

**REGENERACIÓN *IN VITRO* VÍA ORGANOGÉNESIS Y AISLAMIENTO DE  
PROTOPLASTOS DE *Gmelina arborea* A PARTIR DE PLANTAS *IN VITRO*.**

**LIESEL GAMARRA REINOSO**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial para optar el título**

**Bióloga**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**BOGOTÁ D.C DE 2014**

**REGENERACIÓN *IN VITRO* VÍA ORGANOGÉNESIS Y AISLAMIENTO DE  
PROTOPLASTOS DE *Gmelina arborea* A PARTIR DE PLANTAS *IN VITRO*.**

**LIESEL GAMARRA REINOSO**

**DIRECTOR**

**Wilson Terán Pérez**

**Bióloga**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**BOGOTÁ D.C DE 2014**

**REGENERACIÓN *IN VITRO* VÍA ORGANOGÉNESIS Y AISLAMIENTO DE  
PROTOPLASTOS DE *Gmelina arborea* A PARTIR DE PLANTAS *IN VITRO*.**

**LIESEL GAMARRA REINOSO**

APROBADO

---

Andrea Forero Ruiz  
Directora Carrera de Biología

---

Concepción Judith Puerta  
Decana Facultad de Ciencias

**REGENERACIÓN *IN VITRO* VÍA ORGANOGÉNESIS Y AISLAMIENTO DE  
PROTOPLASTOS DE *Gmelina arborea* A PARTIR DE PLANTAS *IN VITRO*.**

**LIESEL GAMARRA REINOSO**

APROBADO

---

Wilson Terán Pérez

Director

---

Claudia Ramírez

Jurado

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución N° 13 Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

## **DEDICATORIA**

A Dios y a mi familia.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a Dios, a mi familia, al profesor Wilson por tenerme paciencia y dejarme trabajar y aprender de él, y a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Mary Luz por ser un apoyo tanto en lo académico como personal.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN .....	13
1 ANTECEDENTES.....	14
2 MARCO TEÓRICO.....	16
2.1 <i>Gmelina arborea</i> ROXB.....	16
2.1.1 Distribución geográfica y origen.....	16
2.1.1.1 Melina en Colombia.....	17
2.1.2 Taxonomía.....	18
2.1.3 Descripción morfológica.....	19
2.1.3.1 Flores.....	19
2.1.3.2 Frutos .....	20
2.1.3.3 Semilla .....	20
2.1.3.4 Hojas .....	21
2.1.3.5 Raíz .....	21
2.1.4 Condiciones ambientales.....	21
2.1.5 Propagación.....	22
2.1.6 Usos.....	22
2.1.6.1 Característica de las madera.....	22
2.1.6.2 Usos de la madera .....	22
2.1.6.3 Reforestación y Sistemas Agroforestales.....	23
2.1.6.4 Uso medicinal .....	24
2.1.6.5 Otros.....	25
2.2 REGENERACION <i>IN VITRO</i> .....	25
2.2.1.1 Organogénesis.....	26
2.2.1.1.1 Organogénesis directa.....	27
2.2.1.2 Organogénesis indirecta.....	28
2.2.2 Factores que influyen en la regeneración.....	28
2.2.2.1 Elementos esenciales .....	29
2.2.2.1.1 Macroelementos.....	29
2.2.2.1.2 Microelementos .....	30
2.2.2.2 Suplementos orgánicos .....	31
2.2.2.3 Fuente de carbono .....	31
2.2.2.4 Agentes gelificante.....	32
2.2.2.5 Fitorreguladores .....	32
2.2.2.5.1 Auxinas.....	33
2.2.2.5.2 Citoquininas.....	34
2.2.2.6 Material vegetal .....	35
2.2.2.7 Factores ambientales: pH, temperatura, humedad y luz .....	36
2.2.3 Enraizamiento de brotes .....	37
2.3 PROTOPLASTOS .....	37
2.3.1 Tipos de aislamiento.....	38
2.3.1.1 Método mecánico.....	38
2.3.1.2 Método enzimático.....	39
2.3.1.2.1 Enzimas .....	39



2.3.1.2.2	Buffer de aislamiento.....	40
2.3.1.2.3	Fuente para la obtención de protoplastos .....	41
2.3.1.2.4	Oscuridad, temperatura y tiempo de acción. ....	41
2.3.2	Uso de los protoplastos .....	42
3	JUSTIFICACIÓN.....	43
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	45
5	OBJETIVOS.....	47
5.1	GENERAL .....	47
5.2	ESPECIFICOS .....	47
6	MATERIALES Y METODOLOGÍA .....	47
6.1	MATERIAL VEGETAL.....	47
6.1.1	Fuentes de explantes empleadas en el estudio. ....	47
6.1.2	Muestras .....	48
6.1.3	Obtención de Material Vegetal .....	48
6.2	REGENERACION <i>in vitro</i> VÍA ORGANOGENESIS DE <i>Gmelina arborea</i> .....	49
6.2.1	Cultivo <i>in vitro</i> de semillas de <i>Gmelina arborea</i> .....	49
6.2.1.1	Extracción de semillas del endocarpo.....	49
6.2.1.2	Germinación <i>in vitro</i> de semillas .....	49
6.2.2	Organogénesis y regeneración <i>in vitro</i> .....	50
6.2.2.1	Preparación de los explantes.....	50
6.3	Enraizamiento de segmentos nodales de Melina.....	51
6.4	AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE MELINA.....	52
6.4.1	Tratamiento pre - aislamiento. ....	52
6.4.2	Aislamiento de protoplastos.....	52
6.4.3	Conteo de protoplastos y viabilidad.....	53
6.5	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	54
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
7.1	Desdiferenciación y Potencial morfogenético de diferentes fuentes de explantes.....	55
7.1.1	Nudo cotiledonar .....	60
7.2	Enraizamiento de segmentos nodales.....	64
7.3	Aislamiento de protoplastos .....	66
7.3.1	Replica 1.....	66
7.3.1.1	Cantidad de protoplastos.....	68
7.3.1.2	Concentración enzimática vs número de protoplastos.....	69
7.3.1.3	Tiempo de incubación vs número de protoplastos.....	70
7.3.1.4	Concentración vs viabilidad de protoplastos ... <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
7.3.1.5	Tiempo de incubación vs número de protoplastos viables .... <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
7.3.1.5	Tiempo de incubación vs número de protoplastos viables .... <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
7.3.2	Replica 2.....	71
7.3.2.1	Cantidad de protoplastos.....	74
7.3.2.2	Concentración enzimática vs número de protoplastos.....	74
7.3.2.3	Tiempo de incubación vs número de protoplastos.....	75
7.3.2.4	Concentración enzimática vs número de protoplastos viables .....	76
7.3.2.5	Tiempo de incubación vs número de protoplastos viables .....	77
7.3.3	Replica 3.....	78

7.3.3.1	Cantidad de protoplastos.....	81
7.3.3.2	Concentración enzimática vs número de protoplastos.....	82
7.3.3.3	Tiempo de incubación vs número de protoplastos.....	82
7.3.3.4	Concentración enzimática vs número de protoplastos viables .....	83
7.3.3.5	Tiempo de incubación vs número de protoplastos viables .....	84
8	CONCLUSIONES .....	88
9	BIBLIOGRAFIA.....	89
10	ANEXOS.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## RESUMEN

*Gmelina arborea* es una especie forestal de importancia comercial para países tropicales debido a características de rápido crecimiento y alta calidad de su madera en diversos usos industriales. La especie además ha sido utilizada para la producción de pulpa para cartón y papel, además de su implementación en sistemas agroforestales. En Colombia, las plantaciones de mayor superficie se encuentran principalmente en la región del Caribe seco, zona caracterizada por la presencia de dos periodos de sequía al año que limitan el crecimiento y los rendimientos de producción. A pesar de la gran aceptación y potencial de esta especie introducida en el país hace varias décadas, es muy escaso el avance en términos de cultivo *in vitro*.

El mejoramiento genético y la transformación genética vegetal se han favorecido por el uso de técnicas biotecnológicas como la propagación *in vitro*, facilitando la producción y el establecimiento de plantaciones de especies forestales con características que permiten un mejor comportamiento en campo; una de las etapas más importantes para la producción de un material mejorado por medio de la biotecnología es el establecimiento de protocolos de regeneración *in vitro*.

Por otro lado, la obtención de protoplastos permite que técnicas como la hibridación somática, y la transformación genética puedan ser aplicadas con fines de mejoramiento genético, sin embargo se hace necesario el poder regenerar una planta completa, si el objetivo es el mejoramiento. Otra utilidad de la obtención de protoplastos es que, debido a la facilidad de su transformación genética, constituyen una herramienta importante para el estudio funcional de genes, aplicando aproximaciones de ganancia o pérdida de función de los mismos y evaluando su efecto sobre otros genes, sin necesidad de obtener una planta completa.

Para el caso de *Gmelina arborea*, si bien existen varios reportes de protocolos para la introducción y propagación *in vitro*, utilizando explantes como segmentos nodales (Nakamura y Ide, 1999; Naik et al., 2003) y yemas (Álvarez et al., 2011), sólo hay dos reportes para la regeneración *in vitro* a partir de nudos cotiledonares (Behera et al., 2008) y de explantes como

segmentos apicales (Madke et al., 2012). El siguiente trabajo busco llenar los vacíos que se presentan para esta especie en cuanto protocolos para regeneración y aislamiento de protoplastos, para regeneración el mejor explante fue nudo cotiledonar con concentraciones de BAP 2,2 uM y AIA 0,7 uM y BAP 4,4 uM con un promedio de 4,25 brotes por explante a los 14 días. Para el aislamiento de protoplastos el mejor tratamiento fue celulasa R10 1,5% y macerozima R10 0,5% a las 10 horas con un promedio de  $2 \times 10^6$  protoplastos por mL.

## INTRODUCCIÓN

La demanda de productos forestales, el deterioro progresivo de los bosques naturales, debido a la necesidad de obtener tierras cultivables, sumado al rápido crecimiento de la población, el calentamiento global y la escasez de agua han hecho que la industria forestal busque otras alternativas para suplir la demanda de productos forestales ( Jain, 1997; Jain, 1998).

El uso de métodos convencionales de mejoramiento y selección, ofrecen posibilidades limitadas para satisfacer las demandas de la industria y de los programas de reforestación, por lo tanto es de gran importancia contar con tecnologías que sean innovadoras y rentables en el desarrollo de materiales con mejores rendimientos y cualidades. (Cardoza, 2008).

El uso de la biotecnología a través de la manipulación, ingeniería y análisis de la variación genética, en combinación con técnicas de cultivo de tejidos y células, proporcionan las herramientas necesarias para lograr la rápida multiplicación y el mejoramiento genético de especies forestales a gran escala (Cardoza, 2008).

Una de las formas para poder llevar a cabo mejoramiento genético biotecnológico, es el uso de sistemas de transformación, para lo cual es necesario contar con un protocolo de regeneración *in vitro*, en el cual, la totipotencia de las células vegetales, junto a la manipulación de los medios de cultivo y de los fitorreguladores permite obtener plantas completas a partir de cualquier explante o célula transformada. Sin embargo, es de gran importancia, dado que son muchas las variables endógenas (carácter juvenil, fuente del explante, genotipo) y exógenas (condiciones de cultivo *in vitro*, concentración relativa de fitorreguladores) se hace necesario desarrollar y optimizar un eficiente sistema de regeneración específico.

## 1 ANTECEDENTES

*Gmelina arborea* es una especie nativa de regiones tropicales y subtropicales de Asia, en el mundo se encuentran aproximadamente 70000 hectáreas las cuales se encuentra distribuidas en el oeste y este de África, el sureste de Asia, el Pacífico sur y el norte de América Latina y se espera que para el año 2020 las plantaciones se hayan extendido a 80000 hectáreas (Dvorak, 2004).

Melina presenta varias ventajas respecto a otras especies forestales, como un rápido crecimiento y un rápido retorno de la inversión, además de la alta calidad de su madera y sus múltiples usos que van desde la pulpa de madera hasta partes para muebles lo cual es de gran interés comercial, aparte de esto también está siendo usada en programas agroforestales y de reforestación (Obregón, 2005).

En el año 1969 un grupo de expertos en recursos genéticos de los bosques declaró el uso y la conservación de *Gmelina arborea* de máxima prioridad, por lo tanto el mejoramiento genético intensivo y los clones mejorados, darán como resultado un mejor crecimiento, madera más uniforme, mejor resistencia a enfermedades y productos de mayor calidad en el mercado nacional e internacional (Lauridsen y Kjaer, 2002).

En melina se han realizado ensayos de micropropagación como los realizados por Sukartiningsih & colaboradores (1999), Gamboa & Abdelnour (1999), Naik & colaboradores (2001), Valverde & colaboradores (2004), Nakamura (2006), Álvarez & colaboradores (2011), y se han reportado muy pocos artículos para regeneración de los que vale resaltar el trabajo hecho por Madke & colaboradores (2012) y Behera & colaboradores (2008).

En el año 2012, Madke & colaboradores evaluaron la inducción de múltiples brotes, teniendo en cuenta factores como la fuente y la edad de los explantes, los reguladores de crecimiento, la composición del medio y la fuente de carbono los cuales intervienen en la brotación múltiple. En este caso el explante que tuvo mayor respuesta fue el brote apical junto al fitorregulador BAP solo, generando una mayor cantidad de brotes múltiples que otros reguladores y concentraciones, para enraizamiento la auxina AIB fue el mejor fitorregulador. La fuente de carbono y el medio

fueron de gran importancia a la hora de la regeneración siendo el medio MS y la glucosa efectivos para la inducción de microbrotes.

En el 2008 Behera & colaboradores usaron nudos cotiledonares como explantes para regenerar estos fueron sembrados en medio MS suplementados con BAP y TDZ solos o en combinación con AIA o ANA. La mejor combinación en este caso fue BAP (4,4uM) e AIA (1,4 uM) los cuales dieron como resultado a un gran porcentaje de brotes. Los cultivos realizados en TDZ obtuvieron baja respuesta. Los brotes se enraizaron en medio MS suplementado con AIA o AIB solo o en combinación con TIBA siendo la combinación AIB (4.9 uM) y TIBA (2 uM) la mejor para enraizamiento.

## 2 MARCO TEÓRICO

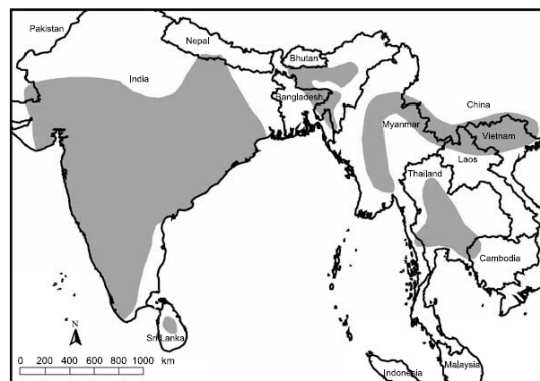
### 2.1 *Gmelina arborea* ROXB

Las limitaciones actuales en el uso de los bosques y el deterioro del ambiente, pueden tener a futuro repercusiones en cuanto a la producción de materias primas en un futuro, esto ha llevado a que el sector industrial genere alternativas para cumplir con sus producciones. (Obregón, 2005).

La introducción de la melina (*Gmelina arborea* Roxb) a América, ha favorecido la industria maderable notablemente debido a que su madera tiene múltiples usos (Rojas et al., 2012), además de que ha representado una importante opción para proyectos de reforestación debido a su rápido crecimiento (Rojas et al., 2012; Obregón, 2005), y su capacidad de adaptarse a diferentes ambientes tropicales. Melina es capaz de prosperar en tierras bajas tanto húmedas como secas, (Rojas et al., 2012).

#### 2.1.1 Distribución geográfica y origen.

*Gmelina arborea* es una especie nativa de países del sudeste asiático, encontrándose en bosques naturales de la India, Bangladesh, Sri Lanka, Myanmar, Tailandia, sur de China, Laos, Camboya y Sumatra en Indonesia (Fig 1) (Cuadrado, 1985; Dvorak, 2004; Kijka, 2012; Orwa et al., 2009), siendo ésta una especie de gran importancia para la producción de madera en regiones tropicales y subtropicales de Asia. (Rojas et al., 2012).



**Fig 1.** Rango geográfico de distribución de *Gmelina arborea* (Dvorak, 2004)



Debido a las características de interés agroforestal que presenta, esta especie ha sido introducida en muchos países tropicales incluyendo Zambia, República Central Africana, Gabón, Camerún, Congo, Senegal, Benín, Sierra Leona, Filipinas, Malasia, Gambia, Burkina Faso, Costa de Marfil, Nigeria y Malawi en África; En América ha sido introducida en Costa Rica, Brasil, Cuba, Colombia, Venezuela, Guatemala y en la zona tropical de México ( Fig 2) (Cuadrado,1985; Obregón, 2005; Orwa et al., 2009; Rojas et al., 2012; Kijkar, 2012).



**Fig 2.** Distribución a nivel mundial de *Gmelina arborea* (Orwa et al., 2009)

### 2.1.1.1 Melina en Colombia

Las plantaciones comerciales de melina se encuentran principalmente en la costa norte de Colombia en los departamentos de Bolívar y Magdalena (Mariño y Rodríguez, 2010), igualmente, en los llanos orientales, en Cundinamarca, Tolima y otras zonas bajas (Obregón, 2005) (Fig 3).

En 1980 esta especie fue introducida por las empresas Pizano S.A, Monterrey y Forestal Ltda. con el fin de reforestar los suelos de la costa Caribe colombiana (Mariño y Rodríguez, 2010). Aunque en el país no es muy conocida a nivel comercial, existen alrededor de 14000 hectáreas plantadas, siendo un número importante si se compara con especies introducidas como la teca (*Tectona grandis*), la acacia (*Acacia mangium*), o especies nativas como caoba, cedro, guayacán o sajo (Mariño y Rodríguez, 2010).

Actualmente Pizano S.A posee alrededor de 7000 hectáreas esto es un 49,7% del total de las plantaciones, localizadas principalmente en los municipios de Zambrano (Bolívar), El Dificil de Ariguaní, Fundación y San Ángel (Atlántico) y en el municipio de Becerrín (Cesar) (Fig 3). Estas hacen parte del programa de mejoramiento llevado a cabo por Monterrey S.A., donde se trabaja en la selección y el mejoramiento convencional de árboles, dirigido al desarrollo de plantaciones clonales para sitios específicos (Obregón,2005).



**Fig 3.** Distribución de *Gmelina arborea* en Colombia.

### 2.1.2 Taxonomía

*Gmelina arborea* pertenece a la familia *Lamiaceae* (Kok, 2012) (Tabla 1), y se encuentra relacionada con los siguientes nombres comunes: gmelina, gemelina, melina, yemane, gumhar, ganar, mai saw o yemani en Birmania, En Europa es conocida como *kashmir tree*, *malay beech* y como *White teak* o teca blanca en Inglaterra, y le peuplier d’Afrique en Francia (Obregón, 2005).

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Gmelina arborea*

<b>Clasificación científica</b>	
<b>Reino:</b>	<i>Plantae</i>
<b>División:</b>	<i>Angiospermae</i>
<b>Clase:</b>	<i>Eudicotyledoneae</i>

<b>Subclase:</b>	<i>Asteridae</i>
<b>Orden:</b>	<i>Lamiales</i>
<b>Familia:</b>	<i>Lamiaceae</i>
<b>Género:</b>	<i>Gmelina</i>
<b>Especie:</b>	<i>Gmelina arborea</i> ROXB. 1814

### 2.1.3 Descripción morfológica

Es un árbol caducifolio de tamaño mediano a grande, tiene un crecimiento acelerado hasta los 5 o 6 años, edad en que su velocidad de crecimiento empieza a disminuir (Obregón, 2005). Por lo general el fuste es limpio entre los 6 a 9 primeros metros. En condiciones óptimas es capaz de alcanzar una altura de 30 metros con 60 centímetros de diámetro, sin embargo su altura promedio es de 20 metros. En lugares abiertos desarrolla ramas bajas y pesadas, con caída amplia y alta conicidad del tronco (Cuadrado, 1985) y en plantaciones su copa es densa y compacta. Su corteza es lisa o escamosa con colores desde el blanco grisáceo al marrón amarillento.

#### 2.1.3.1 Flores

Sus flores son numerosas, con un color amarillo anaranjado (Fig 4), en racimos, su inflorescencia es un racimo o panícula cimosa terminal, la cual mide cerca de 30 cm de largo y puede aparecer en vástagos terminales o laterales (Kijkar,2012), la bráctea mide unos 0,5 cm. Cáliz tubular, corola con 4 a 5 sépalos soldados a la base (Rodríguez., 2004 a).



**Fig 4.** Flor de *Gmelina arborea* (Rodríguez et al., 2004 a)

### 2.1.3.2 Frutos

Es un fruto carnoso tipo drupa, de forma ovoide, de 3 cm, con pericarpo coriáceo y endocarpo óseo, de color verde lustroso cuando es inmaduro (Fig 5a) y tornándose amarillo brillante al madurar (Fig 5b), momento en que caen al suelo facilitando su recolección (Rodríguez et al., 2004 a).



**Fig 5.** **A.** frutos verdes de *Gmelina arborea*; **B** frutos maduros de *Gmelina arborea* (Rodríguez et al., 2004).

### 2.1.3.3 Semilla

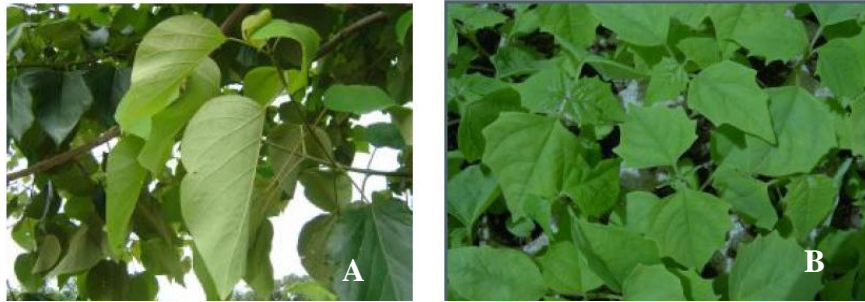
Es una semilla ortodoxa y debido a esto puede almacenarse a una humedad de 6 a 7%, con temperaturas  $\leq 0^{\circ}\text{C}$ ; estas condiciones permiten mantener la viabilidad por varios años. La semilla se encuentra formando parte del endocarpo del fruto (Fig 6a), midiendo de 1.5 a 2.0 cm de largo, de forma elipsoidal y un extremo puntiagudo, con 2 o 3 cavidades donde se encuentran de dos o tres semillas comprimidas. (Kijkar, 2012). La testa de color café, lisa, opaca; la semilla es membranosa, muy delgada; el embrión es recto, comprimido, es de color amarillo-crema y ocupa toda la cavidad de la semilla; el tamaño de la semilla incrementa con el tamaño del endocarpo (Lauridsen, 1986) (Fig 6b).



**Fig 6.** **A.** Endocarpos de *Gmelina arborea* (Rodríguez et al., 2004). **B.** Semilla de *Gmelina arborea* (Autor)

#### 2.1.3.4 Hojas

Las hojas son simples, opuestas, generalmente en forma de corazón, 10 a 25 cm de largo x 5 -18 cm de ancho (Obregón, 2005), el haz es verde y glabra, el envés es verde pálido y aterciopelado, nerviación reticulada, con nervios secundarios entre 3 a 6 pares y estípulas ausentes (Fig 7a y 7b).



**Fig 7. A.** hojas de árboles adultos de *Gmelina arborea*; **B.** hojas de plántulas de *Gmelina arborea*. (Rodríguez et al, 2004 a)

#### 2.1.3.5 Raíz

Presenta un sistema radical profundo, aunque puede ser superficial en suelos con capas endurecidas u otros limitantes de profundidad. (Lauridsen, 1986).

#### 2.1.4 Condiciones ambientales

Melina crece entre 0 y 900 msnm aunque se puede encontrar a los 1500 msnm. En su área de distribución natural las precipitaciones anuales pueden variar desde 760 mm hasta más de 4600 mm, con una temperatura entre 21°C y 28°C sin heladas, con 6 a 7 meses de estación seca (Orwa et al., 2009; Kijkar, 2012). Melina tiene gran plasticidad fenotípica y genotípica lo que le permite sobrevivir en un amplio rango de suelos como: ácidos, limos, calcáceos y suelos lateríticos. (Castro, 1999)

No resiste inundaciones y su crecimiento se ve reducido en suelos delgados con capas impermeables, suelos ácidos muy lixiviados o arenas secas. (Cuadrado, 1985).

Sus zonas de vida según Holdridge son bosque seco- tropical, bosque húmedo tropical, bosque muy húmedo tropical, bosque húmedo pre montano y bosque muy húmedo pre montano. (Cuadrado, 1985; Yepes, 2006)

### **2.1.5 Propagación**

Melina es una especie de fácil establecimiento y manejo. Sus formas de propagación pueden realizarse a través de semillas, estacas o injerto (Cuadrado, 1985).

Las semillas deben provenir de organismos sanos (libres de plagas y enfermedades) vigorosos y con una buena producción de frutos, para así asegurar que las plantas obtenidas de esas semillas hereden las características de los parentales (Lauridsen & Kjaer, 2002).

Para la siembra de las semillas es aconsejable que se dejen en remojo al menos por un día, antes de ser sembradas. Al sembrarse la tierra debe estar suelta y deben estar cubiertas con 0,5 a 1 cm de suelo. La germinación puede darse entre 7 y 21 días (Kijkar, 2012).

También se usa el establecimiento de tocones (Kijkar, 2012): cuando la especie es talada su capacidad de rebrote es buena. Los vástagos que brotan están listos para la producción por esqueje enraizando a los 60 días de edad. Estas suelen establecerse adecuadamente cuando la humedad relativa es mayor o igual a 80% y una temperatura de 30°C (Kijkar, 2012).

### **2.1.6 Usos**

#### **2.1.6.1 Característica de las madera**

Esta se caracteriza por ser liviana, de apariencia suave y sedosa. Sin sabor u olor distintivo. No existe diferencia alguna entre la albura y el duramen, su color varía de crema a pardo amarillento, tornándose pardo-rojizo con la edad (Cuadrado, 1985; Obregón, 2005).

#### **2.1.6.2 Usos de la madera**

El principal uso de melina es la producción de madera, esta se utiliza para leña y carbón, fabricación de muebles y gabinetes, instrumentos musicales, cabos para cerillas, cubiertas de

barcos y botes, también es adecuada para construcciones estructurales (artesones, vigas, madera en cuadro y reglas), construcción en general, tarimas, artesanías, cajonería, pulpa para papel, contrachapados, embalajes, postes, tableros (Tabla 2). (Cuadrado, 1985; Obregón, 2005; 1989; Rojas et al., 2012).

Adicionalmente, la producción de pulpa de papel a partir de la madera de melina, presenta propiedades superiores a la pulpa que se obtiene de la mayoría de las maderas duras, haciendo posible este aprovechamiento (Cuadrado 1985; Obregón ,2005).

**Tabla 2.** Principales usos de Gmelina (Moya., 2004)

Construcción	Muebles	Otros
Cerchas	Archivadores	Carretas de artesanía
Columnas sólidas	Bancas	Papel facial
Pisos y Decks	camas	Papel para imprimir
Molduras	Cómodas	Lápices
Mostradores	Juegos de comedor	Tarimas
Puertas	Juego de salas	Cajones de productos agrícolas
Rodapié	Mesas	Postes para cerca
Tablilla	Sillas	Postes para construcción
Vigas sólidas	Sillones	Fósforos
Vigas laminadas	Trinchantes	Paletas para helado
Columnas laminadas	Escritores	Palillos de dientes
Tableros laminados	Estantes para oficinas	
Marcos de puertas y ventanas		
Plywood		

### 2.1.6.3 Reforestación y Sistemas Agroforestales

En América latina, el primer país en usar melina para reforestar fue Costa Rica, ya que alrededor de los años 50, el país presentó altos índices de deforestación lo que significó que el país disminuyera el 24,4% de su cobertura forestal (Moya, 2004). Debido al rápido crecimiento de melina, su uso en programas de reforestación fue de gran importancia para Costa Rica (Obregón, 2005; Kok, 2012).

En el país, la corporación autónoma regional del río del Magdalena- CORMAGADALENA, en 1999 implementó un programa de reforestación comercial de melina con el fin de reactivar la actividad rural y generar ingresos en la zona ribereña de Río Grande, donde un 88% de los bosques se encuentran en estado de deforestación. Los campesinos que hacen parte de este

programa, son dueños de las propiedades donde conjuntamente se realizan actividades agroforestales complementarias como ganadería, que sirven de flujo de caja mientras la especie cumple su ciclo productivo (Obregón, 2005).

En sistemas agroforestales (Orwa et al., 2009), también se siembra junto a especies como el maní, tabaco, habichuela y maíz. En cultivos como los de café o cacao se usan árboles jóvenes como complemento al manejo de arvenses, estos árboles actúan además como cercas vivas, cortinas rompevientos y barreras protectoras (Obregón, 2005).

Estos proyectos y aprovechamientos indican las múltiples ventajas que esta especie ofrece a nivel agroforestal e industrial, y a nivel de conservación del suelo (lucha contra la erosión / desertificación), debido a sus múltiples beneficios ecológicos como por ejemplo una rápida adaptación y crecimiento, fácil establecimiento y ausencia de plagas (Orwa et al., 2009) siendo promisoría para programas de reforestación (Obregón, 2005).

#### **2.1.6.4 Uso medicinal**

Las especies cultivadas del género *Gmelina* tienen un amplio rango de usos medicinales reportados en sus países de origen (Kok, 2012), además de hacer parte de la medicina tradicional en la India (Punitha, 2012). Se puede decir que todas las partes de la planta tienen un uso medicinal diferente. Los frutos, flores, hojas, raíces y corteza se usan para tratar la tos, dolores de cabeza, problemas de estómago y enfermedades de la sangre, también se puede usar como laxativo y tónico para los nervios, como diurético, actividad antihelmíntica, cardioprotector, antidiabetes, antipirético analgésico (Rohit et al., 2012).

Las raíces y la corteza se usan en su mayoría para tratar dolores estomacales como laxativo, antihelmíntico y para mejorar el apetito. El uso de éstas junto con otras drogas se recomienda igualmente para el tratamiento de mordeduras de serpientes (Punitha, 2012). La pasta formada a partir de las hojas es usada para el alivio del dolor de cabeza, asma, bronquitis, epilepsia, reumatismo, fiebre, dispepsia, tos, diabetes y en jugo para las úlceras y cefaleas. (Chothani y Patel, 2012). Las flores son dulces y son usadas para el control de la lepra y enfermedades de la sangre (Rohit et al., 2012). Los frutos promueven el crecimiento del cabello, contra la anemia,



lepra y úlceras (Rohit et al., 2012). Las raíces son descritas como laxantes suaves, que tratan las flatulencias y aumentan el apetito, la lactancia y el alivio de las irregularidades menstruales. (Rohit et al., 2012).

Los constituyentes químicos de melina incluyen lignanos, flavonoides, iridiodes, glicosidos fenilpropanoides, un alcaloide isoxazole (Punitha, 2012), esteroides, triterpenoides, saponinas, proteínas, compuestos fenólicos, y carbohidratos (Chothani y Patel, 2012; Rohit et al., 2012)

#### **2.1.6.5 Otros**

Las hojas de melina también sirven como forraje para el ganado, los frutos de melina sirven para la alimentación de venados y cerdos y sus flores producen abundante néctar del cual se produce miel de alta calidad (Cuadrado, 1985; Kijkar, 2012; Obregón, 2005). Para los frutos de melina, producidos en forma muy abundante, existen también reportes de contenidos en ácidos grasos, aceites esenciales, ceras y otros lípidos aprovechables industrialmente tanto por la industria cosmética como para la generación potencial de biodiesel a partir de estos desechos (Chothani & Patel, 2012).

Finalmente, debido a su rápido crecimiento y la sombra proporcionada por las copas de los árboles de melina, también es empleada como ornamental en calles y avenidas (Cuadrado, 1985; Kok, 2012).

## **2.2 REGENERACION *IN VITRO***

La regeneración de plantas enteras a partir de células diferenciadas cultivadas *in vitro* es una clara demostración de la plasticidad de las células vegetales en respuesta a señales ambientales específicas; donde las células adquieren competencias para cambiar el destino que llevan mediante el proceso de dediferenciación seguido por la aplicación de una nueva vía de desarrollo. Esta secuencia de eventos se ve acompañada por cambios en el nivel de la cromatina y la reprogramación de la expresión génica (Marum y Marum, 2011).

Debido a lo mencionado anteriormente la capacidad de regeneración (*ex vitro* o *in vitro*) permite, no sólo la propagación clonal o vegetativa de las plantas y su conservación, sino el desarrollo de

programas de mejoramiento genético, ya que posibilita la obtención de plantas completas y genéticamente uniformes (Alves et al., 1999).

La regeneración *in vitro*, es además indispensable para la obtención de plantas transgénicas. El mejoramiento biotecnológico se basa en la posibilidad de transferir una o más características de interés agronómico a las plantas por medio de la transformación genética, la cual puede hacer uso de genes propios de la especie (*cis* génesis) o de genes foráneos proveniente de otro organismo o especie (*trans*génesis) (Díaz, 2004). Éste amplia las oportunidades de mejoramiento de las plantas en características como resistencia a patógenos, tolerancia a estrés abiótico, rendimiento fotosintético, biofortificación, producción de fibras o metabolitos de interés industrial, etc.

Además de constituir una herramienta de biotecnología vegetal invaluable en mejoramiento genético, la transformación genética también es una herramienta necesaria para estudios genéticos y de genómica funcional, los cuales buscan generar conocimiento básicos de las funciones asociadas a genes y así ampliar el conocimiento de la biología y fisiología de las especies vegetales (Gutiérrez et al., 2003).

Finalmente, dentro de las ventajas y usos complementarios asociados con la regeneración *in vitro* de plantas, además de la posibilidad de producción clonal masiva de plantas, encontramos la posibilidad de incremento de la variabilidad genética, obtención de plantas libres de patógenos, propagación de plantas y conservación e intercambio de germoplasma (Nadgauda, 1999; Pérez y Gómez, 2012).

### **2.2.1.1 Organogénesis**

En la regeneración *in vitro* es de gran importancia el desarrollo de la organogénesis, la cual hace referencia a la capacidad de las células vegetales que se encuentran en el explante para reprogramar su desarrollo hacia la formación de tejidos y órganos nuevos que constituyen una planta (Smith, 2012). La organogénesis requiere que las células susceptibles de esta reprogramación genética, sean competentes (epigenéticamente hablando), y por ende receptivas a procesos de desdiferenciación y diferenciación celular (Thorpe, 2014), que permitirán el

desarrollo de meristemas, yemas y brotes adventicios hasta la obtención de una plántula completa (Mathur & Koncz, 2005).

En este proceso la mitosis es esencial ya que permite la formación de un número crítico de células en división activa, que son capaces de responder a señales de desarrollo, este grupo de células en división activa son llamadas meristemoides, de forma isodiamétrica, con un citoplasma denso, vacuolas pequeñas y núcleos prominentes, que contiene varios orgánulos y grandes cantidades de almidón las cuales se necesitan en cantidades considerables durante su diferenciación (Thorpe, 2014). Los meristemoides son similares a meristemas verdaderos, ya que éstos poseen conexiones vasculares con el callo o el tejido circundante, y si están en condiciones adecuadas puede formar yemas o raíces primarias. En la organogénesis la repuesta de los explantes depende del balance entre auxinas y citoquininas tanto en el medio de cultivo como las que existen en forma endógena en el explante (Fig 8b) (Cardozo, 2005).

Existen dos tipos de organogénesis: la organogénesis directa y la indirecta. Se diferencian en que la primera se da sin la ocurrencia de un proceso prolongado de dediferenciación, acompañado visiblemente de la formación de masas celulares indiferenciadas comúnmente denominadas *callo*, mientras que en la segunda existe notablemente formación de callo, previo a la formación de brotes. (Acosta, 2012)

#### **2.2.1.1.1 Organogénesis directa**

La producción directa de yemas o brotes de un tejido en el cual no hay estadio de callo es denominado organogénesis directa. Las plantas *in vitro* se propagan clonalmente por organogénesis directa para mejorar los rangos de multiplicación, así como para obtener plantas transgénicas, si bien es más frecuente la descripción de protocolos de transformación genética vía organogénesis indirecta (Cardozo, 2005).

#### **2.2.1.1.1 Producción de yemas axilares e iniciación de yemas múltiples**

Esta técnica es comúnmente denominada micropropagación, en la cual se asegura la producción de material vegetal sin variación genética. Los brotes axilares se forman directamente de meristemas que se encuentran en los nudos sin que existan grandes cambios en su organización genética. (Cardoza, 2005)). La inducción de yemas múltiples, es de gran importancia económica, ya que varias plantas cultivables han sido micropropagadas de esta forma pero solo en muy pocos forestales se ha llevado a cabo. Por lo tanto la iniciación de yemas múltiples sigue siendo un reto en muchas especies forestales que son recalcitrantes al cultivo de tejidos. (Cardoza, 2005).

#### **2.2.1.2 Organogénesis indirecta**

La organogénesis indirecta, es el desarrollo de masas de células desorganizadas y en proceso de dediferenciación y rediferenciación denominado callo (Adobkar et al., 2012). Los callos se desarrollan cuando los explantes son cultivados en un medio el cual tiene distintos niveles de auxina y citoquininas, los cuales interactúan con los fitorreguladores endógenos para llegar a un equilibrio para la formación de órganos (organogénesis), una vez llegado a esto la producción de callo se detiene (Cardoza,2005). Este proceso involucra la diferenciación celular que a su vez refleja la expresión de la totipotencia celular, interacción celular y la reacción a señales específicas (Yepes, 2006).

La inducción de plantas usando esta técnica no asegura la fidelidad clonal, pero esta puede ser ideal en un sistema para la selección de variantes somaclonales debido a la variabilidad genética que existe en la células somáticas o debido a la inducción de mutaciones o cambios epigenéticos, con el fin de obtener caracteres deseados, además de la multiplicación de masa (Cardoza, 2005)). La inducción de plantas vía callo ha sido usada para la producción de plantas transgénicas en las cuales el callo es transformado y las plantas son regeneradas (Mathur & Koncz, 2005).

#### **2.2.2 Factores que influyen en la regeneración**

El éxito del cultivo de tejidos *in vitro* descansa en una buena elección del explante, la composición de los medios de crecimiento, fitorreguladores y condiciones de cultivo tales como la temperatura, pH, luz y humedad (Smith, 2012). Los medios de cultivo están compuestos

esencialmente por minerales y vitaminas que son necesarias para el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo también la fuente de carbono, o lo que necesite la planta para que prospere, todo esto bajo condiciones estériles (Cardoza, 2005).

Los medios de cultivo usados para el cultivo *in vitro* de plantas están compuesto por 5 componentes básicos:

- Elementos esenciales o iones minerales, suplementados como una mezcla compleja de sales
- suplementos orgánicos, suplementados con vitaminas o aminoácidos;
- una fuente fija de carbono; usualmente un azúcar,
- Agente gelificante y
- Fitorreguladores

### **2.2.2.1 Elementos esenciales**

Para uso práctico, los elementos esenciales se dividen en las siguientes categorías:

- macroelementos o macronutrientes, y
- microelementos o micronutrientes

Un medio de cultivo completo está compuesto por la combinación de varios de estos componentes.

#### **2.2.2.1.1 Macroelementos**

Como su nombre lo dice, los macroelementos son aquellos elementos que se las plantas requieren en grandes cantidades para su crecimiento y desarrollo entre ellos encontramos el nitrógeno (N), fosforo (P), potasio (K), magnesio (Mg), calcio (Ca), y azufre (S) (y carbono (C) pero este es agregado aparte) estos elementos usualmente comprenden al menos un 0,1% del peso seco de las plantas (Tabla 3) (Pierik, 1990; Smith, 2005; Taiz & Zeiger, 2006).

**Tabla 3. Macroelementos y su función (Smith, 2005)**

<b>Elemento</b>	<b>Función</b>
<b>Nitrógeno</b>	Es un elemento requerido en grandes cantidades, componente de proteínas, ácidos nucleicos y algunas coenzimas.
<b>Potasio</b>	Regula el potencial osmótico y es el principal catión inorgánico.
<b>Calcio</b>	Sintetiza las paredes celulares, funcionamiento y señalización de la membrana celular
<b>Magnesio</b>	Cofactor enzimático, componente de la clorofila
<b>Fósforo</b>	Componente de los ácidos nucleicos, transferencia de energía, componente intermedio en la respiración y la fotosíntesis.
<b>Azufre</b>	Componente de algunos aminoácidos como la metionina y la cisteína y algunos cofactores

### 2.2.2.1.2 Microelementos

Estos elementos se requieren en pocas cantidades para el crecimiento y desarrollo de la planta, y tienen muchos y diversos roles entre estos encontramos el manganeso (Mn), yodo (I), cobre (Cu), cobalto (Co), boro (B), molibdeno (Mb), hierro (Fe) y zinc (Zn) usualmente componen el grupo de los microelementos, además otros elementos como el níquel (Ni) y el aluminio (Al) son frecuentemente encontrados en algunas formulaciones (Tabla 4) (Pierik, 1990; Smith, 2005; Taiz & Zeiger, 2006).

**Tabla 4. Microelementos y su función (Smith, 2005)**

<b>Elemento</b>	<b>Función</b>
<b>Hierro</b>	Transferencia de electrones como componente de los citocromos
<b>Manganeso</b>	Cofactor enzimático
<b>Cobalto</b>	Componente de algunas vitaminas
<b>Cobre</b>	Cofactor enzimático, reacciones de transferencia de electrones
<b>Zinc</b>	Cofactor enzimáticos, biosíntesis de clorofila

<b>Molibdeno</b>	Cofactor enzimático, componente de la nitrato reductasa
<b>Yodo</b>	Cofactor enzimático, biosíntesis de la clorofila
<b>Boro</b>	Papel estructural

Los medios que son más comúnmente usados están basados en el establecimiento de formulaciones definidas por Gamborg & colaboradores (1968), Linsmaier and Skoog (1965), Murashige and Skoog (1962), Schenk and Hildebrandt (1972), White (1963) y Mccown Woody Plant Medium (1981) siendo este último de gran importancia para el cultivo de forestales.

### **2.2.2.2 Suplementos orgánicos**

Únicamente dos vitaminas, la tiamina (vitamina B1) y el mioinositol (considerada como una vitamina B) son consideradas esenciales para el cultivo *in vitro* de plantas. Sin embargo otras vitaminas como la piridoxina y el ácido nicotínico pueden mejorar el cultivo (Roca & Mroginski, 1993).

Los aminoácidos son comúnmente agregados como suplementos orgánicos. El más frecuente es el uso de la glicina (arginina, asparagina, ácido aspártico, alanina, ácido glutámico, glutamina y prolina también son usados) pero en muchos casos no es esencial. Los aminoácidos proveen una fuente para la reducción de nitrógeno e iones de amonio, disminuyendo la acidificación en los medios. La caseína hidrolizada puede ser usada como una fuente relativamente económica de una mezcla de aminoácidos (Cardoza, 2005).

### **2.2.2.3 Fuente de carbono**

Muy pocas células en el cultivo *in vitro* son autótrofas, por lo tanto la provisión de una fuente exógena de carbono es de gran importancia. La fuente de carbono más común es la sacarosa, debido a que es económica, se encuentra fácil, es asimilable y relativamente estable. La glucosa a veces es usada en reemplazo de la sacarosa, y puede proveer iguales o mayores rangos en el crecimiento de los cultivos. Otras fuentes son la maltosa, la galactosa y el sorbitol (Litz & Jarret, 2004).

#### **2.2.2.4 Agentes gelificante**

Los medios de cultivo usados pueden ser líquidos, semisólidos o sólidos, esto depende del tipo de cultivo en el cual se realizara el crecimiento. Para cualquier tipo de tejido se requiere que las células o los tejidos vegetales crezcan en la superficie del medio, este puede ser sólido, proveyendo un soporte para los explantes además de facilitar su manejo (Roca & Mroginski, 1993).

La solidificación de los tejidos se realiza mediante el uso de agar el cual es derivado de algas y es ideal para aplicaciones rutinarias. Pero debido a que es un producto natural, la calidad del agar puede variar de aplicación a aplicación y de lote a lote (Cardoza, 2005). También existen otros tipos de agares sustitos como el Gellrite o el Phytigel comercialmente permitidos como variedades de gellam gums, estos son mucho más claros que el agar (Litz & Jarret, 2004).

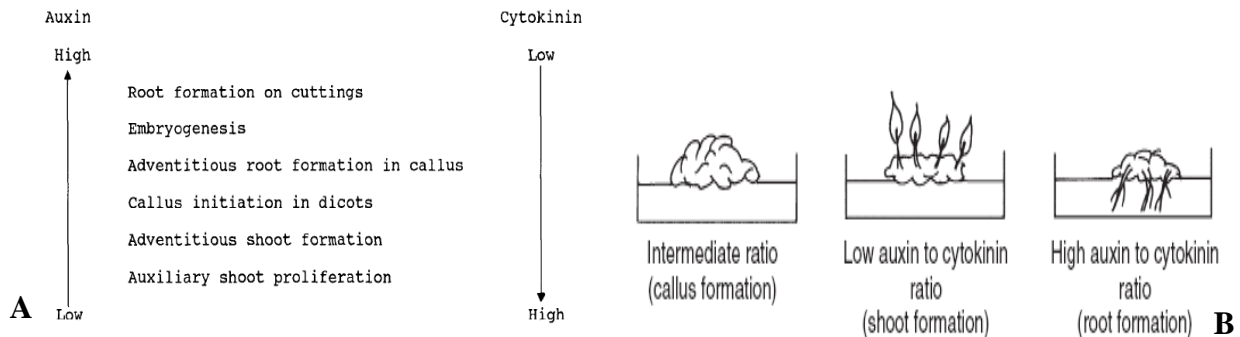
#### **2.2.2.5 Fitorreguladores**

Los fitorreguladores juegan un papel muy importante en las vías de desarrollo de las células y tejidos en medios de cultivo. Las auxinas, las citoquininas y la giberilinas son de gran importancia en cultivo *in vitro*; sin embargo el tipo y la concentración de los fitorreguladores dependen principalmente de la especie, el tejido u órgano y el objetivo del experimento (Adobkar et al., 2012). En procesos de regeneración las auxinas y las citoquininas son las hormonas vegetales más usadas ya que altas concentraciones de auxinas generalmente favorecen la formación de raíces, altas concentraciones de citoquininas favorecen la regeneración de brotes pero cuando se aplica una adecuada concentración de auxinas y citoquininas pueden inducir la regeneración de brotes y raíces a partir de callos o brotes directos (Fig 8a y b) (Smith, 2012).

La formulación de recomendaciones específicas para el uso de fitorreguladores en cultivo de tejidos en plantas leñosas no es fácil, ya que se han realizado estudios con una amplia gama de concentraciones en numerosas combinaciones, acompañadas por pocos o sin datos cuantitativos (Minocha, 1987). Otro factor que complica el uso de fitorreguladores, es la dificultad de igualar las concentraciones exógenas con las endógenas a la hora de la morfogénesis, además de que esto puede afectar la división celular y la morfogénesis a través de la modulación del gen, es conocido



que también pueden afectar indirectamente en la absorción de varios iones inorgánicos y orgánicos (Saber y Wyse, 1984).



**Fig 8.** A y B. Efectos de altas y bajas concentraciones de auxinas y citoquininas (Smith, 2012).

### 2.2.2.5.1 Auxinas

Grandes cantidades de auxinas se encuentran relacionadas con procesos activos de división celular, lo cual está relacionado con sus funciones biológicas asociadas con la elongación de tallos y coleóptilos, formación de raíces adventicias, inducción de floración, diferenciación vascular, algunos tropismos y promoción de la dominancia apical. (Aguilar et al., 2012).

Dentro de la auxinas encontramos el AIA (ácido indolacético), el AIB (ácido indolbutírico) siendo estas unas de las más usadas pero sin embargo existen otras auxinas como el ANA (ácido naftalen acético), 2,4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (Aguilar et al., 2012).

El AIA es la auxina natural más importante, su uso en cultivo *in vitro* es inestable al calor y la luz, por lo que algunas veces es combinado con otros aminoácidos como la alanina y la glicina para que sea más estable (Smith, 2012), esta auxina actúa a nivel de los ápices, en los que hay tejido meristemática, el cual es indiferenciado; dentro de sus funciones encontramos la inhibición de las yemas axiales, dando origen a la dominancia apical, promueve el fototropismo positivo, promueve y provoca el desarrollo de raíces laterales y adventicias y también estimula el desarrollo de los frutos. Dentro de las auxinas más importantes encontramos el AIA, AIB y el ANA entre otras (Tabla 5) (Gaspar et al., 1996).

El AIB es una auxina que es muy usada para la generación de raíces en cultivo *in vitro* y *ex vitro*. Aunque no se tiene conocimiento del funcionamiento exacto, la evidencia genética sugiere que AIB se puede convertir en AIA a través de un proceso de similar a la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. Esta conversión permite pensar que la conversión de AIB es un sumidero de almacenamiento para el almacenamiento de AIA en las plantas (Zolman et al., 2008).

**Tabla 5.** Auxinas comúnmente usadas su abreviación y nombre químico. (Smith, 2012)

Abreviación	Nombre químico
<b>Dicamba</b>	Acido 3,6 diclorobenzoico 2 metoxi
<b>AIA</b>	Ácido indolacético
<b>AIB</b>	Ácido indolbutírico
<b>MCPA</b>	Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético
<b>ANA</b>	Ácido naftalen acético
<b>NOA</b>	Ácido naftoxiacético
<b>Picloram</b>	Acido amino tricloro picolínico.

### 2.2.2.5.2 Citoquininas

Este tipo de regulador es el encargado de procesos de división celular, entre estos se encuentran la formación y crecimiento de brotes axilares, germinación de semillas, la maduración de cloroplastos, la diferenciación celular, además del control de varios procesos vegetales como el retardo de la senescencia y la transducción de señales (Aguilar et al., 2012)). Se piensa que estas son sintetizadas en tejidos meristemáticos como ápices radiculares, nódulos de raíces de leguminosas, yemas de tallo, semillas en germinación; estos se transportan vía xilema hacia la hoja donde se acumula, para luego ser exportada vía floema hacia otros órganos como los frutos. (Aguilar et al., 2012)).

Las citoquininas, debido a su similitud estructural con las adeninas o las purinas, se han considerado como derivados de estas. Las citoquininas están divididas en citoquininas isoprenoides y aromáticas es debido a su variación estructural (Gaspar et al., 1996). Dentro de las citoquininas isoprenoides encontramos a la zeatina, la isopenteniladenina y la dihidrozeatina y dentro de la citoquininas aromáticas encontramos la benciladenina (BA), la kinetina y la zeatina (Tabla 6).

La BA o BAP es una citoquinina de primera generación encargada de provocar el crecimiento de las plantas y las respuestas de desarrollo, el establecimiento de flores y estimular la generación de frutos a través de la estimulación de la división celular. También es un inhibidor de la quinasa respiratoria en las plantas, por lo tanto aumenta la vida después de la cosecha en vegetales verdes (Aguilar et al., 2012).

**Tabla 6.** Citoquininas comúnmente usadas su abreviación y nombre químico. (Smith, 2012)

<b>Abreviación</b>	<b>Nombre químico</b>
<b>BAP</b>	Benzilaminopurina o benziladenina
<b>2iP (IPA)</b>	Ácido indol 3 piruvico
<b>Kinetina</b>	6 furfuralaminopurina
<b>Tidiazuron</b>	1 fenil 3 (1,2,3 tidiazol 5 il) urea
<b>Zeatina</b>	4 hidroxil 3 metil trans 2 butenilaminopurina

#### **2.2.2.6 Material vegetal**

El explante es una parte de un tejido u órgano el cual es aislado de una planta (Litz & Jarret, 2004). La selección de un explante adecuado es el primer paso para el establecimiento de cultivos *in vitro*, esta elección se hace en base al objetivo a estudiar y la especie vegetal involucrada (Cardoza, 2005).

Si la elección del explante no limita el cultivo de tejidos en cuanto a la generación de callos o de brotes, la selección se hace en base a la disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad y la rápida respuesta *in vitro*. Los explantes pueden ser tomados de plantas que son germinadas en invernadero, en campo o *in vitro* en condiciones asépticas. (Roca & Mroginski.1993) Si las plantas son germinadas en invernadero o en campo se debe tener en cuenta la época del año en el que se realiza el cultivo, los pretratamientos que se le realizan a los explantes y las condiciones de crecimiento, esta última, es tanto para las plantas *in vitro* como *ex vitro*.

Se ha observado que el uso de material vegetal adulto ha dificultado el cultivo *in vitro* más que cuando se trabaja con material juvenil (material revigorizado, semillas, embriones o explantes de árboles jóvenes) ya que estos tienen mayor grado de actividad meristemática por lo tanto tienden

a tener mayor plasticidad *in vitro* (Yildiz, 2012). Según Yepes (2006) son muy pocas las plantas que se han podido regenerar a partir de explantes de árboles maduros.

Los explantes pueden ser cualquier parte de la planta desde una célula a un órgano, sin embargo explantes como la raíz e hipocótilos son materiales excelentes para la iniciación de callo y regeneración, en contraste con tallos y hojas (Mathur & Koncz, 2005). Pero para que el desarrollo del explante se exitoso en el cultivo *in vitro*, estos deben adaptarse bien a las condiciones de cultivo, ya que el aislamiento de una célula, tejido u órgano del resto de la planta, genera estrés y altera el metabolismo celular (Cardoza, 2005).

El tamaño del explante puede determinar la respuesta *in vitro* (Yildiz, 2012). Los explantes grandes son más difíciles de esterilizar que los pequeños, pero generalmente los primeros poseen un potencial regenerador considerablemente mayor; la viabilidad y la capacidad regenerativa de explantes muy pequeños tiende a ser baja además de que son dañados fácilmente (Litz & Jarret, 2004). Sin embargo, se han usado exitosamente delgadas capas de células como sistemas experimentales, con el fin de estudiar los efectos de factores exógenos y endógenos sobre la morfogénesis cuando no hay influencia de tejidos circundantes (Hussain et al., 2012).

#### **2.2.2.7 Factores ambientales: pH, temperatura, humedad y luz**

La luz, la temperatura, el pH y la humedad son factores que influyen el crecimiento adecuado de los cultivos *in vitro* (Cardoza, 2005), la temperatura controla la incubación esta suele ser entre 22 – 25°C (Litz & Jarret, 2004), la luz es esencial para la morfogénesis involucrando factores como la intensidad, el fotoperiodo y la calidad, es de gran importancia no colocar los explantes directamente a la luz ya que estos pueden causar condensación en los recipientes dando como resultado un bajo rango de crecimiento y desarrollo (Mathur y Koncz, 2005), por lo general el fotoperiodo es de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. La humedad relativa de esta entre el 50-60% (Litz & Jarret, 2004).

El pH del medio es importante ya que este influencia el consumo de varios componentes del medio así como un amplio rango de las regulaciones de las reacciones bioquímicas que ocurren en el cultivo de tejidos (Owen et al., 1991). La mayoría de los medios son ajustados a un pH de

5.2 a 5.8. Los pH negativos parecen no afectar los tejidos vegetales pero retrasa el crecimiento de contaminantes potenciales. Sin embargo, pH altos son requeridos para ciertos cultivos (Cardoza, 2005).

### **2.2.3 Enraizamiento de brotes**

Un eficiente enraizamiento *in vitro*, es de gran importancia en el éxito de la aclimatación de las plántulas ya que esta depende de gran manera de los sistemas radiculares (Carrizosa et al., 2004). El enraizamiento en árboles o especies forestales es más difícil en comparación con especies herbáceas. Este se logra *in vitro* o *ex vitro*, *ex vitro* (fuera de los envases) el enraizamiento reduce sus costos de producción significativamente e *in vitro* (dentro de los envases) consiste en el enraizamiento de plantas en condiciones axénica y es más costoso, pero a pesar de esto, el enraizamiento *in vitro* sigue siendo de uso común en muchas especies vegetales ya que existen varias ventajas como la fácil administración de auxinas, evitar la contaminación microbiana y fúngica, permite la adición de nutrientes inorgánicos y carbohidratos, entre otras (Cardoza, 2005). Las concentraciones de auxinas endógenas y exógenas son uno de los factores de gran importancia en el enraizamiento *in vitro*, en muchos casos un tratamiento con auxinas por un periodo corto de tiempo ha sido suficiente para la inducción de raíz. Algunos compuestos fenólicos son conocidos por tener un efecto estimulador en el enraizamiento (Minocha, 2000).

## **2.3 PROTOPLASTOS**

El término protoplastos hace referencia a células vegetales completas rodeadas por la membrana citoplasmática, ya que mediante procesos de degradación la pared celular se elimina (Davey et al., 2005). Estos son comúnmente aislados del mesófilo de las hojas o de suspensiones celulares, pero también pueden aislarse de otras fuentes que quizás sean más ventajosas. Los protoplastos tienen la capacidad de resintetizar la pared celular, dividirse y formar colonias siendo útiles para la regeneración de plantas completas o el desarrollo de híbridos somáticos. (Cardoza, 2005).

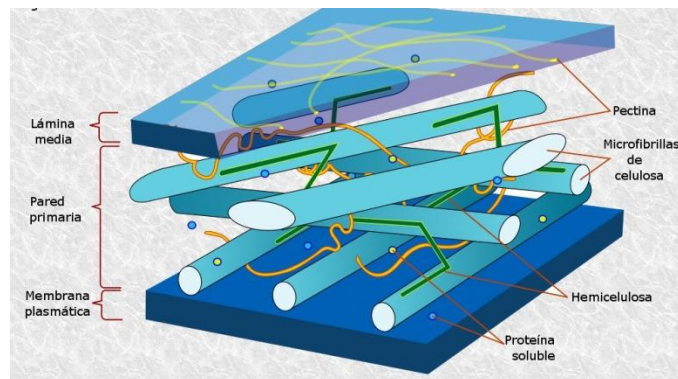
El desarrollo de sistemas de aislamiento de protoplastos ha aumentado la versatilidad de las plantas para sus investigaciones en bioquímica, genética, ingeniería genética y como una herramienta de gran importancia para el mejoramiento genético de los cultivos (Puite, 1992).

Dentro de los distintos puntos de partida para la manipulación genética de plantas el uso de protoplastos permite el aprovechamiento de las tecnologías disponibles en la actualidad (Rao y Prakash, 1995). Sin embargo el desarrollo de protocolos de aislamiento y purificación de protoplastos, son procedimientos de naturaleza compleja, debido a la mano de obra, la exposición al medio ambiente, el explante y los largos tiempos de digestión (Rao y Prakash, 1995).

### 2.3.1 Tipos de aislamiento

Las paredes celulares pueden ser removidas mediante tratamientos mecánicos o enzimáticos, siendo el último el más importante y efectivo (Szabados, 2004). La primera persona en proponer la degradación enzimática de la pared celular fue Cocking & Pjonar (1969), desde entonces el aislamiento de protoplastos a través de esta técnica ha sido aplicado a varios cultivos y especies forestales.

Las paredes celulares están compuestas por celulosa, hemicelulosa y pectina, con menores cantidades de proteínas o lípidos, por lo tanto una adecuada mezcla de enzimas es necesaria para la degradación de la pared celular (Fig 9) (Cardoza, 2005).



**Fig 9.** Composición de la pared celular vegetal (<http://www.bionova.org.es/biocast/tema11.htm>)

#### 2.3.1.1 Método mecánico

El método de aislamiento mecánico, aunque posible, a menudo genera resultados con bajas cantidades, baja calidad y bajo rendimiento en cultivo, debido a sustancias liberadas por las células dañadas (Szabados, 2004).

Este método consiste en aplicar un choque osmótico para producir plasmólisis en las células, las cuales se desprenden de las paredes que se rompen por medio de métodos mecánicos; posteriormente, se liberan los protoplastos de las paredes rotas mediante el restablecimiento de su nivel osmótico. (Szabados, 2004)

### **2.3.1.2 Método enzimático**

El aislamiento enzimático es usualmente llevado a cabo en una solución de sales con un valor osmótico alto, más enzimas degradadoras de la pared celular. Es usual usar una mezcla de celulasas, pectinasas y hemicelulasas.

Para llevar a cabo este método con éxito existen tres factores de gran importancia:

- a. El tipo de enzimas
- b. La composición y osmolaridad del medio donde se llevará a cabo el aislamiento y
- c. El material de origen de los protoplastos.

#### **2.3.1.2.1 Enzimas**

Durante el tratamiento enzimático, es más frecuente y efectivo el uso de enzimas en mezclas que tratamientos individuales por separado. Las enzimas están divididas en celulasas, hemicelulasas y pectinasas (Szabados, 2004) (Tabla 7) que se encargan de degradar la celulosa, la hemicelulosa y la pectina de la pared celular. Estas enzimas se obtienen de preparaciones comerciales pero las enzimas no son puras ya que contienen otras enzimas como proteasas, nucleasas y lipasas (Smith, 2012).

El éxito parece estar ligado al, uso combinado de estas enzimas en concentraciones y proporciones adecuadas dependiendo de la composición y estructura de la pared celular en el tejido empleado. Las enzimas permiten la liberación exitosa de los protoplastos de la mayoría de los tejidos, sin embargo se advierte que los métodos con demasiados pasos implican a menudo la introducción de contaminación en los protoplastos. (Rao y Prakash, 1995).

**Tabla 7.** Enzimas que se utilizan para el aislamiento de los protoplastos. (Szabados, 2004)

<b>Enzimas</b>	<b>Producto comercial</b>
<b>Celulasas</b>	
Celulasa Onozuka R 10	Kinki Yakult Biochemicals Co. Ltd., Nishiromiya, Japón.
Driselasa	Kyowa Hakko Kogyo Co., Tokio, Japón.
Celulisina	Calbiochem, San Diego, CA, U.S.A.
Meicelasa	Meiji Seika Kaisha Ltd., Tokio, Japón.
<b>Pectinasas</b>	
Pectinasa	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.
Macerozima R 10	Kinki Yakult Biochemicals Co., Ltd.
Macerasa	Calbiochem, San Diego, CA, U.S.A.
Pectoliasa Y 23	Seishiu Pharmaceutical Co. Ltd., Tokio, Japón.
<b>Hemicelulasas</b>	
Rhozima HP 150	Rohm & Haas, Filadelfia, PN, U.S.A.
Hemicelulasa	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.

#### **2.3.1.2.2 Buffer de aislamiento**

El buffer para el aislamiento de protoplastos está compuesto por los siguientes elementos: se trata de una solución compuesta por algunas sales como el cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) esencial como protector de la integridad de la membrana, fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) para conservar la viabilidad de los protoplastos, cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) (Szabados, 2004; Rao y Prakash, 1995), un amortiguador de pH como el MES (ácido 2 (N-morfolino)- etanosulfónico) y un estabilizador osmótico neutro, ya que en el momento en el que la pared celular es retirada, esta sufre un estrés hídrico, por lo tanto es importante regular y alcanzar un nivel óptimo en la presión osmótica: para este fin, se utilizan azúcares, entre los más usados encontramos la glucosa, el manitol, o el sorbitol, entre otros (Pérez y Gómez, 2012). Generalmente el potencial osmótico se ajusta de tal manera que las células sean levemente plasmolizadas durante la digestión de la pared celular.



### **2.3.1.2.3 Fuente para la obtención de protoplastos**

En teoría, es posible aislar protoplastos de cualquier tipo de planta órgano o tejido, pero las fuentes que se usan comúnmente son mesófilo foliar o tejidos cultivados *in vitro* como células en suspensión, callos y ápices de plántulas generadas *in vitro* (Russel y McCown, 1986; Szabados, 2004).

El estado juvenil del tejido foliar influye sustancialmente en el rendimiento y viabilidad de los protoplastos, por lo tanto las plantas deben haber sido cultivadas bajo condiciones controladas, (luz, la temperatura y humedad) y sin incidencias de estrés (Vasil & Thorpe, 1998).

Algunas veces los protoplastos aislados resultan más estables si las plantas se conservan previamente en la oscuridad durante algunos días, y en ciertos casos, para mejorar la viabilidad de los protoplastos aislados, es aconsejable el pre tratamiento del tejido foliar en un medio con fitorreguladores de crecimiento, en diferentes condiciones de luz y temperatura (Szabados, 2004).

Las suspensiones celulares obtenidas a partir de callo, son otra fuente para la obtención de protoplastos. Sin embargo, por lo general son heterogéneas, y a menudo están compuestas de agregados de diferentes tamaños y de células libres, por lo tanto no todas las células están en condiciones óptimas para la liberación de protoplastos; debido a esto, al igual que para mesófilos foliares es importante que las condiciones de crecimiento de las células cultivadas sea controlado (Cardoza, 2005).

### **2.3.1.2.4 Oscuridad, temperatura y tiempo de acción.**

La oscuridad, la temperatura y el tiempo de acción son elementos claves a la hora del aislamiento, estos tres factores influyen el comportamiento de las enzimas por lo tanto la liberación eficiente y estable de los protoplastos. (Rao y Prakash, 1995).

La mayoría de cultivos en los que se usan concentraciones altas de enzimas se tiende a aislar protoplastos en tiempos reducidos, la acción enzimática depende de la temperatura y la concentración de las enzimas, y el tiempo en el que pueden actuar logra ser muy variable (entre

30 minutos y 35 horas); la incubación se realiza a temperaturas entre 25 a 30°C, dependiendo de las enzimas; temperaturas menores podrían disminuir la actividad de las enzimas y mayores podrían degradarlas, o alterar su funcionalidad. (Chawla, 2000; Jadán, 2004).

### **2.3.2 Uso de los protoplastos**

La ausencia de la pared celular en los protoplastos facilita las manipulaciones genéticas de transformación por métodos químicos o físicos como la electroporación, los cuales no sería posible emplear con plantas o células intactas con pared. Gracias a esta característica, los protoplastos son de gran utilidad en investigaciones encaminadas a validar funcionalmente secuencias génicas o regulatorias, por la facilidad en que se pueden implementar *screenings* o ensayos genéticos y visualizar los fenotipos asociados directamente en los protoplastos, por ejemplo por medio de fusiones génicas a reporteros fluorescentes (Melcher & Labib, 1974).

Otro de los usos más importantes en cuanto a mejoramiento genético asociado con los protoplastos, hace referencia a la hibridación somática o fusión de protoplastos: estas proveen la oportunidad de pasar las barreras de aislamiento reproductivo, facilitando el flujo de genes entre la misma especie e incluso entre diferentes especies (Ahuja, 1983; Cardoza.2005; Szabados, 2012).

Aunque los protoplastos parecen ser una alternativa atractiva para la transferencia de genes y la regeneración de plantas, estos son muy vulnerables en cuanto a su manipulación. Estos deben ser cultivados en un medio con un alto contenido osmótico como la sacarosa o el manitol, asegurado en permanencia el equilibrio osmótico que garantiza la integridad de los mismos. Esta es la razón por la cual la regeneración de plantas a partir de protoplastos en cultivos, ha proveído dificultades. Por lo tanto, el uso más viable o directo de los protoplastos podría enfocarse en un primer plazo, a estudios de expresión transitoria de transgenes, estudios funcionales de genes y elementos reguladores de los mismos, o estudios de localización e interacción de proteínas, como herramientas complementarias de genómica funcional (Diaz et al., 2004).

### 3 JUSTIFICACIÓN

La producción y la efectividad de las explotaciones forestales implican la necesidad de atender la creciente demanda como el manejo de estándares exigidos a nivel nacional e internacional, sin embargo para una efectiva actividad silvicultural con resultados eficientes, se hace necesario la obtención de material genético de excelente calidad y productividad (Suarez et al., 2006). Dentro de este componente, la tendencia de la silvicultura moderna está dirigida a la siembra y cultivo de árboles que se desarrollen en ambientes específicos y que desarrollen buenas características relacionadas con calidad, volumen y uniformidad en un tiempo determinado (Murillo, 2004).

Según proyecciones realizadas por la FAO (2000) se estima que para el 2030, el consumo global de madera aumentará un 60 % respecto a los niveles de inicio del milenio, además de que probablemente se sigan produciendo aumentos importantes en el consumo de productos de papel y cartón.

El desarrollo de técnicas de propagación *in vitro* ha contribuido significativamente en la producción, conservación, saneamiento y establecimiento de algunas especies agrícolas y forestales (Suarez et al., 2006; Acosta, 2012). Estas técnicas son igualmente indispensables en mejoramiento biotecnológico, para lo cual se debe disponer de un sistema de regeneración *in vitro* eficiente y reproducible que, por medio de organogénesis y posterior enraizamiento de los brotes, permita la obtención de plántulas completas enraizadas a partir de células transformadas. En especies forestales de alta importancia comercial a escala mundial, como eucalipto, varias especies de pino, o álamo, existen protocolos de transformación y regeneración *in vitro* que han hecho posible, no sólo el mejoramiento biotecnológico en estas especies, sino facilitado en gran medida el conocimiento biológico asociado a la funcionalidad de los genes identificados a través de los proyectos de genómica y genómica funcional iniciados en los últimos años.

Sin embargo, no ha sido el caso de especies forestales tropicales para algunas de las cuáles, si se han iniciado proyectos de genómica funcional (Acacia, Melina; Wong et al, 2011; Rosero et al., 2011). Dado que estos protocolos de transformación genética y la respuesta organogénica son muy variables entre una especie y otra, e incluso entre genotipos de una misma especie, se hace

muy difícil el poder adaptar directamente un protocolo que haya sido optimizado para otra especie (Teixeira, 2003).

Así, para desarrollar un protocolo de transformación genética, es necesario establecer primero un sistema de regeneración *in vitro* que permita la obtención eficiente de brotes regenerados y su posterior enraizamiento, esto para la especie que se pretenda manipular genéticamente o mejorar. Por otro lado la hibridación somática obtenida por medio de la fusión de protoplastos constituye una herramienta de mejoramiento complementaria para la introducción de genes de interés y la obtención de híbridos (Szabados, 2004). A su vez, la transformación genética de protoplastos presenta ventajas como el poder emplear técnicas de transformación química o por medio de electroporación, las cuales permiten una mayor tasa de transformación respecto a otras fuentes de tejido celular. Igualmente, estas técnicas posibilitan la expresión transitoria de genes en protoplastos sin la necesidad de regenerar una planta completa, aproximación muy rápida, versátil y útil con fines de validación funcional de genes. (Chawla, 2002).

Como ya se ha mencionado, la transformación genética constituye igualmente una herramienta de gran utilidad para estudios genéticos y de genómica funcional que ayuden a avanzar en el conocimiento de los procesos biológicos que se dan en una especie determinada. En el 2011, en este grupo de investigación, Rosero y colaboradores generaron el primer recurso genómico de la especie por medio de una aproximación transcriptómica dirigida a identificar genes involucrados en la respuesta a estrés hídrico en melina. Esta aproximación permitió identificar cerca de 18000 genes asociados con dicha respuesta tanto en raíz como en hojas de esta especie maderable tropical. Sin embargo el aprovechamiento de este recurso tanto a nivel de biología como biotecnológico requiere contar con herramientas complementarias de genómica funcional para la validación de la función de genes candidatos con potencial en términos de mejoramiento: así, la transformación genética se perfila como una herramienta clave para dicho propósito.

Por lo tanto, se hace indispensable contar con un sistema de regeneración *in vitro*, así como protocolos optimizados para el aislamiento y cultivo de protoplastos, para permitir avances y nuevas oportunidades de mejoramiento y aprovechamiento del recurso generado en la especie maderable melina.

Así, con el presente trabajo se buscó determinar un protocolo de regeneración *in vitro* para melina, evaluando diferentes explantes como epicótilo, hipocótilo, cotiledones, nudos cotiledonares, y hojas provenientes de semillas germinadas *in vitro*, así como establecer un protocolo para el aislamiento de protoplastos, con miras a que en un futuro se pueda contar con protocolos de transformación genética tanto para los estudios funcionales de genes, como el mejoramiento genético de la especie.

#### **4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los ciclos de aprovechamiento presentados en especies forestales nativas son con frecuencia prolongados siendo esto una desventaja que, unida a los pocos estudios relacionados con el manejo silvicultural, impiden que éstas sean usadas en programas de reforestación. Esto conduce a que los silvicultores busquen otras alternativas con especies introducidas que presenten ciertas ventajas como un ciclo corto de producción, una menor susceptibilidad a enfermedades o plagas, tolerancia a estrés abiótico junto con una buena calidad de madera (Álvarez et al., 2011). Este es el caso de melina, una especie originaria del sudeste asiático que, debido a sus características maderables puede ser utilizada para generar distintos productos que van desde la producción de pulpa hasta material para construcciones, (Kannan & Jasrai, 1996) además de ser fuente potencial de metabolitos secundarios de interés farmacéutico (Punitha et al., 2012). Esta especie, debido a su corto ciclo de aprovechamiento, su reportada tolerancia a estrés hídrico y la alta calidad de su madera, ha generado un gran interés a nivel comercial (Town et al., 2008; Rosero et al., 2011) introduciéndose con éxito en Colombia y otros países de América y África tropical.

La especie cuenta con protocolos eficientes de propagación sexual y asexual en campo, así como protocolos eficientes de propagación *in vitro*. En numerosos países, incluyendo Costa Rica y Colombia, se han iniciado programas de selección y mejoramiento convencional enfocados a silvicultura clonal, sin embargo la especie no cuenta aún con protocolos de regeneración y transformación genética que permitan el mejoramiento biotecnológico. Únicamente existen 2 reportes de protocolos de regeneración *in vitro*, algo contradictorios entre ellos, (Behera et al., 2008; Madke et al., 2011) así como un protocolo de inducción de raíces en cabello por

*Agrobacterium rhizogenes* para la producción de metabolitos secundarios (Dhakulkar et al., 2005)

En el grupo de Biología de Plantas y Sistemas Productivos de la Universidad Javeriana, se desarrollaron varios proyectos de genómica funcional encaminados a identificar los genes involucrados en la respuesta de esta especie a condiciones de estrés por sequía, así como los genes expresados en madera (xilema secundario) en desarrollo, esto por medio del uso de aproximaciones transcriptómicas, que permitieron obtener el primer recurso genómico para la especie (Rosero et al, 2011). Se logró identificar una gran cantidad de genes (cerca de 18000), tanto reguladores, como metabólicos involucrados en la respuesta a estrés y el desarrollo de la madera que constituyen excelentes genes candidatos a validar o estudiar con más profundidad para su empleo en mejoramiento. Además del gran interés que estos genes representan para la ingeniería genética en términos de mejoramiento, constituyen un recurso importante para estudios básicos encaminados a entender la biología de la especie, las bases de su tolerancia a sequía o del desarrollo de la madera y su regulación y afección por procesos ambientales, conocimiento indispensable previo a su aplicación en mejoramiento.

Sin embargo, un requisito indispensable para poder realizar estudios funcionales de genes, es la transformación genética, ya que permite la realización de screening y ensayos genéticos, sobreexpresando o silenciando un determinado gen para inferir su función e importancia en determinado proceso o respuesta biológica.

Por lo tanto, en esta investigación se propuso optimizar protocolos para la regeneración *in vitro* vía organogénesis y el aislamiento de protoplastos de *Gmelina arborea* como base para la obtención de protocolos de transformación genética, tanto como herramienta de mejoramiento como de validación funcional de genes.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 GENERAL**

Establecer un protocolo de regeneración *in vitro* vía organogénesis y obtención de protoplastos de *Gmelina arborea*.

### **5.2 ESPECIFICOS**

- Determinar la combinación y concentración óptimas de reguladores de crecimiento para la organogénesis *in vitro* de melina.
- Determinar el tipo de explante con mayor potencial morfogénico entre epicótilo, hipocótilo, nudo cotiledonar, cotiledones, hojas.
- Establecer un protocolo de aislamiento de protoplastos a partir de explantes foliares de plántulas de melina micropropagadas.

## **6 MATERIALES Y METODOLOGÍA**

### **6.1 MATERIAL VEGETAL**

#### **6.1.1 Fuentes de explantes empleadas en el estudio.**

Para establecer un protocolo eficiente de regeneración *in vitro* se utilizaron plántulas de melina germinadas *in vitro*, tomando como explantes segmentos de hipocótilo, epicótilo, cotiledones, nudo cotiledonar y hojas respectivamente con el fin de determinar la fuente de explante con mayor potencial morfogénico para el proceso de regeneración *in vitro*. Como complemento se buscó determinar igualmente las condiciones óptimas para el enraizamiento *in vitro* a partir de segmentos nodales de plántulas micropropagadas.

Para el aislamiento de protoplastos, se utilizó y buscó optimizar un método enzimático sobre explantes foliares obtenidos de plántulas micropropagadas.

### **6.1.2 Muestras**

Todos los explantes o segmentos que se utilizaron en el desarrollo del trabajo se obtuvieron de plantas germinadas *in vitro* por 13-14 días; para la selección de los explantes se tuvo en cuenta asegurarse del estado físico de la plántula (sanidad y desarrollo de las plantas).

Para el procedimiento de organogénesis se tuvo en cuenta la homogeneidad del tamaño del explante, que no estuviera oxidado al sembrarse y estuviera libre de contaminación. Se empleó un total de 80 segmentos de epicótilos, de hipocótilos, de cotiledones y de hojas, y 40 nudos cotiledonares. El número corresponde a los explantes utilizados en los diferentes tratamientos que se evaluaron y sus respectivas repeticiones. Se realizaron 8 réplicas por tratamiento para epicótilos, hipocótilos, cotiledones y hojas y 4 réplicas por tratamiento para nudo cotiledonar y la unidad experimental fue cada explante evaluado.

Las hojas que se usaron en el aislamiento de protoplastos se obtuvieron de plántulas *in vitro*, también se tuvo en cuenta la calidad de las hojas, el tamaño y que no estuviesen contaminadas. Para el trabajo se usaron 80 mg de hojas por réplica. Para este ensayo se usaron alrededor de 10 plantas para la obtención del material foliar, y cada tratamiento conto con 5 réplicas.

Para enraizamiento se obtuvieron segmentos nodales de plantas *in vitro*, las cuales tuviesen un buen desarrollo y no tuvieran contaminación, por tratamiento se evaluaron 9 réplicas y la unidad experimental correspondió a un frasco con un segmento nodal.

### **6.1.3 Obtención de Material Vegetal**

Los endocarpos que se usaron para el aislamiento de las semillas que fueron utilizadas en este trabajo se obtuvieron de 2 proveedores nacionales de semillas. Para el posterior aislamiento de las semillas fue necesario un proceso de lavado, desinfección e imbibición de los endocarpos previo a la extracción manual de las mismas como se describe a continuación. Tras una



desinfección de las semillas extraídas, se procedió a la germinación *in vitro* sembrándolas en medio gelificado. Una parte de las plántulas germinadas *in vitro* se micropropagó y otra fue empleada como fuente de explantes para los ensayos de regeneración. Todos los ensayos se realizaron con plántulas jóvenes provenientes de germinación *in vitro*.

Para el manejo del material vegetal se tomaron todas las medidas de esterilidad del material de vidrio, pinzas, bisturí, y demás utensilios para el trabajo en cámara de flujo laminar.

## **6.2 REGENERACION *in vitro* VÍA ORGANOGENESIS DE *Gmelina arborea***

### **6.2.1 Cultivo *in vitro* de semillas de *Gmelina arborea***

#### **6.2.1.1 Extracción de semillas del endocarpo**

Se lavaron y se cepillaron abundantemente los endocarpos con el fin de eliminar la contaminación externa, para esto se empleó hipoclorito de sodio de marca comercial al 5% (v/v), jabón líquido comercial y agua. Al finalizar los lavados, 150 endocarpos se sometieron a un proceso de imbibición en 200 ml de agua en Erlenmeyer de 1 L, en agitación a 200 rpm, por 48 horas, a 30 °C con cambios de agua cada 12 horas (Gamboa & Abdelnour, 1999). Al terminar el proceso de imbibición, se realizó una primera desinfección superficial de los endocarpos sumergiéndolos en alcohol etílico al 70 % (v/v) por 5 minutos, seguido de hipoclorito de sodio al 5% (v/v) por 20 minutos y 5 enjuagues con agua estéril.

En cámara de flujo laminar se procedió a extraer mecánicamente las semillas (con cuchillo y pinzas), las cuales se almacenaron en cajas de Petri estériles y bajo oscuridad. Cuando finalizó el procedimiento de aislamiento de las semillas, los endocarpos se incubaron en un horno a 30°C de 10 a 12 horas antes de repetir nuevamente el proceso de imbibición/ extracción de semillas antes mencionado.

#### **6.2.1.2 Germinación *in vitro* de semillas**

Una vez extraídas las semillas, éstas se sometieron a desinfección sumergiéndolas en alcohol etílico al 70% (v/v) por un minuto, seguido de dos enjuagues con agua destilada estéril, luego se

agregó hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2% (v/v) y 0.04 % (v/v) de Tween 20 por 10 minutos y se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril, antes de sumergirlas en el desinfectante PPM<sup>TM</sup> (Plant Preservative Mixture) al 5% (v/v) por 12 horas y en agitación a 60 rpm. Al finalizar los procesos de desinfección, se sembraron directamente las semillas en medio de cultivo WPM (Woody Plant Medium) suplementado con 30 g/l de sacarosa, 2 % de PPM, 150 mg/ml del antibiótico Tricarilina, 8 g/l de agar y con un pH de 5,7. Posteriormente, se llevaron a cuarto de cultivo a 27°C con un fotoperiodo de 16/8 horas y una intensidad lumínica de 1148 lumen.

## **6.2.2 Organogénesis y regeneración *in vitro***

Lo planteado a continuación estuvo basado en lo realizado por Sukartiningsih y colaboradores (1999); Behera y colaboradores (2008); Madke y colaboradores (2012).

### **6.2.2.1 Preparación de los explantes**

Después de obtener plántulas de 13- 14 días de germinadas, se extrajeron los explantes en cámara de flujo laminar con pinzas y bisturís completamente estériles. Estos se cortaron en segmentos de aproximadamente 0,5 cm de largo. Teniendo en cuenta que los explantes provenientes de cultivo *in vitro* de melina tienden a deshidratarse y a oxidarse, la preparación y cortes de los explantes se realizó dentro de una caja de Petri, de manera que quedaran ligeramente embebidos en ácido ascórbico al 1% y 0,1 % de PPM<sup>TM</sup>, con el fin de mantener el vigor de los explantes y evitar posible contaminación.

Los explantes se sembraron en medio MS (Murashige & Skoog), con 30 gr/L de glucosa, 8 gr/L de agar, 0,2% de PPM<sup>TM</sup> (v/v) y pH de 5,7 y en presencia o no de diferentes concentraciones y combinaciones de fitorreguladores. Los diferentes tratamientos evaluados se describen en la tabla 8, como tratamiento control se empleó el mismo medio sin reguladores de crecimiento. Los explantes se llevaron al cuarto de cultivo en oscuridad por 24 horas a 27°C, y después se colocaron a luz con una intensidad de 1148 lumen y un fotoperiodo de 16 horas luz – 8 horas oscuridad.

**Tabla 8.** Fitorreguladores y concentraciones para la regeneración vía organogénesis de diferentes explantes.

Tratamiento	BA (uM)	AIA(uM)
<b>1 (control)</b>	0	0
<b>2</b>	2,2	
<b>3</b>	2.2	0,7
<b>4</b>	2,2	1,4
<b>5</b>	3,3	
<b>6</b>	3,3	0,7
<b>7</b>	3,3	1,4
<b>8</b>	4,4	
<b>9</b>	4,4	0,7
<b>10</b>	4,4	1,4

La eficiencia de la regeneración *in vitro* se estimó por medio de la medición de las siguientes variables: frecuencia de producción de callo, días que tardó en generar callo; Frecuencia de formación de brotes, días en que tardó en salir el primer brote, número de brotes por explante al día 14.

### 6.3 Enraizamiento de segmentos nodales de Melina

Como complemento de la regeneración *in vitro*, se buscó optimizar las condiciones de enraizamiento de brotes o segmentos nodales de melina. Se usaron segmentos nodales de plantas micropropagadas, sembradas en medio MS, evaluando dos auxinas diferentes (ácido indol acético, AIA y ácido indol butírico, AIB) a diferentes concentraciones (Tabla 9). Las variables que se evaluaron fueron: días en que tardó en generar raíz, promedio de longitud de las raíces, promedio número de raíces y frecuencia de enraizamiento (día 21).

**Tabla 9.** Fitorreguladores y concentraciones para enraizamiento.

<b>Tratamiento</b>	<b>AIA (uM)</b>	<b>AIB (uM)</b>
<b>1</b>	5,7	
<b>2</b>	11,4	
<b>3</b>	16,5	4,9
<b>4</b>		9,8
<b>5</b>		14,7
<b>6 (control)</b>	0	0

## **6.4 AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE MELINA**

### **6.4.1 Tratamiento pre - aislamiento.**

Las plantas micropropagadas fuente de los segmentos foliares, se incubaron en oscuridad por 36 horas (Andreu et al., 2009; Riofrio et al., 2012) previo a la extracción de protoplastos.

### **6.4.2 Aislamiento de protoplastos**

Al finalizar las 36 horas, en cámara de flujo laminar, se tomaron 80 mg de tejido foliar y se cortaron tanto en el haz como en el envés (Leegood y Walker, 1978).

Previamente se preparó el buffer de extracción compuesto por 0,4 mM de manitol, 20 mM de KCl (Cloruro de potasio), 10 mM de CaCl<sub>2</sub> (cloruro de calcio), 0,1% de BSA (albúmina de suero bovino) y 10 mM de MES-KOH (ácido 2 (N- morfolino 0) – etanosulfónico), ajustado a pH 5,7 (Guo et al., 2012; Ulloa & Jadan, 2003; Rodríguez & Dallos, 2004b; Ayala, 2007; Andreu et al., 2009; Osorio et al., 2010).

En este buffer de extracción se añadieron las diferentes concentraciones de celulasa R10 y macerozima R10 en forma combinada, obteniéndose las soluciones enzimáticas respectivas (Tabla 10).

Las hojas que fueron cortadas se incubaron en tubos de 2 mL con 2 mL de solución enzimática a 27°C (Carrizosa et al., 1994), a 60 rpm en oscuridad (Ayala et al., 2007).

Se tomaron alícuotas de 100 uL cada dos horas por 12 horas los cuales se filtraron en una malla de 70 micras, después de filtrarse se colocaron en un tubo de 2 ml y se agregaron 500 uL de la solución W5 (Tabla 11) empleada para detener la acción de las enzimas y se agregó 400 uL de buffer de extracción (sin enzimas) (Tabla 11). Posteriormente se centrifugó a 1000 rpm por 5 min, después se eliminó el sobrenadante y los protoplastos presentes en el pellet fueron resuspendidos en 100 uL de solución MMG (Tabla 11) (Guo et al., 2012; Lin et al., 2014).

### 6.4.3 Conteo de protoplastos y viabilidad

Para determinar el número de los protoplastos aislados, se tomó una muestra de 10 µL de la suspensión de protoplastos y se realizó un conteo en un microscopio óptico utilizando una Cámara de Neubauer (Levitus et al. 2005) y la metodología de recuento estándar, con objetivo de 10X y un ocular de 4X.

Para evaluar la viabilidad se tiñeron los protoplastos con colorante azul Evans al 1% (Botero et al., 2011) que tiñe los protoplastos que no son viables de color azul al observarse al microscopio.

**Tabla 10.** Concentración en porcentaje de las enzimas

<b>Tratamiento</b>	<b>Celulasa R10 (%)</b>	<b>Macerozima R10 (%)</b>
<b>1 (control)</b>	0	0
<b>2</b>	0,5	0,3
<b>3</b>	1	0,4
<b>4</b>	1,5	0.5

**Tabla 11.** Composición de buffer de extracción, solución de parada W5 y solución de resuspensión y purificación MMG.

Composición de la solución enzimática	composición de la solución de parada W5	Composición de la solución de purificación MMG
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Manitol 0,4 M</li> <li>•KCl 20 mM</li> <li>•CaCl<sub>2</sub> 10 mM</li> <li>•ASB 0,1%</li> <li>•MES-KOH pH:5,7; 10 mM</li> <li>•Diferentes concentraciones de celulasa y macerozima.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•MES-KOH pH 5,7; 2mM</li> <li>•NaCl 154 mM</li> <li>•CaCl<sub>2</sub> 125 mM</li> <li>•KCl 5 mM</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•MES-KOH pH: 5,7; 4 mM</li> <li>•Manitol 0,4 M</li> <li>•MgCl<sub>2</sub> (cloruro de magnesio) 15 mM</li> </ul>

## 6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Todos los ensayos experimentales se realizaron siguiendo un diseño factorial completamente al azar, con 8 réplicas independientes en el ensayo de regeneración para los explantes hojas, cotiledones, epicótilos e hipocótilos y 4 réplicas para nudo cotiledonar, siendo la unidad experimental cada explante: 8 o 4 x 10 x 5 siendo 8 o 4 el número de réplicas, 10 el número de tratamientos y 5 el número de explantes a evaluar; para el ensayo de enraizamiento fueron 9 réplicas y la unidad experimental fue cada segmento nodal, se usó un diseño factorial 9x7x1 siendo 9 el número de réplicas, 7 el número de tratamientos y 1 el tipo de explante; para el aislamiento de protoplastos fueron 5 réplicas por cada tratamiento siendo la unidad experimental los 80 mg de hoja en buffer de extracción: 5x4x6 donde 5 es el número de réplicas, 4 son los tratamientos, 6 los tiempos en horas del tratamiento enzimático.

Las diferencias estadísticas entre tratamientos se detectaron mediante análisis de varianza (ANOVA y Kruskal Wallis) y pruebas específicas (Tukey y Duncan), previa verificación de la homogeneidad de varianzas (normalidad) utilizando el programa SPSS.

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El éxito en los sistemas de regeneración *in vitro* de plantas recae en la buena elección del explante junto a una adecuada combinación de fitorreguladores. La finalidad de este trabajo fue

determinar la mejor combinación y concentración de fitorreguladores junto a un explante con alto potencial morfogénico, esto con el fin de obtener brotes múltiples y maximizar la eficiencia de regeneración *in vitro*. Como complemento a la regeneración se buscó establecer cuál es la mejor auxina y concentración de la misma para un enraizamiento eficiente.

Finalmente, se buscó optimizar los mejores tratamientos enzimáticos (concentración de enzimas y tiempo) para el aislamiento y obtención de protoplastos viables.

### **7.1 Desdiferenciación y Potencial morfogénico de diferentes fuentes de explantes**

Para la inducción de brotes múltiples se evaluaron 5 tipos de explantes: hojas, cotiledones, epicótilos, hipocótilos, y nudos cotiledonares: estos se sometieron a diferentes tratamientos compuestos por la combinación de diferentes concentraciones de la citoquinina BAP y de la auxina AIA. Como control, estos explantes se sembraron en el mismo medio de cultivo desprovisto de fitorreguladores.

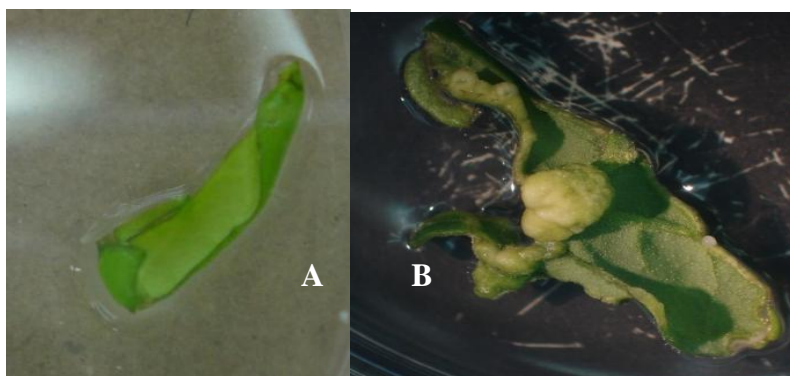
La repuesta para explantes provenientes de hojas, epicótilos, hipocótilos y cotiledones no produjo brotes en ninguno de los tratamientos evaluados. Se observó producción de callos en todos los tratamientos a excepción del control. Los únicos explantes que desarrollaron a la vez callo y brotes fueron los nudos cotiledonares (Tabla 16). Adicionalmente, los nudos cotiledonares fueron los primeros en los que se observó tanto callogénesis (día 8) como brotación (día 5).

Resultados similares se encontraron en la misma especie (Jasrai and Kannan, 1996; Yang *et al.*, 1993) donde se observó que concentraciones de BAP causaron pronunciadamente la formación de callo en los extremos de los segmentos nodales cortados y un poco en los brotes axilares que fueron elongados.

**Tabla 12.** Efecto de BAP y AIA a diferentes concentraciones en la inducción de brotes múltiples en hojas.

BAP (uM)	AIA (uM)	Explante	Respuesta	Frecuencia de calogénesis (%)	Días en generar respuesta
0	0	hojas	no	0	
2,2	0	hojas	no	0	
2,2	0,7	hojas	callo	62,50	11-14
2,2	1,4	hojas	callo	100	11-14
3,3	0	hojas	callo	100	13-14
3,3	0,7	hojas	callo	25	13-14
3,3	1,4	hojas	callo	0	
4,4	0	hojas	callo	0	
4,4	0,7	hojas	callo	62,50	13-14
4,4	1,4	hojas	callo	0	

Para hojas la frecuencia de calogénesis más alta se presentó en los tratamientos BAP 2,2uM – IAA 1,4 uM (Fig 10 a y b) y BAP 3,3 uM con una frecuencia del 100 % a las dos semanas, sin embargo no todos los tratamientos presentaron respuesta, debido a altas concentraciones de BAP no fueron favorables a la formación de callo en general. (Tabla 12).



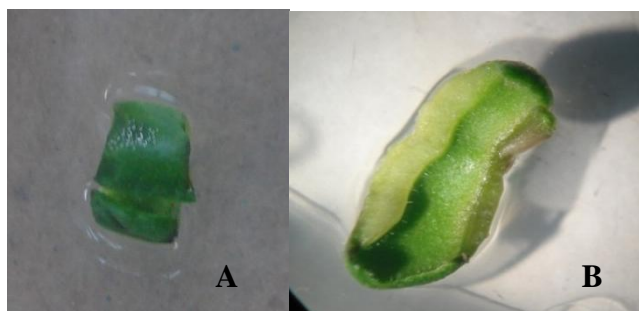
**Fig 10. Calogénesis en explantes foliares.** A: Explante de hoja a los 5 días en tratamiento BAP 2,2 uM y AIA 1,4 uM; B. Explante de hoja a los 14 días en tratamiento BAP 2,2 uM y AIA 1,4 uM.



**Tabla 13.** Efecto de BAP y AIA a diferentes concentraciones en la inducción de brotes múltiples en cotiledones.

BAP (uM)	AIA (uM)	Explante	Respuesta	Frecuencia de calogénesis (%)	Días en generar respuesta
0	0	cotiledón	no	0	
2,2	0	cotiledón	callo	100	13-14
2,2	0,7	cotiledón	callo	50	13-14
2,2	1,4	cotiledón	callo	100	11-14
3,3	0	cotiledón	callo	12,50	13-14
3,3	0,7	cotiledón	callo	75	11-14
3,3	1,4	cotiledón	callo	100	11-12
4,4	0	cotiledón	callo	0	
4,4	0,7	cotiledón	callo	62,50	13-14
4,4	1,4	cotiledón	callo	0	

En cotiledones la mayor frecuencia de calogénesis fue para los tratamientos BAP 2,2 uM; BAP 2,2 uM – AIA 1,4 uM (Fig 11 a y b) y BAP 3,3 uM – AIA 1,4 uM con una frecuencia de 100%. Sin embargo, al igual que lo observado en otros explantes, los tratamientos con concentraciones muy altas de citoquinina (BAP 4,4 uM) no presentaron ningún tipo de respuesta (Tabla 13).



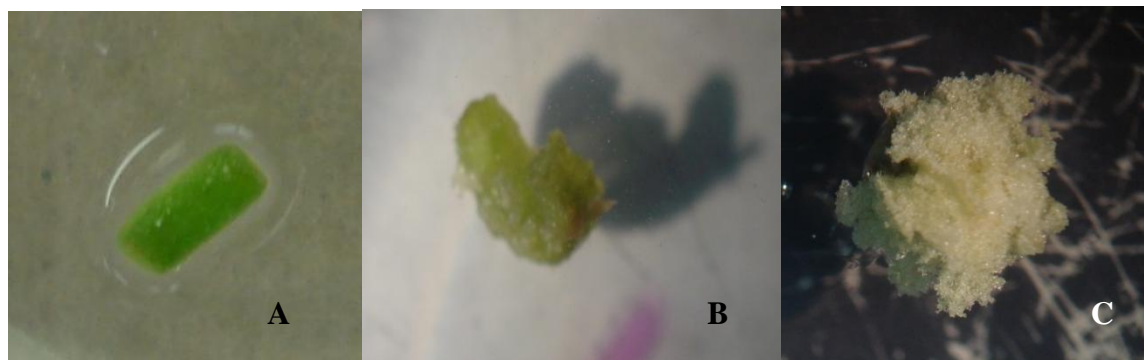
**Fig 11. Calogénesis en cotiledones.** A. Explante de cotiledón a los 5 días en tratamiento BAP 2,2 uM y AIA 1,4 uM; B. Explante de hoja a los 14 días en tratamiento BAP 2,2 uM y AIA 1,4 uM.

Para epicótilos la mayor frecuencia de calogénesis se observó en los tratamientos BAP 2,2 uM – AIA 0.7 uM y BAP 2,2 uM – AIA 1,4 uM (Fig 11.) con una frecuencia de 100%, sin embargo no todos los tratamientos presentaron respuesta como es el caso de BAP 2,2 uM (Tabla 14). Interesantemente, la calogénesis presentada en epicótilos presentó una organización muy diferente al resto de explantes que presentaron callo tipo friables. Las características del callo

generado a partir de los epicótilos se asemejan a las de callo embriogénico (Fig. 11. C.). Sin embargo, al tiempo de evaluación de este ensayo no fue posible evidenciar formación de embriones somáticos.

**Tabla 14.** Efecto de BAP y AIA a diferentes concentraciones en la inducción de brotes múltiples en epicótilo.

BAP (uM)	AIA (uM)	Explante	Respuesta	Frecuencia de calogénesis (%)	Días en generar respuesta
0	0	epicótilo	no	0	
2,2	0	epicótilo	no	0	
2,2	0,7	epicótilo	callo	100	5-14
2,2	1,4	epicótilo	callo	100	6-7
3,3	0	epicótilo	callo	75	11-14
3,3	0,7	epicótilo	callo	75	6-14
3,3	1,4	epicótilo	callo	62,50	5-14
4,4	0	epicótilo	callo	50	6-11
4,4	0,7	epicótilo	callo	62,50	6-14
4,4	1,4	epicótilo	callo	75	5 - 14



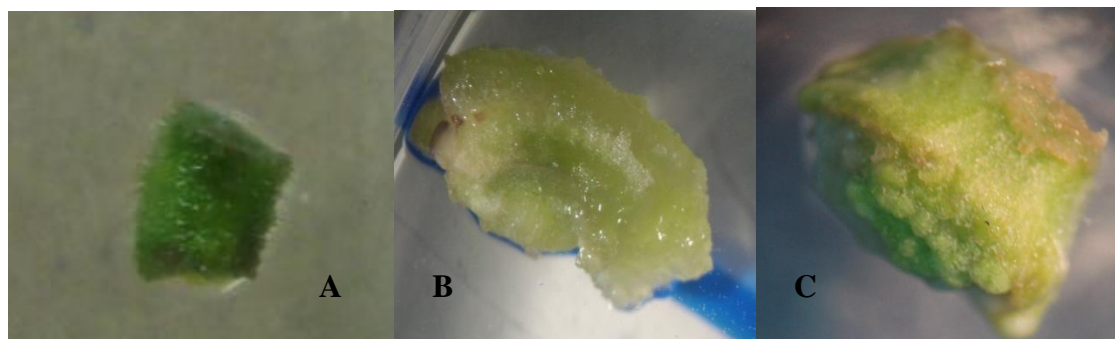
**Fig 11. Calogénesis en epicótilos.** A. Explante de epicótilo a los 5 días en tratamiento BAP 2,2 uM y AIA 1,4 uM; B. Explante de epicótilo a los 14 días en tratamiento BAP 2,2 uM y AIA 1,4 uM; C. Explante de epicótilo a los 14 días en tratamiento BAP 3,3uM y AIA 0,7 uM.

Para hipocótilos se obtuvo respuesta de calogénesis en tiempos relativamente cortos. La mayor frecuencia de calogénesis se generó en los tratamientos BAP 2,2 uM e AIA 0,7 uM, BAP 2,2 uM e AIA 1,4 uM, BAP 3,3 uM e AIA 0,7uM; BAP 4,4 uM e AIA 0,7 uM. Estas concentraciones presentaron un 100% de calogénesis, de tipo callo friable, en un tiempo de 5 a 11 días, pero a

diferencia de los demás tratamientos, este explante presentó respuesta en todos los tratamientos excepto el control (Tabla 15).

**Tabla 15.** Efecto de BAP y AIA a diferentes concentraciones en la inducción de brotes múltiples en hipocótilo.

BAP (uM)	AIA (uM)	Explante	Respuesta	Frecuencia de calogénesis (%)	Días en generar respuesta
0	0	hipocótilo	no	0	
2,2	0	hipocótilo	callo	87,50	5-14
2,2	0,7	hipocótilo	callo	100	5- 6
2,2	1,4	hipocótilo	callo	100	5 - 11
3,3	0	hipocótilo	callo	75	6-14
3,3	0,7	hipocótilo	callo	100	11-14
3,3	1,4	hipocótilo	callo	75	5-6
4,4	0	hipocótilo	callo	88	6-11
4,4	0,7	hipocótilo	callo	100	5-6
4,4	1,4	hipocótilo	callo	75	5-11



**Fig 12. Calogénesis en hipocótilos.** A. Explante de hipocótilo a los 5 días en tratamiento BAP 2,2 uM y AIA 1,4 uM; B. Explante de hipocótilo a los 14 días en tratamiento BAP 2,2 uM y AIA 1,4 uM; C explante de hipocótilo a los 14 días en tratamiento BAP 3,3uM y AIA 0,7 uM.

Los epicótilos y los hipocótilos fueron los explantes que, después de los nudos cotiledonares empezaron a generar respuesta de calogénesis a tiempos más cortos: ésta comenzó entre los 5 primeros días hasta el día 14. Esta variación en los tiempos de respuesta tan distante puede

deberse tanto al tratamiento como al genotipo, debido a que existió variación dentro de un mismo tratamiento. Después entre los días 11 y 14 se observó la respuesta de callogénesis en las hojas y en los cotiledones, aunque no todos los tratamientos en este caso obtuvieron respuesta quizás, debido al poco tiempo al que estuvieron sometidos.

En el trabajo realizado por Madke & colaboradores (2012), donde evaluaron diferentes concentraciones de las citoquininas BAP y Kinetina, solas o en combinación con las auxinas ANA y 2,4D, obtuvieron como respuesta que explantes como las hojas y los epicótilos desarrollaron callo pero los cotiledones y los hipocótilos no dieron ninguna respuesta. En el presente trabajo, los explantes que presentaron una frecuencia de callogénesis más alta y en menor tiempo fueron los hipocótilos y los epicótilos. Esto puede deberse a que Madke y colaboradores (2012) usaron a ANA como auxina y en este caso se utilizó a AIA. El efecto positivo del AIA sobre los explantes puede deberse a que esta auxina cuenta con vías metabólicas y de transporte propias, por lo que la toma, transporte y actividad de esta auxina por el explante podría ser mucho más efectiva que la toma o actividad del ANA o del 2,4 D (Gaspar et al., 1998).

### **7.1.1 Nudo cotiledonar**

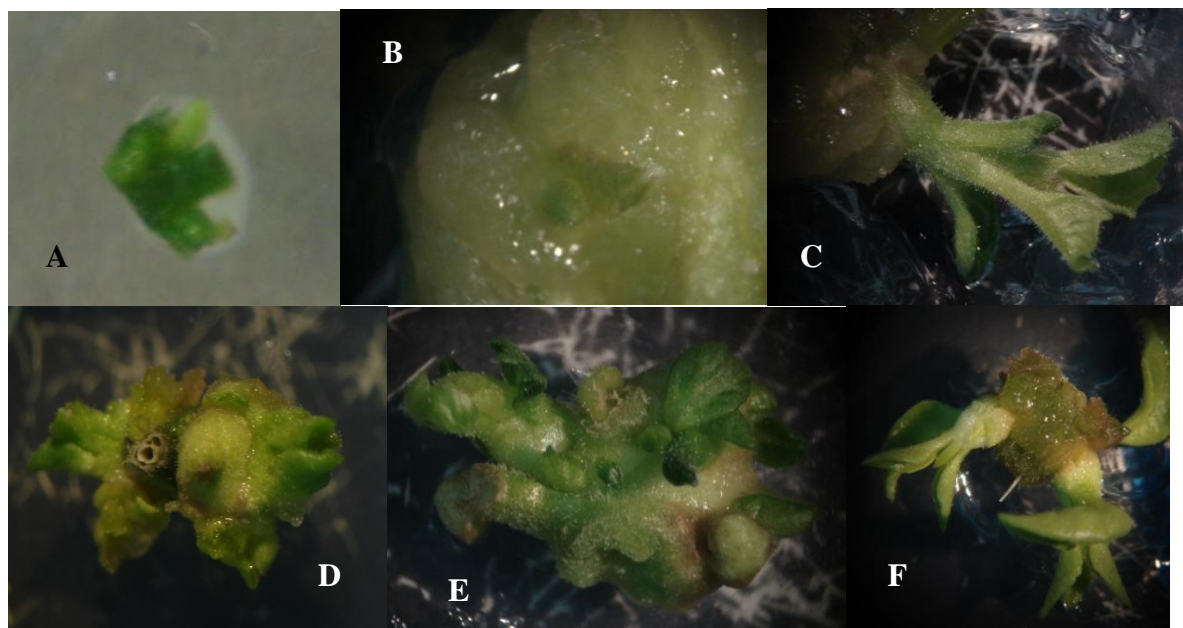
Este explante fue el único que presentó respuesta en cuanto a la generación de brotes. Los tratamientos con un mayor número de brotes. Los tratamiento con mayor generación de brotes fueron BAP 2,2 uM – IAA 0,7 uM y BAP 4,4 uM con 4,25 brotes por explante (Tabla 16), la frecuencia de regeneración fue de un 100% en casi todos los tratamientos a excepción de los tratamientos BAP 2,2 uM y BAP 3,3 uM – IAA 0,7 uM con un 50% de regeneración, y del tratamiento control (0% de regeneración). Esto evidencia el alto potencial morfogénico de este explante y su idoneidad en regeneración *in vitro*, lo cuál ha sido ampliamente reportado en diferentes especies.

El crecimiento de los brotes se presentó en tiempos muy cortos entre los primeros 5 días. El crecimiento y el desarrollo de los brotes estuvo asociado al desarrollo de un poco de callo, lo que coincide con reportes previos (Behera et al., 2008). Algunos de los explantes desarrollaron organogénesis directa otros no, esto fue independiente del tratamiento, por lo que se deduce que es dependiente del genotipo (Tabla 16).

En el año 2008, Behera y colaboradores, realizaron un trabajo en regeneración *in vitro* de melina a partir de nudos cotiledonares donde evaluaron las citoquininas BAP y TDZ solas y en combinación con las auxinas AIA y ANA. Obtuvieron que el mejor tratamiento fue BAP 4,4 uM – AIA 1,4 uM, seguido del tratamiento BAP 4,4 uM. En el presente trabajo, como se mencionó anteriormente, los mejores tratamientos en nudos cotiledonares fueron BAP 2,2 uM – AIA 0,7 uM y BAP 4,4 uM, lo que coincide en gran medida con este único antecedente (balance entre fitorreguladores). En este mismo trabajo, se menciona que menores concentraciones de AIA junto con concentraciones mayores de BAP mejoran la frecuencia y el número de brotes por explante, similar a lo observado en nuestro caso. Aunque el tratamiento con mayor eficiencia de regeneración no fue el mismo que el obtenido por Behera y colaboradores (2008), se mantuvo la relación BAP/AIA con lo que nuestros resultados verifican y soportan este trabajo previo.

**Tabla 16.** Efecto de BAP y AIA a diferentes concentraciones en la inducción de brotes múltiples en nudo cotiledonar (NC). B/E: número promedio de brotes por explante.

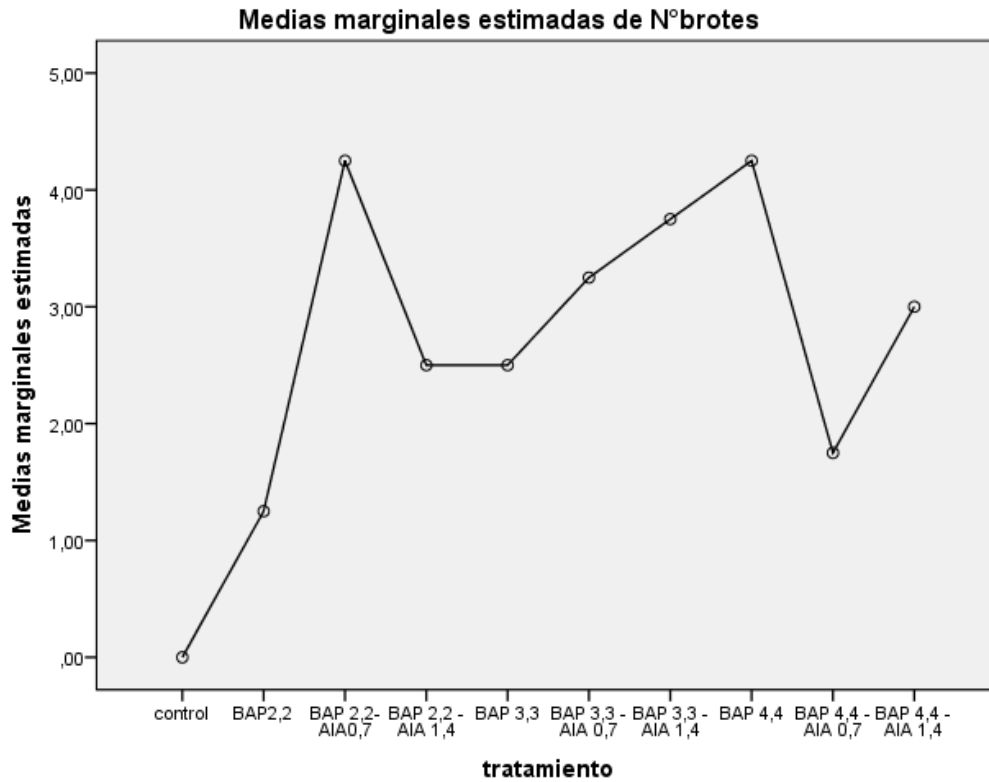
<b>Explante</b>	<b>BAP (uM)</b>	<b>AIA (uM)</b>	<b>B/E</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Frecuencia de regeneración (%)</b>	<b>Días</b>
NC	0	0	0	0	0	3-5
NC	2,2	0	1,25	1,5	50	3-5
NC	2,2	0,7	4,25	2,2	100	3-5
NC	2,2	1,4	2,5	1	100	3-5
NC	3,3	0	2,5	3,7	100	3-5
NC	3,3	0,7	3,25	1,8	50	3-5
NC	3,3	1,4	3,75	2,8	100	3-5
NC	4,4	0	4,25	2,6	100	3-5
NC	4,4	0,7	1,75	0,5	100	3-5
NC	4,4	1,4	3	1,4	100	3-5



**Fig 13. Organogénesis en Nudos Cotiledonares.** **A.** Explante de nudo cotiledonar a los 5 días en tratamiento BAP 2,2 uM y AIA 0,7 uM; **B.** Inicio de Organogénesis en nudo cotiledonar a los 4 días en tratamiento BAP 2,2 uM y AIA 1,4 uM; **C y F.** Elongación de brotes de nudo cotiledonar los a los 14 días en tratamiento BAP 4,4 uM y BAP 3,3 uM y AIA 0,7 uM; **D y E.** Formación de brotes múltiples en nudo cotiledonar con los tratamientos BAP 2,2 y AIA 0,7 y BAP 4,4 uM a los 14 días.

Los resultados de regeneración *in vitro* obtenidos a partir de nudos cotiledonares son muy alentadores debido a la rapidez de la respuesta morfológica como al alto número de brotes múltiples obtenidos a los 14 días (4.25 brotes por explante en promedio). Este resultado es de gran importancia de cara al desarrollo de protocolos de transformación genética en melina, y dejan presajear que podrá ser posible obtener plantas transformadas de melina en tiempos relativamente cortos, algo deseable y poco frecuente en una especie forestal.

Aunque el número de brotes respecto a los tratamientos fue normal (Anexo 1) no hubo homogeneidad de varianzas lo cual nos indica que no hubo diferencias significativas (Anexo 2), Sin embargo se realizó la prueba de Tukey (tabla 17 y fig. 14) para observar diferencias entre tratamientos y en esta se encontró que no hubo diferencias entre los tratamientos incluyendo el control esto se puede deber a que el número de réplicas hechas (4) no fue suficiente para poder establecer diferencia entre los mismos. (Anexo 3).



**Fig 14.** Medias de numeros de brotes respecto a cada tratamiento.

**Tabla 17.** Prueba de tukey para numero de brotes en nudos cotiledonares

**N° brotes**

HSD Tukey<sup>a,b</sup>

tratamiento	N	Subconjunto
		1
control	4	,00
BAP2,2	4	1,2
BAP 4,4 - AIA 0,7	4	1,7
BAP 2,2 - AIA 1,4	4	2,5
BAP 3,3	4	2,5
BAP 4,4 - AIA 1,4	4	3,0
BAP 3,3 - AIA 0,7	4	3,2
BAP 3,3 - AIA 1,4	4	3,7
BAP 2,2- AIA0,7	4	4,2
BAP 4,4	4	4,2
Sig.		,15

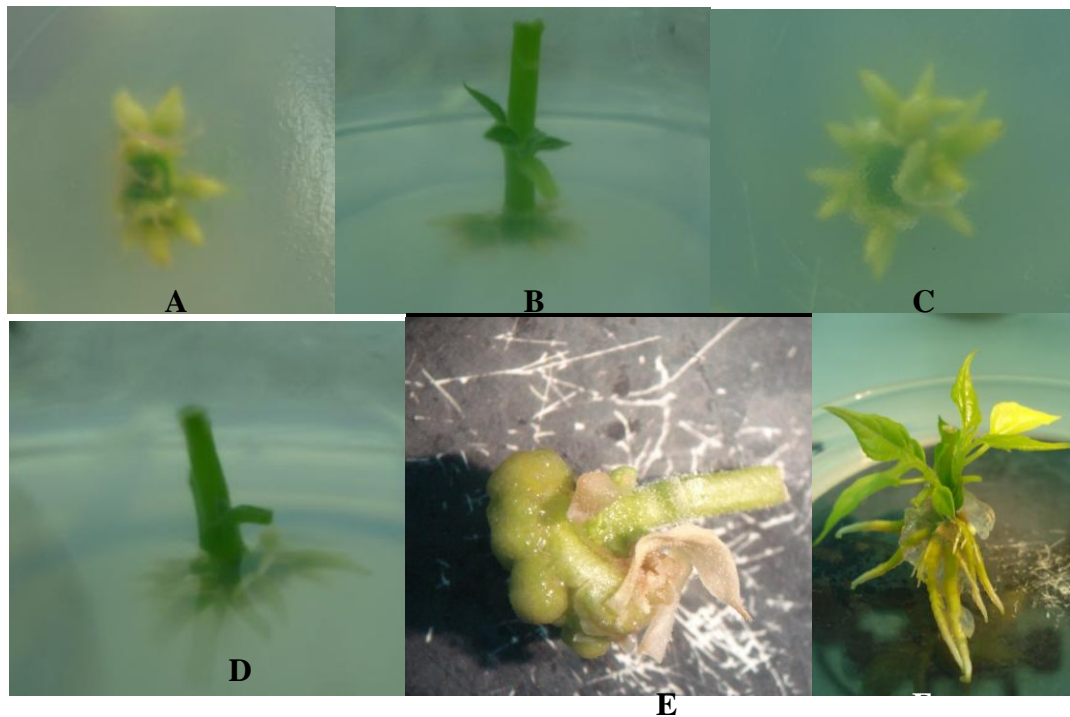
## 7.2 Enraizamiento de segmentos nodales

De acuerdo a los tratamientos que presentaron enraizamiento de los segmentos nodales, el efecto fue entre los 8 y 10 primeros días (Tabla 18). El mejor tratamiento fue AIB 14,7 uM con una frecuencia de enraizamiento del 56 %, un número promedio de raíces de 3,4 y una longitud promedio de 1,4 cm al día 21 (fig 15). Se observó que la formación de raíces es precedida por la formación de callo, similar a lo reportado por otros estudios (Surkartiningsih et al., 1999, Behera et al., 2008). Este resultado coincide con reportes previos que sugerían que AIB tiene efectos positivos para la inducción de raíces y el desarrollo del sistema radical de brotes en esta especie (Jasrai and Kannan, 1996; and Yang et al., 1993). En el trabajo de Behera y colaboradores (2008) el mejor tratamiento fue IBA 4,9 uM + TIBA 2,0 uM, con una frecuencia de enraizamiento de 66,6%, un promedio de 3,2 raíces y un promedio de longitud de 2,2 cm; Madke y colaboradores (2012) reportan a su vez que el mejor tratamiento fue IBA 14,7 uM con efecto de enraizamiento de 7 a 10 días y una frecuencia de 80 %. Con base en estos reportes, se puede decir que en este trabajo se tuvo respuestas similares a lo obtenido por Madke y colaboradores (2012), ya que el mejor tratamiento para enraizamiento fue IBA 14,7 uM, si bien la frecuencia fue ligeramente menor en un 24%. Esto se puede deber a que los subcultivos pudieron afectar la respuesta de inducción de raíces, según reportan Naik & colaboradores (2003), aunque es muy probable que haya sido el efecto de la altitud de la ciudad Bogotá (2600 msnm), poco apta para el crecimiento y desarrollo de la especie, así se trate de cultivos *in vitro*. La diferencia presentada en lo realizado por Behera y colaboradores (2008) puede deberse a que el uso de TIBA junto a IBA genera una mejor inducción de rizogénesis que el IBA solo y en mayores concentraciones, sin embargo esto requeriría ser evaluado dentro de un mismo ensayo y diseño experimental.



**Tabla 18.** Efecto de AIB y AIA a diferentes concentraciones en el enraizamiento de segmentos nodales.

Auxinas	Concentración (uM)	Día de inicio de enraizamiento	Frecuencia de enraizamiento (%)	Promedio de raíces	Promedio de longitud por raíces (cm)
<b>Control</b>	<b>0</b>	0	0	0	0
<b>AIB</b>	<b>4,9</b>	8 -10	11	0,2	0,5
	<b>9,8</b>	8-10	22	1	0,5
	<b>14,7</b>	8 10	56	3,4	1,41
<b>AIA</b>	<b>5,7</b>	0	0	0	0
	<b>11,4</b>	0	0	0	0
	<b>16,5</b>	8-10	11	0,2	2



**Fig 15.** **A y B.** Segmentos nodales de *Gmelina arborea* en medio de cultivo con una concentración de AIB 14,7 uM a los 10 días; **C y D.** Segmentos nodales de *Gmelina arborea* en medio de cultivo con una concentración de AIB 14,7 uM a los 18 días; **E.** Formación de callo en la base de un segmento nodal en un concentración de AIB 4,9 uM; **F.** Formación de raíces al día 21 con una concentración de AIB 14,7 uM.

## Aislamiento de protoplastos

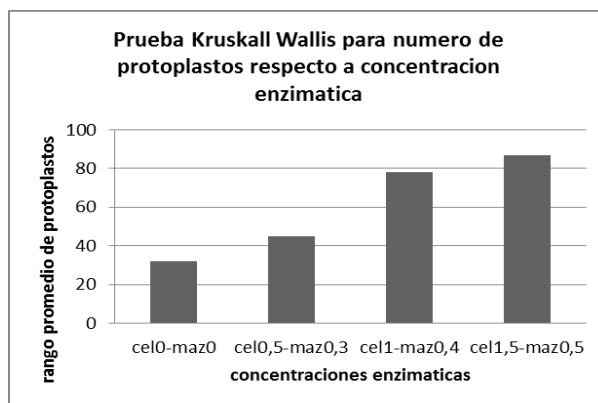
Para esta etapa se evaluaron diferentes concentraciones de enzimas degradadoras de pared vegetal (celulasa y pectinasas) y tiempos (2-12 h) sobre la cantidad de protoplastos obtenidos y su viabilidad. El aislamiento fue realizado a partir de hojas de plántulas de melina propagadas *in vitro*.

Para esto se realizaron 3 réplicas técnicas en el tiempo con el fin de verificar la reproducibilidad del ensayo. El análisis mostrado se presenta por cada réplica técnica en forma independiente, debido a que se implementaron mejoras en ciertos procedimientos entre una réplica y otra.

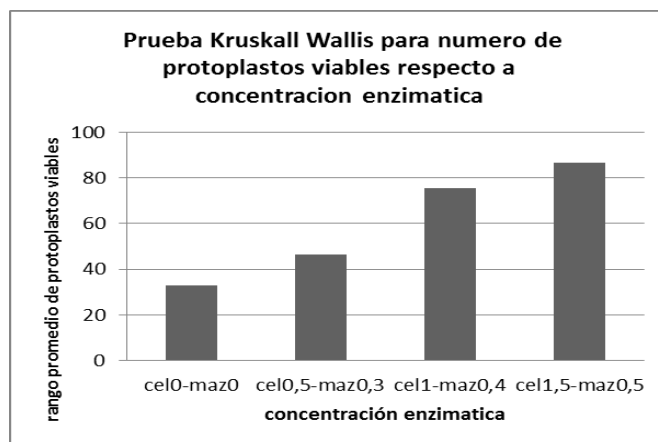
Después de realizar la prueba de normalidad se encontró que los datos no se distribuyeron de forma normal por lo tanto se realizó la prueba de Kruskal Wallis y después mediante la prueba de Duncan se compararon las medias de los tratamientos para saber cuál fue el más óptimo.

### 7.3.1 Replica 1

Mediante la prueba de Kruskal Wallis se logró identificar que si habían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos y tiempos para cada una de las variables dependientes (número de protoplastos y viabilidad de los mismos) (Tabla 19). La combinación de celulasa R10 al 1,5% - macerozima R10 al 0,5% tuvo un rango promedio de 86,93 para el aislamiento (fig 16) y de 86,80 para la viabilidad (fig 17) siendo la óptima en este caso (Anexo 5).



**Figura 16.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos respecto a concentración enzimática.



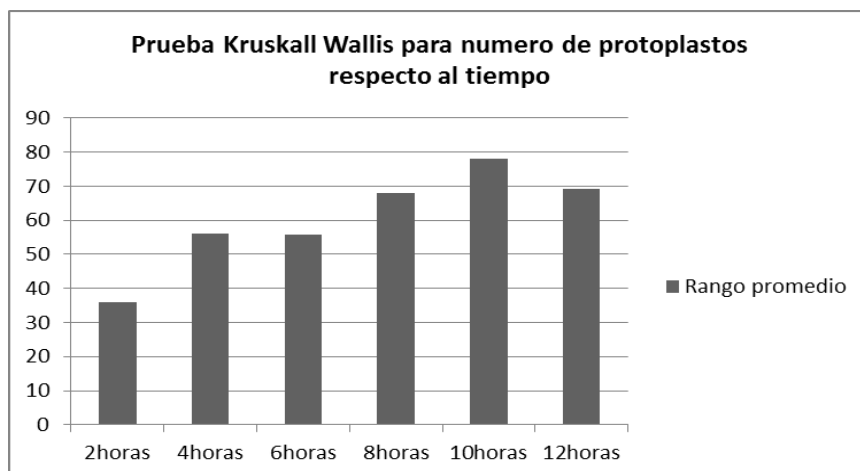
**Fig 17.** Prueba de Kruskal Wallis para numero de protoplastos viables respecto a la concentración enzimática.

**Tabla 19.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos y protoplastos viables respecto a concentración enzimática.

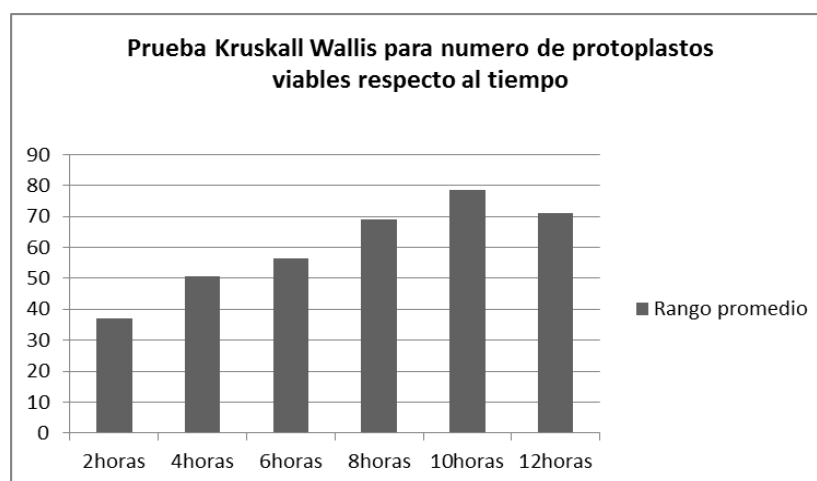
Estadísticos de prueba <sup>a,b</sup>		
	N°protoplastos	N°P.viables
<b>Chi-cuadrado</b>	59,430	55,278
<b>gl</b>	3	3
<b>Sig. asintótica</b>	,000	,000

Cel: celulasa; Maz: macerozima; N°P. viables: número de protoplastos viables

También se realizó esta prueba para observar si existen diferencias entre los tiempos para cada una de las variables dependientes, lo cual resulto ser positivo (Tabla 20), indicando que a 10 horas se presentaron los mejores resultados para el aislamiento de protoplastos (fig 18) además de número de protoplastos viables (fig 19), presentando rangos promedios de 78 y 78,45 respectivamente (Anexo 6).



**Fig 18.** Prueba de Kruskal Wallis para numero de protoplastos respecto al tiempo.



**Fig 19.** Prueba de Kruskal Wallis para numero de protoplastos viables respecto al tiempo.

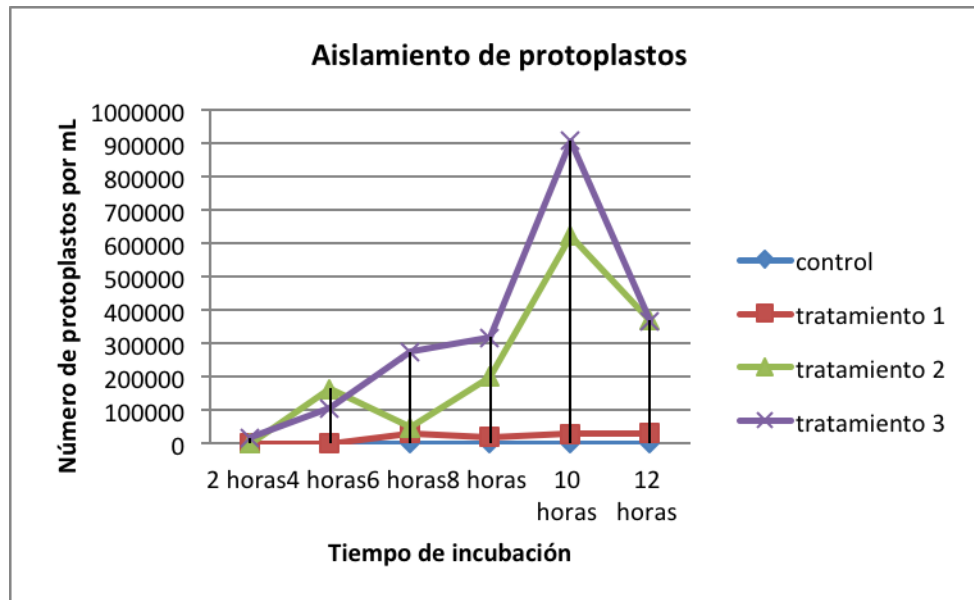
**Tabla 19.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos y protoplastos viables respecto al tiempo.

Estadísticos de prueba <sup>a,b</sup>		
	N° protoplastos	N°P.viables
<b>Chi-cuadrado</b>	20,95	23,01
<b>gl</b>	5	5
<b>Sig. asintótica</b>	,001	,00

### 7.3.1.1 Cantidad de protoplastos

Se puede observar en la figura 20 el conteo de protoplastos realizado durante diferentes tiempos de incubación y concentraciones de celulasa R10 y macerozima R10. El tratamiento que permitió

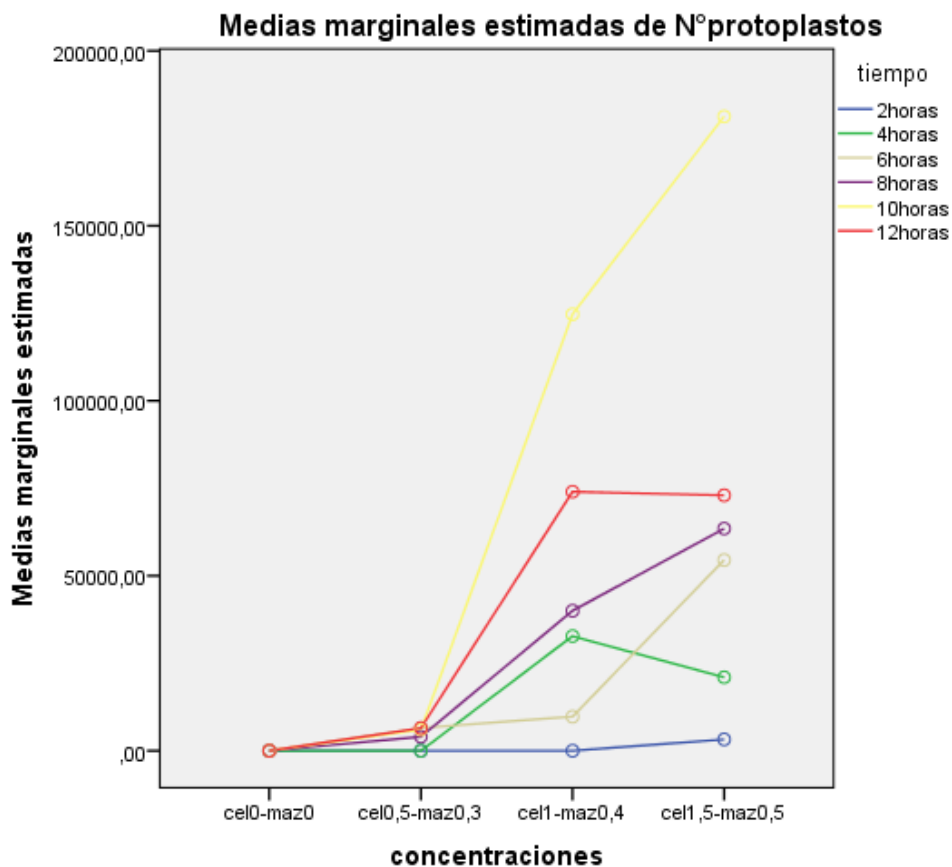
obtener el mayor número de protoplastos, fue el número 3 que corresponde a celulasa R10 1,5% y macerozima R10 0,5% en un tiempo de 10 horas con una producción de  $9 \times 10^5$  protoplastos por mL.



**Fig 20.** Conteo de protoplastos durante 12 horas.

### 7.3.1.2 Concentración enzimática vs número de protoplastos

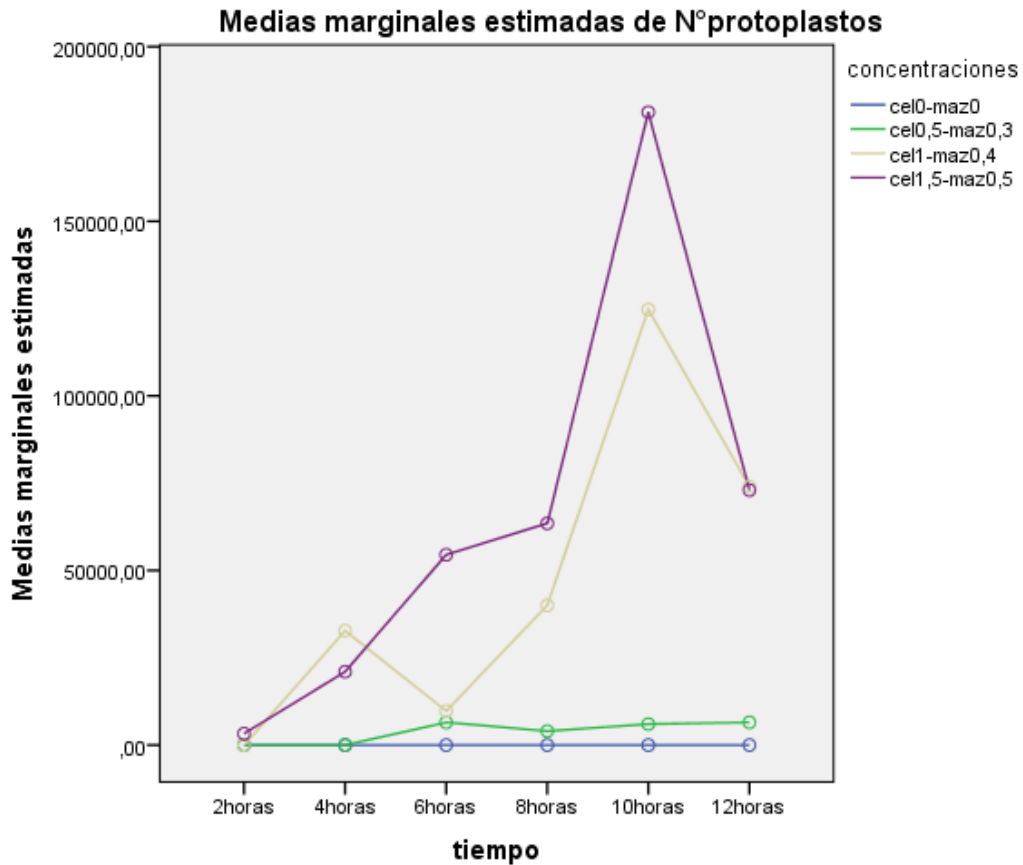
Para evaluar las diferencias entre las concentraciones enzimáticas y el número de protoplastos se realizó una prueba de Duncan (fig 21 y Anexo 7) donde se observaron 2 grupos, los cuales permitieron identificar el tratamiento óptimo para el aislamiento de protoplastos. En el primer grupo quedaron ubicados el control y el tratamiento 1 (celulasa R10 0,5% y macerozima R10 0,3%), y el segundo grupo agrupo el tratamiento 2 y 3 (celulasa R10 1% y 1,5% con macerozima R10 0,4% y 0,5%). Esto indica que los tratamientos con mayor número de protoplastos obtenidos fueron celulasa R10 1% y 1,5% con macerozima R10 0,4% y 0,5%. Pero a pesar de que los tratamientos 2 y 3 estén en el mismo grupo, el número 3 fue mejor respecto a los otros tratamientos.



**Fig 21.** Prueba Duncan para número de protoplastos respecto a concentraciones enzimáticas.

### 7.3.1.3 Tiempo de incubación vs número de protoplastos

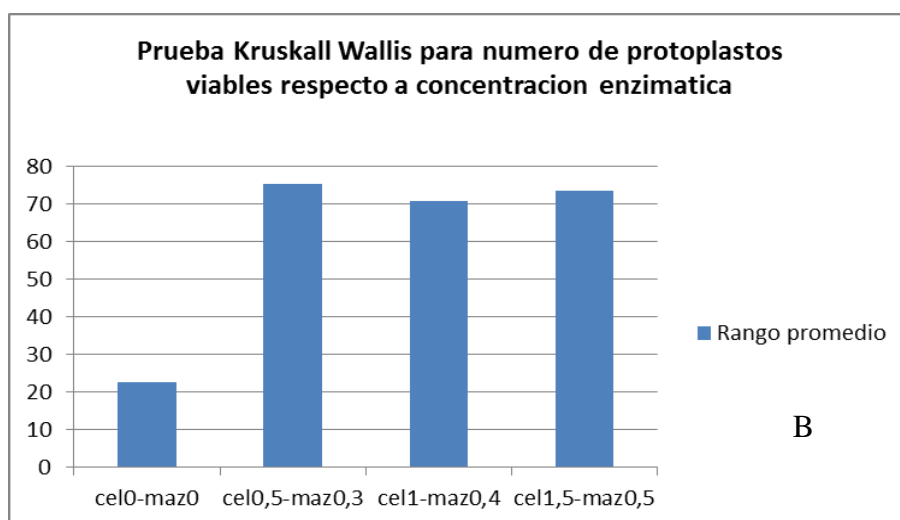
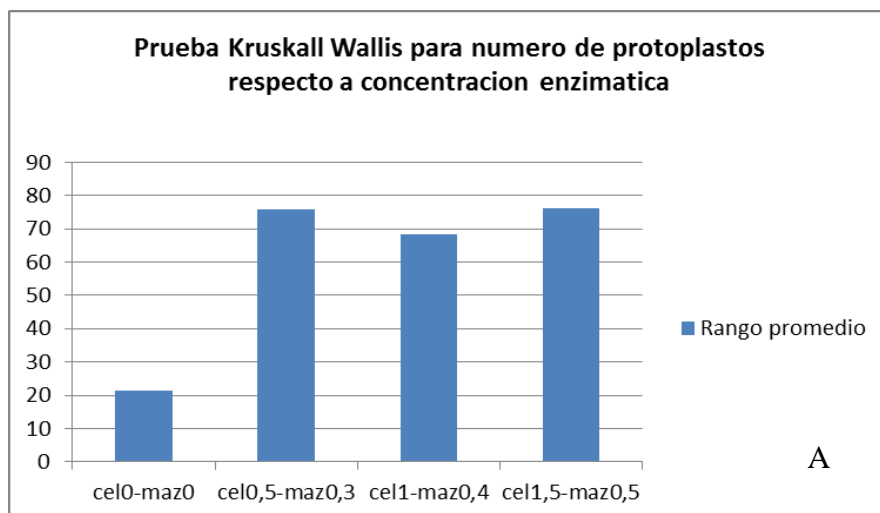
Además se realizó una prueba de Duncan ( fig 22 y anexo 8) para analizar el comportamiento del tiempo de incubación respecto al número de protoplastos aislados, en este se observan 3 grupos, el primero es de las 2 horas a las 8 horas, el segundo está conformado de la hora 4 hasta la hora 12 excluyendo la hora 10, la cual se encuentra en un grupo aparte siendo el tiempo de incubación óptimo para el aislamiento de protoplastos.



**Fig 22.** Prueba Duncan para número de protoplastos respecto a tiempo de incubación.

### 7.3.2 Replica 2

Mediante la prueba de Kruskal Wallis se logró identificar si habían diferencias entre las concentraciones para cada una de las variables dependientes que en nuestro caso fueron número de protoplastos y la viabilidad de los mismos (Tabla 21), la concentración de celulasa R10 1,5% - macerozima R10 0,5% tuvo un rango promedio de 76,35 para el aislamiento de protoplastos (Fig 25 a) y para la viabilidad ( fig 25 b) el tratamiento celulasa R10 0,5% y macerozima R10 0,3% obtuvo un rango promedio de 75,20 siendo estos los más óptimos (Anexo 11 ).



**Figura 25.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos (A) y número de protoplastos viables respecto a concentración enzimática. (B)

**Tabla 21.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos y protoplastos viables respecto a concentración enzimática

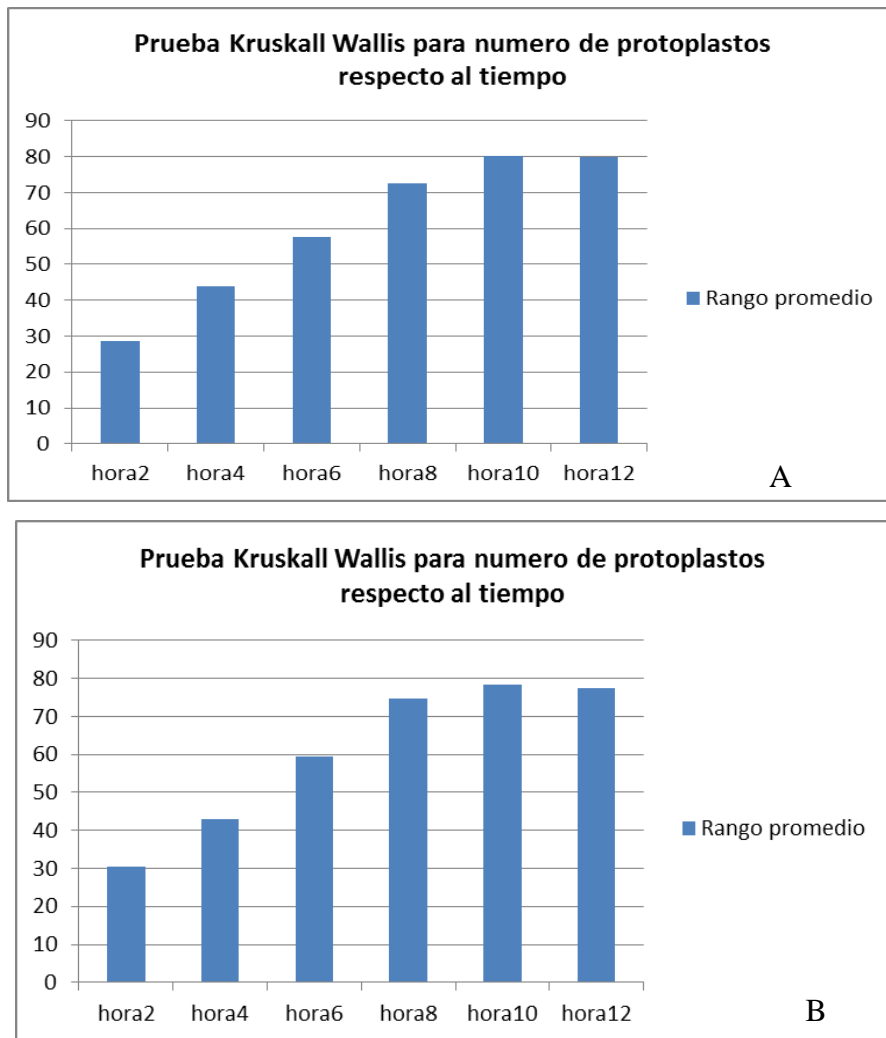
**Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup>**

	N°protoplastos 2	N°viables2
<b>Chi-cuadrado</b>	53,61	50,46
<b>gl</b>	3	3
<b>Sig. asintótica</b>	,00	,00

También se realizó esta prueba para ver si existían diferencias entre los tiempos para cada una de las variables dependientes, las cual resultado ser positiva (Tabla 22), siendo la hora 10 la más



efectiva para el aislamiento de protoplastos (fig 26 a) y la viabilidad (fig 26 b) los mismos con rangos promedios de 80,23 y 78,43 (Anexo 11).



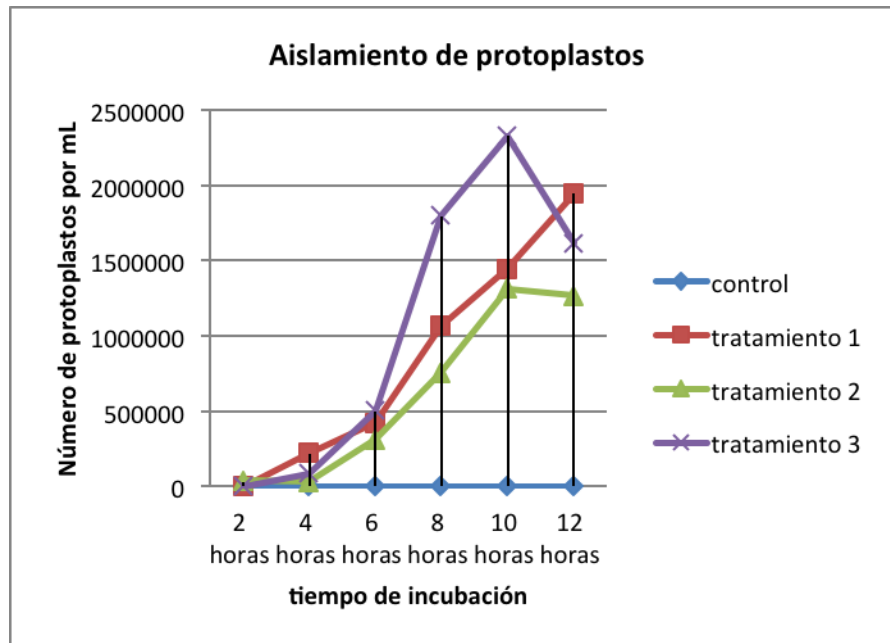
**Figura 26.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos (A) y número de protoplastos viables (B) respecto al tiempo.

**Tabla 22.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos y protoplastos viables respecto al tiempo.

Estadísticos de prueba <sup>a,b</sup>		
	N°protoplastos2	N°viables2
Chi-cuadrado	38,09	35,28
gl	5	5
Sig. asintótica	,00	,00

### 7.3.2.1 Cantidad de protoplastos

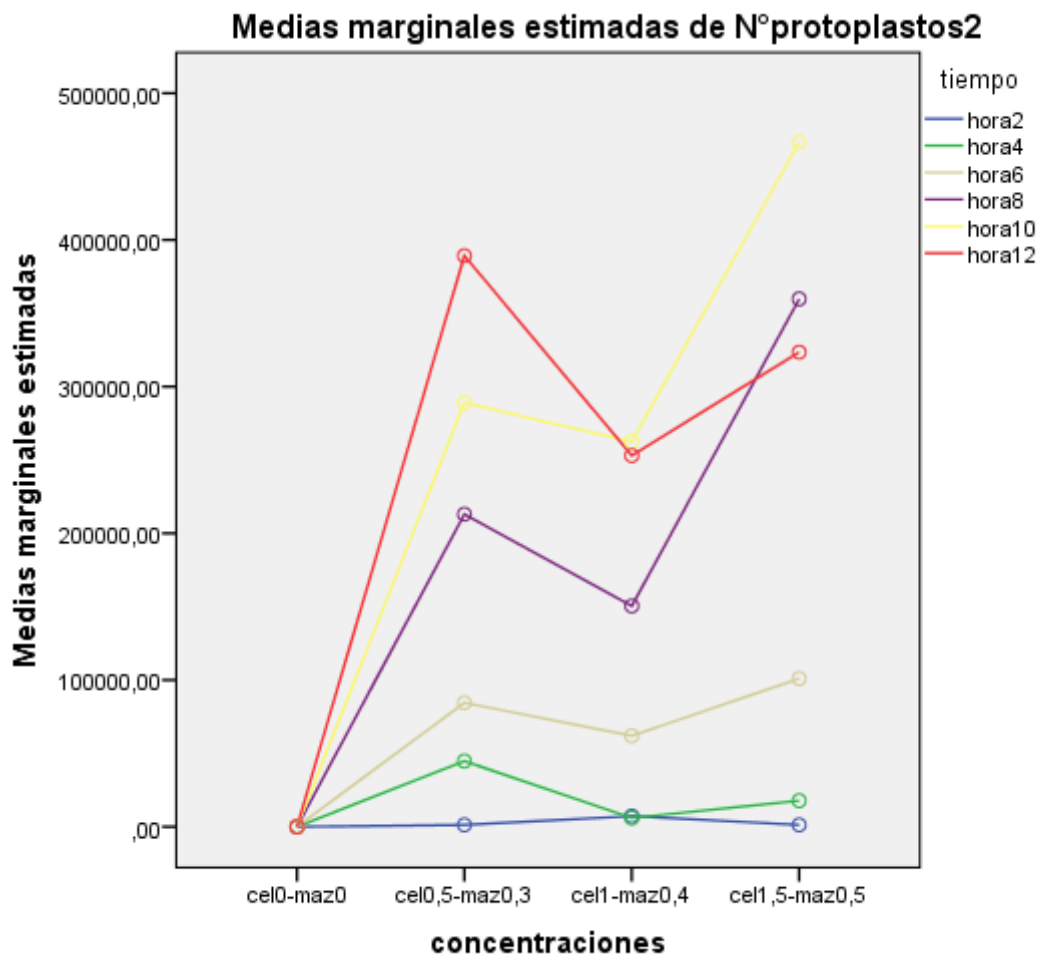
En la Fig 27 se puede observar el conteo de protoplastos realizado durante diferentes tiempos de incubación y diferentes concentraciones de celulasa R10 y macerozima R10. El mejor tratamiento fue el numero 3 a las 10 horas con un total de  $2,3 \times 10^6$  protoplastos aislados.



**Fig 27.** Conteo de protoplastos por 12 horas

### 7.3.2.2 Concentración enzimática vs número de protoplastos

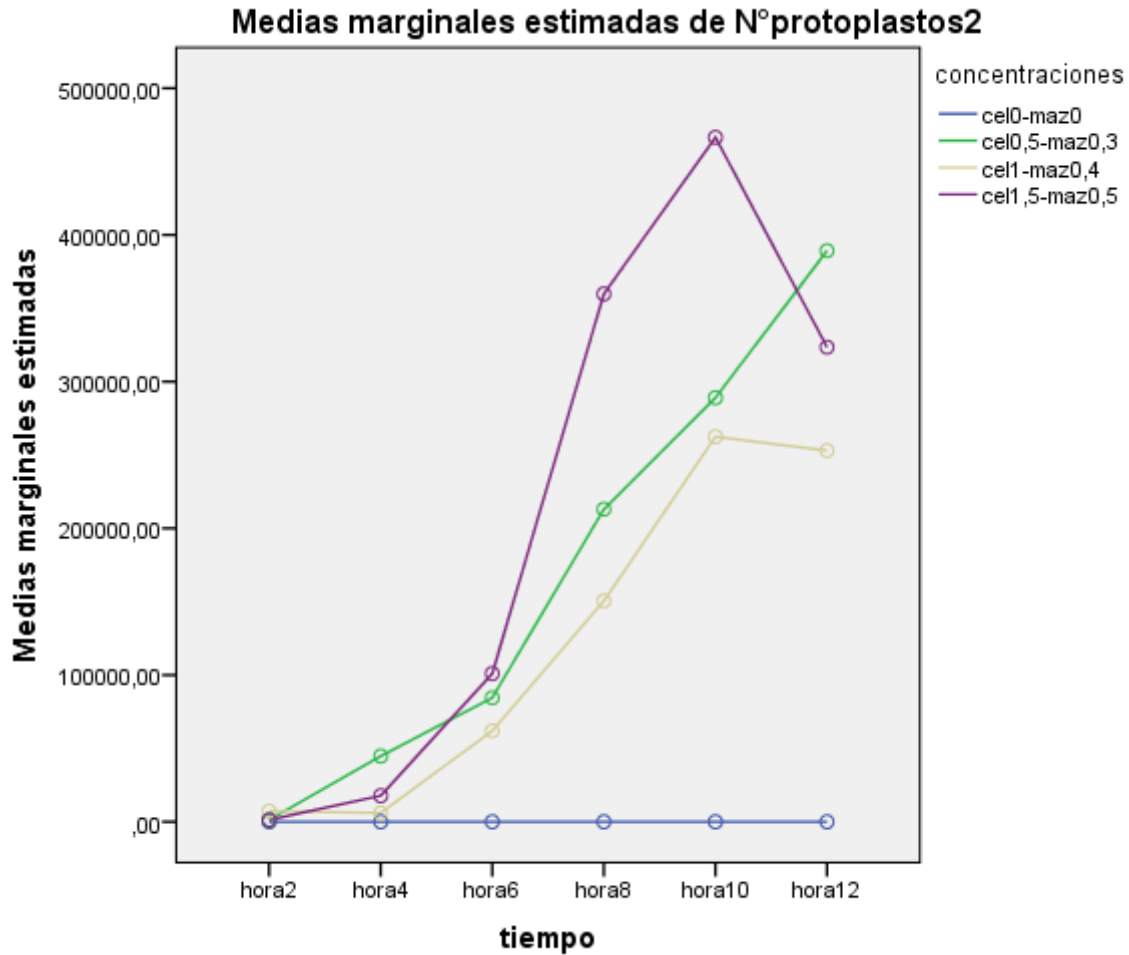
Para la evaluar la mejor concentración enzimática respecto a número de protoplastos aislados se realizó una prueba de Duncan (fig 28 y Anexo 13), donde se observaron 3 grupos, el primer grupo correspondió al control, el segundo grupo correspondió al tratamiento 1 y 2 y el tercer grupo correspondió al tratamiento 2 y 3. Pero el tratamiento 3 (celulasa R10 1,5% con macerozima R10 0,5%) fue el mejor para el aislamiento de protoplastos.



**Fig 28.** Prueba de Duncan para número de protoplastos respecto a concentraciones enzimáticas.

### 7.3.2.3 Tiempo de incubación vs número de protoplastos

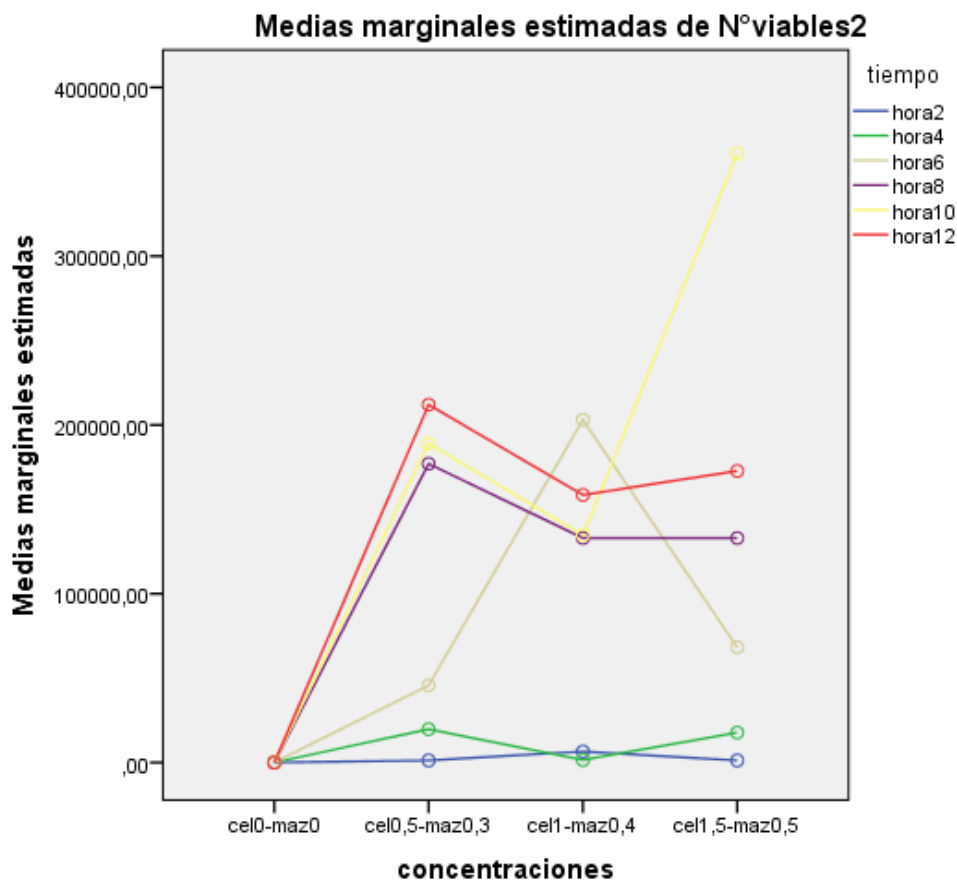
La prueba de Duncan permito realizar una comparación (fig 29 y Anexo 14) de los diferentes tiempos de incubación donde se observan 3 grupos, el primero es de las 2 horas a las 6 horas, el segundo esta conformados de la hora 8 hasta las 12 excluyendo la hora 10 la cual se encuentra en el tercer grupo junto al tratamiento 12. Dentro de este grupo, se encuentran los tiempos que permitieron obtener el mayor número de protoplastos, siendo la hora 10 el tiempo óptimo.



**Fig 29.** Prueba de Duncan para número de protoplastos respecto al tiempo de incubación.

#### 7.3.2.4 Concentración enzimática vs número de protoplastos viables

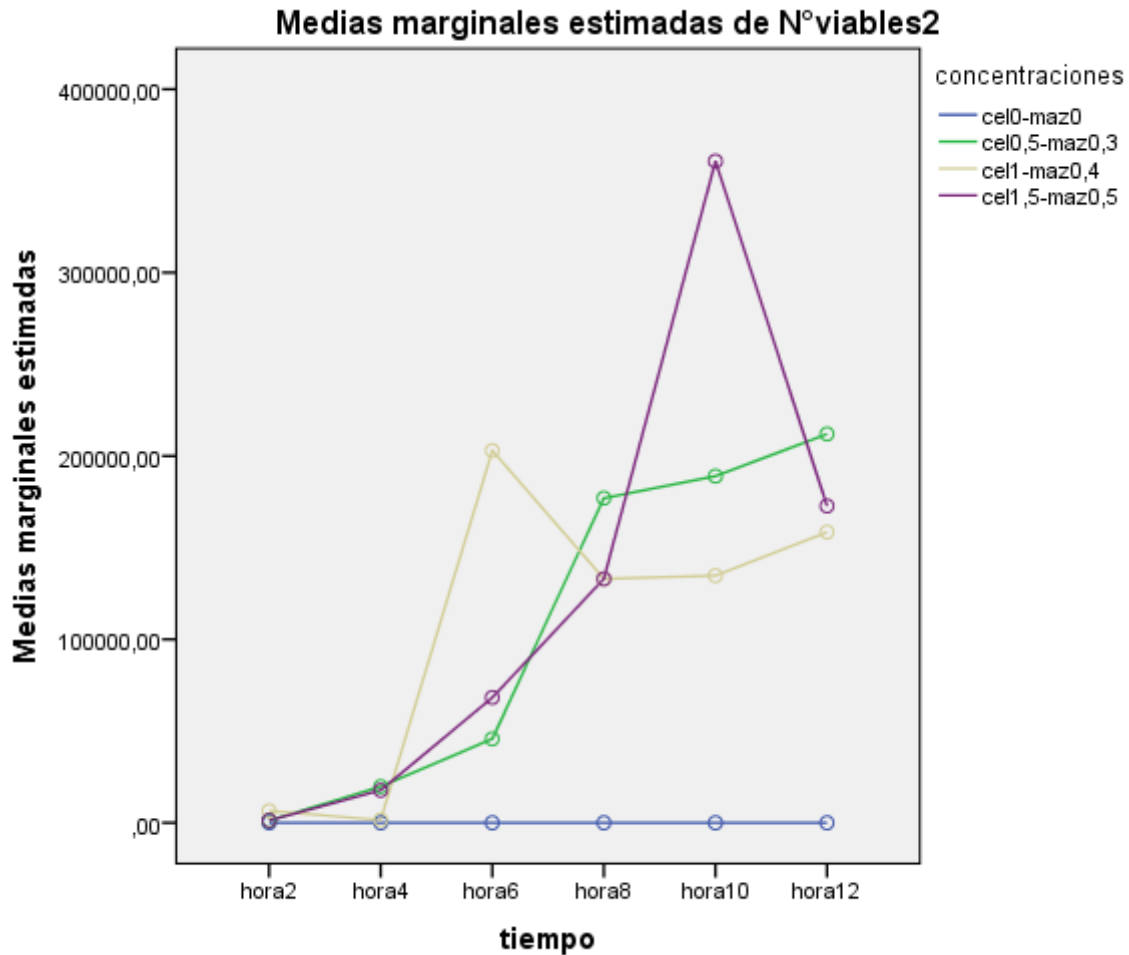
Se realizó una prueba de Duncan (fig 30 y Anexo 15) para evaluar el efecto de los tratamientos sobre el número de protoplastos viables, en donde se observaron 2 grupos, uno para el control y otro para los tratamientos 1, 2 y 3. A pesar de que el tratamiento 3 este en el mismo grupo con los tratamientos 1 y 2 (no existen diferencias estadísticamente significativas) tuvo un número más alto de protoplastos viables.



**Fig 30.** Prueba Duncan para número de protoplastos viables respecto a concentraciones enzimáticas

### 7.3.2.5 Tiempo de incubación vs número de protoplastos viables

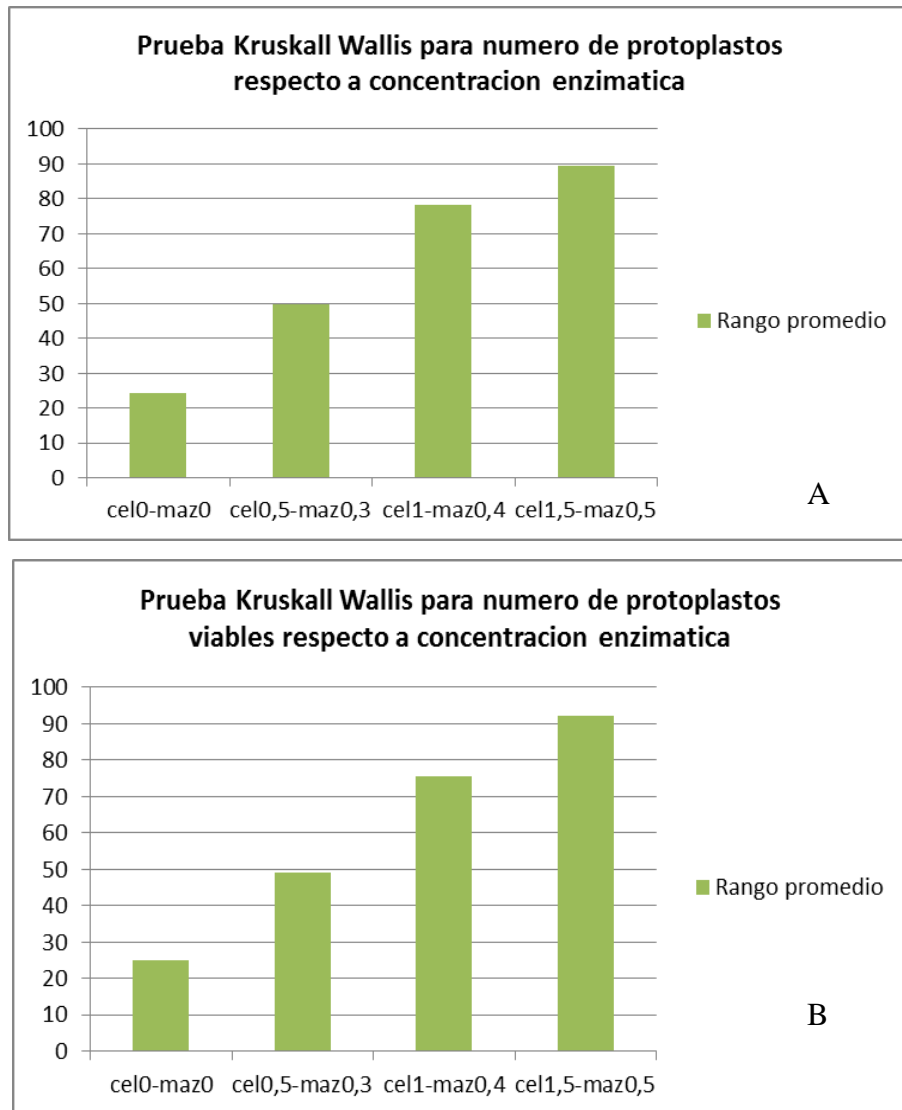
Se realizó una prueba de Duncan (fig 31 y anexo 16) para observar las diferencias entre número de protoplastos viables respecto al tiempo de incubación donde se observaron 4 grupos: el primero agrupo los tiempos entre las 2 horas y las 4 horas, el segundo está conformado de la hora 4 hasta la hora 6, el tercer grupo fue de la hora 6 a la hora 12 excluyendo la hora número 10 y el último grupo estuvo compuesto por las horas 8,10 y 12. La hora 10 tuvo el número más alto de protoplastos viables.



**Fig 31.** Prueba Duncan para número de protoplastos viables respecto al tiempo de incubación.

### 7.3.3 Replica 3

Mediante la prueba de Kruskal Wallis se logró identificar si habían diferencias entre las concentraciones para cada una de las variables dependientes que en este caso fueron número de protoplastos y la viabilidad de los mismos (Tabla 23), la concentración de celulasa R10 1,5% - macerozima R10 0,5% tuvo un rango promedio de 89,40 para el aislamiento (fig 32 a) y de 92,20 para la viabilidad (fig 32 b) siendo óptimas en este caso (Anexo 17).

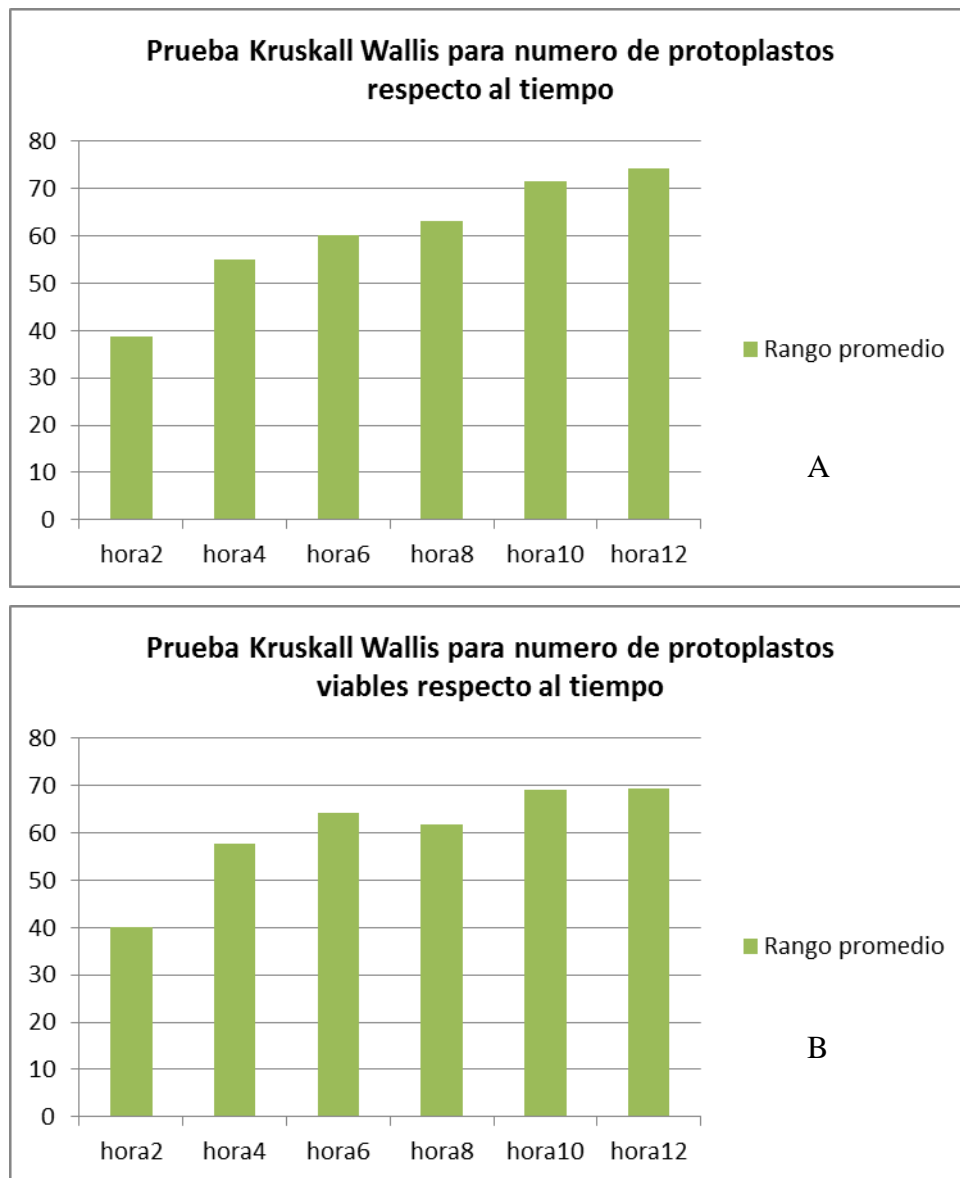


**Fig 32.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos (A) y viabilidad de protoplastos (B) respecto a la concentración enzimática.

**Tabla 23.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos y protoplastos viables respecto a concentración enzimática

Estadísticos de prueba <sup>a,b</sup>		
	N°protoplastos3	N°viables3
<b>Chi-cuadrado</b>	68,01	69,85
<b>gl</b>	3	3
<b>Sig. asintótica</b>	,00	,00

También se realizó esta prueba para ver si existían diferencias entre los tiempos de incubación para cada una de las variables dependientes, la cual resulto ser positiva (Tabla 24), y la hora 12 tuvo los mayores rangos promedio para el aislamiento de protoplastos (fig 33 a) y para la viabilidad de los protoplastos (fig 33 b) siendo 69,48 y 74,20 respectivamente (Anexo 18).



**Fig 33.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos (A) y viabilidad de protoplastos (B) respecto al tiempo de incubación.

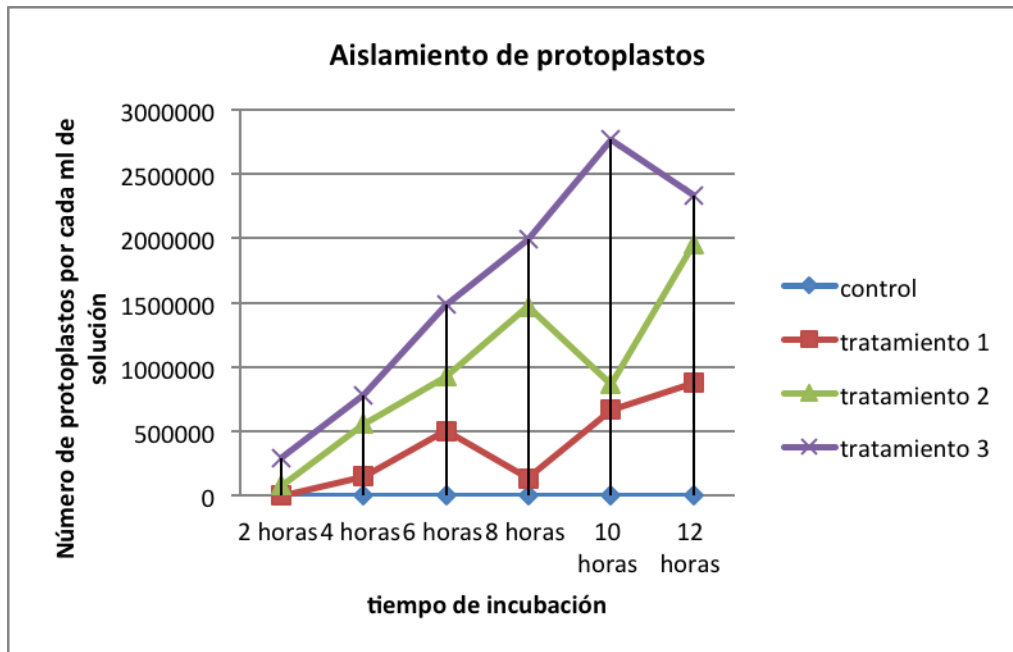


**Tabla 24.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos y protoplastos viables respecto al tiempo.

Estadísticos de prueba <sup>a,b</sup>		
	N° protoplastos3	N° viables3
Chi-cuadrado	14,447	10,502
gl	5	5
Sig. asintótica	,013	,062

### 7.3.3.1 Cantidad de protoplastos

En la figura 34 se puede observar el conteo de protoplastos realizado durante diferentes tiempos de incubación y diferentes concentraciones de celulasa R10 y macerozima R10. El mejor tratamiento fue el numero 3 a las 10 horas con una producción de  $2,7 \times 10^6$  protoplastos por mL.



**Fig 34.** Conteo de protoplastos por 12 horas.

### 7.3.3.2 Concentración enzimática vs número de protoplastos

Para comparar que tratamiento de concentraciones fue mejor para el aislamiento de protoplastos se realizó una prueba de Duncan (Fig 35 y Anexo 19), donde se observan 3 grupos, el primer grupo asocio el control y el tratamiento 1, el grupo 2 estuvo compuesto únicamente por el tratamiento 2, y el grupo 3 estuvo compuesto por el tratamiento 3 siendo el mejor para el aislamiento de protoplastos.

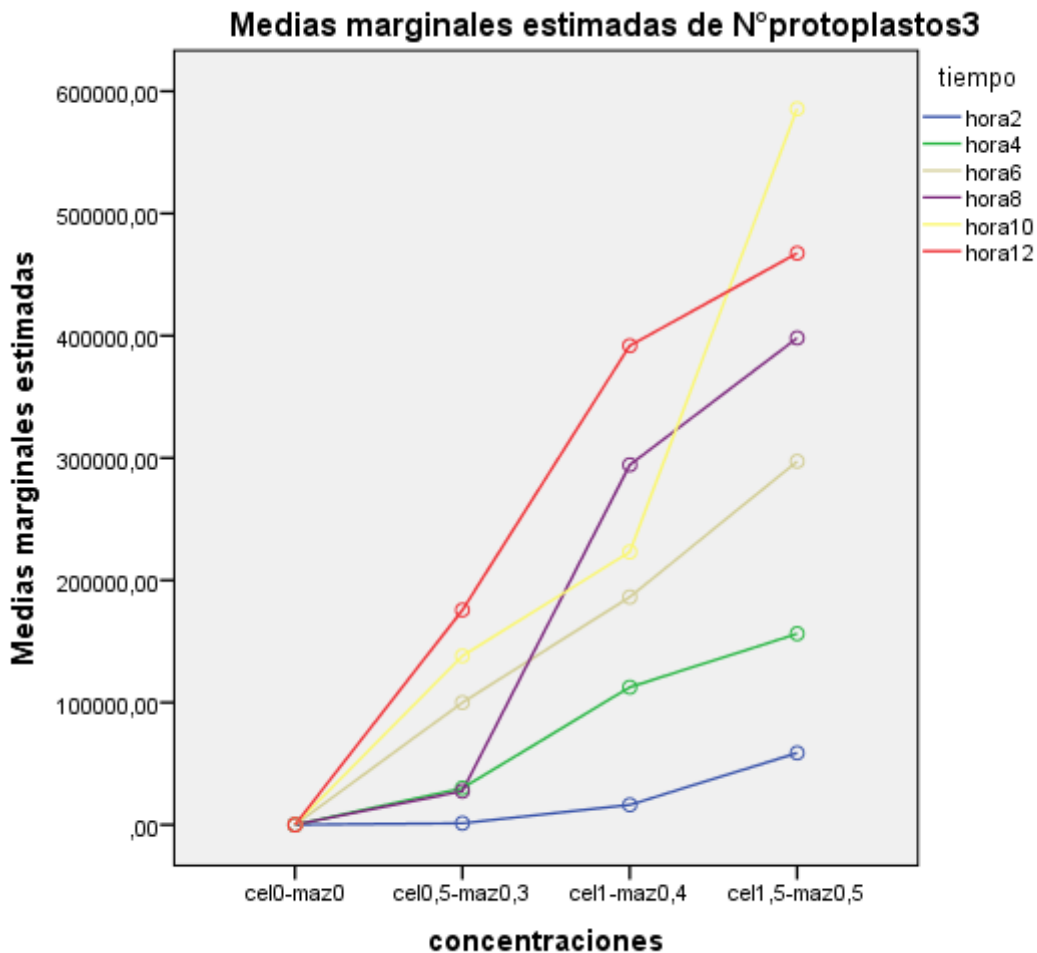
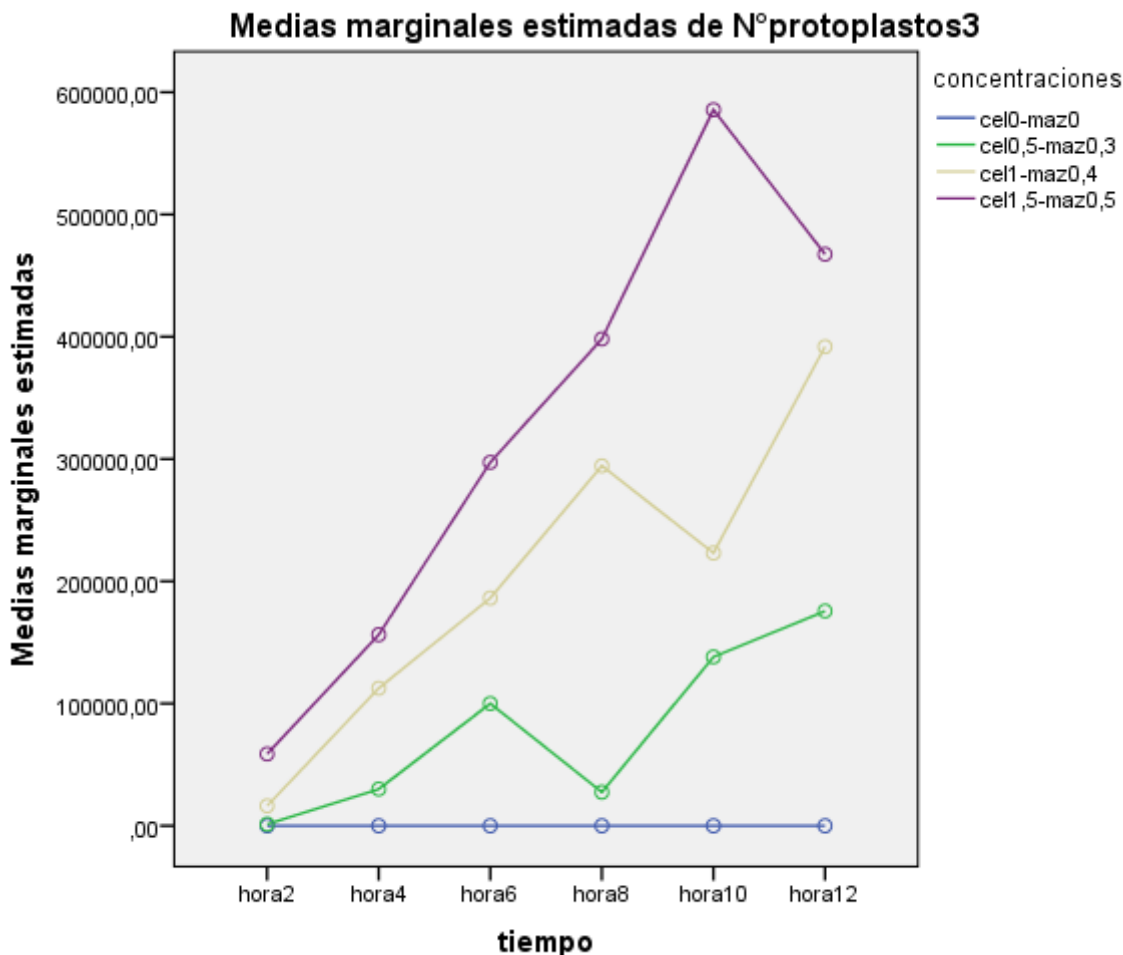


Fig 35. Prueba de Duncan para el número de protoplastos respecto a la concentración enzimática.

### 7.3.3.3 Tiempo de incubación vs número de protoplastos

Se realizó una prueba de Duncan (fig 36 y Anexo 20) para comparar los tiempos de incubación respecto al número de protoplastos, donde se observaron 4 grupos el primero es de las 2 horas a

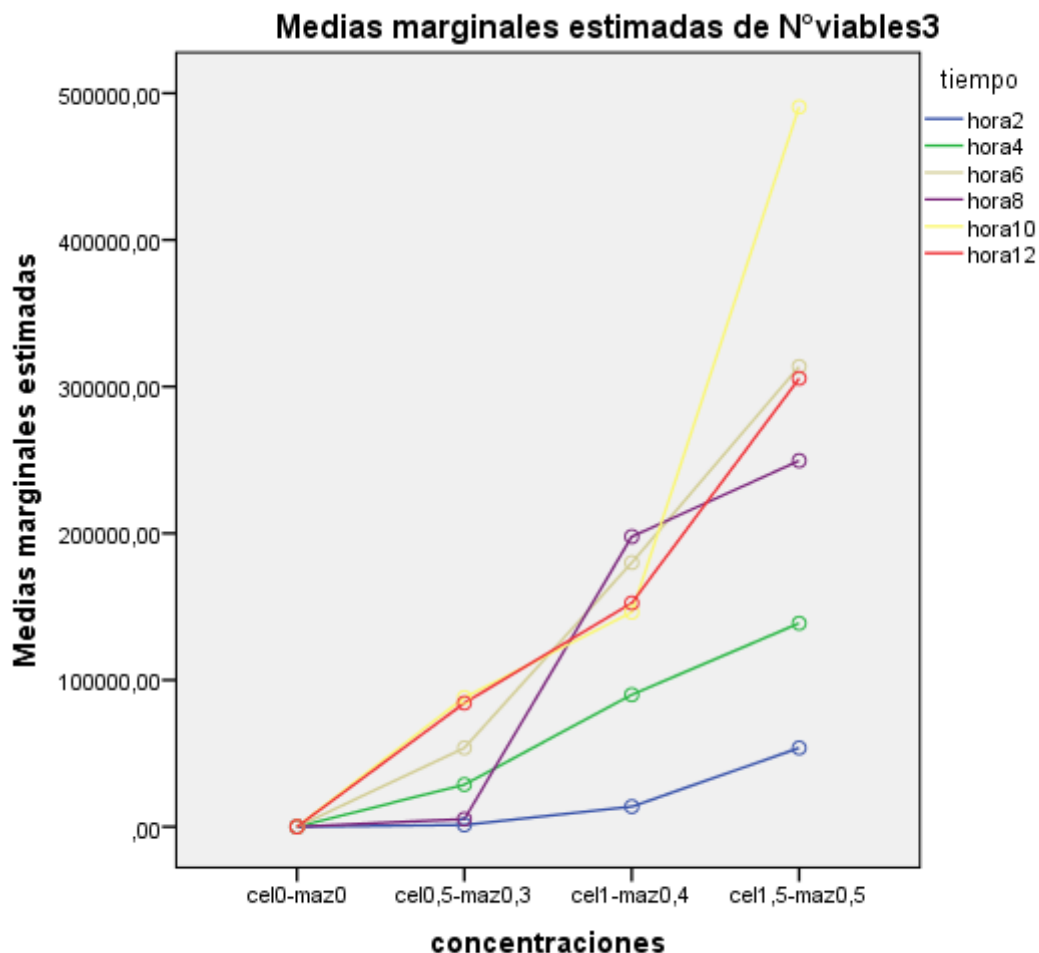
las 4 horas, el segundo fue de las 4 horas a las 8 horas, el 3 grupo fue de las 6 horas a las 10 horas y el ultimo estuvo conformado de la hora 8 hasta las 12, pero la mejor hora de incubación para el aislamiento de protoplastos fue a las 12 horas.



**Fig. 36.** Prueba de Duncan para el número de protoplastos respecto al tiempo

### 7.3.3.4 Concentración enzimática vs número de protoplastos viables

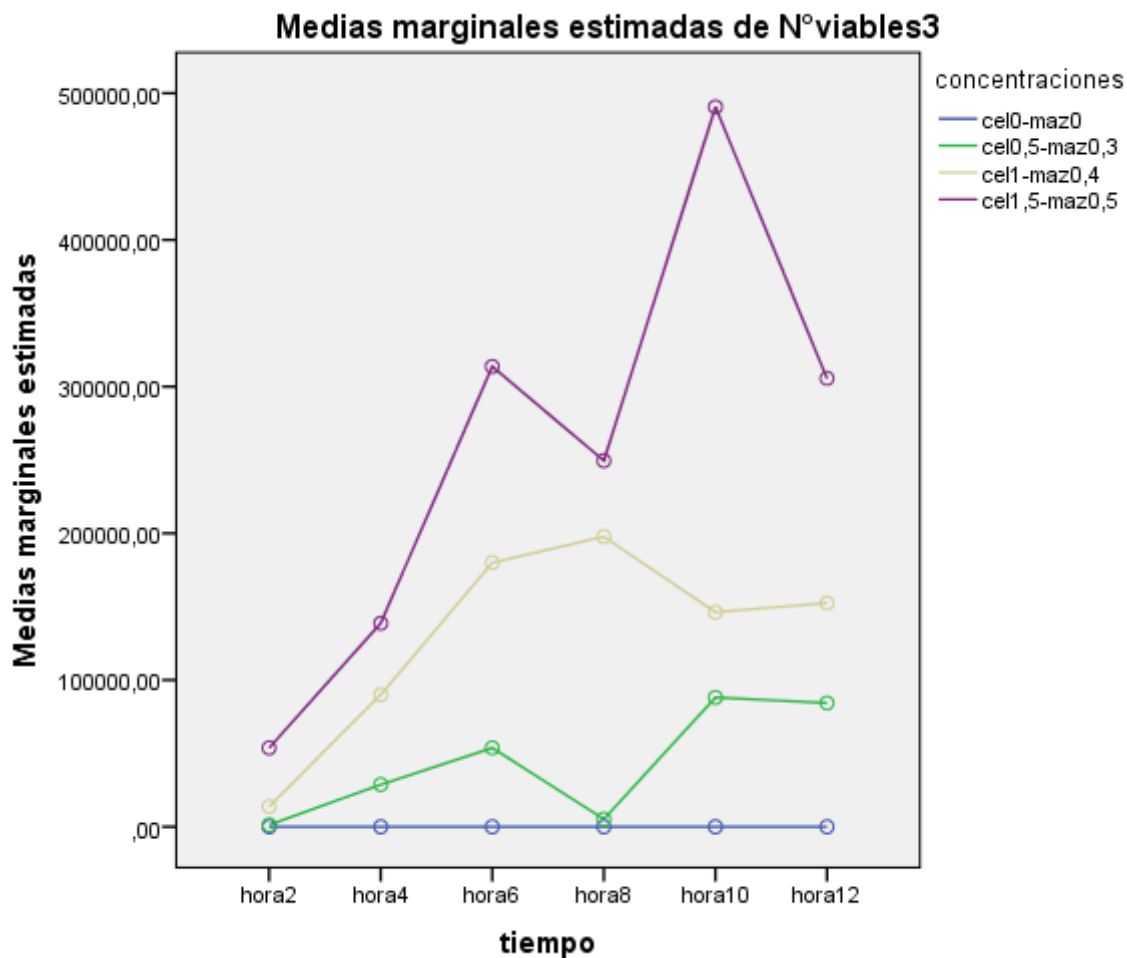
Para la comparación de las concentraciones respecto al número de protoplastos viables se realizó la prueba de Duncan (fig 37 y Anexo 21), donde se observaron 3 grupos, el primer grupo lo comprendió el control y el tratamiento 1, el grupo 2 solo contiene el tratamiento 2 y el grupo 3 solo contiene el tratamiento 3. El tratamiento número 3 tuvo el mayor número de protoplastos viables.



**Fig 36.** Prueba Duncan para número de protoplastos viables respecto a concentraciones enzimáticas.

### 7.3.3.5 Tiempo de incubación vs número de protoplastos viables

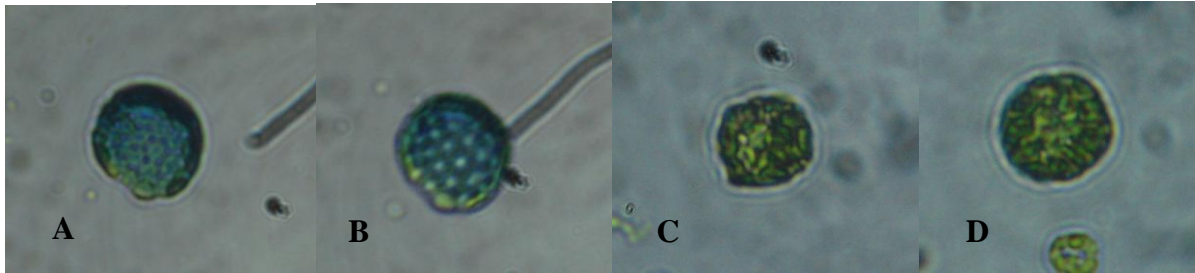
Se realizó una prueba de Duncan (fig 38 y Anexo 22) con respecto al tiempo de incubación y el número de protoplastos viables, en esta se observan 3 grupos el primero es de las 2 horas a las 4 horas, el segundo grupo está conformado por las horas 4, 8,12 y 6, y el último grupo está conformado por las horas 8, 12, 6, y 10; siendo la hora 10 aquella que permitió obtener un número mayor de protoplastos viables.



**Fig 38.** Prueba Duncan para número de protoplastos viables respecto a tiempo de incubación.

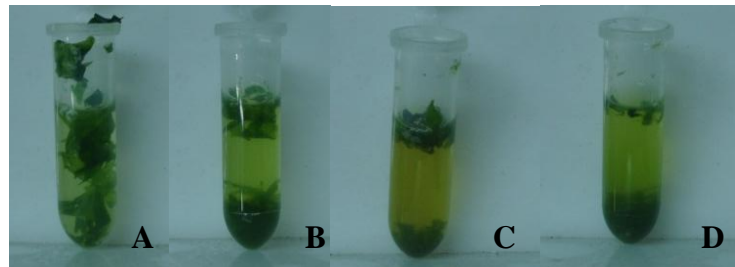
En conjunto, las tres replicas técnicas presentaron la misma tendencia, indicando que el tratamiento óptimo para el aislamiento de protoplastos, tanto en número de protoplastos aislados como en viabilidad fue el tratamiento 3 (celulasa R10 1.5% y macerozima R10 0.5%) con un tiempo de incubación de 10 horas, seguido del tratamiento 2 (celulasa R10 1% y macerozima R10 0.4%) con incubación también de 10 horas y del tratamiento 1 (celulasa R10 0.5% y macerozima R10 0.3%) con 12 horas de incubación.

Para evaluar la viabilidad de los protoplastos, se empleó azul de Evans el cual permitió distinguir entre protoplastos no viables (teñidos de azul) (Fig 39 A y B) y viables (sin tinción azul) (Fig 39 C y D). El tamaño del protoplasto de melina es de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  (Fig 39 D).



**Fig 38.** viabilidad de protoplastos objetivo de 40X. **A y B.** protoplastos no viables; **CyD** protoplastos viables.

Durante el proceso de aislamiento de los protoplastos, las enzimas actuaron en las hojas presentando sedimentación creciente de los protoplastos según el tiempo de incubación, como se observa en la figura 40.



**Fig 40.** Proceso de sedimentación de los protoplastos en el tratamiento 3 (celulasa R10 1,5% y macerozima R10 0,5%). **A.** 2 horas; **B.** 6 horas; **C.** 8 horas; **D.** 10 horas.

Los tratamientos enzimáticos que se evaluaron en este trabajo, se derivan del tratamiento recomendado por Lin y colaboradores (2014) a partir de xilema para álamo (*Populus trichocarpa*), en el cual usaron celulasa R10 1,5% y macerozima R10 0,4%, sin embargo los autores recomiendan que puede este tratamiento puede ser replicado y optimizado para distintos explantes y distintas especies.

Bajas concentraciones de enzimas en tiempos de incubación cortos dieron como resultado un número bajo de protoplastos esto puede deberse a que no hubo una digestión completa de la pared celular, pero también altas concentraciones de enzimas junto a tiempos prolongados, pueden afectar el número de protoplastos y su viabilidad, como fue observado por Jadan y colaboradores (2004) y en el presente estudio.

En este trabajo el número de protoplastos máximo obtenido fue de aproximadamente  $2 \times 10^5$  / g de tejido fresco, que si se compara respecto a lo obtenido en otras especies de forestales, se ubica en los rangos esperados, ya que por ejemplo en cruces de *Populus trichocarpa x Pitiriasis alba* fue de  $1 \times 10^7$  protoplastos /g (Guo et al., 2012), cruces de *Populus deltoides x Populus euramericana* produjeron  $1 \times 10^8$  protoplastos /g (Tan et al., 2013) , en *Robinia pseudoacacia* se logró aislar  $9,45 \times 10^5$  protoplastos/g (Kanwar et al ., 2009), y en la planta modelo no leñosa *Arabidopsis thaliana* se logró aislar  $1 \times 10^7$  protoplastos/ g (Yoo et al., 2007) . El rendimiento fue incluso superior a lo obtenido en maracuyá (*Passiflora edulis*) para el cual el mejor tratamiento para el aislamiento de protoplastos fue celulasa al 1% y macerozima al 0,4% en cotiledones con un rendimiento de  $9,2 \times 10^3$  protoplastos/g (Rivera, 2004).

Ya que la melina (*Gmelina arborea* Roxb) no contaba con protocolos reportados para el aislamiento de protoplastos, se empleó un diseño con un rango variable amplio de concentraciones, sobre la base del trabajo de Lin y colaboradores (2014) en álamo. De acuerdo a nuestros resultados el tratamiento óptimo fue la combinación de celulasa al 1,5 % y macerozima al 0,5%, bastante parecido con el tratamiento óptimo para álamo. La diferencia se encuentra en el tiempo de incubación, ya que en álamo se aislaron protoplastos en 20 min y en melina el mejor tiempo de aislamiento fue considerablemente superior (10 horas). Esto puede deberse a diferencias en la composición de todas las paredes vegetales entre las dos especies, y a la diferencia de explante utilizado, ya que en álamo se emplearon tallos y en nuestro trabajo empleamos hojas. En el aislamiento de protoplastos a partir de tallos de *Populus* realizado por Guo y colaboradores (2012), se obtuvieron resultados más similares a los obtenidos en nuestro trabajo en donde el tratamiento óptimo fue celulasa R10 al 3% y Macerozima R10 al 0,8% con un tiempo de 5 horas.

Aun cuando el número de protoplastos obtenidos en el presente estudio fue inferior lo obtenido en otras especies forestales, este trabajo constituye el primer reporte de aislamiento de protoplastos en melina, demostrando que es viable su uso y optimización futura en mejoramiento.

## 8 CONCLUSIONES

El explante con mayor potencial morfogénico fue el nudo cotiledonar, siendo el único explante en generar brotes múltiples (4,25 brotes por explante en promedio) por medio de organogénesis directa e indirecta.

Los tratamientos BAP 2,2 uM y AIA 0,7 uM y BAP 4,4 uM en medio MS con glucosa al 3% fueron óptimos para la regeneración *in vitro* de melina, obteniéndose brotes múltiples en tiempos muy cortos (5 a 14 días), lo cual hace viable el uso de este eficiente protocolo de regeneración *in vitro* en futuros desarrollos de transformación genética para melina.

El tratamiento de auxinas óptimo para enraizamiento *in vitro* de brotes de melina fue AIB a 14,7 uM en concordancia con reportes previos, complementando la eficiencia del protocolo de regeneración *in vitro* logrado en este estudio.

En el presente estudio se logró obtener el primer reporte para aislamiento de protoplastos de *Gmelina arborea*, a partir de explantes foliares de plantas micropropagadas. Las concentraciones óptimas para el aislamiento de protoplastos viables fueron Celulasa R10 al 1,5% y Macerozima R10 al 0,5%, a las 10 horas.



## 9 BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, C.C. 2012. El micro propagación en especies forestales. Ciencia actual- Vol 1. Numero 2 Julio/Diciembre 2011 ISSN 2248-468x
- Adobkar, I.M. Saad y Ahmed, M. Elshahed. 2012. Plant tissue culture media. Annarita Leyva and Laura M.R. Rinaldi (ed) In: Recent advances in plant in vitro culture. ISBN 978-953-51-0787-3
- Aguilar, M; Melgarejo, L.M.;Romero, M. 2012. FITOHORMONAS. Laboratorio de fisiología y bioquímica vegetal. Departamento de biología. Universidad Nacional de Colombia
- Ahuja, M.R. 1983. Protoplast Research in Woody plants. Federal research center for forestry and forest products. Institute of forest genetics and forest tree breeding.
- Alvarez, M.J; Beltran, D.P.; Mesa, N.L. 2011. Evaluación de reguladores de crecimiento vegetal en la organogénesis de *Gmelina arborea* Roxb. Revista Tumbaga 2011/6/107-124.
- Alves, C., Quecini, V. and Viera, M. 1999. Plant transformation: Advances and Perspectives. *Scientia Agricola* 56 (1): 1-8.
- Andreu, P.; Arbeloa, A.; Terrén, N. y Marín, J.A. 2009. Aislamiento y cultivo de protoplastos del patrón ciruelo ‘Mariana 2624’ (*Prunus cerasifera* Ehrh x *P. munsoniana* W. Wight & Hedrick). Estación Experimental de Aula Dei (CSIC). Avda Montañana 1005, 50059 Zaragoza.
- Ayala, D.I. 2007. Tesis “Regeneración de plantas de tabaquillo *Nicotiana glauca* a partir de protoplastos”. Universidad San Francisco de Quito.
- Behera. P.R., Nayak. P., Thirunavoukkarasu. M. & S.B. Sahoo. 2008. Plant regeneration of *Gmelina arborea* Roxb. From cotyledonary node explants. *Indian J. Plant Physiol.* 13: 3:258-265.
- Botero, C.; Restrepo, C., & Urrea, A. I. 2011. Respuesta de tres genotipos de tomate al cultivo in vitro y aislamiento de protoplastos. *Actualidades Biológicas*, 33(94), 35-49. Retrieved December 05, 2014, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-35842011000100003&lng=en&tlng=es.](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-35842011000100003&lng=en&tlng=es.) .

- Cardoza, V.2005. Tissue culture: the manipulation of plant development. Chapter 5. Book Plant biotechnology and genetics. Principles, techniques and applications.(2005) ed. Stewart, C.N.
- Carrizosa, M.; Ramírez, C.; Guerrero, E.;Santamaría, L. y Hodson, E. 1994. Cultivo de tejidos para la propagación y mejoramiento de especies forestales. Memorias III Congreso de Especies Forestales,Bogotá, Universidad Javeriana,p547-559
- Castro, D.; Díaz, J. y Murillo, M. 1999. Estrategias de trabajo para la multiplicación clonal in vitro de árboles adultos de Teca (*Tectona grandis*), Melina (*Gmelina arborea*) y Roble (*Tabebuia rosea*). Universidad Católica de Oriente, Rionegro, p16- 51
- Chawla, H. 2002. Introduction to Plant Biotechnology. {Electronic version}India: Science Publisher. Extraído el 25 de mayo, 2010, de:<http://books.google.com.ec/books?id=RgQLISN8zT8C&pg=PA87&dq=protoplasts+isolation&cd=1#v=onepage&q=protoplasts%20isolation&f=false>
- Chothani, D.L & Patel, N.M. 2012. Preliminary phytochemical screening, pharmacognostic and physicochemical evaluation of leaf of *Gmelina arborea*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine (2012)S1333-S1337.
- Cocking, E. & Pojnar, E. 1969. An electron microscope study of the infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus. Genetics of virology: 4: 305-312
- Cuadrado, M. 1985. Influencia del tamaño del endocarpo de *Gmelina arborea* Roxb. en el crecimiento inicial fase de vivero en Pavones, Turrialba, Costa Rica. Centro agronómico tropical de investigación de enseñanza (CATIE).
- Davey, M.R.; Anthony, P.;J. Power,J.P.; Lowe, K.C. 2005. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. Biotechnology Advances 23 (2005) 131–171
- Dhakulkar. S., Bhargava. S., Ganapathi. T.R. & V.A. Bapat. 2005. Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. Using *Agrobacterium rhizogenes* and production of verbascoside in hairy roots. Plant Science 169:5:812-818.

- Díaz, M.; Zappacosta, D.; Franzone, P.; Ríos, R. 2004. Transformación genética. En: Echenique, V., Rubinstein, C. y Mroginski, L. (Ed). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ediciones INTA, Buenos Aires, p109-123.
- Dvorak, W.S. 2004. World view of *Gmelina arborea*: opportunities and challenges. *New Forest* 28: 111-126.
- FAO. Evaluación de los recursos forestales mundiales, 2000. Documento forestal FAO No. 140. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia. 2002
- Gamboa, J. & Aldenour, A. 1999. Micropropagación de Melina (*Gmelina arborea* ROBX). *Agronomía Costarricense* 23:69-76.
- Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A., and Vasil, I. K. (1976) Plant tissue culture media. *In Vitro* 12, 473–478.
- Gaspar, T.; Kevers, C.; Penel, C.; Greppin, H.; Reid, D.M.; Thorpe, T.A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 32:272-289, October-December 1996 Society for In Vitro Biology.
- Guo, J.; Morrell-Falvey, J.L; Labbe, J.L.; Muchero, W.; Kalluri, U.C. 2012. Highly Efficient Isolation of Populus Mesophyll Protoplasts and Its Application in Transient Expression Assays. *PLoS ONE* 7(9): e44908. doi:10.1371/journal.pone.0044908
- Gutiérrez, A., Santacruz, F., Cabrera, J., y Rodríguez, B. 2003. Mejoramiento genético vegetal in vitro. *e-Gnosis* 1: 1-19.
- Hussain, A.; Ahmed Qarshi, I.; Nazir, H.& Ullah, I. 2012. Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. <http://dx.doi.org/10.5772/50568>
- Jadan, M., Guevara, E., y Jimenez, V.M. 2004. Efecto de concentraciones enzimáticas y tiempos de digestión en el aislamiento de protoplastos a partir de callos y cultivos en suspensión de dos cultivares de naranja dulce (*Citrus sinensis* OSB). *Rev. Agr. Trop.* 34:41-5.
- Jain, S. M. Newton, R. J. 1988 Proto-variation in protoplast derived Brassica napus plants; in *Progress in plant protoplast research* (eds) K. J. Puite, J. J M. Dons, H. J Huizing, A. J Kool, M. Koornneef

- Jain, S. M. 1997. Creation of variability by mutation and tissue culture in improving plants; Acta Hort.(in press).
- Kannan, V.R. Jasrai, Y.T.1996. Micropropagation of *Gmelina arborea*. Plant cell Tiss and Org Cult, 46: 269-271.
- Kijkar, S. 2012. *Gmelina arborea* Roxb. Asociación de Naciones del Sudeste Asiático (ASEAN) Centro de Semillas Forestales, Tailandia
- Kok. R. 2012. A revision of the genus *Gmelina* (Lamiaceae). KEW BULLETIN VOL. 67: 293 Y 329 (2012)
- Lauridsen, E.B. & E.D. Kjaer, E.D. 2002. Provenance research in *Gmelina arborea* Linn., Roxb. A summary of results from three decades of research and a discussion of how to use them. *Published in International Forestry Review 4(1), 2002.*
- Lauridsen, E.B. 1986. *Gmelina arborea*, Linn. Seed Leaflet no. 6. Danida Forest Seed Centre, Humlebæk, Denmark.
- Leegood, R. & Walker, K. 1979. Isolation of protoplasts and chloroplasts from flag leaves of *Triticum aestivum*. Plant Physiol (63): 1212-1214
- Lin, Y.C.; Li, W.;Chen, H.; Li, Q.; Sun, Y.H.; Shi, R.;Lin, C.H.; Wang, J.P.; Chen, H.C.; Chuang, L.; Qu, G.Z.; , Sederoff, R.R. & Chiang,V.L.2014. A simple improved-throughput xylem protoplast system for studying wood formation. 2194 | VOL.9 NO.9 | 2014 | nature protocols. doi:10.1038/nprot.2014.147
- Linsmaier, E.M; Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol plant18:100-127.
- Litz, R.E & Jarret, R.L. 2004. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. Tropical research institute of food and agricultural sciences, University of Florida, homestead,Floridas, E.U.
- Madke, S.S.; Cherian, K.J.; Badere, R.S. 2012. A modified Murashige and Skoog medio for efficient multiples shoot induction in *G. arborea* Roxb. Journal of forestry. Research. DOI 10.1007/s 11676-014-0449-
- Mariño, Y.A. Rodríguez, M.A. 2010. El punto de marchitez permanente (PMP) en melina (*Gmelina arborea* L. Roxb) para la Costa Caribe colombiana ¿una

característica para la selección de clones?. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* (2010) 11(2), 116 -121.

- Marum, C.M. & Marum, L. 2011. An epigenetic view of plants cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 62, No. 11, pp. 3713–3725, 2011 doi:10.1093/jxb/err155 Advance Access publication 26 May, 2011.
- Mathur, J. & Koncz, C. 2005. Callus and culture regeneration. *Methods in molecular biology*, Vol. 82: Arabidopsis Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ
- Melcher G. and G. Labib. 1974. Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. *Molecular and General Genetics MGG* 31, XII, 4: 277-294.
- Moya, R. 2004. *Gmelina arborea* en Costa Rica. BOIS ET FORÊTS DES TROPIQUES, 2004, N° 279 (1).
- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and BioAssays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Murillo, O. 2004. Calidad y valoración de plantaciones forestales. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, p7-9
- Nadgauda, R. 1999. Application of tissue culture in clonal forestry programme. *Proceedings International Tree Biotechnology Meeting*, India, p4-8
- Naik. D., Vartak. & S. Bhargava. 2003. Provenance- and subculture-dependent variation during micropropagation of *Gmelina arborea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 73: 189–195.
- Nakamura. S.K. & Y. Ide. 1999. Clonal propagation of *Gmelina arborea* Roxb. by in vitro culture. *J. For. Res.* 4:47-51
- Obregón. C. 2005. *Gmelina arborea* versatilidad, renovación y productividad sostenible para el futuro. *Revista El Mueble y La Madera*, Edición especial
- Orwa, C.; Mutua, A.; Kindt. R.; Jamnadass, R.; Simons, A. 2009. Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0 (<http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>)
- Osorio, J.A.; Bustamante, E.E.; Macareno, M.M.; Hernandez, E.J.; Beltran, J.D. 2010. Aislamiento enzimático de protoplastos a partir de mesófilo de dioscorea

alata cultivar “Pico de Botella”. TEMAS AGRARIOS - Vol. 15:(1) Enero - Junio 2010 (58 - 70).

- Perez, R.M. Gomez, A. 2012. *In vitro* Tissue Culture, a Tool for the Study and Breeding of Plants Subjected to Abiotic Stress Conditions. <http://dx.doi.org/10.5772/50671>
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. España: Mundiprensa.
- Puite, K. 1992. Progress in plant protoplast research. *Physiologia plantarum* (85): 403-410.
- Punitha, D.; Thandavamoortly, A.; Arumugasamy, K.; Suresh, N.S; Danya, U.; Udhayasankar, R.M. 2012. Anti-hyperlipidemic effect of ethanolic leaf extract of *gmelina arborea* in streptozotocin induced male wistar albino rats. *International Journal of Life science of Pharma Research*, Vol 2/Issue 3/Jul-Sept 2012. ISSN 2250-0480.
- Rao, K.S. Prakash, A.H. 1995. A simple method for the isolation of plant protoplasts. *J. Biosci.*, Vol. 20, Number 5, December 1995, pp 645-655. © Printed in India.
- Riofrío, L.A.; Arias, A.S.; Arahana V.S.; Torres, M.L. 2012. Regeneración de plantas de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) a partir de protoplastos. Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, USFQ.
- Rivera, R. y Perea, M. 2004. Aislamiento y cultivo de protoplastos en maracuyá. *Acta biológica colombiana*. Vol 9, No.2.
- Roca. W.M. & Mroginski. L.A. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. ISBN 95B-9183-15-8.
- Rodríguez, F; Aguilar, D; Roque, R; Montoya, A; Gamboa. O; Arguedas, M. 2004a. Manual para productores de melina *gmelina arborea* en costa rica.
- Rodríguez, R; Dallos, M. 2004b. Aislamiento y cultivo de protoplastos en maracuyá. *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 9 No. 2, 2004 35

- Rohit. K; Patel. V; Chakraborty. M & Kamath, J. 2012. Phytochemical and pharmacological profile of *Gmelina arborea* an overview. International research journal of pharmacy. ISSN 2230-8407.
- Rojas, A.; Moreno, L; Melgarejo, L. M; Rodríguez M. 2012. Physiological response of *gmelina* (*Gmelina arborea* Roxb.) to hydric conditions of the colombian Caribbean. Agronomía Colombiana, vol. 30, núm. 1, enero-abril, 2012, pp. 52-58.
- Rosero, C.; Argout, X.; Ruiz, M.; Teran, W. 2011. A drought stress transcriptome profiling as the first genomic resource for white teak - Gamhar - (*Gmelina arborea* Roxb) and related species. Rosero et al. BMC Proceedings 2011, 5(Suppl 7):P178 <http://www.biomedcentral.com/1753-6561/5/S7/P178>.
- Russell, J.A & McCown., B.H. 1986. Culture and regeneration of *populus* leaf protoplasts isolated from non-seedling tissue. *Plant Science*, 46 (1986)133 -142 Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.
- Schenck, R.U; Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50:199-204.
- Smith, R. 2012. Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments. USA 3rd edition.
- Suarez, I.E.; Jarma, A.J.; Avila M. 2006. Desarrollo de un protocolo para propagación in vitro de roble (*Tabebuia rosea* bertol dc). TEMAS AGRARIOS - Vol. 11:(2), Julio - Diciembre 2006 (52 - 62)
- Sukartiningsih, N.;Ide, K.1999.Clonal propagation of *Gmelina arborea* Roxb. by in vitro culture. *J For Res*, 4: 47–51.
- Szabados,L. 2004. Aislamiento de protoplastos.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2006. Fisiología vegetal. Vol. 2. Edición Universitata Jaume. España.
- Teixeira, S.J.A. 2003. Chrysanthemum: advances in tissue culture, cryopreservation, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology. *Biotechnology Advances* 21: 715-766.

- Thorpe, T.A.2014. History of Plant Tissue Culture. Methods in Molecular Biology, vol. 318: Plant Cell Culture Protocols, Second Edition Edited by: V. M. Loyola-Vargas and F. Vázquez-Flota © Humana Press Inc., Totowa, NJ
- Town, M.H.; Thummala C.; Ghanta, R.G. 2008. Micropropagation of *Sterculiaurens Roxb.*, an endangered tree species from intact seedlings. African Journal of Biotechnology, 7: 095–101.
- Ulloa, M.A.; Jadan, M. 2003. Aislamiento, Purificación y Fusión de Protoplastos de Babaco (*V. heilbornii*) y jigacho (*V. stipulata*). *EIDOS*
- Vasil, I. & Thorpe, T. (1998). Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer academic publisher: Países Bajos
- White, P. R. (1934) .Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.* 9, 585–600.
- Yepes, A. (2006). Revigorización y establecimiento in-vitro de Gmelina arborea Roxb.V. Mediante cultivo de tejidos vegetales. Colombia Forestal, 2006-12-00 vol:9 nro:19 pág:70-87
- Yildiz, M. 2012. The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture: High Frequency Shoot Regeneration. <http://dx.doi.org/10.5772/51097>
- Zolman, B.K.; Martinez, N.; Millius, A.; Adham, A.R.; Bartel, B. (2008). «Identification and characterization of Arabidopsis indole-3-butyric acid response mutants defective in novel peroxisomal enzymes» (en inglés). *Genetics* 180 (1): pp. 237–251.



## ANEXOS

**Anexo 1.** Prueba de normalidad para nudo cotiledonar respecto a diferentes fitorreguladores.

		Pruebas de normalidad <sup>a</sup>					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>b</sup>			Shapiro-Wilk		
	tratamiento	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Nºbrotes	BAP2,2	,298	4	.	,849	4	,224
	BAP 2,2- AIA0,7	,214	4	.	,963	4	,798
	BAP 2,2 - AIA 1,4	,441	4	.	,630	4	,001
	BAP 3,3	,303	4	.	,791	4	,086
	BAP 3,3 - AIA 0,7	,303	4	.	,791	4	,086
	BAP 3,3 - AIA 1,4	,353	4	.	,744	4	,034
	BAP 4,4	,288	4	.	,887	4	,369
	BAP 4,4 - AIA 0,7	,441	4	.	,630	4	,001
	BAP 4,4 - AIA 1,4	,260	4	.	,827	4	,161

**Anexo 2.** Homogeneidad de varianzas para nudo cotiledonar respecto a diferentes concentraciones de fitorreguladores.

### Prueba de homogeneidad de varianzas

Nbrotes

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,366	9	30	,037

**Anexo 3.**prueba de tukey para nudo cotiledonares.

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: N°brotes

HSD Tukey

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
control	BAP2,2	-1,2500	1,47479	,997	-6,2808	3,7808
	BAP 2,2- AIA0,7	-4,2500	1,47479	,155	-9,2808	,7808
	BAP 2,2 - AIA 1,4	-2,5000	1,47479	,790	-7,5308	2,5308
	BAP 3,3	-2,5000	1,47479	,790	-7,5308	2,5308
	BAP 3,3 - AIA 0,7	-3,2500	1,47479	,476	-8,2808	1,7808
	BAP 3,3 - AIA 1,4	-3,7500	1,47479	,287	-8,7808	1,2808
	BAP 4,4	-4,2500	1,47479	,155	-9,2808	,7808
	BAP 4,4 - AIA 0,7	-1,7500	1,47479	,969	-6,7808	3,2808
	BAP 4,4 - AIA 1,4	-3,0000	1,47479	,584	-8,0308	2,0308
	BAP2,2	control	1,2500	1,47479	,997	-3,7808
BAP 2,2- AIA0,7		-3,0000	1,47479	,584	-8,0308	2,0308
BAP 2,2 - AIA 1,4		-1,2500	1,47479	,997	-6,2808	3,7808
BAP 3,3		-1,2500	1,47479	,997	-6,2808	3,7808
BAP 3,3 - AIA 0,7		-2,0000	1,47479	,931	-7,0308	3,0308
BAP 3,3 - AIA 1,4		-2,5000	1,47479	,790	-7,5308	2,5308
BAP 4,4		-3,0000	1,47479	,584	-8,0308	2,0308
BAP 4,4 - AIA 0,7		-,5000	1,47479	1,000	-5,5308	4,5308
BAP 4,4 - AIA 1,4		-1,7500	1,47479	,969	-6,7808	3,2808

BAP 2,2- AIA0,7	control	4,2500	1,47479	,155	-,7808	9,2808
	BAP2,2	3,0000	1,47479	,584	-2,0308	8,0308
	BAP 2,2 - AIA 1,4	1,7500	1,47479	,969	-3,2808	6,7808
	BAP 3,3	1,7500	1,47479	,969	-3,2808	6,7808
	BAP 3,3 - AIA 0,7	1,0000	1,47479	,999	-4,0308	6,0308
	BAP 3,3 - AIA 1,4	,5000	1,47479	1,000	-4,5308	5,5308
	BAP 4,4	,0000	1,47479	1,000	-5,0308	5,0308
	BAP 4,4 - AIA 0,7	2,5000	1,47479	,790	-2,5308	7,5308
	BAP 4,4 - AIA 1,4	1,2500	1,47479	,997	-3,7808	6,2808
	BAP 2,2 - AIA 1,4	control	2,5000	1,47479	,790	-2,5308
BAP2,2		1,2500	1,47479	,997	-3,7808	6,2808
BAP 2,2- AIA0,7		-1,7500	1,47479	,969	-6,7808	3,2808
BAP 3,3		,0000	1,47479	1,000	-5,0308	5,0308
BAP 3,3 - AIA 0,7		-,7500	1,47479	1,000	-5,7808	4,2808
BAP 3,3 - AIA 1,4		-1,2500	1,47479	,997	-6,2808	3,7808
BAP 4,4		-1,7500	1,47479	,969	-6,7808	3,2808
BAP 4,4 - AIA 0,7		,7500	1,47479	1,000	-4,2808	5,7808
BAP 4,4 - AIA 1,4		-,5000	1,47479	1,000	-5,5308	4,5308
BAP 3,3		control	2,5000	1,47479	,790	-2,5308
	BAP2,2	1,2500	1,47479	,997	-3,7808	6,2808
	BAP 2,2- AIA0,7	-1,7500	1,47479	,969	-6,7808	3,2808
	BAP 2,2 - AIA 1,4	,0000	1,47479	1,000	-5,0308	5,0308
	BAP 3,3 - AIA 0,7	-,7500	1,47479	1,000	-5,7808	4,2808
	BAP 3,3 - AIA 1,4	-1,2500	1,47479	,997	-6,2808	3,7808
	BAP 4,4	-1,7500	1,47479	,969	-6,7808	3,2808

	BAP 4,4 - AIA 0,7	,7500	1,47479	1,000	-4,2808	5,7808
	BAP 4,4 - AIA 1,4	-,5000	1,47479	1,000	-5,5308	4,5308
BAP 3,3 - AIA 0,7	control	3,2500	1,47479	,476	-1,7808	8,2808
	BAP2,2	2,0000	1,47479	,931	-3,0308	7,0308
	BAP 2,2- AIA0,7	-1,0000	1,47479	,999	-6,0308	4,0308
	BAP 2,2 - AIA 1,4	,7500	1,47479	1,000	-4,2808	5,7808
	BAP 3,3	,7500	1,47479	1,000	-4,2808	5,7808
	BAP 3,3 - AIA 1,4	-,5000	1,47479	1,000	-5,5308	4,5308
	BAP 4,4	-1,0000	1,47479	,999	-6,0308	4,0308
	BAP 4,4 - AIA 0,7	1,5000	1,47479	,989	-3,5308	6,5308
	BAP 4,4 - AIA 1,4	,2500	1,47479	1,000	-4,7808	5,2808
BAP 3,3 - AIA 1,4	control	3,7500	1,47479	,287	-1,2808	8,7808
	BAP2,2	2,5000	1,47479	,790	-2,5308	7,5308
	BAP 2,2- AIA0,7	-,5000	1,47479	1,000	-5,5308	4,5308
	BAP 2,2 - AIA 1,4	1,2500	1,47479	,997	-3,7808	6,2808
	BAP 3,3	1,2500	1,47479	,997	-3,7808	6,2808
	BAP 3,3 - AIA 0,7	,5000	1,47479	1,000	-4,5308	5,5308
	BAP 4,4	-,5000	1,47479	1,000	-5,5308	4,5308
	BAP 4,4 - AIA 0,7	2,0000	1,47479	,931	-3,0308	7,0308
	BAP 4,4 - AIA 1,4	,7500	1,47479	1,000	-4,2808	5,7808
BAP 4,4	control	4,2500	1,47479	,155	-,7808	9,2808
	BAP2,2	3,0000	1,47479	,584	-2,0308	8,0308
	BAP 2,2- AIA0,7	,0000	1,47479	1,000	-5,0308	5,0308
	BAP 2,2 - AIA 1,4	1,7500	1,47479	,969	-3,2808	6,7808
	BAP 3,3	1,7500	1,47479	,969	-3,2808	6,7808

	BAP 3,3 - AIA 0,7	1,0000	1,47479	,999	-4,0308	6,0308
	BAP 3,3 - AIA 1,4	,5000	1,47479	1,000	-4,5308	5,5308
	BAP 4,4 - AIA 0,7	2,5000	1,47479	,790	-2,5308	7,5308
	BAP 4,4 - AIA 1,4	1,2500	1,47479	,997	-3,7808	6,2808
BAP 4,4 - AIA 0,7	control	1,7500	1,47479	,969	-3,2808	6,7808
	BAP2,2	,5000	1,47479	1,000	-4,5308	5,5308
	BAP 2,2- AIA0,7	-2,5000	1,47479	,790	-7,5308	2,5308
	BAP 2,2 - AIA 1,4	-,7500	1,47479	1,000	-5,7808	4,2808
	BAP 3,3	-,7500	1,47479	1,000	-5,7808	4,2808
	BAP 3,3 - AIA 0,7	-1,5000	1,47479	,989	-6,5308	3,5308
	BAP 3,3 - AIA 1,4	-2,0000	1,47479	,931	-7,0308	3,0308
	BAP 4,4	-2,5000	1,47479	,790	-7,5308	2,5308
	BAP 4,4 - AIA 1,4	-1,2500	1,47479	,997	-6,2808	3,7808
BAP 4,4 - AIA 1,4	control	3,0000	1,47479	,584	-2,0308	8,0308
	BAP2,2	1,7500	1,47479	,969	-3,2808	6,7808
	BAP 2,2- AIA0,7	-1,2500	1,47479	,997	-6,2808	3,7808
	BAP 2,2 - AIA 1,4	,5000	1,47479	1,000	-4,5308	5,5308
	BAP 3,3	,5000	1,47479	1,000	-4,5308	5,5308
	BAP 3,3 - AIA 0,7	-,2500	1,47479	1,000	-5,2808	4,7808
	BAP 3,3 - AIA 1,4	-,7500	1,47479	1,000	-5,7808	4,2808
	BAP 4,4	-1,2500	1,47479	,997	-6,2808	3,7808
	BAP 4,4 - AIA 0,7	1,2500	1,47479	,997	-3,7808	6,2808

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 4,350.

**Anexo 4.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos y viabilidad de protoplastos respecto a la concentración.

<b>Rangos</b>			
	<b>Concentraciones</b>	<b>N</b>	<b>Rango promedio</b>
<b>N°protoplastos</b>	cel0-maz0	30	32,00
	cel0,5-maz0,3	30	45,15
	cel1-maz0,4	30	77,92
	cel1,5-maz0,5	30	86,93
	Total	120	
<b>N°P.viables</b>	cel0-maz0	30	33,00
	cel0,5-maz0,3	30	46,50
	cel1-maz0,4	30	75,70
	cel1,5-maz0,5	30	86,80
	Total	120	

**Anexo 5.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos y viabilidad de protoplastos con respecto al tiempo.

<b>Rangos</b>			
	<b>tiempo</b>	<b>N</b>	<b>Rango promedio</b>
<b>N°protoplastos</b>	2horas	20	35,88
	4horas	20	56,13
	6horas	20	55,88
	8horas	20	67,90
	10horas	20	78,00
	12horas	20	69,23
	Total	120	
<b>N°P.viables</b>	2horas	20	37,13
	4horas	20	50,55
	6horas	20	56,60
	8horas	20	69,08
	10horas	20	78,45
	12horas	20	71,20
	Total	120	

**Anexo 6.** Prueba Duncan para número de protoplastos respecto a concentraciones enzimáticas.

**N°protoplastos / 80 mg de tejido fresco**

Duncan<sup>a,b</sup>

concentraciones	N	Subconjunto	
		1	2
cel0-maz0	30	0	
cel0,5-maz0,3	30	3833	
cel1-maz0,4	30		46875
cel1,5-maz0,5	30		66083
<b>Sig.</b>		,734	,091

**Anexo 7.** Prueba Duncan para número de protoplastos respecto a tiempo de incubación.

**N°protoplastos/ 80 mg de tejido fresco**

Duncan<sup>a,b</sup>

tiempo	N	Subconjunto		
		1	2	3
2horas	20	812,5		
4horas	20	13437,5	13437,5	
6horas	20	17687,5	17687,5	
8horas	20	26875	26875	
12horas	20		3837,	
10horas	20			78000
<b>Sig.</b>		,087	,102	1,000

**Anexo 8.** Prueba Duncan para número de protoplastos viables respecto a las concentraciones enzimáticas

**N° Protoplastos viables / 80 mg de tejido fresco**

Duncan<sup>a,b</sup>

concentraciones	N	Subconjunto		
		1	2	3
cel0-maz0	30	0		
cel0,5-maz0,3	30	3708		
cel1-maz0,4	30		44541,6	
cel1,5-maz0,5	30			64333,3
<b>Sig.</b>		,704	1,000	1,000

**Anexo 9.** Prueba Duncan para número de protoplastos viables respecto al tiempo de incubación.

**N°P.viables**

**Duncan a,b**

tiempo	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
2horas	20	812,5			
4horas	20	9312,5	9312,5		
6horas	20	17250	17250	17250	
8horas	20		26875	26875	
12horas	20			38375	
10horas	20				76250
<b>Sig.</b>		,198	,168	,097	1,000

**Anexo 10.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos y viabilidad de protoplastos respecto a la concentración enzimática.

**Rangos**

	concentraciones	N	Rango promedio
<b>N°protoplastos</b> <b>2</b>	cel0-maz0	30	21,50
	cel0,5-maz0,3	30	75,92
	cel1-maz0,4	30	68,23
	cel1,5-maz0,5	30	76,35
	Total	120	
<b>N°viables2</b>	cel0-maz0	30	22,50
	cel0,5-maz0,3	30	75,20
	cel1-maz0,4	30	70,85
	cel1,5-maz0,5	30	73,45
	Total	120	



**Anexo 11.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos y viabilidad de protoplastos respecto al tiempo de incubación.

<b>Rangos</b>			
	<b>tiempo</b>	<b>N</b>	<b>Rango promedio</b>
<b>N°protoplastos</b> <b>2</b>	hora2	20	28,78
	hora4	20	43,90
	hora6	20	57,48
	hora8	20	72,73
	hora10	20	80,23
	hora12	20	79,90
	Total	120	
<b>N°viables2</b>	hora2	20	30,33
	hora4	20	42,85
	hora6	20	59,40
	hora8	20	74,63
	hora10	20	78,43
	hora12	20	77,38
	Total	120	

**Anexo 12.** Prueba de Duncan para número de protoplastos respecto a concentraciones enzimáticas.

**Duncan<sup>a,b</sup> Número de protoplastos / 80 mg de tejido fresco**

<b>concentraciones</b>	<b>N</b>	<b>Subconjunto</b>		
		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>cel0-maz0</b>	30	0		
<b>cel1-maz0,4</b>	30		123541,6	
<b>cel0,5-maz0,3</b>	30		170291,6	170291,6
<b>cel1,5-maz0,5</b>	30			211625
<b>Sig.</b>		1,000	,104	,150

**Anexo 13.** Prueba de Duncan para número de protoplastos respecto al tiempo de incubación.

**N°protoplastos / 80 mg de tejido fresco**

Duncan<sup>a,b</sup>

tiempo	N	Subconjunto		
		1	2	3
hora2	20	2437,5		
hora4	20	17125		
hora6	20	61875		
hora8	20		180812,5	
hora12	20		241437,5	241437,5
hora10	20			254500
<b>Sig.</b>		,111	,086	,709

**Anexo 14.** Prueba Duncan para número de protoplastos viables respecto a concentraciones enzimáticas.

**N° protoplastos viables / 80 mg de tejido fresco**

Duncan<sup>a,b</sup>

concentraciones	N	Subconjunto	
		1	2
cel0-maz0	30	0	
cel1-maz0,4	30		106208,3
cel0,5-maz0,3	30		107458,3
cel1,5-maz0,5	30		125625
<b>Sig.</b>		1,000	,529

**Anexo 15.** Prueba Duncan para número de protoplastos viables respecto al tiempo de incubación.

**N° de protoplastos viables / 80 mg de tejido fresco**

Duncan<sup>a,b</sup>

tiempo	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
hora2	20	2250,0000			
hora4	20	9750,0000	9750,0000		
hora6	20		79250,0000	79250,0000	
hora8	20			110750,0000	110750,0000
hora12	20			135812,5000	135812,5000
hora10	20				171125,0000
<b>Sig.</b>		,832	,051	,133	,109

**Anexo 16.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos y viabilidad de protoplastos respecto a la concentración enzimática.

<b>Rangos</b>			
	<b>concentraciones</b>	<b>N</b>	<b>Rango promedio</b>
<b>N°protoplastos3</b>	cel0-maz0	30	24,50
	cel0,5-maz0,3	30	49,72
	cel1-maz0,4	30	78,38
	cel1,5-maz0,5	30	89,40
	Total	120	
<b>N°viables3</b>	cel0-maz0	30	25,00
	cel0,5-maz0,3	30	49,12
	cel1-maz0,4	30	75,68
	cel1,5-maz0,5	30	92,20
	Total	120	

**Anexo 17.** Prueba de Kruskal Wallis para número de protoplastos y viabilidad de protoplastos respecto al tiempo de incubación.

<b>Rangos</b>			
	<b>tiempo</b>	<b>N</b>	<b>Rango promedio</b>
<b>N°protoplastos3</b>	hora2	20	38,78
	hora4	20	55,10
	hora6	20	60,15
	hora8	20	63,25
	hora10	20	71,53
	hora12	20	74,20
	Total	120	
<b>N°viables3</b>	hora2	20	40,23
	hora4	20	57,83
	hora6	20	64,35
	hora8	20	61,88
	hora10	20	69,25
	hora12	20	69,48
	Total	120	

**Anexo 18.** Prueba de Duncan para el número de protoplastos respecto a la concentración enzimática.

**N°protoplastos3**

Duncan<sup>a,b</sup>

concentraciones	N	Subconjunto		
		1	2	3
cel0-maz0	30	0		
cel0,5-maz0,3	30	78750		
cel1-maz0,4	30		204062,5	
cel1,5-maz0,5	30			327250
<b>Sig.</b>		,060	1,000	1,000

**Anexo 19.** Prueba de Duncan para el número de protoplastos respecto al tiempo de incubación.

**N°protoplastos / 80 mg de tejido fresco**

Duncan<sup>a,b</sup>

tiempo	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
hora2	20	19062,5			
hora4	20	74687,5	74687,5		
hora6	20		145875,1	145875,1	
hora8	20		180000	180000	180000
hora10	20			236718,7	236718,7
hora12	20				258750
<b>Sig.</b>		,275	,051	,093	,146

**Anexo 20.** Prueba Duncan para número de protoplastos viables respecto a concentraciones enzimáticas en la réplica técnica 3.

**N° de protoplastos viables / 80 mg de tejido fresco**

Duncan<sup>a,b</sup>

concentraciones	N	Subconjunto		
		1	2	3
cel0-maz0	30	0		
cel0,5-maz0,3	30	43583,3		
cel1-maz0,4	30		130041,6	
cel1,5-maz0,5	30			258673
<b>Sig.</b>		,145	1,000	1,000

**Anexo 21.** Prueba Duncan para número de protoplastos viables respecto a tiempo de incubación.

**N°viables3**

Duncan<sup>a,b</sup>

tiempo	N	Subconjunto		
		1	2	3
hora2	20	17187,5000		
hora4	20	64375,0000	64375,0000	
hora8	20		113134,5500	113134,5500
hora12	20		135625,0000	135625,0000
hora6	20		136875,0000	136875,0000
hora10	20			181250,0000
Sig.		,198	,071	,090