

APLICACIÓN DE DIVERSAS TÉCNICAS ESTADÍSTICAS A UN ESTUDIO DE ORGANOGÉNESIS ADVENTICIA DE KIWÍ

M.R. Paradela¹, P. De Paz¹, G. Fiestras², A. Saavedra², P.P. Gallego¹

¹Fisiología y Biotecnología Vegetal

Fac. Ciencias. Univ. Vigo

²Estadística e Investigación Operativa

Fac. Económicas y Empresariales. Univ. Vigo

RESUMEN

La organogénesis adventicia consiste en la formación de estructuras diferenciadas (en nuestro caso brotes) a partir de órganos no meristemáticos. Pretendemos evaluar la influencia del tipo de explanto, combinación de fitohormonas y condiciones de luz sobre este proceso.

1. INTRODUCCIÓN

El proceso de organogénesis adventicia indirecta está determinado por varias fases. En la primera fase las células de los explantos adquieren competencia y se desdiferencian, es decir, forman un tejido desdiferenciado llamado callo. En la segunda fase las células competentes en explantos cultivados son determinadas para la formación de un órgano específico bajo la influencia de determinados factores, es la fase de morfogénesis, en la cual se forman las yemas. A partir de entonces la morfogénesis continúa independientemente durante la tercera fase, en la cual los yemas formarán brotes (caulogénesis). El objetivo de este trabajo es evaluar cuáles son las condiciones de cultivo más favorables en cada una de estas fases para lograr explantos hábiles para la siguiente etapa. Dada la naturaleza dicotómica de las variables respuestas: sobrevive o no, se forma callo o no, se forman yemas o no, se forman brotes o no, se aplicó el análisis de regresión logística para analizar esa relación (Mize et al. (1999)).

También hemos analizado qué factores determinan el número de brotes que se forman. Puesto que se trata de un recuento hemos utilizado la regresión binomial negativa para efectuar el análisis pues se ha detectado un efecto de sobredispersión en el modelo de regresión de Poisson.

El trabajo se estructura de la siguiente forma. En la sección 2 se describen las condiciones en las que se realizaron los experimentos. En la sección 3, se señalan brevemente las técnicas estadísticas empleadas. La sección 4 está dedicada a la exposición de los resultados obtenidos. En la sección 5 se presentan las conclusiones que podemos extraer de nuestros experimentos. Finalmente, aparece una lista con las referencias de los trabajos utilizados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Como fuente del material vegetal se utilizaron brotes de kiwi mantenidos en condiciones *in vitro*. Estos brotes se cultivaron en medio de multiplicación Ch suplementado con 1 mg/L de BAP y 1 mg/L de GA₃ a 23°C con fotoperiodo de 16 h luz: 8 h oscuridad, subcultivado cada 6 semanas. A partir de estos brotes se obtuvieron los explantos (exp) utilizados en el estudio de organogénesis adventicia: peciolas de tamaño 0.5-1 cm (P) y discos foliares de 1 cm de diámetro con la parte abaxial (H) o con la parte adaxial (E) en contacto con el medio.

En el primer subcultivo se utilizó la composición completa de macronutrientes, micronutrientes, fuente de hierro y vitaminas del medio descrito por Cheng en 1975 (Ch) con 3% de sacarosa, 0.8% de agar, ajustado a un pH de 5.8±0.02. El medio fue suplementado con 5 mg/L

de zeatina y 0.1 mg/L de NAA o con 2 mg/L de tidiázurón, denominándose medio con citoquinina (citoq) Z y TDZ, respectivamente. Los medios se dispensaron en placas, aproximadamente 25 mL por placa. Posteriormente, se cortaron y colocaron los explantos en las placas con el medio, sellándolas con Parafilm®. Por tratamiento se utilizaron 10 placas: 4 para peciolos y 3 para cada tipo de discos foliares, con 5 explantos por placa.

En el segundo y tercer subcultivo, los explantos se transfirieron a medio con la concentración de macronutrientes, micronutrientes, fuente de hierro y citoquininas diluidas a la mitad. Se utilizaron frascos de vidrio de 120 mL con aproximadamente 30 mL de medio de cultivo.

Las condiciones de iluminación (luz) que probamos a lo largo de los tres subcultivos fueron:

- L: fotoperiodo de 16 h luz: 8 h oscuridad durante los 3 subcultivos.
 - O: oscuridad sólo durante el primer subcultivo.
 - LO: fotoperiodo en el primer subcultivo, oscuridad en el segundo y, de nuevo, fotoperiodo en el tercero.
 - OTot: oscuridad en el primer y segundo subcultivo, con fotoperiodo en el tercero.
 - O1sL: oscuridad la primera semana y luego siempre fotoperiodo.
 - O1sO: oscuridad la primera semana y durante el segundo subcultivo.
- Cada subcultivo duró 6 semanas. Los explantos se mantuvieron siempre a 23°C.

3. TOMA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Debido a que hasta el segundo subcultivo, es decir, a partir de la semana 6, hubo tratamientos de luz que no se diferenciaban, la variable condición de luz hasta ese momento se consideró que tenía tres niveles: L, que comprendía los tratamientos L y LO; O, que comprendía O y OTot; y, O1s, que comprendía O1sL y O1sO.

Se tomaron datos de supervivencia, formación de callo y estructuras organizadas o morfogénesis, a las 2, 4, 6 y 18 semanas del inicio del experimento. Al final de los tres subcultivos, en la semana 18, se midió además cuántos explantos formaron brotes o caulogénesis y el número de los mismos.

En el caso de los datos de tipo binomial (supervivencia, callogénesis, morfogénesis y caulogénesis) se analizaron mediante regresión logística. En las variables binomiales que se midieron varias veces a lo largo del experimentos también se comparó la distribución de las curvas de densidad con un test de Kaplan-Meier.

La variable número de brotes es de tipo discreto. Se le hizo un test para comprobar si se ajustaba a una distribución de Poisson o a una binomial negativa mostrando sobredispersión, por lo que se analizó ajustándola a una distribución binomial negativa.

4. RESULTADOS

4.1 SUPERVIVENCIA

La supervivencia fue de un 100% en todos los tratamientos de luz a lo largo de todos los subcultivos, independientemente del tipo de explanto, de la citoquinina presente en el medio y de las condiciones de luz.

4.2 CALLOGÉNESIS

No se encontraron diferencias entre las curvas de callogénesis a lo largo del tiempo entre los distintos tratamientos estudiados.

En la semana 2 se observó que un 22.37% de explantos presentaban callo. El único tratamiento en el que no se registró formación de callo fue H 5Z O1s. Al analizar los datos mediante regresión logística, se vió que la callogénesis no estaba afectada de forma significativa por las condiciones de iluminación a las que se vieron sometidos los explantos sino que los factores que afectaron fueron el tipo de explanto, de citoquinina en el medio y la interacción entre ambos. En medio con zeatina, los explantos E y P se comportaban de la misma forma y eran

mejores que los H. En medio con tidiázurón la callogénesis siguió el orden: P>E>H. Para los explantos P y E las odds ratio de TDZ respecto a Z fueron 2.725 y 0.523, respectivamente. Así, mientras que para los explantos P fue mejor el TDZ para E fue mejor Z. En los discos foliares H no aparecieron diferencias significativas debidas al tipo de citoquinina (Datos no mostrados).

En la semana 4, la callogénesis aumentó hasta un 97.81%. Las variables con un efecto significativo sobre la formación de callo fueron el tipo de citoquinina y el tipo de explanto. Los explantos P y E fueron iguales entre sí y significativamente mejores que H. La zeatina fue 3.8 veces mejor que el TDZ en la inducción de callo (Tabla 1).

Tabla 1: Análisis de regresión logística de datos de callogénesis en la semana 4. Las categorías de referencia fueron P y Z

Modelo	-2 log verosimilitud	Ji-cuadrado	gl	Sig.	Cox y Snell	Nagelkerke
Intersección	125.083				.48	.253
Final	95.798	29.285	3	.000		
	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
CITOQ(TDZ)	-1.334	.674	3.916	1	.048	.263
EXP			7.880	2	.019	
EXP(H)	-2.908	1.048	7.702	1	.006	.055
EXP(E)	5.681	19.835	.082	1	.775	293.358
Constante	6.350	1.135	31.274	1	.000	572.441

El 100% de los explantos en todos los tratamientos estudiados contaron con la presencia de callo en la semana 6.

4.3 MORFOGÉNESIS

Mediante una comparación de sus curvas con un test de Kaplan-Meier, se detectaron diferencias en la morfogénesis debidas al tipo de explanto y a las condiciones de luz. No se encontraron diferencias entre los dos tipos de citoquininas.

En la revisión de la segunda semana tan sólo se registró un 0.17% de explantos con morfogénesis, lo que ocurrió en el tratamiento P 2TDZ O1sO. En la semana 4 ya se detectó un 48% de callos morfogénicos, mediante un análisis de regresión logística se comprobó que los factores que influían significativamente sobre la morfogénesis eran el tipo de explanto, la condición de luz y la interacción entre ambos. Las odds ratio de L y O1s con respecto a O: para el explanto P, fueron de 5.047 y 7.261, siendo ambas condiciones significativamente mayores que O; para H, fueron de 1.231 y 1.37, sin mostrar diferencias entre las tres condiciones de iluminación y para E, 1.999 y 1.118, de forma que L fue mejor que O y O1s. Las odds ratio de los explantos H y E respecto P fueron: para O, 11.005 y 13.312 siendo mejores que P; para L, 2.685 y 5.271, de forma que E>H>P y para O1s, 2.080 y 2.050 siendo de nuevo los mejores H y E (Datos no mostrados).

En la semana 6, el 90% de los explantos tenía yemas y se obtuvieron tratamientos con un 100% de morfogénesis. Al analizar los datos mediante regresión logística, se encontró que el modelo que mejor se ajustaba a nuestros datos incluía las tres variables independientes estudiadas: luz, tipo de explanto y citoquinina junto con la interacción de luz - tipo de explanto. En la Tabla 2 se puede observar que el TDZ es 0.385 veces menos posible que se formen estructuras organizadas que con Z. La principal diferencia fue debida al tratamiento P-Osc, de forma que Osc fue significativamente peor que los otros tratamientos de luz para el explanto P y, a su vez, el explanto P fue el peor para la condición de iluminación Osc. El resto de los tratamientos se situaron sobre el 100%.

Tabla 2: Análisis de regresión logística de datos de morfogénesis de la semana 6. Las categorías de referencia fueron Z, P y O.

Modelo	-2 log verosimilitud	Ji-cuadrado	gl	Sig.	Cox y Snell	Nagelkerke
Intersección	378.977				.137	.289
Final	292.201	86.776	9	.000		
	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
CITOQ(TDZ)	-.954	.317	9.043	1	.003	.385
EXP			19.922	2	.000	
EXP(H)	2.139	.574	13.870	1	.000	8.492
EXP(E)	1.514	.473	10.262	1	.001	4.545
LUZ			28.395	2	.000	
LUZ (L)	1.909	.492	15.062	1	.000	6.745
LUZ(O1s)	2.751	.639	18.561	1	.000	15.662
EXP * LUZ			12.945	4	.012	
EXP(H) by LUZ(L)	5.641	20.934	.073	1	.788	281.849
EXP(H) by LUZ(O1s)	4.757	21.860	.047	1	.828	116.403
EXP(E) by LUZ(L)	.165	1.194	.019	1	.890	1.179
EXP(E) by LUZ(O1s)	-2.935	.850	11.937	1	.001	.053
Constante	1.073	.299	12.891	1	.000	2.926

En la semana 18 todos los tratamientos, excepto P OTot TDZ con un 94%, tuvieron estructuras organizadas en todos los explantos.

4.4 CAULOGÉNESIS

Con respecto a la caulogénesis, un 98% de los explantos iniciales produjeron brotes: el 99% de los explantos P y E y el 95% de los H fueron caulogénicos.

En análisis de regresión logística se observó que el explanto tenía un efecto significativo mientras el tipo de citoquinina o la luz no influían, aunque el modelo se ajustaba muy poco a los datos observados. Se puede ver que el explanto E no se puede diferenciar del explanto P, mientras que H es significativamente peor que P con una odds ratio de 0.09 (Tabla 3).

Tabla 3: Análisis de regresión logística de datos de caulogénesis. La categoría de referencia fue P.

Modelo	-2 log verosimilitud	Ji-cuadrado	gl	Sig.	Cox y Snell	Nagelkerke
Intersección	100.507				.019	.117
Final	89.613	10.894	2	.004		
	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
EXP			8.135	2	.017	
EXP(H)	-2.408	1.066	5.106	1	.024	.090
EXP(E)	-.286	1.418	.041	1	.840	.751
Constante	5.416	1.002	29.206	1	.000	224.983

4.5 NÚMERO DE BROTES

Se consiguió una media de 8.35 brotes por explanto inicial. Tanto en explantos P como en E se consiguieron más de 8 brotes por explanto. Sin embargo, en explantos H se obtuvieron 6 brotes por explanto en medio con zeatina y 10 en medio con tidiazurón.

Mediante regresión binomial negativa, se concluyó que sobre el número de brotes influían todas las variables estudiadas, así como sus interacciones de 2 en 2 (Tabla 4). En Osc y OTot se formaron aproximadamente la misma proporción de brotes en medio con zeatina que con

tidiazurón y son las condiciones de luz en las que más brotes se formaron. Sin embargo, en Luz se formaron 1.75, 2.63 y 1.47 veces más brotes en medio con tidiazurón que con zeatina en P, H y E respectivamente (es decir, hay un 75%, 163% y 47% más brotes en medio con TDZ). Con LO y O1sL y en P y E, aproximadamente la misma proporción de brotes se formaron en medio con Z y TDZ mientras que en H se formaron menos brotes en Z. En O1sO para todos los explantos se formaron más brotes con Z que con TDZ. En todas las condiciones de iluminación los explantos H eran los que tienen menor proporción de brotes formados en Z que en TDZ. En medio con TDZ, en los explantos H se formaron en general más brotes que en el resto de los explantos, independientemente de la condición de luz, mientras que en medio con Z, fue en E en el que formó mayor número. A los explantos P no les afectó tanto la citoquinina como las condiciones de iluminación, siendo de los explantos que más brotes formó en las condiciones L, LO, O1sL y O1sO.

Tabla 4: Análisis de regresión binomial negativa del número de brotes. Las categorías de referencia fueron E, O1sO y TDZ.

Modelo	-2 log verosimilitud	Ji-cuadrado	gl	Sig.
Intersección	6194.703			
Final	5638.4098	556.2932	530	.000
	gl	Ji-Cuadrado		Sig.
EXP	2	6.00		0.0499
LUZ	5	34.53		<.0001
CITOQ	1	19.72		<.0001
EXP*LUZ	10	32.08		0.0004
EXP*CITOQ	2	26.61		<.0001
LUZ*CITOQ	5	38.06		<.0001

	B	E.T.	gl	Ji-cuadrado	Sig.
Constante	2.0888	0.1146	1	332.43	<.0001
EXP(P)	0.2787	0.1373	1	4.12	0.0424
EXP(H)	0.2241	0.1502	1	2.23	0.1357
LUZ(O)	0.0026	0.1538	1	0	0.9866
LUZ(L)	-0.019	0.1654	1	0.01	0.9087
LUZ(LO)	0.1664	0.1533	1	1.18	0.2778
LUZ(OTot)	0.103	0.1514	1	0.46	0.4965
LUZ(O1sL)	-0.3208	0.1658	1	3.75	0.053
CITOQ(ZA)	-0.2913	0.1289	1	5.1	0.0239
EXP(P)*LUZ(O)	-0.4993	0.1802	1	7.68	0.0056
EXP(P)*LUZ(L)	0.024	0.1887	1	0.02	0.8986
EXP(P)*LUZ(LO)	-0.2278	0.1808	1	1.59	0.2079
EXP(P)*LUZ(OTot)	-0.3398	0.177	1	3.68	0.0549
EXP(P)*LUZ(O1sL)	0.2152	0.1874	1	1.32	0.2507
EXP(H)*LUZ(O)	-0.0805	0.1963	1	0.17	0.6819
EXP(H)*LUZ(L)	0.0391	0.2148	1	0.03	0.8556
EXP(H)*LUZ(LO)	-0.3013	0.1969	1	2.34	0.126
EXP(H)*LUZ(OTot)	0.1422	0.1921	1	0.55	0.4591
EXP(H)*LUZ(O1sL)	0.1446	0.2148	1	0.45	0.5008
EXP(P)*CITOQ(ZA)	-0.171	0.1055	1	2.63	0.1051
EXP(H)*CITOQ(ZA)	-0.5867	0.1159	1	25.64	<.0001
LUZ(O)*CITOQ(ZA)	0.5767	0.1523	1	14.33	0.0002
LUZ(L)*CITOQ(ZA)	-0.1005	0.1616	1	0.39	0.5338
LUZ(LO)*CITOQ(ZA)	0.4272	0.1541	1	7.68	0.0056
LUZ(OTot)*CITOQ(ZA)	0.6108	0.1489	1	16.82	<.0001

LUZ(O1sL)*CITOQ(ZA)	0.5375	0.1567	1	11.76	0.0006
Dispersión	0.1449	0.0166	1		

5. DISCUSIÓN

Se ha comprobado que los requerimientos y el efecto de las variables en cada etapa fueron diferentes. En la callogénesis influían el tipo de explantos y citoquinina en el medio, siendo mejor TDZ y los explantos P y E, también se detectaron las interacciones P-TDZ y E-Z. Sobre la morfogénesis afectó principalmente el tipo de iluminación y el tipo de explanto, siendo los mejores explantos H y E con una interacción positiva entre E-L y una negativa entre P-O, además Z indujo una mayor morfogénesis. En cuanto a la caulogénesis sólo afectó el tipo de explanto, siendo de nuevo peor H. Por otro lado, en el número de brotes todos los factores estudiados tuvieron efectos estadísticamente significativos, con un efecto positivo de TDZ. Hay relaciones que se mantuvieron a lo largo de todo el experimento, como son una relación positiva entre E-Z y L-TDZ y una negativa entre P-Osc.

El desarrollo organizado tiene lugar como consecuencia de interacciones cuantitativas de varios factores, entre los que juegan un papel fundamental los reguladores de crecimiento. Las dos citoquininas empleadas en este estudio se diferenciaron fundamentalmente en la gran capacidad callogénica y de formación de brotes que mostró el TDZ. Huetteman y Peece (1993) también encontraron que el TDZ formaba muchos brotes lo cual podría ser debido a la alta actividad citoquinina del TDZ. Se encontró una relación positiva entre TDZ y L probablemente debida a la mayor estabilidad del TDZ en condiciones de luz.

El tipo de explanto tuvo un efecto significativo sobre todas las variables medidas. Los mejores explantos fueron P y E. Los explantos H y E son discos foliares que se diferenciaron únicamente en su colocación sobre el medio. Nehra et al. (1988) y Welander (1988) también encontraron una mayor respuesta morfogénica cuando colocaban las hojas con la parte adaxial en contacto con el medio. Welander propuso como explicación que el parénquima en empalizada en la cara adaxial era más sensible a los nutrientes del medio. La polaridad inherente del tejido también probablemente también esté causada por el transporte de hormonas en el tejido vascular.

La luz a menudo es necesaria para la formación de brotes adventicios pero no siempre. Ocasionalmente se puede aumentar la morfogénesis si se mantienen los explantos en oscuridad durante un periodo de tiempo (Welander, 1988). En este experimento se intentó ver a qué variables podía afectar la luz, cambiando las condiciones de iluminación. No tuvieron influencia sobre la callogénesis ni sobre la caulogénesis pero sí sobre la morfogénesis, número de brotes. En la morfogénesis en la condición de luz L se formaron antes estructuras organizadas, pero para número de brotes fueron mejores los tratamientos con un periodo de oscuridad de 1 a 2 subcultivos (O y OTot, respectivamente).

6. BIBLIOGRAFÍA

- HUETTEMAN C.A., PREECE J.E. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 105-119.
- NEHRA N.S., STUSHNOFF C. 1988. Regeneration of plants from immature leaf-derived callus of strawberry. *HortScience* 23: 756.
- MIZE C.W., KOEHLER K.J., COMPTON M.E. 1999. Statistical considerations for in vitro research: II- Data to presentation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 35:122-126.
- SUGIYAMA M. 1999. Organogenesis in vitro. *Current Opinion in Plant Biology* 2:61-64.
- WELANDER M. 1988. Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised *in vitro* from mature apple trees. *J. Plant Physiol.* 132: 738-744.