Establecimiento, inducción y evaluación a callogénesis *in vitro* de meristemos apicales de árboles jóvenes de Romerillo *(Podocarpus oleifolius*) como futura estrategia de conservación de la especie en el Distrito Metropolitano de Quito

Jácome J., Páez Tatiana[1]., Romero Pedro[1]., Reyes Cristian[2]
[1]Departamento de Ciencias de La Vida, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ESPE
[2]Laboratorio de Micropropagación Vegetal, EPMMOP-Q, Centro de Investigación Ambiental de Cununyacu (CIAC)

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación es establecer una metodología en el proceso de callogénesis a partir de meristemos apicales de romerillo, para brindar un aporte en el proceso de embriogénesis somática del mismo con el cual se puede aspirar a la obtención de plantas de alto rendimiento. El proyecto cuenta con cuatro etapas (desinfección de explantes, inducción, identificación y proliferación de callo embriogénico), en donde se evalúan diferentes agentes desinfectantes, medios de cultivo, reguladores de crecimiento y condiciones de incubación. Los resultados indican que los meristemos apicales de romerillo sometidos a un tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio a una concentración de 1% durante 10 minutos sobreviven en un 83% y de éstos un 76% logra establecerse y continuar desarrollándose. En cuanto a la inducción de callo embriogénico, una concentración de 3 mg/L de 2,4-D combinado con 0.5 mg/L de BAP forma el 75% de callo embriogénico. La identificación morfológica e histológica de los callos embriogénicos inducidos muestran las estructuras características de un tejido con capacidad embriogénica según la literatura consultada. Finalmente en la proliferación no se obtienen los resultados deseados debido a necrosamiento de las porciones callo sembradas.

ABSTRACT

The objective of this research is establishing a methodology for the callogenesis process using apical meristem of romerillo, so that highly productive plants could be obtained, improving on its somatic embryogenesis process. The investigation has four stages (disinfection of explants, induction, identification and proliferation of embryogenic callus) in which the effectiveness of different disinfecting agents, cultivating media and growth regulators, as well as of different incubation conditions were evaluated. The results indicated that the apicals meristems of romerillo, when subjected to disinfection through 1% sodium hypochlorite for 10 minutes, 83% survived the process and of those 76% managed to germinate and grow. In the process of induction, 3 mg/L concentration of 2,4-D combined with 0.5 mg/L of BAP, formed 75%. The morphologic and histologic identification of the embryogenic callus induced show the typical structures of a tissue with embryogenic capacity, as indicated by the consulted bibliography. In the proliferation stage, the desired results not obtained because of a cell death of the callus portions planted.

INTRODUCCIÓN

El romerillo (*Podocarpus oleifolius)* siendo la única conífera andina que se encuentra en el Distrito Metropolitano de Quito, es mucho más difícil de integrar en la repoblación. La limitante que se tiene con la propagación de especies forestales de forma natural o incluso mediante siembra de semillas o estacas, es el tiempo que demoran éstas en desarrollarse y crecer, esto implica tiempo invertido sin ganancia hasta poder cosechar, por lo cual se necesita buscar medios de propagación a mayor escala que acorten el tiempo de producción para poder propagar especies de interés comercial, así como para disminuir la extinción de especies importantes. En este sentido la embriogénesis somática indirecta puede ser una alternativa factible para resolver dicho problema (Freire, 2003).

La embriogénesis somática como sistema de propagación de plantas presenta una serie de ventajas frente a otros sistemas, como la enorme capacidad de multiplicación aplicable a la industria con el uso de bioreactores, con lo que se obtiene en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente por un largo periodo de tiempo (Martínez *et al*., 2004) y cuyo fenómeno no es observado cuando las plántulas se forman por la vía organogénica, donde el crecimiento de brotes y raíces se excluye entre sí (Darias, 1993). Además, presenta un gran potencial para generar semillas artificiales y eventualmente utilizarlas en sistemas automatizados y sistemas de suspensiones que pueden proveer protoplastos embriogénicos y ser usados para ingeniería genética (ICTA, 2003).

Uno de los métodos más eficientes para poder reproducir masivamente material vegetal *in vitro* es a través de la inducción a callogénesis, a partir de la cual se puede obtener una organogénesis indirecta o una embriogénesis somática indirecta. Mediante callogénesis se genera tejido de callo a partir de un explante, de preferencia juvenil, debido a que éste es morfo genéticamente más viable (Acuña, 2004) y eventualmente como lo cita Freire, 2003, con la ayuda de reguladores de crecimiento se estimula la formación de órganos (organogénesis indirecta) o de embriones somáticos (embriogénesis somática indirecta).

En las fuentes bibliográficas consultadas no existe información acerca de la ocurrencia de este proceso en la especie *Podocarpus oleifolius,* por lo que el objetivo de este trabajo es conseguir un procedimiento que permita la obtención de callo embriogénico a partir de meristemos apicales, como una herramienta futura en el proceso de embriogénesis somática indirecta en el romerillo, con lo cual se pueda construir uno de los pasos preliminares para poder emplear ésta técnica como una alternativa accesible para iniciar la propagación y conservación de la especie *Podocarpus oleifolius*, debido a su importancia económica, ecológica e incluso ornamental en parques y jardines por el aspecto siempre verde que presenta (Loján, 1992).

El presente proyecto de investigación, brindará un aporte técnico – científico referente a la embriogénesis somática del romerillo, ya que el estudio de los callos obtenidos podrán servir en futuras investigaciones de suspensiones celulares, identificación de marcadores histológicos relacionados con el proceso embriogénico de *Podocarpus oleifolius*, desde la fase inicial de callogénesis hasta la obtención de embriones somáticos, lo que llevaría a la posterior búsqueda de genes de interés del proceso embrionario (Cevallos *et al*., 2002).

METODOLOGÍA

Zona de estudio.- **Fase de campo:** Vivero Municipal de la Armenia - Conocoto, con Latitud: 0°17´, Longitud: 78°27´, Altura: 2550 m.s.n.m. y Temperatura: 15.7°C. **Fase de laboratorio:** Laboratorio de Micropropagación y Cultivo de Tejidos Vegetales de la Empresa Pública Municipal de Movilidad y Obras Públicas de Quito (EPMMOP) se encuentra ubicado en la provincia de Pichincha, parroquia de Cumbayá, con Latitud 0°20´15"S y Longitud 78°30´24"W, a una altura de 2200 m.s.n.m., precipitación media anual de alrededor de 1500 mm, con temperaturas medias anuales de 17.7 °C.

Procedimientos:

Desinfección de los explantes: Con el fin de disminuir la contaminación de los explantes (yemas), se procedió a lavarlos vigorosamente con una solución de agua mas tres gramos de detergente comercial por cada 20 yemas, en un volumen de 200 mL durante 40 minutos, agitándose constantemente en un shaker (Innova 2100), a continuación se realizaron lavados con agua corriente y un lavado con agua destilada para eliminar los restos de detergente. Después de la aplicación general de detergente las yemas se sometieron a diferentes tratamientos de desinfección (tabla 1).

Tabla 1: Tratamientos de desinfección aplicados a las yemas apicales de romerillo.

Tratamientos	Alcohol	Tiempo	Hipoclorito de sodio (NaClO) (v/v)	Tiempo
1	-	-	1.5%	15 minutos
2	70%	1 minuto	1.5%	15 minutos
3	-	-	1%	10 minutos

Inducción a callo embriogénico: Una vez establecido el mejor método de desinfección y el establecimiento de los meristemos, se procedió a probar diferentes medios de cultivo con diferentes dosis de reguladores de crecimiento para la inducción del callo embriogénico, según los métodos descritos por (ICTA, 2000), (ICTA, 2003) y (Ojeda, 1996) con ciertas modificaciones (tabla 2).

Tabla 2: Tratamientos de inducción a callo embriogénico.

Tratamiento	Medio de cultivo	Reguladores evaluados para cada medio (mg/L)			Sacarosa (g/L)	Mioinositol (mg/L)
		2,4-D	BAP	KIN		
Control 1	MS	0	0	0	30	10
1	MS	3	0.5	0	30	10
2	MS	3	0	0.5	30	10
3	MS	3	0	0	30	10
Control 2	MS	0	0	0	45	10
4	MS	3	0.5	0	45	10
5	MS	3	0	0.5	45	10
6	MS	3	0	0	45	10

Análisis morfológico e histológico de callos embriogénicos: Una vez obtenidos los callos se realizó la identificación de los mismos en un estereoscopio (Olympus) permitiendo evaluar de mejor manera las características morfológicas y posteriormente se los identificó histológicamente con ayuda de un microscopio óptico.

Proliferación de callo embriogénico: Los callos obtenidos en la fase de inducción identificados como embriogénicos, se establecieron en un medio de proliferación para aumentar el volumen inicial de callo e inducir la diferenciación celular según lo descrito por ICTA, 2003 (tabla 3).

Tabla 3: Tratamientos de proliferación de callo embriogénico.

Tratamiento	Medio	Reguladores de crecimiento (mg/L)		Incubación	
		2,4-D	BAP	Luz directa (L)	Oscuridad (O)
1	MS	2	1	L	-
2	MS	2	1	-	O

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desinfección de los explantes: El tiempo de inmersión de los explantes tanto en el primer tratamiento (NaClO 1.5% por 15 minutos) y el segundo tratamiento (alcohol 70% por 1 minuto + NaClO por 15 minutos) evitan de manera eficaz la aparición de contaminación fúngica y bacteriana, pero causan la muerte del tejido. Dolberg, 2006, señala que la alta mortalidad de los explantes cuando se utiliza concentraciones altas de hipoclorito de sodio se debe principalmente a sus propiedades corrosivas, las cuales al entrar en contacto con las heridas abiertas de los explantes derivan en una necrosis del tejido. El tercer tratamiento (NaClO 1% por 10 minutos) es considerado estadísticamente el mejor tratamiento de desinfección ya que se obtiene un porcentaje de sobrevivencia de 83.3% y no produce cifras significativas en cuanto a los agentes causales que se consideran para el descarte de los meristemos apicales, confirmando de esta manera que el hipoclorito de sodio es un buen compuesto para la desinfección de los explantes a una dosis adecuada y dependiendo la especie vegetal en estudio (figura 1).

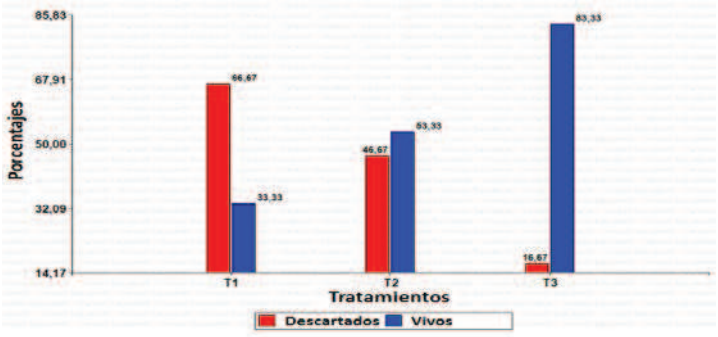

Figura 1: Porcentajes de las variables: sobrevivencia y mortalidad, evaluadas en la etapa de desinfección después de 21 días.

Establecimiento de los explantes: El establecimiento *in vitro* de los meristemos, es decir, la separación del explante y las operaciones relacionadas con su incubación (Roca & Mroginski, 1991), como la viabilidad de los mismos para crecer son evaluadas en base a los meristemos que sobrevivieron de los diferentes tratamientos de desinfección, que es un 47.1%. En este sentido el tercer tratamiento (NaClO 1% por 10 minutos) presenta un porcentaje de 76% de meristemos establecidos de un total de 83.3% de meristemos que no se descartaron por contaminación (figura 2).

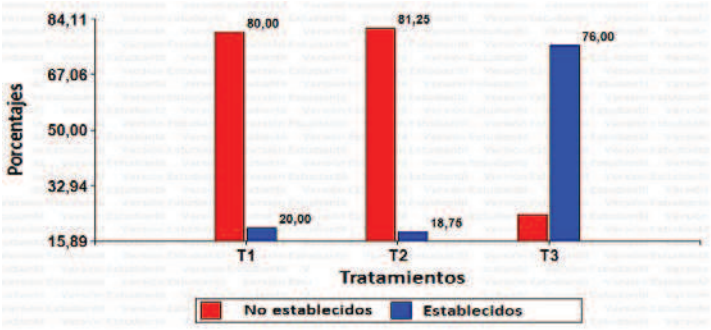

Figura 2: Porcentaje de los meristemos establecidos y no establecidos en la etapa de desinfección después de 21 días.

Inducción a callo embriogénico

Formación de callo embriogénico: López – Báez y colaboradores (2001) probaron la eficiencia de diferentes fuentes de carbono en la inducción de callo, donde la sacarosa se utiliza a concentraciones entre 60 y 80 g/L y las dos favorecen el desarrollo de callo embriogénico, el mismo efecto se obtiene en nuestros resultados, donde la sacarosa se varia en concentración, pero no se observa diferencias significativas en la formación de callo embriogénico utilizando una u otra concentración.

Al variar el tipo de citoquininas utilizadas, en los tratamientos con adición de BAP, se obtiene un leve incremento en la formación de callo embriogénico que en los tratamientos donde se utiliza Kinetina, estadísticamente no hubo diferencias significativas, pudiendo ser la causa que tanto el uso de BAP como Kinetina en bajas concentraciones en relación a la auxina (2,4-D), son necesarias para la inducción de callogénesis (Calva *et al*., 2005).

Con una concentración de 2,4-D (3 mg/L) + BAP (0.5 mg/L) y el medio de cultivo MS, se obtiene el mayor número de callos embriogénicos por explante. Un análisis estadístico de los tratamientos utilizados en la inducción, muestra que el primer tratamiento (3 mg/L de 2,4-D + 0.5 mg/L de BAP + 30 g/L de sacarosa) y el cuarto tratamiento (3 mg/L de 2,4-D + 0.5 mg/L de BAP + 45 g/L de sacarosa) adicionado 10 mg/L de mioinositol, no tienen diferencias significativas entre ellos en la formación de callo embriogénico, pero a la vez son los tratamientos que mayor porcentaje de callos embriogénicos presentan (figura 3).

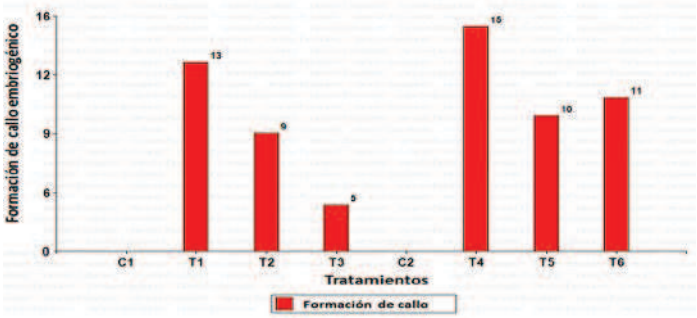

Figura 3: Número de callos embriogénicos formados en los diferentes tratamientos de inducción – segundo ensayo, evaluados a los 60 días.

Tiempo de formación de callo: Los resultados obtenidos revelan que la formación de callo embriogénico a partir de meristemos apicales de romerillo se produce a partir de los 50 y 60 días de introducido el meristemo en el medio de cultivo.
A los 50 días se obtiene un porcentaje de 9.38% de callos embriogénicos mientras que a los 60 días se obtiene un porcentaje de 30%, lo que confirma los resultados del primer ensayo, en donde se afirma que a los 60 días es el periodo de tiempo en donde se puede evidenciar notoriamente las estructuras morfológicas características de los callos embriogénicos (figura 4).

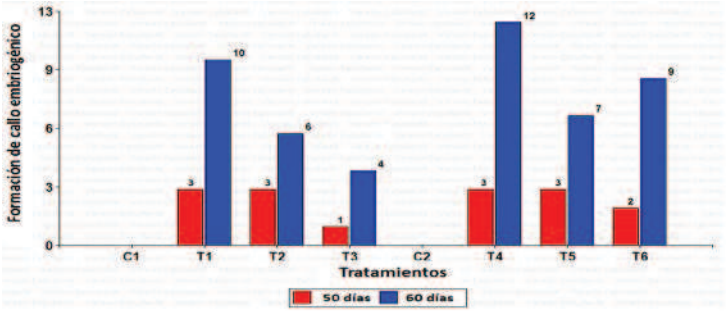

Figura 4: Número de callos embriogénicos formados en los diferentes tratamientos de inducción – segundo ensayo, evaluados a los 50 y 60 días.

Identificación del tejido embriogénico: Se visualiza que los callos que se obtienen en los diferentes tratamientos presentan las mismas estructuras morfológicas que los callos embriogénicos que se obtienen en el primer ensayo, por lo que se procede con el análisis histológico y se puede observar la presencia de agregados con células redondas e isodiamétricas, citoplasma denso y núcleo grande, características de tejidos embriogénicos, dichos componentes de éste tejido fueron observados en un estudio de embriogénesis somática realizado sobre una especie de conífera (*Abies guatemalensis*) (ICTA, 2003) (figura 5).

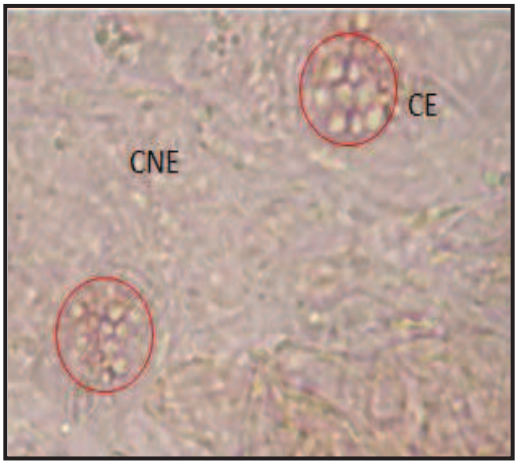

Figura 5: Agregados de células redondas señaladas en un círculo rojo fueron las que el acetocarmín tiñó, conjuntamente con el núcleo y las glicoproteínas de la pared celular de las células embriogénicas (CE), mientras que las células no embriogénicas (CNE) no se tiñeron.

Proliferación de callo embriogénico: La inducción de respuesta morfo génica cuando se utiliza 2,4-D es mejor en condiciones de oscuridad, ya que esta auxina sufre una degradación más rápida cuando se incuba en condiciones de luz (Arzate et al., 2008), con este antecedente se explica el necrosamiento que sufren las porciones de callo embriogénico que estuvieron expuestos a luz directa, por lo que se descarta el pesaje de los callos al final del proceso.

La necrosis observada en las porciones de callo sembradas en las cajas Petri que se incuban en condiciones de oscuridad, se debe a que éstas presentaron problemas de oxidación por los cortes que se realizan previo el cultivo en las cajas Petri provocando la muerte de las células embriogénicas e impidiendo la proliferación y el crecimiento de las mismas (ICTA, 2003), por otro lado las tres porciones que proliferan y aumentan en peso, tienen un necrosamiento parcial, por lo que se consideran aptas y se procede a pesarlas (figura 6).

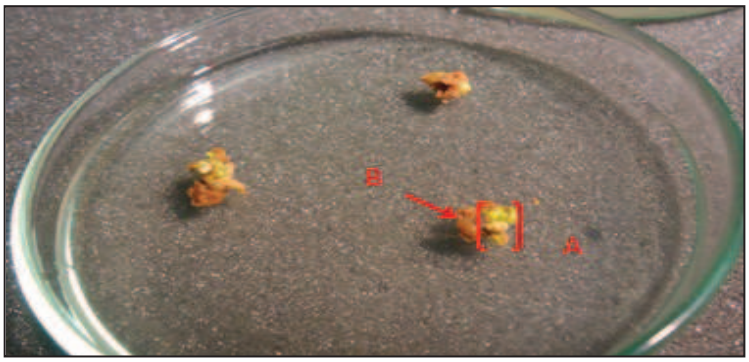

Figura 6: Proliferación de callos embriogénicos después de 30 días de evaluados. **A**. Zona del callo de color verde aún viable. **B**. Zona del callo embriogénico en proceso de necrosis.

CONCLUSIONES

- ✓ El mejor tratamiento de desinfección para el establecimiento *in vitro* de meristemos apicales de árboles jóvenes de *Podocarpus oleifolius* es el tratamiento con hipoclorito de sodio (NaClO) a una concentración de 1% durante 10 minutos con un lavado previo de las yemas apicales en una solución de detergente durante 40 minutos.

- ✓ La mejor formulación nutritiva evaluada para el establecimiento e inducción a callogénesis *in vitro* de meristemos apicales de árboles jóvenes de *Podocarpus oleifolius* es el medio MS a su concentración completa.

- ✓ Con el cuarto tratamiento (3 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L BAP + 45 g/L sacarosa + 10 mg/L mioinositol) del segundo ensayo, se obtiene un porcentaje de 23.8% callos embriogénicos de un total de 63 callos embriogénicos formados en todos los tratamientos, siendo el más óptimo para la inducción a callogénesis *in vitro* de meristemos apicales de árboles jóvenes de *Podocarpus oleifolius*.

- ✓ Los callos embriogénicos formados a partir de los meristemos apicales de romerillo son callos translúcidos, friables y de color amarillento.

- ✓ Histológicamente el tejido embriogénico presenta agregados con células redondas e isodiamétricas, citoplasma denso, núcleo grande y la presencia de células meristemáticas.

- ✓ La proliferación de los callos embriogénicos se da en condiciones de oscuridad, pero se ve afectada por el necrosamiento del tejido siendo el medio MS + 2 mg/L 2,4-D + 1 mg/L BAP el adecuado para la proliferación del callo embriogénico evaluado.

BIBLIOGRAFÍA

Acuña, C. (2004). La Biotecnología Forestal. INTA-CONICET. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Extraído el 14 de marzo de 2011, de: www.argenbio.org/adc/uploads/doc/biotecnologiaforestal.pdf

Arzate, A., Piña, J., Zavaleta, H. (2008). Inducción de Proembriones Somáticos en Ave del Paraíso (*Strelitzia reginae* Banks). Revista Fitotec. México. Volumen 31. pp 183-186. Extraído el 02 de junio de 2012, de: http://redalyc.uaemex.mx/pdf/610/61031212.pdf

Calva, G., Pérez, J. (2005). Cultivo de Células y Tejidos Vegetales: Fuente de Alimentos para el Futuro. Revista Digital Universitaria. Volumen 6, número 11. Extraído el 19 de abril de 2012, de: http://www.revista.unam.mx/ vol.6/num11/art104a/art104a.htm.

Cevallos, M. Sánchez, I. & Montes, S. (2002). Caracterización histológica de la embriogénesis en *Coffea canephora* P. var. Robusta. Protección Vegetal. Vol. 17 No. 95. La Habana – Cuba. Extraído el 08 de septiembre de 2011, de: http://www.censa.edu.cu/index2.php?option=com_docman&task=doc .

Darias, R. (1993). Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos. En: Recopilación de temas sobre técnicas del cultivo "*in vitro*". Oruro. Universidad técnica de Oruro. p. 115.

Dolberg, F. (2006). PROQUIMSA S.A. Hoja de Seguridad de Materiales. Extraído el 02 de junio de 2012, de: http://www.proquimsaec.com/PDF/HojaSeguridad/HS_Hipoclorito_de_Sodio.pdf

Freire, M. (2003). Aspectos básicos de La embriogénesis somática. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Cuba. Biotecnología Vegetal Vol. 3, No. 4: 195-209.

Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA). (2000). Adaptación de un método de embriogénesis somática para la regeneración de embriones asexuales de Pinabete (*Abies guatemalensis redher*) FASE I. Quetzaltenano, Guatemala

Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA). (2003). Adaptación de un método de embriogénesis somática para la regeneración de embriones asexuales de Pinabete (*Abies guatemalensis redher*) FASE II. Quetzaltenano, Guatemala.

Loján, L. (1992). El Verdor del los Andes. Árboles y Arbustos Nativos para el Desarrollo Forestal Altoandino. Proyecto Desarrollo Forestal Participativo en los Andes. Universidad de Texas. pp: 33-35.

López-Báez, O., Moreno, J., Pacheco, S. (2001). Avanzos en Propagación de Cacao (*Theobroma cação*) por Embriogénesis Somática en México. *In* Ingenic. Proceedings of the International Workshop on new Technologies and Cocoa Breeding. Malaysia.

Martínez, R., Azpiroz, H., Rodríguez, J., Cetina, V., Gutierrez, M. (2004). Embriogénesis Somática de *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden y *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake. Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente, año/vol. 10, número 002. Universidad Autónoma Chapingo, México. Pp. 83-92. Extraído el 14 de marzo de 2011 de: redalyc.uaemex.mx/pdf/629/62910203.pdf

Ojeda, M. (1996). Inducción de Organogénesis y Embriogénesis Somática en *Pinus cembroides* (Zucc) y *Pinus halepensis* (Mili). Tesis presentada para optar al grado de Maestro en Ciencias en Producción Agrícola. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía, Subdirección de Estudios de Postgrado. México.

Roca, W. & Mroginski, L. (1991). Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones Colombia: CIA.