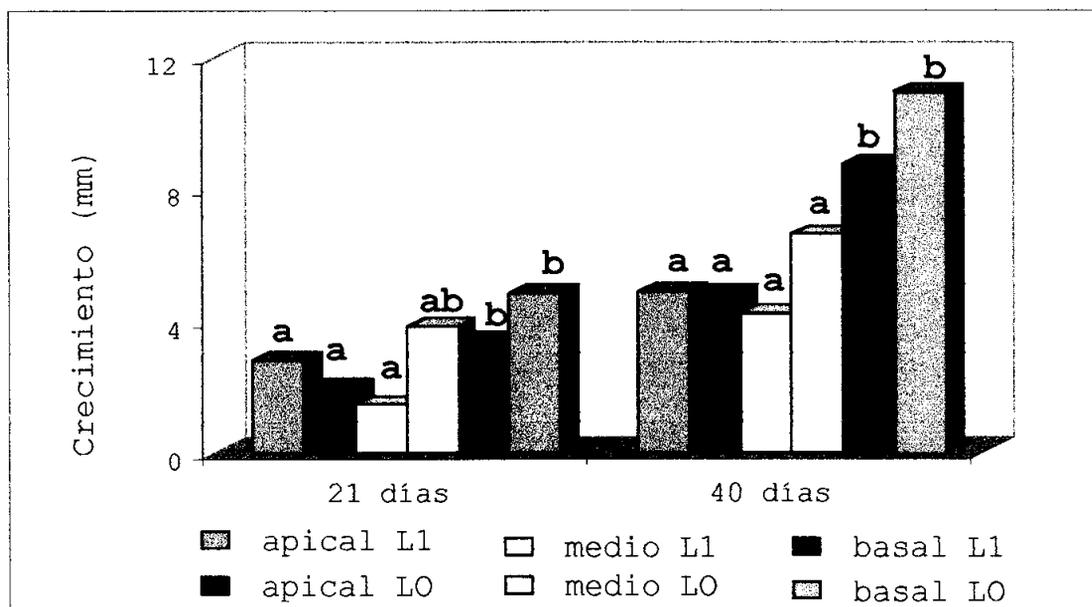


FIGURA 3. Crecimiento de la púa en los distintos tratamientos según su posición sobre el patrón (apical, medio y basal) y por condiciones de luz (L1, luz; L0, oscuridad), a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

Las diferencias de los tratamientos se observan en la Figura 4. Se destaca que la posición basal tiene un crecimiento mayor, en comparación con la posición apical y media, esto debido a la cercanía con el medio nutritivo, por lo que tiene disponible iones minerales, agua, C, O₂, H₂, y otros elementos que participan en forma activa en la nutrición y por ende del crecimiento, además en esta posición existe acumulación de reguladores de crecimiento necesarios para el equilibrio de éste. La luz también influye en el crecimiento, notándose la diferencia en los explantes en oscuridad, cuyos entrenudos crecen exageradamente, presentando además un color más pálido que las expuestas a la luz, incluso luego de estar tres semanas a la luz para que recuperen la clorofila.

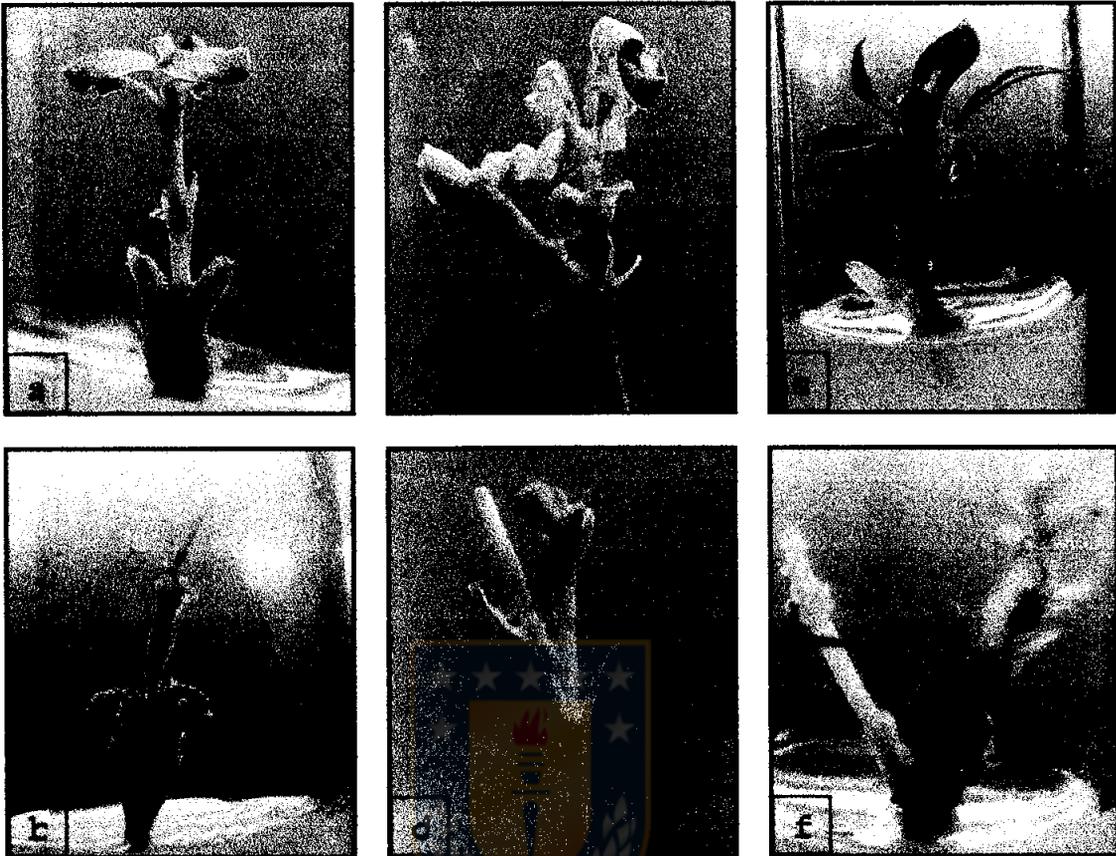


FIGURA 4. Distintas posiciones de púas sobre patrones a los 40 días realizado el microinjerto. a) apical en luz; b) apical en oscuridad; c) media en luz; d) media en oscuridad; e) basal en luz; f) basal en oscuridad.

Lo anterior, se puede analizar en forma más acabada, observando la Figura 5, que representa el crecimiento de la púa según la posición sobre el patrón. A los 21 días la púa injertada en posición basal tiene 4,1 mm de longitud, es significativamente mayor que el apical con 2,4 milímetros. A los 40 días se observa diferencia significativa en la posición basal con 9,8 mm en comparación con el apical y medio. Esto puede ser explicado con el hecho que el injerto basal se encuentra más próximo al medio nutritivo teniendo más contacto con nutrientes y reguladores de crecimiento,

según Barceló (1995), los nutrientes se absorben por el tejido vascular, por difusión. Es importante mencionar con respecto a la auxina, que la elongación del tejido crece a medida que lo hace la concentración de auxina hasta un cierto valor máximo, ésta se acumula en la posición basal, causando mayor elongación de la púa en ésta posición.

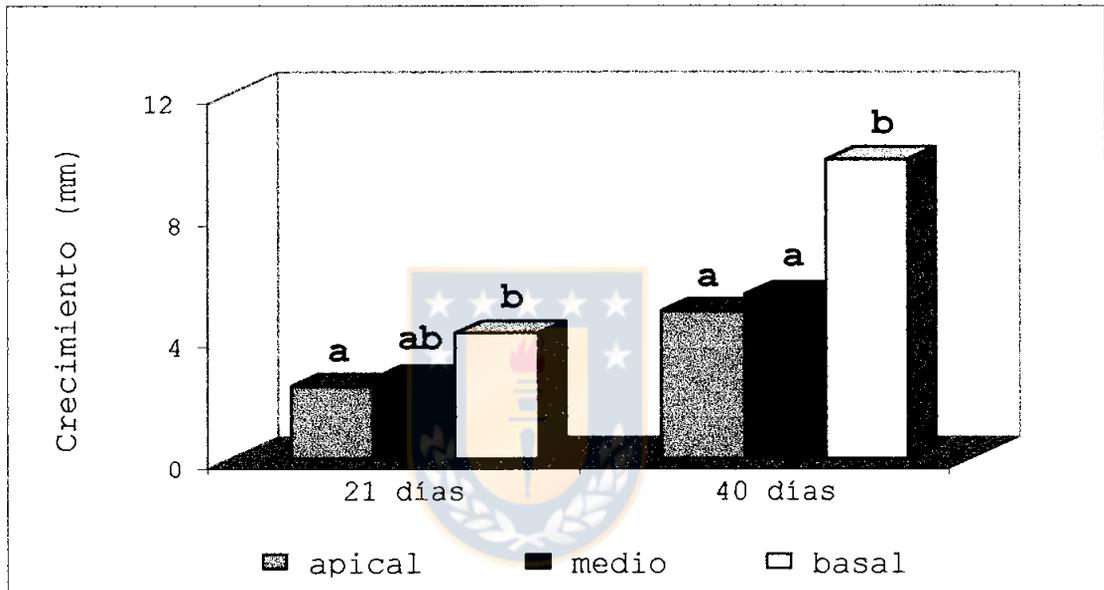


FIGURA 5. Crecimiento de la púa por posición sobre el patrón (apical, medio y basal) a los 21 y 40 días de realizado el microinjerto (Apéndice 1).

En la Figura 6, se presenta el crecimiento de la púa con respecto al factor luz a los 21 y 40 días realizado el microinjerto. A los 21 días no existe diferencia significativa, pero los explantes en oscuridad presentan un mayor crecimiento. Así éstos presentan un crecimiento de 3,6 mm y los expuestos a la luz 2,6 milímetros. A los 40 días ocurre una situación similar, presentando un crecimiento de 7,5 mm los explantes en oscuridad, y los expuestos a un fotoperíodo de 16 h un crecimiento de 5,9

milímetros. Esto es si se sabe que en oscuridad existe un alargamiento celular debido a la activación de la síntesis de auxina (Barceló, 1995).

A los 21 días realizado el microinjerto, el shock que pueden haber tenido los explantes tras pasados de la oscuridad a 16 h de fotoperíodo, a los 40 días se recuperan muy bien, notándose en el desarrollo de la clorofila influyendo indirectamente sobre el crecimiento por la fotosíntesis (Barceló, 1995).

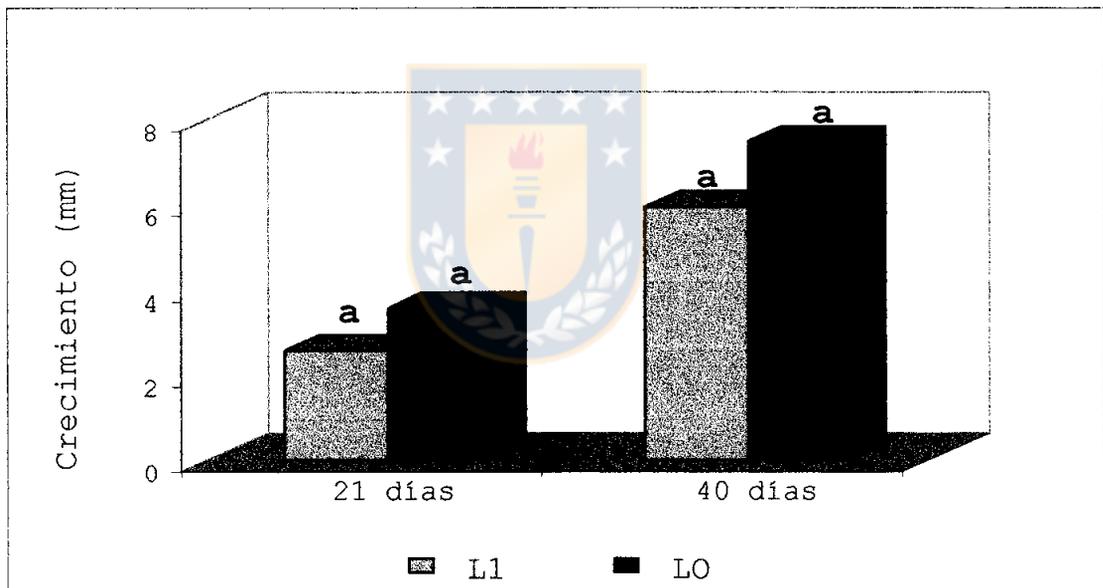


FIGURA 6. Crecimiento de la púa por factor luz, L1 (16 h fotoperíodo) y LO (oscuridad), a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

Aunque no exista diferencia significativa entre los tratamientos, las respuestas que tengan los explantes, son importantes, ya que, nos permite decidir cual es el tratamiento efectivo para realizar el microinjerto, debido

que esto nos puede significar la obtención de más explantes.

3.2.2 Número de verticilos nuevos. En la Figura 7, es posible observar a los distintos tratamientos para el número de nuevos verticilos a los 21 y 40 días realizado el microinjerto. A los 21 días de medición existe diferencia significativa entre los tratamientos con injerto basal con el resto de los tratamientos, sin existir diferencia en el factor luz. El injerto apical en oscuridad tiene diferencia significativa con el expuesto a la luz y los injertados en posición media, siendo superior con 1,7 verticilos como promedio, influyendo en éste la posición en un punto de llegada de nutrientes y agua desde el medio de cultivo hacia la púa injertada. En el caso del injerto basal, el expuesto a la luz es superior en número de verticilos, producto de que existe una mayor acumulación de auxina tanto endógena como exógena en ese punto.

A los 40 días los injertos con posición basal siguen siendo significativamente superiores, con el expuesto a la luz mayor. El apical y el medio en oscuridad formaron pocos verticilos desde los 21 días, se le puede atribuir al shock de trasplante a la luz.

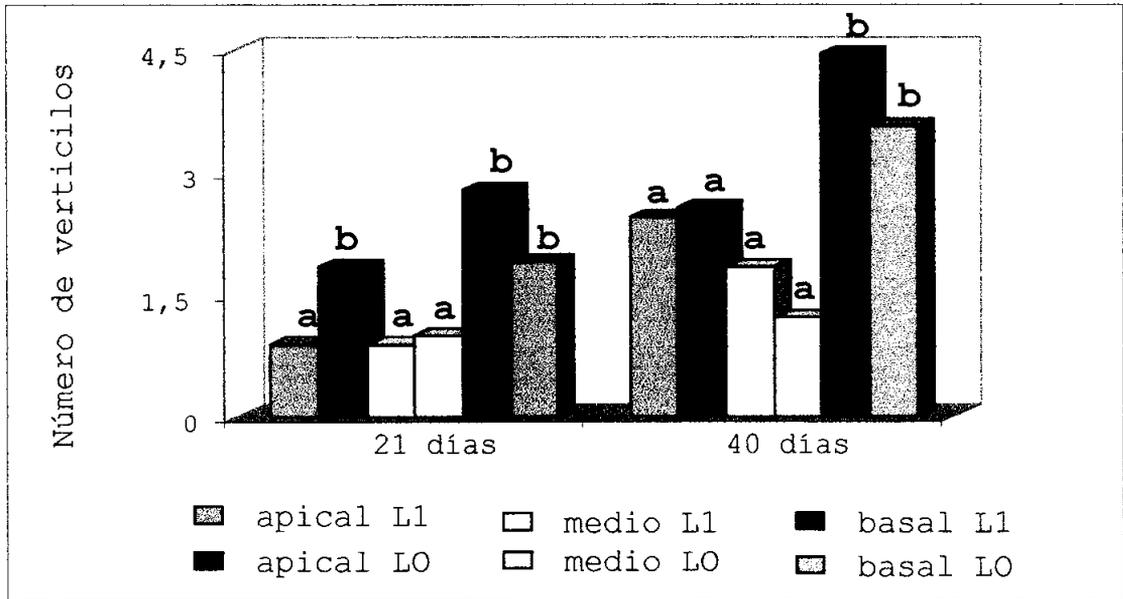


FIGURA 7. Número de nuevos verticilos de la púa en los distintos tratamientos por posición del injerto en el patrón y condiciones de luz (L1; L0), a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

Al observar la Figura 8, en donde se muestran los tratamientos a los 40 días luego de haber realizado el microinjerto, se comprueba lo dicho anteriormente, el basal presenta mayor número de verticilos, que el apical y medio, siendo el medio el que presenta el menor número, esto debido a que no se encuentra en un punto de llegada de nutrientes y reguladores de crecimiento, para una mayor formación de verticilos. Los explantes en oscuridad tienen un aspecto decolorado producto de la falta de clorofila, junto con esto una mayor síntesis de auxina, dando como resultado un menor número de verticilos.

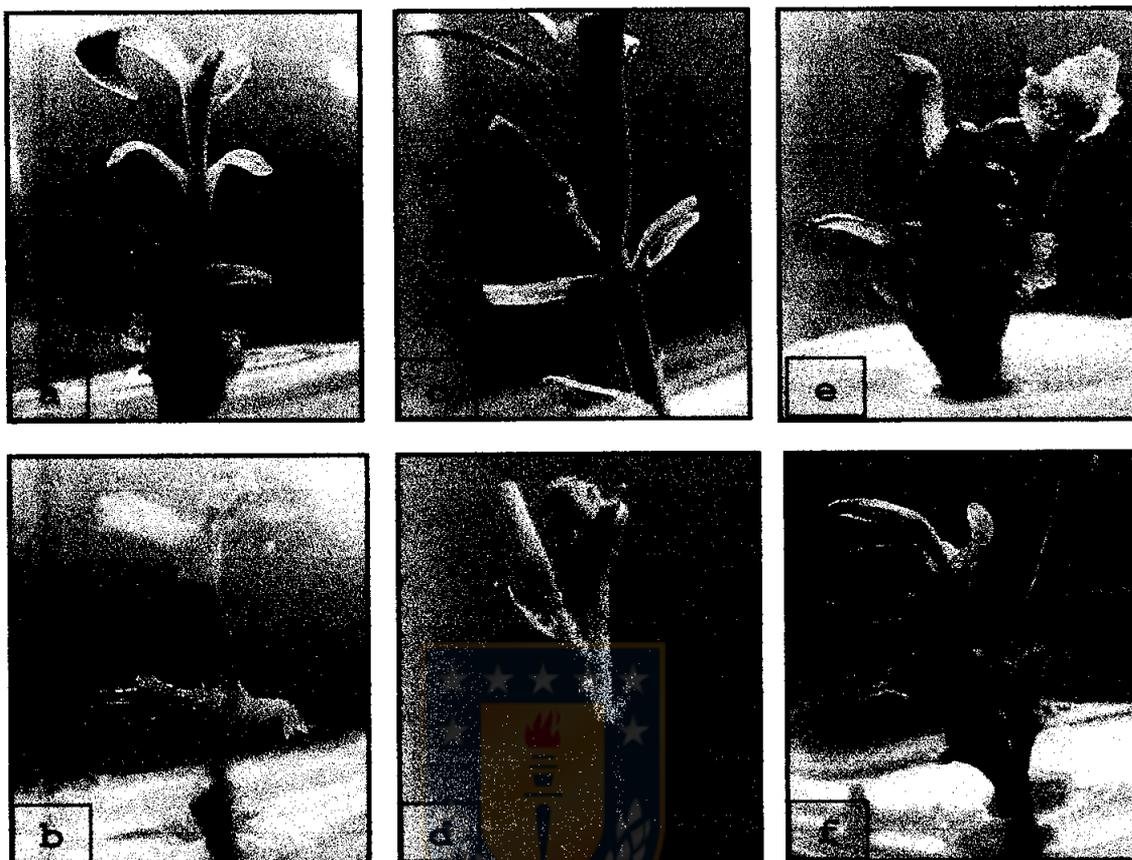


FIGURA 8. Tratamientos de la púa en distintas posiciones sobre el patrón, y expuestas o no a la luz. a) apical con luz; b) apical en oscuridad; c) media con luz; d) media en oscuridad; e) basal con luz; f) basal en oscuridad.

Si se analiza por posición del injerto, como se observa en la Figura 9, se observa una situación similar a los 21 y 40 días de cultivo, en donde existe diferencia significativa del injerto basal con las otras posiciones de injerto con 2,3 y 4 verticilos respectivamente como promedio. El injerto apical y medio no presentan diferencias significativas. El basal, tiene mayor crecimiento y mayor número de verticilos, debido a la acumulación de nutrientes, auxina y citoquinina en ésta posición. La posición media es menor debido a que no se encuentra en un

punto de llegada de los nutrientes y reguladores de crecimiento.

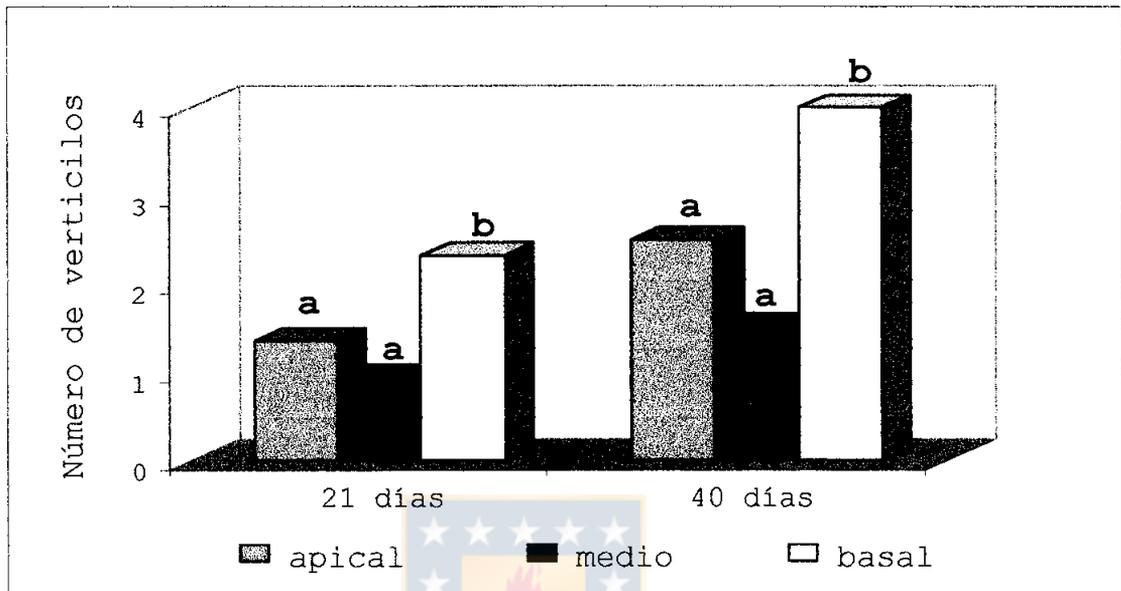


FIGURA 9. Número de nuevos verticilos de la púa por posición del injerto en el patrón a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

El factor luz no presenta diferencia significativa entre sus tratamientos, como se observa en la Figura 10, a los 21 días el número de verticilos en el tratamiento en oscuridad tiene 1,8 verticilos, y el expuesto a la luz 1,5 verticilos promedio. Así a los 40 días, los tratamientos expuestos a un fotoperíodo de 16 h tienen 2,9 verticilos, y los que se encuentran en oscuridad tienen 2,5 verticilos promedio.

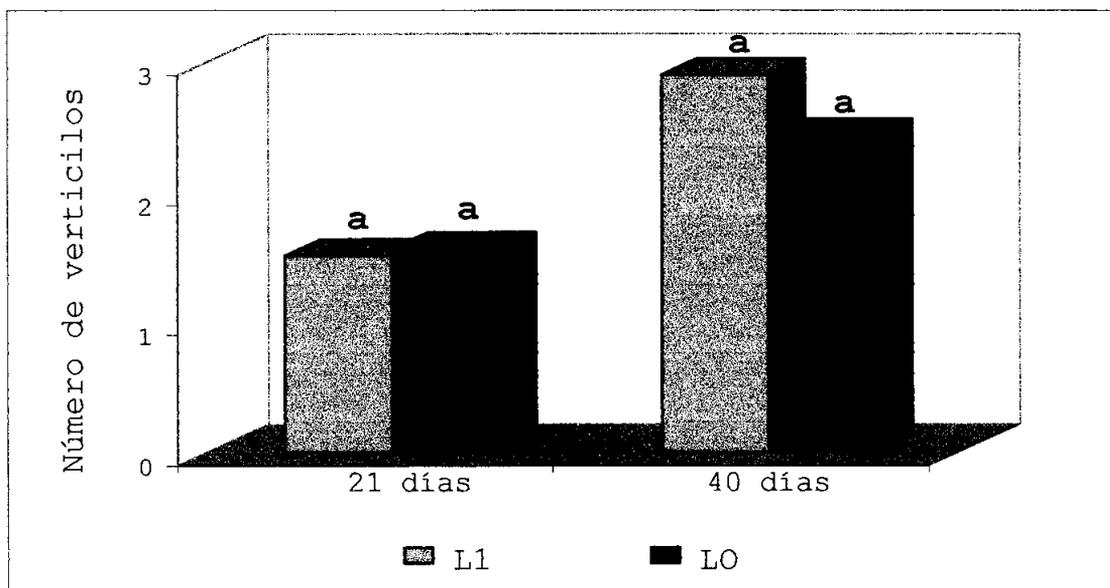


FIGURA 10. Número de nuevos verticilos de la púa por factor luz (L1; L0), a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

El efecto directo que tiene la luz sobre las plantas en oscuridad, es el crecimiento exagerado del entrenudo, influenciado por la cantidad de auxina, produciendo un mayor crecimiento y un menor número de verticilos (Barceló, 1995).

Aunque no sea significativa la diferencia, es importante conocer cual es la técnica que influya en la producción de mayor número de verticilos sobre la púa, debido a que cada verticilo puede originar un explante.

3.2.3 Número de brotes nuevos. La Figura 11, muestra el número de brotes de la púa a los 21 y 40 días realizado el microinjerto. A los 21 días existe diferencia significativa entre los tratamientos con injerto en posición media con los de posición apical y basal, sin existir diferencia

significativa en el factor luz. A los 40 días de medición existe diferencia significativa entre el basal con exposición a la luz con el resto de los tratamientos, siendo este superior. La posición apical expuesta a la luz es superior, sin tener diferencia significativa con el apical en oscuridad y la posición media.

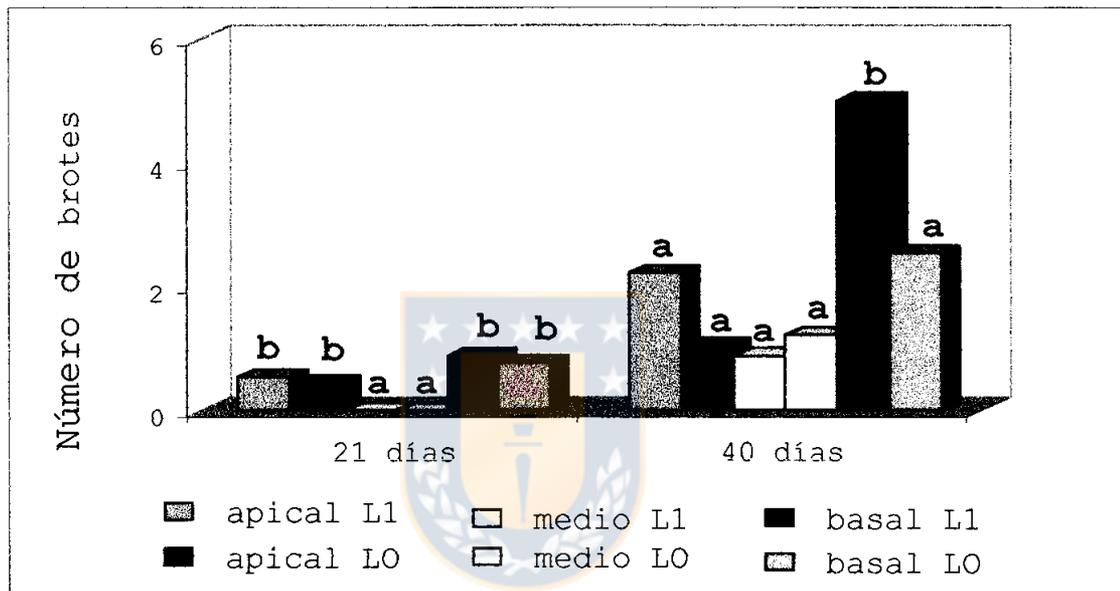


FIGURA 11. Número de brotes de la púa en los distintos tratamientos por injerto y por luz (L1; L0), a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

Se demuestra que en presencia de luz existe mayor producción de células dando origen a nuevos brotes. Lo anterior se puede observar en la Figura 12, es posible diferenciar el mayor número de brotes del tratamiento con injerto basal expuesto a la luz, debido a la cercanía con el medio nutritivo existiendo mayor disponibilidad de elementos necesarios para el crecimiento y división celular, además la luz influye en el crecimiento en forma indirecta por la fotosíntesis y existe una proporción

adecuada de auxina y citoquinina permitiendo un crecimiento y desarrollo de brotes.



FIGURA 12. Tratamientos de la púa en distintas posiciones sobre el patrón, y expuestas o no a la luz. a) apical con luz; b) apical en oscuridad; c) media con luz; d) media en oscuridad; e) basal con luz; f) basal en oscuridad.

En la Figura 13, se muestran los números de brotes en la púa en distintas posiciones sobre el patrón. A los 21 días no existe diferencia significativa entre la posición apical y basal. A los 40 días existe diferencia significativa entre el basal con las otras posiciones, con 3,8 brotes como promedio. La inducción de brotes en ésta posición es mayor, debido a que la relación entre la citoquinina y la auxina es elevada (Barceló, 1995). Además cabe señalar que

el injerto con posición media se encuentra en un lugar de paso de nutrientes desde el medio de cultivo hacia puntos de llegada, por lo que se puede atribuir al menor número de brotes formados.

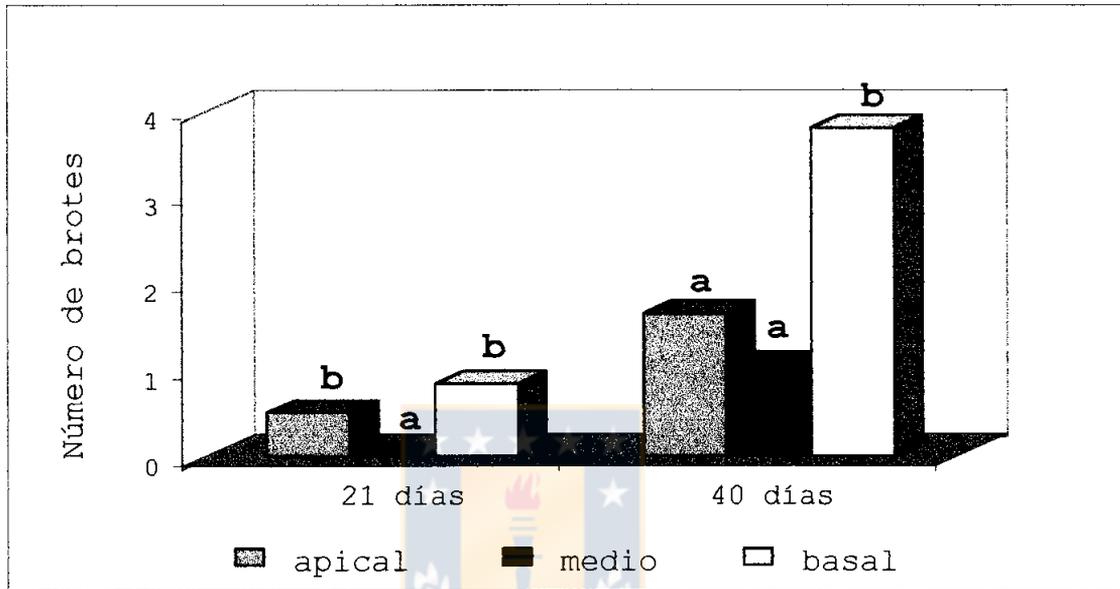


FIGURA 13. Número de brotes de la púa por posición del injerto en el patrón a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

Los tratamientos según el factor luz, como se muestra en la Figura 14, a los 21 días no existe diferencia significativa entre los tratamientos. A los 40 días, los expuestos a la luz son significativamente mayor con 2,7 brotes como promedio. En presencia de luz existe menor síntesis de auxina en comparación con los explantes en oscuridad, por lo que la relación entre citoquinina y auxina es mayor, promoviendo la división celular formando un mayor número de brotes.

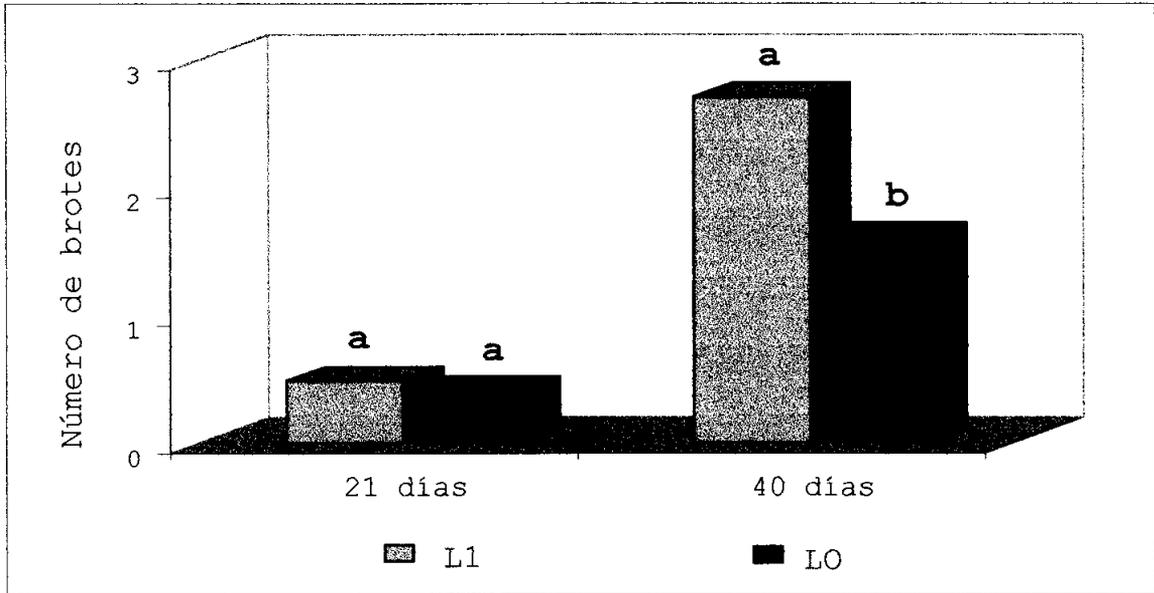


FIGURA 14. Número de brotes de la púa por factor luz (L1; LO), a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

3.3 Patrón con tres microinjertos.

Microinjertar tres púas en un mismo patrón, es una alternativa, en el caso de que el material como patrón sea escaso, o para ocupar menos medio de cultivo y espacio. En los puntos siguientes se analizarán los resultados de crecimiento, número de verticilos y número de brotes con el test de Duncan.

3.3.1 Crecimiento de la púa. En la Figura 15, se muestra el comportamiento en crecimiento de la púa injertada en distintas posiciones sobre el patrón a distintas condiciones de luz. A los 21 días se puede ver que la posición de injerto basal en oscuridad, presenta diferencias significativas con el resto de los tratamientos con 8,1 mm de longitud. A los 40 días cada posición presenta diferencias significativas por exposición a la

luz, siendo mayor los explantes en oscuridad para la posición apical, media y basal. Esto debido a que en oscuridad se induce la síntesis de auxina, causando mayor elongación celular, por ende, de los tejidos. La posición basal, es significativamente mayor, existiendo una mayor acumulación de auxina endógena y exógena, producto del transporte polar de ésta sobre el tallo.

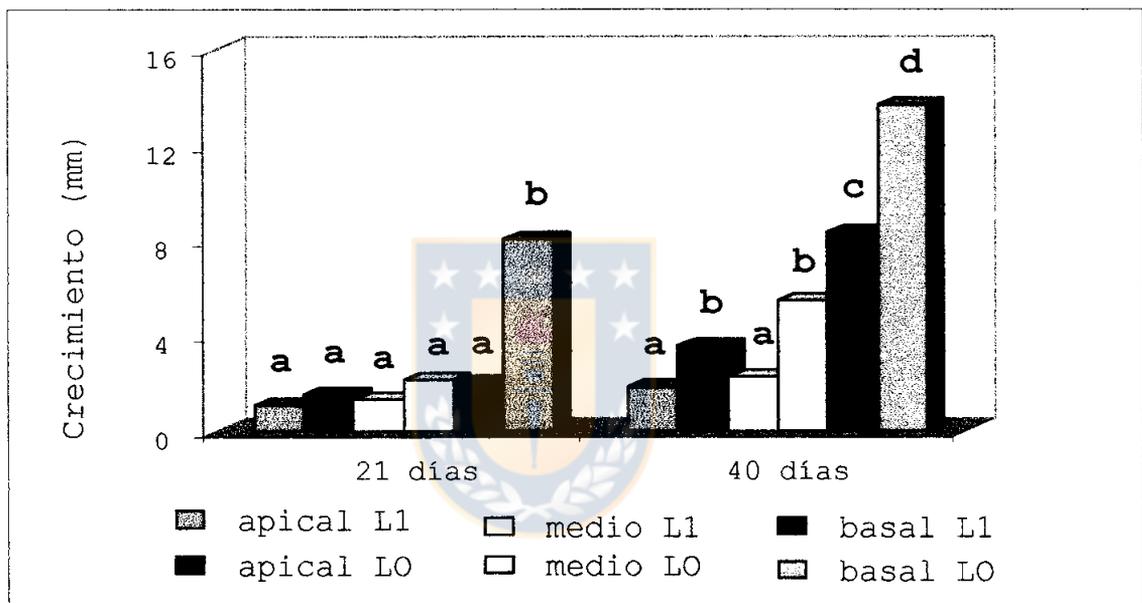


FIGURA 15. Crecimiento de la púa en distintas posiciones sobre el patrón y condiciones de luz a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

Se observa en la Figura 16 el mayor crecimiento del injerto basal en oscuridad y expuesto a 16 h luz, los que se encuentran más cerca del medio nutritivo. Es probable que la notoria diferencia con las posiciones apical y media, se deba a la profundidad del corte en posición basal sobre el patrón, interrumpiendo el flujo de nutrientes por el tejido vascular, impidiendo un desarrollo adecuado de la púa, y en algunos casos quede en estado latente, o incluso la

necrosis del tejido. Además es posible ver la diferencia entre los expuestos a 16 h luz con los expuestos en oscuridad presentando los últimos un crecimiento significativamente superior, debido a la mayor síntesis de auxina causante de la elongación de los tejidos.

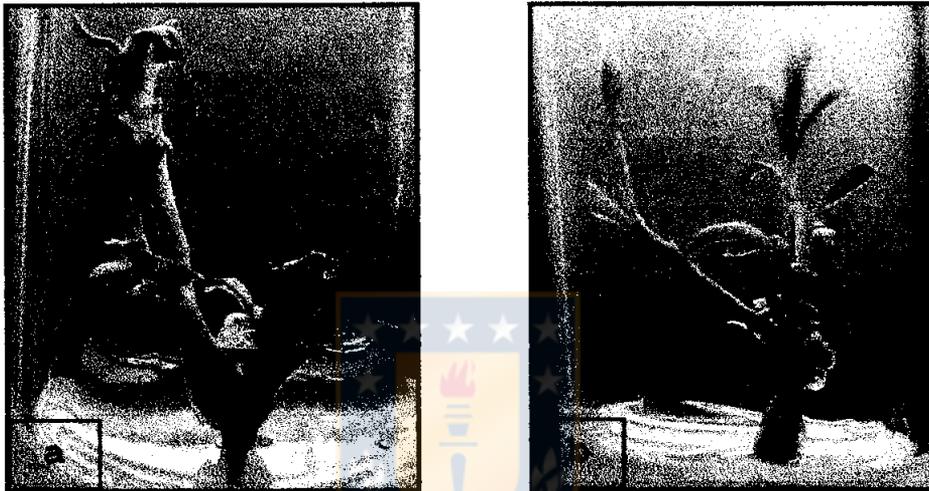


FIGURA 16. Tratamientos de la púa en distintas posiciones sobre un patrón común, expuestas a la luz y en oscuridad. a) patrón con púas injertadas en posición apical, media y basal en 16 h luz; b) patrón con púas injertadas en posición apical, media y basal en oscuridad.

En la Figura 17, se analiza el crecimiento de la púa según la posición sobre el patrón. A los 21 y 40 días existe diferencia significativa entre el basal con los otros tipos de injerto con 5 mm a los 21 días y 11 mm a los 40 días. Es importante señalar que el elevado crecimiento que se produce en el injerto basal se explica debido a que se encuentra más cerca del medio nutritivo, además, en ésta posición existe una acumulación de auxina, la que es traslocada en el tallo en forma polar, y en cortas distancias hacia arriba (Hartmann y Kester, 1998). Otra

razón asociada a esto, es la profundidad del corte para injertar la púa en posición basal, la que puede impedir el paso del flujo de nutrientes y agua hacia las púas superiores.

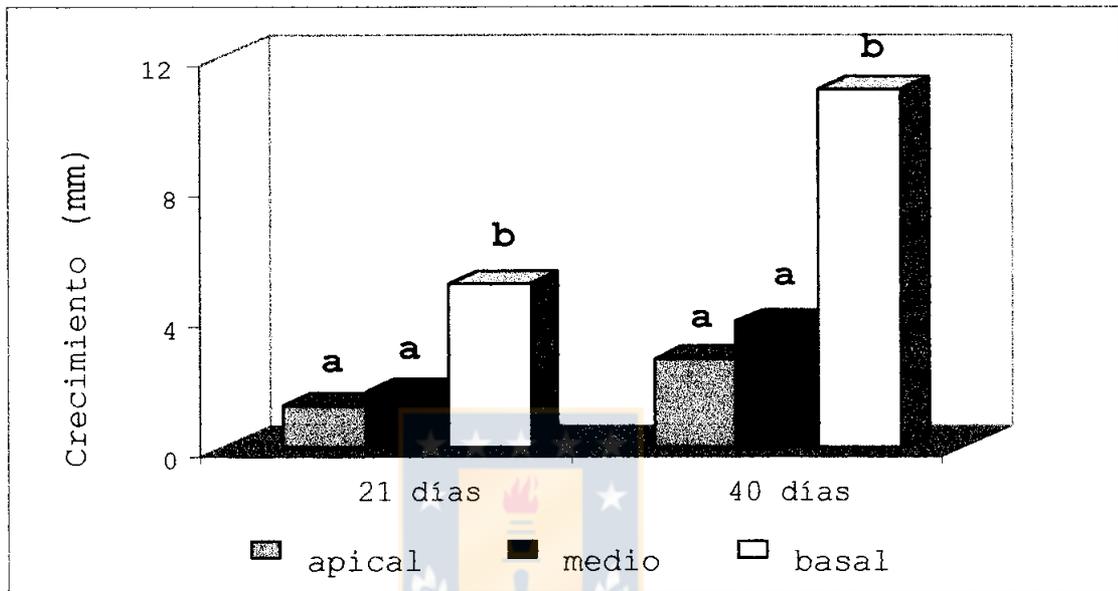


FIGURA 17. Crecimiento de la púa según posición del injerto, a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

La Figura 18 muestra el crecimiento de los injertos según las condiciones de luz, a los 21 días existe diferencia significativa, con un mayor crecimiento en los tratamientos en oscuridad. A los 40 días existe una diferencia notoria entre las dos condiciones de luz, con 7,6 mm los explantes en oscuridad, y 4,14 mm los expuestos a un fotoperíodo de 16 horas. Los injertos en oscuridad, tienen un alargamiento celular de las púas, por el aumento de la síntesis de auxinas endógenas.

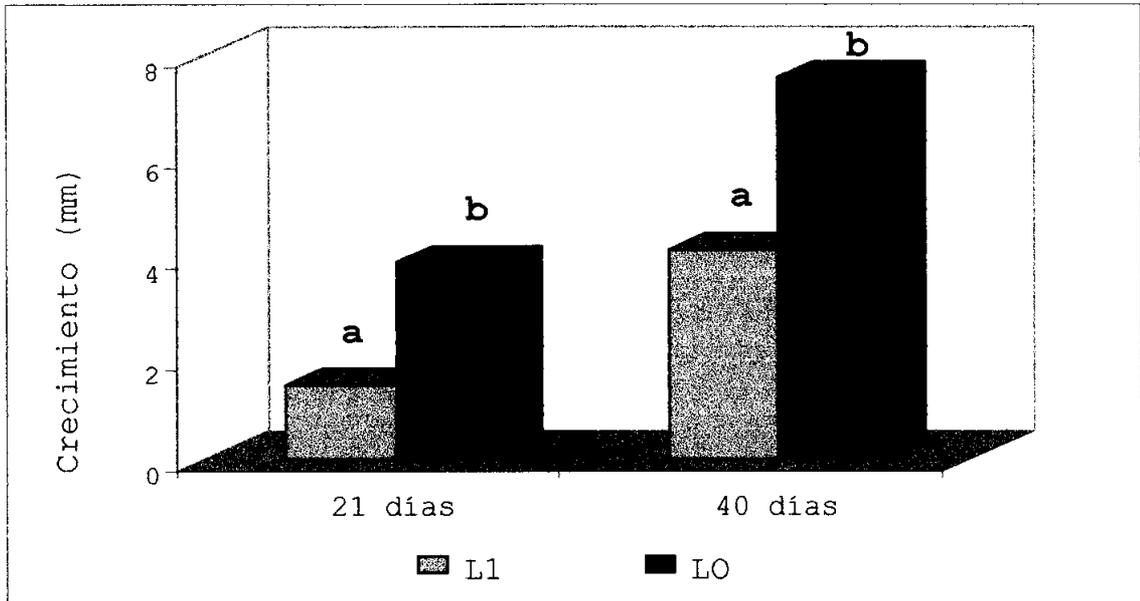


FIGURA 18. Crecimiento de la púa según condiciones de luz, L1 y LO a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

3.3.2 Número de verticilos nuevos. La Figura 19 muestra el número de nuevos verticilos para distintas posiciones de injerto sobre un patrón a distintas condiciones de luz, se puede ver que a los 21 días realizado el microinjerto, no existe diferencia significativa entre ellos. A los 40 días existe diferencia significativa entre el injerto basal con el medio, siendo mayor el basal con 3,6 verticilos como promedio.

Afirmando esto con la Figura 16, donde el número de verticilos es mayor en la posición basal, por la falta de nutrientes del medio hacia los injertos superiores. Se ve además, el mayor número en injertos expuestos a la luz, en donde existe traslocación de auxina a puntos de crecimiento, provocando mayor formación de verticilos y menor elongación celular.

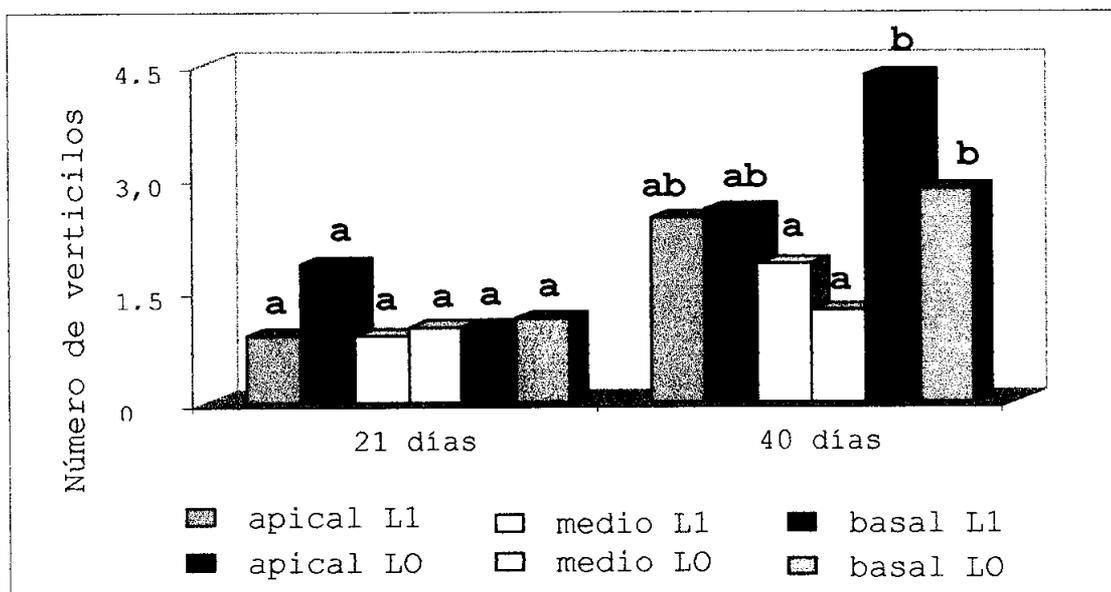


FIGURA 19. Número de nuevos verticilos de la púa en distintas posiciones sobre el patrón a distintas condiciones de luminosidad, L1 y LO, a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

De acuerdo con la posición de la púa sobre el patrón, como se observa en la Figura 20, el injerto apical supera al medio y basal con 1,4 verticilos promedio, sin tener diferencias significativas, a los 21 días. A los 40 días, existe diferencia significativa entre el basal y el medio, teniendo el basal 3,6 verticilos promedio. El apical con 2,5 verticilos promedio se puede decir que existe mayor cantidad de citoquinina lo cual promueve la división celular formando verticilos. El basal se explica porque está más en contacto con el medio nutritivo, teniendo acceso casi directo con nutrientes y reguladores de crecimiento, causando la mayor producción de verticilos y crecimiento. En el caso de la posición media, el que tiene el menor número de verticilos, por encontrarse en un lugar de paso donde los nutrientes no llegan en forma directa.

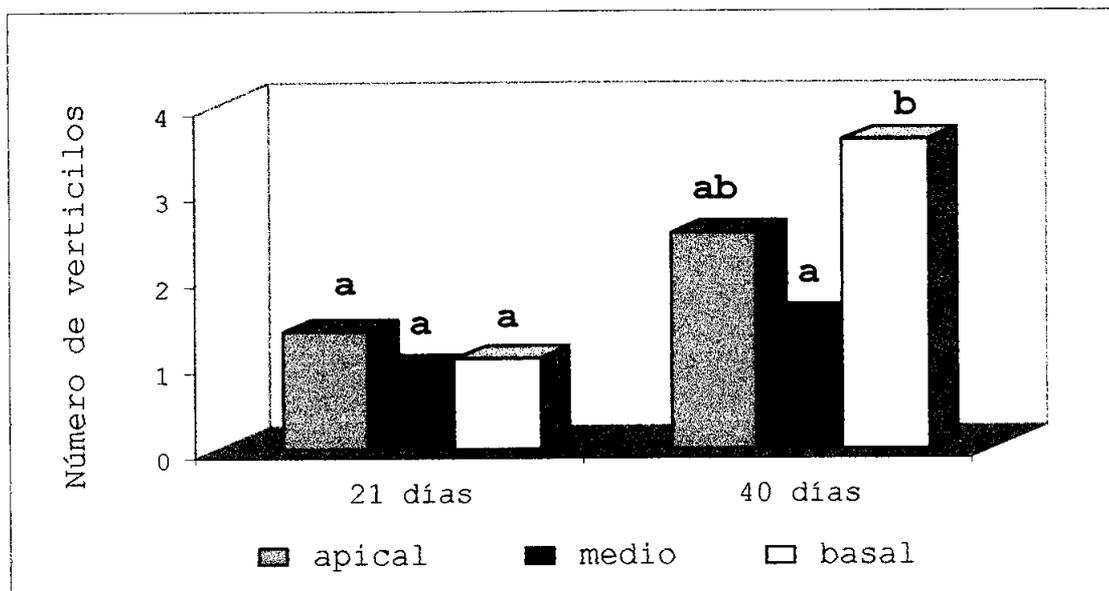


FIGURA 20. Número de nuevos verticilos de la púa según posición sobre el patrón, a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

En la Figura 21, se muestra la producción de nuevos verticilos según la exposición a la luz, no existiendo diferencia significativa entre ellas. A los 21 días, cuando aún los explantes se encuentran en oscuridad superaron a los expuestos a la luz con 1,3 verticilos promedio. A los 40 días los expuestos a la luz (L1) superaron a los expuestos en oscuridad (L0), con 2,9 verticilos promedio. En oscuridad la auxina no es traslocada, produciendo elongación del tejido, por lo que los entrenudos son más largos, reduciendo así el número de verticilos. Se debe tomar en cuenta que cada verticilo es importante, pues origina un nuevo explante.

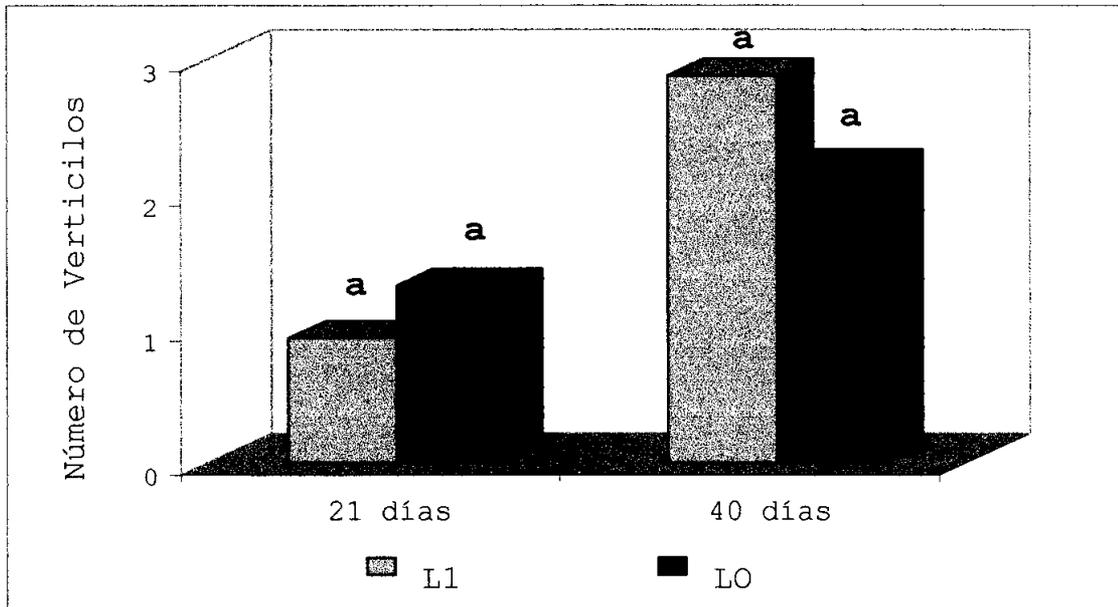


FIGURA 21. Número de nuevos verticilos de la púa según condiciones de luz, L1 y LO a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

3.3.3 Número de brotes nuevos. El número de brotes para los tratamientos con diferentes posiciones de la púa en el patrón y exposiciones de la luz, como se observa en la Figura 16 y 22, a los 21 días no existe diferencia significativa para ningún tratamiento. A los 40 días existe diferencia significativa entre el injerto basal con las otras posiciones, siendo significativamente mayor el expuesto a 16 h de fotoperíodo. El injerto en posición basal intercepta los nutrientes hacia los injertos superiores, por lo que tiene un mayor desarrollo reflejado en un mayor número de brotes.

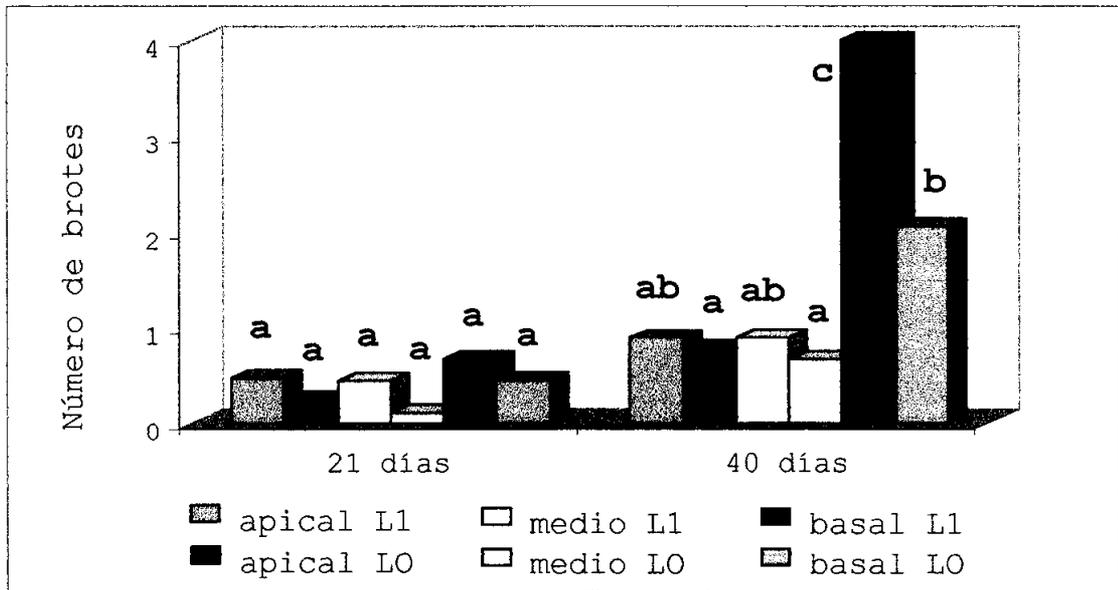


FIGURA 22. Número de brotes de la púa en distintas posiciones sobre el patrón con exposiciones de luz, L1 y L0, a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

En la Figura 23, están representados los tratamientos por posición de la púa en el patrón. A los 21 días no hay diferencia significativa entre los tratamientos. A los 40 días, hay diferencia entre el basal con 3 brotes promedio, con el apical y medio con 0,8 brotes promedio cada uno. El mayor número de brotes en el basal es principalmente por la acumulación de reguladores de crecimiento y nutrientes en ésta posición, además la profundidad del corte en la posición basal del patrón limita el paso de nutrientes hacia púas superiores, lo que se puede notar por la diferencia en el número de brotes.

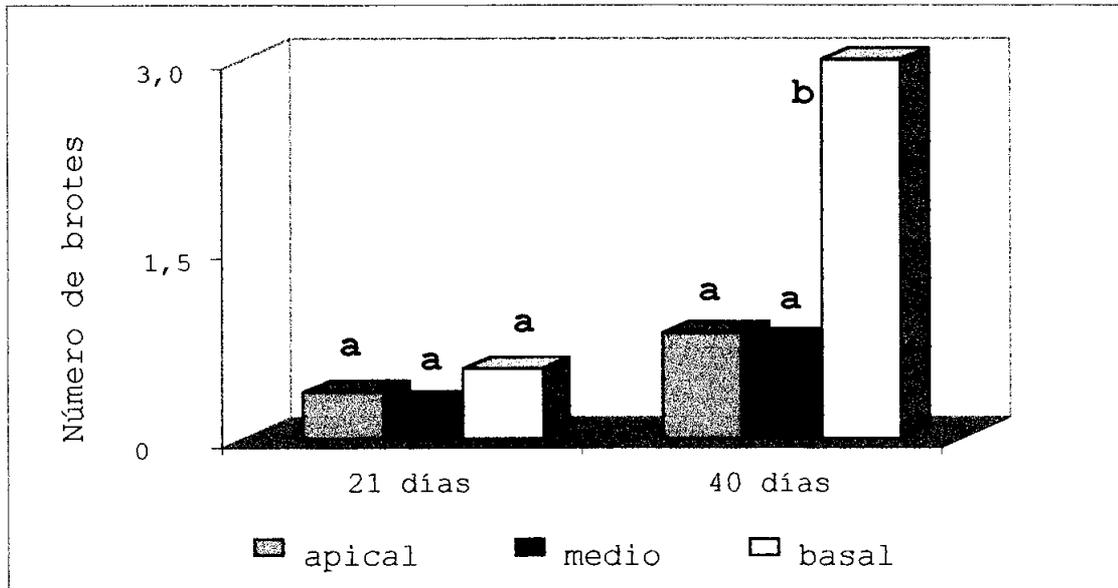


FIGURA 23. Número de brotes de la púa según posición sobre el patrón, a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

En la Figura 24, se muestran los tratamientos por exposición a la luz. A los 21 días no existe diferencia significativa. A los 40 días existe diferencia, el expuesto a la luz es mayor con 1,9 brotes promedio en comparación con 1,2 brotes promedio del expuesto en oscuridad. La relación entre la citoquinina y auxina, en este caso es importante, debido a que si ésta es alta existe una inducción de brotes, por lo que se puede decir que en luz, la cantidad de auxina es menor (Hartmann y Kester, 1998).

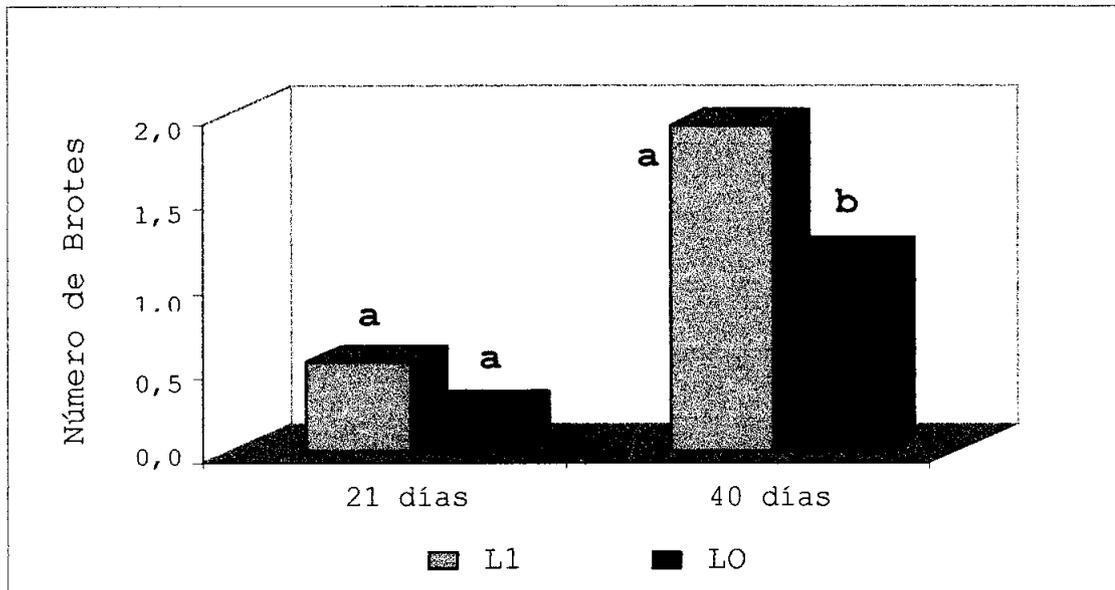


FIGURA 24. Número de brotes de la púa según condiciones de luz, L1 y LO, a los 21 y 40 días realizado el microinjerto (Apéndice 1).

3.4 Viabilidad de patrones con injertos simples y triples.

3.4.1 Viabilidad de la púa. Al observar la Figura 25, que representa la viabilidad de la púa en los distintos tratamientos, se puede decir que existe una diferencia notable entre los tratamientos de patrones con injerto simple con los tratamientos de patrones con injertos triples. Es así como en estos últimos, los expuestos a un fotoperíodo de 16 h tienen una viabilidad de 20%, y los en oscuridad una viabilidad de 60%. En el caso de los tratamientos con injertos simples, podemos decir que existe una alta viabilidad, superior al 70% en todos los casos, alcanzando el 100% en el injerto basal. Estos porcentajes son independientes al factor luz, debido a que en el caso del injerto apical y basal es superior en el expuesto a la luz, y en el injerto medio ocurre lo contrario.

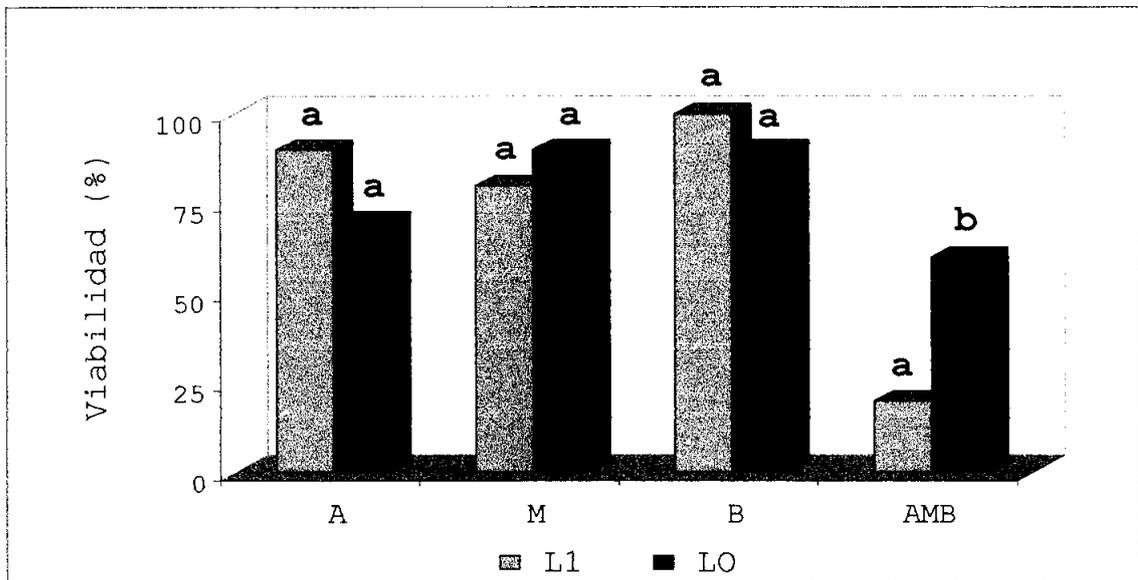


FIGURA 25. Porcentaje de viabilidad de la púa en patrones con injertos simples y triples, para las distintas condiciones de luz (L1 y L0), al final del período de medición (6ª semana) (Apéndice 1).

Esta condición de viabilidad de la púa, depende de varios factores, siendo uno de los más importantes el factor humano, debido a que en toda la etapa de injerto, desde el microinjerto en sí, hasta su crecimiento sobre un patrón libre de brotes, el injertador está en directo contacto con el explante injertado, y este desencadena una serie de otros factores. La elección de un patrón y una púa con similares diámetros, para que no exista desprendimiento de la púa; el corte sobre el patrón y la púa tomando contacto con el tejido vascular, para que exista conexión entre ellos y se produzca un flujo de nutrientes; en el caso de los injertos triples, que el corte no sea tan profundo para asegurar la nutrición de todas las púas; el sumo cuidado al sacar el explante injertado del tubo de ensayo y eliminar los posibles brotes sobre el patrón, son factores que

influyen directamente sobre la viabilidad de la púa. Es así como en los injertos triples, la manipulación es más complicada, por lo que requiere más cuidado que los injertos simples, en donde podemos asegurar en la mayoría de los casos que a la púa le llegará nutrientes y reguladores de crecimiento del medio de cultivo.

3.4.2 Viabilidad del patrón. La viabilidad, en el caso de los tratamientos con injertos triples, es menor con un 40% para los expuestos a la luz, y un 30% los que se encuentran bajo la condición oscuridad, como se observa en la Figura 26. Para el resto de los tratamientos con injertos simples, la viabilidad del patrón no se podría definir como alta, teniendo en el caso del injerto apical un 55% y 34% para el caso de expuesto a la luz y en oscuridad respectivamente, el injerto medio un 36% y 80%, y el basal un 70% y 60%.

Hay que tener en cuenta que el patrón tiene la función de un tubo que transporta nutrientes y agua desde el medio de cultivo hacia la púa. Por ésta razón el patrón debe estar libre de yemas y brotes para no entorpecer el crecimiento de la púa sobre éste, siendo necesario eliminarlas causando heridas. Sumado a esto el corte aplicado para injertar la púa, que en el caso del tratamiento injertos triples, es tres veces mayor que en el simple, provoca oxidación y necrosis.

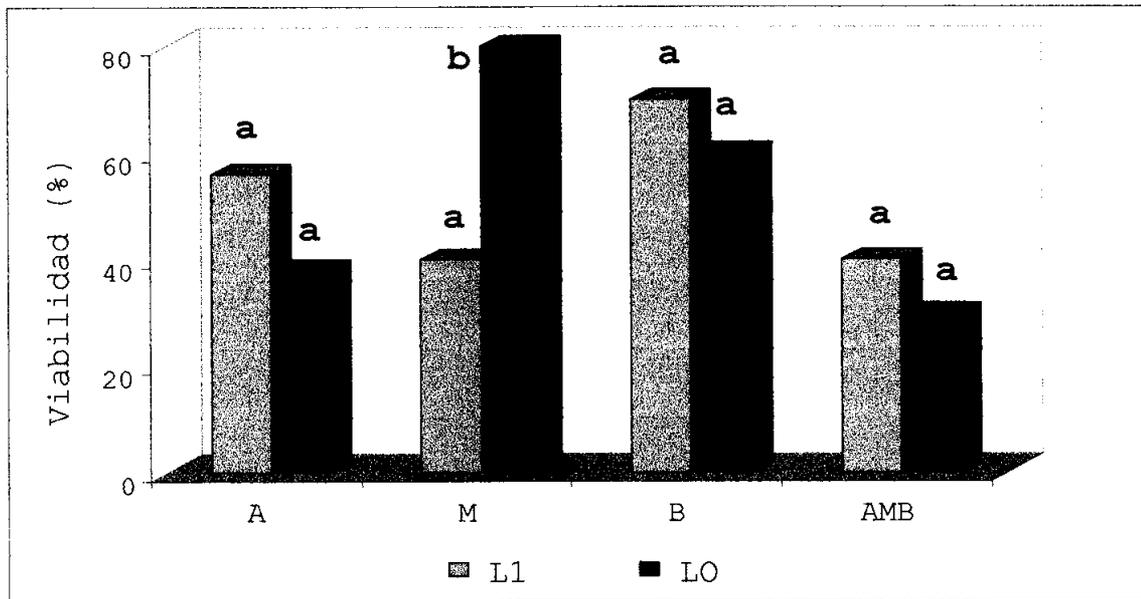


FIGURA 26. Porcentaje de viabilidad del patrón con injertos simples y triples, para distintas condiciones de luz (L1 y L0), al final del período de medición (6^a semana) (Apéndice 1).

IV CONCLUSIONES

El injerto basal tiene mayor efecto revigorizante debido a su posición proximal al medio de cultivo.

La mayor elongación de la púa se logra en oscuridad, puesto que la ausencia de luz induce la síntesis de auxina endógena.

El mayor número de verticilos y brotes en las púas, se obtiene en cultivo bajo fotoperíodo de 16 horas.

La viabilidad de la púa es mayor en injertos simples, debido a que existe mejor manejo y control del cultivo.

La viabilidad del patrón es afectada negativamente por las heridas que se le infieren, provocando oxidación y necrosis del mismo. Por esta razón, para las condiciones ensayadas, el microinjerto triple es poco aconsejable.

V RESUMEN

El microinjerto es una técnica utilizada actualmente en ensayos de revigorización, orientados principalmente a la clonación de materiales adultos seleccionados libres de contaminación.

El material vegetal adulto de clavel es propagado vegetativamente *in vitro*, cultivado en un medio MS con reguladores de crecimiento. Luego de obtener un número indefinido de explantes se puede microinjertar. Una de las partes involucradas en el microinjerto es el patrón, cumpliendo la función de transportar nutrientes y agua desde el medio de cultivo hacia la púa injertada. La púa es obtenida de yemas meristemáticas apicales, las que pueden estar solas o acompañadas de tejido vascular. La región cambial, de ambas partes, debe estar en estrecho contacto para poder lograr una cicatrización exitosa. Es importante que el microinjerto se realice en un medio esterilizado.

En el presente estudio se demostró que la técnica de microinjerto es factible de realizar, utilizando patrones con uno o más injertos. Su efectividad va a depender de la posición de la púa sobre el patrón y de la presencia de luz. En patrones con un microinjerto la viabilidad de la púa fue superior al 80%. Además la posición basal de la púa sobre el patrón expuesta a 16 h luz, presenta mayor crecimiento, mayor formación de verticilos y brotes, variables con la que se puede medir el grado de vigorización.

VI SUMMARY

The micrografting is a technique presently used in rejuvenation tests, orientated principally to clonal propagation of selected adult materials, free of contamination.

The vegetal adult material carnation is propagated vegetatively *in vitro*, cultivated in a MS medium with growth regulators. It is possible to micrografting after obtaining an indefinite number of explants. One of the parts involved in the micrografting is the rootstock. The rootstock has the function of transporting nutrients and water from the culture medium to the graft. The graft is obtained from apical buddings, which can be alone or accompanied by vascular tissue. The cambium zones must be closely connected in order to have a successful cicatrization. It is important the micrografting to be done in a sterilized medium.

In the present study it was demonstrated that the micrografting technique is quite feasible to be done by utilizing rootstocks with one or more graftings. Its effectiveness will depend on the position of the graft upon the rootstock as well as the presence of light. In patrons with one micrografting the viability of the graft was higher than 80%. Again, the basal position of the graft upon the rootstock exposed to 16 h of light presents a higher growth, a better development of buds and shoots. These are variables with which the degree of vigorization can be measured.

VII BIBLIOGRAFIA

1. Barceló, J., G. Nicolas, B. Sabater y R. Sánchez. 1995. Fisiología Vegetal. Pirámides S.A. Madrid, España.
2. Dantas de Oliveira, A. 1996. Incidencia del Ambiente Sobre la Nutrición y el Metabolismo de Reguladores en Plantas Micropropagadas. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo. España.
3. Debergh, P. y P. Read. 1991. Micropropagation. En Micropropagation. Technology and Application (Debergh P.C. y Zimmerman R.H., eds), pp. 1-13. Kluwer Academic Publ., Dordrecht.
4. Hackett, W. y J. Murray. 1993. Micropropagation of woody plants. Maturation and rejuvenation in woody species. (Ahuja M.R., ed.), pp.93-105. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
5. Hartmann, H. y D. Kester. 1998. Propagación de Plantas. Principios y prácticas. Cía. Editorial Continental S.A. de C.V. México. 760 págs.
6. Jensen, W. y F. Salisbury. 1988. Botánica. Editorial McGraw-Hill. Segunda edición. México.
7. Kyte, L. y J. Kleyn. 1996. Plants From the Test Tubes: an introduction to micropropagation. Editorial Portland. Estados Unidos.

8. Margara, J. 1988. Multiplicación Vegetativa y Cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España.
9. Pacheco, J. 1995a. El Microinjerto como Método de Revigorización de Material Adulto de *Pinus* spp. En: Cultivo *in vitro* de plantas: introducción a la biotecnología. 1995. Universidad de Oviedo, España.
10. Pacheco, J. 1995b. Revigorización de material adulto de *Pinus nigra* ARN: Criterios morfológicos y moleculares. Tesis de doctorado. Universidad de Oviedo, España.
11. Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Tercera Edición. Madrid, España.
12. Steel, R. y J. Torrie. 1995. Bioestadística: Principios y Procedimientos. Editorial Mc Graw-Hill, Inc. México, D.F. México.

VIII APENDICE



TABLA 1. Porcentaje de contaminación en el cultivo de material adulto, en un medio con y sin reguladores de crecimiento.

Condición explante		MS sin reguladores (%)	MS con reguladores (%)
Sano		0,83	0,00
Contaminado	Bacteria	5,00	1,67
	Hongo	98,33	100,00
Necrosis	Total	43,33	45,00
	Basal	21,67	27,50

TABLA 2. Porcentaje de explantes vivos, vivos sanos, contaminados con hongos y/o bacteria, y viables para el repique, de material adulto cultivado en un medio MS con reguladores de crecimiento.

Condición explante	Periodo de medición (días)	
	15	30
Sanos	29,30 %	2,30 %
Bacteria	35,02 %	58,44 %
Hongo	30,20 %	38,80 %
Vivos sanos y bacterias	60,30 %	57,14 %

TABLA 3. Datos de crecimiento (mm), para injertos simples con distintas condiciones de luz, a los 21 y 40 días realizado el injerto.

Injerto	Luz	Replica	21 días	40 días
Apical	L1	1	1,47	2,13
		2	4,00	7,17
		3	2,97	5,30
	LO	1	2,00	4,50
		2	1,33	4,00
		3	2,67	6,00
Medio	L1	1	0,90	4,40
		2	2,23	3,23
		3	1,33	5,00
	LO	1	4,83	7,17
		2	2,33	6,00
		3	4,33	6,67
Basal	L1	1	1,33	7,00
		2	5,00	7,00
		3	3,98	12,23
	LO	1	3,67	9,33
		2	5,33	12,33
		3	5,50	11,17

TABLA 4. Modelo lineal general utilizado para definir las diferencias significativas de los distintos tratamientos, para crecimiento en injerto simple.

Tiempo (días)	Fuente	Valor f	Pr > f
21	Injerto	3,53	0,0622
21	Luz	2,89	0,1148
21	Injerto*Luz	2,66	0,1108
40	Injerto	13,38	0,0009
40	Luz	3,11	0,1031
40	Injerto*Luz	0,8169	0,4649

TABLA 5. Test múltiple de Duncan, para la variable crecimiento, con un alfa de 0,05, y grado de libertad 18, en injerto simple.

	21 días	Duncan	40 días	Duncan
Apical L1	2,8133	A	4,8667	A
Apical L0	2,0000	A	4,8333	A
Medio L1	1,4867	AB	4,2100	A
Medio L0	3,8300	AB	6,6133	A
Basal L1	3,4367	B	8,7433	B
Basal L0	4,8333	B	10,9433	B

TABLA 6. Datos de número de nuevos verticilos, para injertos simples con distintas condiciones de luz, a los 21 y 40 días realizado el injerto.

Injerto	Luz	Replica	21 días	40 días
Apical	L1	1	0,33	2,00
		2	2,00	3,00
		3	0,33	2,33
	L0	1	1,50	2,00
		2	2,00	3,00
		3	2,00	2,67
Medio	L1	1	1,00	1,50
		2	0,33	0,67
		3	1,33	3,33
	L0	1	1,33	1,67
		2	0,67	0,67
		3	1,00	1,33
Basal	L1	1	2,33	4,33
		2	2,33	4,00
		3	3,67	5,00
	L0	1	1,00	1,67
		2	2,00	4,33
		3	2,67	4,67

TABLA 7. Modelo lineal general utilizado para definir las diferencias significativas de los distintos tratamientos, para número de verticilos en injerto simple.

Tiempo (días)	Fuente	Valor f	Pr > f
21	Injerto	6,820	0,0105
21	Luz	0,034	0,8577
21	Injerto*luz	2,820	0,0989
40	Injerto	9,990	0,0028
40	Luz	1,030	0,3308
40	Injerto*Luz	0,430	0,6605

TABLA 8. Test múltiple de Duncan, para la variable número de verticilos, con un alfa de 0,05, y grado de libertad 18, en injerto simple.

	21 días	Duncan	40 días	Duncan
Apical L1	0,89	A	2,44	A
Apical L0	1,83	A	2,56	A
Medio L1	0,89	A	1,83	A
Medio L0	1,00	A	1,22	A
Basal L1	2,78	B	4,44	B
Basal L0	1,89	B	3,56	B

TABLA 9. Datos de número de nuevos brotes, para injertos simples con distintas condiciones de luz, a los 21 y 40 días realizado el injerto.

Injerto	Luz	Replica	21 días	40 días
Apical	L1	1	0,33	2,00
		2	0,33	2,00
		3	1,00	2,67
	L0	1	0,00	0,50
		2	0,67	2,00
		3	0,67	0,67
Medio	L1	1	0,00	0,00
		2	0,00	1,67
		3	0,00	1,00
	L0	1	0,00	1,67
		2	0,00	0,33
		3	0,00	1,67
Basal	L1	1	1,00	3,67
		2	0,67	5,67
		3	1,00	5,67
	L0	1	0,33	1,33
		2	0,67	3,33
		3	1,33	3,00

TABLA 10. Modelo lineal general utilizado para definir las diferencias significativas de los distintos tratamientos, para número de brotes en injerto simple.

Tiempo (días)	Fuente	Valor f	Pr > f
21	Injerto	10,660	0,0022
21	Luz	0,240	0,6300
21	Injerto*luz	0,061	0,9409
40	Injerto	16,030	0,0004
40	Luz	7,010	0,0212
40	Injerto*Luz	3,790	0,0531

TABLA 11. Test múltiple de Duncan, para la variable número de brotes, con un alfa de 0,05, y grado de libertad 18, en injerto simple.

	21 días	Duncan	40 días	Duncan
Apical L1	0,55	B	2,22	A
Apical L0	0,45	B	1,06	A
Medio L1	0,00	A	0,89	A
Medio L0	0,00	A	1,22	A
Basal L1	0,89	B	5,00	B
Basal L0	0,78	B	2,55	A

TABLA 12. Datos de crecimiento (mm), para injertos triples con distintas condiciones de luz, a los 21 y 40 días realizado el injerto.

Injerto	Luz	Replica	21 días	40 días
Apical	L1	1	0,83	1,83
		2	1,00	2,00
		3	1,38	1,63
	L0	1	1,33	5,67
		2	0,33	0,67
		3	2,88	4,38
Medio	L1	1	1,83	1,33
		2	1,17	1,50
		3	0,97	3,97
	L0	1	2,00	4,67
		2	1,00	5,67
		3	3,33	6,00
Basal	L1	1	2,00	7,00
		2	2,00	7,00
		3	2,00	11,00
	L0	1	9,17	15,50
		2	8,50	17,00
		3	6,50	8,50

TABLA 13. Modelo lineal general utilizado para definir las diferencias significativas de los distintos tratamientos, para crecimiento en injerto triple.

Tiempo (días)	Fuente	Valor F	PR > F
21	Injerto	28,82	0,00003
21	Luz	30,46	0,00013
21	Injerto*Luz	17,04	0,00031
40	Injerto	20,59	0,00013
40	Luz	8,94	0,11258
40	Injerto*Luz	0,83	0,46085

TABLA 14. Test múltiple de Duncan, para la variable crecimiento, con un alfa de 0,05, y grado de libertad 18, en injerto triple.

	21 días	Duncan	40 días	Duncan
Apical L1	1,07	A	1,82	A
Apical L0	1,51	A	3,57	A
Medio L1	1,32	A	2,27	A
Medio L0	2,11	A	5,45	A
Basal L1	2,00	A	8,33	B
Basal L0	8,06	B	13,67	B

TABLA 15. Datos de número de nuevos verticilos, para injertos triples con distintas condiciones de luz, a los 21 y 40 días realizado el injerto.

Injerto	Luz	Replica	21 días	40 días
Apical	L1	1	0,33	2,00
		2	2,00	3,00
		3	0,33	2,33
	L0	1	1,50	2,00
		2	2,00	3,00
		3	2,00	2,67
Medio	L1	1	1,00	1,50
		2	0,33	0,67
		3	1,33	3,33
	L0	1	1,33	1,67
		2	0,67	0,67
		3	1,00	1,33
Basal	L1	1	1,00	6,00
		2	1,00	3,00
		3	1,00	4,00
	L0	1	1,33	3,00
		2	1,50	4,50
		3	0,50	1,00

TABLA 16. Modelo lineal general utilizado para definir las diferencias significativas de los distintos tratamientos, para número de verticilos en injerto triple.

Tiempo (días)	Fuente	Valor F	PR > F
21	Injerto	1,00	0,3952
21	Luz	2,46	0,1426
21	Injerto*Luz	1,25	0,3202
40	Injerto	4,73	0,0306
40	Luz	1,49	0,2462
40	Injerto*Luz	0,73	0,5020

TABLA 17. Test múltiple de Duncan, para la variable número de verticilos, con un alfa de 0,05, y grado de libertad 18, en injerto triple.

	21 días	Duncan	40 días	Duncan
Apical L1	0,89	A	2,44	AB
Apical L0	1,83	A	2,56	AB
Medio L1	0,89	A	1,83	A
Medio L0	1,00	A	1,22	A
Basal L1	1,00	A	4,33	B
Basal L0	1,11	A	2,83	B

Tabla 18. Datos de número de nuevos brotes, para injertos triples con distintas condiciones de luz, a los 21 y 40 días realizado el injerto.

Injerto	Luz	Replica	21 días	40 días
Apical	L1	1	0,67	1,33
		2	0,00	0,33
		3	0,75	1,00
	L0	1	0,00	0,67
		2	0,00	0,67
		3	0,75	1,00
Medio	L1	1	0,67	0,67
		2	0,67	1,33
		3	0,00	0,67
	L0	1	0,00	1,00
		2	0,33	0,67
		3	0,00	0,33
Basal	L1	1	0,00	5,00
		2	0,00	3,00
		3	2,00	4,00
	L0	1	0,33	2,67
		2	0,00	2,50
		3	1,00	1,00

TABLA 19. Modelo lineal general utilizado para definir las diferencias significativas de los distintos tratamientos, para número de brotes en injerto triple.

Tiempo (días)	Fuente	Valor F	PR > F
21	Injerto	0,34	0,7187
21	Luz	0,86	0,3715
21	Injerto*Luz	0,02	0,9821
40	Injerto	24,73	0,0001
40	Luz	64,7	0,0258
40	Injerto*Luz	3,97	0,0475

TABLA 20. Test múltiple de Duncan, para la variable número de brotes, con un alfa de 0,05, y grado de libertad 18, en injerto triple.

	21 días	Duncan	40 días	Duncan
Apical L1	0,47	A	0,89	AB
Apical L0	0,25	A	0,78	A
Medio L1	0,45	A	0,89	AB
Medio L0	0,11	A	0,67	A
Basal L1	0,67	A	4,00	C
Basal L0	0,44	A	2,06	B

TABLA 21. Viabilidad de la púa en los distintos tratamientos, para injerto simple como para injerto triple, en la sexta semana de medición.

	Apical	Medio	Basal	Triple
Luz	90%	80%	100%	20%
Oscuridad	70%	90%	90%	60%

TABLA 22. Viabilidad de los patrones en los distintos tratamientos, tanto en injerto simple como en injerto triple, en la sexta semana de medición.

	Apical	Medio	Basal	Combinado
Luz	56%	40%	70%	40%
Oscuridad	38%	80%	60%	30%