

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**OBTENCIÓN Y AISLAMIENTO DE PROTOPLASTOS DE  
TRIGO (*Triticum aestivum*), VARIEDAD COJITAMBO,  
MEDIANTE EL ESTABLECIMIENTO DE HOJAS Y  
CALLOS *in vitro* PROVENIENTES DE SEMILLAS.**

**Previa a la obtención del Título de:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.**

**ELABORADO POR:**

**ANDREA ELIZABETH ARCOS ANDRADE**

**SANGOLQUÍ, 23 de junio de 2010**

## RESUMEN

En el presente estudio se logró obtener protoplastos de trigo, variedad Cojitambo, al establecer un protocolo de desinfección de semillas en el que se encontró la necesidad de utilizar hipoclorito de sodio 2%, con tiempos de contacto de hasta diez minutos; además de tratamientos pregerminativos, con inmersión de semillas en hipoclorito de sodio 0.2% al menos tres horas; la germinación fue lograda en tiempos de 6.33 días al utilizar MS (Murashige & Skooge, 1962) suplementado con vitaminas y  $2\text{mg.L}^{-1}$  de ácido giberélico; se adicionó 0.003 ppm de brasinolina para optimizar el establecimiento de brotes y lograr hojas anchas y sin enrollamiento. Se obtuvo callos a partir de semillas en un promedio de 36 días gracias al medio L2 (Lina, 2005) suplementado con brasinolina; la mejor obtención de protoplastos a partir de las hojas y callos establecidos *in vitro* se logró con el coctel enzimático celulasa-macerozima 4% y pectoliasa 0.3%, junto con el medio BH3 (Grosser & Gmitter, 1990), con células cercanas al mesófilo para el caso de la hoja, los tamaños de estos protoplastos se encontraron entre 10 y  $15\mu\text{m}$  y para callo entre 10 y  $20\mu\text{m}$ .

## ABSTRACT

In the present study was able to obtain wheat protoplasts, variety Cojitambo, to establish a protocol for seeds disinfection, which found the need to use sodium hypochlorite 2%, with contact times up to ten minutes; plus pretreatment with seeds immersion in sodium hypochlorite 0.2% three hours at least; the germination was achieved in a time of 6.33 days by using MS (Murashige y Skooge, 1962) supplemented with vitamins and gibberellic acid  $2\text{mg.L}^{-1}$ , and was added 0.003 ppm of brasinolina to optimize the shoots establishment and achieve broad-leave without winding. Callus was obtained from seeds in 36 days with L2 (Lina, 2005), supplemented with brasinolina, the best protoplasts collection from leaves and callus established *in vitro*, was achieved with enzyme cocktail cellulose-macerozime 4% and pectolyase 0.3% with BH3 medium (Grosser & Gmitter, 1990), the size of leaf protoplasts were 10 to  $15\mu\text{m}$  and from callus between 10 and  $20\mu\text{m}$ .

## CERTIFICACION

M.Sc. Mónica Jadán

M.Sc. Norman Soria

### **Certifican:**

Que el trabajo titulado “Obtención y aislamiento de protoplastos de trigo (*Triticum aestivum*) variedad Cojitambo, mediante el establecimiento de hojas y callos *in vitro* provenientes de semillas” realizado por Andrea Elizabeth Arcos Andrade, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a su aplicación de interés para el país, se recomienda publicar este estudio.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat. Autorizan a Andrea Elizabeth Arcos Andrade que lo entregue al Ing. Rafael Vargas, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, 23 de junio 2011.

---

**M.Sc. Mónica Jadán**  
DIRECTOR

---

**M.Sc. Norman Soria**  
CODIRECTOR

## **DECLARACION DE RESPONSABILIDAD**

Yo, Andrea Elizabeth Arcos Andrade

### **Declaro que:**

El proyecto de grado denominado “Obtención y aislamiento de protoplastos de trigo (*Triticum aestivum*), variedad Cojitambo, mediante el establecimiento de hojas y callos *in vitro* provenientes de semillas”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 23 de junio de 2011.

---

**Andrea Elizabeth Arcos Andrade**

## **AUTORIZACIÓN**

Yo, Andrea Elizabeth Arcos Andrade

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “Obtención y aislamiento de protoplastos de trigo (*Triticum aestivum*), variedad Cojitambo, mediante el establecimiento de hojas y callos *in vitro* provenientes de semillas”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 23 de junio de 2011

---

**Andrea Elizabeth Arcos Andrade**

## **DEDICATORIA**

El esfuerzo realizado en esta investigación está dedicado en primer lugar a Dios, quien me ha dado la fuerza y la luz para realizarla, a mis padres que con su ejemplo me han enseñado a perseverar y jamás rendirme, a mi hermano que ha sabido ser paciente en todo este tiempo y a mis directores de tesis que con su sabiduría, enseñanzas y responsabilidad supieron dirigirla de la mejor manera.

**Andrea Elizabeth Arcos**

## AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradezco a Dios por darme la fuerza para empezar y concluir este proyecto, poniéndome los obstáculos que necesitaba aprender a sobrellevar y rodeándome de personas que estuvieron dispuestos a darme la mano en cualquier momento; especialmente cuando las cosas iban mal.

A mis padres que con su esfuerzo y principalmete su ejemplo me enseñaron siempre a poner lo mejor de mi en cualquier actividad, es así como concluyo mis estudios universitarios con la presentación de más de un año de esfuerzo y dedicación, siguiendo todas sus enseñanzas. A mi padre le agradezco el ejemplo de esfuerzo, trabajo y dedicación, su enseñanza de hacer siempre lo máximo que se pueda; y a mi madre su lucha, dinamismo y constante preocupación y ayuda.

Como mi directora de tesis, Mónica Jadán, por conseguir y guiar este proyecto con la mayor habilidad y disposición; y como amiga, por enseñarme a ser más inteligente con las personas que me rodean, por sus consejos, aliento y cada una de las conversaciones que tuvimos en todo este tiempo, por toda la confianza que depositó en mi, que me trajo muchas enseñanzas.

A mi codirector Norman Soria, que estuvo siempre dispuesto a compartir su basto conocimiento para la realización de este proyecto, muchas gracias por cada consejo y dirección, sabiendo todas sus ocupaciones y responsabilidades en esta institución.

Quiero agradecerle a mi hermano Felipe por toda la paciencia que ha tenido, durante seis años, porque su hermana siempre ha estado estudiando, por aguantar mis mal genios cuando me costaba sentarme a escribir esta tesis; eres un gran hermano que ha sabido entenderme y sobre todo subirme el ánimo como solo tu sabes hacerlo.

A mi tía Normita y sus hijos José y Esteban, que son como mis hermanos, que siempre han estado muy pendientes de mis estudios, las dificultades y los logros que he alcanzado en esta escuela.

A todos los chicos lab cultivo, les agradezco mucho por toda la ayuda que me dieron cuando ya estaba muy cansada, por todos esos momentos de alegría, por cada almuerzo, por cada cumpleaños, por esas conversaciones largas en la cafetería cuando alguien estaba triste, porque sin importar el tema, todo se convierte en momentos muy alegres, que están en la memoria de cada uno, por el apoyo que siempre me mostraron y su preocupación en cada detalle de mi vida; les agradezco a todos por la paciencia; especialmente quiero agradecer a Cristian por ser mi asesor estadístico, por la paciencia en su enseñanzas, por ayudarme a conseguir trabajo y sobre todo por confiar en mi y en mi trabajo.

A mi novio Xavi porque ha sido un hombre muy paciente los últimos tres años, porque eras tu mi vida quien estaba fuera del laboratorio siempre esperándome sin importar cuanto me demore, siempre pendiente de cuando algo no iba bien en el lab, muy comedido en ayudarme, por arreglar las cosas que dañábamos, porque estuviste siempre dispuesto al horario que yo imponía, y sobre todo por interesarte en mi investigación, porque aprendiste de biotecnología, y siempre me dabas ánimos cuando ya no quería continuar, cuando salía muy triste del lab, o cuando algo salía bien y me llevabas a celebrar; todas esas cosas cuentan para mi, y no las he olvidado.

Agradezco a mis amigos, porque han sabido entender lo preocupada que soy de mis estudios, y he dejado de lado otras cosas importantes, muchas gracias por todo.

ANDREA ARCOS

## ÍNDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	2
1.3 Objetivos e hipótesis	4
1.3.1 Objetivo principal	4
1.3.2 Objetivos específicos	4
1.3.3 Hipótesis	4
1.4 Marco teórico	5
1.4.1 Características generales de la especie	5
1.4.1.1 Taxonomía	5
1.4.1.2 Descripción botánica	6
1.4.1.3 Exigencias edafoclimáticas	8
1.4.1.4 Ciclo vegetativo	9
1.4.1.5 Variedades	11
1.4.1.6 Plagas que afectan los cultivos	12
1.4.1.7 Enfermedades	12
1.4.1.8 Distribución geográfica y origen de la especie	14
1.4.1.9 Importancia de la especie	15
1.4.2 Cultivo <i>in vitro</i>	16
1.4.2.1 Técnicas empleadas del cultivo <i>in vitro</i>	18
1.4.2.1.1 Germinación de semillas	18
1.4.2.1.2 Establecimiento de brotes	22
1.4.2.1.3 Establecimiento de callos	22
1.4.2.1.4 Aislamiento de protoplastos	23
1.4.3 Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i> de hojas y callos	27
1.4.3.1 Material vegetal	27
1.4.3.1.1 Condiciones de almacenamiento de las semillas	27
1.4.3.2 Factores químicos	28
1.4.3.2.1 Sales inorgánicas	28
1.4.3.2.2 Carbohidratos	29
1.4.3.2.3 Vitaminas y aminoácidos	30
1.4.3.2.4 Reguladores de crecimiento	30
1.4.3.2.5 Agente gelificante	33
1.4.3.3 Factores físicos	34
1.4.4 Factores que influyen en la obtención y aislamiento de protoplastos	34
1.4.4.1 Material vegetal <i>in vitro</i>	34
1.4.4.1.1 Edad y condiciones de incubación del material foliar	34
1.4.4.1.2 Edad y condiciones de incubación de callos	35
1.4.4.2 Factores Químicos	36
1.4.4.2.1 Solución enzimática	36
1.4.4.2.2 Medio de desarrollo de protoplastos	37
1.4.4.3 Factores Físicos	39
1.4.4.3.1 Temperatura y tiempo de incubación	39

<b>CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
2.1. Fase de campo	40
2.1.1. Localización geográfica	40
2.1.2. Selección, transporte y almacenamiento de semillas	40
2.2. Fase de Laboratorio	41
2.2.1. Localización del ensayo	41
2.2.2. Desinfección de semillas.	42
2.2.3. Rompimiento de dormancia	45
2.2.4. Fase de germinación	48
2.2.5. Fase de inducción de brotes	50
2.2.6. Establecimiento de callos	52
2.2.6.1 A partir de semilla no germinada	52
2.2.6.2 A partir de planta con semilla	55
2.2.7. Aislamiento de protoplastos a partir de hoja	57
2.2.8. Aislamiento de protoplastos a partir de callo	60
<b>CAPÍTULO 3 RESULTADOS</b>	
3.1 Establecimiento de semillas <i>in vitro</i>	63
3.1.1 Desinfección.	63
3.1.1.1 Contaminación	63
3.1.1.2 Germinación	70
3.1.2 Rompimiento de dormancia	77
3.1.2.1 Contaminación	77
3.1.2.2 Viabilidad	78
3.1.3 Germinación	80
3.1.4 Establecimiento de brotes	82
3.2 Establecimiento de callos	86
3.2.1 A partir de semillas no germinadas	86
3.2.2 A partir de plantas germinadas <i>in vitro</i>	94
3.3 Aislamiento de protoplastos	97
3.3.1 A partir de hoja	98
3.3.1.1 Cantidad de protoplastos	99
3.3.1.2 Disgregación celular	103
3.3.1.3 Morfología celular	106
3.3.2 A partir de callo	109
3.3.2.1 Cantidad de protoplastos	110
3.3.2.2 Disgregación celular	115
3.3.2.3 Morfología celular	119
3.3.3 Protoplastos obtenidos a partir de hoja y callo	123
<b>CAPÍTULO 4 DISCUSIÓN</b>	
4.1 Establecimiento de semillas <i>in vitro</i>	128
4.1.1 Desinfección	128
4.1.1.1 Contaminación	128
4.1.1.2 Germinación	130
4.1.2 Rompimiento de dormancia	132
4.1.2.1 Contaminación	132
4.1.2.2 Viabilidad	133
4.1.3 Germinación	133
4.1.4 Establecimiento de brotes	135
4.1.4.1 Cantidad de brotes	135

4.1.4.2 Ancho de la hoja	136
4.1.4.3. Tiempo de germinación	137
4.1.5 Establecimiento de callos	137
4.1.5.1 A partir de semillas no germinadas	138
4.1.5.2 A partir de planta germinada in viro	141
4.1.6 Aislamiento de protoplastos	143
4.1.6.1 A partir de hoja	143
4.1.6.1.1 Cantidad	144
4.1.6.1.2 Disgregación celular	146
4.1.6.1.3 Morfología celular	148
4.1.6.2 A partir de callo	150
4.1.6.2.1 Cantidad de protoplastos	151
4.1.6.2.2 Disgregación celular	153
4.1.6.2.3 Morfología celular	156
4.1.6.3. Protoplastos a partir de hoja y a partir de callo	158
 CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES	 160
 CAPÍTULO 6 RECOMENDACIONES	 164
 CAPÍTULO 7 BIBLIOGRAFÍA	 165
 ANEXOS	 177

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1. Tratamientos establecidos para desinfección de semillas	43
Tabla 2.2. Tratamientos establecidos para el rompimiento de dormancia	46
Tabla 2.3 Tratamientos establecidos para germinación de semillas	49
Tabla 2.4. Tratamientos establecidos para el establecimiento de brote	50
Tabla 2.5. Tratamientos establecidos para inducción de callos	53
Tabla 2.6 Tratamientos establecidos para proliferación de callo a partir de semillas geminadas de trigo.	55
Tabla 2.7. Tratamientos establecidos para el aislamiento de protoplastos a partir de hoja	58
Tabla 2.8. Tratamientos establecidos para el aislamiento de protoplastos a partir de callo.	61
Tabla 3.1 Prueba de chi cuadrado en contaminación de semillas de trigo con respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio.	64
Tabla 3.2 Recuento de datos y porcentajes de contaminación en semillas de trigo con respecto a las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio.	64
Tabla 3.3 Prueba de chi cuadrado en contaminación de semillas de trigo con respecto a los tiempos de inmersión en NaClO	65
Tabla 3.4 Recuento de porcentajes de contaminación en semillas de trigo con respecto al tiempo de inmersión en NaClO	66
Tabla 3.5 Prueba de chi cuadrado en contaminación de semillas de trigo con respecto a los diferentes fungicidas utilizados.	67

Tabla 3.6	68
Prueba de chi cuadrado en contaminación de semillas de trigo con respecto a tratamiento de desinfección.	
Tabla 3.7	69
Recuento de porcentajes de contaminación en semillas de trigo con respecto a los diferentes tratamientos de desinfección.	
Tabla 3.8	71
Prueba de chi cuadrado en germinación de semillas de trigo con respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio.	
Tabla 3.9	72
Prueba de chi cuadrado en germinación de semillas de trigo con respecto a tiempos de inmersión en NaClO.	
Tabla 3.10	72
Recuento de porcentajes de germinación en semillas de trigo con respecto al tiempo de inmersión en NaClO.	
Tabla 3.11	73
Prueba de chi cuadrado en germinación de semillas de trigo con respecto a los diferentes fungicidas utilizados.	
Tabla 3.12	73
Recuento de porcentajes de germinación de semillas de trigo con respecto a los diferentes fungicidas utilizados.	
Tabla 3.13	75
Prueba de chi cuadrado en germinación de semillas de trigo con respecto a los diferentes tratamiento de desinfección.	
Tabla 3.14.	75
Recuento de porcentajes de germinación en semillas de trigo con respecto a los diferentes tratamientos de desinfección	
Tabla 3.15	77
Prueba de chi cuadrado en análisis de contaminación con respecto al tiempo de inmersión de NaClO al 0.2%	
Tabla 3.16	78
Análisis de porcentajes en la contaminación de semillas de trigo con respecto al tiempo de inmersión en NaClO	
Tabla 3.17	79
Prueba de chi cuadrado para la viabilidad de semillas de trigo con respecto al tiempo de inmersión en NaClO al 0.2%.	
Tabla 3.18	81
ANOVA para evaluar el tiempo de germinación con respecto a las diferentes concentraciones de ácido giberélico.	

Tabla 3.19	82
Prueba DHS de Tukey para la germinación con respecto a la concentración de ácido giberélico	
Tabla 3.20	83
ANOVA para cantidad de botes, ancho de la hoja y tiempo de germinación con respecto a concentración de brasinolina.	
Tabla 3.21	83
Prueba HSD de Tukey para cantidad de brotes con respecto a la concentración de brasinolina.	
Tabla 3.22	84
Prueba HSD de Tukey para ancho de la hoja con respecto a las concentraciones de brasinolina	
Tabla 3.23	86
ANOVA para evaluar el tiempo de aparecimiento de callo en un arreglo factorial.	
Tabla 3.24	87
Porcentajes de presencia de callo en tratamientos para proliferación de callos.	
Tabla 3.25	88
Prueba HSD de Tukey para tiempo de aparecimiento de callos con Respecto a concentración de 2,4-D	
Tabla 3.26	89
Estadística descriptiva para presencia de brasinolina con respecto al aparecimiento de callos.	
Tabla 3.27	90
Estadística descriptiva para medios de cultivo con respecto a tiempo de aparecimiento de callos.	
Tabla 3.28	92
Prueba HSD Tukey sobre interacción medio de cultivo*concentración de 2,4D; con respecto a tiempo de aparecimiento de callo.	
Tabla 3.29	95
Prueba de chi cuadrado de Pearson para oxidación de plantas con respecto a la presencia o ausencia de semilla.	
Tabla 3.30	96
Prueba de Chi cuadrado para presencia de callo con respecto a presencia/ausencia de semilla en plantas establecidas	

Tabla 3.31	98
ANOVA para las diferentes variables evaluadas en el aislamiento de protoplastos a partir de hojas <i>in vitro</i> .	
Tabla 3.32	100
Prueba HSD de Tukey para la cantidad de protoplastos con respecto al tiempo de incubación.	
Tabla 3.33	101
Prueba de Tukey para cantidad de protoplastos con respecto a concentración enzimática.	
Tabla 3.34	102
Prueba de HSD Tukey para cantidad de protoplastos con respecto a la interacción entre concentración enzimática y tiempo de incubación.	
Tabla 3.35	104
Prueba de HSD Tukey para disgregación celular con respecto al tiempo de incubación de hojas de trigo con el coctel enzimático.	
Tabla 3.36	105
HDS Tukey para disgregación celular con respecto a la interacción concentración enzimática*tiempo de digestión enzimática	
Tabla 3.37	107
Prueba de HSD Tukey para morfología celular con respecto a tiempo de digestión.	
Tabla 3.38	108
Prueba de Tukey para morfología con respecto a concentración enzimática	
Tabla 3.40	110
ANOVA para aislamiento de protoplastos a partir de callo con respecto a morfología celular, cantidad de protoplastos y disgregación celular.	
Tabla 3.41	111
Prueba HSD de Tukey para la cantidad de protoplastos con respecto al tiempo de incubación.	
Tabla 3.42	112
Prueba HSD de Tukey para la cantidad de protoplastos con respecto a tres concentraciones enzimáticas distintas.	
Tabla 3.43	114
Prueba de HSD Tukey para cantidad de protoplastos con respecto a la interacción entre concentración enzimática y tiempo de incubación.	
Tabla 3.44	115
Prueba de HSD Tukey para disgregación celular con respecto al tiempo de incubación de callos de trigo con el coctel enzimático.	
Tabla 3.45	116

HDS Tukey para disgregación celular de callos con respecto a la concentración enzimática

Tabla 3.46 118

Prueba de HSD Tukey para la disgregación celular con respecto a la interacción concentración enzimática\*tiempo de incubación.

Tabla 3.47 119

Prueba de HSD Tukey para la morfología celular con respecto a tiempo de incubación.

Tabla 3.48 120

Prueba de HSD Tukey para morfología celular con respecto a concentración enzimática

Tabla 3.49 122

Prueba de HSD Tukey para morfología celular con respecto a la interacción concentración enzimática\*tiempo de incubación

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1	6
Planta de trigo donde se observa la vaina rodeando el tallo, limbo a cada lado del tallo.	
Figura 1.2	7
Partes de una espiga de trigo.	
Figura 1.3	8
Estructura de un grano de trigo.	
Figura 1.4	11
Chinche que ataca espigas de trigo.	
Figura 1.5	12
Roya que ataca de la hoja.	
Figura 1.6	13
Espigas de trigo afectadas por fusariosiosis.	
Figura 1.7	24
Protoplastos aislados a partir de Brassica oleracea.	
Figura 1.8	24
Disposición de proteínas en la pared celular vegetal.	
Figura 2.1	41
Condiciones de las semillas de trigo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Escuela Politécnica del Ejército.	
Figura 2.2	42
Posicionamiento del embrión en una semilla de trigo.	
Figura 2.3.	42
Semillas de trigo seleccionadas para el inicio de la fase de laboratorio	
Figura 2.4	44
Frasco con una semilla de trigo que presenta contaminación por hongos.	
Figura 2.5	45
Semillas germinadas y no germinadas	
Figura 2.6	47
Viabilidad de semillas mediante tinción	
Figura 2.7	49
Semilla considerada como germinada, presencia de hipocótilo y raicilla	

Figura 2.8. Conteo de brotes a los 40 días desde la siembra.	51
Figura 2.9. Medición de las hojas a los 45 días desde el día de la siembra.	52
Figura 2.10 Aparecimiento de masa indiferenciada a partir del embrión, a los 38 días desde la siembra.	54
Figura 2.11 Plantas de trigo a los 45 días desde su siembra.	56
Figura 2.12 Callos a los 45 días desde su	56
Figura 2.13 Aislamiento de protoplastos. 8 horas de incubación.	58
Figura 2.14 Disgregación celular.	59
Figura 2.15 Células y protoplastos de trigo.	60
Figura 2.16 Cámara de Neubauer	62
Figura 3.1 Gráfico de porcentajes de contaminación fúngica-bacteriana encontrados en semillas de trigo, mediante la utilización de diferentes concentraciones de NaClO.	65
Figura 3.2 Gráfico de porcentajes de contaminación fúngica-bacteriana encontrados en semillas de trigo, mediante una inmersión en NaClO en diferentes tiempos.	66
Figura 3.3 Representación gráfica de porcentajes de contaminación fúngica-bacteriana encontrados en semillas de trigo, mediante el uso de diferentes fungicidas.	67
Figura 3.4 Gráfico de porcentajes de contaminación fúngica-bacteriana encontrados en semillas de trigo, mediante el uso de varios tratamientos de desinfección.	70
Figura 3.5 Porcentajes de germinación encontrados en semillas de trigo, mediante la utilización de diferentes concentraciones de NaClO.	71
Figura 3.6 Gráfico de porcentajes de germinación en semillas de trigo, mediante una inmersión en NaClO en diferentes tiempos.	72

Figura 3.7	74
Representación gráfica de porcentajes de germinación de semillas de trigo, mediante el uso de diferentes fungicidas	
Figura 3.8	76
Gráfico de porcentajes sobre germinación en semillas de trigo, mediante el empleo de varios tratamientos de desinfección	
Figura 3.9	78
Representación gráfica de porcentajes de contaminación de semillas de trigo, con diferentes tiempos de inmersión en NaClO al 0,2%.	
Figura 3.10	79
Gráfico representativo de porcentaje de viabilidad con respecto a tiempo de inmersión en NaClO 0.2%.	
Figura 3.11	80
Hinchamiento de semillas posterior a inmersión	
Figura 3.12	81
Representación gráfica sobre el tiempo de germinación de semillas con respecto a la concentración de ácido giberélico.	
Figura 3.13	82
Tiempo medio de germinación de semillas de trigo con respecto a la concentración de ácido giberélico	
Figura 3.14	84
Representación gráfica sobre cantidad de brotes con respecto a la concentración de brasinolina.	
Figura 3.15	85
Gráfica representativa del ancho de la hoja con respecto a la concentración de brasinolina.	
Figura 3.16	85
Enrollamiento de hoja de trigo con tratamiento brasinolina.	
Figura 3.17	88
Tiempo de apareamiento de callos a partir de semillas de trigo con respecto a la concentración de 2,4-D empleada en el medio de cultivo.	
Figura 3.18	89
Representación gráfica sobre el tiempo de apareamiento de callos con respecto a la presencia de brasinolina.	
Figura 3.19	90
Representación gráfica para el tiempo de apareamiento de callos con respecto al medio de cultivo.	

Figura 3.20	91
Representación gráfica sobre el tiempo de apareamiento de callos con respecto a la interacción medio de cultivo y presencia de brasinolina.	
Figura 3.21	92
Gráfica que representa a la media estimada del apareamiento de callos con respecto al medio de cultivo y concentración de 2,4-D.	
Figura 3.22	93
Representación gráfica sobre el tiempo de apareamiento de callos con respecto a presencia de brasinolina y concentración de 2,4-D.	
Figura 3.23	94
Representación gráfica sobre las medias estimadas para el tiempo de apareamiento de callos con respecto al tratamiento empleado.	
Figura 3.24	95
Representación gráfica para la oxidación de semillas con respecto a presencia de semilla en plantas germinadas <i>in vitro</i> .	
Figura 3.25	96
Semilla de trigo pre germinada; a los seis días desde su establecimiento en medio L2 con 2,4-D y presencia de brasinolina.	
Figura 3.26	97
Callo en plantas con semilla.	
Figura 3.29	97
Cantidad de protoplastos en diferentes horas de incubación.	
Figura 3.28	99
Conteo de protoplastos de hoja durante 14 horas de digestión enzimática.	
Figura 3.29	100
Representación gráfica de la cantidad de protoplastos obtenidos en las distintas horas de incubación en la solución enzimática.	
Figura 3.30	101
Cantidad de protoplastos obtenidos por mL de solución enzimática en diferentes concentraciones.	
Figura 3.31	103
Representación gráfica sobre la cantidad de protoplastos obtenida con respecto a la interacción entre concentración enzimática y tiempo de incubación.	
Figura 3.32	104
Representación gráfica sobre los diferentes niveles de disgregación celular (“1” para nula, “2” inicial, “3”media, “4”completa) con respecto al tiempo de digestión celular.	

Figura 3.33	106
Representación gráfica sobre la disgregación celular establecida en cuatro niveles (“1” nula, “2” inicial, “3”media, “4”completa) con respecto a la interacción entre concentraciones enzimáticas y tiempo de incubación.	
Figura 3.34	107
Representación gráfica sobre la morfología celular con respecto al tiempo de incubación.	
Figura 3.35	108
Representación gráfica sobre los diferentes niveles de morfología celular (“1” célula; “2” protoplastos; “3” protoplasto roto) con relación a la concentración enzimática de los diferentes tratamientos.	
Figura 3.36	109
Representación gráfica de los diferentes niveles de morfología (“1” célula; “2” protoplastos; “3” protoplasto roto) con respecto a la interacción concentración enzimática*tiempo de digestión de pared celular.	
Figura 3.38	112
Cantidad de protoplastos obtenidos por mL de solución enzimática, con respecto al tiempo de incubación.	
Figura 3.39	113
Representación gráfica sobre la cantidad de protoplastos con respecto a las diferentes concentraciones enzimáticas.	
Figura 3.40	114
Cantidad de protoplastos con respecto a la interacción concentración enzimática*tiempo de incubación	
Figura 3. 41	116
Representación gráfica sobre nivel de disgregación celular (1 disgregación nula; 2, inicial; 3, media; 4 completa) con respecto al tiempo de incubación.	
Figura 3.42	117
Representación gráfica sobre los niveles de disgregación celular (1 inicial; 2, media; 3 completa) a partir de callos <i>in vitro</i> con respecto a la concentración enzimática.	
Figura 3.43	118
Representación gráfica sobre el nivel de disgregación celular (1disgregación inicial; 2, media; 3 completa) a partir de callos con respecto a la interacción concentración enzimática*tiempo de incubación.	
Figura 3.44	120
Morfología celular (1 célula; 2, protoplasto; 3, protoplasto roto) con respecto al tiempo de incubación.	

Figura 3.45	121
Representación gráfica sobre la morfología celular (1, célula; 2, protoplasto; 3, protoplasto roto) con respecto a la concentración enzimática.	
Figura 3.46	122
Niveles de morfología celular (1, célula; 2, protoplasto, 3 protoplasto roto), con respecto a la interacción concentración enzimática* tiempo de incubación.	
Figura 3.47	123
Protoplastos aislados a partir de callo.	
Figura 3.48	124
Aislamiento de protoplastos a partir de hoja.	
Figura 3.49	124
Aislamiento de protoplastos a partir de hojas de trigo, utilizando la técnica según Gerald.	
Figura 3.50	125
Protoplasto aislado a partir de hoja <i>in vitro</i> mediante técnica de Legood y Walker (1978).	
Figura 3.51	125
Disgregación celular a partir de callos <i>in vitro</i> a las tres horas a partir del inicio de la incubación.	
Figura 3.52	126
Disgregación celular a partir de hojas <i>in vitro</i> a las 9 horas a partir del inicio de la incubación.	

## ANEXOS

ANEXO A: Medio Murashige y Skooge (MS) 1962.....	177
ANEXO B: Medio L2 (Lina, 2005).....	178
ANEXO C: Preparación de solución BH3 0.7M .....	179

## NOMENCLATURA UTILIZADA

AIA: Ácido Indol Acético

ANA: Ácido Naftalén Acético

BH3: Medio de cultivo para protoplastos

g: gramos

mL: mililitros

AG<sub>3</sub>: Ácido giberélico

MES: Ácido 3-(N-morfolino)etano.sulfónico

MS: Murashige & Skooge

L2: Medio Lina para callo a partir de semillas.

2,4-D: Ácido 2,4 dIclorofenoxiacético.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Formulación del problema

El cultivo de trigo (*Triticum aestivum*) es de gran importancia principalmente en países subdesarrollados ya que constituye una de las principales fuentes de alimentación, además presenta un aporte fundamental en cuanto a minerales y oligosacáridos. El 70% de la producción mundial de trigo es utilizada en la producción de harina; el trigo blando es destinado para la producción de pan, mientras que el trigo duro es utilizado en la producción de galletas y harina casera. La parte restante de la producción es destinada para las nuevas siembras, producción de gluten, almidón y el grano de menor calidad además de los subproductos de refinado son utilizados en la elaboración de piensos. (Benítez, 2005).

El Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (1998) describe alrededor de 50 enfermedades que pueden atacar al trigo, dependiendo de la región, temperatura y humedad a las que se cultiva el cereal, dentro de las cuales se incluyen aquellas que atacan a semillas, hojas y espigas. Además es importante mencionar que existen variedades que no pueden adaptarse a las diferentes alturas, por lo que es indispensable para los agricultores realizar pruebas de adaptabilidad antes de una siembra a gran escala. Otro problema importante constituye la cantidad de gluten de las variedades ecuatorianas, que alcanzan a penas el 12.6% (INIAP, 2005).

En el año 1970 Estados Unidos colocó en el mercado internacional trigo a costos reducidos, por lo que desde ese momento el Ecuador importa el 98% de los requerimientos internos, tan solo el 2% restante es producido en el país, lo que corresponde a 5000has, el gobierno actual busca incrementar la producción a 80.000 has, con el fin de abastecer la demanda nacional y busca lanzar variedades mejoradas en cuanto a eficiencia de producción, resistencia a enfermedades y cantidad de gluten (Falconí, 2008). El siguiente problema constituye en que los productores prefieren el

trigo de importación debido a la cantidad de gluten que presenta (14 – 16%), proteína que le confiere elasticidad, calidad y textura del pan (Diario Los Anes, 2009).

## 1.2 Justificación del problema

La biotecnología ofrece varias soluciones para los distintos problemas que se han presentado, dentro de los cuales se pueden mencionar técnicas como transformación, que se basa en modificaciones genéticas. La hibridización somática es otra alternativa, que implica una recombinación de información genética pero sin la inserción de genes foráneos (de otras especies). Para cualquiera de las alternativas mencionadas una de las técnicas más conocidas, rápidas y de mayor acceso en un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales constituye el aislamiento de protoplastos; al establecer esta técnica es posible llevar a cabo transformaciones genéticas o hibridización somática, con lo que se lograría solucionar varios problemas en esta especie (Roca & Mroginski, 1991; Jadán, 2000; Gordon, 2000).

En el periodo correspondiente a los años 1991 a 2008 el Instituto Nacional Autónomo de Investigación Agropecuaria (INIAP) emitió varios informes técnicos en los que se afirma que la variedad de trigo conocida como Cojitambo, es la más cultivada en las provincias correspondientes a Azuay, Loja, Chimborazo e Imbabura debido a su eficiencia de productividad, adaptación al suelo, resistencia a roya amarilla de hoja y de espiga; además presenta un porcentaje de gluten del 12.6%, lo que la hace apta para la fabricación de galletas y fideos. Esta variedad se adapta a varias altitudes (Coronel *et al.*, 1993).

Por otro lado cabe mencionar que este trabajo busca el establecimiento de hojas y callos *in vitro* con el fin de obtener células a partir de cultivos totalmente asépticos, es decir libres de virus y microorganismos en general; además de darnos la facilidad de una rápida obtención de protoplastos, ya que las muestras no desarrollarán tricomas o serás muy pocos (no interfieren en la penetración enzimática), que constituyen una

forma de absorción de humedad, lo que provoca aumento en el tiempo de inicio de penetración enzimática en las hojas, como es el caso del material obtenido en campo; cabe mencionar que los tricomas constituyen una fuente de contaminación (Ely *et al.*, 2005).

En la actualidad existen varios protocolos, a nivel mundial, para la obtención de hojas y callos *in vitro*, además del aislamiento de protoplastos de trigo; en el Ecuador el estudio de trigo se ve limitado a su producción y estudios de patógenos en campo, este estudio es uno de los pocos que busca la optimización de producción de las hojas con la finalidad de tener mayor área foliar, además del ajuste de medios de cultivo que produzcan callos lo suficientemente disgregables para obtener protoplastos.

Según Grosser (2009; conversación vía e-mail), la composición de la solución enzimática que utilizan para la obtención de protoplastos en cítricos, puede ser utilizada en otras plantas, debido a la eficiencia observada en la mezcla de las tres enzimas utilizadas y el regulador osmótico en alta concentración; por lo que esta es la solución enzimática elegida para el estudio.

Es importante mencionar que al establecer el protocolo para el aislamiento de protoplastos en la variedad Cojitambo, no se requiere estandarizarla para otras líneas que pertenezcan a *Triticum aestivum*, es decir que la técnica es útil para la misma especie y/o familia debido a que la estructura de la pared celular es similar. Esto se ha comprobado en un estudio realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (ESPE), donde se pudo aislar protoplastos de Babaco y Gigacho con la misma técnica (Rivera, 2010); se corrobora esta investigación en una estudio realizado en la Universidad Rodrigo Facio de Costa Rica, donde se emplea la misma técnica en aislamiento de protoplastos de dos variedades de *Citrus sinensis cv* (Jadán, 2000).

### 1.3 Objetivos e hipótesis

#### 1.3.1 Objetivo principal

Obtener y aislar protoplastos de trigo (*Triticum aestivum*), variedad Cojitambo, mediante el establecimiento de hojas y callos *in vitro* provenientes de semillas.

#### 1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar el método de desinfección apropiado para la introducción *in vitro* de semillas de trigo.
- Establecer el mejor medio nutritivo para la inducción y propagación de hojas de la variedad Cojitambo a partir de semilla.
- Determinar el medio nutritivo adecuado para el establecimiento y proliferación de callos de *Triticum aestivum* a partir de semilla.
- Establecer la técnica de aislamiento de protoplastos a partir de hojas y callos de trigo obtenidos *in vitro*.

#### 1.3.2 HIPÓTESIS

Es posible obtener y aislar protoplastos de trigo (*Triticum aestivum*), variedad Cojitambo, a partir de hojas y callos establecidos *in vitro* provenientes de semillas.

## 1.4 Marco teórico

### 1.4.1 Características generales de la especie

#### 1.4.1.1 Taxonomía

El trigo es un cereal monocotiledonar, perteneciente a la familia de las gramíneas o conocida con el nombre de Poáceas, tribu *Hordeae* (Carrera *et al.*, 2005).

En el año 1753 Carl Von Linneo realiza la primera clasificación del Triticeae a la que pertenecen: el trigo (*Triticum*), centeno (*Secale*) y la Cebada (*Hordeum*).

En 1918, Sakamura clasifica las especies del género *Triticum* en función del número de cromosomas, y la división se estableció de la siguiente manera: Diploide (14 cromosomas y genoma AA), Tetraploide (28 cromosomas y genoma AABB) y Hexaploide (42 cromosomas y genoma AABBDD) (Benítez, 2005).

Bowden (1991) realizó una nueva clasificación a los géneros correspondientes a trigos poliploides, al descubrir que estos no provenían de la multiplicación de un mismo genoma, sino a la adición de genomas de características similares, es el caso de los genomas BBDD de trigos hexaploides, a los cuales se les clasificó dentro del género *Aegilops*.

*Triticum aestivum* conocido también como trigo blando es la especie más cultivada a nivel mundial y pertenece al grupo hexaploide (Carrera *et al.*, 2005).

Dentro de los nombres científicos que se encuentran como sinónimos se mencionan los siguientes: *T. hybernum*, *T. macha*, *T. Sphaerococcum*, *T. Vulgare* (United States Department of Agriculture, 2009).

#### 1.4.1.2 Descripción botánica

El trigo es una planta herbácea que alcanza una altura entre 30 y 180 cm, desarrolla entre cuatro y ocho hojas lanceoladas con un ancho de 0,5 a 1cm y una longitud de 15 a 25 cm, la vaina rodea la longitud del entrenudo, y el limbo se prolonga a cada lado del tallo (Figura 1.1).



Figura 1.1 Planta de trigo donde se observa la vaina rodeando el tallo, limbo a cada lado del tallo (Puglia, 2003).

El sistema radicular es fasciculado, las raíces pueden alcanzar hasta 2m de longitud y nacen de la semilla (Dirección General Tecnológica Agropecuaria, 1987; Carrera *et al.*, 2005)

La espiga presenta dos glumas (Figura 1.2a) por cada nudo con una sola espiguilla que incluye un número variable de flores fértiles que dependerán de cada variedad; además es una planta autógama, si los estambres salen al exterior es porque la fecundación se ha efectuado (Figura 1.2b); el grano de trigo normalmente es ovalado y posee una longitud de 4 a 10 mm. Y su color varía del blanco al rojo (Carrera *et al.*, 2005).

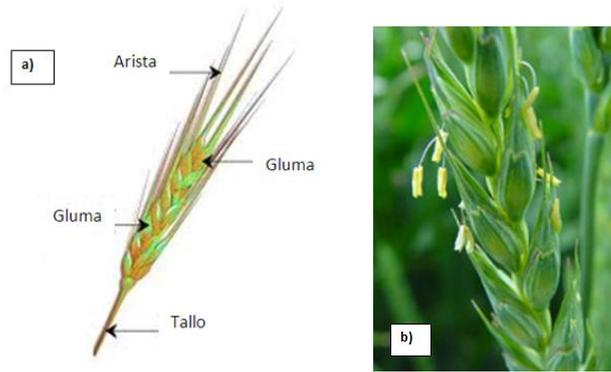


Figura 1.2 Partes de una espiga de trigo. a) Disposición de glumas. b) Disposición de estambres (Wheat Genetic and Genomic Resources Center, 2010).

Carrera, *et al.* (2005) afirman que el grano de trigo es una carióspside desnuda que presenta en el interior varias capas como se observa en la Figura 1.3:

-El pericarpo es la capa de recubrimiento y protección de todo el grano de trigo.

-El tegumento que constituye las células protectoras del embrión se denomina testa y le proporciona la pigmentación a los granos.

-Albumen o endospermo está rodeado por una capa de células denominada capa de aleurona que internamente presenta un albumen harinoso de células llenas de almidón y gluten.

-El Embrión que se encuentra en la parte inferior de la cara dorsal y está rodeado por el cotiledón único cuya función es la de llevar reservas desde el albumen hacia el embrión durante la germinación.

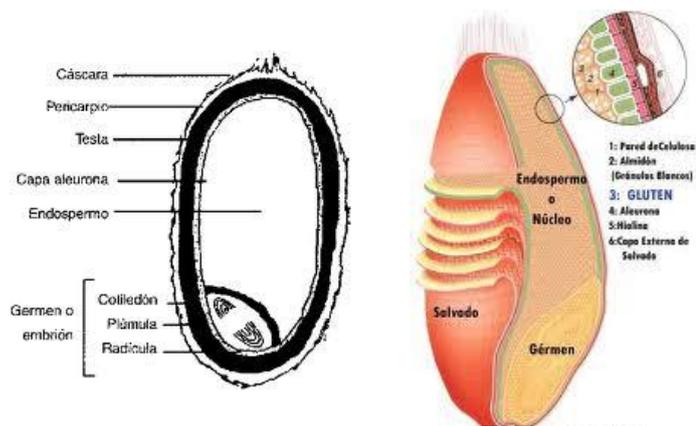


Figura 1.3 Estructura de un grano de trigo (Gómez, 2003).

En condiciones normales la semilla germina entre cinco y diez días después de la siembra; de una semilla pueden desarrollarse varios tallos y el número depende de la variedad y de la distancia a la que se siembra una semilla de otra. Para la floración de los cereales de invierno se requiere de una vernalización, que consiste en el sometimiento de las semillas a una fase de enfriamiento por varios días, el fotoperiodo es necesario para días largos.

El trigo se cultiva en zonas templadas y pueden crecer en áreas calurosas y de baja humedad, la temperatura óptima está entre 25 y 31°C; los límites de temperatura radican entre 4 y 43°C, para su germinación y permanencia estable (Dirección General Tecnológica Agropecuaria, 1987).

La variedad estudiada en la presente tesis (Cojitambo) tiene un ciclo vegetativo que corresponde a 175 días, la altura de planta se encuentra entre 80 y 90cm y la espiga presenta un color blanco barbado (Coronel *et al.*, 1993).

#### 1.4.1.3 Exigencias edafoclimáticas

Temperatura: La temperatura ideal para la germinación y el crecimiento de este cereal se encuentra entre 10 y 25°C.

Suelo: requiere suelos profundos, para el buen desarrollo del sistema radicular. Al ser poco permeables los suelos arcillosos conservan demasiada humedad durante los inviernos lluviosos. El suelo arenoso requiere, en cambio, abundante lluvia durante la primavera, dada su escasa capacidad de retención. En general se recomienda que las tierras que dispongan de un buen drenaje.

pH: La producción de trigo es mejor en suelos neutros o algo alcalinos, cabe mencionar que los microorganismos beneficiosos del suelo prefieren este tipo de suelos.

#### 1.4.1.4 Ciclo vegetativo

El ciclo vegetativo del trigo comprende tres periodos:

Período vegetativo: esta fase inicia con la siembra del cereal; el grano de trigo requiere de una temperatura de 20 a 25°C, pero puede germinar, en menores porcentajes, a temperaturas entre 3-4°C o 30-32°C, la humedad no debe sobrepasar 11%; la facultad germinativa del trigo dura entre 4 a 10 años; pero es recomendable utilizar las semillas en un máximo de dos años, ya que a medida que aumenta el tiempo disminuye su capacidad germinativa; una vez que se forma la raíz primaria y algunas hojas la planta puede alimentarse por si misma, y las reservas del grano se agotan, aquí culmina el proceso de germinación.

Dentro de este periodo se encuentra el ahijamiento que corresponde al tiempo durante el cual las zonas de los tallos que están en contacto con la tierra, crecen dando lugar a raíces adventicias y nuevos tallos secundarios llamados "hijos"; y se denomina padre a la planta principal que salió del grano, "hijos" a las secundarias y siguientes y "macolla" al conjunto de todas ellas; no existe un límite de ahijamiento, pero una planta bien ahijada tendrá al menos 20 tallos secundarios (INTA, 1998).

Periodo de reproducción: Esta fase comienza con el encañado que constituye el crecimiento del tallo debido al alargamiento de los entrenudos; esto ocurre cuando la temperatura aumenta y los nudos pierden la capacidad de generar hijos.

Durante la fase de encañado la planta sufre una gran actividad fisiológica que no finaliza hasta la madurez. La extracción de elementos nutritivos del suelo es muy elevada, sobre todo en nitrógeno y la extracción de agua del suelo es muy considerable.

Cuando empieza la fase del espigado los estambres se secan, caen y el ovario fecundado va creciendo, convirtiéndose en un grano de trigo verde, hinchado y lleno de un líquido lechoso, a partir de este momento comienza la madurez del trigo (INTA, 1998).

La etapa del espigado es el de máxima actividad fisiológica, con una transpiración y una extracción de humedad y alimentos del suelo que llegan al máximo. Los azúcares de las hojas inferiores van emigrando a los granos de trigo que se forman mientras las hojas se van secando. La cantidad de agua necesaria para transportar a los granos de trigo las sustancias de reserva, hace que las raíces desequen la tierra con facilidad, por ello el riego en esta fase resulta muy importante.

Período de maduración: esta fase inicia en la "madurez láctea" cuando las hojas inferiores ya están secas, y el resto de la planta está verde, seguidamente tiene lugar la "maduración pastosa", en la que sólo se mantiene verdes los nudos y el resto de la planta toma su color típico de trigo seco, tomando el grano su color definitivo.

A los tres o cuatro días del estado pastoso llega el cereal a su "madurez completa". Por último se alcanza la "madurez de muerte", en el que toda la paja está dura y quebradiza; así como el grano, saltando muy fácilmente de las glumillas y raquis (INTA, 1998).

#### 1.4.1.5 Variedades

Las variedades de trigo pueden determinarse de acuerdo a su ciclo, entre estos tenemos:

Ciclo largo o variedades de otoño: Las variedades de trigo que se siembran en otoño, completan su ciclo vegetativo madurando al iniciarse el verano siguiente, debido a la falta de resistencia de las condiciones ambientales desfavorables durante este periodo.

Ciclo corto o variedades de primavera: Las variedades sembradas en primavera, necesitan más de un año para madurar y son las llamadas "de invierno". La cualidad de los trigos invernales o primaverales es independiente de las demás cualidades de la variedad (INTA, 1998).

#### 1.4.1.6 Plagas que afectan los cultivos

Dentro de las plagas que atacan estos cultivos se encuentran los chinches (*Aelia* y *Eurygaster*) (Figura 1.4), estos organismos emiten enzimas destruyen el gluten, además de atacar las espigas.



Figura 1.4 Chinche que ataca espigas de trigo (Maganto, 2010).

Otras plagas de importancia son los pulgones, insectos chupadores que extraen la savia de la planta, atacando las hojas y las espigas, si el ataque es severo produce una disminución del rendimiento de la cosecha

Finalmente se tiene a los nemátodos que penetran en el tejido radicular, succionan el jugo celular y ponen sus huevos en la corteza radicular. Las raíces dañadas se tornan pardas, dando lugar a necrosis y finalmente mueren. Los campos infectados de nemátodos muestran zonas circulares de plantas con crecimiento raquítico y hojas descoloridas. Los ataques pueden confundirse con pulgones o encharcamientos (INTA, 1998).

#### 1.4.1.7 Enfermedades

Las enfermedades que pueden atacar al trigo son principalmente producidas por hongos, las mismas que se describen a continuación:

Royas. (*Puccinia striiformis*, *P. recondita*, *P. graminis*): hongos que ocasionan pústulas en hojas (Figura 1.5) y espigas de los cereales, éstas contiene un gran número de esporas, que son transportadas por el viento, propagando la enfermedad. En las hojas, las pústulas alteran el metabolismo, disminuye su rendimiento. En el tallo afectan a los vasos conductores, disminuyendo el transporte de savia; quedando el grano pequeño y rugoso (INTA, 1998).

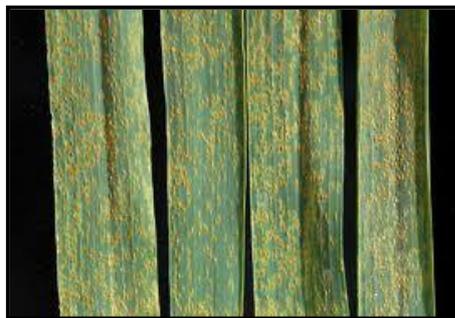


Figura 1.5 Roya que ataca de la hoja (INTA, 1998).

Oidio (*Erysiphe graminis*): La temperatura favorable para su desarrollo está comprendida entre 15 y 20°C. Los síntomas de la enfermedad se manifiestan por la aparición del micelio, que toma forma de borra blanca, que finalmente se torna gris, apareciendo pequeños puntos negros.

Caries o tizón del trigo. (*Tilletia controversa*): Es un hongo del grupo de los Basidiomicetos que ataca al grano de trigo, éstos contienen en su interior un polvillo negruzco, constituido por numerosas esporas del hongo. Los granos atacados suelen ser más pequeños y redondos que los granos normales, cuyo interior queda totalmente destruido y sólo subsiste la envoltura externa. Las espigas atacadas son más erectas que las sanas debido a que el grano no pesa. Se encuentra sólo en trigos de invierno, siendo la temperatura óptima de esporulación de 5-8°C. En condiciones desfavorables de germinación, las esporas pueden sobrevivir en el suelo durante muchos años. Las infecciones más frecuentes de las plántulas proceden del suelo (INTA, 1998).

Septoriosis del trigo. (*Septoria nodorum*, *S. tritici*): Este hongo se origina en las semillas infectadas, propagándose primero a las hojas senescentes y más tarde afectando al tejido verde, atacan a las plantas jóvenes. La infección se origina tanto en los residuos vegetales como en las gramíneas espontáneas

Fusariosis. (*Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. nivale*): El ataque afecta espigas (Figura 1.6), base del tallo y plántulas. Los patógenos sobreviven en las semillas o en los restos de plantas, siendo el número de plantas huésped relativamente grande.



Figura 1.6 Espigas de trigo afectadas por fusariosis (ITG, 2010).

Carbón. (*Ustilago nuda*): Este hongo sobrevive en forma de micelio latente en el embrión de la semilla, manifestándose los síntomas después de espigar. Durante la floración, las espigas pueden ser infectadas por esporas transportadas por el aire.

Podredumbre del tallo. (*Cercospora herpotrichoides*): Este hongo puede sobrevivir hasta unos tres años en el suelo en los rastrojos infectados. Durante la primavera, los conidios infectados de los rastrojos que yacen superficialmente penetran en las vainas de las hojas jóvenes, dando lugar a manchas en forma de medallón. Los tejidos afectados mueren.

Podredumbre de raíz y tallo. (*Gaeumannomyces graminis*): Se trata de una de las podredumbres más importantes de la zona templada. Este hongo inverna en forma de micelio sobre rastrojos y raíces del trigo; las hifas del hongo se extienden a lo largo de la superficie de las raíces. Las partes atacadas se ennegrecen y se pudren y las plantas supervivientes experimentan una madurez temprana, dando lugar a la decoloración de las espigas (INTA, 1998).

#### 1.4.1.8 Distribución geográfica y origen de la especie

El origen de los primeros trigos, *T. monococcum* y *T. dicoccum*, data hacia 15.000 – 10.000 años a. C. y el cultivo se expandió desde el Medio Oriente hacia México y el resto del mundo.

En la actualidad se cultiva en una gran variedad de climas desde zonas fría como Siberia, Canadá, Escandinavia hasta zonas ubicadas en el Ecuador; las zonas donde los cultivos resultan más favorables son aquellas cuya estación húmeda es seguida por una seca y cálida; los trigos de las principales áreas húmedas son los blandos, mientras en las zonas secas se cultivan los duros.

La distribución de trigo en América se encuentra en su mayoría ubicada en el norte y sur, Estados Unidos, Canadá, Australia, Argentina, Ecuador, Bolivia, entre otros (Carrera *et al.*, 2005).

En el año 1983 la variedad Cojitambo fue obtenida en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y se originó por cruzamiento de las variedades BONANZA/YECORA/3/F.3575/KALIAN-ZONA/BLUEBIRD (Coronel *et al.*, 1993).

#### 1.4.1.9 Importancia de la especie

La importancia del trigo blando, de forma general, se refiere a la obtención de harina para la fabricación de pan, papillas, galletas, granos pelados, pastelería, entremeses. La harina de trigo es rica en proteínas y pobre en grasa lo que ayuda a que se conserve mayor tiempo en comparación con otros cereales.

La proteína que le da a la harina de trigo su valor panadero y semolero es el gluten, que constituye un complejo formando granos de almidón; las reservas amiláceas representan el 85% del peso del grano, el 13% es tegumento y el 2% corresponde al germen de trigo (Carrera *et al.*, 2005).

El trigo se encuentra dentro de la principal fuente de alimento a nivel mundial después del maíz; esto se debe a sus propiedades alimenticias, contiene en promedio 84mg de aminoácidos por cada kilogramo de harina de trigo (Benítez, 2005).

La variedad Cojitambo posee una capacidad de germinación de 90 a 94%, con un rendimiento harinero de 63 al 66%, cantidad de proteínas de 12.6%, presenta buena aptitud panadera y da buen volumen de pan (Coronel *et al.*, 1993). Por todo lo mencionado esta constituye una variedad apropiada para este estudio.

#### 1.4.2 Cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* consiste en la desinfección de cualquier material vegetal, el mismo que será cultivado en frascos de vidrio bajo condiciones de total asepsia, brindándole todos los nutrientes, hormonas y demás compuestos necesarios para su desarrollo, cuya finalidad consiste en la obtención de órganos, tejidos o plantas completas.

Según Jiménez (1998), el cultivo de tejidos aparece en el año 1902 gracias a las investigaciones de Haberlandt sobre el cultivo de células aisladas de plantas, de donde se derivó el postulado sobre la totipotencia celular, base de la técnica del cultivo *in vitro*.

A partir del año 1950 se tiene a disposición información sobre los avances obtenidos en cuanto a reguladores de crecimiento y medios de cultivo con lo que se logra desarrollar una serie de investigaciones como la regeneración de plantas a partir de callos, obtención de miles de plantas a partir de una planta madre, gracias a la micropropagación, y el aislamiento de células individuales capaces de regenerar plantas completas (Pérez, 1998).

Al colocar un explante, que pueden ser hojas, yemas, meristemos, entre otros; en el medio de cultivo según el regulador de crecimiento que se utilice y también la cantidad de hormonas endógenas, existen dos caminos de desarrollo de dicho explante; este puede generar una masa amorfa de células totipotentes que pueden posteriormente dar lugar a nuevos brotes, embriones o agregados celulares de menor tamaño dependiendo del nuevo medio de cultivo que se utilice; o seguir la segunda vía de desarrollo que constituye la generación de nuevos brotes (Calva, Pérez, 2005).

El cultivo *in vitro* a partir de semillas presenta algunas ventajas ya que estas se producen en grandes cantidades y su cultivo genera plantas individuales y de bajo costo;

además aquellas que son generadas son libres de la mayoría de enfermedades y plagas; su pérdida de viabilidad se da después de mucho tiempo (Geroge *et al.*, 2008).

En el año 1960, Cocking, introduce un método químico utilizando celulasas y pectoliasas para la obtención de células sin pared, las cuales fueron modificadas para la reproducción viral o generación de nuevas variedades vegetales (Roca y Mroginski, 1993).

El cultivo *in vitro* es la base para el desarrollo de otras técnicas biotecnológicas; se conoce que se han utilizado protoplastos para estudios sobre infección viral, con lo que se ha logrado conocer la sincronía de los eventos en el proceso y ahora se sabe cómo evitar infecciones masivas en cultivos vegetales (Peñaranda, 1996); esto se ha logrado debido a las características de los protoplastos dentro de las cuales se puede mencionar que constituyen células individuales, se pueden aislar poblaciones uniformes y numerosas de células haploides desprovistas de pared, partiendo de tejido mesófilo; aquellos recién aislados son homogéneos y no presentan variabilidad genética, y por último son los sistemas más adecuados para la interpretación estadística (Roca y Mroginski, 1993).

En el cultivo de protoplastos la membrana plasmática está en contacto directo con el medio, por lo que puede ser de utilidad para estudios sobre transporte a través de la membrana y su estructura. Además de la posibilidad de aislar organelos, de donde se derivarían estudios sobre vacuolas, mitocondrias, cromosomas, etc. por separado (Vasil & Thorpe, 1998).

La técnica del cultivo *in vitro* no puede estar aislada de las demás técnica biotecnológicas ya que tiene estrecha relación con otras ramas, como por ejemplo las verificaciones moleculares de los estudios obtenidos en cultivo *in vitro*.

El cultivo de tejidos puede definirse como el conjunto de técnicas que permiten el cultivo de órganos, tejidos, células y protoplastos en condiciones de total asepsia, utilizando medios nutritivos artificiales y brindando al explante las condiciones ambientales adecuadas (Pérez, 1998).

#### 1.4.2.1 Técnicas empleadas del cultivo in vitro

##### 1.4.2.1.1 Germinación de semillas

La germinación de las semillas requiere de condiciones ambientales adecuadas y fitohormonas endógenas necesarias; según Kamiya & García (1999) la condición obligatoria para que la germinación pueda ocurrir es la luz, debido a que este evento está regulado por el fitocromo; y según Arteca (1996); Watkinson y Pill (1998) afirman que el regulador de crecimiento que promueve la germinación es el ácido giberélico, mientras que el ácido abscísico la inhibe (Araya *et al.*, 2000).

Estudios moleculares recientes demostraron que el metabolismo y la síntesis de giberelinas están reguladas por el fitocromo, por lo que se confirma que se encuentran relacionadas directamente; con este antecedente otros estudios demuestran que al utilizar cámaras de crecimiento donde todas las condiciones pueden ser controladas el uso de 5 mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico sustituyó el requerimiento lumínico (Hernández, 1990).

Las condiciones que se mencionan en bibliografía sobre los requerimientos ambientales para la germinación de semillas de trigo son las siguientes: temperatura comprendida entre 16 y 28°C con un fotoperiodo entre 12 y 16 horas luz entre 2000 y 2500 lux, humedad relativa entre 50 y 60% (Velázquez y Fuentes, 2002).

Leubner & Metzger (2001) realizaron varios estudios sobre los efectos de las brasinolininas y giberelinas en la germinación de semillas de tabaco; encontraron que ambas tienen efectos sobre germinación, eliminación de la dormancia ocasionada por el ácido abscísico; además descubrieron que tanto las brasinolininas como el ácido

giberélico actúan por diferentes rutas metabólicas, y son complementarias en los procesos mencionados (Sasse, 2003).

En el cultivo *in vitro* previo a un proceso de germinación es necesario pasar por varias fases, desde la selección de semillas, con la finalidad de trabajar con material que proporcione buenos resultados en la experimentación; además es necesario que estas se encuentren en el estadio fisiológico adecuado para que el proceso de germinación sea correcto; a continuación se mencionan las fases previas a la germinación de semillas.

#### a) Selección del material vegetal

Para que el cultivo *in vitro* cumpla con su finalidad el material de partida debe provenir de una planta élite, generalmente se utilizan plantas en estado activo de crecimiento que demuestren un desarrollo sano y vigoroso; es más recomendable utilizar material vegetal cultivado en invernaderos o viveros, pero esto no siempre es posible; es por esta razón que se requiere de pre-tratamientos de desinfección para garantizar la introducción de explantes libres de contaminación a un ambiente controlado y aséptico (Pérez, 1998).

Para este estudio se requieren semillas colectadas previamente de plantas élite, las mismas que deben estar almacenadas en condiciones de humedad menores a 15%, y a temperaturas inferiores a 15°C, con la finalidad de mantener las semillas viables durante varios años (Erazo, 2004).

#### b) Rompimiento de latencia y/o dormancia de la semilla

Una semilla latente es aquella que aunque tiene capacidad germinativa no la desarrolla debido a condiciones ambientales poco favorables dentro de las cuales se puede mencionar cantidad de luz, humedad, temperatura, entre otras. La dormancia se debe a que las condiciones internas de la semilla no le permiten germinar; es decir que

al tener todas las condiciones ambientales necesarias no se activa; las causas son varias: presencia de cubiertas impermeables en la semilla, dormición embrional, presencia de inhibidores de germinación, impermeabilidad de membranas celulares (De la cuadra, 1992)

Tanto la latencia y la dormancia son de gran importancia, principalmente en el cultivo de trigo en suelo, ya que gracias a la latencia la semilla germinará únicamente cuando las condiciones sean suficientemente favorables y esta pueda sobrevivir y desarrollarse normalmente; y la dormancia asegura la supervivencia de la semilla frente a cambios bruscos de condiciones, si se habla de un cultivo en campo; pero en el cultivo *in vitro* esto se convierte en desventaja al momento de germinar semillas para la obtención de plantas nuevas (De la cuadra, 1992).

Según Baskin & Baskin (2004) existen especies cuyas semillas presentan dormición en diferentes niveles, estos pueden reducirse con incrementos paulatinos de temperatura; por otro lado Wareing & Saunders (1971) describieron un modelo de balance hormonal relacionado directamente con el ácido giberélico, dónde se observa un efecto promotor de la germinación al adicionarle este regulador de crecimiento (Chantre *et al.*, 2008).

Otros estudios han revelado que existen especies cuyas semillas poseen estados de dormancia muy leves y que con una inmersión en agua corriente (imbibición) algunas horas antes de su introducción son suficientes; esto debido a que el hinchamiento de las semillas activa el transporte de ácido giberélico endógeno, dando lugar a una pronta germinación (De la cuadra, 1992).

Las fases de latencia son más fáciles de controlar en un laboratorio, debido a que las condiciones pueden ser manejadas en casi un 100%, por lo que lo más importante es darle al interior de la semillas las condiciones más apropiadas para que inicie su germinación en tiempos cortos.

### c) Desinfección

La contaminación de los explantes pueden deberse a dos razones; la primera y más común se refiere a que la superficie de las planta donadoras y sus tejidos constituyen hábitats para bacterias, hongos y levaduras; en segundo lugar la contaminación se da en consecuencia de un mal manejo dentro del laboratorio en técnicas de introducción.

Los desinfectantes más utilizados corresponden al hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, peróxido de hidrógeno; los mismos que son empleados en concentraciones entre 1 y 3% en tiempos de 10 a 20 minutos; también puede utilizarse etanol en una concentración del 70%; El bicloruro de mercurio es tóxico por lo que se lo utiliza en concentraciones de 0.1% durante un máximo de 3 minutos (Pérez, 1998).

Muchas veces resulta útil aplicar un tensoactivo, con el fin de reducir la tensión superficial y eliminar las burbujas que se forman en el área externa y cavidades del explante (Pérez, 1998), por ejemplo el Tween-20 puede adicionarse en concentraciones máximas de 0.1% en agitación junto con el material vegetal a una velocidad de 80 a 150 rpm (Roca y Mroginski, 1993).

No es recomendable colocar los antibióticos de alta especificidad en el medio de cultivo, ya que altera su composición, restando poder a los nutrientes que lo componen (Roca y Mroginski, 1993); pero en la fase de desinfección puede someterse al explante a una etapa corta en concentraciones bajas, con el fin de eliminar bacterias y hongos (Pérez, 1998).

Para la desinfección de semillas se utiliza hipoclorito de sodio en concentraciones entre 2 y 3% hasta 30 minutos; etanol al 70% hasta cinco minutos; la selección de tiempos dependerá del tipo de introducción, si es de embriones o directamente de semillas (Smith, 1992).

#### 1.4.2.1.2 Establecimiento de brotes

La división celular que genera el esteroide conocido como brasinolina, se convierte en específica al combinarla con otro regulador de crecimiento; es decir que al adicionar alguna giberelina, el brasinoesteroide será capaz de generar división celular para germinación y crecimiento; provocando mayor cantidad de brotes y de mejor tamaño (Geroge *et al.*, 2008).

Niveles bajos de brasinoesteroides provocan una elongación significativa en coleóptilos y mecótilos en las plantas monocotiledóneas (Clouse & Sasse, 2006).

Un estudio demuestra que en Trigo, la brasinolida es capaz de disminuir el efecto de enrollamiento de hoja; lo que significa que el material foliar tendrá mayor ancho comparada con aquellas en las que no se utiliza brasinolina, en donde se demostró también que el ácido 3-indol-acético y el ácido abscísico son inhibidores de este efecto (Wada *et al.*, 1985; Honda *et al.*, 2003).

La concentración de brasinolina necesaria para el desenrollamiento de hojas según Wada *et al.* (1985) es de  $0.01\mu\text{g.mL}^{-1}$  logrando hojas de trigo totalmente desenrolladas de 3.6cm de ancho; esto no ocurre al utilizar concentraciones de AG<sub>3</sub> y 2iP hasta  $100\mu\text{g.mL}^{-1}$  y  $1\mu\text{g.mL}^{-1}$  respectivamente.

#### 1.4.2.1.3 Establecimiento de callos

El callo puede ser obtenido de varios tejidos de una planta, y consiste en el crecimiento desorganizado de células mediante el uso de auxinas exógenas al explante.

Desde el punto de vista morfogénico la utilidad del callo corresponde a la característica de totipotencia, que le da la habilidad de generar brotes, raíces o

embriones somáticos dependiendo del balance del medio de cultivo en cuanto a auxinas: citocinas.

Existen varios estudios en los que se ratifica la utilización de 2,4-D para la inducción de callos a partir de embriones o semillas de Trigo; manteniéndolo en obscuridad a temperaturas entre 16 y 20°C; teniendo un apareamiento promedio de callos a los 20 días (Shimada, 1978; Ghosh & Zapata, 1990).

La producción de callos en cereales a partir de semillas puede realizarse con un medio MS modificado con 2,4-D; pero la producción de callos de trigo fue significativamente menor en comparación al maíz, avena, sorgo y arroz (Masteller & Holden, 1969).

Un porcentaje bajo de células de un explante son las que contribuyen en la formación de callos, estas células se encuentran en la superficie del explante, o en la zona lastimada del mismo; para obtener callos en tiempos reducidos es importante utilizar explantes jóvenes, cuya renovación celular sea alta (Pérez, 1998).

El uso de concentraciones nanomolares de brasinoesteroides junto con auxinas o citoquininas pueden aumentar hasta en un 50% la tasa de división celular, este fenómeno fue observado en suspensiones celulares, formaciones de callos y cultivo de protoplastos (Clouse & Sasse, 1998).

#### 1.4.2.1.4 Aislamiento de protoplastos

Los protoplastos son células desnudas, desprovistas de pared celular, las mismas que son aisladas gracias a métodos mecánicos o enzimáticos (Chawla, 2002); el primero corresponde a la aplicación de choques osmóticos que ocasionan plasmólisis celular, se realizan cortes leves con los que se rompe la pared, y los protoplastos son liberados

gracias a un restablecimiento osmótico. (Roca y Mroginski, 1991). El segundo método consiste en elaborar una mezcla de enzimas capaces de degradar la pared celular, además de poseer reguladores osmóticos.

Los protoplastos (Figura 1.7) pueden ser aislados de varias partes de la planta como frutos, hojas, ápices de raíces, callos, suspensiones celulares, entre otras; el tejido de mayor utilidad debido a la eficiencia en cuanto a la cantidad de protoplastos aislados es el material foliar; con respecto a los callos los que mejor resultados presenta es el material friable (Chawla, 2002).

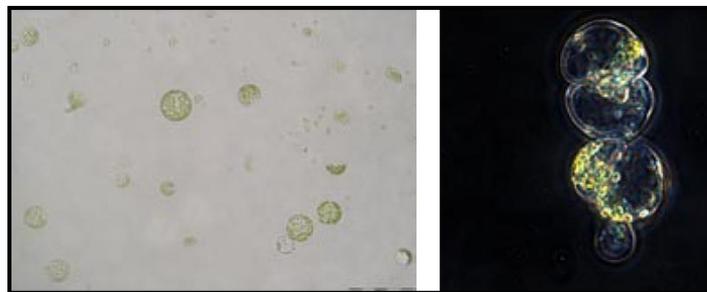


Figura 1.7 Protoplastos aislados a partir de *Brassica oleracea*. barra=100 $\mu$ m (INIA, 2002)

En la pared celular los vegetales poseen tres sustancias a tomar en cuenta para la utilización de enzimas en la digestión de pared celular; corresponden a la celulosa, hemicelulosa y pectina (Figura 1.8). Las dos primeras pertenecen a componentes primarios y secundarios mientras que la última se encuentra en la lamela media y constituye la conexión entre las distintas células; para lo que se utiliza pectinasa (macerozima), capaz de destruir las pectinas junto con la lamela y lograr la separación celular; las celulasas y hemicelulasas son utilizadas para destruir la pared de células separadas (Chawla, 2002).

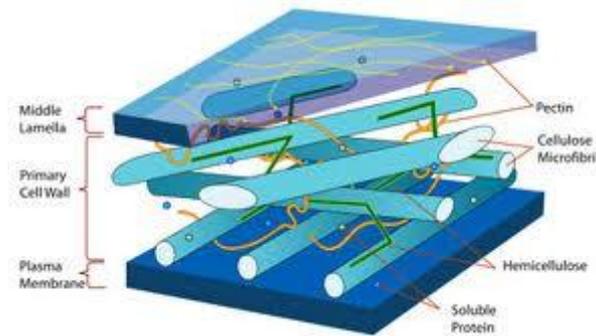


Figura 1.8 Disposición de proteínas en la pared celular vegetal.

La pectinasa más utilizada corresponde a la macerozima, que actúa catalítica y proteolíticamente, es decir que podría ser utilizada sola en una digestión enzimática. Existen enzimas con las que se facilita el aislamiento de protoplastos como helicasas, pectoliasas, entre otros; Para células con pared resistente es necesario utilizar celulasa, especialmente en cereales, como por ejemplo la cebada (Chawla, 2002).

#### a) Importancia del aislamiento de protoplastos

La característica más importante de los protoplastos consiste en que una sola de estas células desnudas tiene la capacidad de producir un organismo altamente diferenciado; en muchas especies se ha logrado observar que los protoplastos son capaces de resintetizar la pared celular, dividirse, formar colonias y plantas completas (Roca y Mroginski, 1993; Jadán, 2000)

Gracias a la ausencia de pared celular los protoplastos son utilizados para diversas manipulaciones genéticas que no son posibles en otras células debido a la protección que le confiere la pared.

Una de las técnicas que utiliza protoplastos constituye la hibridación somática; que ha logrado superar las barreras de incompatibilidad sexual en cultivos de importancia económica, como es el caso de la hibridación entre papa y tomate

(Melchers & Labib, 1974), donde se observó que se regeneraron tomates con características de resistencia al frío (Cubero, 2002). De igual forma se conoce del caso de la transferencia exitosa de la resistencia que posee *Severena buxifolia* al hongo *Phytophthora spp* a la especie de *Citrus sinensis*, sexualmente incompatibles (Agustí, 2003).

Otra de las aplicaciones que tiene el aislamiento de protoplastos es la infección viral; en los primeros ensayos realizados sobre este tema se introdujo el virus del mosaico del tabaco en protoplastos vegetales (Aoki & Takebe, 1969; Cocking & Pojnar, 1969; Otsuki & Takebe, 1969), gracias a esta técnica y los primeros estudios, ahora se conoce la sincronía de los eventos en el proceso de infección viral; y la forma de evitar infecciones masivas en cultivos vegetales (Roca y Mroginski, 1993; Peñaranda, 1996)

En el cultivo de protoplastos la membrana plasmática está en contacto directo con el medio, por lo que puede ser de utilidad para estudios sobre transporte a través de la membrana y su estructura, lo que contribuiría en el conocimiento acerca de los mecanismos que pueden utilizarse en la optimización de absorción, fagocitosis, endocitosis, entre otras. (Vasil & Thorpe, 1998)

Además existe la posibilidad de aislar organelos citoplasmáticos, de donde se derivarían estudios sobre vacuolas, mitocondrias, cromosomas, etc. por separado, generando una idea mucho más clara de la fisiología y el proceso interno de la célula en diferentes condiciones (Vasil & Thorpe, 1998).

En definitiva la importancia del aislamiento de protoplastos deriva estudios en diferentes áreas, principalmente en fitomejoramiento; una técnica interesante corresponde a la captación del DNA que se encuentra en contacto con el medio de cultivo donde se desarrollan los protoplastos; La alta actividad enzimática de los protoplastos puede originar la despolimerización del DNA que se encuentre en el

mismo medio de incubación, dependiendo de las condiciones de temperatura (Roca y Mroginski, 1993).

#### b) Desventajas en el aislamiento de protoplastos

Según Vasil & Vasil (1986) el mayor problema que existe en el aislamiento de protoplastos consiste en su inestabilidad cuando ya se los ha aislado, hablando específicamente de cereales, esto se da por el incremento de senescencia por la acción enzimática de hidrolasas, proteasas y nucleasas, que reducen la actividad metabólica en la división celular después del aislamiento. Según Sawney (1980), este efecto puede ser reducido con retardantes de senescencia como kinetina, poliamidas, arginina o lisina (Fathey & Dismie, 1988).

### 1.4.3 Factores que influyen en el cultivo *in vitro* de hojas y callos

#### 1.4.3.1 Material vegetal

##### 1.4.3.1.1 Condiciones de almacenamiento de las semillas

Las semillas son partes constitutivas de organismos vegetales vivientes, lo que quiere decir que utilizan el CO<sub>2</sub> y el agua para generar oxígeno y energía; pero su actividad se ve reducida al mínimo en condición de semilla, a lo que se conoce como estado de latencia; si las semillas se cosechan en buenas condiciones y su almacenamiento es el correcto pueden retener su efecto germinativo y vigor por varios años (Erazo, 2004).

El objetivo del almacenamiento de semillas consiste en mantenerlas bajo las condiciones adecuadas para que cuando sean utilizadas presenten la capacidad de germinar y generar altos niveles de productividad (Willian, 1991)

Las semillas serán capaces de germinar aún después de décadas de almacenamiento, siempre que se encuentren bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura (Erazo, 2004).

#### 1.4.3.2 Factores químicos

##### 1.4.3.2.1 Sales inorgánicas

Los medios de cultivo poseen dos tipos de compuestos, los macro y micro nutrientes; ambos son necesarios en diferentes concentraciones según la especie que se vaya a estudiar (Evans *et al.*, 2003).

Los nutrientes utilizados en los medios de cultivo son los mismos que han sido establecidos para las plantas cultivadas en campo; dentro de estos tenemos los macroelementos: nitrógeno ( $\text{NO}_3^-$ ;  $\text{NH}_4^+$ ), azufre ( $\text{SO}_4^-$ ), fósforo ( $\text{PO}_4^-$ ), calcio, magnesio y potasio; todos estos compuestos son requeridos en concentraciones milimolares (mM). Los microelementos corresponden a los siguientes: hierro, boro, cobalto, cobre, yodo, manganeso, molibdeno y zinc, estos son requeridos en concentraciones micromolares ( $\mu\text{M}$ ) (Evans *et al.*, 2003; Pierik, 1990; Guerra & Nodari, 2004).

Nitrógeno: forma parte de los aminoácidos, es indispensable para el desarrollo de seres vivos; puede ser adicionado como nutriente orgánico, y uno de sus precursores más utilizados corresponde a la glutamina (Guerra & Nodari, 2004); otras fuentes de nitrógeno son: ácido málico, succínico, o la caseína hidrolizada; este compuesto es indispensable para la diferenciación de partes aéreas de la planta (Pierik, 1990).

Fósforo: es absorbido por la planta en forma de fosfato, e interviene en el metabolismo, activación enzimática, estimula la diferenciación de partes aéreas de la planta (Guerra & Nodari, 2004).

Potasio: es necesario en el metabolismo de carbohidratos y proteínas; es añadido al medio de cultivo como nitrato, fosfato o cloruro; estimula la embriogénesis somática, y es necesario para una absorción de fósforo en cantidades correctas

Azufre: forma parte de la tiamina, coenzima A y biotina, es añadido al medio de cultivo como aminoácido y constituye una fuente importante de nitrógeno.

Calcio junto con el Boro: incrementan la división de células, ayuda a mantener la integridad de la pared y en la germinación de granos de polen (Guerra & Nodari, 2004).

Lo más importante del magnesio y el hierro consiste en su intervención en la síntesis de clorofila; además el magnesio forma parte de esta.

#### 1.4.3.2.2 Carbohidratos

Según Roca & Mroginski (1993) la mayor parte de cultivos vegetales establecidos *in vitro* son heterótrofos; por lo que se considera importante la adición de una fuente de carbono; en cultivo de tejidos es de uso frecuente la sacarosa (Lentini *et al.*, 1997).

La sacarosa se utiliza en concentraciones del 2 al 5% siendo esta la más habitual; pero existen especies o tejidos en las que se requiere una concentración mayor (6 al 12%) como es el caso de cultivo de anteras; además si se trata de plantas monocotiledóneas ocasionalmente se sustituye o adiciona al medio fructosa o almidón (Pierik, 1990; Lentini *et al.*, 1997).

Generalmente el desarrollo y el crecimiento de los cultivos se ven incrementado de acuerdo a la concentración de azúcar disponible en el medio de cultivo; llega a un punto máximo y comienza a descender esta concentración (Pierik, 1990; Roca & Mroginski, 1991).

#### 1.4.3.2.3 Vitaminas y aminoácidos

Las vitaminas como el mioinositol y la tiamina son muy utilizadas en plantas monocotiledóneas y gimnospermas, ya que juegan un papel importante en la pared celular y en la membrana; además la L-glutamina es usada como fuente de nitrógeno orgánico (Pierik, 1990).

Tiamina: cataliza la oxidación del ácido pirúvico en el ciclo respiratorio de las plantas, por lo que se la considera de vital importancia para su supervivencia.

Riboflavina: Estimula el crecimiento de raíces, gracias a su acción en la disminución de auxinas endógenas de las plantas.

Las vitaminas, en general, tienen la característica de no influir en el cambio de la estructura de la planta, pero participa en la nutrición y asimilación de nutrientes, aceleran el crecimiento de las estructuras de las plantas al estar en combinación, en proporciones establecidas, con reguladores de crecimiento (Miller, 1992).

#### 1.4.3.2.4 Reguladores de crecimiento

Existen compuestos orgánicos sintetizados por las mismas plantas y son conocidas como fitohormonas, estos son capaces de influir en la germinación, crecimiento y desarrollo de la planta; estas presentan influencia en concentraciones muy bajas (Pierik, 1990).

Actualmente para poder adicionar a las hormonas producidas por las plantas; aquellas que son sintetizadas artificialmente se ha incorporado el término regulador de crecimiento; dentro de estos tenemos las auxinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno (Alemán, 2000).

## Auxinas

La auxina natural más utilizada es el ácido 3-indolacético (AIA), su concentración óptima en un medio de cultivo se encuentra entre 0.1 y 1 mg.L<sup>-1</sup>, pero esta concentración depende del tipo de explante además de la concentración endógena de la auxina en la planta; por lo que puede ser utilizada en concentraciones de 0.001-10mgL<sup>-1</sup> (Roca & Mroginski, 1991; Alemán, 2000; Evans *et al.*, 2003).

Existen auxinas sintéticas con mayor efecto sobre ciertas especies como por ejemplo ácido Indol butírico (AIB), ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) o el ácido naftalenacético (ANA) (Pierik, 1990, Roca & Mroginski, 1991).

Existen varios efectos de las auxinas sobre diferentes explantes, pero generalmente producen elongación celular, expansión de tejidos, división celular, todo esto en concentraciones normales; si las concentraciones son bajas predomina la formación de raíces adventicias; si se elevan las concentraciones se inhibe la producción de raíces y se incrementa la formación de callos (Pierik, 1990).

El 2,4-D se utiliza en concentraciones entre 0.1 y 10mg.L<sup>-1</sup> y su concentración óptima se encuentra entre 0.1 a 5mg.L<sup>-1</sup>, esta es considerada una auxina muy fuerte además es tóxica a concentraciones elevadas, ya que puede generar mutaciones en concentraciones mayores a 6mgL<sup>-1</sup> (Alemán, 2000; Roca & Mroginski, 1991).

Las auxinas, en general, mantienen la dominancia apical y reprime el desarrollo de los brotes axilares debido a la polaridad de su transporte desde la parte apical de la planta hacia su base (Evans *et al.*, 2003).

### Citoquininas

Dentro de las citoquininas naturales se encuentran: zeatina, isopentenil-adenina (IPA), dimetil aminopurina, metilzeatina, entre otras; dentro de las sintéticas tenemos: kinetina, N6-bencil aminopurina (BAP) entre las más utilizadas (Alemán, 2000; Pierik, 1990).

Las concentraciones de estos reguladores van entre 1 a 10mg.L<sup>-1</sup>, las citoquininas estimulan la división celular, formación de yemas laterales, morfogénesis, estimula la expansión foliar, retrasa la senescencia foliar y permite la eliminación de dormancia (Pierik, 1990; García, 2004).

### Giberelinas

La giberelina más utilizada corresponde al ácido giberélico (AG3); según Roca & Mroginski (1991), las giberelinas deben ser utilizadas hasta una concentración máxima de 1 mg.L<sup>-1</sup>, niveles superiores a estos se tornan tóxicos.

Las giberelinas incrementan tanto la división celular como su elongación afectando a las hojas y a los tallos; hay que tomar en cuenta que son sensibles al calor y pierde cerca del 70% de actividad al ser autoclavada, por lo que es mejor utilizarla filtrada (García, 2004).

La principal función de las giberelinas, según el fin que tiene este estudio, corresponde a su implicación directa en la promoción de la germinación de semillas;

además se conoce que el fitocromo controla el metabolismo y la síntesis del ácido giberélico, por lo que existe una relación con el factor luz en la germinación (Araya *et al.*, 2000).

### Brasinoesteroides

Los brasinoesteroides son productos naturales que se encuentran en concentraciones mínimas en las plantas, tienen efectos en la división celular, desarrollo vascular, reproductivo y la modulación del estrés ante temperaturas bajas, infección por hongos, daños por herbicidas, o salinidad (Chory *et al.*, 1996; Sasse, 1997; Gómez *et al.*, 2000).

La acción de la brasinolina se vuelve específica, refiriéndose al área de acción, al combinarla con otro regulador de crecimiento, es por esta razón que al adicionarle ácido giberélico es capaz de generar mayor división celular logrando una germinación más rápida (Geroge *et al.*, 2008).

#### 1.4.3.2.5 Agente gelificante

Según Pullman *et al.* (2005), los agentes gelificantes afectan la absorción de auxinas en el medio de cultivo, por lo que aquellos medios para inducción de callos y elongación celular, en donde se utilice auxinas es necesario colocar concentraciones bajas de gelificante entre 0.001 y 0.1mg.L<sup>-1</sup> (Rossi, 2005).

El agente gelificante más utilizado es el phytagel, compuesto sintético, creado exclusivamente para el crecimiento vegetal. También se utiliza agar, que es extraído de algas; dependiendo de los fines del estudio puede también utilizarse agarosa para el cultivo de callos, debido a que posee una estructura más suave, y los nutrientes se encuentran en mayor disponibilidad en comparación con el agar (Ovando, 2000).

#### 1.4.3.3 Factores físicos

Dentro de los factores físicos que influyen en el cultivo *in vitro* tenemos humedad, temperatura, luz. Las temperaturas adecuadas para la formación de callos de una forma general está entre 20 y 24°C, temperaturas mayores a esta degenera rápidamente los explantes, y temperaturas inferiores logra que no se activen los procesos de iniciación de división celular (Roca, Mroginski, 1991).

Como se ha mencionado anteriormente las semillas de trigo requieren varias condiciones específicas para iniciar la germinación, como es el caso de la cantidad de luxes a las que se le somete, además en la semilla de trigo tiene una gran influencia la posición en la que se coloque la semilla en el medio de cultivo para una pronta germinación o inducción de callos.

#### 1.4.4 Factores que influyen en la obtención y aislamiento de protoplastos

##### 1.4.4.1 Material vegetal in vitro

##### 1.4.4.1.1 Edad y condiciones de incubación del material foliar

Según Puite (1992), el mejor material para la obtención de protoplastos es aquel que sea joven y presente un color verde fresco; adicional a esto antes de someterlo a un aislamiento el cultivo debe tener entre 8 y 15 días del apareamiento de las hojas, con la finalidad de que el material se encuentre en división celular (Leegood & Walker, 1979).

La influencia de la incubación de hojas previo al aislamiento de protoplastos se basa principalmente en las condiciones necesarias para obtener un material foliar joven de buen aspecto, buen color, sin daños visibles; lo que se refiere principalmente a la cantidad de luz a la que es sometido el explante, esta debe ser suficiente para la apertura adecuada de las hojas; también es importante que estas no estén en contacto directo con el medio de cultivo debido a que su envejecimiento puede acelerarse (Torres, 1990).

La edad de la semilla no es la parte importante en cuanto al aislamiento de protoplastos, la parte definitiva corresponde a las condiciones que se le da a la semilla para eliminar su estado de latencia o dormancia y pueda dar lugar a hojas grandes, es por esta razón que se recomienda obtener el material foliar en cámaras de crecimiento ya que en estas se pueden controlar la luz (10.000 – 30.000 lux), y el fotoperiodo entre 18 y 16 horas, además de la humedad (Roca & Mroginski, 1991).

Según Szabados & Roca (1986) es importante que las hojas se encuentren totalmente abiertas si se quiere obtener el mesófilo; además se han observados mejores resultados en la obtención de protoplastos a partir de hojas cultivadas *in vitro* que aquellas que se obtienen en invernaderos. (Roca & Mroginski, 1991)

#### 1.4.4.1.2 Edad y condiciones de incubación de callos

Las células jóvenes son indispensables para un buen rendimiento de protoplastos, por lo que se recomienda que aunque el cultivo de callo sea viejo, este debe ser transferido a un medio de cultivo nuevo ocho días antes del aislamiento, con la finalidad de que este se encuentre en plena división celular, por ende exista el apareamiento de células nuevas (Roca & Mroginski, 1991).

En el caso de que los callos deban ser cultivados en medio sólido es importante que este tenga una concentración baja de gelificante; los callos duros y secos son un material de bajo rendimiento en el aislamiento de protoplastos (Roca & Mroginski, 1991).

En un estudio realizado por Xiang *et al.* (2003), se demuestra que callos con edades de uno a dos años son mejores fuentes de protoplastos que aquellos que tienen pocos meses de apareamiento; en ambos casos los subcultivos deben realizarse al menos uno cada treinta días.

Para que los callos jóvenes puedan constituir fuentes importantes de protoplastos estos deben ser subcultivados cada tres semanas al menos tres veces, el medio nuevo debe tener los mismos componentes, y de preferencia en obscuridad si se trata de cereales como el trigo o el maíz a una temperatura de 25°C, con la finalidad de activar rápidamente la división celular (Niseki & Kita, 1981).

#### 1.4.4.2 Factores Químicos

En el aislamiento de protoplastos existen dos medios importantes que son utilizados, primero, la mezcla enzimática junto con algunas sales, estabilizadores y amortiguadores; el segundo es el medio en el que se van a dividir los protoplastos, estos medios son diversos, e intervienen en la estabilización de los mismos una vez que son obtenidos y aislados (Grosser & Gmitter, 1990; Roca & Mroginski, 1991).

##### 1.4.4.2.1 Solución enzimática

Las enzimas constituyen elementos indispensables en el aislamiento de protoplastos, según diferentes estudios las enzimas pueden ser usadas individualmente o en mezclas, con lo que se han obtenido mejores resultados (Roca & Mroginski, 1991)

La mezcla correcta de un medio de digestión enzimática debe contener: al menos una sal disuelta en el medio de cultivo como cloruro de calcio, fosfato de potasio, cloruro de magnesio, entre otros. El calcio y el fosfato son utilizados para conservar la viabilidad de los protoplastos; además debe poseer un amortiguador o solución tampón que puede ser un fosfato o el más utilizado es el MES {ácido 2 (N-morfolino)-etanosulfónico}; debe contener al menos un estabilizador osmótico que pueden ser: manitol, sorbitol, sacarosa o glucosa, esto ya que las células deben ser levemente plasmolizadas el momento de la digestión (Edwards *et al.*, 1978; Roca & Mroginski, 1991; Xiang *et al.*, 2003).

Dentro de las enzimas que deben ser utilizadas se encuentran las celulasas, hemicelulasas y pectinasas; estas enzimas comerciales contienen otras dentro de una mezcla, como por ejemplo proteasas, nucleasas y lipasas (Roca & Mroginski, 1991).

Existen enzimas que no son indispensables para ciertos cultivos pero incrementan notablemente la obtención de protoplastos en una eficiencia significativa con respecto al tiempo, entre estas tenemos las helicasas y las pectoliasas (Chawla, 2002).

La solución enzimática requiere de todos los componentes mencionados con la finalidad de eliminar la pared celular, las lamelas medias y obtener protoplastos aislados en un medio de cultivo que le brinde la osmorregularidad necesaria y estabilidad

#### 1.4.4.2.2 Medio de desarrollo de protoplastos

Junto a la solución enzimática es necesario colocar un medio de desarrollo de protoplastos, para brindarle mayor estabilidad al cultivo además de proporcionarle todos los requerimientos a aquellos que ya han sido aislados, para que se mantengan vivos e hinchados.

No existe un medio estándar para este fin, pero los componentes utilizados son básicamente los mismos.

#### Sales Minerales

El ión calcio es esencial en la estabilización de protoplastos aislados, dentro de las sales minerales pueden utilizarse: nitrato de amonio, nitrato de potasio, cloruro de calcio, sulfato de magnesio, ácido bórico, sulfato de manganeso, sulfato de cobre,

cloruro de cobalto y microelementos del MS (Grosser & Gmitter, 1990; Roca & Mroginski, 1991)

#### Estabilizadores osmóticos

Al existir un estrés hídrico en el momento en el la pared celular es retirada de la célula, es importante regular y alcanzar un nivel óptimo en la presión osmótica. Los reguladores más utilizados son los azúcares como glucosa, manitol, sorbitol, celobiosa, ramnosa, xilosa, ribosa, fructosa, sacarosa, etc. Existen medios de cultivo en los que se utilizan todos estos compuestos, pero los de mayor importancia constituyen el manitol, sorbitol, glucosa y sacarosa (Binding *et al.*, 1981; Grosse & Gmitter, 1990).

#### Reguladores de crecimiento

Es posible adicionar reguladores de crecimiento con el fin de estimular la división celular para lo cual se pueden adicionar 2,4-D o ANA; aunque existen cultivos en los que se constituyen como inhibidores de división de protoplastos (Roca & Mroginski, 1991).

#### Otros compuestos

Con la finalidad de proporcionar todos los nutrimentos necesarios para el mantenimiento de protoplastos se puede adicionar al medio vitaminas como inositol, tiamina, ácido ascórbico, piridoxina, pantotenato de calcio, cloruro de colina, rivo flavina, ácido fólico, entre otros; además se pueden adicionar otras fuentes de nitrógeno como aminoácidos, agua de coco, extracto de levadura (Roca & Mroginski, 1991).

#### 1.4.4.3. Factores Físicos

##### 1.4.4.3.1 Temperatura y tiempo de incubación

En la mayoría de cultivos las concentraciones enzimáticas altas generan protoplastos en tiempos reducidos, la acción enzimática dependiendo de la temperatura y la concentración las enzimas pueden actuar desde 30 minutos a 35 horas; la incubación puede realizarse a temperaturas entre 25 y 30°C, dependiendo de las enzimas; temperaturas inferiores a esta podrían no activar la acción enzimática, y temperaturas mayores pueden degradarlas, o alterar su funcionalidad (Chawla, 2000; Jadán, 2000).

## CAPÍTULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Fase de campo

##### 2.1.1. Localización geográfica

Las semillas de trigo fueron proporcionadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigación Agropecuaria, INIAP, estación Santa Catalina, ubicado en el km 14 vía Quito-Aloag, parroquia Cutuglagua, cantón Quito, provincia de Pichincha, Región Interandina; a una altura de 2400 a 3500 msnm.

##### 2.1.2. Selección, transporte y almacenamiento de semillas

Las semillas secas inicialmente se encontraban almacenadas en bodegas especiales para este fin, bajo condiciones de temperatura controladas de máximo 15°C y una humedad relativa que no excedía un 15%; según Erazo (2004) estas constituyen las condiciones adecuadas para que las semillas de cereales mantengan su viabilidad a lo largo de los años. Ocurre lo contrario con semillas que se encuentran almacenadas a temperatura ambiente, entre 25 y 35°C y humedad relativa entre 50 y 60% donde el deterioro puede incrementarse y las semillas pueden perder totalmente su viabilidad en un periodo de cuatro a seis años (Luz, 2002).

Otra de las razones por las que es necesario mantener las semillas almacenadas a bajas temperaturas corresponde al daño que pueden ocasionar macro y microorganismos, como es el caso de hongos y bacterias, que tienen mayor índice de crecimiento y reproducción en temperaturas más altas (Erazo, 2004).

El transporte del material no tardó más de una hora, bajo condiciones no controladas. En el laboratorio las semillas fueron mantenidas en una bodega donde la temperatura se encuentra a  $19\pm 2^{\circ}\text{C}$  y la humedad varía entre 50 y 60% por un periodo de seis meses (Figura 2.1). Según Landa (2004), las semillas de cereales en condiciones de almacenamiento de temperatura de hasta  $30^{\circ}\text{C}$  y una humedad relativa que no exceda 14%, pueden mantenerse en estado de latencia, es decir que bajo estas condiciones al momento de producir un cambio en el entorno ambiental, las semillas serán capaces de germinar; en el caso de que la humedad se eleve más de 25% la velocidad de deterioro de semillas se verá incrementado con el pasar de los años. Se decidió mantener las semillas en las condiciones mencionadas anteriormente ( $19\pm 2^{\circ}\text{C}$  humedad entre 50 y 60%) ya que el uso de las mismas no excederán los nueve meses.

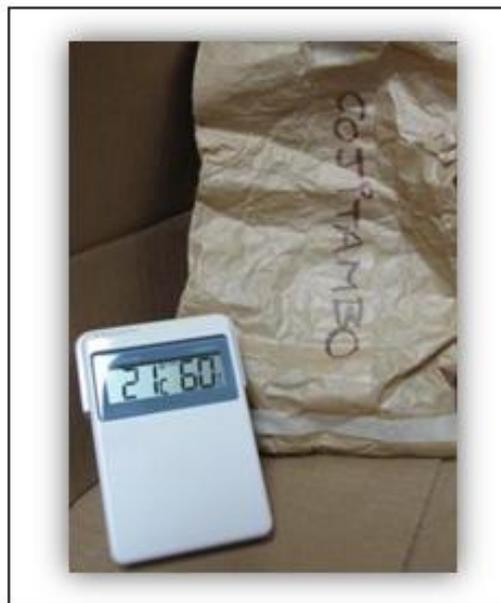


Figura 2.1 Condiciones de las semillas de trigo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Escuela Politécnica del Ejército (Arcos, 2008).

## 2.2. Fase de Laboratorio

### 2.2.1. Localización del ensayo

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología del Departamento de

Ciencias de la Vida de la Escuela Politécnica del Ejército, ubicado en la parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, 0° 18,81 S; 78° 26,64 O; altitud: 2516 msnm

### 2.2.2. Desinfección de semillas.

Previo a la desinfección, se seleccionaron las semillas que se encontraban visualmente en buen estado, las semillas debían estar completas, y de tamaño comprendido entre 5 y 10mm, además, la estructura donde se encuentra el embrión (Figura 2.2) debe estar totalmente unida a la semilla, como puede observarse en la Figura 2.3.

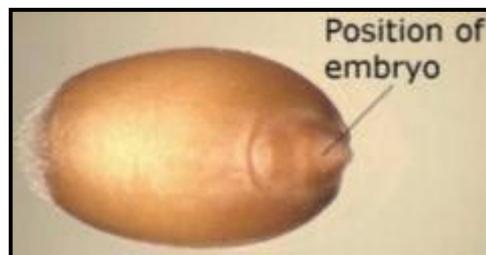


Figura 2.2 Posicionamiento del embrión en una semilla de trigo (Parkinson *et al.*, 2004)

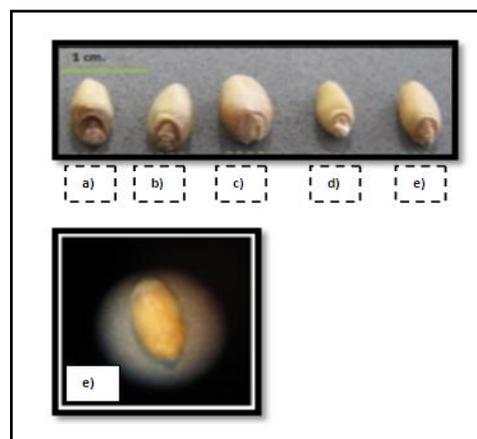


Figura 2.3. Semillas de trigo seleccionadas para el inicio de la fase de laboratorio. a y b semillas no seleccionadas; c, d y e semillas seleccionadas. e. parte inferior: vista de una semilla seleccionada al estereomicroscopio, después de tres horas de hidratación (Arcos, 2008).

En esta fase se realizó un lavado a presión con agua corriente, seguido de un lavado con agua estéril y se procedió a la eliminación de contaminantes con thiram al 0.175% o sulfato pentahidratado de cobre 0.12%, durante 15 minutos, cada fungicida fue utilizado en tratamientos diferentes; se realizaron tres lavados con agua estéril, seguido de una inmersión en etanol al 70% durante cinco minutos, enseguida se sometió a las semillas a un lavado en agitación constante en hipoclorito de sodio en concentraciones de 2% y 2.5%; en tiempos de 5, 10 y 15 minutos como puede observarse en la Tabla 2.1 donde se establece el diseño factorial 2x2x3 (Hall, 1999; Azcón, 2003; Polci *et al.*, 2005; Bensch *et al.*, 2007).

El medio de cultivo MS propuesto por Murashige & Skoog (1962) (ANEXO A) fue empleado para la siembra de semillas desinfectadas, suplementado con 30gL<sup>-1</sup> de sacarosa y agar 5.8g.L<sup>-1</sup>, ajustado a pH 5.75; estos medios fueron esterilizados a una temperatura de 121°C y 15 PSI.

Tabla 2.1. Tratamientos establecidos para desinfección de semillas

TRATAMIENTO	FUNGICIDA	HIPOCLORITO DE SODIO(%)	TIEMPO (min)
D1	Thiram	2	5
D2	Thiram	2	10
D3	Thiram	2	15
D4	Thiram	2.5	5
D5	Thiram	2.5	10
D6	Thiram	2.5	15
D7	Sulfato pentahidratado de cobre	2	5
D8	Sulfato pentahidratado de cobre	2	10
D9	Sulfato pentahidratado de cobre	2	15
D10	Sulfato pentahidratado de cobre	2.5	5
D11	Sulfato pentahidratado de cobre	2.5	10
D12	Sulfato pentahidratado de cobre	2.5	15

Número de repeticiones: 20

Unidad experimental: Un frasco con 25 mL de medio de cultivo MS con una semilla.

VARIABLES EVALUADAS:

**Contaminación:** Mediante la observación se determinó un explante con presencia de hongos o bacterias y se asignó el valor de “1” (Figura 2.4), y a un explante libre de contaminación se le dio la calificación de “2” Esta variable fue evaluada a los 15 días después de la siembra.



Figura 2.4 Frasco con una semilla de trigo que presenta contaminación por hongos (Arcos, 2009).

**Germinación:** Cuando se observó el apareamiento de tejido verde (hipocótilo) y de una raicilla, se lo determinó como semilla germinada y se le dio la valoración de “1”; la semilla que no presentó cambios o solo presentaba una de las dos estructura (raicilla-hipocótilo) obtuvo la numeración de “2” Esta variable fue evaluada 15 días después de la siembra, como se observa en la Figura 2.5.

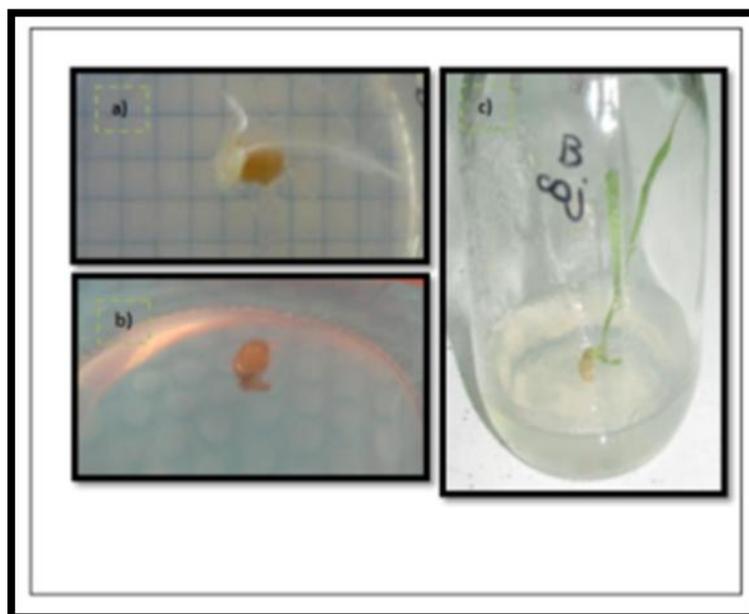


Figura 2.5. a y b Material considerado no germinado; c material germinado. Evaluación a los 15 días desde la siembra (Arcos, 2008).

Análisis estadístico: Se realizó análisis de independencia chi cuadrado además de análisis de porcentajes.

### 2.2.3 Rompimiento de dormancia

Para dar lugar a una germinación rápida, la semilla debe ser sometida a inmersión en agua, a la que puede adicionarse algún regulador de crecimiento como el ácido giberélico; pero algunos estudios han demostrado que no existe diferencia significativa si se la sumerge en agua sin reguladores (De la Cuadra, 1992).

Se probaron varios períodos de imbibición, y para evitar la proliferación de hongos al someterla a largos periodos de hidratación se las sumergió en cloro al 0.2%.

Posterior al tratamiento de imbibición se procedió a combinarlo con el mejor tratamiento de desinfección evaluado en la fase anterior, descartando las semillas que

flotaron en el líquido imbibidor, ya que estas pueden tener algún daño interno, por lo que en ensayos posteriores no fueron utilizadas. Se evaluó la viabilidad de las semillas gracias al empleo de TTZ (Tricloruro de trifeníl tetrazolio) en concentraciones de 1% a una temperatura superior a 40°C y un tiempo no mayor a diez minutos (Silmar, 2004), además se evaluó contaminación por hongos o bacterias.

El tricloruro de tetrazolio actúa sobre las estructuras vivas de la semilla de trigo; tornándolas de color rojo uniforme; cuando existen daños en el embrión la coloración es poco uniforme pero esta podrá regenerar plantas en el 80% de los casos.

En el caso de presentar algún daño con el que el embrión ya no tenga la capacidad de generar plantas no existirá tinción (Craviotto & Arango, 2005).

Para los tratamientos de imbibición se han establecido tiempos de 1, 6, 12 y 24 horas en hipoclorito de sodio al 0.2%, combinados con el mejor tratamiento de desinfección, para la evaluación de contaminación; y se adicionó tiempos de imbibición de 0 y 2 horas para evaluación de viabilidad; se empleó un DCA simple. Los tratamientos empleados se observan en la Tabla 2.2

Tabla 2.2. Tratamientos establecidos para el rompimiento de dormancia

TRATAMIENTO	Tiempo (horas) de imbibición en NaClO
I0	0
I1	2
I2	1
I3	6
I4	12
I5	24

Número de repeticiones: 15

Unidad experimental: Un frasco con una semilla.

Variables evaluadas

Contaminación: Gracias a la observación se dio la valoración de “1” a material contaminado y “2” a frascos con explantes libres de bacterias u hongos. Esta variable fue evaluada a los 15 días después de la siembra; para esta fase se utilizó medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

Viabilidad: Gracias a la visualización en el estéreo microscopio se analizó la coloración roja al ponerlo en contacto con el TTZ 1%, durante 10 minutos a una temperatura de 40°C. Las semillas cuyo embrión y paredes presentaron tinción de color rojo en forma de medio corazón (Craviotto & Arango, 2005) fueron considerados como viables y se les dio una valoración de “1”, y las no teñidas de “2” y son semillas no viables, como se observa en la figura 2.6.



Figura 2.6 Derecha: semilla de trigo teñido en forma de corazón paredes junto con embrión. Izquierda: mitad de semilla de trigo sin tinción (Arcos, 2008).

#### 2.2.4. Fase de germinación

Desde el momento en que se activa el funcionamiento de la semilla, el ácido giberélico endógeno llega al embrión activando el proceso de germinación; por esta razón se utilizó ácido giberélico en diferentes concentraciones en el medio de cultivo con el fin de darle a la semilla una fuente externa del regulador iniciador de la germinación; en este ensayo se evaluó el tiempo de apareamiento de germinación, en días; además las semillas fueron sembradas de forma que el embrión no se encuentre en contacto directo con el medio de cultivo, ya que esto ocasionaría estrés imposibilitando y/o retardando la germinación (Chantre *et al.*, 2008).

Para esto se utilizó el medio MS propuesto por Murashige y Skooge (1962), complementado con  $100\text{mg.L}^{-1}$  de mioinositol,  $10\text{mg.L}^{-1}$  tiamina,  $0.5\text{mg.L}^{-1}$  de piridoxina,  $2\text{mg.L}^{-1}$  de glicina,  $1\text{mg.L}^{-1}$  ácido nicotínico, ácido giberélico en concentraciones de  $0.1\text{mg.L}^{-1}$ ,  $0.5\text{mg.L}^{-1}$ ,  $1\text{mg.L}^{-1}$  y  $2\text{mg.L}^{-1}$ , en los distintos tratamientos;  $5.8\text{ g.L}^{-1}$  de agar y  $30\text{g.L}^{-1}$  de sacarosa como fuente de carbono; este medio será capaz de dar lugar a la germinación de la semilla al tener todos los nutrientes disponibles en su entorno (Roca y Mroginski, 1991).

Estos cultivos fueron mantenidos en una sala de incubación a una temperatura comprendida entre 18 y 24°C con un fotoperiodo de 16 horas luz de 2500 lux, humedad relativa entre 50 y 60% (Velázquez y Fuentes, 2002).

Para determinar la mejor concentración de ácido giberélico en el medio se planteó un DCA simple, cuyos tratamientos se muestran en la tabla 2.3

Tabla 2.3 Tratamientos establecidos para germinación de semillas

TRATAMIENTOS	ÁCIDO GIBERÉLICO (mgL <sup>-1</sup> )
AG1	0.1
AG2	0.5
AG3	1
AG4	2

Número de repeticiones: 15

Unidad experimental: Un frasco con una semilla.

Variables evaluadas:

Tiempo de germinación: Se contaron los días desde el momento de la siembra hasta el día del apareamiento de un eje radical y apical saliendo de la semilla. Se tomó el tiempo en días (Figura 2.7).



Figura 2.7 Semilla considerada como germinada, presencia de hipocótilo y raicilla (circunferencia azul). Fotografía tomada a los cinco días desde la siembra (Arcos, 2009).

Análisis estadístico: Se realizó análisis de independencia chi cuadrado y además de análisis de porcentajes.

### 2.2.5. Fase de inducción de brotes

Según Geroge *et al.* (2008), la división celular que genera el esteroide conocido como brasinolina, se convierte en específica al combinarla con otro regulador de crecimiento, cuya acción sea específica; es por esto que al medio de cultivo MS compuesto por vitaminas, azúcar y agar, además de la mejor concentración de ácido giberélico obtenida en la fase previa, se le adicionó brasinolina en diferentes concentraciones, que será capaz de generar división celular para germinación y crecimiento; provocando mayor cantidad de brotes y de mejor tamaño.

Un estudio demuestra que en trigo, la brasinolida es capaz de disminuir el efecto de enrollamiento de hoja; logrando así generar material foliar de un ancho con el que resultará un aislamiento de protoplastos de mayor facilidad, además de la utilización de menor cantidad de plantas (Wada *et al.*, 1985; Honda *et al.*, 2003).

En esta etapa se evaluó el tiempo de germinación, número de brotes, el ancho de la hoja y el número de hojas por cada brote. El material foliar obtenido a partir de estos ensayos sirvió para el aislamiento de protoplastos.

El medio de cultivo que fue empleado en esta etapa corresponde al mejor obtenido en la fase anterior y se adicionó concentraciones de brasinolina de 0, 0.001, 0.002, 0.003 ppm; para esta etapa se planteó un DCA simple (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Tratamientos establecidos para el establecimiento de brotes

TRATAMIENTO	BRASSINOLINA (ppm)
B0	0
B1	0.001
B2	0.002
B3	0.003

Número de repeticiones: 10

Unidad experimental: Un frasco con 25mL de medio de cultivo con una semilla.

VARIABLES A EVALUADAS:

En esta etapa se evaluó el tiempo de germinación, número de brotes y el ancho de la hoja. El material foliar obtenido a partir de estos ensayos sirvió para el aislamiento de protoplastos

**Tiempo de germinación:** Se contaron los días desde el momento de la siembra hasta el apareamiento del eje radical y apical en las semillas. Se tomó el tiempo en días.

**Cantidad de brotes:** transcurrido un tiempo de 40 días se contaron los brotes que han salido a partir del brote principal (Figura 2.8).



Figura 2.8. Conteo de brotes a los 40 días desde la siembra. a) 7 brotes; b) 5 brotes y c) 9 brotes (Arcos, 2009).

Ancho de la hoja: Se midió la parte más ancha de la hoja, en centímetros. Al pasar 45 días de la siembra se procedió a la medición (Figura 2.9).

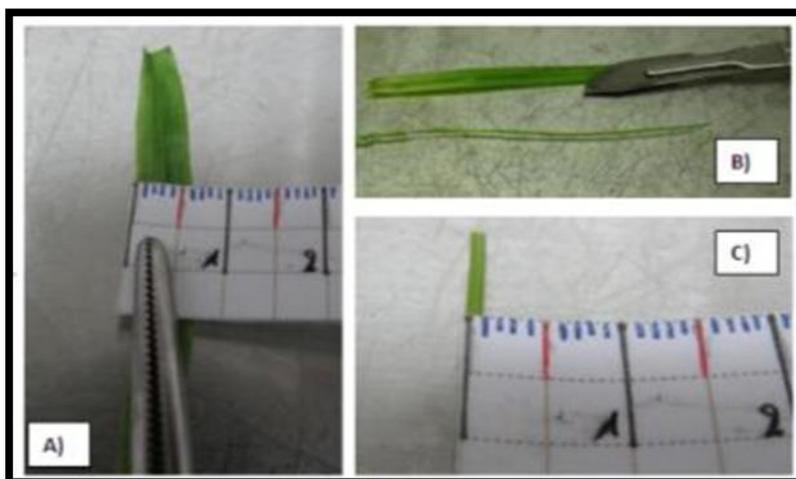


Figura 2.9. Medición de las hojas a los 45 días desde el día de la siembra. A) medición de hoja tratamiento B3. B) comparación hojas de diferentes tratamientos. C) Medición de hoja tratamiento B0 (Arcos, 2009).

Análisis estadístico: En esta fase se realizó un ANOVA con una prueba de Tukey al 5% de confianza.

## 2.2.6. Establecimiento de callos

### 2.2.6.1 A partir de semilla no germinada

Existen varios estudios en los que se ratifica la utilización de 2,4-D para la inducción de callos a partir de embriones y/o semillas de trigo; manteniéndolo en obscuridad a temperaturas entre 16 y 20°C; se obtuvo un apareamiento promedio de callos a los 20 días (Shimada, 1978; Ghosh & Zapata, 1990).

Los medios de cultivo probados en este estudio son: MS complementado con 2,4-D en concentraciones desde  $1\text{mg.L}^{-1}$  hasta  $6\text{ mg.L}^{-1}$ (Elnfishi, 2008; Roca y

Mroginski, 1991), y el medio L2 (Lina, 2005) (B), que también se ha utilizado para el establecimiento de callos (Hall, 1999); y se adicionó brasinolida en concentración de  $1\text{mg.L}^{-1}$  con el fin de dar lugar a una división celular más rápida (Anuradha & Ram, 2003).

Se evaluó el tiempo de apareamiento de callos, su tamaño, y grado de friabilidad; este último es de gran importancia debido a la disposición y rapidez con la que se puede aislar protoplastos de callos cuya disgregación celular sea fácil (Roca y Mroginski, 1991).

Es importante determinar el mejor tratamiento para la inducción rápida de callos friables. Y se estableció un diseño factorial de  $2 \times 2 \times 3$ , utilizando dos clases de medios de cultivo MS y L2; además tres concentraciones de 2,4-D; y la aplicación de Brasinolina en una concentración de  $1\text{mg.L}^{-1}$  (Figura 2.5).

Tabla 2.5. Tratamientos establecidos para inducción de callos

TRATAMIENTO	MEDIO DE CULTIVO	BRASINOLINA	2,4 D ( $\text{mgL}^{-1}$ )
C1	MS	Si	2
C2	MS	Si	2.5
C3	MS	Si	3.5
C4	L2	Si	2
C5	L2	Si	2.5
C6	L2	Si	3.5
C7	MS	No	2
C8	MS	No	2.5
C9	MS	No	3.5
C10	L2	No	2
C11	L2	No	2.5
C12	L2	No	3.5

Número de repeticiones: 10

Unidad experimental: Un frasco con 25mL de medio de cultivo con una semilla no germinada.

Variables a evaluadas:

Tiempo de aparecimiento de callo: Se tomaron los días a partir de la siembra, hasta el aparecimiento de la primera masa celular indiferenciada que aparece en la zona del embrión (Figura 2.10).

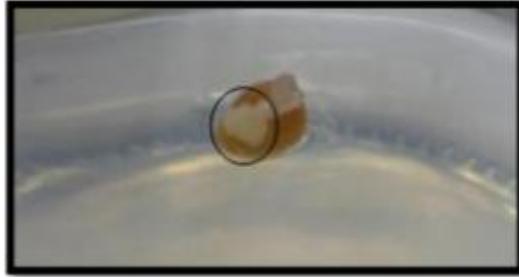


Figura 2.10 Aparecimiento de masa indiferenciada a partir del embrión, a los 38 días desde la siembra (Arcos, 2009).

Tamaño: Se estableció una escala para indicar el nivel de crecimiento del callo; “1” callo pequeño, “2” callo mediano si ocupa un tercio del medio nutritivo y “3” callo grande, si ocupa dos tercios del medio de cultivo. Estos datos fueron tomados después de 60 días desde su siembra.

Friabilidad: La escala de friabilidad se determinó de la siguiente manera, “1” para callos poco friables; “2” medianamente friables y “3” callos friables, la calificación de la escala será determinada de acuerdo la facilidad con que el callo logra disgregarse. Los datos fueron tomados 60 días después de aparecimiento de callo.

Análisis estadístico: Se realizó un ANOVA para los datos de diseños factoriales, además de análisis comparativos para los tratamientos con Tukey al 5%.

### 2.2.6.2 A partir de planta con semilla

Con los mejores resultados obtenidos en las pruebas establecidas para semillas no germinadas se establecieron tratamientos para la comprobación de proliferación de callos a partir de semillas germinadas de trigo *in vitro*; para lo que se estableció semillas de 45 días a partir de su siembra, con crecimiento regular, y plantas de trigo obtenidas *in vitro* desprovistas de su semilla. Para lo cual se estableció un DCA simple como se observa en la tabla 2.6.

Tabla 2.6 Tratamientos establecidos para proliferación de callo a partir de semillas geminadas de trigo.

Tratamiento	Presencia de semilla
F1	Con semilla
F2	Sin semilla

Número de repeticiones: 10

Unidad experimental: Un frasco con 35mL de medio de cultivo con una planta de trigo *in vitro* de 45 días.

Variabes a evaluadas:

Presencia de callo: Se le dará la valoración de “1” si existe callo (Figura 2.11) a los 45 días después de la siembra; se le dará la valoración de “2” si no existe presencia de callo.

Oxidación: Se le dará la valoración de “1” si la planta presenta algún grado de oxidación (Figura 2.11); se le asignará el valor de “2” si no existe oxidación.

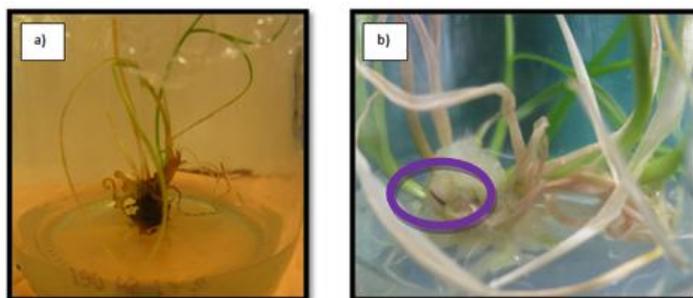


Figura 2.11 Plantas de trigo a los 45 días desde su siembra, a) Planta sin semilla, ausencia de callo y presencia de oxidación; b) planta con semilla presencia de callo y ausencia de oxidación.

Análisis estadístico: Se realizó una prueba de chi cuadrado y análisis de porcentajes.

Adicional a este análisis se decidió comprobar la proliferación de callos a partir de semillas de trigo no germinadas (Figura 2.12) utilizando el medio establecido por Lina (2005) conocido como L2 además ANA Y BAP en una relación 3 a 1, sometido a luz continua; de lo cual no se estableció un diseño estadístico formal, por lo que se presentarán los resultados obtenidos por observación en relación a los callos obtenidos en oscuridad (Hall, 1999).



Figura 2.12 Callos a los 45 días desde su apareamiento a) Callos de luz adicionado ANA y BAP relación 3 a 1; b) callos establecido en oscuridad Medio L2 regulador 2,4-D.

### 2.2.7 Aislamiento de protoplastos a partir de hoja

Para el aislamiento de protoplastos se utilizó el material foliar establecido en las fases anteriores, aproximadamente 0.5 gramos, la técnica empleada fue la establecida por Leegood y Walker (1978) en la que se pica y pasa el bisturí por toda la superficie de la hoja, con el propósito de lastimar la mayor cantidad del haz y envés logrando que se encuentre en contacto con las enzimas (Jadán, 2000).

La solución enzimática fue establecida en tres tratamientos diferentes según las concentraciones utilizadas en investigaciones que sirvieron de base para este estudio; se utilizó pectoliasa, celulasa y macerozima; con el propósito de separar células vegetales y además eliminar la pared celular (Gerald *et al.*, 1978; Xia *et al.*, 2003; Ghosh, 1990).

Según Grosser y Gmitter (1990), la solución osmoreguladora, que ayuda a los protoplastos a tener forma esférica con el fin de que sean totalmente viables, es el conocido BH3 (ANEXO C) (Jadán, 2000).

Cada componente de la solución fue filtrado a través de una membrana de 0,2 um.; la solución BH3 y la enzimática fueron colocadas en la misma cantidad; esta mezcla, junto con los trozos de hoja, fue sometida a vacío para que la solución enzimática pueda penetrar en el tejido; posteriormente se los sometió a incubación durante 14 horas; tiempo en el que se evaluó la cantidad de protoplastos viables, la morfología y disgregación celular; a temperatura de incubación de  $27\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  (Jadán, 2000).

El diseño planteado para esta fase corresponde a un DCA simple, cuyos tratamientos se presentan a continuación. (Tabla 2.7)

Tabla 2.7. Tratamientos establecidos para el aislamiento de protoplastos a partir de hoja

TRATAMIENTOS	Celulasa (%), Macerozima (%), pectoliasa (%)
P1	2- 2- 0,3
P2	3- 3- 0,3
P3	4- 4- 0,3

Número de repeticiones: 4

Unidad experimental: un erlenmeyer con 0.5g de hoja picada y 4 ml de solución.

VARIABLES A EVALUADAS

Cantidad de protoplastos por mL de solución: A partir de la primera hora se contó el número de protoplastos viables, (según Ghosh (1990) son considerados viables los protoplastos que no presentan daños en la membrana y son totalmente esféricos) existentes por cada  $\text{cm}^3$ ; para lo cual se empleó una cámara de Neubauer. Los datos fueron tomados cada hora, durante 14 horas (Figura 2.13).

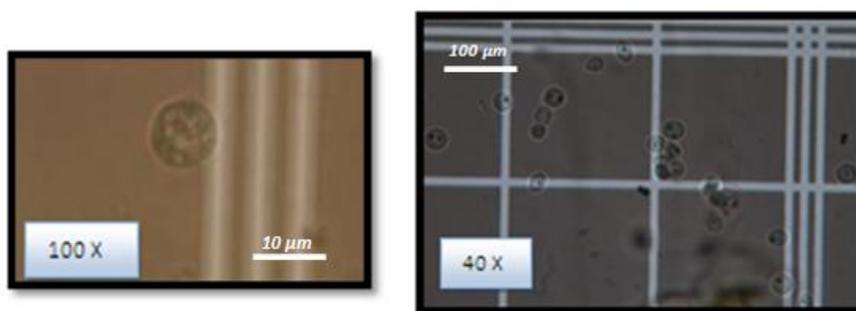


Figura 2.13 Aislamiento de protoplastos. 8 horas de incubación, derecha- protoplasto viable (Arcos, 2009).

Disgregación celular: Esta parte se refiere a la separación que tienen las células entre sí, cuando se logra una disgregación completa no existen cúmulos celulares. Para

esto se estableció una escala “1” para nula, “2” inicial, “3” media, “4” completa. Los datos fueron tomados cada hora, durante 14 horas (Figura 2.14).

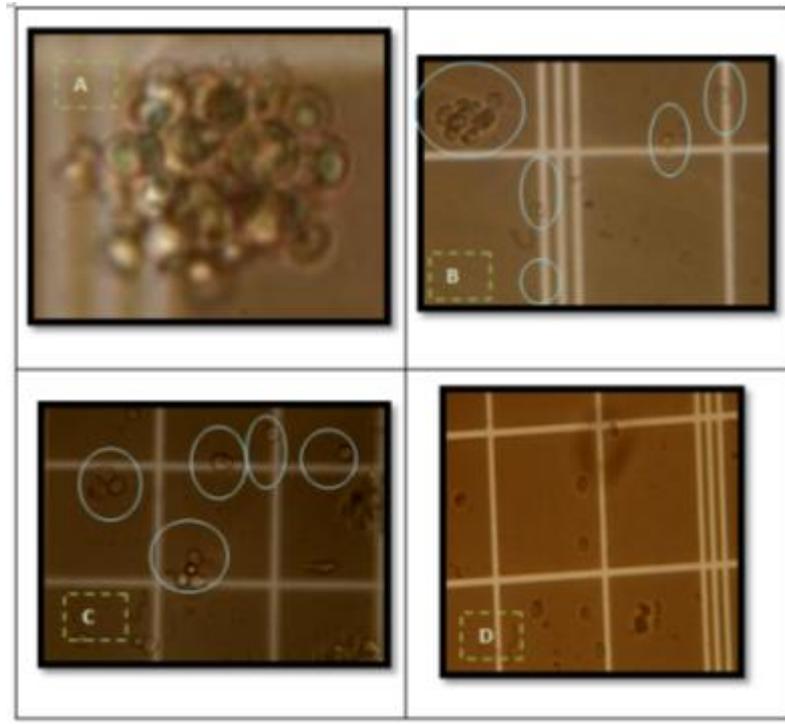


Figura 2.14 Disgregación celular A. nula, microscopio óptico 100x. B. inicial Microscopio óptico 45x. C. media, Microscopio óptico y D completa, microscopio óptico 45x (Arcos, 2009).

Morfología celular: Para la obtención de protoplastos las células deben pasar por estadios diferentes, y se establece una escala que los determina como: “1” célula, “2” protoplasto, “3” protoplasto roto. Se tomará en cuenta la predominancia en la placa, mayor al 50%, los datos fueron tomados cada hora, durante 14 horas (Figura 2.15).

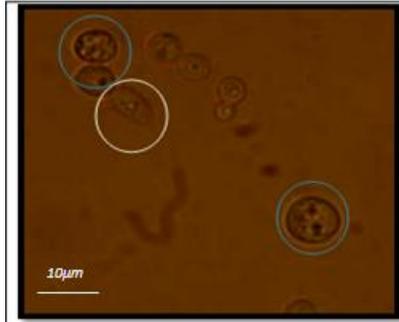


Figura 2.15 Circunferencia blanca célula. Circunferencia celeste protoplasto.  
Microscopio óptico 45x (Arcos y Jadán, 2009).

Análisis estadístico: Para esta etapa se tomarán en cuenta los resultados obtenidos en el tiempo de incubación en el que el número de protoplastos sea el mayor en todos los tratamientos; se realizará análisis de ANOVA, además de pruebas de Tukey 5% de significancia.

#### 2.2.8. Aislamiento de protoplastos a partir de callo

Para el aislamiento de protoplastos a partir de callos se agregó aproximadamente 0.1g de callo friable, en 1.5 ml del medio para la regulación osmótica BH3; se añadió la misma cantidad de solución enzimática con diferentes concentraciones de macerozima, pectoliasa y celulasa.

Se los sometió a agitación de 50 rpm durante 11 horas a una temperatura de incubación de 27°C. Durante este tiempo se contó la cantidad de protoplastos viables obtenidos, disgregación celular y morfología (Jadán, 2000).

El diseño planteado para esta fase corresponde a un diseño DCA simple, cuyos tratamientos se presentan a continuación. (Tabla 2.8)

Tabla 2.8. Tratamientos establecidos para el aislamiento de protoplastos a partir de callo.

TRATAMIENTOS	Celulasa (%), Macerozima (%), pectoliasa (%)
Q1	2- 2- 0,3
Q2	3- 3- 0,3
Q3	4- 4- 0,3

Número de repeticiones: 4

Unidad experimental: un erlenmeyer con 0.3g de callo y 3 ml de solución.

VARIABLES A EVALUADAS

Cantidad de protoplastos por mL de solución: A partir de la segunda hora se contó el número de protoplastos viables existentes por cada  $\text{cm}^3$ ; para lo cual se empleó una cámara de Neubauer. Los datos fueron tomados cada hora, durante 11 horas.

Disgregación celular: Esta parte se refiere a la separación que tienen las células entre sí, cuando se logra una disgregación completa no existen cúmulos celulares. Para esto se establece una escala “1” para nula, “2” inicial, “3” media, “4” completa y “0” para agregados. Los datos fueron tomados cada hora, durante 11 horas.

Morfología celular: Para la obtención de protoplastos las células deben pasar por estadios diferentes, y se establece una escala que los determina como: “1” célula, “2” protoplasto, “3” protoplastos roto. Se tomará en cuenta la predominancia en la placa, mayor al 50%, los datos fueron tomados cada hora, durante 11 horas.

Análisis estadístico: Para esta etapa se tomarán en cuenta los resultados obtenidos en el tiempo de incubación en el que el número de protoplastos sea el mayor

en todos los tratamientos; se realizará análisis de ANOVA, además de pruebas de Tukey 5% de significancia.

Para el conteo de protoplastos, tanto de hoja como de callo, se utilizó una cámara de Neubauer (Figura 2.16) con la finalidad de conocer la cantidad de protoplastos por mL de solución cada hora.

Se tomaron para referencia 5 cuadros de la cámara central, y se contaron las células existentes en cada cuadro, se realizó un promedio de células y se multiplicó por 25 cuadros que son los que contienen la cámara central y finalmente se multiplicó por la profundidad de la cámara.

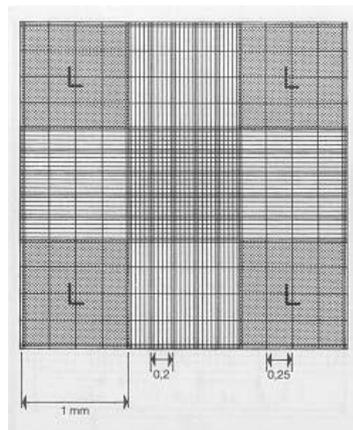


Figura 2.16 Cuadrícula en cámara de Neubauer

Programa estadístico: se utilizó el programa SPSS 17.0 para el análisis estadístico de resultados.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Establecimiento de semillas *in vitro*

El establecimiento *in vitro* de semillas de trigo se llevó a cabo en diferentes etapas, incluyendo pruebas de desinfección, tratamientos pregerminativos, evaluando viabilidad en base a germinación y tinción.

##### 3.1.1 Desinfección.

En esta fase se evaluó la contaminación y la capacidad germinativa de las semillas, a partir de tratamientos con hipoclorito de sodio (2 y 2.5%) y tiempos de inmersión de 5, 10 y 15 minutos; además se evaluó el uso de dos fungicidas (Thiram y sulfato pentahidratado de cobre).

##### 3.1.1.1 Contaminación

###### a) Concentración de hipoclorito de sodio

En esta fase se evaluó la contaminación con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio utilizada, mediante una prueba de chi cuadrado por la cual se obtuvo un valor estadísticamente no significativo (Tabla 3.1), con lo que se demuestra que no existe dependencia entre la concentración de hipoclorito de sodio (2 y 2,5%) y la variable contaminación.

Tabla 3.1 Prueba de chi cuadrado en contaminación de semillas de trigo con respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio.

	Valor	Gl	Signif. Asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0.095	1	0,758 N.S.
Razón de verosimilitudes	0,095	1	0,758 N.S.
Nº de casos válidos	228		

Adicional a esta prueba se realizó un análisis de porcentajes en el que se observa, en ambos casos (2 y 2.5% de hipoclorito de sodio), resultados muy similares (Tabla 3.2 y figura 3.1)

Tabla 3.2 Recuento de datos y porcentajes de contaminación en semillas de trigo con respecto a las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio.

TRATAMIENTOS	Porcentaje de contaminación	
	SEMILLAS CONTAMINADAS	SEMILLAS NO CONTAMINADAS
Porcentaje hipoclorito de sodio 2%	25%	75%
2,5%	24%	76%
Total	25%	75%

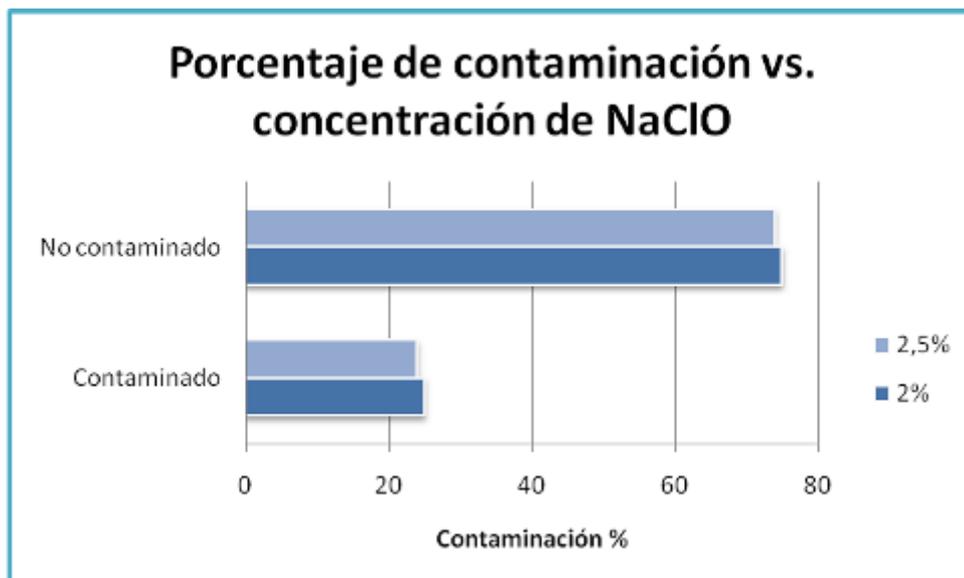


Figura 3.1 Gráfico de porcentajes de contaminación fúngica-bacteriana encontrados en semillas de trigo, mediante la utilización de diferentes concentraciones de NaClO.

b) Tiempo de inmersión en cloro

En complemento a la fase anterior se evaluó la contaminación con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio, mediante una prueba de chi cuadrado en la que se obtuvo un valor altamente significativo (Tabla 3.3), con lo que se demuestra la dependencia entre el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio y contaminación.

Tabla 3.3 Prueba de chi cuadrado en contaminación de semillas de trigo con respecto a los tiempos de inmersión en NaClO

	Valor	Gl	Signif. Asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	30.157	2	2,828E-07**
Razón de verosimilitudes	29,985	2	3,083E-07**
Nº de casos válidos	228		

Además se realizó un análisis de porcentajes (Tabla 3.4 y figura 3.2) con la finalidad de encontrar los mejores resultados (10 y 15 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio).

Tabla 3.4 Recuento de porcentajes de contaminación en semillas de trigo con respecto al tiempo de inmersión en NaClO

TRATAMIENTOS		PORCENTAJES DE CONTAMINACIÓN	
		SEMILLAS CONTAMINADAS	SEMILLAS NO CONTAMINADAS
Tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio	5 minutos	46%	54%
	10 minutos	18%	82%
	15 minutos	9%	91%
Total		25%	75%

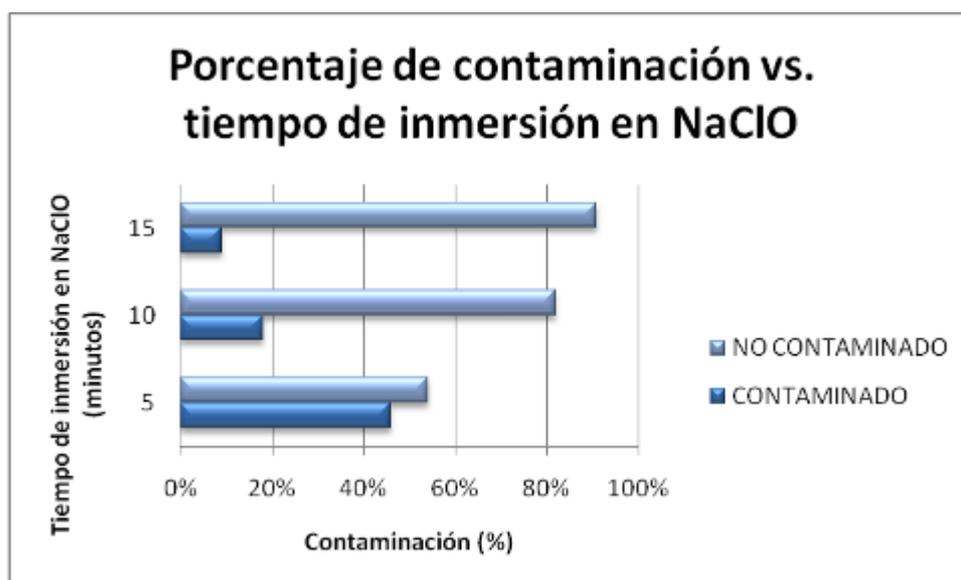


Figura 3.2 Gráfico de porcentajes de contaminación fúngica-bacteriana encontrados en semillas de trigo, mediante una inmersión en NaClO en diferentes tiempos.

c) Tipo de fungicida

En esta fase se evaluó la contaminación con respecto al tipo de fungicida, cuyos principios activos corresponden a thiram y sulfato de cobre pentahidratado (fúngico-bacteriano); mediante una prueba de chi cuadrado, donde se obtuvo un valor no significativo (Tabla 3.5), que demuestra independencia entre el tipo de fungicida y la contaminación.

Tabla 3.5 Prueba de chi cuadrado en contaminación de semillas de trigo con respecto a los diferentes fungicidas utilizados.

	Valor	Gl	Signif. Asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0,000	1	1,000 N.S.
Razón de verosimilitudes	0,000	1	1,000 N.S.
Nº de casos válidos	228		

Adicional a esta prueba se realizó un análisis de porcentajes en el que se puede observar en pruebas con fungicida, principio activo Thiram o Sulfato de cobre pentahidratado, los resultados obtenidos son iguales (Figura 3.3)

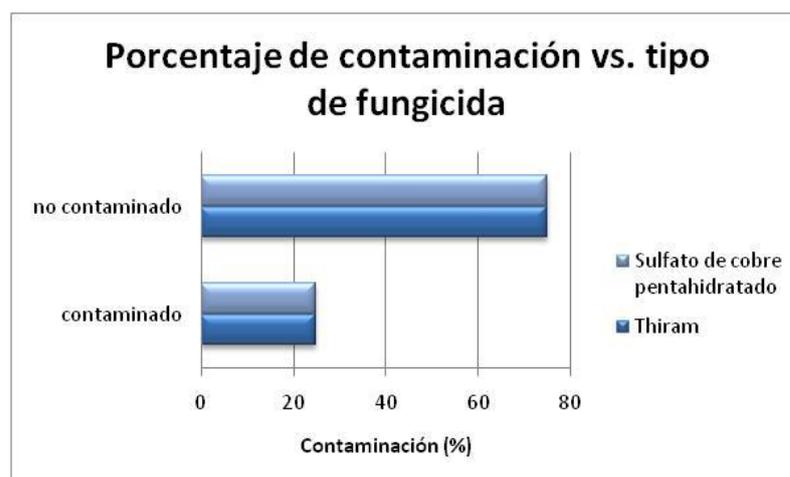


Figura 3.3 Representación gráfica de porcentajes de contaminación fúngica-bacteriana encontrados en semillas de trigo, mediante el uso de diferentes fungicidas

d) Tratamiento de desinfección

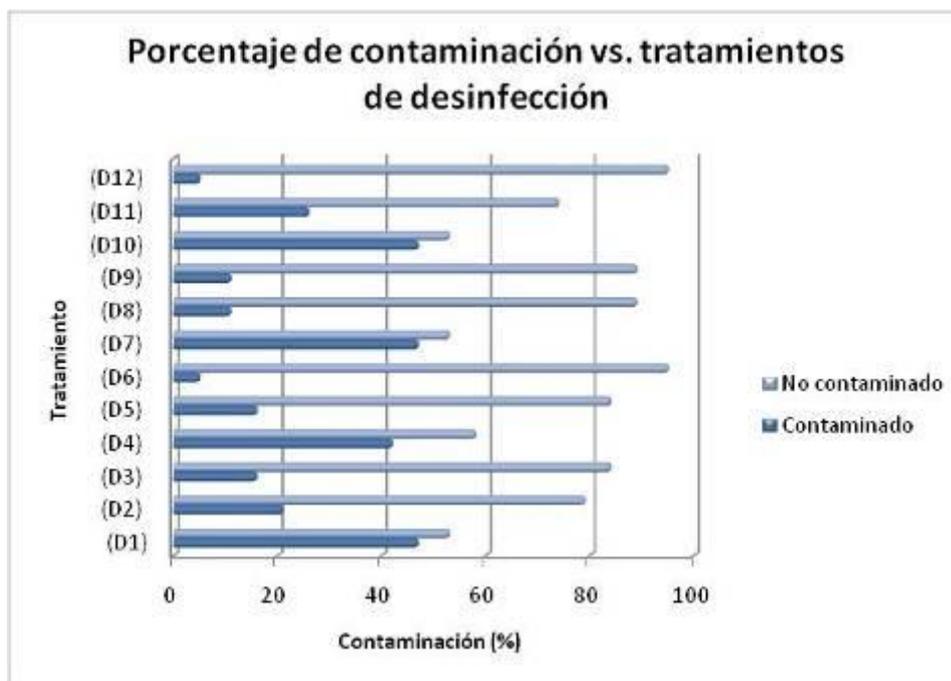
Se analizó cada tratamiento con respecto a la contaminación mediante una prueba de chi cuadrado, esta generó un valor altamente significativo (Tabla 3.6), lo que indica la dependencia entre los tratamientos de desinfección y el porcentaje de contaminación. Según el análisis de porcentajes se observó los mejores resultados en tratamientos D6, D12, D8 y D9; detallados en la tabla 3.7 y figura 3.4.

Tabla 3.6 Prueba de chi cuadrado en contaminación de semillas de trigo con respecto a tratamiento de desinfección.

	Valor	Gl	Signif. Asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	32.571	11	0,001**
Razón de verosimilitudes	33,629	11	4,158E-04**
Nº de casos válidos	228		

Tabla 3.7 Recuento de porcentajes de contaminación en semillas de trigo con respecto a los diferentes tratamientos de desinfección.

TRATAMIENTOS	PORCENTAJE DE CONTAMINACIÓN		
	SEMILLAS CONTAMINADAS	SEMILLAS NO CONTAMINADAS	
Pesticida+NaClO+Tiempo de inmersión en NaClO	(D1) Thiram-2%-5	47%	53%
	(D2) Thiram-2%-10	21%	79%
	(D3) Thiram-2%-15	16%	84%
	(D4) Thiram-2.5%-5	42%	58%
	(D5) Thiram-2.5%-10	16%	84%
	(D6) Thiram-2.5%-15	5%	95%
	(D7) Sulfato de cobre.5H <sub>2</sub> O-2%-5	47%	53%
	(D8) Sulfato de cobre.5H <sub>2</sub> O-2%-10	11%	89%
	(D9) Sulfato de cobre.5H <sub>2</sub> O-2%-15	11%	89%
	(D10) Sulfato de cobre.5H <sub>2</sub> O-2.5%-5	47%	53%
	(D11) Sulfato de cobre.5H <sub>2</sub> O-2.5%-10	26%	74%
	(D12) Sulfato de cobre.5H <sub>2</sub> O-2.5%-15	5%	95%
<b>Total</b>	<b>25%</b>	<b>75%</b>	



D1: Thiram-2%NaClO-5minutos; D2: Thiram-2%NaClO-10minutos; D3: Thiram-2%NaClO-15 minutos; D4: Thiram-2.5%NaClO-5minutos; D5: Thiram-2.5%NaClO-10minutos; D6: Thiram-2.5%NaClO-15minutos. D7: Sulfato de cobre.5H<sub>2</sub>O-2%NaClO-5minutos; D8: Sulfato de cobre.5H<sub>2</sub>O-2%NaClO-10minutos; D9: Sulfato de cobre.5H<sub>2</sub>O-2%NaClO-15minutos; D10: Sulfato de cobre.5H<sub>2</sub>O-2.5%NaClO-5minutos; D11: Sulfato de cobre.5H<sub>2</sub>O-2.5%NaClO-10minuto; D12: Sulfato de cobre.5H<sub>2</sub>O-2.5%NaClO-15minutos

Figura 3.4 Gráfico de porcentajes de contaminación fúngica-bacteriana encontrados en semillas de trigo, mediante el uso de varios tratamientos de desinfección.

### 3.1.1.2 Germinación

#### a) Concentración de hipoclorito de sodio

En esta fase se evaluó el efecto que tiene la concentración de hipoclorito de sodio (2 y 2,5%) en la germinación de semillas de trigo; mediante una prueba de chi cuadrado donde se obtuvo un valor no significativo estadísticamente (Tabla 3.8), con lo que se demuestra no existe dependencia entre la concentración de hipoclorito de sodio y la germinación.

Tabla 3.8 Prueba de chi cuadrado en germinación de semillas de trigo con respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio.

	Valor	Gl	Signif. Asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0,000	1	1,000 N.S
Razón de verosimilitudes	0,000	1	1,000 N.S
Nº de casos válidos	228		

Además se realizó un análisis de porcentajes (Figura 3.4), donde se observa que el porcentaje de germinación es el mismo utilizando 2 o 2,5% de NaClO.

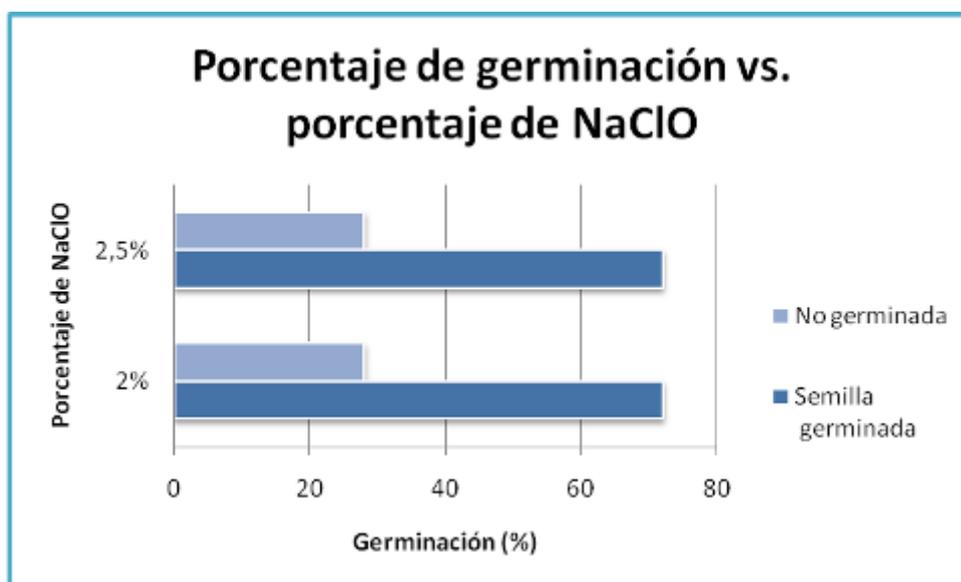


Figura 3.5 de porcentajes de germinación encontrados en semillas de trigo, mediante la utilización de diferentes concentraciones de NaClO

b) Tiempo de inmersión en cloro

En esta etapa se evaluó la germinación con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio, mediante una prueba de chi cuadrado en la cual se obtuvo alta significancia estadística (Tabla 3.9), con lo que se demuestra existe dependencia entre el tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio y germinación de semillas de trigo.

Tabla 3.9 Prueba de chi cuadrado en germinación de semillas de trigo con respecto a tiempos de inmersión en NaClO.

	Valor	Gl	Signif. Asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	11.643	2	0,003**
Razón de verosimilitudes	11,413	2	0,003**
Nº de casos válidos	228		

Adicional a esta prueba se realizó un análisis de porcentajes con la finalidad de encontrar el mejor tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio, como se observa en la tabla 3.10 y en la figura 3.5, los mejores tiempos son 5 y 10 minutos.

Tabla 3.10 Recuento de porcentajes de germinación en semillas de trigo con respecto al tiempo de inmersión en NaClO.

TRATAMIENTOS	Porcentaje de germinación	
	SEMILLA GERMINADA	SEMILLA NO GERMINADA
Tiempo de inmersión en cloro (minutos)		
5	82%	18%
10	76%	24%
15	58%	42%
Total	72%	28%

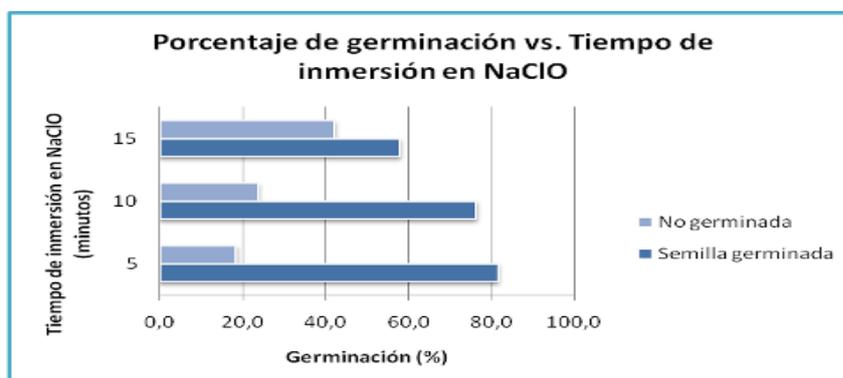


Figura 3.6 Gráfico de porcentajes de germinación en semillas de trigo, mediante una inmersión en NaClO en diferentes tiempos.

c) Tipo de fungicida

En esta fase se evaluó la germinación y tipo de fungicida utilizado, cuyos principios activos corresponden a thiram y sulfato de cobre pentahidratado; mediante una prueba de chi cuadrado con la cual se obtuvo un resultado no significativo (Tabla 3.11), demostrando que no existe dependencia entre el tipo de fungicida utilizado y la germinación. Además se realizó el análisis de porcentajes (Tabla 3.12 y figura 3.6).

Tabla 3.11 Prueba de chi cuadrado en germinación de semillas de trigo con respecto a los diferentes fungicidas utilizados.

	Valor	Gl	Signif. Asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0,782	1	0,377 N.S.
Razón de verosimilitudes	0,783	1	0,376 N.S.
Nº de casos válidos	228		

Tabla 3.12 Recuento de porcentajes de germinación de semillas de trigo con respecto a los diferentes fungicidas utilizados.

TRATAMIENTOS	Porcentaje de germinación	
	SEMILLA GERMINADA	SEMILLA NO GERMINADA
Thiram	75%	25%
Sulfato de cobre pentahidratado	69%	31%
Total	72%	28%

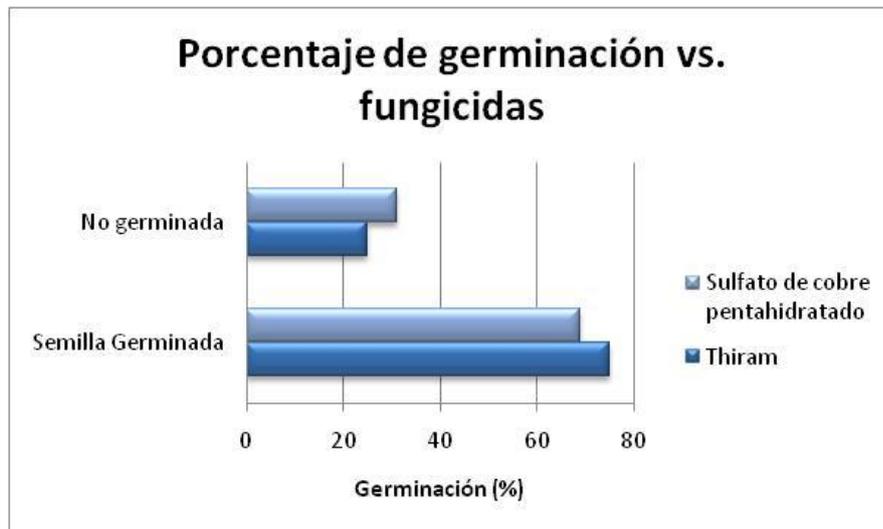


Figura 3.7 Representación gráfica de porcentajes de germinación de semillas de trigo, mediante el uso de diferentes fungicidas

Según los resultados observados en esta fase, se demuestra que tanto la concentración de hipoclorito de sodio como el tipo de fungicida utilizado no influyen estadísticamente en la contaminación o en la germinación de las semillas de trigo; por lo tanto los resultados que serán tomados en cuenta con mayor énfasis corresponden al tiempo de inmersión en NaClO y tipo de tratamiento.

#### d) Tratamiento

En esta etapa se analizó cada uno de los tratamientos planteados con respecto a la germinación mediante una prueba de chi cuadrado donde el valor obtenido fue no significativo (Tabla 3.13), lo que indica que no existe dependencia entre los tratamientos de desinfección y la germinación.

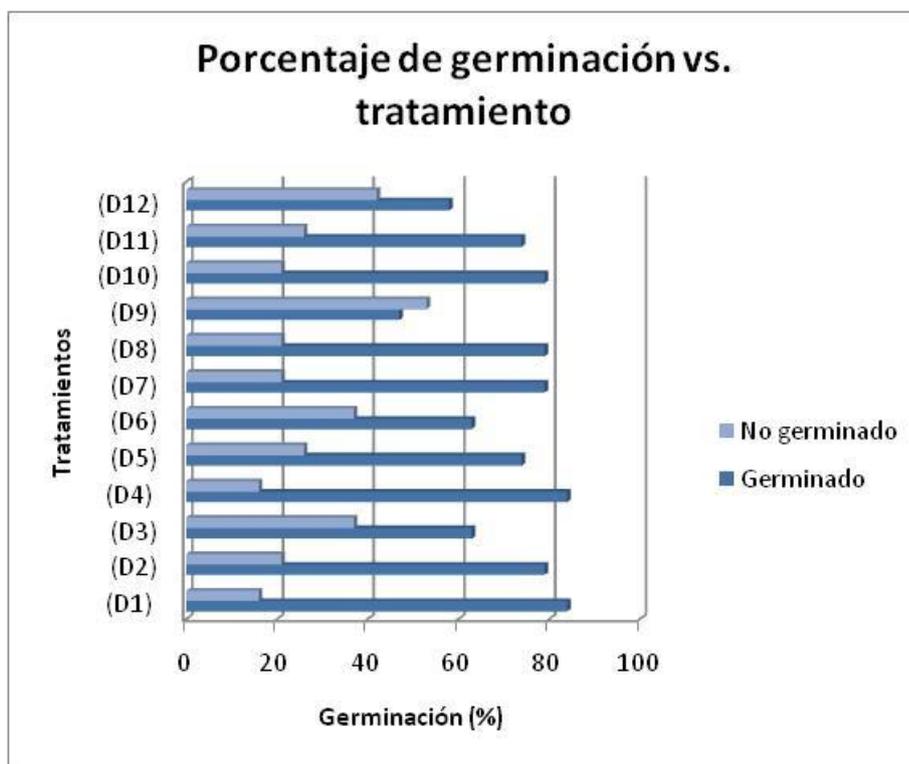
Tabla 3.13 Prueba de chi cuadrado en germinación de semillas de trigo con respecto a los diferentes tratamiento de desinfección.

	Valor	Gl	Signif. Asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	13.729	11	0,248 N.S.
Razón de verosimilitudes	13,344	11	0,271 N.S.
Nº de casos válidos	228		

Según el análisis de porcentajes se observó los mejores resultados en los tratamientos D1, D2, D4, D7, D8 y D10 (Tabla 3.14 y figura 3.7).

Tabla 3.14 Recuento de porcentajes de germinación en semillas de trigo con respecto a los diferentes tratamientos de desinfección.

Tratamientos		Porcentaje de germinación	
		SEMILLA GERMINADA	SEMILLA NO GERMINADA
Pesticida+NaCl+tiempo de inmersión en NaClO	(D1) Thiram-2%-5	84%	16%
	(D2) Thiram-2%-10	79%	21%
	(D3) Thiram-2%-15	63%	37%
	(D4) Thiram-2.5%-5	84%	16%
	(D5) Thiram-2.5%-10	74%	26%
	(D6) Thiram-2.5%-15	63%	37%
	(D7) Sulfato de cobre.5H <sub>2</sub> O-2%-5	79%	21%
	(D8) Sulfato de cobre.5H <sub>2</sub> O-2%-10	79%	21%
	(D9) Sulfato de cobre.5H <sub>2</sub> O-2%-15	47%	53%
	(D10) Sulfato de cobre.5H <sub>2</sub> O-2.5%-5	79%	21%
	(D11) Sulfato de cobre.5H <sub>2</sub> O-2.5%-10	74%	26%
	(D12) Sulfato de cobre.5H <sub>2</sub> O-2.5%-15	58%	42%
Total		72%	28%



D1: Thiram-2%NaClO-5minutos; D2: Thiram-2%NaClO-10minutos; D3: Thiram-2%NaClO-15 minutos; D4: Thiram-2.5%NaClO-5minutos; D5: Thiram-2.5%NaClO-10minutos; D6: Thiram-2.5%NaClO-15minutos. D7: Sulfato de cobre.5H<sub>2</sub>O-2%NaClO-5minutos; D8: Sulfato de cobre.5H<sub>2</sub>O-2%NaClO-10minutos; D9: Sulfato de cobre.5H<sub>2</sub>O-2%NaClO-15minutos; D10: Sulfato de cobre.5H<sub>2</sub>O-2.5%NaClO-5minutos; D11: Sulfato de cobre.5H<sub>2</sub>O-2.5%NaClO-10minuto; D12: Sulfato de cobre.5H<sub>2</sub>O-2.5%NaClO-15minutos

Figura 3.8 Gráfico de porcentajes sobre germinación en semillas de trigo, mediante el empleo de varios tratamientos de desinfección

Al evaluar las variables contaminación y germinación con respecto al tratamiento de desinfección empleado, se observa que coincide dentro de los mejores, el tratamiento D8, en el que se utiliza el fungicida cuyo principio activo corresponde a sulfato de cobre pentahidratado-2% de NaClO y un tiempo de inmersión de 10 minutos; si se analizan los resultados obtenidos en tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio se observa que tanto la germinación como la contaminación es aceptable y fue considerado dentro de los mejores resultados, por lo tanto el tratamiento D8 fue utilizado en las fases posteriores.

### 3.1.2 Rompimiento de dormancia

En esta etapa se evaluó el porcentaje de contaminación y viabilidad al someter a las semilla a diferentes tiempos de inmersión (0, 1, 2, 6, 12 y 24 horas) en hipoclorito de sodio al 0.2%.

#### 3.1.2.1 Contaminación

##### Tiempo de inmersión en NaClO

Esta etapa fue evaluada mediante una prueba de chi cuadrado en la que se observa un resultado no significativo (Tabla 3.15); esto revela que la contaminación encontrada no depende del tiempo de inmersión en NaClO al 0,2% al que se sometieron las semillas.

Tabla 3.15 Prueba de chi cuadrado en análisis de contaminación con respecto al tiempo de inmersión de NaClO al 0.2%

	Valor	Gl	Signif. Asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3.111	3	0,375 N.S.
Razón de verosimilitudes	3,100	3	0,376 N.S.
Nº de casos válidos	60		

En el análisis de porcentajes de esta etapa se obtuvo como mejor resultado el tiempo de inmersión de seis horas (Tabla 3.16 y figura 3.9)

Tabla 3.16 Análisis de porcentajes en la contaminación de semillas de trigo con respecto al tiempo de inmersión en NaClO

TRATAMIENTOS		PORCENTAJES DE CONTAMINACIÓN	
		SEMILLAS CONTAMINADAS	SEMILLAS NO CONTAMINADAS
Tiempo de inmersión en NaClO (horas)	1	20%	80%
	6	13%	87%
	12	27%	73%
	24	40%	60%
Total		25%	75%

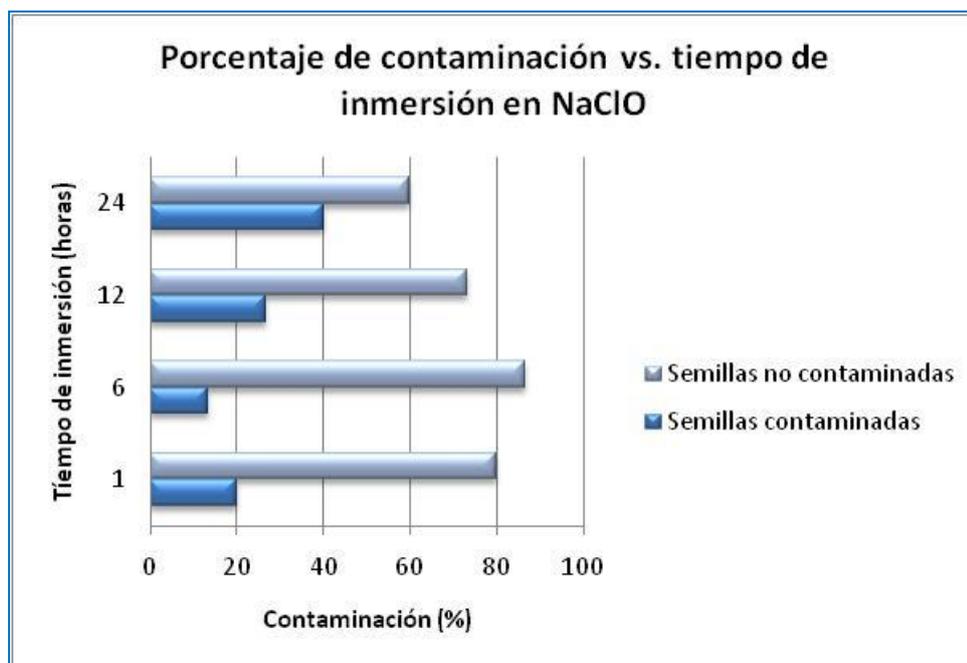


Figura 3.9 Representación gráfica de porcentajes de contaminación de semillas de trigo, con diferentes tiempos de inmersión en NaClO al 0,2%.

### 3.1.2.2 Viabilidad

Tiempo de inmersión en NaClO

Para esta fase se evaluó dos tiempos adicionales a los estudios de contaminación, que corresponde a 0 y 2 horas de inmersión en NaClO al 0.2%. Se realizó una prueba de chi cuadrado en la que se obtuvo un valor estadísticamente no significativo, por lo que la viabilidad no depende del tiempo de inmersión en NaClO al 0.2% (Tabla 3.17).

Tabla 3.17 Prueba de chi cuadrado para la viabilidad de semillas de trigo con respecto al tiempo de inmersión en NaClO al 0.2%.

	Valor	Gl	Signif. Asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	3,600	5	0,608 N.S
Razón de verosimilitudes	3,572	5	0,613 N.S.
Nº de casos válidos	90		

Además se realizó el análisis de porcentajes en el que se observa que los tratamientos correspondientes a tiempos de inmersión en 1 y 0 horas son los mejores, seguidos con porcentajes cercanos los tratamientos de inmersión de 2 y 6 horas (Figura 3.10).

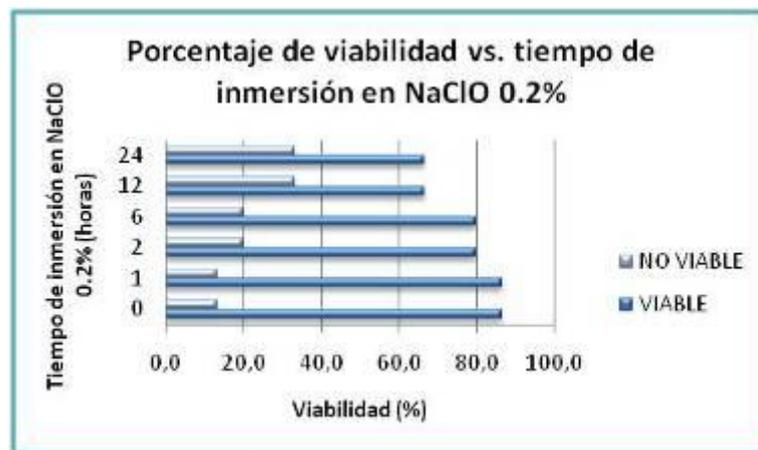


Figura 3.10 Gráfico representativo de porcentaje de viabilidad con respecto a tiempo de inmersión en NaClO 0.2%

Para esta fase se comprueba que el tiempo de inmersión en NaClO al 0.2% no influye en la contaminación ni en la viabilidad de las semillas de trigo, por lo que se acude al análisis de porcentajes para determinar el mejor tratamiento; en cuanto a la

contaminación el mejor es aquel en el que las semillas permanecen en inmersión durante 6 horas, seguido del tratamiento de 1 hora.

En cuanto a la viabilidad los mejores porcentajes se refieren a aquellos en los que se sumerge las semillas durante 0 y 1 hora, seguidos de los tratamientos de 2 y 6 horas.

En cuanto a la observación las semillas se presentaban más hinchadas pasadas las tres horas de inmersión en agua (Figura 3.11), por lo que el tratamiento que se ha elegido es 6 horas de inmersión en NaClO al 0.2%.



Figura 3.11 Hinchamiento de semillas posterior a inmersión. a) 1 hora de inmersión. b) 2 horas de inmersión. c) 3 horas de inmersión

### 3.1.3 Germinación

En esta fase se evaluó el tiempo de germinación con respecto a cuatro concentraciones diferentes de ácido giberélico; se encontró que las semillas germinaban más rápido con el tratamiento en el que se emplea  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido giberélico en el medio de cultivo MS (Figura 3.12).

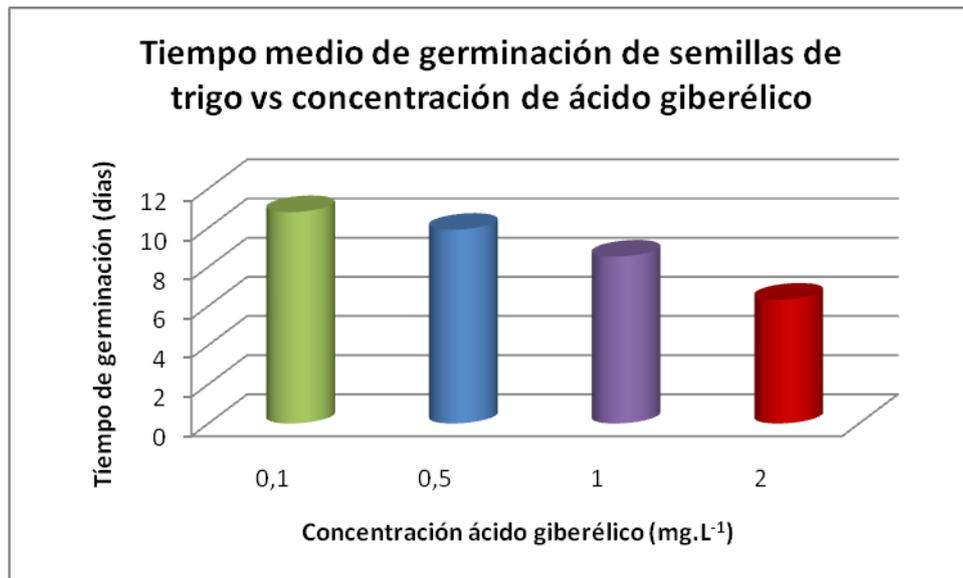


Figura 3.12 Representación gráfica sobre el tiempo de germinación de semillas con respecto a la concentración de ácido giberélico.

Se realizó un ANOVA, donde se obtuvo un valor altamente significativo, lo que demuestra que existen diferencia entre los grupos (Tabla 3.18); además con la prueba HSD de Tukey 5% se puede observar que el tratamiento con 2mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico es el mejor (Tabla 3.19).

Tabla 3.18 ANOVA para evaluar el tiempo de germinación con respecto a las diferentes concentraciones de ácido giberélico.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Significancia
Entre grupos	11,483	6	1,914	6,083	1,130E-04**
Dentro de los grupos	13,528	43	0,315		
Total	25,011	49			

Tabla 3.19 Prueba DHS de Tukey para la germinación con respecto a la concentración de ácido giberélico

Concentración de ácido giberélico (mgL <sup>-1</sup> )	N	Subconjuntos encontrados
2	12	6,33 <sup>a</sup>
1	13	8,23 <sup>ab</sup>
0.5	12	11,33 <sup>bc</sup>
0,1	13	12,46 <sup>c</sup>

En la figura 3.13 se observa una germinación más rápida con respecto al aumento en la concentración de ácido giberélico.

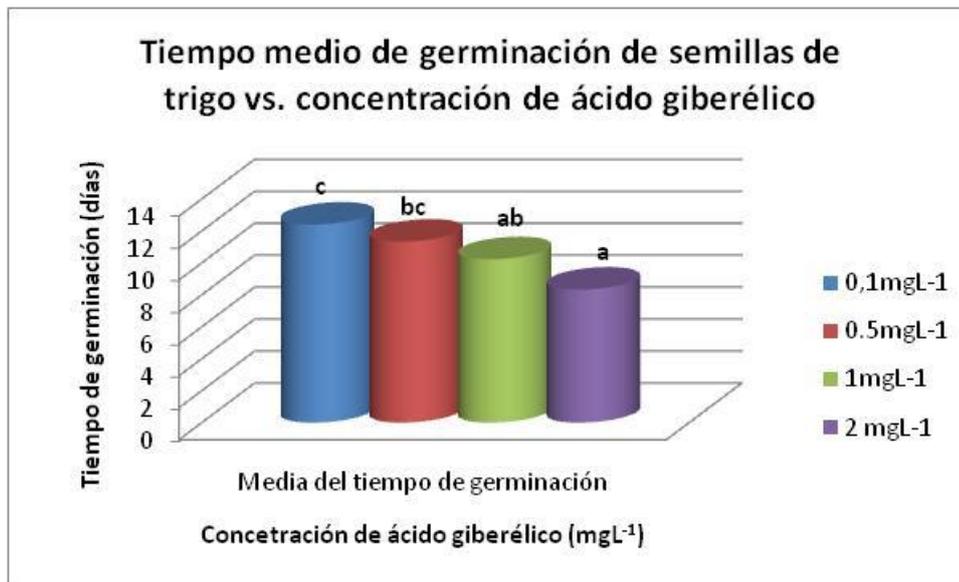


Figura 3.13 Tiempo medio de germinación de semillas de trigo con respecto a la concentración de ácido giberélico.

#### 3.1.4 Establecimiento de brotes

En esta fase se evaluó la cantidad de brotes, tiempo de germinación y ancho de la hoja con respecto a diferentes concentraciones de brasinolina (0, 0.001; 0.002 y 0.003ppm); para esto se realizó un ANOVA (Tabla 3.20).

Tabla 3.20 ANOVA para cantidad de brotes, ancho de la hoja y tiempo de germinación con respecto a concentración de brasinolina.

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Cantidad de brotes	Entre grupos	22,200	3	7,400	5,183	0,004**
	Dentro del grupo	51,400	36	1,428		
	Total	73,600	39			
Ancho de la hoja (cm)	Entre grupos	94,875	3	31,625	66,579	9,221E-15**
	Dentro del grupo	17,100	36	0,475		
	Total	111,975	39			
Tiempo de germinación (días)	Entre grupos	16,800	3	5,600	1,839	0,157 N.S.
	Dentro del grupo	109,600	36	3,044		
	Total	126,400	39			

Lo que demuestran los resultados del ANOVA en cuanto a la cantidad de brotes y ancho de la hoja es que al menos una de las concentraciones de brasinolina genera una diferencia significativa en los resultados, debido a su valor altamente significativo; por el contrario el tiempo de germinación no se ve influenciado por las concentraciones de este regulador; por lo que se realizó una prueba de Tukey para la cantidad de brotes (Tabla 3.21 y figura 3.14) y ancho de la hoja (Tabla 3.22 y figura 3.15).

Tabla 3.21 Prueba HDS de Tukey para cantidad de brotes con respecto a la concentración de brasinolina.

Concentración de brasinolina (ppm)	N	Subgrupos encontrados
0	10	2,7 <sup>a</sup>
0.001	10	3,2 <sup>a</sup>
0.002	10	3,8 <sup>ab</sup>
0.003	10	4,7 <sup>b</sup>

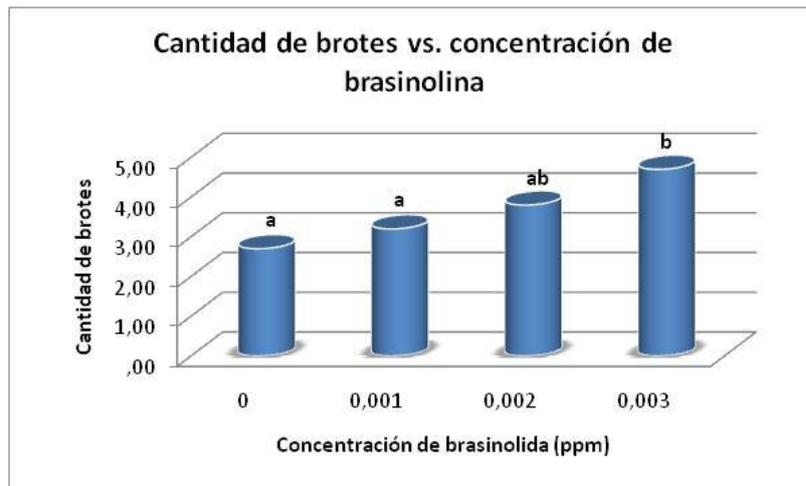


Figura 3.14 Representación gráfica sobre cantidad de brotes con respecto a la concentración de brasinolida.

Tabla 3.22 Prueba HSD de Tukey para ancho de la hoja con respecto a la concentraciones de brasinolida

Concentración de brasinolida (ppm)	N	Subgrupos
0	10	1 <sup>a</sup>
0.001	10	3,7 <sup>b</sup>
0.002	10	4,3 <sup>bc</sup>
0.003	10	5,1 <sup>c</sup>

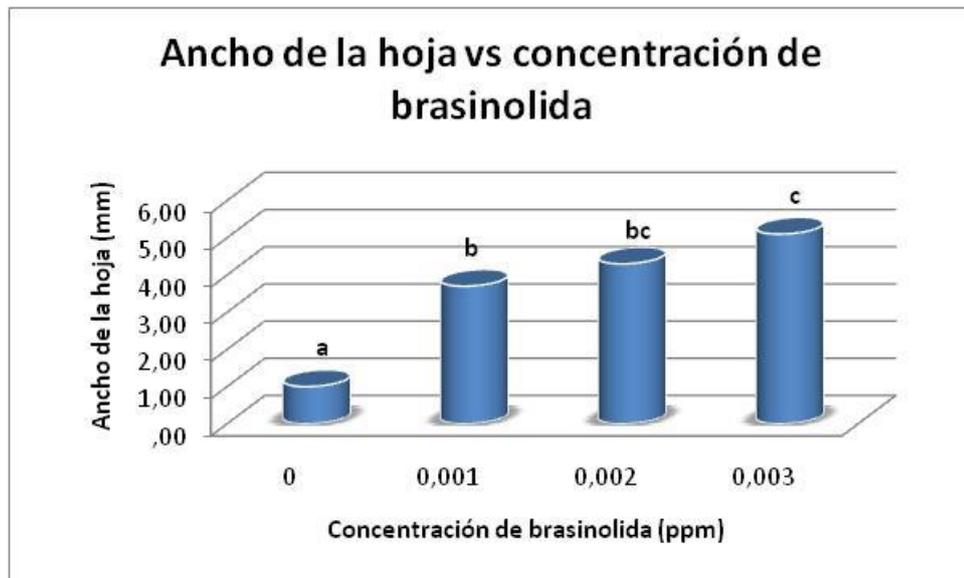


Figura 3.15 Gráfica representativa del ancho de la hoja con respecto a la concentración de brasinolina.

Según las pruebas de Tukey realizadas se puede observar que la mejor concentración de brasinolina consiste en 0,003ppm.

Cabe mencionar que en el tratamiento 0 se observó el enrollamiento de hojas de trigo (figura 3.16); los demás tratamientos no presentaron este fenómeno.

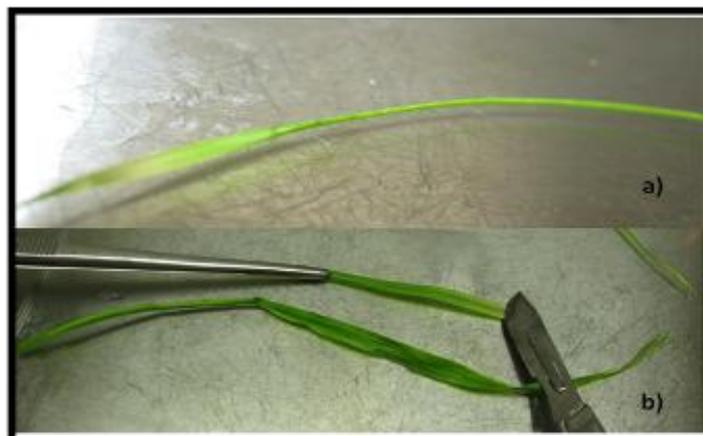


Figura 3.16 a) enrollamiento de hoja de trigo con tratamiento B0 (0 ppm). b) hoja sin enrollamiento tratamiento 0.003ppm de brasinolina.

### 3.2 Establecimiento de callos

#### 3.2.1 A partir de semillas no germinadas

En esta fase se analizó el tiempo de apareamiento de callos, además del tamaño y friabilidad; en cuanto a estos dos últimos solo se obtuvieron callos “pequeños” y “muy friables”, por lo que no se los toma en cuenta para el análisis estadístico.

De forma específica el tiempo de apareamiento de callos fue evaluado con respecto a diferentes concentraciones de 2,4-D ( $2\text{mg.L}^{-1}$ ;  $2.5\text{mg.L}^{-1}$ ;  $3.5\text{mg.L}^{-1}$ ), dos medios de cultivo (MS y L2), y presencia o ausencia de brasinolina. Para este análisis se realizó un ANOVA. (Tabla 3.23).

Tabla 3.23 ANOVA para evaluar el tiempo de apareamiento de callo en el arreglo factorial utilizado.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	200240.636 <sup>a</sup>	12	16686,720	1114,700	6,850E-17**
Medio de cultivo	572,917	1	572,917	38,272	4,174E-10**
Presencia de brasinolina	632,735	1	632,735	42,268	1,909E-09**
Concentración de 2,4D	778,288	2	389,144	25,995	8,828E-09**
Medio de cultivo * presencia de brasinolina	49,705	1	49,705	3,320	0,071N.S.
Medio de cultivo * Concentración de 2,4D	231,379	2	115,689	7,728	0,001**
Presencia de brasinolina * Concentración 2,4D	67,470	2	33,735	2,254	0,109 N.S.
Medio de cultivo * Presencia de brasinolina * Concentración 2,4D	11,773	2	5,886	,393	0,676 N.S.

Se obtuvo alta significancia estadística en los factores: medio de cultivo, presencia de brasinolina, concentración de 2,4D y la interacción medio de cultivo\*concentración de 2,4-D; para lo que se analizará una prueba de Tukey al 5% de confianza.

Además se realizó un análisis de porcentajes por cada tratamiento, donde los resultados obtenidos se observan en la tabla 3.24.

Tabla 3.24. Porcentajes de presencia de callo en tratamientos para proliferación de callos.

TRATAMIENTO	MEDIO DE CULTIO	Porcentaje de semillas que presentan callo
C1	MS-brasinolina-2mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D	40%
C2	MS-brasinolina-2.5mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D	27%
C3	MS-brasinolina-3.5mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D	21%
C4	L2-brasinolina- 2mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D	65%
C5	L2-brasinolina- 2.5mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D	56%
C6	L2-brasinolina- 3.5mg.L <sup>-1</sup> 2,4 D	39%
C7	MS-2mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D	37%
C8	MS-2.5mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D	27%
C9	MS-3.5mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D	16%
C10	L2-2mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D	49%
C11	L2-2.5mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D	37%
C12	L2-3.5mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D	26%

a) Concentración de 2,4-D.

En cuanto a la concentración de 2,4-D se realizó una prueba de Tukey que se presenta en la tabla 3.25 y figura 3.17, donde se observan dos subgrupos, siendo el mejor aquel en el que utiliza 2mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D.

Tabla 3.25 Prueba HSD de Tukey para tiempo de aparecimiento de callos con respecto a concentración de 2,4-D

Concentración de 2,4D	N	Subgrupos encontrados
2	44	35,5 <sup>a</sup>
2,5	44	39,29 <sup>b</sup>
3,5	44	41,36 <sup>b</sup>

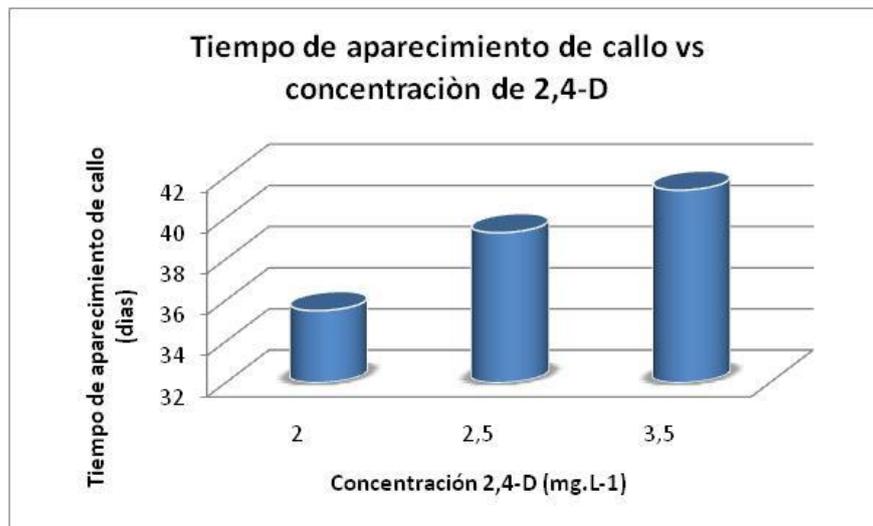


Figura 3.17 Tiempo de aparecimiento de callos a partir de semillas de trigo con respecto a la concentración de 2,4-D empleada en el medio de cultivo.

b) Presencia de brasinolina

Los análisis de estadística descriptiva para la presencia de brasinolina se muestran en la tabla 3.26 y figura 3.18, donde se observa un menor tiempo de aparecimiento de callo cuando se utiliza brasinolina en el medio de cultivo.

Tabla 3.26 Estadística descriptiva para presencia de brasinolina con respecto al apareamiento de callos.

	N	Media	Desviación std.	Error std.	Media	
					Límite inferior	Límite superior
Con brasinolina	66	36,53	5,404	,665	35,20	37,86
Sin brasinolina	66	40,91	4,976	,613	39,69	42,13
Total	132	38,72	5,622	,489	37,75	39,69

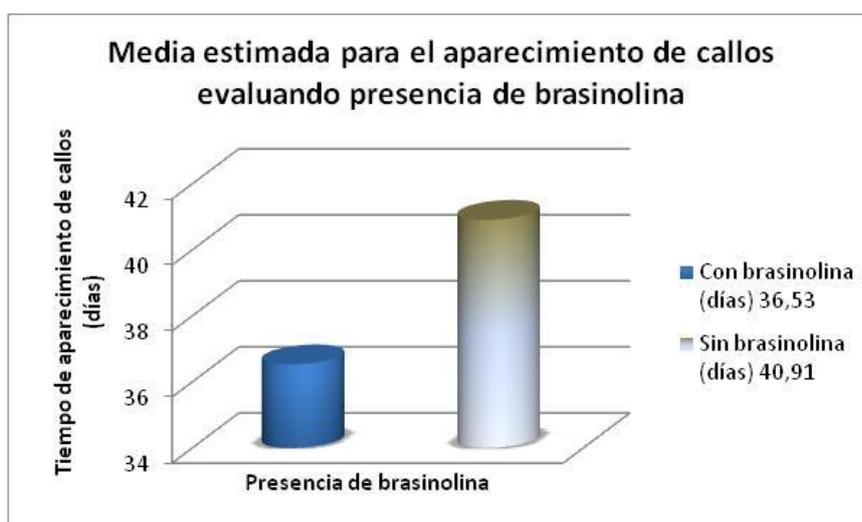


Figura 3.18 Representación gráfica sobre el tiempo de apareamiento de callos con respecto a la presencia de brasinolina.

### c) Medio de cultivo

El ANOVA demostró que existe alta significancia estadística en este factor por lo que se realizaron análisis de estadística descriptiva para el medio de cultivo (MS o L2) que se presentan en la tabla 3.27 y figura 3.19, donde se puede observar menor tiempo de apareamiento con el medio L2.

Tabla 3.27 Estadística descriptiva para medios de cultivo con respecto a tiempo de aparecimiento de callos.

	N	Media	Desviación std.	Error std.	95% de confianza,	
					Límite inferior	Límite superior
MS	66	40,80	5,382	0,662	39,48	42,13
L2	66	36,64	5,092	0,627	35,38	37,89
Total	132	38,72	5,622	0,489	37,75	39,69

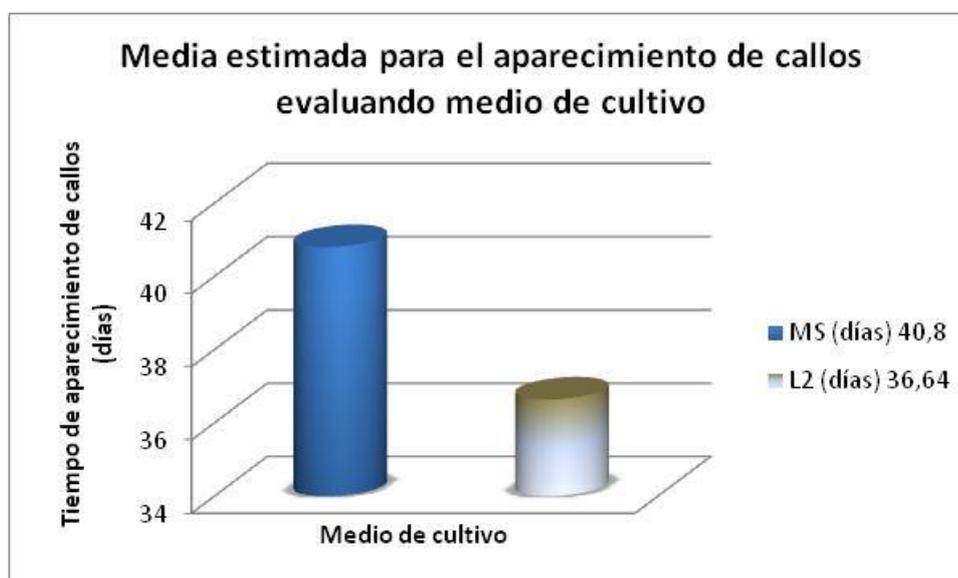


Figura 3.19 Representación gráfica para el tiempo de aparecimiento de callos con respecto al medio de cultivo.

d) Interacción medio de cultivo\*presencia de brasinolina

En esta interacción se encontraron resultados no significativos por lo que no existe diferencia estadística entre los diferentes tratamientos; pero en la figura 3.20 se puede observar que el menor tiempo de aparecimiento de callo corresponde a medio L2 y presencia de brasinolina.

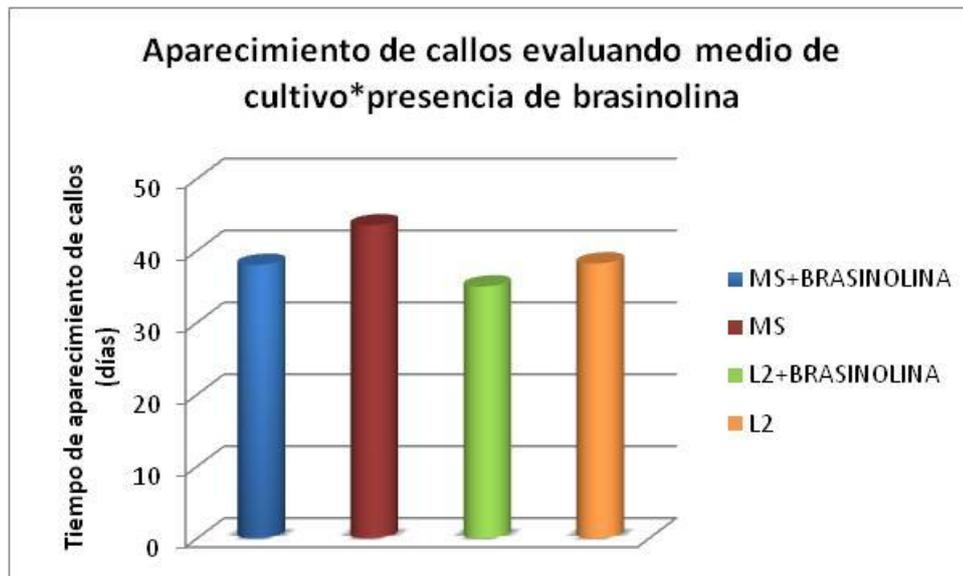


Figura 3.20 Representación gráfica sobre el tiempo de aparecimiento de callos con respecto a la interacción medio de cultivo y presencia de brasinolina.

e) Interacción medio de cultivo\*concentración de 2,4-D

En cuanto a la interacción medio de cultivo\*2,4D el ANOVA reveló un resultado altamente significativo (Tabla 3.23) por lo que la prueba de Tukey se presenta en la tabla 3.28 y figura 3.21, donde se puede observar cuatro grupos.

Tabla 3.28 Prueba HSD Tukey sobre interacción medio de cultivo\*concentración de 2,4D; con respecto a tiempo de aparecimiento de callo.

Medio de cultivo * concentración 2,4D	Subgrupos encontrados
L2 2,0	31,54 <sup>a</sup>
L2 2.5	38,17 <sup>b</sup>
Ms 2.0	39,45 <sup>bc</sup>
L2 3.5	40,28 <sup>bc</sup>
MS 2.5	40,5 <sup>bc</sup>
MS 3,5	42,45 <sup>c</sup>

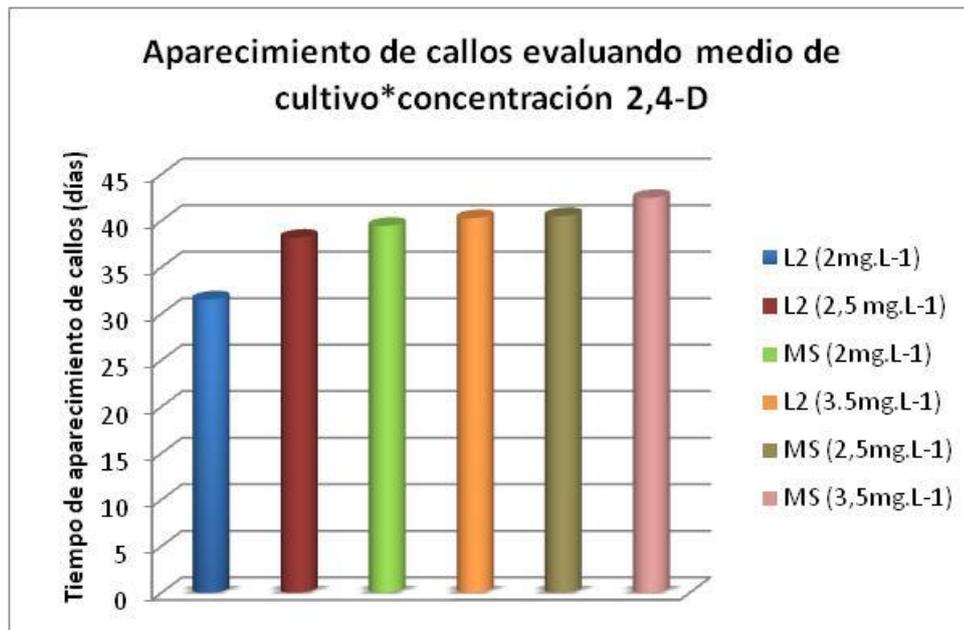


Figura 3.21 Gráfica que representa a la media estimada del apareamiento de callos con respecto al medio de cultivo y concentración de 2,4-D.

f) Interacción presencia de brasinolina\*concentración de 2,4-D

En esta interacción el resultado estadístico es no significativo, por lo que no existe diferencia entre los tratamientos; en la figura 3.22 se puede observar que el mejor resultado se obtuvo con concentraciones de 2,4-D,  $2\text{mg.L}^{-1}$  y presencia de brasinolina en el medio de cultivo para establecimiento de callos.

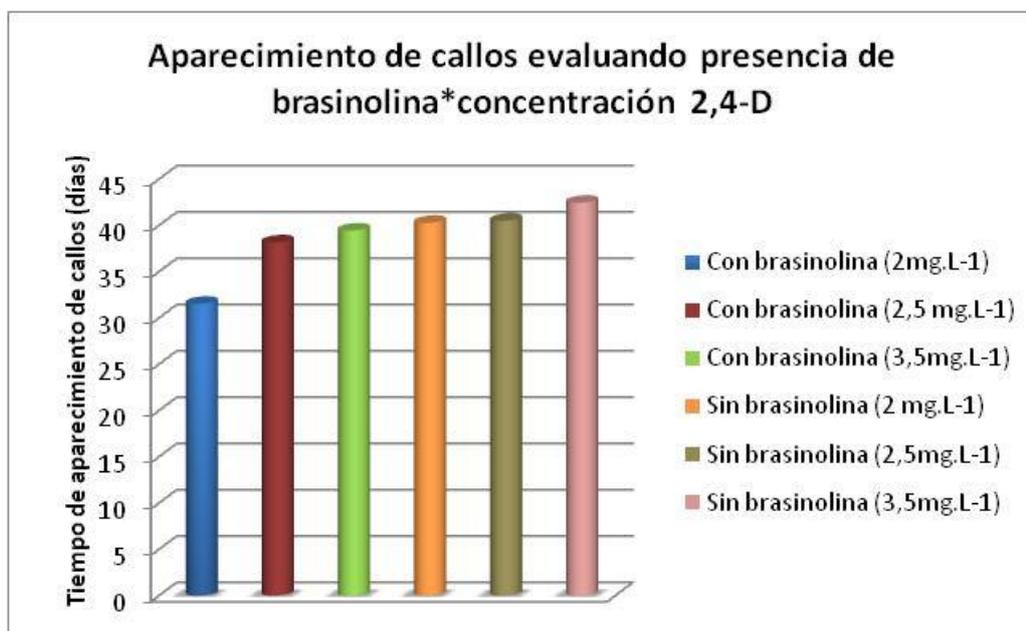


Figura 3.22 Representación gráfica sobre el tiempo de aparecimiento de callos con respecto a presencia de brasinolina y concentración de 2,4-D.

#### g) Tratamientos

Finalmente se presenta en la figura 3.23 de forma general el tiempo de aparecimiento de callos con respecto al tratamiento empleado; donde se observa que el mejor corresponde a C4 (Medio L2, presencia de brasinolina y  $2\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-D) con el menor tiempo de aparecimiento de callos; lo que coincide con todos los análisis anteriormente realizados.

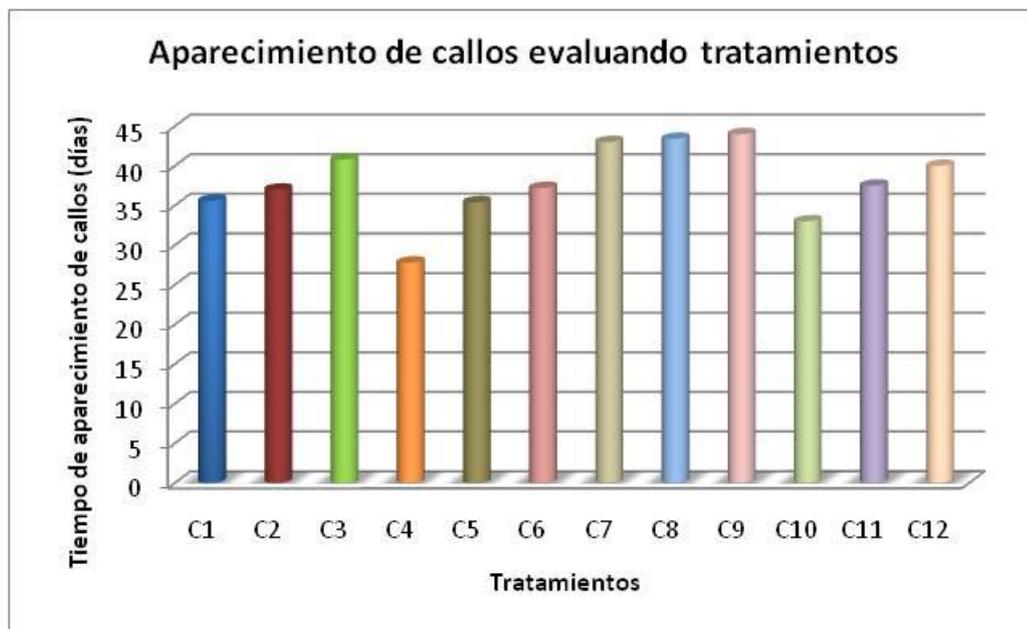


Figura 3.23 Representación gráfica sobre las medias estimadas para el tiempo de aparecimiento de callos con respecto al tratamiento empleado.

### 3.2.2 A partir de plantas germinadas *in vitro*

Para esta etapa se realizó una prueba de chi cuadrado con la finalidad de establecer si existe diferencia al sembrar plantas completas que estén provistas de semilla con respecto a aquellas a las que se les haya quitado la semilla en cuanto a la presencia de callo y oxidación.

#### a) Oxidación

Para esta fase se realizó una prueba de chi cuadrado que reveló un resultado altamente significativo, por lo tanto existe dependencia entre la presencia de semilla y la oxidación generada en la planta (Tabla 3.29).

Tabla 3.29 Prueba de chi cuadrado de Pearson para oxidación de plantas con respecto a la presencia o ausencia de semilla.

	Valor	Gl	Sig. Asintótica bilateral
Chi cuadrado de Pearson	20.000	1	7,744E-06**
Razón de verosimilitudes	27,726	1	1,398E-07**
Número de casos válidos	20		

Además se generó el resultado que indica que el 100% de las plantas sembradas sin semillas presentaron oxidación, mientras que las plantas con semillas presentan 10% de oxidación (Figura 3.24); por observación se determinó que las plantas oxidadas que presentan semillas fueron aquellas que se encontraban sumergidas en el medio de cultivo, además presentaban marchitez (Figura 3.25).



Figura 3.24 Representación gráfica para la oxidación de semillas con respecto a presencia de semilla en plantas germinadas *in vitro*



Figura 3.25 Semilla de trigo pre germinada; a los seis días desde su establecimiento en medio L2 con 2,4-D y presencia de brasinolina (Arcos, 2010).

b) Presencia de callo

Para esta variable se realizó una prueba de chi cuadrado (Tabla 3.30) donde se demostró claramente que la presencia o ausencia de callo depende del establecimiento de plantas provistas o desprovistas de semillas (Figura 3.26); se puede observar también en el análisis de porcentajes (Figura 3.27) claramente que para obtener callos es necesario establecer plantas con semillas.

Tabla 3.30 Prueba de Chi cuadrado para presencia de callo con respecto a presencia/ausencia de semilla en plantas establecidas

	Valor	Gl	Sig. Asintótica (bilateral)
Chi cuadrado de Pearson	20.000	1	7,744E-06**
Razón de verosimilitudes	27,726	1	1,398E-07**
Número de casos válidos	20		



Figura 3.26 izquierda: planta de trigo con semilla y presencia de callo 45 días desde el establecimiento en medio para proliferación. Derecha: planta sin semilla ausencia de callo, oxidada (Arcos, 2010).

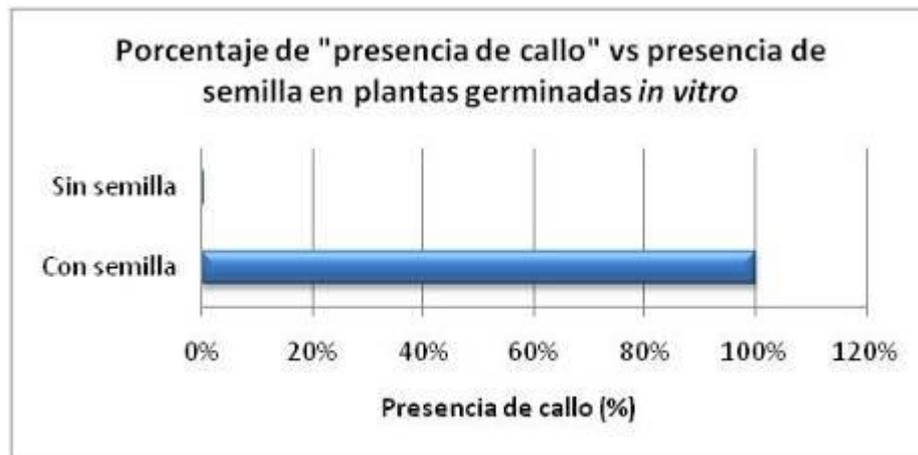


Figura 3.27 Análisis de porcentajes para la presencia de callo en plantas con o sin semillas en plantas establecidas en medio para callos.

### 3.3 Aislamiento de protoplastos

Para esta etapa se evaluó la acción enzimática con respecto a la cantidad de protoplastos obtenidos, disgregación celular y morfología, en diferentes horas de incubación (1-10 horas). El aislamiento fue realizado a partir de callos y hojas de trigo *in vitro*.

### 3.3.1 A partir de hoja

Para esta etapa se probaron concentraciones celulasa-macerozima 2, 3 y 4% en diferentes tratamientos, mientras que la pectoliasa tiene una concentración de 0.3% en todos los casos. Para el análisis estadístico únicamente se emplearon los datos obtenidos hasta la hora 10, en la cual todos los tratamientos presentan el pico más alto para cantidad de protoplastos.

Se realizó un ANOVA (Tabla 3.31) donde se muestra que todos los casos son altamente significativos, es decir que dentro de cada factor, al menos uno genera resultados con diferencia estadística. El único caso no significativo corresponde a concentración enzimática\*disgregación celular.

Tabla 3.31 ANOVA para las diferentes variables evaluadas en el aislamiento de protoplastos a partir de hojas *in vitro*.

Fuente	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	Morfología	356.000 <sup>a</sup>	41	8,683	7,651E+29	1.285E-83**
	Disgregación celular	1376.000 <sup>a</sup>	41	33,561	1,039E+30	0,0056**
	Cantidad de protoplastos	50271.460 <sup>b</sup>	41	1226,133	1530,489	6,867E-149**
Tiempo de digestión	Morfología	68,484	13	5,268	4,642E+29	1.345E-56**
	Disgregación celular	225,652	13	17,358	5,376E+29	0,00024**
	Cantidad de protoplastos	15073,689	13	1159,515	1447,334	9,104E-128**
Concentraci on enzimatica	Morfología	2,418	2	1,209	1,065E+29	0,039**
	Disgregación celular	11,154	2	5,577	1,727E+29	0,215N.S.
	Cantidad de protoplastos	682,507	2	341,253	425,961	5,100E-56**
Tiempo de digestión * Concentraci on enzimatica	Morfología	29,582	25	1,183	1,043E+29	1,456E-34**
	Disgregación celular	127,513	25	5,101	1,580E+29	0,00037**
	Cantidad de protoplastos	3884,080	25	155,363	193,928	9,704E-87**
Total	Morfología	356,000	164			
	Disgregación celular	1376,000	164			
	Cantidad de protoplastos	50370,000	164			

### 3.3.1.1 Cantidad de protoplastos

En esta etapa se puede observar en la figura 3.28 el conteo de protoplastos realizado durante diferentes tiempos de incubación y concentraciones diferentes de celulasa, macerozima y pectoliasa.

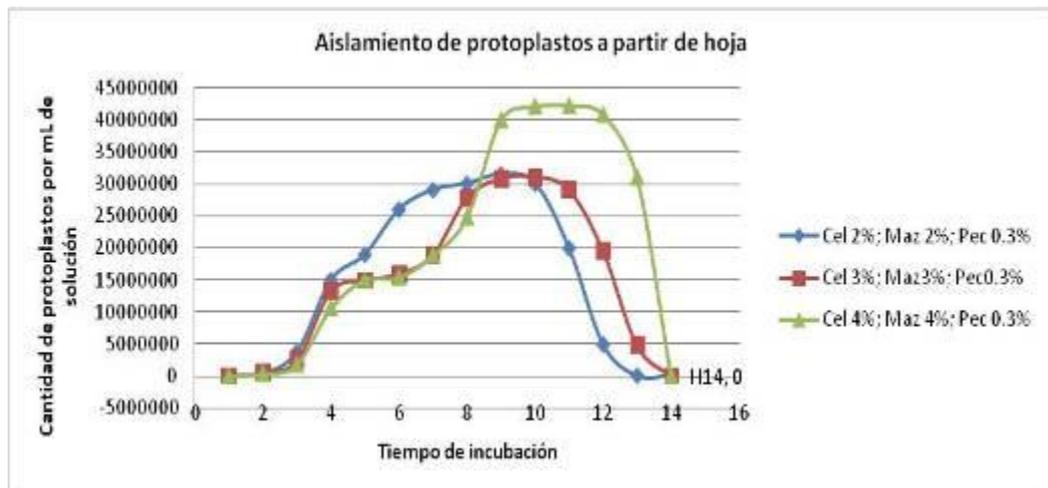


Figura 3.28 Conteo de protoplastos de hoja durante 14 horas de digestión enzimática.

#### a) Tiempo de incubación

Además se realizó una prueba de Tukey (Tabla 3.32 y figura 3.29) con respecto al tiempo de incubación donde se observan 10 grupos desde las horas de incubación 2 hasta la hora 8 representan grupos individuales; mientras que las horas 9 y 10 forman un solo grupo, que fue el mejor.

Tabla 3.32 Prueba HSD de Tukey para la cantidad de protoplastos con respecto al tiempo de incubación.

Tiempo de digestión (horas)	Subgrupos
2	468750 <sup>a</sup>
3	2645833,33 <sup>b</sup>
4	12958333,33 <sup>c</sup>
5	16312500 <sup>d</sup>
6	19125000 <sup>e</sup>
7	22291666,66 <sup>f</sup>
8	27562500 <sup>g</sup>
9	34104166,66 <sup>h</sup>
10	34416666,66 <sup>h</sup>



Figura 3.29 Representación gráfica de la cantidad de protoplastos obtenidos en las distintas horas de incubación en la solución enzimática.

#### b) Concentración enzimática

Para la concentración enzimática se realizó una prueba de Tukey (Tabla 3.33 y figura 3.20), donde se observan 3 grupos, uno por cada concentración enzimática.

Tabla 3.33 Prueba de Tukey para cantidad de protoplastos con respecto a concentración enzimática.

Concentración enzimática	Subgrupos
Cel 3%, Maz 3%, Pec 0.3%	17305555,55 <sup>a</sup>
Cel 2%, Maz 2%, Pec 0.3%	20513888,88 <sup>b</sup>
Cel 4%, Maz 4%, Pec 0.3%	21101562,5 <sup>c</sup>

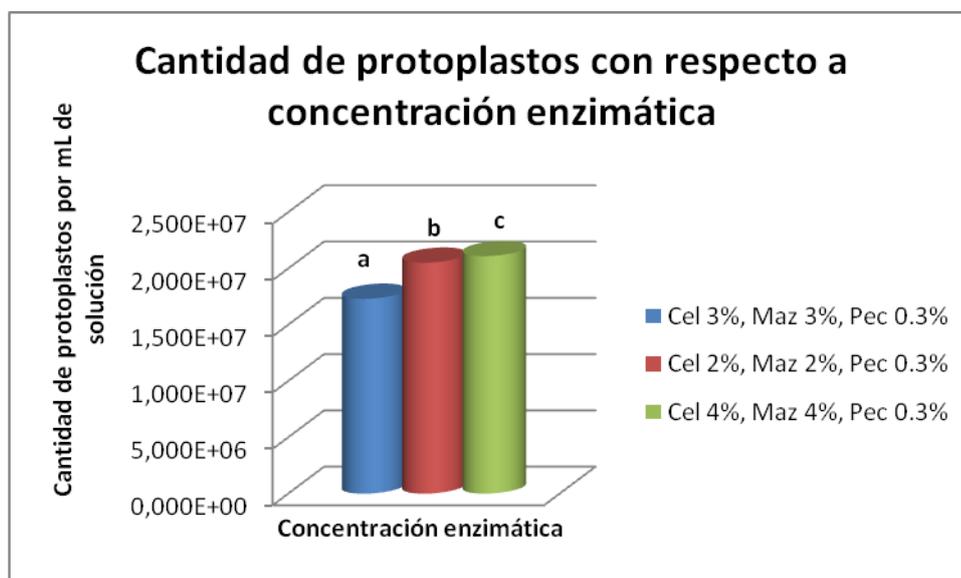


Figura 3.30 Cantidad de protoplastos obtenidos por mL de solución enzimática en diferentes concentraciones.

c) Interacción concentración enzimática\*tiempo de incubación

Se realizó una prueba de Tukey para la interacción entre concentración enzimática y tiempo de incubación donde se observan 11 subgrupos; y los mejores correspondientes a celulasa-macerozima 4% con 9-10 horas de incubación (Tabla 3.34 y figura 3.31).

Tabla 3.34 Prueba de HSD Tukey para cantidad de protoplastos con respecto a la interacción entre concentración enzimática y tiempo de incubación.

Concentración enzimática-tiempo de incubación	Subgrupos
cel 2% maz 2%*1h	0 <sup>a</sup>
cel 3% maz 3%*1h	0 <sup>a</sup>
cel 4% maz 4%*1h	0 <sup>a</sup>
cel 2% maz 2% * 2 h	375000 <sup>a</sup>
cel 4% maz 4%*2h	375000 <sup>a</sup>
cel 3% maz 3%*2h	562500 <sup>a</sup>
cel 4% maz 4%*3h	1812500 <sup>ab</sup>
cel 3% maz 3%*3h	2437500 <sup>ab</sup>
cel 2% maz2% * 3 h	3687500 <sup>b</sup>
cel 4% maz 4%*4h	10625000 <sup>c</sup>
cel 3% maz 3%*4h	13312500 <sup>d</sup>
cel 2% maz 2%* 4h	14937500 <sup>de</sup>
cel 3% maz 3%*5h	14937500 <sup>de</sup>
cel 4% maz 4%*5h	15062500 <sup>de</sup>
cel 4% maz 4%*6h	15437500 <sup>de</sup>
cel 3% maz 3%*6h	15937500 <sup>e</sup>
cel 3% maz 3%*7h	18875000 <sup>f</sup>
cel 2% maz 2%*5h	18937500 <sup>f</sup>
cel 4% maz 4%*7h	18937500 <sup>f</sup>
cel 4% maz 4%*8h	24812500 <sup>g</sup>
cel 2% maz 2%*6h	26000000 <sup>gh</sup>
cel 3% maz 3%*8h	27812500 <sup>hi</sup>
cel 2% maz2% 7h	29062500 <sup>ij</sup>
cel 2% maz 2%*8h	30062500 <sup>ij</sup>
cel 2% maz2%*10h	30062500 <sup>ij</sup>
cel 3% maz 3%*9h	30812500 <sup>j</sup>
cel 3% maz 3%*10h	31062500 <sup>j</sup>
cel 2% maz 2%*9h	31500000 <sup>j</sup>
cel 4% maz 4%*9h	40000000 <sup>k</sup>
cel 4% maz 4%*10h	42125000 <sup>k</sup>

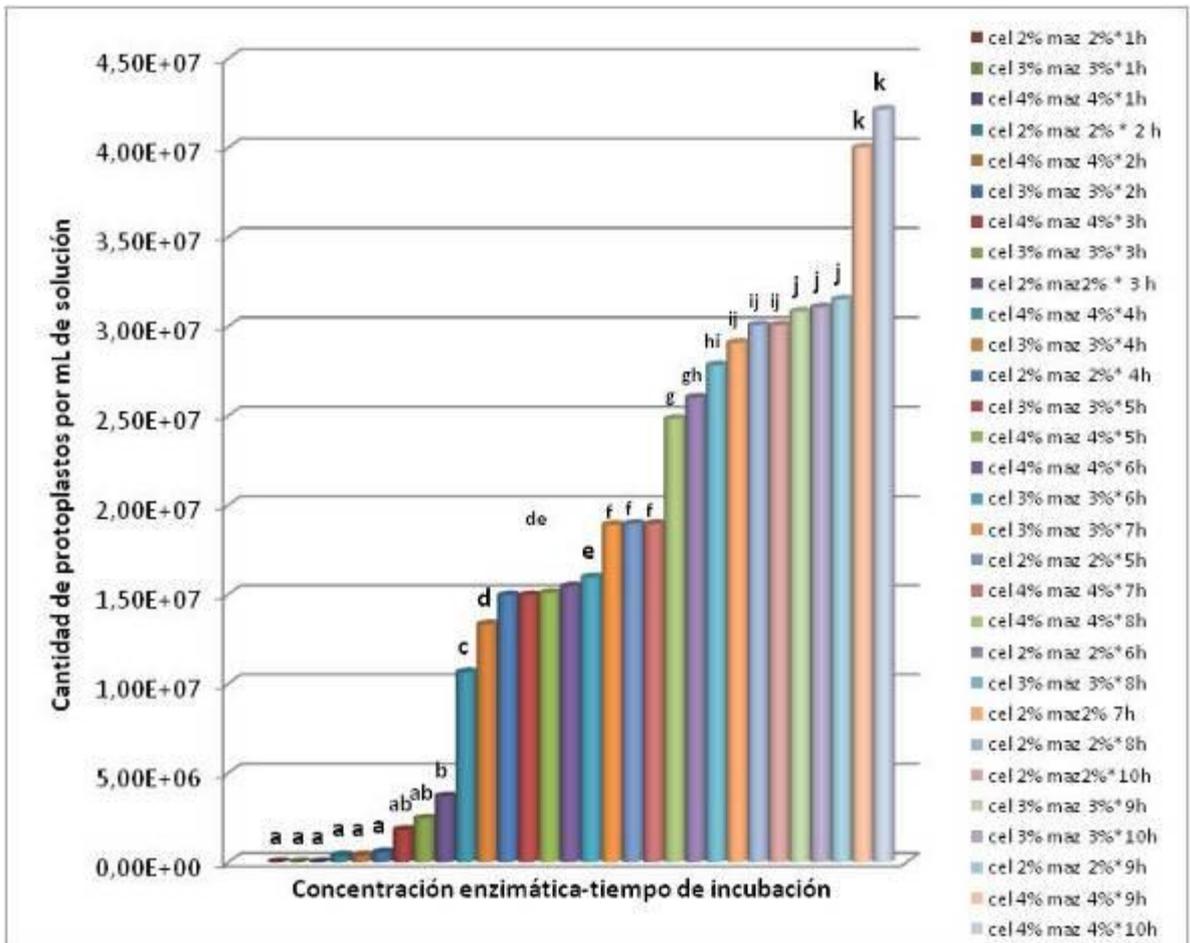


Figura 3.31 Representación gráfica sobre la cantidad de protoplastos obtenida con respecto a la interacción entre concentración enzimática y tiempo de incubación.

### 3.3.1.2 Disgregación celular

Gracias al ANOVA (Tabla 3.30) se observa alta significancia estadística en cuanto a la disgregación celular, donde se estableció cuatro niveles (1 disgregación nula; 2, inicial; 3, media; 4 completa) con respecto al tiempo de digestión enzimática además de la concentración del coctel enzimático.

a) Tiempo de digestión por medio de enzimas

Se realizó la prueba de Tukey para el tiempo de digestión enzimática (Tabla 3.35 y figura 3.32), donde se puede observar seis grupos; con disgregación completa en las horas de digestión nueve y diez.

Tabla 3.35 Prueba de HSD Tukey para disgregación celular con respecto al tiempo de incubación de hojas de trigo con el coctel enzimático.

Hora de incubación (horas)	N	Subgrupos
1	12	1 <sup>a</sup>
2	12	1,3 <sup>a</sup>
3	12	2 <sup>b</sup>
4	12	3 <sup>c</sup>
5	12	3 <sup>c</sup>
6	12	3,3 <sup>cd</sup>
7	12	3,3 <sup>cd</sup>
8	12	3,6 <sup>de</sup>
9	12	4 <sup>e</sup>
10	12	4 <sup>e</sup>

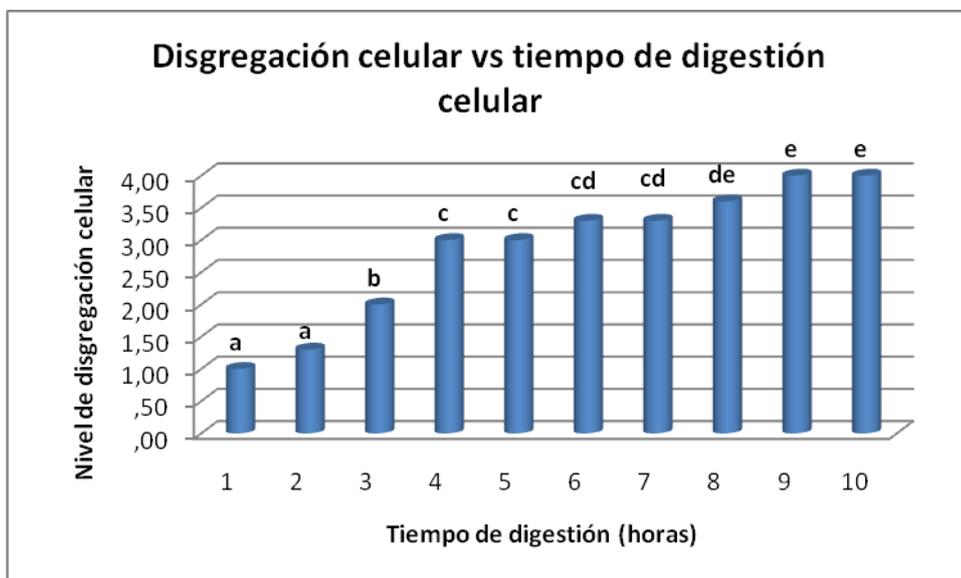


Figura 3.32 Representación gráfica sobre los diferentes niveles de disgregación celular (“1” para nula, “2” inicial, “3” media, “4” completa) con respecto al tiempo de digestión celular.

b) Concentración enzimática\*tiempo de incubación

En cuanto a la concentración enzimática el resultado generado es no significativo; ocurrió lo contrario con la interacción de factores: concentración enzimática\*tiempo de incubación; para lo cual se realizó una prueba de Tukey (Tabla 3.36 y figura 3.33), donde se puede observar cuatro grupos bien definidos, donde la mayor disgregación corresponde a tiempos de nueve y diez horas con la mayor concentración enzimática.

Tabla 3.36 HDS Tukey para disgregación celular con respecto a la interacción concentración enzimática\*tiempo de digestión enzimática

Concentración enzimática* tiempo de digestión	Subgrupos
cel 2% maz 2%*1h	1 <sup>a</sup>
cel 3% maz 3%*1h	1 <sup>a</sup>
cel 4% maz 4%*1h	1 <sup>a</sup>
cel 2% maz 2% * 2 h	2 <sup>b</sup>
cel 3% maz 3%*2h	1 <sup>a</sup>
cel 4% maz 4%*2h	1 <sup>a</sup>
cel 2% maz2% * 3 h	2 <sup>b</sup>
cel 3% maz 3%*3h	2 <sup>b</sup>
cel 4% maz 4%*3h	2 <sup>b</sup>
cel 2% maz 2%* 4h	3 <sup>c</sup>
cel 3% maz 3%*4h	3 <sup>c</sup>
cel 4% maz 4%*4h	3 <sup>c</sup>
cel 2% maz 2%*5h	3 <sup>c</sup>
cel 3% maz 3%*5h	3 <sup>c</sup>
cel 4% maz 4%*5h	3 <sup>c</sup>
cel 2% maz 2%*6h	3 <sup>c</sup>
cel 3% maz 3%*6h	3 <sup>c</sup>
cel 4% maz 4%*6h	3 <sup>c</sup>
cel 2% maz 2% 7h	3 <sup>c</sup>
cel 3% maz 3%*7h	3 <sup>c</sup>
cel 4% maz 4%*7h	3 <sup>c</sup>
cel 2% maz 2%*8h	3 <sup>c</sup>
cel 3% maz 3%*8h	3 <sup>c</sup>
cel 4% maz 4%*8h	3 <sup>c</sup>
cel 2% maz 2%*9h	3 <sup>c</sup>
cel 3% maz 3%*9h	3 <sup>c</sup>
cel 4% maz 4%*9h	4 <sup>d</sup>
cel 2% maz2%*10h	3 <sup>c</sup>
cel 3% maz 3%*10h	3 <sup>c</sup>
cel 4% maz 4%*10h	4 <sup>d</sup>

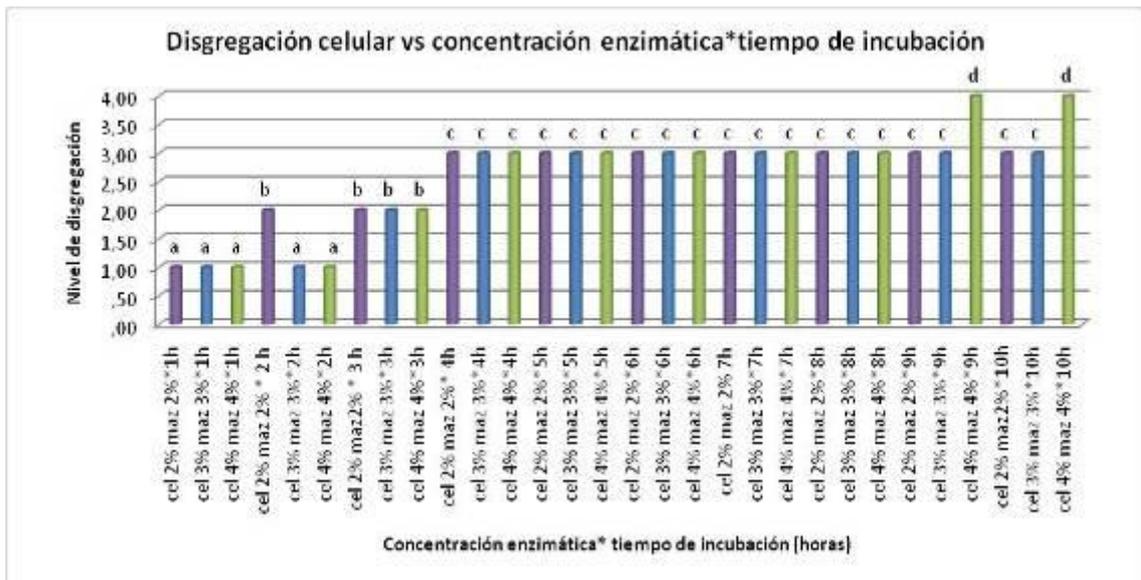


Figura 3.33 Representación gráfica sobre la disgregación celular establecida en cuatro niveles (“1” nula, “2” inicial, “3” media, “4” completa) con respecto a la interacción entre concentraciones enzimáticas y tiempo de incubación.

### 3.3.1.3 Morfología celular

Gracias al ANOVA (Tabla 3.30) se observa alta significancia estadística en cuanto a la morfología celular, donde se estableció tres niveles (1 célula; 2, protoplasto; 3, protoplasto roto) con respecto al tiempo de digestión enzimática además de la concentración del coctel enzimático.

#### a) Tiempo de digestión de pared celular

Se realizó una prueba de Tukey para el tiempo de digestión enzimática (Tabla 3.37 y figura 3.34), donde se pueden observar cuatro grupos; las horas ocho, nueve y diez, son las de mayor cantidad de protoplastos viables con relación a las células.

Tabla 3.37 Prueba de HSD Tukey para morfología celular con respecto a tiempo de digestión.

Tiempo de digestión (horas)	N	Subgrupos
2	8	1 <sup>a</sup>
3	12	1 <sup>a</sup>
4	12	1 <sup>a</sup>
5	12	1,3 <sup>ab</sup>
6	12	1,3 <sup>ab</sup>
7	12	1,6 <sup>bc</sup>
8	12	2 <sup>c</sup>
9	12	2 <sup>c</sup>
10	12	2 <sup>c</sup>

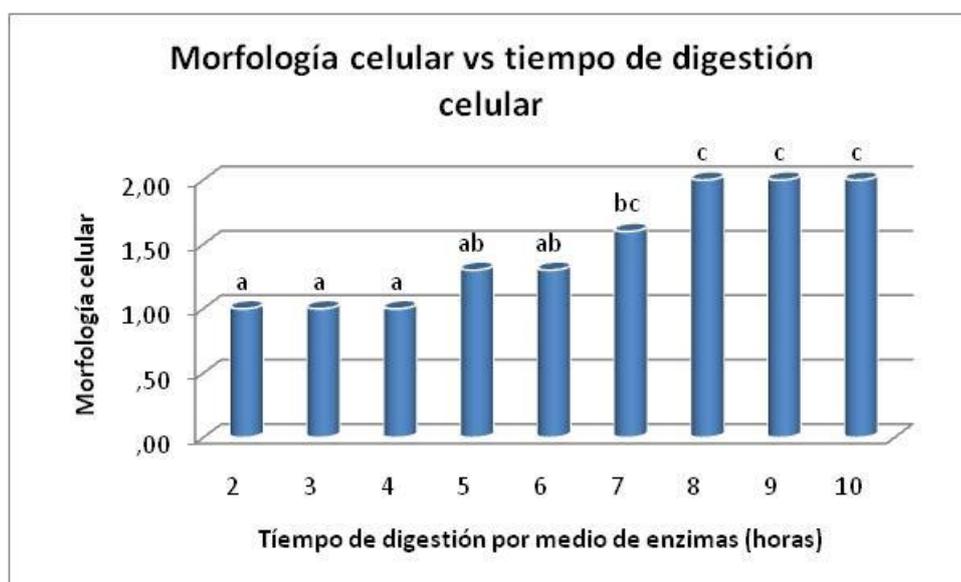


Figura 3.34 Representación gráfica sobre la morfología celular con respecto al tiempo de incubación.

#### b) Concentración enzimática

Se realizó una prueba de Tukey para la morfología con respecto a la concentración enzimática, ya que en el ANOVA (Tabla 3.30) se encontró alta significancia estadística para esta etapa; como se observa en la tabla 3.38 y figura 3.35

existen dos grupos, dentro de los cuales el que se acerca al valor de “2”, que constituye más del 50% de protoplastos en cada concentración enzimática es en la que se utiliza macerozima-celulasa 2%.

Tabla 3.38 Prueba de Tukey para morfología con respecto a concentración enzimática

Concentración enzimática	N	Subgrupos
Cel 4%, Maz 4%, Pec 0.3%	32	1,375 <sup>a</sup>
Cel 3%, Maz 3%, Pec 0.3%	36	1,44 <sup>ab</sup>
Cel 2%, Maz 2%, Pec 0.3%	36	1,66 <sup>b</sup>

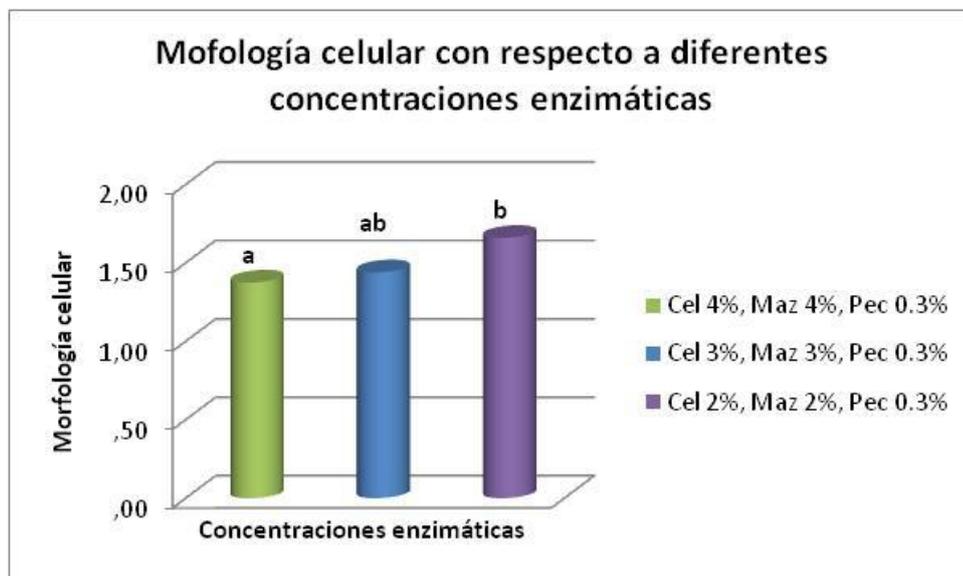


Figura 3.35 Representación gráfica sobre los diferentes niveles de morfología celular (“1” célula; “2” protoplastos; “3” protoplasto roto) con relación a la concentración enzimática de los diferentes tratamientos.

c) Interacción concentración enzimática\*tiempo digestión de pared celular

Se conoce que los resultados de una prueba de Tukey arrojarán únicamente dos grupos; pero es necesario conocer, cuáles fueron los tratamientos que alcanzaron con mayor rapidez una mayor concentración de protoplastos (Figura 3.36).

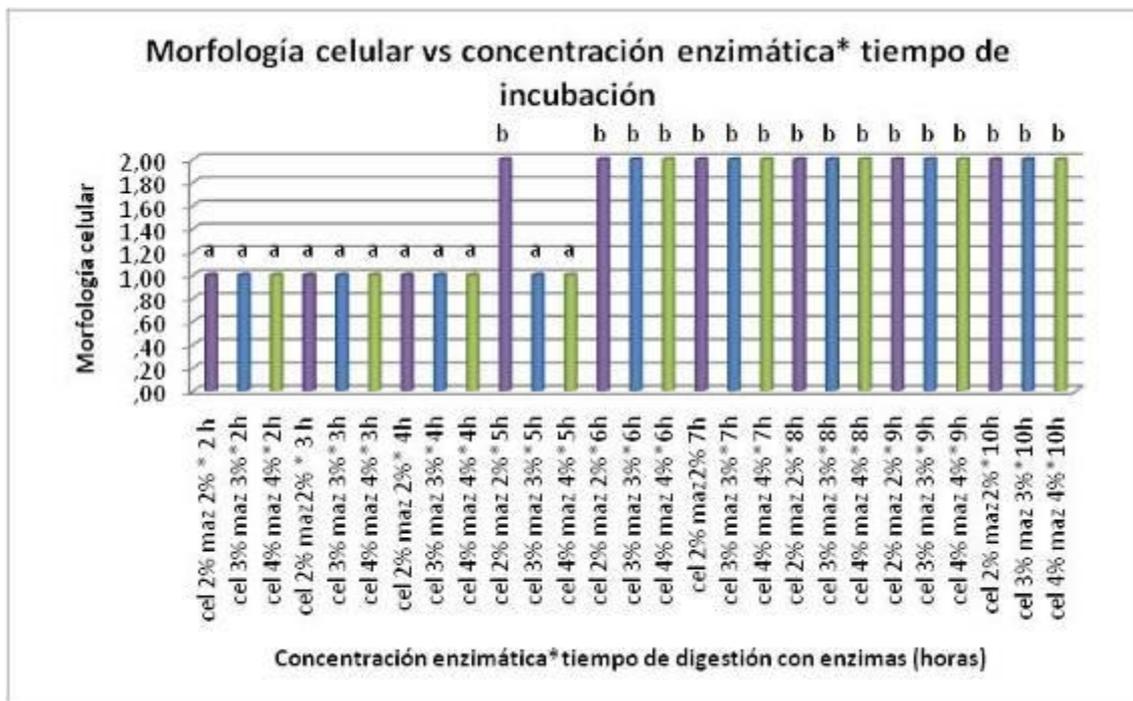


Figura 3.36 Representación gráfica de los diferentes niveles de morfología (“1” célula; “2” protoplastos; “3” protoplasto roto) con respecto a la interacción concentración enzimática\*tiempo de digestión de pared celular.

### 3.3.2 A partir de callo

Para esta etapa se probaron concentraciones de celulasa-macerozima 2, 3 y 4% en diferentes tratamientos, mientras que la pectoliasa tiene una concentración de 0.3% en todos los casos. Para el análisis estadístico únicamente se emplearon los datos obtenidos hasta la hora seis, en la cual todos los tratamientos presentan el pico más alto en cuanto a cantidad de protoplastos.

Se realizó un ANOVA (Tabla 3.40) donde se muestra alta significancia estadística para todos los casos.

Tabla 3.40 ANOVA para aislamiento de protoplastos a partir de callo con respecto a morfología celular, cantidad de protoplastos y disgregación celular.

Fuente	Variable dependiente	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	Morfología	112.000	16	7,000	3,000	0,005**
	Disgregación celular	476.000	16	29,750	367,789	6850E-37**
	Cantidad de protoplastos	408.440	16	25,528	408,440	4,174E-10**
Tiempo de incubación	Morfología	3,200	5	,640	378,948	1,909E-09**
	Disgregación celular	9,733	5	1,947	345,758	8,828E-09**
	Cantidad de protoplastos	36,538	5	7,308	116,921	1,345E-04**
Concentración enzimática	Morfología	8,533	2	4,267	465,76	3,567E-07**
	Disgregación celular	2,133	2	1,067	235,56.	0,013**
	Cantidad de protoplastos	45,916	2	22,958	367,328	1,567E-11**
Tiempo de incubación * Concentración enzimática	Morfología	2,133	8	0,267	345,67	1,456E-56**
	Disgregación celular	3,200	8	0,400	156,45	5,567E-11**
	Cantidad de protoplastos	2,531	8	0,316	5,061	4,687E-07**

### 3.3.2.1 Cantidad de protoplastos

En esta etapa se puede observar en la figura 3.37 el conteo de protoplastos realizado durante diferentes tiempos de incubación (1 – 6 horas) y concentraciones de celulasa-macerozima (2 y 3%).

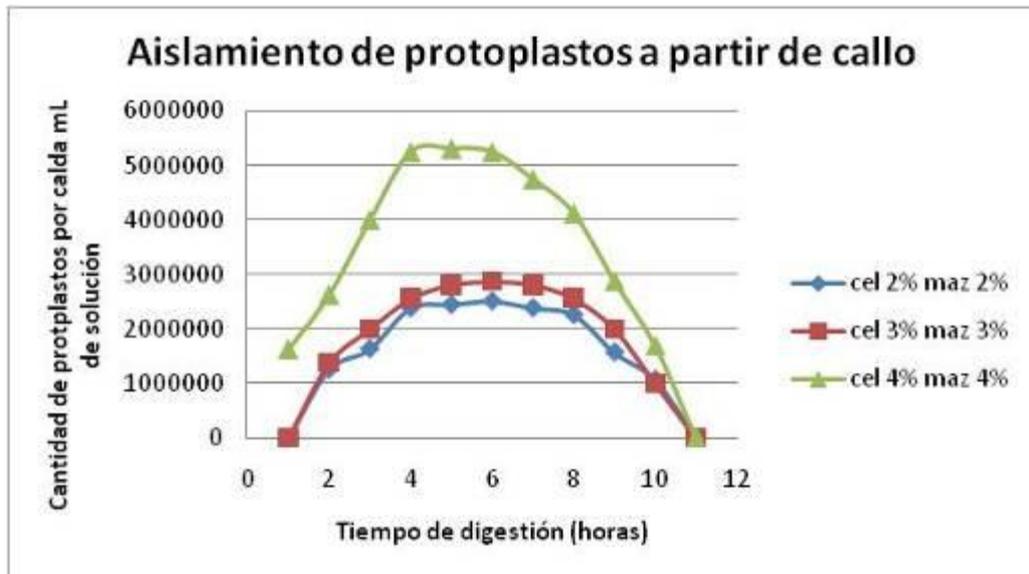


Figura 3.37 Conteo de protoplastos de callo durante 11 horas de digestión enzimática

a) Tiempo de incubación

Se realizó una prueba de Tukey (Tabla 3.41 y figura 3.38) con respecto al tiempo de incubación donde se observan 3 grupos desde las horas de incubación 4 hasta la hora 6 corresponde al grupo con mayor cantidad de protoplastos por mL de solución.

Tabla 3.41 Prueba HSD de Tukey para la cantidad de protoplastos con respecto al tiempo de incubación.

Tiempo de incubación (horas)	N	Subgrupos
1	4	1625000 <sup>a</sup>
2	12	1750000 <sup>a</sup>
3	12	2541666,6 <sup>b</sup>
4	12	3395833,33 <sup>c</sup>
5	12	3520833,3 <sup>c</sup>
6	12	3541666,6 <sup>c</sup>

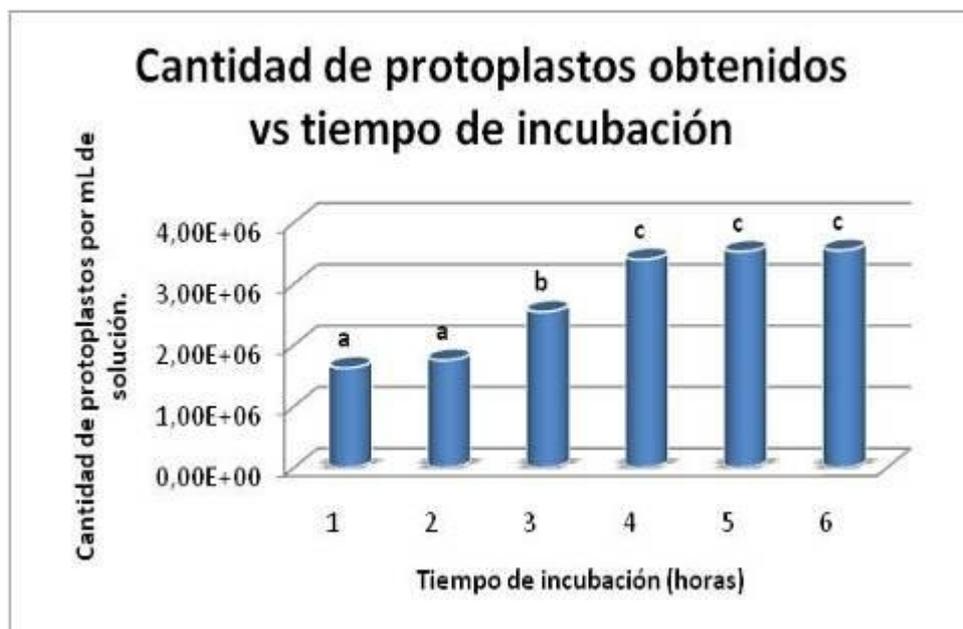


Figura 3.38 Cantidad de protoplastos obtenidos por mL de solución enzimática, con respecto al tiempo de incubación.

b) Concentración enzimática

Para la concentración enzimática se realizó una prueba de Tukey (Tabla 3.42 y figura 3.39), donde se observan 3 grupos, uno por cada concentración enzimática; el mejor tratamiento corresponde al que utiliza celulosa-macerozima 4%.

Tabla 3.42 Prueba HSD de Tukey para la cantidad de protoplastos con respecto a tres concentraciones enzimáticas distintas.

Concentración enzimática	N	Subgrupos
cel 2% maz 2%	20	2037500 <sup>a</sup>
cel 3% maz 3%	20	2325000 <sup>b</sup>
cel 4% maz 4%	24	4010416,67 <sup>c</sup>

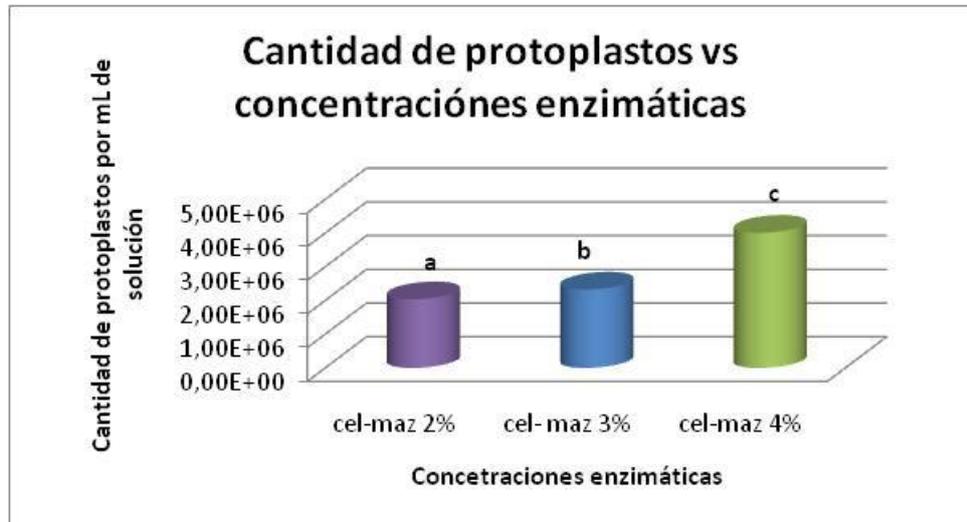


Figura 3.39 Representación gráfica sobre la cantidad de protoplastos con respecto a las diferentes concentraciones enzimáticas.

c) Interacción concentración enzimática\*tiempo de incubación.

Se realizó una prueba de Tukey para la interacción entre concentración enzimática y tiempo de incubación donde se observan 8 grupos; dentro de los cuales las mejores interacciones corresponden a celulasa-macerozima 4%; en los tiempos de 4, 5 y 6 horas (Tabla 3.43 y figura 3.40).

Tabla 3.43 Prueba de HSD Tukey para cantidad de protoplastos con respecto a la interacción entre concentración enzimática y tiempo de incubación.

CONCENTRACIÓN ENZIMÁTICA * TIEMPO DE INCUBACIÓN	N	Subgrupos
CEL 2% MAZ 2% 1h	4	0 <sup>a</sup>
CEL 3% MAZ 3% 1h	4	0 <sup>a</sup>
CEL 2% MAZ 2% 2h	4	1250000 <sup>b</sup>
CEL 3% MAZ 3% 2h	4	1375000 <sup>b</sup>
CEL 2% MAZ 2% 3h	4	1625000 <sup>bc</sup>
CEL 4% MAZ 4% 1h	4	1625000 <sup>bc</sup>
CEL 3% MAZ 3% 3h	4	2000000 <sup>bcd</sup>
CEL 2% MAZ 2% 4h	4	2375000 <sup>bcd</sup>
CEL 2% MAZ 2% 5h	4	2437500 <sup>de</sup>
CEL 2% MAZ 2% 6h	4	2500000 <sup>de</sup>
CEL 3% MAZ 3% 4h	4	2562500 <sup>de</sup>
CEL 4% MAZ 4% 2h	4	2625000 <sup>de</sup>
CEL 3% MAZ 3% 5h	4	2812500 <sup>e</sup>
CEL 3% MAZ 3% 6h	4	2875000 <sup>e</sup>
CEL 4% MAZ 4% 3h	4	4000000 <sup>f</sup>
CEL 4% MAZ 4% 4h	4	5250000 <sup>g</sup>
CEL 4% MAZ 4% 6h	4	5250000 <sup>g</sup>
CEL 4% MAZ 4% 5h	4	5312500 <sup>g</sup>

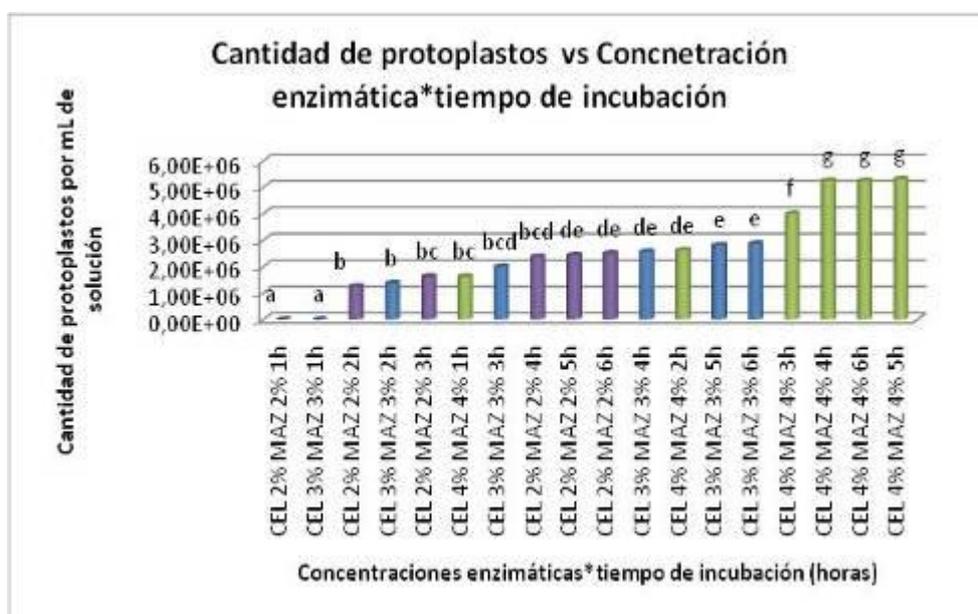


Figura 3.40 Cantidad de protoplastos con respecto a la interacción concentración enzimática\*tiempo de incubación

### 3.3.2.2 Disgregación celular

Gracias al ANOVA (Tabla 3.40) se observa alta significancia estadística para disgregación celular, donde se establecieron tres niveles (1 inicial; 2, media; 3 completa) con respecto al tiempo de digestión enzimática además de la concentración del coctel enzimático y su interacción.

#### a) Tiempo de digestión enzimática

Se realizó la prueba de Tukey para el tiempo de digestión enzimática (Tabla 3.44 y figura 3.41), donde se observan tres grupos perfectamente establecidos; las horas de incubación cuatro, cinco y seis son las mejores.

Tabla 3.44 Prueba de HSD Tukey para disgregación celular con respecto al tiempo de incubación de callos de trigo con el coctel enzimático.

Tiempo de incubación (horas)	N	Subgrupos para alfa=0.05
1	12	1,3 <sup>a</sup>
2	12	2,3 <sup>b</sup>
3	12	2,3 <sup>b</sup>
4	12	3 <sup>c</sup>
5	12	3 <sup>c</sup>
6	12	3 <sup>c</sup>

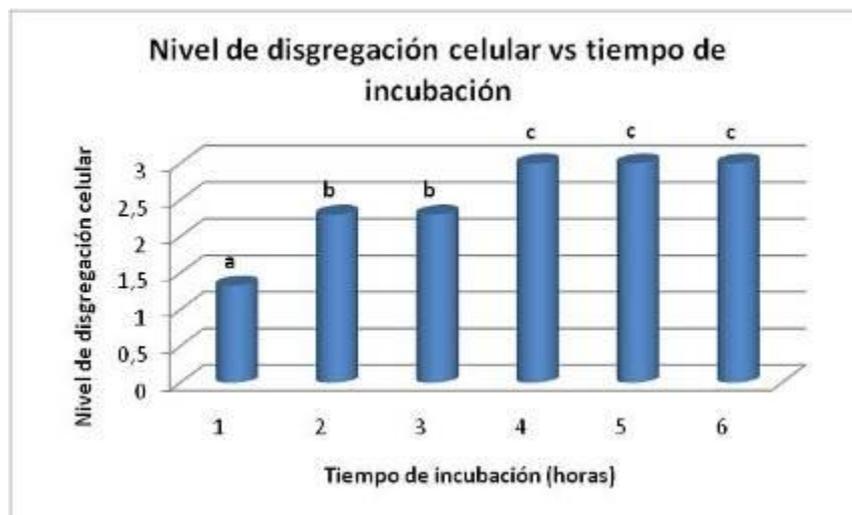


Figura 3. 41 Representación gráfica sobre nivel de disgregación celular (1 disgregación nula; 2, inicial; 3, media; 4 completa) con respecto al tiempo de incubación.

#### b) Concentración enzimática

En cuanto a la concentración enzimática se encontró alta significancia; para lo cual se realizó una prueba de Tukey (Tabla 3.45 y figura 3.42), donde se puede observar dos grupos bien definidos, la mayor disgregación corresponde a la concentración 4% celulasa-macerozima, 0.3% pectoliasa.

Tabla 3.45 HDS Tukey para disgregación celular de callos con respecto a la concentración enzimática

Concentración enzimática	N	Subgrupos
cel 2% maz 2%	24	2,3 <sup>a</sup>
cel 3% maz 3%	24	2,3 <sup>a</sup>
cel 4% maz 4%	24	2,83 <sup>b</sup>

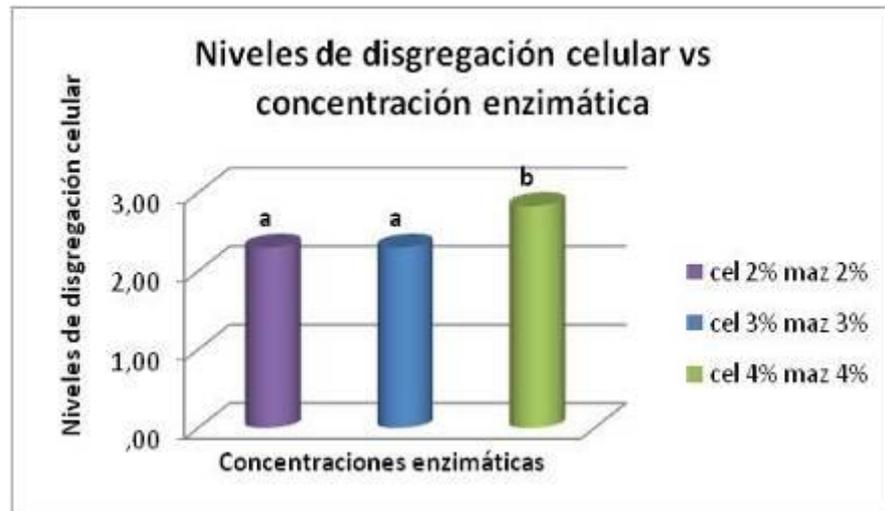


Figura 3.42 Representación gráfica sobre los niveles de disgregación celular (1 inicial; 2, media; 3 completa) a partir de callos *in vitro* con respecto a la concentración enzimática.

c) Concentración enzimática\*tiempo de incubación.

La tabla 3.39 (ANOVA) nos revela alta significancia estadística con respecto a la interacción concentración enzimática\*tiempo de incubación; para lo que se realizó una prueba de Tukey (Tabla 3.46 y figura 3.43) donde se muestra claramente la presencia de tres grupos estadísticos; dentro de los mejores corresponden las interacciones: celulasa- macerozima 4% desde dos hasta seis horas de incubación; y celulasa-macerozima 3% y 2%, desde la hora cuatro hasta la hora seis.

Tabla 3.46 Prueba de HSD Tukey para la disgregación celular con respecto a la interacción concentración enzimática\*tiempo de incubación.

Concentración enzimática*tiempo de incubación	Subgrupos
CEL 2% MAZ 2% 1h	1 <sup>a</sup>
CEL 3% MAZ 3% 1h	1 <sup>a</sup>
CEL 4% MAZ 4% 1h	2 <sup>b</sup>
CEL 2% MAZ 2% 2h	2 <sup>b</sup>
CEL 3% MAZ 3% 2h	2 <sup>b</sup>
CEL 2% MAZ 2% 3h	2 <sup>b</sup>
CEL 3% MAZ 3% 3h	2 <sup>b</sup>
CEL 4% MAZ 4% 2h	3 <sup>c</sup>
CEL 4% MAZ 4% 3h	3 <sup>c</sup>
CEL 2% MAZ 2% 4h	3 <sup>c</sup>
CEL 3% MAZ 3% 4h	3 <sup>c</sup>
CEL 4% MAZ 4% 4h	3 <sup>c</sup>
CEL 2% MAZ 2% 5h	3 <sup>c</sup>
CEL 3% MAZ 3% 5h	3 <sup>c</sup>
CEL 4% MAZ 4% 5h	3 <sup>c</sup>
CEL 2% MAZ 2% 6h	3 <sup>c</sup>
CEL 3% MAZ 3% 6h	3 <sup>c</sup>
CEL 4% MAZ 4% 6h	3 <sup>c</sup>

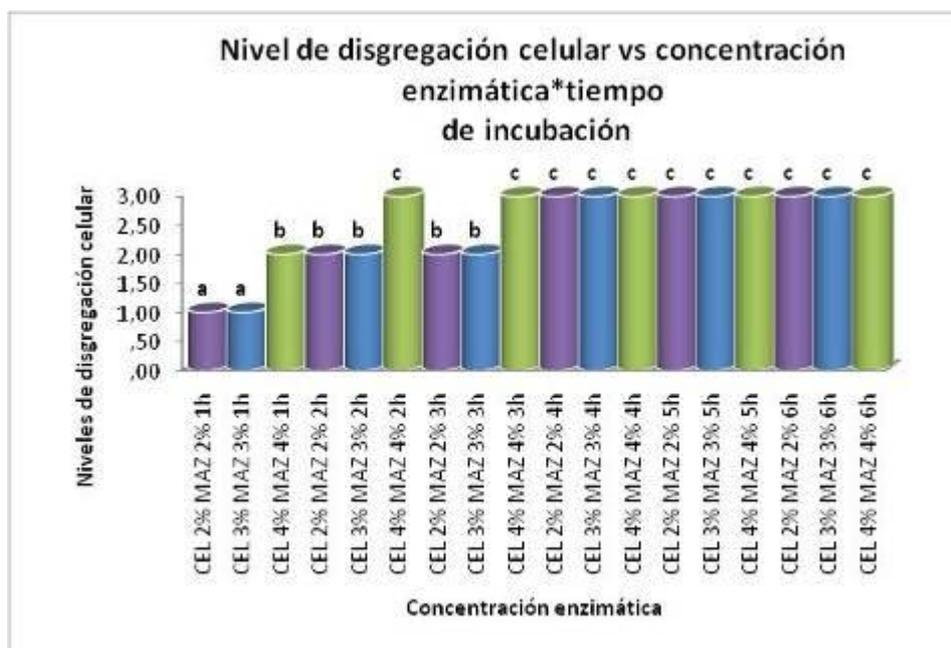


Figura 3.43 Representación gráfica sobre el nivel de disgregación celular (1 disgregación inicial; 2, media; 3 completa) a partir de callos con respecto a la interacción concentración enzimática\*tiempo de incubación.

### 3.3.2.3 Morfología celular

Gracias al ANOVA (Tabla 3.40) se observa alta significancia estadística en cuanto a la morfología celular, donde se estableció tres niveles (1 célula; 2, protoplasto; 3, protoplasto roto) con respecto al tiempo de digestión enzimática además de la concentración del coctel enzimático.

#### a) Tiempo de digestión de pared celular

Para esta variable se realizó una prueba de Tukey (Tabla 3.47 y figura 3.44), aunque se conozca que los resultados solo proporcionarán dos grupos estadísticos, es importante conocer que a partir de la hora dos, en todos los casos, ya existe mayor cantidad de protoplastos que número de células.

Tabla 3.47 Prueba de HSD Tukey para la morfología celular con respecto a tiempo de incubación.

Tiempo de incubación (horas)	N	Subgrupos para alfa= 0.05
1	12	1 <sup>a</sup>
2	12	1,67 <sup>b</sup>
3	12	1,67 <sup>b</sup>
4	12	1,67 <sup>b</sup>
5	12	2 <sup>b</sup>
6	12	2 <sup>b</sup>

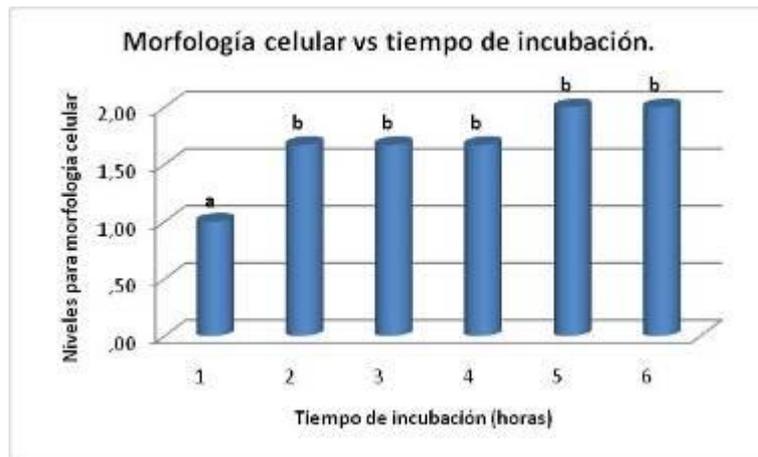


Figura 3.44 Morfología celular (1 célula; 2, protoplasto; 3, protoplasto roto) con respecto al tiempo de incubación.

b) Concentración enzimática

Se ha establecido la prueba de Tukey en la tabla 3.48 y en la figura 3.45; en la que se observan dos grupos estadísticamente diferentes.

Tabla 3.48 Prueba de HSD Tukey para morfología celular con respecto a concentración enzimática

Concentración enzimática	N	Subgrupos para alfa=0.05
cel 2% maz 2%	24	1,33 <sup>a</sup>
cel 3% maz 3%	24	1,83 <sup>b</sup>
cel 4% maz 4%	24	1,83 <sup>b</sup>

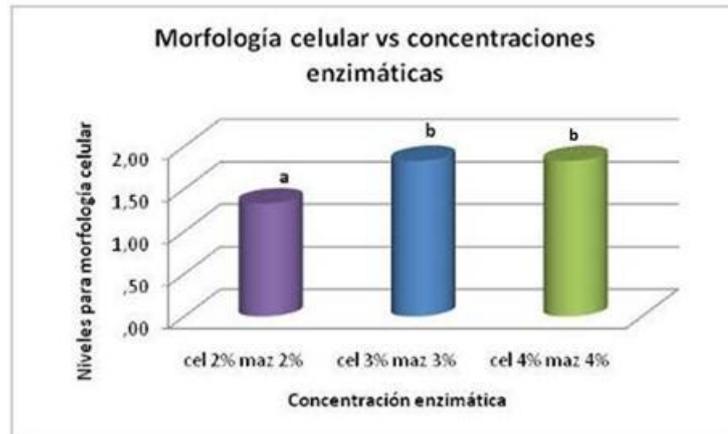


Figura 3.45 Representación gráfica sobre la morfología celular (1, célula; 2, protoplasto; 3, protoplasto roto) con respecto a la concentración enzimática.

c) Interacción concentración enzimática\*tiempo de incubación

Para los niveles planteados en la morfología celular existe alta significancia estadística con respecto a interacción concentración enzimática\*tiempo de incubación; se conoce que las pruebas de Tukey únicamente arrojarán dos grupos estadísticamente significativos; pero es necesario conocer las interacciones que han generado los mejores resultados (Tabla 3.49 y figura 3.46).

Tabla 3.49 Prueba de HSD Tukey para morfología celular con respecto a la interacción concentración enzimática\*tiempo de incubación

Concentración enzimática	Subgrupos encontrados
CEL 2% MAZ 2% 1h	1 <sup>a</sup>
CEL 3% MAZ 3% 1h	1 <sup>a</sup>
CEL 4% MAZ 4% 1h	1 <sup>a</sup>
CEL 2% MAZ 2% 2h	1 <sup>a</sup>
CEL 2% MAZ 2% 3h	1 <sup>a</sup>
CEL 2% MAZ 2% 4h	1 <sup>a</sup>
CEL 3% MAZ 3% 2h	2 <sup>b</sup>
CEL 4% MAZ 4% 2h	2 <sup>b</sup>
CEL 3% MAZ 3% 3h	2 <sup>b</sup>
CEL 4% MAZ 4% 3h	2 <sup>b</sup>
CEL 3% MAZ 3% 4h	2 <sup>b</sup>
CEL 4% MAZ 4% 4h	2 <sup>b</sup>
CEL 2% MAZ 2% 5h	2 <sup>b</sup>
CEL 3% MAZ 3% 5h	2 <sup>b</sup>
CEL 4% MAZ 4% 5h	2 <sup>b</sup>
CEL 2% MAZ 2% 6h	2 <sup>b</sup>
CEL 3% MAZ 3% 6h	2 <sup>b</sup>
CEL 4% MAZ 4% 6h	2 <sup>b</sup>

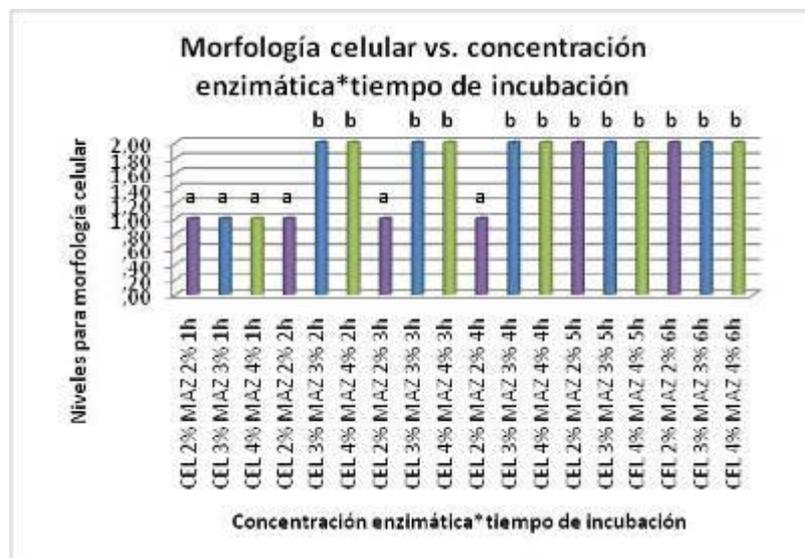


Figura 3.46 Niveles de morfología celular (1, célula; 2, protoplasto, 3 protoplasto roto), con respecto a la interacción concentración enzimática\* tiempo de incubación.

### 3.3.3 Protoplastos obtenidos a partir de hoja y callo

Existen algunas diferencias entre los protoplastos obtenidos a partir de hoja de aquellos que fueron aislados a partir de callo de trigo *in vitro*, como su color (Figura 3.47); los protoplastos de hoja poseen cloroplastos lo que genera un color verde al microscopio; en el caso de los protoplastos aislados a partir de callo de obscuridad, son transparentes, ya que no han experimentado procesos de fotosíntesis; otra observación consiste en el tamaño muy similar entre ambos protoplastos.

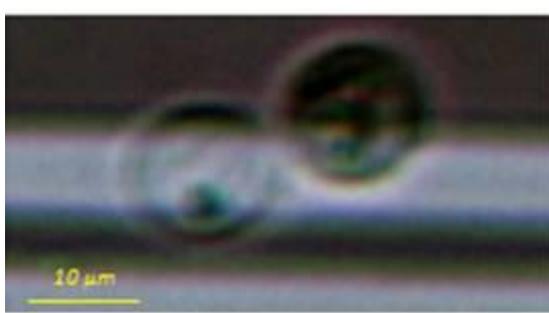


Figura 3.47 Protoplastos aislados a partir de callo (izquierda) y hoja de trigo (derecha) microscopio óptico 45X (Arcos y Jadán, 2010).

En cuanto al tamaño de los protoplastos se puede observar diferencias muy significativas dependiendo de la técnica empleada para el aislamiento; cuando se realizó el raspado de las hojas de trigo en toda su extensión, se obtuvieron protoplastos de tamaños entre 10 y 15  $\mu\text{m}$ .; existe gran diferencia con los protoplastos obtenidos al no realizar el raspado; además se debe mencionar que estos últimos no se presentan aislados y no poseen forma esférica perfecta (Figura 3.48 y Figura 3.49); los protoplastos aislados por la técnica establecida por Legood & Walker (1978), son totalmente esféricos (Figura 3.50).

En cuanto a los protoplastos obtenidos a partir de callo los tamaños varían entre 10 y 20  $\mu\text{m}$ .



Figura 3.48 Aislamiento de protoplastos a partir de hoja, utilizando la técnica de Gerald, 2000; microscopio óptico 100X (Arcos y Rivera, 2010).

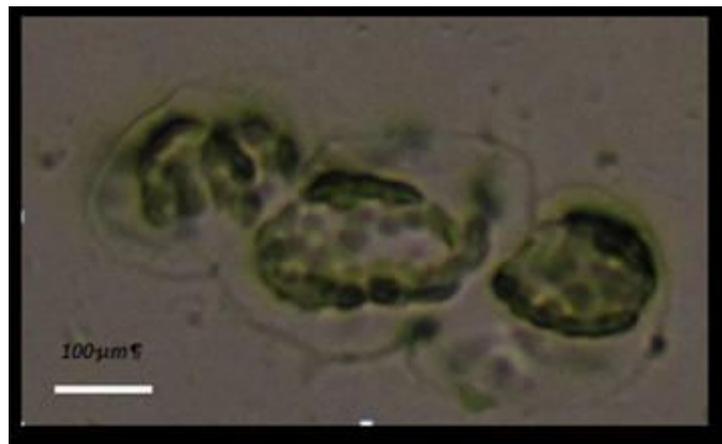


Figura 3.49 Aislamiento de protoplastos a partir de hojas de trigo, utilizando la técnica según Gerald, 2000; microscopio óptico 100X (Arcos, 2010).

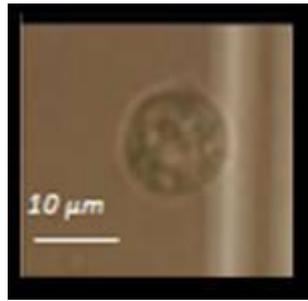


Figura 3.50 Protoplasto aislado a partir de hoja *in vitro* mediante técnica de Legood y Walker (1978). Microscopio óptico 45X. (Arcos, 2010)

Con respecto a la disgregación; las células de callo se separaron con mayor facilidad (Figura 3.51) mientras que tardaron más tiempo aquellas células obtenidas a partir de hojas (Figura 3.52)

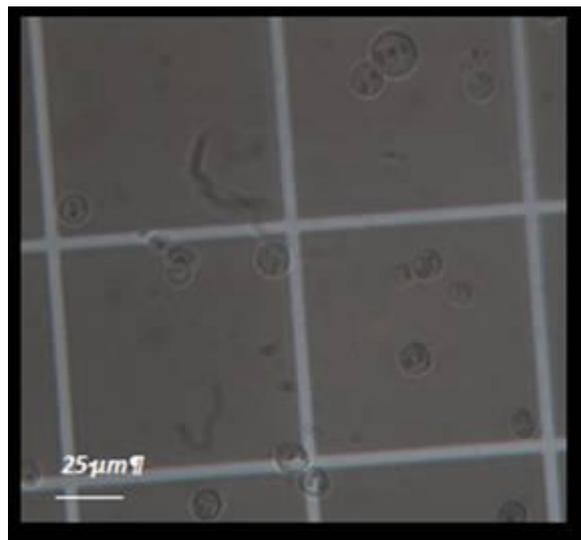


Figura 3.51 Disgregación celular a partir de callos *in vitro* a las tres horas a partir del inicio de la incubación. Microscopio óptico 45X. (Arcos y Jadán, 2010)

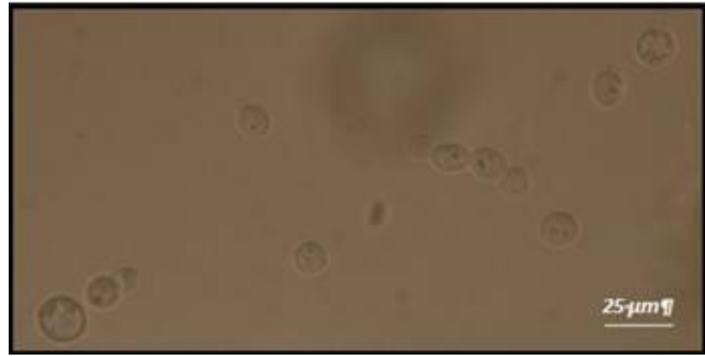


Figura 3.52 Disgregación celular a partir de hojas *in vitro* a las 9 horas a partir del inicio de la incubación. Microscopio óptico 45X (Arcos y Jadán, 2010).

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

#### 4.1 Establecimiento de semillas *in vitro*

Dentro de esta fase se discutirá acerca de todas las etapas correspondientes al establecimiento de semillas; dentro de las cuales está la fase de desinfección, germinación, rompimiento de dormancia e inducción de brotes.

##### 4.1.1 Desinfección

Esta fase es crucial para dar inicio a este estudio, puesto que las semillas son utilizadas en todas las fases posteriores.

##### 4.1.1.1 Contaminación

Los resultados obtenidos con relación a las concentraciones 2 y 2.5% de hipoclorito de sodio no arrojan diferencias significativas (Tabla 3.1) en cuanto a contaminación (25%-24%) como se observa en la tabla 3.2 y figura 3.1. Por otro lado, el tiempo de lavado en hipoclorito de sodio en las mismas concentraciones influye en la limpieza de semillas de trigo según el análisis estadístico (Tabla 3.3); la descripción de porcentajes reveló que los mejores resultados fueron obtenidos con 10 y 15 minutos de tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio (9% y 18%), se observa en la tabla 3.4 y figura 3.3.

En el estudio realizado por Velázquez y Fuentes (2009) sobre germinación de semillas de trigo, los mejores porcentajes de hipoclorito de sodio fueron 5 y 6%, con

diez minutos de contacto, seguido de varios lavados; se repitió tres veces las inmersiones en hipoclorito de sodio; donde se obtuvo el 100% de asepsia en los cultivos; pero el crecimiento de brotes fue anormal, debido a que un prolongado contacto con el cloro provoca daños en embriones generando anomalías en la germinación (Pierik, 1990). Araya *et al.* (2000) logró el 100% de asepsia al usar un lavado a presión con agua corriente, un minuto en etanol al 70% y finalmente hipoclorito de sodio al 2.5% durante 15 minutos; la diferencia con nuestro ensayo en los resultados con respecto al porcentaje de contaminación que no alcanza el 100% probablemente se deriva de que las semillas fueron mantenidas en almacenamiento a  $19\pm 2^{\circ}\text{C}$  y humedad entre 50 y 60%; a diferencia del ensayo en comparación donde el almacenamiento fue a  $12^{\circ}\text{C}$  y 20% de humedad, por no más de 15 días, con la finalidad de que no exista proliferación de esporas fúngicas (Arteca, 1996); según Christensen y Kaufmann (1976), los hongos de almacén pueden aparecer en humedades desde 60% y temperaturas a partir de  $20^{\circ}\text{C}$ ; mientras mayor sea el tiempo que el cereal se mantenga almacenando los hongos presentarán mayor capacidad de proliferación y serán más difíciles de eliminar.

En cuanto al uso de fungicida en la desinfección, los resultados estadísticos revelaron que usar thiram al 0.175% o sulfato de cobre pentahidratado al 0.12% (Figura 3.3) generan los mismos porcentajes de contaminación (23%); Gonzales (2006) recomienda utilizar thiram para semillas de trigo al ser un fungicida de contacto, para evitar proliferación de esporas; en el caso del sulfato de cobre pentahidratado, al ser un fungicida sistémico, se esperaba resultados diferentes en comparación con thiram; pero Drokasa (2010) afirma que es necesario utilizar una concentración de al menos 100ppm para lograr la verdadera función sistémica del fungicida; hay que tomar en cuenta también que estos son formulados para campo, y una prolongada exposición con el vegetal, por lo que en concentraciones bajas y tiempos reducidos de exposición, ya que este es retirado con las siguientes etapas de la desinfección, puede alcanzar una desinfección superficial; mas no una acumulación en el tejido vegetal.

Al evaluar la contaminación en base a los tratamientos establecidos se puede observar que el mejor tratamiento corresponde a aquellos donde se maneja la

concentración de 2.5% de NaClO con 15 minutos de inmersión (contaminación 5%), como se observa en la tabla 3.7; los tratamientos donde se utilizó 2% de NaClO durante 10 minutos generaron resultados de contaminación de 11% que se considera bueno en métodos de introducción *in vitro*, este tratamiento también se lo considera dentro de los mejores ya que con el análisis antes mencionado; se buscó un método en el que existan posibilidades reducidas de crecimientos anómalos o daños en el embrión por exposición prolongada a NaClO.

Es importante mencionar que el análisis por tratamiento se observa diferencia al utilizar los diferentes fungicidas, donde el sulfato de cobre presenta mejores resultados.

#### 4.1.1.2 Germinación

Gracias al análisis estadístico sobre la germinación de semillas con respecto a concentración y tiempo de inmersión en Hipoclorito de sodio, se obtuvo que aunque las concentraciones de 2 y 2.5% no intervienen en los porcentajes de germinación (70%) de semillas de trigo (Tabla 3.8), el tiempo de inmersión en este desinfectante guarda relación con la variable, mientras mayor sea el tiempo de inmersión en NaClO menor es el porcentaje de germinación de semillas de trigo variedad Cojitambo (Tabla 3.10); se encontró que con tiempos de 5, 10 y 15 minutos se reportaron porcentajes de germinación de 82, 76 y 56% respectivamente (Figura 3.5).

En el trabajo de Velázquez y Fuentes (2009) se establecieron tratamientos de desinfección de 3, 4, 5 y 6% de hipoclorito de sodio durante 30 minutos, este tiempo fue fraccionado en tres, con la finalidad de mantener a las semillas de trigo expuesta al contacto con el NaClO durante poco tiempo; pero los resultados de germinación se vieron afectados; mientras mayor concentración de NaClO menor fue el porcentaje de germinación de semillas, lo que concuerda con lo encontrado en nuestro estudio. Según Pierik (1990), esto se debe a la relación existente entre concentraciones altas de hipoclorito de sodio junto con tiempos prolongados de inmersión en la misma sustancia; en el estudio de comparación se presentan resultados de germinación de 80, 72, 60 y

51%; En esta tesis se observa disminución de aproximadamente un 20%, en la germinación, entre los dos últimos tiempos de inmersión (10 y 15 minutos), como se observa en la tabla 3.10; lo que nos indica una relación muy clara con el tiempo de inmersión; por lo que se tomarán en cuenta tratamientos con tiempos de hasta 10 minutos de contacto con esta sustancia.

Los análisis estadísticos reflejan que el uso de cualquiera de los dos fungicidas (Thiram o sulfato de cobre pentahidratado) no interviene en la germinación de semillas de trigo (Tabla 3.13 y 3.14); lo que puede explicar Drokasa (2010), al establecer que los fungicidas de contacto son retirados con facilidad, como es el caso de thiram; además este logra una desinfección superficial, por lo que no interviene en procesos fisiológicos de la planta; mientras que el sulfato de cobre pentahidratado al ser un fungicida sistémico, que se lo mantiene únicamente por 15 minutos en contacto y es retirado al utilizar etanol y cloro en los pasos posteriores de la desinfección, podría decirse que el tiempo de exposición y su concentración es insuficiente para generar alteraciones en el proceso de germinación de trigo.

Al analizar la variable germinación con respecto a los diferentes tratamientos, se puede observar que los mejores son aquellos en los que se utiliza tiempos de cinco y 10 minutos de lavado en NaClO ya que generan los mejores resultados en cuanto a germinación de semillas (84% y 79%), y en la mayoría de los casos presentan la concentración de 2% de este desinfectante (Tabla 3.14 y figura 3.8).

Según los análisis realizados para contaminación y germinación de semillas de trigo en etapa de introducción se encontró que el mejor tratamiento, en ambos casos, según las características planteadas, corresponde al tratamiento D8 en el que se utiliza sulfato de cobre pentahidratado como fungicida, 2% de NaClO y tiempo de lavado en el mismo de 10 minutos, generando 11% de contaminación (Tabla 3.7) y 79% de germinación (Tabla 3.14).

#### 4.1.2 Rompimiento de dormancia

Para el rompimiento de dormancia de las semillas se evaluaron diferentes tiempos de imbibición.

##### 4.1.2.1 Contaminación

El análisis estadístico revela que el tiempo de inmersión en NaClO al 0.2% no refleja significancia estadística en porcentajes de contaminación (Tabla 3.15), sin embargo los análisis de porcentajes demuestran que los mejores tratamientos corresponden a los tiempos de inmersión de 1 y 6 horas con porcentajes de 20 y 13% de contaminación (Tabla 3.16); además se puede observar que en tiempos de 12 y 24 horas se ven incrementados los porcentajes de contaminación a 27 y 40%; según Dolberg (2008) el hipoclorito de sodio pierde su estabilidad con el transcurso del tiempo; si se encuentra bajo condiciones adecuadas de almacenamiento la pérdida corresponde a 0,07% diario; con forme se lo exponga a luz, aire, altas temperatura pierde estabilidad, disminuyendo su efecto blanqueador y desinfectante; en el presente ensayo las semillas en imbibición se encontraban a temperaturas entre 20°C y 27°C, bajo condiciones de luz; lo que pudo afectar su estabilidad con el pasar de las horas, más aún al encontrarse en una concentración tan baja (0.2%).

Este tratamiento de imbibición fue realizado con el mejor tratamiento de desinfección obtenido en el análisis anterior, que corresponde al D8 (Tabla 3.7); por lo que es posible comparar los resultados de contaminación obtenidos en ambos casos, en la aplicación del protocolo de desinfección sin la imbibición se obtuvo un porcentaje de contaminación del 11% (Tabla 3.7), mientras que después de la imbibición se obtuvieron porcentajes de 20 y 13% (Tabla 3.16), aun utilizando hipoclorito de sodio para la imbibición los porcentajes de contaminación se ven incrementados.

#### 4.1.2.2 Viabilidad

La prueba de chi cuadrado de Pearson refleja que no existe significancia estadística en la viabilidad de semillas de trigo variedad Cojitambo, con respecto al tiempo de imbibición en NaClO al 0.2% (Tabla 3.17); los análisis de porcentajes reflejan que los mejores tratamientos con viabilidad de 85% corresponden a tiempos de 0 y 1 hora; y de 80% en tiempos de 2 y 6 horas (Figura 3.10).

En el estudio realizado por Mendez *et al.* (2008) se sometieron semillas de maíz a tiempos de imbibición en agua de 1, 4, 8, 12 y 14 horas, que reflejaron porcentajes de germinación de 100% para los dos primeros tiempos; para ocho y 14 horas porcentajes de 93 a 95%; para la hora 12 de 84%; cuando se sometió las semillas a un tratamiento previo de desinfección con fungicida, los porcentajes se vieron reducidos en 50 y 70%; al igual que en el estudio realizado en trigo se observa la reducción de viabilidad con respecto al incremento de tiempo de imbibición (Figura 3.10).

Al realizar una comparación entre viabilidad y contaminación los resultados reflejarían que el mejor tratamiento en ambos casos constituye una hora de imbibición, pero al observar las semillas de cada tratamiento se encontró que no se encontraban totalmente hinchadas en este tiempo (Figura 3.11a) en la siguiente hora la semilla se encontraba hinchada a excepción de la zona del embrión (Figura 3.11b), a las seis horas se observó un hinchamiento completo de la semilla (Figura 3.11c), tiempo que presenta 80% (Figura 3.10) de viabilidad y 13% de contaminación (Tabla 3.16).

#### 4.1.3 Germinación

En esta etapa se evaluaron diferentes concentraciones de ácido giberélico, el ANOVA revela alta significancia estadística entre los grupos (Tabla 3.18); para lo que se realizó una prueba de Tukey siendo el mejor resultado  $2\text{mg.L}^{-1}$  de ácido giberélico con 6.3 días de germinación promedio (Tabla 3.19 y figura 3.13).

En el trabajo de Araya *et al.* (2000), se utilizaron las mismas concentraciones de ácido giberélico en los ensayos de germinación de semillas de *Alnus acuminata*, en este estudio se probó un fotoperiodo de 12 horas y en otro tratamiento ausencia total de luz; este estudio reflejó resultados similares a los obtenidos en trigo con mayor porcentaje de germinación en menor tiempo a concentraciones de  $2\text{mg.L}^{-1}$  de ácido giberélico; según Arteca (1996) existe una relación directa entre concentración de ácido giberélico, porcentaje y tiempo de germinación de semillas en general.

Según García y Kamiya (1999) la germinación de semillas, que requieren luz, está regulada por el sistema fitocromo, y se conoce por Watkinson y Pill (1998) que la síntesis de giberelinas está regulado por el fitocromo; por lo que se afirma que una concentración límite en cada especie puede sustituir los requerimientos de luz en la germinación de semillas, así como también adicionar a semillas que se encuentran bajo efectos de luz concentraciones de ácido giberélico ayudarán a una pronta geminación ya que la síntesis de alfa amilasa se genera gracias a la presencia de giberelinas, la enzima es secretada hacia el endospermo donde digiere el almidón generando azúcares que constituye la reserva alimenticia del embrión para su crecimiento y pronta germinación (Taíz y Zeiger. 2006); esta puede ser la razón de que en el estudio realizado en trigo se observa una germinación más rápida mientras mayor es la concentración de ácido giberélico en el medio de cultivo.

El fotoperiodo empleado es crucial en la germinación de semillas; en el estudio realizado Velázquez y Fuentes (2009) en germinación de semillas de trigo de cuatro variedades harineras se probaron fotoperiodos de 16 y 12 horas luz, y aunque no existieron diferencias estadísticas se observó una germinación más temprana con 16 horas luz, y posteriormente existió un mayor crecimiento de las plántulas; en el presente estudio realizado en Cojitambo se estableció un fotoperiodo de 16 horas luz.

Rojas y Róvalo (1985) afirman también que es indispensable distinguir las condiciones de temperatura que son requeridas para los cultivos de trigo; para que una

planta de trigo *in vitro* realice fotosíntesis y pueda desarrollarse normalmente es necesario temperaturas entre 26 y 30°C; aunque la temperatura reportada como óptima para trigo en fases posteriores a germinación de campo fluctúe entre 20 y 25°C; pero Velázquez y Fuentes (2009) demostraron que los trigos duros presentan resultados de germinación más tempranos en temperaturas de 24°C. En nuestro estudio la temperatura varió entre 18 y 24°C, y tratándose de una variedad de trigo duro se encontraba a la temperatura óptima para su correcto desarrollo.

#### 4.1.4 Establecimiento de brotes

Para el establecimiento de brotes se propusieron cuatro concentraciones de brasinolina (0; 0.001; 0.002; 0.003 ppm) y se evaluó mediante un ANOVA los resultados obtenidos en cuanto a cantidad de brotes, ancho de la hoja y tiempo de germinación, dentro de los cuales solo este último presentó baja significancia estadística (Tabla 3.20).

##### 4.1.4.1 Cantidad de brotes

Los subconjuntos encontrados en la prueba de Tukey para esta variable fueron tres, el mejor corresponde a 0,003 ppm de brasinolina generando un promedio de 4.7 brotes por cada semilla de trigo introducida *in vitro* (Tabla 3.21).

Según Geroge (2008) esto se debe a la interacción que presenta el ácido giberélico junto con la brasinolina al tratarse de germinación, aumento en la biomasa y formación de brotes; además Mandava (1988) comprobó en su bioensayo en frijol y maíz que el ácido giberélico y los brasinoesteroides tienen una acción independiente y aditiva, mientras el ácido giberélico aporta en la pronta germinación, la brasinolina aporta el establecimiento de brotes además de su alargamiento, engrosamiento de hipocótilo y mescótilo, y del desdoblamiento de hojas.

Se le atribuye a la brasinolina la razón por la que los coléoptilos crecieron muy erguidos en este estudio; esto lo demostró Salinas *et al.* (1994) en sus ensayos referentes a la fisiología de las plantas con respecto a la aplicación de brasinoesteroides donde se obtuvieron mediciones de epicótilos, mesocótilos, curvaturas de entre nudos, entre otros, en todos los casos los mejores resultados se obtuvieron al usar algún brasinoesteroide.

Ikekawa y Zhao (1991) demostraron que las concentraciones de brasinolida óptimas para cualquier especie se encuentran entre 0,001 y 0,1 ppm, concentraciones mayores a esta se tornan tóxicas o inhibitorias de crecimiento; por esta razón se utilizaron de 0,003 ppm de brasinolida, como concentración más alta, con la que se obtuvo mayor cantidad de brotes con respecto a las concentraciones inferiores.

#### 4.1.4.2 Ancho de la hoja

Vargas e Irizar (2005) propusieron un estudio en el que se probó la diferencia al usar o no brasinolida en cultivos *in vitro* de maíz con el propósito de observar el incremento de biomasa en tallos, hojas y raíz; cuyos resultados revelaron que al usar el bresinoesteroide se logró incremento en un factor de 1,7 de biomasa en todos los casos, con respecto al blanco; en el caso de las hojas se encontró mayor área foliar y peso seco. En esta tesis se observó gracias a la prueba de Tukey (Tabla 3.22) que el ancho de la hoja es mayor conforme aumenta la concentración de brasinolina en el medio de cultivo, siendo 5,1 mm el mayor ancho encontrado en hojas de trigo *in vitro* al utilizar 0,003 ppm de brasinolida, en comparación con concentraciones de 0, 0,001 y 0,002 ppm.

El resultado obtenido por observación para el enrollamiento de la hoja de trigo en el tratamiento donde no se adicionó brasinolina al medio de cultivo (Figura 3.16); existen dos estudios en los que se explica este fenómeno; según Honda *et al.* (2003) *Horderum vulgare* y *Triticum aestivum* presentan una mutación en la ruta sintética de brasinolina y el ácido abscísico, que provocan el enrollamiento de hojas; lo que se

puede neutralizar al añadir algún brasinoesteroide en el medio de cultivo; en este estudio se añadió 0,1 ppm de brasinoesteroide *ex vitro*, logrando resultados exitosos. En el estudio realizado por Wada *et al.* (1985) se probó concentraciones *in vitro* desde 0,0005 hasta 0,0 mg.L<sup>-1</sup> que fue la concentración que logró el desenrollamiento total de las hojas de trigo.

#### 4.1.4.3. Tiempo de germinación

En este estudio no se observó una diferencia significativa en el tiempo de germinación de semillas de trigo con respecto a las diferentes concentraciones de brasinolina empleadas en el ensayo (Tabla 3.20); se conoce según Zeferino y Rodriguez (2003) que la brasinolina posee efectos sobre la germinación de semillas de maíz al adicionarla en el medio de cultivo, pero se demostró también que los efectos de este brasinoesteroide varía entre especies y concentraciones tornándose inhibitorio en algunas, y utilizaron 0,3 ppm para lograr una germinación temprana de semillas de maíz; gracias al estudio realizado por Namhauser y Chory (2004) realizado en leguminosas se conoce que las concentraciones de brasinolida empleadas para la germinación de semillas se encuentra muy cerca de los límites en los que puede volverse tóxico para la planta; por esto se cree que las concentraciones de brasinolina empleadas (0, 0,001, 0,002 y 0,003 ppm) no fueron suficientes para lograr una diferencia en el tiempo de germinación de semillas de trigo.

#### 4.1.5 Establecimiento de callos

Para el establecimiento de callos los ensayos fueron planteados de acuerdo a la presencia o ausencia de semillas en plantas germinadas; además de la proliferación de callos a partir de semillas de trigo no germinadas.

#### 4.1.5.1 A partir de semillas no germinadas

Según Ogura y Shimada (1975), son muy pocas las variedades de trigo de las cuales se puede obtener callos de diferentes órganos de la planta, además se observó que si se requiere la formación de una planta completa es necesario que el callo sea generado a partir de embrión o el endospermo, también se han obtenido callos a partir de semillas íntegras y raíces; esto debido a su característica monocotiledonar.

Onogura y Shimada (1975) utilizaron el medio MS con 2,4-D en concentración de  $2\text{mg.L}^{-1}$ , y luz fluorescente, después de un mes se observó el crecimiento de callo a partir del embrión en un 32% de los casos; y en un 56% a partir del endospermo; es por este motivo que se decidió obtener callos a partir semillas de trigo, y no otro órgano; además esto concuerda con los resultados obtenidos de presencia de callo por tratamientos, donde el 65% de los casos en medio de cultivo con  $2\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4D (Tabla 3.23), la diferencia con el 56% puede deberse al uso de brasinolina y un medio L2 más efectivo para formación de callo a partir de semilla de trigo.

##### a) Concentración de 2,4D

En el análisis de Tukey 5% (Tabla 3.25) y según el análisis de porcentajes (Figura 3.17) se puede observar que existen dos grupos siendo el mejor  $2\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-D con un tiempo de aparecimiento de callo de 35.5 días en promedio. En el estudio formulado por Rodríguez *et al.* (2003), para generar callosidad a partir de semillas en cereales es necesario el empleo de 2,4-D.

Las concentraciones más elevadas suelen tornarse tóxicas para el medio, logrando en ciertos casos la oxidación de las semillas y en otros el retraso en el aparecimiento de callos; en las concentraciones de  $2,5\text{mg.L}^{-1}$  y  $3,5\text{mg.L}^{-1}$  se obtuvo aparecimiento de callo en porcentajes más bajos que al aplicar  $2\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-D, además del aumento en el tiempo de su aparecimiento (Figura 3.17); lo que concuerda

con el estudio realizado en Libia por Elfinish (2002) en una variedad de trigo de primavera en el que se emplearon hasta  $6\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4 D, concentración en la que se observó un menor porcentaje de semillas de trigo que presentaban callo (25%), y se comprobó mutación en la regeneración de plantas.

#### b) Presencia de brasinolina

Gracias a los resultados se pudo observar que la presencia de brasinolina disminuye el tiempo de apareamiento de callo a partir de semillas de trigo (Figura 3.18); lo que se explica con la capacidad del brasinoesteroide de división celular; el estudio realizado por Rodriguez *et al.* (2003) concuerda con los resultados del presente estudio en los que se comprueba que la brasinolina es esencial en la formación de callosidades en el que demostró que la mejor concentración en arroz corresponde a  $0,00005\text{mg.L}^{-1}$ ; y existen diferencias entre variedades para el tiempo de apareamiento de callo, por lo que recomienda establecer una concentración para cada variedad.

Además los resultados revelan que los callos fueron muy friables; esto se le atribuye a la brasinolina; según el estudio realizado por Sasse (1997), se demuestra que la presencia de concentraciones bajas de brasinoesteroide (0,001 a 0,009 ppm) genera callos blanquesinos o amarillos muy friables y nodulares; esto se debe según Velázquez *et al.* (1999) a que la brasinolida no solo es capaz de generar una pronta división celular sino que además ayuda a las células en su osmoregularidad gracias al transporte de nutrientes dentro de la célula y especialmente a la suficiente cantidad de agua para los diferentes procesos; por esto los callos que se generan con brasinolina son friables.

#### c) Medio de cultivo

Los medios de cultivo utilizados son MS y L2 (ANEXO B); el medio MS ha sido formulado con la finalidad de darle al explante todos los nutrientes necesarios para que se alimente, nutra y crezca; pero la fisiología de la formación de callos es diferente,

por lo que ciertos nutrientes deben ser reducidos como es el caso del nitrógeno y fósforo, para darle al explante menos posibilidad fisiológica de convertirse en una planta completa; es por esto que se formula el medio L2 específico para formación de callos en cebada a partir de semillas o embriones. (Lina 2005).

Los resultados obtenidos revelan una diferencia altamente significativa en cuanto al tiempo de apareamiento de callo a partir de semillas al utilizar medio L2 o medio MS (Tabla 3.23); revelando que podría obtenerse apareamiento de callo al menos cinco antes al utilizar medio L2.

d) Interacción medio de cultivo\*presencia de brasinolina

Los resultados revelan que no existe diferencia estadística en estos tratamientos; como se observa en la tabla 3.23; pero basados en los análisis mencionados sobre el medio de cultivo L2 y acción de la brasinolina en la formación de callos a partir de semillas no germinadas; se observa que usar medio L2 con brasinolida genera callos más temprano que el resto de tratamientos; esto debido a la acción de la brasinolina correspondiente a la rápida división celular (Rodríguez *et al.*, 2003) además el medio L2 es específico para cebada (*Hordeum*), cereal muy parecido fitogenéticamente al trigo (*Triticum*) y centeno (*Secale*) (Berlitz & Grosch, 1999).

e) Interacción medio de cultivo\*concentración de 2,4-D

El ANOVA (Tabla 3.23) demuestra alta significancia estadística en cuanto a esta interacción, y la prueba de Tukey muestra cuatro grupos, siendo la mejor interacción el medio L2 con 2,4-D en concentración  $2\text{mg.L}^{-1}$  con un tiempo de apareamiento de callo de aproximadamente 31 días (Tabla 3.28 y figura 3.21); esto se constata con el estudio de Lina (2002) en el que aunque no describe el resto de concentraciones de 2,4-D se propone como mejor medio de cultivo al L2 con una concentración de brasinolina de  $2\text{ mg.L}^{-1}$  para la cebada.

f) Interacción presencia de brasinolina\*concentración de 2,4D

El ANOVA (Tabla 3.23) arrojó un resultado no significativo para esta interacción, pero la figura 3.22 demuestra que los callos a partir de semilla sin germinar son obtenidos unos días antes si se utiliza la interacción presencia de brasinolina con  $2\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-D.

Según Geroge *et al.* (2008) la brasinolina puede tener acción específica de división celular si es combinada con otro regulador de crecimiento; esto hace que el 2,4-D torne específica la división celular para la formación de callo; es por esto que en todas las concentraciones de 2,4-D los mejores resultados se presentan en presencia de brasinolina (Figura 3.22).

g) Tratamientos

La figura 3.23 muestra el resultado para tiempo de apareamiento de callos con respecto al tratamiento, junto con todos los análisis realizados anteriormente sobre cada variable se toma al mejor tratamiento como el C4 en el que se utiliza medio L2, presencia de brasinolina y  $2\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-D.

4.1.5.2 A partir de planta germinada *in vitro*

Existen grandes diferencias entre las propiedades vitamínicas y minerales de la semilla y la planta de trigo; a continuación se demuestran los análisis referentes a variables oxidación y presencia de callo.

#### a) Oxidación

En esta etapa se encontró alta significancia estadística gracias a la prueba de chi cuadrado realizada (Tabla 3.29); en el análisis de porcentajes se observó que los mejores resultados corresponde a aquellas plantas colocadas *in vitro* que presentan semilla (Figura 3.24); esto se debe según Fuertes *et al.* (2006) a la presencia de antioxidantes en las capas más externas en las semillas de trigo como vitaminas: A, B y C; además la semilla de trigo se constituye una fuente natural de hidroquinona que es un conocido antioxidante.

Según Vaugh (1984), las semillas son las únicas estructuras de la planta que poseen antioxidantes en la suficiente concentración como para prevenir una oxidación ante los componentes de un medio de cultivo normal como es el MS; esta puede ser la razón por la que al sembrar plantas de trigo desprovistas de semillas el 100% de los casos presenta oxidación; en un estudio realizado por Vaugh (1990) se demuestra que al retirar la semilla a planta de trigo se produce una herida irreparable en la planta, donde se corta el vínculo de nutrientes directos; además esta herida provocada al retirar la semilla es la que ocasiona la oxidación fenólica y la muerte del tejido.

También se observó la muerte del explante o marchitez en los casos donde la semilla de se encontraba sumergida en el medio de cultivo (Figura 3.25); El Instituto Interamericano de Cooperación para la agricultura (2009) publica un estudio en el que demuestra que las semillas de algunos cereales como el trigo presenta estrés por hiperhidricidad; donde el embrión de trigo es el motor de todos los procesos fisiológicos, en el caso de causarle un estrés por retención de agua excesiva todos los procesos se detienen ocasionando un estado latente.

Dentro de las observaciones se nota que la semilla no sufre oxidación, sino únicamente el tejido de la planta por su contacto directo con el medio de cultivo (Figura 3.25).

## b) Presencia de callo

La prueba de chi cuadrado demuestra que la presencia de semilla está relacionada con el apareamiento de callo (Tabla 3.30); en el análisis de porcentaje se demuestra que la presencia del embrión es esencial en la proliferación de callo (Figura 3.26 y 3.27), los mismo que aparecieron en un promedio de 28 días; lo que concuerda con el estudio realizado por Shimada (1980) donde se logró obtener callos a partir de embriones, endospermo y semillas de trigo, a los 32 días a partir del inicio de la incubación; la diferencia con nuestra ensayo constituye la presencia de brasinolina

No hay disponibilidad de estudios en los que se hayan inducidos a callos de trigo a partir de semillas pregerminadas, pero Berthouly y Ferrier (1996) afirman en sus estudios en semillas de plantas monocotiledóneas que aunque las células de un mismo organismo tengan igual genotipo, la capacidad de formación de callo difiere entre células de distintos órganos; y en plantas monocotiledóneas la presencia de la semilla asegura la sobrevivencia de la planta y su capacidad de generación de callos.

Se observó en este estudio que la proliferación de callo nace del embrión; es posible que en semillas pregerminadas el apareamiento de callo tenga el mismo inicio pero su proliferación continúa en el vínculo que menciona Vaugh (1990) en su estudio en trigo, empezando por raíces y tallo.

### 4.1.6 Aislamiento de protoplastos

#### 4.1.6.1 A partir de hoja

En esta fase se utilizaron diferentes concentraciones de macerozima y celulasa 2, 3 y 4%; y la pectoliasa fue utilizada en una única concentración de 0.3% en vista de su efectividad observada en varios ensayos previos.

Los datos para el análisis estadístico fueron tomados hasta la hora diez del ensayo, esto para obtener una mejor visión en la comparación de resultados cuando todos los tratamientos se encuentran en el pico más alto de aislamiento de protoplastos.

#### 4.1.6.1.1 Cantidad

En la Figura 3.28 se observan las diferentes curvas generadas por la cantidad de protoplastos con respecto al tiempo de incubación. El coctel enzimático con concentración débil (2% maz-cel) obtuvo la mayor concentración de protoplastos ( $30 \times 10^6$  por mL de solución) entre las horas 7 y 10 de incubación; la concentración intermedia (3% maz-cel) obtuvo la concentración más alta de protoplastos ( $30 \times 10^6$  por mL de solución) entre las horas 9 y 11; y la concentración más fuerte (4% cel-maz) generó  $40 \times 10^6$  protoplastos por mL de solución entre las nueve y doce horas de incubación, siendo este el mejor tratamiento.

Se realizó un ANOVA (Tabla 3.31) para esta variable con respecto al tiempo de digestión y concentración enzimática además de su interacción, en todos los casos se obtuvo un resultado altamente significativo.

##### a) Tiempo de incubación

Se realizó una prueba de Tukey, figura 3.29, se observan los grupos generados en esta prueba, y el aumento en la cantidad de protoplastos con respecto al aumento en el tiempo de incubación a  $27^\circ\text{C}$ , donde se demuestra que el mejor corresponde al grupo “h” entre las 9 y 10 horas de incubación, con una cantidad de protoplastos de  $34 \times 10^6$  por cada mL de solución; en el estudio realizado por Sethi y Maeda (1983), en trigo, el pico correspondiente a la mayor cantidad de protoplastos se encuentra entre las horas 10 y 13 de incubación en la que se utilizó celulasa 4%, macerozima 1% y pectoliasa 0.2%; además se menciona que la viabilidad de protoplastos aumentó hasta obtener el 86%, ( $1 \times 10^6$ ); por otro lado en el estudio realizado por Duquenme *et al.* (2007) el mejor

tiempo de incubación para protoplastos de trigo fue de 16 horas a una temperatura de 22°C; en el presente estudio la temperatura de incubación fue de 27±0,5°C. Debido a los estudios realizados por Chawla (2000) y Jadán (2000) muestran que las mejores temperaturas para la acción enzimática se encuentran entre 26 y 28°C, por lo que se tomó una temperatura intermedia, a lo que se atribuye una generación de protoplastos más rápida en comparación con el estudio de Duquenme (2007) en trigo.

Es importante mencionar que en este estudio el conteo de protoplastos se realizó únicamente de aquellos viables; en el estudio realizado por Deep *et al.* (2006) en *Brassica napus* se realizaron pruebas en cuanto al tiempo de incubación que concuerda con los resultados obtenidos, los mejores tiempos de incubación son de 10 a 12 horas, mientras que en tiempos de 16 a 18 horas existe menor cantidad de protoplastos viables.

#### b) Concentración enzimática

Las concentraciones enzimáticas utilizadas en este ensayo correspondientes a los tratamientos Cel-Maz 2%; Cel-Maz 3% y Cel-Maz 4%; pectoliasa en concentración 0,3%; la prueba de Tukey revela tres grupos diferentes (Tabla 3.33), uno con cada tratamiento, donde el mejor corresponde a Celulasa-mazerozima 4%, con una cantidad de protoplastos de  $21 \times 10^6$  protoplastos por mL de solución; en el estudio realizado por Sethi y Maeda (1983) se probaron varias concentraciones enzimáticas: celulosa de 4% y macerozima 2%; donde se demostró que existen mayor cantidad de protoplastos viables al utilizar pectoliasa en concentraciones de 0.2% a 0.4%; la cantidad de protoplastos obtenidos fue de  $5,58 \times 10^6$  unidades por mL de solución con un 86% de viabilidad con una cantidad de hoja adulta de 0,5g; es posible que la cantidad de protoplastos que no concuerda se deba a dos motivos, la edad de las hojas y además la concentración de macerozima.

En otros estudios (Duquenme, 2007) se trabaja con concentraciones de celulosa y macerozima 2%, y en lugar de la pectoliasa se adiciona 0.5% de dicrelasa; en el cual se

obtienen  $10^6$  protoplastos por cada mL de solución a las 13 horas de incubación, cabe recalcar que en este estudio los tiempos de evaluación constituyeron las 9, 13 y 17 horas desde la incubación; que según Krautwig y Lorz (1995) la función de la dicrelasa es muy similar al de la pectoliasa y varias helicasas, de ayudantes y aceleradores de rompimiento de pared celular.

En un estudio en Maracuyá por Rivera y Perea (2004) se analizó la diferencia de utilizar distintas combinaciones enzimáticas, en las que se probó Cell1%-pec0.05%; cell1%-maz0.2%; cel2%-mac0.4%; los mejores resultados con cantidades de  $7 \times 10^6$  protoplastos por gramo de hoja utilizada fue con pectoliasa en el coctel, en comparación con el presente estudio la obtención de protoplastos con respecto al peso de hojas utilizadas es de  $60 \times 10^6$  utilizando tres enzimas cel-maz2% y pectoliasa 0.3%.

#### c) Concentración enzimática\*tiempo de incubación

La prueba de Tukey reveló 11 grupos estadísticamente diferentes (Tabla 3.33) dentro de los mejores se encuentran las interacciones: cel-maz 4% con 9 y 10 horas de incubación generando de 40 a  $42 \times 10^6$  protoplastos por mL de solución. Este tratamiento le brindó a los protoplastos mayor estabilidad logrando así una cantidad viable muy alta.

Cabe recalcar que en todos los tratamientos a partir de las dos horas de incubación se obtuvieron protoplastos que pueden servir para ensayos posteriores en investigaciones que le competen al trigo.

#### 4.1.6.1.2 Disgregación celular

El ANOVA reflejó alta significancia estadística (Tabla 3.31) donde se estableció cuatro niveles (1 disgregación nula; 2, inicial; 3, media; 4 completa) con respecto al tiempo de digestión enzimática además de la concentración del coctel enzimático; esta fase se evaluó mientras se realizaba el conteo de protoplastos.

a) Tiempo de incubación

Se realizó la prueba de Tukey para el tiempo de digestión enzimática (Tabla 3.35 y figura 3.32), donde se observó seis grupos; con disgregación completa en las horas de digestión nueve y diez (Figura 3.32), que coincide con la mayor cantidad de protoplastos viables.

En el estudio realizado por Beranek *et al.* (2007) con *Brassica carinata* en obscuridad a una temperatura de 25°C con un coctel enzimático de celulasa 1% y macerozima 0.5%; aunque no menciona el momento en el que inicia la disgregación completa se conoce que se tuvo una disgregación total a las 16 horas de incubación.

En el estudio de Nobre *et al.* (1996) al utilizar el mismo coctel enzimático presentado en este estudio la disgregación celular comenzó a las tres horas después de la incubación; en nuestro estudio como se observa en la tabla 3.35 el inicio de la disgregación a la tercera hora de la incubación a 27°C.

b) Concentración enzimática

El ANOVA (Tabla 3.31) reflejó un resultado no significativo para esta variable; lo que significa que no hay diferencia entre la obtención de protoplastos aislados en los diferentes tratamientos; pero la diferencia se observa al evaluar la interacción tiempo de incubación\*concentración enzimática (Tabla 3.36).

c) Concentración enzimática\*tiempo de incubación

El ANOVA (Tabla 3.31) reflejó un resultado altamente significativo, en la prueba de Tukey se obtuvo cuatro grupos bien definidos estadísticamente (Tabla 3.36 y

figura 3.33), en el que muestra el mejor grupo como cel-maz4% y tiempos de 9 y 10 horas que coincide con los resultados anteriores.

Los resultados en los estudios de disgregación realizados por Sethi y Maeda (1983) coincide en que es necesario un tiempo de incubación de al menos tres horas y una concentración de pectoliasa de al menos 0.2% para que se logre una liberación de protoplastos.

En el estudio realizado por Beranek *et al.* (2007) en *Brassica carinata* refleja que al utilizar celulasa al 1% y macerozima al 0.5% se obtiene una disgregación total de protoplastos en la hora 14; en este estudio se utilizó mayor concentración enzimática y el coctel más eficiente.

Y por último Nobre *et al.* (1996) utiliza las enzimas coincidentes con el presente estudio, en concentraciones de cel1%, maz-pec 0.5% la digestión celular se da a partir de las tres horas de digestión enzimática, en este estudio se puede observar que en todos los casos el inicio de la disgregación celular se da a partir de la hora tres, y la disgregación intermedia a partir de la hora cuatro; si bien es cierto las diferentes concentraciones enzimáticas no reflejan diferencia en la disgregación celular, su interacción con el tiempo genera diferencia, por lo que los desfases de resultados en cuanto al tiempo pueden deberse a la diferencia en la concentración enzimática.

#### 4.1.6.1.3 Morfología celular

Para esta variable se realizó un ANOVA (Tabla 3.31) donde se observó alta significancia estadística, estableciendo tres niveles (1 célula; 2, protoplasto viable; 3, protoplasto roto) con respecto al tiempo de digestión enzimática además de la concentración del coctel enzimático; cabe mencionar que esta fase se evaluó mientras se realizaba el conteo de protoplastos y se tomó el dato correspondiente al 51% de la placa.

a) Tiempo de incubación

Se realizó una prueba de Tukey para el tiempo de digestión enzimática (Tabla 3.37 y figura 3.34), donde las horas ocho, nueve y diez, presentan mayor cantidad de protoplastos viables con relación a la cantidad de células; esto guarda relación con los resultados anteriores, ya que han sido los tiempos donde se encuentra la mayor cantidad de protoplastos viables y donde se observa mayor disgregación celular.

b) Concentración enzimática

Se realizó una prueba de Tukey (Tabla 3.38) para la morfología con respecto a la concentración enzimática, ya que en el ANOVA (Tabla 3.31) se encontró alta significancia estadística; como se observa en la tabla 3.38 y figura 3.35 existen tres grupos, dentro de los cuales el que se acerca al valor de “2”, corresponde a macerozima-celulasa al 2%.

Como se observa en la figura 3.35 mientras aumenta la concentración enzimática la viabilidad de los protoplastos disminuye, pero es también importante denotar que no existen protoplastos rotos en estas concentraciones, como mayoría en la placa y que las diferencias no son abismales.

Según Rivera y Perea (2004) la eficiencia de la concentración enzimática va a depender en un 70% de la juventud del material inicial, es decir que para las hojas de un tiempo de 5 a 7 semanas las enzimas podrán actuar más rápido y mejor gracias a la falta de lignificación por ende contribuyen en una mejor penetración enzimática; en este estudio se utilizaron hojas de una edad de 6 semanas.

Por último en el estudio realizado en trigo por Sethi y Maeda (1982) se observa que el medio BH3 que sirve como regulador osmótico pierde viabilidad a temperaturas

altas (27°C a 30°C) con forme pasa el tiempo a partir de las seis horas de incubación; los que les llevó a concluir que es indispensable el uso de pectoliasa para la pronta obtención de protoplastos, ya que así podrán mantenerse esféricos y viables mayor tiempo en esta solución; los protoplastos esféricos perfectos y de núcleo visible fueron obtenidos a las seis horas de incubación aunque su cantidad fue baja.

c) Interacción concentración enzimática\*tiempo digestión de pared celular

Los resultados de una prueba de Tukey arrojaron únicamente dos grupos (Tabla Figura 3.36); pero fue necesario conocer, cuáles son los tratamientos que alcanzaron con mayor rapidez una morfología “protoplasto viable” en un 51% de la placa, que constituye cel-maz 2% en cinco horas de incubación; esto concuerda con lo antes mencionado acerca de la reducción de viabilidad con respecto al aumento de concentración enzimática.

En los tratamientos posteriores se observa que en todos los casos se tiene una valoración “2” que corresponde a protoplastos viables se encuentran en la hora seis de incubación, con todas las concentraciones enzimáticas planteadas.

#### 4.1.6.2 A partir de callo

Para esta etapa se probaron concentraciones de celulasa-macerozima 2; 3 y 4% en diferentes tratamientos, mientras que la pectoliasa tiene una concentración de 0.3% en todos los casos. Para el análisis estadístico únicamente se emplearon los datos obtenidos hasta la hora seis, en la cual todos los tratamientos presentan el pico más alto en cuanto a cantidad de protoplastos.

Se realizó un ANOVA (Tabla 3.40) donde se muestra alta significancia para todos los casos, esto se detalla a continuación.

#### 4.1.6.2.1 Cantidad de protoplastos

De forma general se puede observar en la figura 3.37 el conteo de protoplastos realizado durante diferentes tiempos de incubación (1 – 6 horas) y concentraciones de celulasa y macerozima (2, 3 y 4%); en el que se observa la mayor cantidad de protoplastos en el tratamiento celulasa-macerozima 4%.

##### a) Tiempo de incubación

Se realizó una prueba de Tukey (Tabla 3.41 y figura 3.38) con respecto al tiempo de incubación donde se observan 3 grupos desde las horas de incubación 4 hasta la 6 corresponde al grupo con mayor cantidad de protoplastos por mL de solución; además se observa que conforme aumenta el tiempo de incubación la cantidad de protoplastos se incrementa.

En el estudio realizado en *Eurycoma longifolia* por Kiong *et al.* (2010) se evaluaron tiempos de incubación desde dos seis horas en los que se demostró que en tiempos de dos a cuatro horas existe un incremento del 40% en la cantidad de protoplastos viables; el tiempo en el que encontró mayor número de protoplastos con una concentración de cel.maz 1.5% con una cantidad de 0.2g de callo fue en la hora cuatro con  $5.58 \pm 1.5 \times 10^5$  protoplastos por mL de solución; en contraste con este estudio se utilizó 0.3g de callo con pectoliasa adicional a las enzimas del coctel en el estudio de comparación, donde se se obtuvo en las horas 4, 5 y 6 una cantidad de  $3 \times 10^6$  protoplastos por mL de solución.

Además en el estudio realizado por Wakita *et al.* (1992) se demostró que el aumento en el tiempo de incubación con una concentración enzimática reducida (0.5% cel-maz) a 25°C fue de máximo 12 horas con protoplastos viables, en tiempos posteriores la viabilidad decrece en 50%.

b) Concentración enzimática

Para la concentración enzimática se realizó una prueba de Tukey (Tabla 3.42 y figura 3.39), donde se observan 3 grupos, uno por cada concentración; el mejor tratamiento corresponde a 4% de celulasa-macerozima; además se observa que conforme aumenta la concentración enzimática, también aumenta el número de protoplastos.

Según Krautwig y Lorz (1995) en su revisión de protoplastos a partir de cereales, se conoce que en callos muy friables, de color amarillento, la cantidad de enzima utilizada es indispensable para obtener una mayor o menos cantidad de protoplastos viables; en cebada una concentración de cel-maz 2% es suficiente para obtener una cantidad de protoplastos de  $3.8 \times 10^4$  por cada mL de solución en un tiempo de cinco horas de incubación a 25°C; en el caso de la investigación actual, la cantidad de protoplastos obtenida con la concentración de 2% cel-maz es de  $2 \times 10^6$  por cada mL de solución; la diferencia consistió en la cantidad de callo 0,3g, la temperatura de incubación de 27°C, además de la adición de pectoliasa.

Duquenme *et al.* (2007) comprobó en su estudio en varias plantas monocotiledonares el aumento de concentración de celulasa incrementa la cantidad de protoplastos viables; y su cantidad depende del tipo de callo y su edad.

En el estudio realizado por Kiong *et al.* (2010) se demuestra que utilizar una concentración enzimática de 2% cel-macerasa en 0.2g callo friable es suficiente para la obtención de  $1.7 \times 10^4$  protoplastos por mL de solución; con un porcentaje de viabilidad del 87%.

c) Interacción concentración enzimática\*tiempo de incubación.

Se realizó una prueba de Tukey para la interacción entre concentración enzimática y tiempo de incubación donde se observan ocho grupos; dentro de los cuales las mejores interacciones corresponden a celulasa-macerozima 4%; en los tiempos de 4, 5 y 6 horas (Tabla 3.43 y figura 3.40).

Se observa también en todos los casos que a partir de las dos horas ya se obtienen protoplastos viables; en el único caso que se vio apareamiento de protoplastos en una hora de incubación fue con el tratamiento de cel-maz 4%, que corresponde a la concentración donde los callos dieron mayor cantidad de protoplastos libres; cabe mencionar que al final del tiempo de incubación aún existía aproximadamente 0.1g de callo sin disgregar.

#### 4.1.6.2.2 Disgregación celular

Gracias al ANOVA (Tabla 3.40) se observa alta significancia estadística en cuanto a la disgregación celular, donde se estableció cuatro niveles (1 inicial; 2, media; 3 completa) con respecto al tiempo de digestión enzimática además de la concentración del coctel enzimático y su interacción; lo que se detalla a continuación.

a) Tiempo de digestión enzimática

Se realizó la prueba de Tukey para el tiempo de digestión enzimática (Tabla 3.44 y figura 3.41), donde se puede observar tres grupos perfectamente establecidos; donde las horas de incubación cuatro, cinco y seis son las mejores, y se encuentran en el mismo grupo.

En la figura 3.41 se observa claramente que conforme se incrementa el tiempo de incubación, la disgregación también aumenta, logrando completarse a partir de la hora cuatro de incubación. En la investigación realizada por Jadán (2000) en *Citrus sinensis* se demuestra que la acción que realizan las enzimas en horas iniciales de la incubación empieza con la digestión de láminas medias alcanzando así una disgregación temprana para una posterior degradación de pared celular.

Jadán (2000) menciona también que existen especies en las que es necesario aumentar la concentración enzimática para lograr obtener disgregaciones celulares completas, aún tratándose de callos, ya que debido a la distribución celular en este, las enzimas podrían actuar únicamente en la parte superficial y continuar con la lamela media; por lo que la concentración enzimática en algunos casos son requeridas superiores a 1.5% cel-maz; y en este caso la recuperación de protoplastos aislados se encontraría en tiempos entre cuatro y seis horas de incubación; lo que coincide con el presente estudio.

#### b) Concentración enzimática

En cuanto a la concentración enzimática se encontró alta significancia (Tabla 3.40); para lo cual se realizó una prueba de Tukey (Tabla 3.45 y figura 3.42), donde se observó dos grupos bien definidos; la mayor disgregación corresponde a la concentración celulasa,-macerozima 4% y 0.3% pectoliasa; con una media de 2,83 en una escala de tres, lo que significa que con esta concentración se obtuvo una disgregación casi completa.

En el estudio realizado por Duquenme *et al.* (2007) en una monocotiledonea, demuestra que el aumento específicamente de macerozima logra el rompimiento de lamelas medias en callos, obteniendo así protoplastos aislados en tiempos reducidos; además, probó la adición de pectoliasa, en diferentes concentraciones; el mejor resultado en cuanto a disgregación celular lo obtuvo con concentraciones entre 0.2% y

0.4% con las que se observó una disminución en el tiempo del asilamiento celular y posterior aislamiento de protoplastos; esta es la posible razón por la que se logró la recuperación de protoplastos libres en todos los tratamientos establecidos, adicional a las concentraciones enzimáticas elevadas.

c) Concentración enzimática\*tiempo de incubación

La tabla 3.40 nos revela alta significancia estadística con respecto a la interacción concentración enzimática\*tiempo de incubación (ANOVA); para lo que se realizó una prueba de Tukey (Tabla 3.46 y figura 3.43) donde se muestra claramente la presencia de tres grupos estadísticos; dentro de los mejores corresponden a las interacciones: celulasa- macerozima 4% desde dos hasta seis horas de incubación; y celulasa-macerozima 3 y 2%, desde la hora cuatro hasta la seis; con una media de “3” lo que significa una disgregación completa.

Se observa que en todos los casos la disgregación completa a partir de la hora cuatro; lo que indica buenos tiempos de recuperación; pero con el tratamiento 4% cel-maz se observa una disgregación completa ya en la hora dos; es por esta razón que Wakita *et al.* (1992) menciona en su estudio que las concentraciones enzimáticas para el aislamiento de protoplastos de callos deben estar entre 0.25% y 4% en cuanto a celulasas, pectinasas y helicasas, en cocteles enzimáticos; en caso de usar mayores concentraciones es probable que no exista recuperación de protoplastos al someterlos a un daño excesivo y rompimiento prematuro de membranas.

En la figura 3.37 se puede observar claramente que las curvas de concentraciones 2 y 3% cel-maz, presentan mayor tiempo de estabilidad, es decir que los protoplastos asilados se mantienen viables durante más horas con respecto a la concentraciones de 4% cel-maz. Wakita *et al.* (1992) menciona además, que las mejores concentraciones enzimáticas para separar protoplastos de callos se encuentran entre 1y 3% para celulasa, helicasas, pectinasas; con la finalidad de brindarle mayor estabilidad a

los protoplastos aislados; es decir que su tiempo de sobrevivencia será mayor al utilizar reguladores osmóticos como manitol, sorbitol y sacarosa en concentraciones intermedias.

#### 4.1.6.2.3 Morfología celular

Gracias al ANOVA (Tabla 3.40) se observa alta significancia estadística en cuanto a la morfología celular, donde se estableció tres niveles (1 célula; 2, protoplasto; 3, protoplasto roto) con respecto al tiempo de digestión enzimática además de la concentración del coctel enzimático; lo que se describe a continuación.

##### a) Tiempo de incubación

Para esta variable se realizó una prueba de Tukey (Tabla 3.47 y figura 3.44), aunque se conozca que los resultados solo proporcionarán dos grupos estadísticos, es importante conocer que a partir de la hora dos, en todos los casos, ya existe mayor cantidad de protoplastos aislados que número de células; lo que concuerda con el estudio realizado por Kiong *et al.* (2010) donde se observó que los tiempo de incubación de dos horas fueron suficientes para obtener una buena cantidad de protoplastos ( $3.5 \times 10^4$ ) con respecto a la cantidad de células que aún no presentaban degradación de pared celular; pero en este caso la cantidad de protoplastos viables aumentó en un 40% al dejarlo más de tres horas en incubación; además, tiempos mayores a 6 horas generaban reducción de viabilidad; en el presente estudio se puede observar (Figura 3.37) que en la hora 7 y posteriores existe un descenso en la cantidad de protoplastos viables con concentraciones enzimáticas elevadas; en concentraciones inferiores el descenso de viabilidad se dio una horas más tarde.

b) Concentración enzimática

Se realizó una prueba de Tukey que se observa en la tabla 3.48 y en la figura 3.45; en la que se establecen dos grupos estadísticamente diferentes, el primero corresponde a la concentración 2% cel-maz; y el segundo grupo con las concentraciones 3 y 4% cel-maz, con una media de 1.83, se acerca a la totalidad de protoplastos.

En este tiempo en ningún caso se observaron protoplastos rotos, como mayoría en la placa; además existe diferencia significativa entre la concentración de 2% cel-maz con respecto al resto de concentraciones; esto concuerda con el estudio realizado por Kiong *et al.* (2010); donde existe mayor cantidad de protoplastos viables con respecto a células con pared al incrementar la concentración de 1.5 a 3%; en este punto existió un incremento de protoplastos del 37%.

c) Interacción concentración enzimática\*tiempo de incubación

Para los niveles planteados para la morfología celular existe alta significancia estadística con respecto a interacción concentración enzimática\*tiempo de incubación; se conoce que la prueba de Tukey únicamente arrojó dos grupos estadísticamente significativos; pero es necesario conocer las interacciones que han generado los mejores resultados (Tabla 3.49 y figura 3.46).

Se observa que en la primera hora de incubación en todas las concentraciones enzimáticas la mayor parte de la placa corresponde a células completas; a partir de la hora dos en las concentraciones 3 y 4% cel-maz ya se observa mayor cantidad de protoplastos con respecto a células completas; en el tratamiento 2% cel-maz se observa hasta la hora cuatro mayor cantidad de células con respecto a protoplastos; por lo que las concentraciones 3% celulasa-macerozima y 4% celulasa-macerozima son las mejores con respecto a la obtención de protoplastos viables en tiempos reducidos en mayor cantidad con respecto a células completas.

#### 4.1.6.3. Protoplastos a partir de hoja y a partir de callo

Los protoplastos obtenidos en este estudio reflejan diferencia notable de acuerdo al tejido del cual fueron obtenidos; en el caso de los protoplastos del mesófilo o muy cercanos al mismo, presentaron tamaños de 10 a 15  $\mu\text{m}$ , muy uniformes, totalmente esféricos; lo que coincide con los protoplastos obtenidos por Kanai y Edwards (1973) en maíz, estudio en el que en promedio los protoplastos obtenidos de hoja, cercanos al mesófilo presentaron tamaños promedio de 13,7  $\mu\text{m}$ . En el estudio realizado por Sethi y Maeda (1983), los protoplastos obtenidos de la superficie de la hoja medían entre 10 y 100  $\mu\text{m}$  mientras que aquellos encontrados en el mesófilo estaban entre 10 y 25  $\mu\text{m}$ .

Ortegui y Torato (2006) explican que según la superficie de la hoja, las células que forman la epidermis superior se encuentran muy compactadas ya que su función es la protección; al someterse al estrés osmótico además de la digestión enzimática, estos tienden a ensancharse, más aún que aquellas células que se encuentran en el mesófilo, específicamente en el parénquima esponjoso que posee mayor espacio intercelular, y son células más pequeñas en comparación con las más superficiales, además poseen menor cantidad de cloroplastos; esto explica que en la técnica sin raspado superficial se hayan obtenido protoplastos de 100  $\mu\text{m}$ ; además la función de protección que poseen las torna compactas, por lo que se torna compleja su separación.

Para los protoplastos obtenidos a partir de callo, los tamaños se encuentran muy cercanos a aquellos obtenidos por Adytia y Baker (2003) en arroz; se encuentran entre 15 y 30  $\mu\text{m}$ ; esto también puede variar entre especies además entre tamaños y peso del callo inicial, en el presente estudio los callos se encontraron entre 10 y 20  $\mu\text{m}$ .

La diferencia del color, se explica por la actividad fotosintética que poseen las células provenientes de hojas; mientras que aquellas células de callos de obscuridad, no presentan coloración verde, debido a la falta de cloroplastos.

Se observó que los protoplastos de callo se obtienen con mayor rapidez, esto se debe a que las células de callo, no se encuentran especializadas, es decir que no forman tejidos, lo que las tornaría con mayor cantidad de celulosa y pectinas; esto es lo que ocurre en el caso de las células de las hojas; como se encuentran especializadas y formando tejidos poseen mayor capacidad de protección por lo tanto poseen mayor cantidad de celulosa y pectinas (Grosser (2009). Conversación vía correo electrónico).

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

1. En el presente estudio se logró obtener protoplastos de trigo (*Triticum aestivum*), variedad Cojitambo, mediante el establecimiento de hojas y callos *in vitro* provenientes de semillas. En la etapa de desinfección es necesario utilizar fungicida y la mejor concentración de hipoclorito de sodio fue de 2% con un tiempo de inmersión de 10 minutos.
2. Son importantes los tratamientos pregerminativos, para semillas de trigo, variedad Cojitambo, se encontró que tiempos de inmersión de 1 a 24 horas no genera diferencia significativas en cuanto a viabilidad y contaminación, pero se observó que mientras más hinchada se siembra la semilla, esta germina con mayor rapidez; en seis horas de inmersión en hipoclorito de sodio al 0.2% las semillas se encuentran totalmente hinchadas.
3. El medio de cultivo adecuado para la pronta germinación de semillas de trigo, variedad Cojitambo, corresponde al medio MS propuesto por Murashige y Skooge (1962), complementado con 100mg.L<sup>-1</sup> de mioinositol, 10mg.L<sup>-1</sup> tiamina, 0.5mg.L<sup>-1</sup> de piridoxina, 2mg.L<sup>-1</sup> de glicina, 1mg.L<sup>-1</sup> ácido nicotínico, y ácido giberélico 2mg.L<sup>-1</sup>, medio con el que se ha logrado germinación en un promedio de 6.33 días; y con la adición de 0,003 ppm de brasinolina se alcanzó un promedio de 4.7 brotes de cada semilla de trigo, variedad Cojitambo, además de un ancho de hoja de 5.3 mm.
4. La adición de brasinolina en el medio de cultivo para establecimiento de brotes y hojas de trigo, provoca un desenrollamiento notable de la hoja, lo que facilita el posterior aislamiento de protoplastos. Además una concentración de 0.001 a 0.003 ppm de brasinolina son insuficientes para la influencia en el tiempo de germinación.

5. El medio L2 generó un aparecimiento de callo más rápido en comparación con el medio MS, en un promedio de 36.64 días. La concentración  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D, genera callos en menor tiempo a diferencia de concentraciones de 2.5 y  $3 \text{ mg.L}^{-1}$ .
6. La presencia de brasinolina disminuye el tiempo de aparecimiento de callos; este factor combinado con la concentración de 2,4-D y medio L2 genera callos en un tiempo promedio de 28 días; los cuales son muy friables y pequeños.
7. Para la generación de callos a partir de plantas completas en medio L2 con  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de 2,4 D; es indispensable que la misma posea la semilla en su estructura; y que su embrión no se encuentre sumergido en el medio de cultivo.
8. Es posible generar callos a partir de semillas de trigo con medio L2 adicionado con ANA y BAP en relación 3:1.
9. Para el aislamiento de protoplastos a partir de hoja las concentraciones de celulasa-macerozima (2, 3 y 4%), adicional a la concentración de pectoliasa 0.3%, generan protoplastos a partir de la hora 2 de incubación a  $27 \pm 0.5^\circ\text{C}$ .
10. El coctel enzimático con concentración débil (2% maz-cel) obtuvo la mayor cantidad de protoplastos ( $30 \times 10^6$ ) por mL de solución, a partir de hoja de trigo, entre las horas 7 y 10 de incubación; la concentración intermedia (3% maz-cel) obtuvo la cantidad más alta de protoplastos ( $30 \times 10^6$ ) por mL de solución entre las horas 9 y 11; y la concentración más fuerte (4% cel-maz) generó  $40 \times 10^6$  protoplastos por mL de solución entre las nueve y doce horas de incubación.
11. Los mejores tiempos de incubación se encuentran entre las horas 9 y 10 con una cantidad aproximada de  $34 \times 10^6$  protoplastos de hoja por cada mL de solución.
12. Se concluye que conforme aumenta la concentración de cel-mac entre 2 y 4% aumenta la cantidad de protoplastos viables obtenidos a partir de hoja de trigo.

13. Las horas 9 y 10 de incubación generan la mayor cantidad de protoplastos y coinciden con los tiempos de mayor disgregación celular; además de la concentración enzimática que se alcanza los dos objetivos corresponde a 4% cel-maz.
14. Entre las horas 8 y 10 de incubación se observa protoplastos aislados, de acuerdo a la escala; y la concentración enzimática que más se acerca a esta morfología corresponde a cel-maz 4%.
15. A partir de las seis horas de incubación, con todas las concentraciones enzimáticas empleadas se observa en el 51% de la placa la morfología catalogada como protoplasto; entre las horas 2 y 10 de incubación no se ha alcanzado la morfología “protoplasto roto” como mayoría en la placa.
16. En el caso del aislamiento de protoplastos a partir de callo, los mejores tiempo de incubación a temperaturas de  $27\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , se encuentran entre las cuatro y seis horas; siendo la mejor concentración enzimática 4% de células-macerozima, con 0.3% de pectoliasa obteniendo  $5 \times 10^6$  protoplastos por mL de solución a partir de 0.3g de callo friable.
17. A partir de las dos horas de incubación con concentraciones enzimáticas de 3 y 4% de cel-maz con 0.3% de pectoliasa; se alcanzó en el 51% de la placa la morfología “protoplasto”; a partir de las cuatro horas de incubación las concentraciones 2, 3 y 4% de cel-maz con 0.3% de pectoliasa alcanzaron la categoría “protoplasto”; estos tiempos coinciden con los que se alcanzó la mayor disgregación celular.
18. Los protoplastos obtenidos a partir de hoja, se observan de color verde al microscopio, debido a los cloroplastos que posee, mientras que los protoplastos obtenidos a partir de callos son transparentes.

19. Al aislar protoplastos a partir de la cutícula estos llegan a tamaños de 100 $\mu\text{m}$ ; mientras que aquellos protoplastos obtenidos a partir del mesófilo o muy cercanos al mismo tienen tamaños entre 10 y 15 $\mu\text{m}$ ; los protoplastos obtenidos a partir de callos pequeños (diámetro 1cm.) poseen tamaños de 10 y 20 $\mu\text{m}$ .
20. Con esta tesis se estableció un método reproducible de aislamiento de protoplastos a partir de trigo (*Triticum aestivum*), variedad Cojitambo, además del establecimiento de hojas y callos útiles para este fin.
21. Se comprobó la veracidad de la hipótesis planteada en la que se afirma que es posible obtener y aislar protoplastos de trigo (*Triticum aestivum*), variedad Cojitambo, a partir de hojas y callos establecidas *in vitro* provenientes de semilla.

## CAPÍTULO 6

### RECOMENDACIONES

1. Es importante establecer un método de purificación para los protoplastos asilados; con lo que se podrá utilizar estas células sin pared en diversos estudios, de acuerdo a las necesidades que se presenten en el Ecuador.
2. Sería importante probar un medio de regeneración de pared celular, microcallos, callos y brotes. Además es de vital importancia lograr aclimatar las plantas obtenidas; y sacarlas al campo para cerrar el ciclo y conocer así la posibilidad de continuar con investigaciones que requieran la formación de plantas completas a partir de los protoplastos obtenidos.
3. El trigo presenta varios problemas que pueden ser solucionados al estudiar o modificar protoplastos, dentro de estos problemas se encuentra su baja producción de gluten, que constituye la proteína que le brinda la elasticidad al harina, lo que permite hacer pastas o pan de alta calidad, el trigo es susceptible a mas de 50 enfermedades; tiene adaptación solo a ciertos suelos o alturas; entre otras; estudios sobre fusión de protoplastos puede mejorar varios de estos problemas al dar lugar a una nueva variedad; o es posible su modificación genética con la finalidad de generar variaciones específicas para la solución de estos problemas.

## CAPÍTULO 7

### BIBLIOGRAFÍA

Agustí, M. (2003). Citricultura. España: Librimundi.

Alemán, S. (2000). Organización y técnicas del cultivo de células y tejidos. Extraído el 5 de noviembre de 2010, del sitio web Universidad de Matanzas Cuba:

<http://agroweb.umcc.cu/PaginasProfesores/Silvia%20PAG%20WEB%20BIOTEKNOLOGÍA/silvia2/Páginas%20de%20la%20portada/Pagina%20tema%20III.htm>

Aditya, T. & Baker, D. (2003). Optimization of protoplasts isolation from NaCl stressed primary, secondary and tertiary calli derived from mature seeds of Bangladeshi indica rice cultivar Binnatoa.

Anuradha, S., Ram, S. (2003). Application of brassinosteroids to rice seeds (*Oryza sativa L*) reduced the impact of salt stress on growth, prevented photosynthetic pigment loss and increased nitrate reductase activity. *Plant Growth Regulation* 40: 29-32.

Aoki, S., Takebe, I. (1969). Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus ribonucleic acid. *Virology*: 39: 439-448.

Araya, E., Gómez, L., Higo, N., Valverde, R. (2000). Efecto de la luz y el ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de (*Alnus acuminata*). Revista agronomía costarricense: 0377-9424

Arteca, R. (1996). Plant growth substances. Principles and Applications. USA: Chapman and Hall: 331p.

- Azcón, T. (2003). Relación entre la tasa de imbibición y el porcentaje de germinación en semillas de maíz (*Zea mays L*), carota (*Phaseolus vulgaris L*) y quinchoncho (*Cajanus cajan L*). Extraído el 9 de diciembre de 2010 de <http://www.bioline.org.br/pdf?cg08008>.
- Baskin, C. & Baskin, J. (2004). Classification system for seed dormancy. *Seeds science research*. Vol 14: 1-6.
- Benítez, A. (2005). Avances Recientes en Biotecnología Vegetal e Ingeniería Genética de Plantas España: Reverté S.A.
- Bensch, E., Schalchli, S., Fuentes, R., Seemann, P y Jobet, C. (2007). Potencial alelopático diferencial de cultivares de trigo (*Triticum aestivum L*) chileno sobre Ballica anual (*Lolium rigidum*) Var. Wimmera. *IDESIA, Chile* 25 (2): 81-89.
- Binding, H., Nehls, R., Kock, R., Finger, J. & Mordhorst, G. (1981). Comparative studies on protoplasts regeneration in herbaceous species of the *Dicotyledoneae* class. *Z. Pflanzenphysiol.* (101): 119-130
- Calva, G & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. México: Coordinación de publicidad digitales UNAM
- Carrera, M., Galán, V., Moroto, J., Navarro, J., Hidalgo, L., Puerta, C., Rojo, C. & Zarago, S. (2005). *Prontuario de Agricultura, Cultivo Agrícolas.* España: Mundi.Prensa.
- Chantre, G., Sabbatinni, M., Orioli, G. & Gigón, R. (2008). Requerimientos térmicos y efecto del ácido giberélico en la ruptura de la dormición de semillas de *Lithosporum arvense L*. {Versión electrónica}, Congreso

latinoamericano de malezas. Extraído el 28 de mayo, 2010, de:  
[http://www.inta.gov.ar/bordenave/contactos/autores/ramon/maleza\\_lithospermum.pdf](http://www.inta.gov.ar/bordenave/contactos/autores/ramon/maleza_lithospermum.pdf)

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>

Chory, J., Chatterjee, M., Cook, R., Elich, T. (1996). From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. Proc. Natl. Acad. Sci: (93), 12066-12071.

Clouse, S. (2007). Brassinosteroid signaling. Plant cell monogr. 10, 179-190.

Clouse, S. & Sasse, J. (1998). Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 427-451.

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

Coronel, J., Rivadeneria, M., Urbano, J., Díaz, & Abad, S. (1993). INIAP – COJITAMBO 92 Variedad de Trigo para el Austro Ecuador: Plegable 130- INIAP

Craviotto, R., Arango, M. (2005). Análisis de semillas. Extraído el 2 de diciembre de 2010 de:  
[http://www.analisisdesemillas.com.ar/descargas/revista\\_analisis\\_1\\_1.pdf](http://www.analisisdesemillas.com.ar/descargas/revista_analisis_1_1.pdf)  
Argentina: BIAGRO.

- Cubero, J. (2002). Introducción a la mejora genética vegetal. España: Mundiprensa.
- De la Cuadra, C. (1992). Germinación, latencia y dormición de semillas. (Rep. No. 3-92). España: Ministerio de Agricultura
- Deep, N., Vyvadilova, M., Klima, M. & Bechyne, M. (2006). A simple procedure for mesophyll protoplasts culture and plant regeneration in *Brassica oleraceae* L. and *Brassica napus* L. Genet. Plant breed 42 (3): 103-110.
- Diario LOS ANDES (2009). Gobierno y empresarios apuntan a elevar la producción de trigo. Extraído el 19 de abril de 2010, de: <http://www.diariolosandes.com.ec/content/view/15411/38/>
- Dirección General Tecnológica Agropecuaria. (1987). Trigo, Cebada, Avena Ecuador
- Duquenne, B., Eeckaut, T., Werbrouk, S. & Huylenbroek, J. (2007). Efect of enzyme concentration on protoplasts isolation and protoplasts culture of *Statiphyllum*. Plant cell, Tissue organ cult. 91 (2): 165-173.
- Edwards, G., Robinson, S., Tyler, N. & Walker, D. (1978). Photosynthesis by Isolated Protoplasts, Protoplasts Extracts, and Chloroplasts of wheat. Plant physiology, 62, 313-319
- Ely, F., Torres, F. & Gaviria, J. (2005). Morfología y anatomía foliar de *Monochaetum meridense*. Acta botánica de Venezuela: 0084-5906

- Erazo, A. (2004). Deterioro de actividad física y viabilidad de semillas de maíz (*Zea mays*), frijol (*phaseolus vulgaris*), y sorgo (*Sorghum bicolor*) durante su almacenamiento en Zamorano. Honduras: Zamorano.
- Evans, D., Coleman, J. & Kearns, A. (2003). Plant cell culture. USA: BIOS scientific publisher.
- Falconí, E. (2008). Nuevas variedades de trigo y cebada para recuperación que entregó el INIAP. Extraída el 2 de noviembre de 2010 de PROCITROPICOS:  
<http://www.procitropicos.org.br/portal/conteudo/item.php?itemid=1327>
- Fathey, S. & Dismie, C. (1988). High yield isolation of mesophyll protoplasts from wheat, barley and rye. *Physiologia Plantarum* (72): 337-342
- García, F. (2004). Fitorreguladores. Extraído el 5 de noviembre de 2010. De Universidad de Valencia. <http://www.cca.ufsc.br/ldgv/style.css>
- García, J. & Kamiya, Y. (1999). Regulation of gibberellin biosyntheses by light. *Current opinion in plant biology* (2): 398-403.
- Gerald, E., Simons, O., Nicholas, T. & Walker, D. (1978). Photosynthesis by isolated protoplasts, protoplast extract and chlooplasts of wheat. *Plant Physiol.* 62: 313-319.
- Geroge, G., Hall, M. & Klerk, G. (2008). Plant propagation in tissue culture. Holanda: Springer Netherlands.
- Ghosh, G. & Zapata, F. (1990). Callus Formation and Plant Regeneration from Protoplasts Derived from Suspension Culture of Rice (*Oryza sativa* L. cv. 'Taipei 177'). *Plant breeding*, {Electronic version}, 95, 95-100, extraído el

20 de mayo, 2010, de:  
<http://www3.interscience.wiley.com/journal/119377250/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>

Gómez, R., Gillard, T., Barranco, L. & Reyes, M. (2000). Embriogénesis somática en medios líquidos. Maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido. *INFOMUSA*: (9):12-16.

Grosser, J., Gmitter, F. (1990). Protoplasts fusión and *citrus* improvement. *Plant Breeding Rev* (8): 339-374.

Guerra, M. & Nodari, R. (2004). Biotecnología-universidad federal de Santa Catarina. Extraído el 10 de abril de 2010 de:  
<http://www.cca.usfc.br/lfdgv/style.css>

Gutiérrez, G., Virgen, J. & Arellano, J. (2007). Germinación y crecientito inicial de semillas de maíz con envejecimiento natural. *Agronomía Mesoamericana* 18 (2): 163-170.

Hernández, R. (1990). Un estudio sobre la germinación de la semilla de *Alnus acuminata* H.B.K. *Revista forestal venezolana* (3): 132-135.

Honda, I., Zenyta, H., Yoneyama, K., Chono, M., Kaenko, M. & Watanabe, Y. (2003). *Uzu* mutation in barley (*Hordeum vulgare*) Reduces the Leaf Unrolling Response to Brassinolide{Electronic version}, 67, 1194-1197, extraído el 20 de mayo, 2010, de:  
<http://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/67/5/1194/pdf>

Ikekawa, N. & Zhao, Y. (1991). Application of 24-epibrasinolide in agriculture. *American chemistry society*. Vol 3: 23-28.

- INIAP. (2005). Informe técnico variedades de trigo cultivadas hasta 2005. Extraído el 15 de abril de 2010, de: <http://www.iniap-ecuador.gov.ec/>
- Instituto nacional de tecnología agropecuaria. (1998). Guía práctica para el cultivo de trigo. Secretaría de agricultura, pesca y alimentación. Argentina.
- Jadán, M. (2000). Obtención de protoplastos a partir de callos y suspensiones celulares de *Citrus sinensis* cv. Acosta 6 y cv. Washington, y su fusión con protoplastos de hojas de patrones comerciales Costa Rica: Universidad Rodrigo Facio
- Jiménez, V. (1996). El cultivo de protoplastos en cítricos y su potencial para el mejoramiento genético. *Agronomía costarricense* 20 (2): 187-204.
- Kanai, R. & Edwards, G. (1973). Separation of mesophyll protoplasts and bundle sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies. *Plant Physiol.* (51): 1133-1137.
- Kiong, A., Ting, G., Siang, C & Hussein, S. (2010). Optimization of protoplasts isolation protocols from callus of *Eurycoma longifolia*. *Journal of medicine plants research*. Vol. 4 (17): 1778-1785.
- Krautwig, B. & Lorz, H. (1995). Cereal protoplasts. *Plant Science* 111: 1-10.
- Kristensen, A. & Kaufmann, R. (1976). Contaminación por hongos en granos almacenados. México, Pax-México. 199p.
- Leegood, R. & Walker, K. (1979). Isolation of protoplasts and chloroplasts from flag leaves of *Triticum aestivum*. *Plant Physiol* (63): 1212-1214

- Lentini, Z., Martínez, C. & Roca, R. (1997). Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplanta. Colombia: CIAT: 293, pp57.
- Luz, L. (2002). Recubrimiento de semillas. Medidores de humedad: importancia económica del contenido de humedad en semillas. México: Zamorano.
- Mandava, N. (1988). Plant growth-promoting brassinoesteroids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 23-52.
- Masteller, V & Holden, V. (1969). The growth of and organ formation from callus tissue of sorghum. *Plant Physiol.* 45: 362-364.
- Miller, E. (1992). Fisiología Vegetal. Vitaminas. Departamento de agricultura de los Estados Unidos.
- Nemhauser, J. & Chory, J. (2004). Bring on: new into the mechanism of brassinoesteriod action. *Juernal of experimental botany* 55 (395): 265-270.
- Nobre, J., Davey, M. & Lazzeri, P. (1996). Barley scutellum protoplasts: isolation, culture and plnat regeneration. *Physiologia plantarum* 98: 868-874.
- Otsuki, Y. & Takebe, I. (1969). Fluorescent antibody staining of tobacco mosaic antigen in tobacco mesophyll protoplasts. *Virology*: 38: 497-499
- Parkinson, R., Hardbard, R. & Hughes, B. (2004). Descripción botánica de trigo en todas sus fases. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Peñaranda, J. (1996). Biología Molecular. Tópicos seleccionados. Editorial Universidad Nacional: Colombia

- Pérez, J. (1998). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. IBP: Cuba.
- Pierik, R. (1990). Cultivo *in vitro* de plantas superiores. España: Mundiprensa.
- Polci, P., Conti, V., Humble, A., Miranda, R. y Echenique, V. (2005). Obtención de plantas haploides de cultivares argentinos de trigo pan (*Triticum aestivum* L) por cultivos de anteras y cruzamientos con maíz. INTA, Argentina: 34 (3): 151-176.
- Puglia, M. (2003). Gramíneas ornamentales. Edición especial N°7. pp. 1-130.
- Puite, K. (1992). Progress in plant protoplast research. *Physiologia plantarum* (85): 403-410.
- Pullman, G., Gupta, P., Timmis, R., Carpenter, C., Kreintinger, M. & Welty, E. (2005). Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscísico acid combined with activated carbon. *Plant cell reports* (21): 271-279
- Rivera, A. (2010). Aislamiento, purificación y fusión de protoplastos, obtenidos a partir de hojas *in vitro* y callos friables de babaco (*Vasconcellea heibornii*) y jigacho (*Vasconcellea stipulata*). Escuela Politécnica del Ejército.
- Rivera, R. y Perea, M. (2004). Aislamiento y cultivo de protoplastos en maracuyá. *Acta biológica colombiana*. Vol 9, No.2.
- Roca, W. & Mroginski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones Colombia: CIAT

- Rojas, G. y Róvalo, M. (1985). Fisiología vegetal aplicada. Tercera edición. Ediciones MacGraw-Hill. México. 262pp.
- Rossi, L. (2005). Hormonas vegetales: desarrollo y crecimiento: brasinoesteroides. Universidad peruana Cayetano Heredia. Extraído el 1 de marzo de 2009 de: <http://www.upch.edu.pe/facien/fc/dcbf/fisiovegeta/Hormonas%20vegetales%201y2+Otros.ppt>
- Sasse, J. (1997). Recent progress in brassinoesteroid research. *Physiol. Plant*: (100): 696-701.
- Sasse, J. (2003). Physiological actions of brassinoesteroids: An update: *Journal plant growth regulation*, 22, 276-288.
- Saehney, R. (1986). Polyamine metabolism and osmotic stress. *Plant Physiol.* 82: 372-378
- Sethi, M. y Maeda, E. (1983). Studies on Wheat Protoplasts – A Rapid and Large-scale Isolation Method and Cell Wall Regeneration in cultures. *Japan jouenal. Crop Sci.* 52(2): 158-167.
- Shimada, T. (1978). Plant Regeneration from the Callus Induced from Wheat embryo {electronic version}, 5, 371-374, extraído el 12 de mayo, 2010, de: <http://rms1.agsearch.agropedia.affrc.go.jp/contents/JASI/pdf/society/18-1537.pdf>
- Silmar, B. (2004). Prueba de tetrazolio en Maíz. Extraído el 2 de diciembre de 2010 de Universidad Nacional del Sur. Argentina: <http://www.mejoravegetal.criba.edu.ar/>

- Smith, R. (1992). Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments. USA: Academic Press.
- Szabados, L & Roca, W (1986). Regeneration of isolated mesophyll and cell suspension protoplasts to plants in *Stylosanthes guianensis* a tropical forege legumen. Plant cell reports (3): 174-177
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal. Vol. 2. Edición Universitata Jaume. España.
- Torres, K. (1990). Tissue culture techniques for horticultural crops. USA: AVI books.
- Vargas, M., Irizar, M. (2005). Efecto del brasinoesteroide y densidad de población en la acumulación de biomasa y rendimiento de acoyote (*Phaseolus coccineus L.*). Revista Chapingo (11): 269-272
- Vasil, I. & Thorpe, T. (1998). Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer academic publisher: Países Bajos
- Vasil, I & Vasil, V. (1986). Regeneration in cereal and other grass species in cell cultura and somatic cell genetics of plants. Vol 3: 121-122
- Velázquez, M. & Fuentes, G. (2002). Germinación de semilla de cuatro variedades de trigo (*Triticum spp. L.*) *in vitro*. México
- Wada, K., Kondo, H. & Marumo, S. (1985). A simple Bioassay for Brassinoesteroids: A Wheat Leaf-unrolling Test, Vol 7, 2249-2251, Agricultural Biologycal Chem: Japón.

- Wakita, Y., Yokota, S. & Yoshizawa, N. (1992). Isolation and cultura of protoplasts from Kunugi callus culture. *Plant tissue culture letters* 9 (2): 74-80.
- Wareing, P. & Saunders, P. (1971). Hormones and dormancy. *Annual Review of plant Physiology*. Vol. 22: 261-288.
- Watkinson, J. & Pill, W. (1998). Gibberelic acid and presowing chilling increase seed germination of indiangrass (*Sorghastrum nutans L.*). *Hort science* (33): 849-851
- Willian, O. (1999). Comportamiento de la viabilidad en semillas de cereals durante el almacenamiento. *Manejo de silos y almacenes de semillas*. España: Editorial sevillana.
- Xia, G., Xiang, F., Zhou, A. & Chen, H. (2003). Asymetric somatic hybridization between wheat (*Triticum aestivum*) and *Agropyron elongatum*. *Theor Appl Genet*. 170: 299-305.
- Xiang, F., Xia, G., Chen, H. (2003). Asymetric somatic hybridization between wheat (*Triticum aestivum*) and *Avena sativa L.* *Science in China Serie C* (46): 243-252, extraido el 20 de mayo, 2010, de: <http://www.springerlink.com/content/hxyqjtg67p9xa8ca/>

## ANEXOS

### ANEXO A: Medio Murashige y Skooge (MS) 1962.

#### STOCKS PARA MEDIO MS (1962)

COMPUESTO	FÓRMULA	CANTIDAD PARA STOCK (g.L <sup>-1</sup> )
STOCK MACRONUTRIENTES 10X		
Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16.5
Nitrato de potasio	KNO <sub>3</sub>	19
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4.4
STOCK MICRONUTRIENTES 10X		
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3.7
Fosfato de potasio dihidrogenado	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.062
Sulfato de manganeso tetrahidratado	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0.196
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.086
Yoduro de potasio	KI	0.009
Molibdato de sodio dihidratado	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.003
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.003
Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.003
STOCK QUELATO		
Sulfato de hierro heptahidratado	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.56
Na <sub>2</sub> -EDTA (2H <sub>2</sub> O)		0.736

## ANEXO B: Medio L2 (Lina, 2005)

## STOCKS PARA MEDIO L2 (2005)

COMPUESTO	FÓRMULA	CONCENTRACIÓN (mg.L <sup>-1</sup> )
Macrosales		
Nitrato de amonio	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1500
Nitrato de potasio	KNO <sub>3</sub>	1750
Fosfato de potasio dihidrogenado	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	350
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	450
Microsales		
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5
Sulfato de manganeso tetrahidratado	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	15
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7.5
Yoduro de potasio	KI	0.75
Molibdato de sodio dihidratado	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.025
Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
Cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
EDTAS-Na-Fe		
Sulfato de hierro heptahidratado	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	28
Na <sub>2</sub> -EDTA (2H <sub>2</sub> O)		37
Vitaminas		
Inositol	100	
Tiamina	10	
Piridoxina	1	
Ácido nicotínico	1	
Aminoácidos		
Glicina		750
Glutamina		300
Azúcar		30000
2,4-D		2
Agar		5200

## ANEXO C: Preparación de solución BH3 0.7M

## Solución BH3 0.7M

Componente	Cantidad (mg.L <sup>-1</sup> )
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	370
KCl	1500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	170
Microelementos de MS	10 ml
Vitaminas del MS	10ml
Pantotenato de calcio	1
Ácido ascórbico	2
Cloruro de colina	1
Ácido p-aminobenzoico	0.02
Ácido fólico	0.4
Rivoflavina	0.2
Biotina	0.01
Retinol	0.01
Colecalciferol	0.01
Cianocobalamina	0.02
Fructosa	250
Ribosa	250
Xilosa	250
Manosa	250
Celobiosa	250
Galactosa	250
Manitol	250
Piruvato de sodio	20
Ácido cítrico	40
Ácido málico	40
Ácido fumárico	40
Agua de coco	20ml/L
Sacarosa	85560
Glutamina	3100

El pH fue ajustado a 5.7 y esterilizado con filtro tamaño de poro 0.2 um.

# **HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

---

Andrea Elizabeth Arcos Andrade

**DIRECTOR DE LA CARRERA DE INGENIERIA EN  
BIOTECNOLOGÍA**

---

Ing. Rafael Vargas

**DELEGADO UNIDAD DE ADMISION Y REGISTRO**

---

Dr. Mario Lozada

Lugar y fecha : Sangolquí, 23 de junio de 2011