



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1379(Coordenação) / (35) 3299-1392 (Secretaria)
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



César Alfredo Valenzuela Sandoval

Cultivo *in vitro* de callos de Jequitibá-rosa del sur de Minas Gerais

Alfenas-MG, janeiro de 2019

César Alfredo Valenzuela Sandoval

Cultivo *in vitro* de callos de Jequitibá-rosa del sur de Minas Gerais

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas -UNIFAL-MG. Área de concentração: Tecnologias Ambientais Aplicadas

Orientador: Prof. Dr. Breno Régis Santos

Colaboradores: João Marcos Martins Ferreira



CÉSAR ALFREDO VALENZUELA SANDOVAL

“Cultivo *in vitro* de callos de Jequitibá-rosa del sur de Minas Gerais Alfenas-MG”

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Aprovado em: 18 de janeiro de 2019.

Prof. Dr. Breno Régis Santos
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. Dr. Wellington Marota Barbosa
Instituição: IFSULDEMINAS

Assinatura:

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

*Dedico este trabajo a mis padres,
hermanos, amigos y a cada una de
esas personas que fueron parte de
esta aventura.*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, la cual siempre me ha brindado el apoyo y la fuerza para cumplir las metas que me he propuesto en la vida.

A esos amigos que fui conociendo en este pasar por Brasil, que con el tiempo se tornaron en hermanos.

A Carolina y Cristian por estar siempre ahí para mí, por la paciencia que tuvieron conmigo y por los miles de momentos que vivimos juntos los cuales nunca olvidare.

A Cindy por entregarme esa energía de que somos capaces de mucho más y que siempre lo podemos lograr con dedicación y paciencia.

A Luiza por abrirme las puertas de su casa y de su corazón, muchas gracias.

A todos mis amigos del BIOGEN que siempre me aconsejaron y ayudaron a sacar este trabajo a delante y por todos esos momentos vividos.

A mi orientador Breno Régis Santos quien confió en mí y quien manifiesto siempre sus ganas de ayudar independiente de lo que fuera, muchas gracias.

Al programa PAEC OEA-GCUB por la oportunidad de hacer esta maestría en Brasil y por el financiamiento.

A la UNIFAL-MG y al programa de pos-graduación PPGCA por dejarme ser parte de este grupo.

Aos guardiões e guardiãs da visão – os de ontem, que desbravaram o caminho para um mundo tornado inteiro; os de hoje, multidões que o levam adiante; e os de amanhã viajantes que talvez avistem o destino.

(Raskin, 2018)

RESUMO GERAL

A atividade humana levou à fragmentação generalizada de habitats, alterando a estrutura, distribuição e funcionalidade de espécies nativas, como Jequitiba-rosa. Espécie com grande potencial no setor florestal, devido à diversidade de usos que sua madeira tem; atualmente é classificada como vulnerável segundo a IUCN. Hoje estima-se que exista um número limitado de habitats naturais para esta espécie, com uma densidade populacional inferior a 1 árvore ha⁻¹. Nos últimos séculos a madeira desta espécie tem sido explorada, devido à qualidade e às grandes dimensões que tem. A propagação de Jequitibá-rosa no Brasil se dá por sementes, o que limita a disponibilidade de mudas e o repovoamento dessa espécie. Portanto, esta pesquisa visa estabelecer um protocolo indutor de calogênese com a ideia de ser utilizado no futuro para a produção em massa de plantas e assim aumentar o número de indivíduos dessa espécie nos ecossistemas. Secções de folha foram induzidos em meio Woody Plant Medium (WPM) diluído pela metade, suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de ácido naftaleno acético (ANA) em conjunto com 3; 1; 1,5 e 3 mg L⁻¹ 6-benzilaminopurina (BAP), após 30 dias foi observado a formação de calos de cor castanha clara. Foram subcultivadas em meio WPM diluído pela metade, suplementado com 0,1 mg L⁻¹ de ANA simultaneamente com 4 e 8 mg L⁻¹ de BAP como meio de expressão de calogênese, observando aos 90 dias um calo de tamanho maior. O máximo crescimento de calos foi observado em maiores concentrações de BAP (8 mg L⁻¹).

Palavras-chave: *Cariniana legalis*, Lecythidaceae, 6-benzilaminopurina, ácido naftalenoacético.

RESUMEN GENERAL

La actividad humana ha dado lugar a una amplia fragmentación del hábitat, alterando la estructura, distribución y funcionalidad de especies nativas como, Jequitiba-rosa. Especie con un gran potencial en el sector forestal, por la diversidad de usos que tiene su madera y actualmente está catalogada como vulnerable según la IUCN. Hoy en día se estima que existe un número limitado de hábitats naturales para esta especie, con una densidad de poblacional menor a 1 árbol ha⁻¹. En los últimos siglos se ha explotado la madera de esta especie, debido a la calidad y a las grandes dimensiones que tiene. La propagación de Jequitibá-rosa en Brasil es por semillas, lo que limita la disponibilidad de plántulas y la repoblación de esta especie. Por ende este trabajo busca establecer un protocolo inductor de callogénesis con la idea de ser usado en un futuro para la producción de plantas en masa y así aumentar el número de individuos de esta especie en los ecosistemas. Se utilizaron secciones foliares, inducidas en medio Woody Plant Medium (WPM) diluido a la mitad, suplementado con 0,1 mg L⁻¹ ácido naftalenoacético (ANA) conjuntamente con 3; 1; 1,5 y 3 mg L⁻¹ 6-bencilaminopurina (BAP), observándose a los 30 días la formación de callos de color marrón claro. Fueron subcultivados en medio WPM diluido a la mitad, suplementados con 0,1 mg L⁻¹ de ANA simultáneamente con 4 y 8 mg L⁻¹ de BAP como medio de expresión de callogénesis observándose a los 90 días un callo de gran tamaño. Se observó mayor crecimiento de los callos en concentraciones mayores de BAP (8 mg L⁻¹).

Palabras claves: *Cariniana legalis*, Lecythidaceae, 6-bencilaminopurina, ácido naftalenoacético.

ABSTRACT

Human activity has led to widespread habitat fragmentation, altering the structure, distribution and functionality of native species such as *Jequitiba-rosa*. Species with a great potential in the forestry sector, due to the diversity of uses that its wood has and it is currently classified as vulnerable according to the IUCN. Today it is estimated that there is a limited number of natural habitats for this species, with a population density of less than 1 tree ha⁻¹. In the last centuries, the wood of this species has been exploited, due to the quality and the great dimensions that it has. The propagation of *Jequitibá-rosa* in Brazil is by seeds, which limits the availability of seedlings and the repopulation of this species. Therefore, this work seeks to establish a protocol of callogenesis with the idea of being used in the future for mass plants production and thus increase the number of individuals of this species in the ecosystems. Foliar sections were used, induced in half Woody Plant Medium (WPM) diluted in half, supplemented with 0.1 mg L⁻¹ naphthaleneacetic acid (ANA) in conjunction with 3, 1, 1.5 and 3 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP), being observed at 30 days the formation of calluses of light brown color. They were subcultured in medium WPM at medium force, supplemented with 0.1 mg L⁻¹ of ANA simultaneously with 4 and 8 mg L⁻¹ of BAP as a callogenesis 's means of expression , showing a large callus at 90 days. Greater growth of callus was observed in higher concentrations of BAP (8 mg L⁻¹).

Keywords: *Cariniana legalis*, Lecythidaceae, 6-benzylaminopurine, naphthaleneacetic acid.

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

IUCN	- Union for Conservation of Nature
GEI	- Gases de efecto invernadero
EGE	- Estructura genética espacial
ANA	- Acido naftalenoacético
AIA	- Acido indolacético
BAP	- 6-bencilaminopurina
WPM	- Woody plant medium
MS	- Murashige and Skoog
PVP	- Polivinilpirrolidona
CA	- Carmín acético
AE	- Azul de evans

SUMARIO

CAPÍTULO I.....	11
1. INTRODUCCION	12
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	13
2.1. Características de la especie.....	13
2.2. Distribución geográfica y condiciones edafo-climáticas.	14
2.3. Importancia ambiental.....	14
2.4. Germinación.....	15
2.5. Cultivo <i>in vitro</i>	15
2.6. Cultivo <i>in vitro</i> de especies forestales	16
2.7. Micropropagación	16
3. JUSTIFICATIVA.....	18
4. OBJETIVO.....	18
5. REFERENCIAS	18
CAPÍTULO II.....	21
1. INTRODUCCIÓN	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS	23
2.1. Localización y material vegetal.....	23
2.2. Desinfección de los explantes.....	24
2.3. Diferentes antioxidantes en el control de la oxidación de las hojas.....	24
2.4. Inducción de callos	24
2.5. Efectos de BAP y Cinetina en la iniciación de callos friables.....	25
2.6. Análisis de citoquímica	25
2.7. Diseño experimental.....	26
3. RESULTADOS.....	26
3.1. Antioxidantes en la oxidación de las hojas.....	26
3.2. Inducción de callos	27
3.3. Efectos del BAP y la Cinetina en la iniciación de callos friables	28
3.4. Análisis de citoquímica	30
4. DISCUSION.....	31
5. CONCLUSIONES	33
6. AGRADECIMIENTOS	33
7. REFERENCIAS	33

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCION

Los bosques son un ecosistema dinámico en donde comunidades vegetales, animales y microbianas interactúan como una unidad funcional. Los beneficios proporcionados por el bosque al ambiente, incluyen tanto bienes y servicios. Los bienes corresponden a productos procedentes de los ecosistemas (ej. madera) y de fuentes abióticas (ej. depósitos de minerales), mientras que los servicios son prestados principalmente por los ecosistemas. Los servicios que presta el bosque incluyen el almacenamiento temporal de aguas, la dilución y asimilación de residuos por los ríos, además del almacenamiento a largo plazo de gases de efecto invernadero (GEI) que alteran el clima (CONSTANZA *et al.*, 2006). Las emisiones de GEI, tales como dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O) son responsables del calentamiento global, del cual, el CO₂ es responsable de aproximadamente el 50 % del efecto de los GEI (BOWMAN, 1990), debido a esto es de gran importancia la conservación de los bosques.

La actividad humana ha dado lugar a una amplia fragmentación del hábitat, donde se ve alterada la estructura, distribución y funcionalidad de los ecosistemas terrestres (RIBEIRO *et al.*, 2009). Una de estas especies afectada por la fragmentación es *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze, considerado el mayor árbol de la Mata Atlántica y ampliamente distribuido en el Este de Brasil. Esta especie ha sufrido con la explotación sistemática de madera a lo largo de los últimos siglos, debido a la calidad y a las grandes dimensiones que tiene, en algunas localidades todavía acontecen estas explotaciones (MARTINELLI; MORAES, 2013). Según la International Union for Conservation of Nature - IUCN (2012), está incluida en la lista de especies en extinción, categorizada como vulnerable.

El cultivo *in vitro* puede ser una forma de obtener un gran número de plantas de forma asexual, convirtiéndose en una herramienta de gran valor cuando se trata de propagar especies vegetales en peligro de extinción (FLASCHLAND *et al.*, 1996). Técnica de gran importancia cuando se pretende multiplicar un genotipo que es heterocigoto y que presentan características de interés, que se pierden cuando son propagadas por semillas (DE CÁSSIA GONÇALVES *et al.*, 2011).

La embriogénesis somática y la organogénesis son dos procesos morfogénéticos muy frecuentes en el cultivo *in vitro* de especies vegetales. La embriogénesis somática es el proceso por el cual se obtiene una estructura similar al embrión cigótico sin que medie la fertilización de las gametos, mientras que por organogénesis pueden obtenerse tallos, raíces o flores (LEVITUS, 2010). Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de

células que, según las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división. A este grupo de células se les llama callo y a tal proceso se le denomina como callogénesis que es el resultante de células en constantes división por mitosis, como respuesta al estímulo de los balances entre reguladores de crecimiento y otros factores (TERMIGNONI, 2005).

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Características de la especie

La especie *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze, popularmente conocida como Jequitibá-rosa pertenece a la familia *Lecythidaceae*. Presenta un tronco típicamente columnar y puede alcanzar más de 30 a 50 m de altura y 4 m de diámetro, es de un fuste de gran tamaño, destacándose en medio de los árboles donde crecen. Son árboles semidecíduos, heliófilas, su tronco es revestido por una cáscara parda y fisurada (LORENZI, 2008). Además, *C. legalis* es una especie muy longeva, con individuos que pueden vivir más de 500 años y las subpoblaciones son en general, compuestas de varios individuos de gran porte, supuestamente muy antiguas (MARTINELLI; MORAES, 2013).

La madera es modernamente pesada y generalmente de color marrón-claro. La superficie es irregularmente lustrosa y ligeramente áspera al tacto, también tiene baja resistencia al ataque de organismos xilofagos, cuando se encuentra expuesta a condiciones adversas (RÊGO; POSSAMAI, 2001). La madera de Jequitibá tiene aplicaciones en la carpintería como laminados, fabricación de escobas como también en la industria de la celulosa y el papel. Según Chudnoff (1984), Rego y Possamai (2001), de la corteza se extrae resina, tanino que tiene gran poder desinfectante, siendo muy usada en la medicina popular contra las afecciones de la boca, inflamación de la garganta, amigdalitis y faringitis.

Es una planta características de la floresta climax, es rara en el cerrado o en terrenos más secos. Posee tolerancia moderada a la luz solar durante los primeros años y su crecimiento varía de moderado a rápido alcanzando 2 metros de altura en dos años (RÊGO, 2002; LORENZI, 2008). Florece durante los meses de diciembre - febrero, es de flores pequeñas, dispuestas en panículas axiliares y apicales. Sus flores son hermafroditas y polinizadas por abejas (CARVALHO, 2005).

Los frutos son de tipo pixidio, leñoso y comienzan a ser producidos a partir de los 20 años de edad y su maduración ocurre en el periodo de agosto - septiembre (RÊGO; POSSAMAI, 2001; CARVALHO, 2006). Para la obtención de semillas los frutos deben ser

cogidos directamente de los árboles cuando inician la abertura espontánea, después deben quedar al sol para completar la abertura y liberar las semillas. La dispersión de las semillas es zoocórica y anemocórica (CARVALHO, 2005).

2.2. Distribución geográfica y condiciones edafo-climáticas.

Jequitibá-rosa crece de forma natural en los siguientes estados: Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahía, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo y Mato Grosso do Sul (LORENZI, 2008; RODRIGUES, 2012; MARTINELLI; MORAES, 2013). En las latitudes, desde 7° S a 23° S, longitudes entre 35° y 49° W y a una altitud de 30 m a 1000 m. (CARVALHO, 2005).

Jequitibá-rosa crece en planicies y laderas húmedas, en el estrato superior de la formación bajo-montaña del bosque Ombrófilo-Denso de la Mata atlántica (RODRIGUES, 2012) y en la formación sub-montañosa, en el estado de Rio de Janeiro, en el bosque de Tabuleiro, en el norte de Espírito Santo (CARVALHO, 2006). En Minas Gerais y en la cuenca del Rio Paraná crece en formaciones de montaña, submontaña y en aluviales (LORENZI, 2008). También se encuentra en la región del cacao al sur de Bahía.

Las condiciones climáticas ideales para el crecimiento y desenvolvimiento de Jequitibá-rosa, es a una temperatura media entre los 25 y 35° C y precipitaciones de 1.500 mm al año (RÊGO; POSSAMAI, 2001). En regiones con temperaturas < 15° C no ocurre germinación, ni el crecimiento inicial de la planta.

Crece en suelos de origen arenoso y basáltico; laderas, suelos planos, húmedos, profundos, de buena fertilidad química con buen drenaje (CARVALHO, 2005). En plantaciones se prefiere suelos profundos de media y buena fertilidad química, ricos en materia orgánica, bien drenados y con textura franco arcillosa (RÊGO, 2001).

2.3. Importancia ambiental

Jequitibá-rosa es un árbol de amplia y globosa copa, en forma de guarda lluvia, con ramas horizontales, lo que permite el crecimiento de otras especies sobre sus ramas, como Orquídeas, Bromelias y Cactáceas (CARVALHO, 2005). Por tanto, tiene una gran importancia para la mantención de la diversidad y riqueza de especies epífitas, hospedando estas formas de vida en mayor abundancia y de forma exclusiva a diferencia de otras especies arbóreas (REIS; FONTOURA, 2009). Esto da paso a habitar una gran diversidad de insectos, aves, reptiles y primates que se alimentan y se reproducen en su copa (SANTOS, 2016).

En el sur de Minas Gerais, aun se pueden encontrar Jequitibá-rosa de tamaños considerablemente grandes en fragmentos de bosques remanentes. Se pueden encontrar

aisladas en medio de la matriz o en el centro de los fragmentos. La drástica disminución de la población por fragmentación es un problema importante ya que puede alterar la estructura de la genética espacial (EGE). Esto llevaría a la especie a un apareamiento entre individuos relacionados y a la deriva genética, como resultado de la reducción del número de individuos reproductivos (DICK *et al.*, 2008). Por esta razón es indispensable la reforestación de esta especie, para evitar que desaparezca por problemas de depresión endogámica y también para el manejo de fauna y flora (LORENZI, 2008).

2.4. Germinación

La germinación es epigea, ocurriendo entre los 8 - 45 días después de la siembra, teniendo una tasa de germinación de 28 a 70 % (RÊGO, 2001; CARVALHO, 2005; LORENZI, 2008). Rêgo y Possamai (2001), en estudios de germinación y desarrollo inicial de Jequitibá-rosa, afirman que las semillas son recalcitrantes y a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento (a partir de 30 días después de la colecta) la viabilidad de ellas disminuye significativamente. Por tanto el cultivo *in vitro* podría ser de gran ayuda a la hora de producir en masa mudas de Jequitibá-rosa.

Las temperaturas de 20 - 30° C, juntamente con los sustratos de vermiculita y suelo de bosque, además de luz blanca, son las condiciones más adecuadas para la germinación de semillas de Jequitibá-rosa, en laboratorio. Presenta mayor crecimiento en altura en condiciones de sombreado de 50 a 66% y mayor diámetro cuando hay condiciones de luminosidad directa de un 100% (RÊGO, 2001; RÊGO; POSSAMAI, 2006).

2.5. Cultivo *in vitro*

Algunas especies tienen ciertas dificultades en la producción de semillas o florecen intensamente produciendo pocas semillas, debido a diversos factores. Factores como la baja eficiencia en el transporte del polen o en especies zoófilas, como polinizadores poco especializados generando que pocos estigmas reserven el polen compatible; problemas con animales como monos y aves, que utilizan los recursos florales y compiten con los polinizadores, provocando una pérdida considerable de flores (DE CÁSSIA GONÇALVES *et al.*, 2011). Otros problemas son, la disminución en los polinizadores, el bajo número de individuos de la especie, la pequeña cantidad de semillas viables, la época de colecta y el proceso de colecta que en árboles altos requiere de técnicas de escalada (LORENZI, 2008; SANTOS, 2016).

El cultivo *in vitro* es un método de multiplicación asexual que se inició en 1963 con plantas herbáceas, como la propagación de orquídeas (*Cymbidium*, *Dendrobium*) a partir de los ápices de tallos. Luego, en 1978, se extendió a la producción de plantas leñosas, forestales y portainjertos de frutas. Es así como esta técnica surge como una alternativa entendible para la multiplicación de especies amenazadas, siendo de gran interés para la conservación de esta especie (ALVAREZ, 2011).

2.6. Cultivo *in vitro* de especies forestales

La necesidad del hombre de obtener recursos de los ecosistemas ha llevado a la humanidad a un gran problema que es la deforestación. La tala abusiva, los incendios forestales y el inadecuado manejo silvícola pueden conllevar a la desaparición de los bosques del planeta (LUJAN, 2003). Una de las estrategias para evitar la extinción de especies únicas, es el cultivo *in vitro* de tejido vegetal (DELGADO *et al.*, 2008).

La propagación *in vitro* incrementa de forma rápida el número de individuos, esta etapa es importante en la producción de plántulas a nivel industrial, ya que permite el establecimiento de un banco de germoplasma con fines de rescate (URIBE *et al.*, 2008). También esto permite obtener plantas sin enfermedades y en algunas ocasiones reduce el tiempo de propagación.

Una plantación forestal depende principalmente de la calidad de las plantas que se utilice. La calidad de las plantas va estar definida por su comportamiento final en terreno, el que está regulado por atributos tanto morfológicos como fisiológicos, por su interacción con el ambiente y la vía de propagación (JIMENEZ- TERRY; AGRAMINTE, 2013).

La micropropagación surge como una herramienta que va en contribución a mantener el equilibrio de los ecosistemas forestales y del medio ambiente ya que como herramienta de rescate permite la producción de plantas y la conservación de la biodiversidad genética y la innovación de procedimientos tecnológicos en los bosques tropicales (FARJON, 2003).

2.7. Micropropagación

Este método de cultivo o de micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (LEVITUS *et al.*, 2010). Esto es posible gracias a la

propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban (ALVARES, 2011). Dependiendo de las características de la planta que se pretenda propagar y del objetivo perseguido, la micropropagación puede realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas de novo y embriogénesis somática.

El proceso de callogénesis en el cultivo *in vitro* es proveniente de células originadas por sucesivas mitosis, como respuesta al estímulo de los balances entre reguladores de crecimiento, factores del medio de cultivo y el ambiente, callos son un sistema obtenido *in vitro* caracterizado por un grupo de células (TERMIGNONI, 2005). En determinadas condiciones, centros meristemáticos del tejido callogénico pueden diferenciarse originando raíces, brotes o embriones somáticos. Este cultivo se puede realizar tanto en medios de cultivo líquido o sólido, pudiéndose realizar estudios en diversos campos, como la citología y la bioquímica (NEUMANN *et al.*, 2009).

Estudios como los de Shekhawt y Manokari (2016) quienes consiguieron multiplicar *in vitro* segmentos nodales con 2-3 yemas de un individuo con 21 años de edad de *Couroupita guianensis*, árbol con propiedades medicinales de la misma familia *Lecythidaceae*. Lograron que cerca de un 90% de los explantes presentaran $4,1 \pm 0,23$ brotes de yema, después de 5 semanas de inoculación en medio MS, enriquecido de 8 g L^{-1} de agar, 30 g L^{-1} de sacarosa, (50 mg L^{-1} ácido ascórbico + 25 mg L^{-1} de sulfato de adenina + 25 mg L^{-1} de L-arginina + 25 mg L^{-1} de ácido cítrico) y 4 mg L^{-1} de BAP.

Yaya *et al.* (2005) han logrado la organogénesis indirecta de la especie emparentada *Cariniana pyriformis* Miers. Donde se aislaron segmentos de hipocótilos, cotiledones y hojas jóvenes, los cuales se inocularon en el medio Woody Plant Medium (WPM) diluido a la mitad suplementado con ácido indolacético (AIA) y 6-bencilaminopurina (BAP), sacarosa al 30 % y agar al 6 %. Obteniendo a la cuarta semana un porcentaje de formación de callo de un 75 %.

También Santos (2016) indujo callos de *Cariniana legalis* usando cotiledones los cuales presentan crecimiento callogénico después de 70 días. Fueron inoculados en medio WPM con 30 g L^{-1} de sacarosa y 7 g L^{-1} de agar con adición de reguladores de crecimiento ANA ($0,54 \mu\text{M}$) y BAP ($6,66; 13,32 \mu\text{M}$).

3. JUSTIFICATIVA

La reducción del tamaño de las poblaciones de esta especie, puede causar la pérdida de alelos y reducir la heterocigosidad. Juntamente con la disminución de la dispersión del polen y semillas, efecto de la fragmentación, aislaría las poblaciones genéticas y demográficamente causaría la extinción local de la especie. El cultivo de tejidos, como herramienta biotecnológica, puede ser de gran ayuda para evitar esta problemática. Se podría desarrollar un protocolo de micropropagación y así obtener individuos nuevos con los cuales se puedan restaurar áreas de preservación ambiental, parques y plazas públicas.

4. OBJETIVO

Desarrollar un protocolo de callogénesis a partir de hojas de Jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*).

5. REFERENCIAS

ALVAREZ, M. **Multiplicacion de plantas / Plant Propagation: Una guia esencial para conocer los distintos tipos de multiplicacion y su correcta aplicacion en el inicio de un cultivo / An essential guide to learn.** [s.l.] Editorial Albatros, 2011.

BOUWMAN, A. F. Global distribution of the major soils and land cover types. **Soils and the greenhouse effect**, p. 33–59, 1990.

CARVALHO, P. E. R. **Jequitibá-rosa.** [s.l.] Colombo: Embrapa Floresta, 2005.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras.** [s.l.] Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2003-2014., 2006. v. 5

COSTANZA, R. et al. The value of new jersey's ecosystem services and natural captial. **New Jersey Department of Environmental Protection, Trenton Google Scholar**, 2006.

DE CÁSSIA GONÇALVES, R.; ALOÍSIO, X.; DE PAIVA, H. Propagação vegetativa de jequitibá *Cariniana estrellensis* (Raddi) por miniestaquia. **Temas agrarios**, v. 16, n. 2, p. 54–63, 2011.

DELGADO, M. F. et al. Propagación vegetativa de taique (*Desfontainia spinosa*) y tepa (*Laureliopsis philippiana*) con fines ornamentales. **Bosque (Valdivia)**, v. 29, n. 2, p. 120–126,

2008.

DICK, C. W. et al. Spatial scales of pollen and seed-mediated gene flow in tropical rain forest trees. **Tropical Plant Biology**, v. 1, n. 1, p. 20–33, 2008.

FARJON, A. THE REMAINING DIVERSITY OF CONIFERS. **Acta Horticulturae**, n. 615, p. 75–89, set. 2003.

FLACHSLAND, E. et al. Medios de cultivo para la germinación in vitro de 41 especies de orquídeas. **Facena**, v. 12, p. 93–100, 1996.

JIMÉNEZ-TERRY, F.; AGRAMONTE, D. Cultivo in vitro y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales. **Biotecnología Vegetal**, v. 13, n. 1, 5 jan. 2013.

LEVITUS, G. et al. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. **Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina**, 2010.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. vol 1. 2008.

LUJÁN ÁLVAREZ, C. Forestería comunitaria: una acción de base para el desarrollo forestal sustentable en México. **Relaciones. Estudios de historia y sociedad**, v. 24, n. 94, 2003.

MARTIN, C. Tropical timbers of the world. **Agriculture handbook (USA). no. 607.**, 1984.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. Livro vermelho da flora do Brasil. 2013.

NEUMANN, K.-H.; KUMAR, A.; IMANI, J. **Plant cell and Tissue Culture-A tool in Biotechnology: Basics and Application**. [s.l.] Springer, 2009.

RASKIN P. **JORNADA PARA TERRALANDA A Grande Transição para a Civilização Planetária - PDF**. Cândido Grzybowski Iracema Dantas ed. [s.l.] IBASE, 2018.

RÊGO, G. M. Ecofisiologia do jequitibá-rosa e do jacarandá-da-bahia: morfogênese, germinação e crescimento inicial. **Scientia Agraria**, v. 3, n. 1–2, p. 125, 2002.

RÊGO, G. M.; POSSAMAI, E. Recomposição florestal: cultivo do jequitibá-rosa (*cariniana legalis*). **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2001.

REIS, J. R. DE M.; FONTOURA, T. Diversity of epiphytic bromeliads in the Reserva Particular do Patrimônio Natural Serra do Teimoso-Jussari, BA. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 1, p. 0–0, 2009.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, 2009.

RODRIGUES, B. P. et al. *Cariniana legalis* (Mart.) Kuntze (Lecythidaceae): descrição dendrológica e anatômica. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 419–427, 2012.

SANTOS, P. M. D. DOS. **Biometria, conservação de germoplasma e multiplicação in vitro de jequitibás-rosa do Sul de Minas Gerais**. 2016.

SHEKHAWAT, M. S.; MANOKARI, M. In vitro propagation, micromorphological studies and ex vitro rooting of cannon ball tree (*Couroupita guianensis* aubl.): a multipurpose threatened species. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 22, n. 1, p. 131–142, 2016.

TERMIGNONI, R. R. **Cultura de tecidos vegetais**. [s.l.] Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2005., 2005.

URIBE, M. E. et al. Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento in vitro de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. **Bosque (Valdivia)**, v. 29, n. 1, p. 58–64, 2008.

YAYA, M. L. et al. Inducing indirect organogenesis in Abarco (*Cariniana pyriformis* Miers.). **Agronomía Colombiana**, v. 23, n. 1, p. 50–54, 2005.

CAPÍTULO II

ARTICULO:

INDUCCIÓN DE CALLOS A PARTIR DE EXPLANTES DE HOJAS DE JEQUITIBÁ-ROSA (*Cariniana legalis*)

1. INTRODUCCIÓN

La actividad humana ha dado lugar a una amplia fragmentación del hábitat, donde se ve alterada la estructura, distribución y funcionalidad de los ecosistemas terrestres (Ribeiro *et al.*, 2009). Esta problemática a pesar de ser un problema global, es en los trópicos donde particularmente hay una gran diversidad de especies arbóreas, muchas de las cuales tienen una baja densidad poblacional (Laurence *et al.*, 2000). Árboles altos con grandes doseles son cruciales para la supervivencia de los bosques, ya que proporcionan frutas, flores y refugio para las poblaciones de animales, además de un sinnúmero de otras especies (Laurence *et al.*, 2000). Muchas de estas especies tienen problemas de propagación, lo cual dificulta la repoblación natural dado al tamaño y la longevidad de estos árboles, especies claves de los ecosistemas forestales.

Jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze), es considerado el mayor árbol de la Mata Atlántica y ampliamente distribuido en el este de Brasil. Esta especie ha sufrido con la explotación sistemática de madera a lo largo de los últimos siglos, debido a la calidad y a las grandes dimensiones que tiene, en algunas localidades todavía acontecen estas explotaciones (Martinelli y Moraes, 2013). Según la International Union for Conservation of Nature - IUCN (2012), está incluida en la lista de especies en extinción, categorizada como vulnerable. Hoy en día existe un número limitado de hábitats naturales para esta especie, con una densidad poblacional < 1 árbol ha^{-1} (Leal *et al.*, 2014).

La propagación de Jequitibá-rosa en Brasil es por semillas, lo que limita la disponibilidad de sus plántulas y la repoblación de esta especie. El cultivo *in vitro* puede ser una forma de obtener un gran número de plantas de forma asexual, lo cual puede ser una técnica de gran valor cuando se trata de propagar especies vegetales en peligro de extinción o especies de gran valor económico (Us-Camas *et al.*, 2014). Tiene como finalidad acelerar el crecimiento, aumentar la productividad y generar una planta con cualidades homogéneas por medio de la multiplicación de las plantas seleccionadas (Cid *et al.*, 2014).

El cultivo *in vitro* consiste en aislar una porción de la planta, a la cual se le llama explante o propágulo, y proporcionar artificialmente las condiciones físicas y químicas que requiera, para que las células expresen su potencial intrínseco (Singh, 2015). En la actualidad exista un gran interés en el cultivo de tejidos como un medio complementario o alternativo de propagación de especies forestales, y en particular de aquellas que tienen problemas en su propagación por los métodos convencionales (Acosta, 2012). Dependiendo de las características de la planta que se pretenda propagar y del objetivo perseguido, el cultivo de tejido se puede realizar a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas de novo y embriogénesis somática, estas últimas pueden ser generadas por callogénesis.

Son pocas las investigaciones que se han hecho con Jequitibá-rosa en los últimos años. Shekhart y Manokari (2016) consiguieron multiplicar *in vitro* segmentos nodales de *Couroupita guianensis*, árbol con propiedades medicinales de la misma familia *Lecythidaceae*. También trabajos como los de Yaya *et al.* (2005) y Santos (2016) usando cotiledones de las especies *Cariniana pyriformis* y *Cariniana legalis* consiguieron un porcentaje de formación de callo de un 70 %. Ninguna de las dos investigaciones llegó a la generación de un individuo completo por callogénesis.

Basándose en lo anterior este trabajo busca desarrollar un protocolo de callogénesis a partir de hojas de Jequitibá-rosa (*Cariniana legalis*), dando así un paso para futuras investigaciones en la generación de plántulas a partir del cultivo de tejido.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización y material vegetal

El material vegetal se obtuvo de clones de 2 años de Jequitibá-rosa del proyecto de maestría de Santos (2016). Dichos clones se encuentran dentro del Campus Santa Clara de la Universidad Federal de Alfenas-MG en las coordenadas geográficas: 21°25' S y 45°58' W. La colecta de hojas fue hecha en los meses de abril a julio del 2017.

2.2. Desinfección de los explantes.

Las hojas se lavaron con abundante agua y jabón líquido comercial. Posteriormente, en la cámara de flujo laminar, se colocaron en una solución de etanol 70 % por 2 minutos, para luego ser sumergidas en hipoclorito de sodio 2,5 % con 5 gotas de Tween[®] 20 por 10 minutos en agitación constante. Finalmente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril (Rocha *et al.*, 2007).

2.3. Diferentes antioxidantes en el control de la oxidación de las hojas.

Se evaluaron cinco tratamientos para disminuir la oxidación de la hoja y se probó un fungicida para reducir la contaminación en los ensayos. Bajo una cámara de flujo laminar se utilizaron explantes de hoja de 1 cm² en tubos de ensayo de 150 x 15 mm con medio Woody Plant Medium (WPM) diluido a la mitad sin reguladores del crecimiento, se adicionaron 20 mL de medio por tubo y fueron sellados con papel filme comercial. Los tratamientos fueron: T-1: WPM con luz; T-2: WPM en oscuridad; T-3: WPM + 3 g L⁻¹ de carbón activado; T-4: 0,4 g L⁻¹ de PVP-40; T-5: WPM + 0,1 g L⁻¹ de ácido ascórbico (Melo *et al.*, 2001). Se realizaron 20 réplicas por tratamiento con la adición de 0,07 g L⁻¹ de CERCOBIM[®] para disminuir la contaminación. A los 30 días fue validado el nivel de oxidación de las hojas; se dieron valores de un 100 % a una hoja completamente oxidada, 50 % mitad de la hoja oxidada y 0 % para aquella hoja sin oxidación. Se repitió este paso para cada uno de los tratamientos y se sacó una media para determinar cuál fue el mejor antioxidantes.

Como fuente de carbono se empleó sacarosa 30 g L⁻¹ y como agente solidificante Agar 0,7 %, se ajustó el pH a 5,8. Todo material de cultivo fue esterilizado en autoclave por 20 minutos a 121 °C. Después de la inoculación de los segmentos foliares estos se mantuvieron en sala de crecimiento con fotoperiodo de 12/12, temperatura de 25 ± 1 °C y a una intensidad luminosa de 36 μmol m⁻² s⁻¹.

2.4. Inducción de callos

Se indujo formación de callos inoculando hojas jóvenes de 1 cm² al envés, en tubos de ensayo, utilizando medio WPM con micronutrientes y macronutrientes diluidos a la mitad. Los tratamientos fueron los siguientes: T-1: control; T-2: 3 mg L⁻¹ de BAP; T-3: 0,1 mg L⁻¹ de ANA + 1 mg L⁻¹ de BAP; T-4: 0,1 mg L⁻¹ de ANA + 1,5 mg L⁻¹ de BAP; T-5: 0,1 mg L⁻¹ de ANA + 3 mg L⁻¹ de BAP. Para disminuir la contaminación se uso 0,07 g L⁻¹ de CERCOBIM[®] más 0,4 g L⁻¹ de PVP-40 para controlar la oxidación. Se realizaron 30 réplicas por tratamiento

y a los 30 días de cultivo se evaluó presencia o ausencia de callo en el explante, tomándose en consideración la presencia de cualquier masa callogénica en la hoja.

2.5. Efectos de BAP y Cinetina en la iniciación de callos friables.

Se utilizaron envases de vidrios cilíndricos de 40 mm x 50 mm x 80 mm, con 100 mL de medio WPM diluido a la mitad, además de 0,4 g L⁻¹ de PVP-40 para disminuir la oxidación. Callos se transfirieron a los tratamientos mostrados en la tabla 1. Se realizaron 20 réplicas por tratamientos y después de 3 a 5 meses se evaluó el peso fresco de los callos.

Tabla 1. Tratamientos para la iniciación de callos friables de hojas de Jequitibá-rosa.

Tratamientos	FC	Regulador de Crecimiento (mg L ⁻¹)		
		ANA	BAP	CIN
1	60	0,1	4	-
2	60	0,1	8	-
3	90	0,1	-	0,5
4	90	0,1	-	2
5	90	0,1	-	2,5
6	90	0,1	-	3

FC: número de días en la formación de callo. ANA: ácido naftalenoacético, BAP: 6-bencilaminopurina, CIN: cinetina.

2.6. Análisis de citoquímica

Se maceraron 50 mg de tejido fresco de callos con ayuda de bastón de vidrio sobre un vidrio de reloj. Se adicionaron 3 gotas de azul de Evans 0,1 %, se dejó reaccionar por 3 minutos, se retiró el exceso del colorante y se agregaron 3 gotas de Carmín-acético 2 %, y se dejó reaccionar por 3 minutos más. Se retiró el exceso nuevamente y se distribuyó la masa celular sobre la superficie de una lámina de vidrio para luego analizar en microscopio de luz. El uso de estos colorantes posibilita la diferenciación de células embriogénicas. La masa pró-embriogénica (MPE) presenta dos tipos de células, el primer grupo es compuesto por células isodiamétricas, pequeñas y con citoplasma denso, tales células reaccionan al carmín acético (CA), resultando de coloración roja. El otro grupo es compuesto por células no embrionarias, alargadas, vacuoladas y permeables al azul de Evans (AE), resultando de color azul (Silva, 2009).

2.7. Diseño experimental

Se usó un delineamiento estadístico completamente al azar. Para el análisis de varianza y la comparación de medias fue realizada con el software Infostat/L. Las diferencias entre las medias se analizaron por un Test de Scott Knott. En todos los casos el nivel de significancia utilizado fue de $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Antioxidantes en la oxidación de las hojas

A los 30 días fueron analizados los diferentes tratamientos para ver el nivel de oxidación de las hojas. De las 20 repeticiones por tratamientos se descartaron tubos contaminados y se calculó la media por tratamiento. Se le dio un valor de 0 a 100 % como se muestra en la tabla 1, de menos a mayor nivel de oxidación de la hoja. Los tratamientos con luz y sin luz manifestaron un 55 y 56,57 % de oxidación en las hojas, en conjunto con el tratamiento con ácido ascórbico arrojando un valor de 51,38 % estos tres fueron los tratamientos con más de la mitad de la hoja oxidada (Fig. 1) por lo tanto se descartaron como tratamiento de antioxidantes.

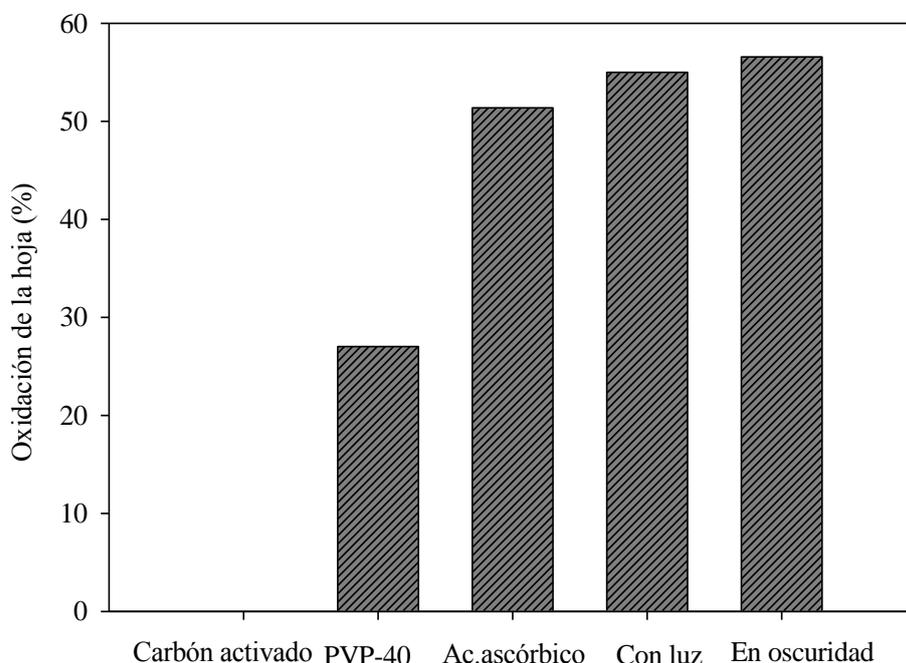


Figura 1. Media en porcentaje (%) de los diferentes antioxidantes en el control de la oxidación de las hojas de Jequitibá-rosa.

Como se puede ver en la figura 1 el tratamiento con carbón activado muestra que las hojas por tubo se mantuvieron sin oxidación ya que mostro un 0 % de oxidación en las hojas después de los 30 días. El tratamiento con PVP-40 fue el segundo mejor antioxidante con un porcentaje de 27,02 %. Este último se utilizó durante toda la experimentación a pesar de que el carbón activado muestra mejores resultados. El manejo de este compuesto es muy trabajoso puesto que este precipita al momento de ser autoclavado y cuando se trabaja con más de 150 repeticiones es muy difícil de usar. Si en un futuro este protocolo es utilizado para regenerar plantas en masa eso dificultaría su uso. PVP-40 para la producción en masa de plantas puede ser una mejor alternativa.

3.2. Inducción de callos

A partir de los 30 días se observó presencia de callo en las hojas, de las 30 repeticiones que se hicieron por tratamiento, se descartaron las contaminadas con un porcentaje de un 58 % considerándose repeticiones sin respuesta. Se evaluó presencia y ausencia de callo en la hoja tomando en consideración cualquier muestra de masa callogénica. La mayor frecuencia de explantes que formaron callo se observó mayoritariamente en el tratamiento 3 con una concentración de 0,1 mg L⁻¹ de ANA y 1 mg L⁻¹ de BAP con un valor de 25,5 %, con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos (Fig. 2). Se observó un callo pequeño de color marrón claro en un comienzo el cual con el tiempo se tornó un poco más oscuro, esta aglomeración de callo se desarrolló en los lugares con heridas de la hoja, especialmente en el contorno (Fig. 5b). El segundo mejor tratamiento fue el número 2 con la adición de solo 3 mg L⁻¹ de BAP con un porcentaje de 10,5 % de presencia de callo en la hoja. En el caso del tratamiento 4 y 5 la respuesta fue de un 4,5 y 1,5 % respectivamente.

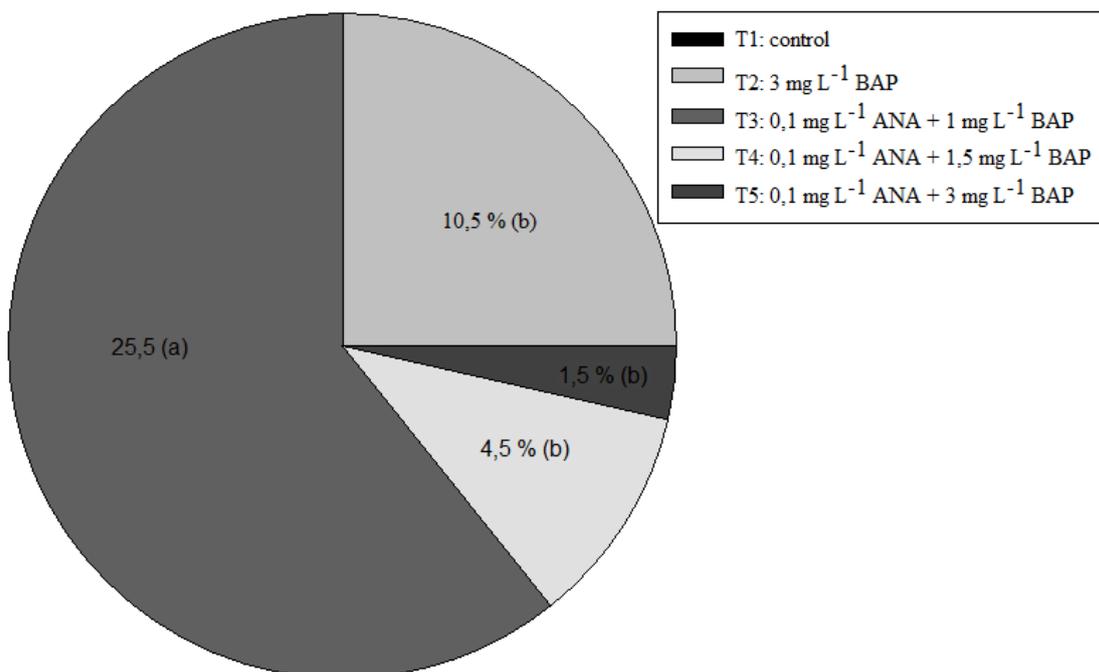


Figura 2. Porcentaje de la presencia o ausencia de callo en hojas de Jequitibá-rosa. Medias con letras diferentes difieren estadísticamente según la prueba de Scott Knott para $p \leq 0,05$. ANA: ácido naftalenoacético, BAP: 6-bencilaminopurina

3.3. Efectos del BAP y la Cinetina en la iniciación de callos friables

Los callos obtenidos anteriormente fueron transferidos a tratamientos con diferentes concentraciones de BAP y Cinetina. A los 3 meses no se observa diferencia significativa entre los tratamientos, pero luego de 5 meses las concentraciones mayores de BAP (8 mg L⁻¹) son estadísticamente diferentes respecto al otro tratamiento (Fig. 3). Callos de color blanco, marrón claro y oscuro son observados en ambos tratamientos, la masa callogénica creció notablemente con respecto al callo inicial obtenido del explante (Fig. 5c).

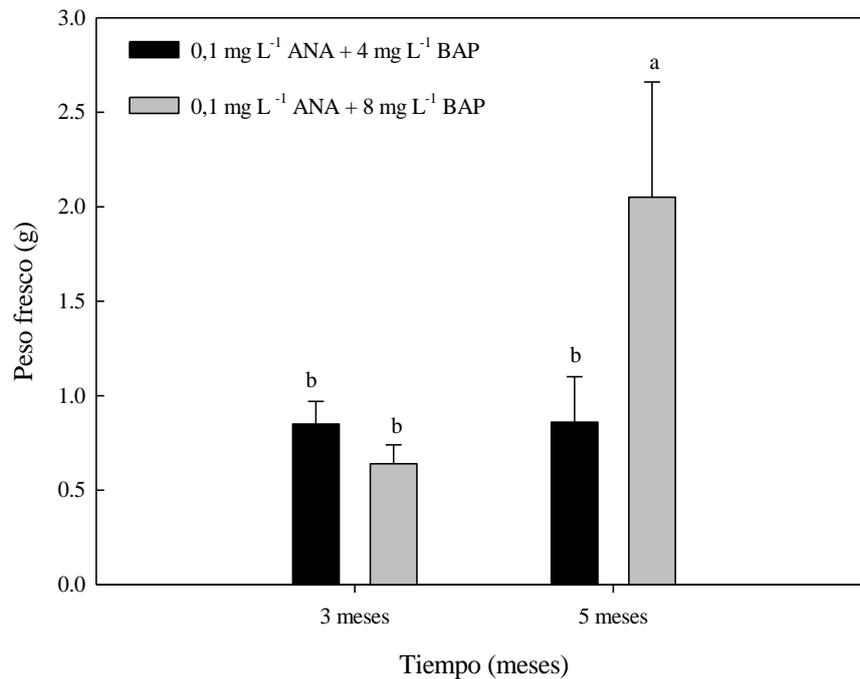


Figura 3. Peso fresco de callos (g) con diferentes concentraciones de BAP a los 3 y 5 meses de cultivo. Medias con letras diferentes en cada columna difieren estadísticamente según la prueba de Scott Knott para $p \leq 0,05$. ANA: ácido naftalenoacético, BAP: 6-bencilaminopurina

En cuanto al experimento realizado con diferentes concentraciones de cinetina no muestran diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 4). Concentraciones mayores y menores de cinetina muestran casi los mismos resultados. La masa callogénica se vio aumentada a pesar de no tener diferencias significativas, callos de color marrón claro y oscuro son frecuentes en las diferentes concentraciones hormonales.

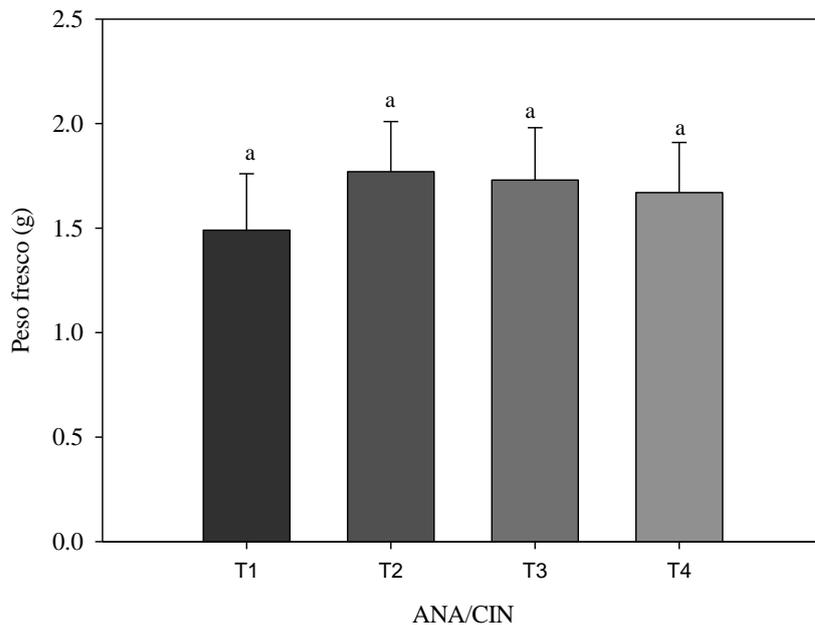


Figura 4. Peso fresco de callos (g) con diferentes concentraciones de cinetina a los 3 meses de cultivo. **T1:** 0,1 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ CIN; **T2:** 0,1 mg L⁻¹ ANA + 2 mg L⁻¹ CIN; **T3:** 0,1 mg L⁻¹ ANA + 2,5 mg L⁻¹ CIN; **T4:** 0,1 mg L⁻¹ ANA + 3 mg L⁻¹ CIN. Medias con letras diferentes en cada columna difieren estadísticamente según la prueba de Scott Knott para $p \leq 0,05$.

3.4. Análisis de citoquímica

Se tomaron muestras de los callos con 8 mg L⁻¹ BAP, dentro de este mismo tratamiento se observó callo de tres colores diferentes (color blanco, marrón claro y oscuro) por lo tanto se generó citoquímica de los tres. Fue observado que el colorante AE reaccionó fuertemente con las células callogénicas (Fig. 5), ciertas áreas muestran coloración roja debido al CA pero estas áreas son las menores. La reacción al AE indica una alta presencia de células no embrionarias.

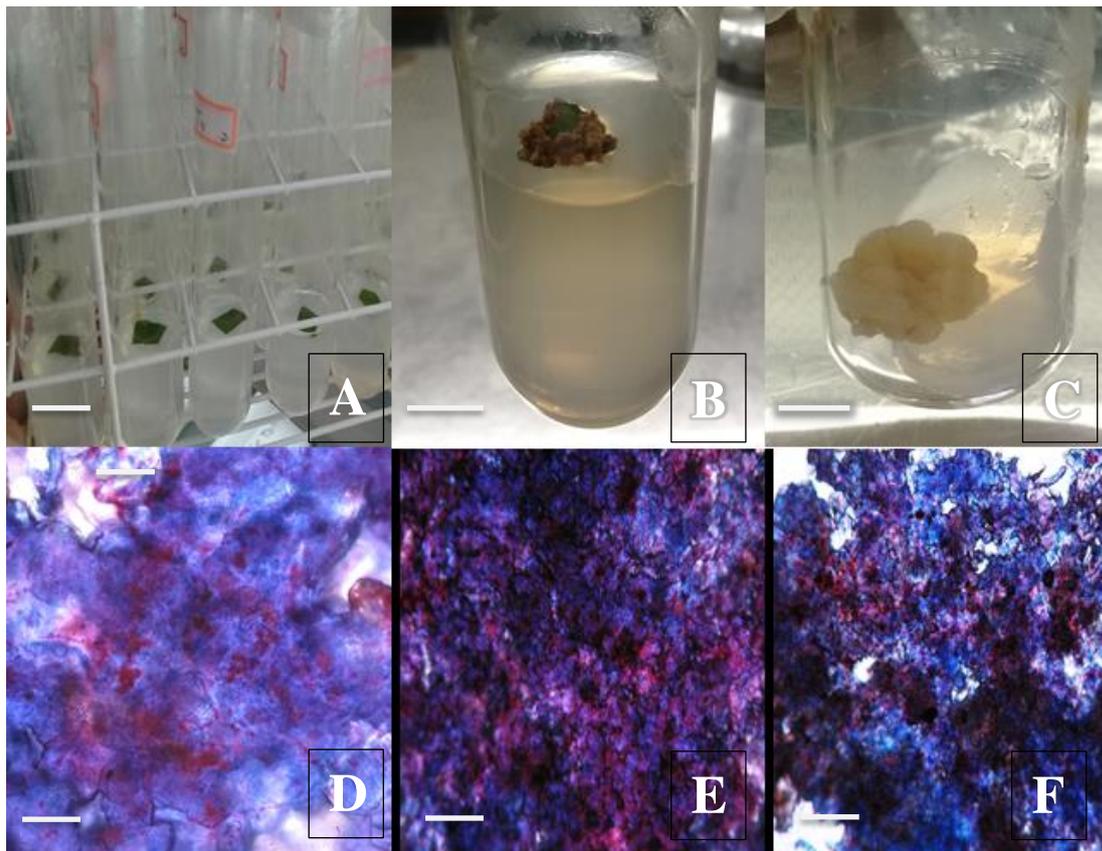


Figura 5. **A:** Explantes de hojas en tubos de ensayo; **B:** Hojas con presencia de callo a los 30 días de inoculación (medio con $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BAP); **C:** Callo después de 3 meses en medio con $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ANA + 8 mg L^{-1} BAP; **D, E y F:** Células no embriogénicas de callo de hoja (aumento de 40X y 10X para E y F), callo de color blanco (D), marrón claro (E) y marrón oscuro (F) de tratamiento 8 mg L^{-1} BAP. Barra: A y B = 7,5 mm; C = 9 mm; D = 50 μm ; E y F = 100 μm .

4. DISCUSION

La oxidación fenólica de hojas es un problema relevante en el crecimiento y en la propagación de plantas *in vitro*, puede deberse tanto a un componente ambiental como genético. Se ha determinado que la oxidación de los explantes se pueden controlar modificando las condiciones ambientales del cultivo y manipulando el explante (Husain y Anis, 2009) o mediante la adición de antioxidantes al medio nutritivo (Bhatia y Ashwath, 2008). Aquí queda en evidencia que antioxidantes químicos como carbón activo y PVP-40 reducen la oxidación en hojas de Jequitibá-rosa, mientras que tratamientos en oscuridad o sin la adición de un antioxidante tuvieron un efecto negativo. Antioxidantes químicos como carbón activo y PVP son altamente usados tanto en especies leñosas como arbustivas (Melo *et al.*, 2001; Larson *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2016). El carbón activado actúa promoviendo la adsorción de los exudados que genera el explante, los cuales provocan oxidación y el PVP reacciona con los

compuestos oxidantes, evitando que estos queden disponibles para ser oxidados (George *et al.*, 1996).

El efecto de los reguladores de crecimiento incrementó la formación de masas celulares indiferenciadas. La combinación de citoquininas y auxinas promueve la inducción de la división y diferenciación celular (Tamakura y Tanaka, 2004). Como se observó en las Fig. 2 y 3 la aplicación de BAP generó una mejor respuesta en la producción de callo. Este tipo de respuesta fue observada por Rodríguez Beraud *et al.* (2014) y Santos (2016) en la micropropagación de hojas de especies leñosas. Asimismo Pinto *et al.* (2002) logro aumentar el porcentaje de callo aumentando las concentraciones de BAP en explantes de hojas de *E. globulus*. En esta investigación, la mayor producción de callos se logró con concentraciones de 0,1 a 8 mg L⁻¹ de BAP con bajas concentraciones de ANA. La interacción de estos reguladores del crecimiento no nos determina un resultado certero ya que la respuesta también depende de otros factores como la especie, la variedad, tipo y edad del explante, la condición del cultivo entre otros. Por lo tanto realizar una combinación adecuada de reguladores es importante para tener resultados de interés (Coutiño-Cortés *et al.*, 2017). La tasa de respuesta generada por el uso de BAP se debe a la inducción de la división celular y al aumento de las células meristemáticas. Las citoquininas están involucradas en la función de ciertas enzimas responsables de la producción de tubilinas, que están relacionadas con la mitosis y la meiosis, jugando un papel importante en el metabolismo de las plantas (Haq *et al.*, 2013). También citosinas como la cinetina promovieron la proliferación de callo a pesar de no tener diferencias significativas se vio un aumento de masa en los diferentes tratamientos. Trabajo como el de Guillén *et al.*, 2015 obtuvieron aumento en el volumen de callo con concentraciones de 0,5 mg L⁻¹ de CIN en hojas de *Beaucarnea Inermis*; con café (*Coffea canephora*) utilizando 2 mg L⁻¹ de CIN obtuvieron gran crecimiento de callo y la friabilidad deseada del mismo, pero no se obtuvo un alto porcentaje de desarrollo de callo embriogénico (Paredes *et al.*, 2013). Según Bharathi y Elavarasi 2012, la elección de los reguladores de crecimiento es de mayor importancia para la inducción de callo, más allá de las diferentes concentraciones. Algunos investigadores como Sarker *et al.* (2006) y Foo *et al.* (2018) sugieren el uso de BAP y cinetina en conjunto para inducir brotes, lo cual se podría usar en una futura continuación de esta investigación.

La reacción a los colorantes citoquímicos posibilita la diferenciación de células embriogénicas. Se observó una alta reacción al A.E. para el tratamiento con 8 mgL⁻¹ de BAP, esto ocurre en aquellas células que presentan algún tipo de daño en la membrana celular

(Bhargava *et al.*, 2007). De acuerdo con Filonova *et al.* (2000) células altamente vacuoladas y alongadas son la primera señal de muerte celular por vacuolización. Estas células presentan daño en la membrana plasmática lo que permite la tinción con A.E. George *et al.* (2008) sugiere que para la proliferación de MPE se debería disminuir al mínimo o eliminar las concentraciones de auxinas para que los iniciar el desarrollo de los embriones. La auxina controla los procesos básicos de división y elongación celular por lo tanto sería favorable para continuar con esta investigación disminuir estos niveles de auxina para así obtener la formación de embriones.

5. CONCLUSIONES

El uso de PVP como antioxidante en el medio de cultivo WPM es de alta eficacia al momento de la inoculación de hojas.

El uso de concentraciones bajas de ANA y altas de BAP mostró una alta proliferación de callo de hojas de Jequitibá-rosa.

Análisis de citoquímica de los callos mostró una alta afinidad al AE mostrando que no hay proliferación de masa pro-embriogénica.

Se sugiere en una futura investigación el uso de CIN y BAP, disminuyendo o anulando el uso de ANA para el desarrollo de masa pro-embriogénica o el desarrollo de brotes.

6. AGRADECIMIENTOS

Al programa de Ciencias Ambientales de la Universidad de Alfenas-MG/Brasil por el financiamiento de este proyecto, así como a todo el personal del Laboratorio de Biotecnología y Genotoxicidad (BIOGEN) de la UNIFAL. Además de agradecer Becas OEA-GCUB por permitirme la oportunidad de hacer mi maestría en Brasil.

7. REFERENCIAS

Araujo MDCDR, Chagas EA, Garcia MIR, Pinto STS, Chagas PC, Vendrame W, et al. Micropropagation of caçari under different nutritive culture media, antioxidants, and levels of agar and pH. *African Journal of Biotechnology*. 2016; 15(33):1771-80.

Bharathi P, Elavarasi N. Preliminary studies of reactor system designed for cell suspension culture of chickpea (*Cicer aritenum*). *International Journal of Chemical Sciences and Applications*. 2012; 3(1):223-31.

- Bhargava A, Osusky M, Forward BS, Hancock RE, Kay WW, Misra S. Expression of a polyphemusin variant in transgenic tobacco confers resistance against plant pathogenic bacteria, fungi and a virus. *Plant cell, tissue and organ culture*. 2007;88(3):301.
- Bhatia P, Ashwath N. Improving the quality of in vitro culture shoots of tomato. *Biotechnology*. 2008;7(2):188-93.
- Cid LPB. *Cultivo in vitro de plantas*. 3 ed. Brasilia, DF: Embrapa; 2014.
- Coutiño-Cortés AG, Bertolini V, Iracheta-Donjuan L, Ruíz-Montoya L, Valle-Mora JF. In vitro callogenesis induction of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler & WE Higgins (Orchidaceae). *Acta Agronómica*. 2017;66(2):254-9.
- Filonova LH, Bozhkov PV, Brukhin VB, Daniel G, Zhivotovsky B, von Arnold S. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *Journal of Cell Science*. 2000;113(24):4399-411.
- Foo PC, Lee ZH, Chin CK, Subramaniam S, Chew BL. Shoot Induction in White Eggplant (*Solanum melongena* L. Cv. Bulat Putih) using 6-Benzylaminopurine and Kinetin. *Tropical life sciences research*. 2018;29(2):119.
- George EF, Hall MA, De Klerk GJ. *Plant Propagation by Tissue Culture, Part: 2 In Practice Exegetics*. Basingstoke Google Scholar. 1996.
- Guillén S, Martínez-Palacios A, Martínez H, Martínez-Ávalos JG. Organogénesis y embriogénesis somática de *Beaucarnea inermis* (Asparagaceae), una especie amenazada del noreste de México. *Botanical Sciences*. 2015;93(2):221-30.
- Haq R, Naz S, Aslam F, Manzoor F. Comparison of in vitro response of micropropagation and callogenesis of medicinal plant, *Vinca rosea*. *J Agric Res*. 2013;51(1):9-17.
- Husain MK, Anis M. Rapid in vitro multiplication of *Melia azedarach* L.(a multipurpose woody tree). *Acta physiologiae plantarum*. 2009;31(4):765-72.
- Larson CG, Gómez C, Sánchez-Olate M, Ríos D. Inducción de caulogénesis indirecta en *Eucalyptus globulus*. *Bosque (Valdivia)*. 2006;27(3):250-7.
- Laurance WF, Delamônica P, Laurance SG, Vasconcelos HL, Lovejoy TE. Rainforest

fragmentation kills big trees. *Nature*. 2000;404(6780):836. Doi:10.1038/35009032

Leal JB, Santos RP, Gaiotto FA. Effect of selective logging on genetic diversity and gene flow in *Cariniana legalis* sampled from a cacao agroforestry system. *Genet Mol Res*. 2014;13(1):626-35. Doi:10.4238/2014.January.28.8

Martinelli, G. y Moraes, M.A. Livro vermelho da flora do Brasil. 1.ed. Rio de Janeiro: instituto de pesquisas jardim botânico do rio de janeiro; 2013.

Melo B, Pinto J, Luz JMQ, Peixoto JR, Juliatti FC. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura in vitro de embriões da guarirobeira [*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.]. *Ciência e Agrotecnologia*. 2001;25(6):1301-6.

Paredes G, Peña C, Jadán M. Obtención de embriones en fase cotiledonar de Café Robusta (*Coffea canephora*) con el empleo de un sistema de inmersión temporal, mediante la técnica de embriogénesis somática a partir de segmentos foliares. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas: REMCB*. 2013;34(1):63-83.

Pinto G, Santos C, Neves L, Araújo C. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Reports*. 2002;21(3):208-13.

Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*. 2009;142(6):1141-53. Doi:10.1016/j.biocon.2009.02.021

Rocha SC da, Quorim M, Ribas LLF, Koehler HS. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. *Revista Árvore*. 2007;31(1):43-50. Doi:10.1590/S0100-67622007000100006

Rodríguez Beraud MM, Latsague Vidal MI, Chacón Fuentes MA, Astorga Brevis PK. Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*. 2014;35(1):111-8.

SANTOS PMD dos. Biometria, conservação de germoplasma e multiplicação in vitro de jequitibás-rosa do Sul de Minas Gerais. 2016.

Sarker RH, Yesmin S, Hoque MI. Multiple shoot formation in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 2006;16(1):53-61.

Shekhawat MS, Manokari M. In vitro propagation, micromorphological studies and ex vitro rooting of cannon ball tree (*Couroupita guianensis* aubl.): a multipurpose threatened species. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2016;22(1):131-42.

Silva LC. Viabilidade de células pró-embriogênicas e suspensão celular de murici-pequeno. 2009.

Singh A. Micropropagation of Plants. En: Bahadur B, Venkat Rajam M, Sahijram L, Krishnamurthy KV, editores. *Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology* [Internet]. New Delhi: Springer India; 2015 [citado 14 de octubre de 2018] p. 329-46. Recuperado a partir de: https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_16

Solano CCA. La micropropagación en especies forestales. *Micropropagation in forest species*. *Ciencia Actual*. 2012;1(1):22-44. Doi:10.21500/2248468X.1594

Takamura T, Tanaka M. Callus formation and plant regeneration from callus through somatic embryo structures in *Cymbidium* orchid. *Plant Science*. 2004;166(6):1443-9.

Us-Camas R, Rivera-Solís G, Duarte-Aké F, De-la-Pena C. In vitro culture: an epigenetic challenge for plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2014;118(2):187-201.

Yaya ML, Rodríguez OL, Usaquén W, Chaparro A. Inducing indirect organogenesis in *Abarco* (*Cariniana pyriformis* Miers.). *Agronomía Colombiana*. 2005;23(1):50-4.

The IUCN Red List of Threatened Species [Internet]. IUCN Red List of Threatened Species. [citado 13 de octubre de 2018]; Recuperado a partir de: <https://newredlist.iucnredlist.org/es>