



Artigo Original / Original Paper

Propagación *in vitro* de *Bucquetia glutinosa*, especie endémica de los Paramos colombianos

In vitro propagation of Bucquetia glutinosa, endemic species of the Colombian Paramos

Camilo A. Cárdenas-Burgos^{1,4}, Johanna Araque-Barrera², María de los Ángeles Bohorquez-Quintero², Yecenia Hernández-Herrera^{2,3} & José C. Pacheco-Maldonado²

Resumen

Utilizando semillas colectadas en el Páramo de Rabanal (Boyacá-Colombia), se estableció un protocolo de multiplicación *in vitro* de *B. glutinosa*, especie útil para programas de conservación y restauración de ecosistemas paramunos. Durante el establecimiento de cultivos *in vitro*, un 57% de semillas asépticas se obtuvo con NaOCl al 5 y 10%, después de 30 días de cultivo en MS⁻¹ el 61,4% de estas desarrollaron plántulas de apariencia normal; el 75% de los microtallos cultivados en MS/2+0,5 mg l⁻¹ AIB, alcanzó una longitud promedio de 2,06 cm, formaron hasta 10 yemas axilares y de estos se individualizaron entre dos y cuatro brotes basales. El desarrollo de raíces fue simultáneo con la fase de multiplicación. Las plantas, mostraron un 94,4% de sobrevivencia durante la aclimatación en invernadero, en sustrato compuesto por tierra y capote (1:1). Este es el primer protocolo de micropropagación de melastomáceas nativas colombianas, de uso potencial en la restauración y conservación de ecosistemas alto andinos en estado de deterioro y vulnerabilidad.

Palabras clave: melastomatáceas nativas, páramo, propagación *in vitro*, restauración, semillas.

Abstract

In vitro multiplication protocol of *B. glutinosa* was established by seeds collected in the Paramo of Rabanal (Boyacá-Colombia), this species is useful in programs for the conservation and restoration of moorland ecosystems. During the establishment of *in vitro* cultures, 57% of aseptic seeds were obtained with 5 and 10% NaOCl, after 30 days of culture in MS-1, 61.4% of them developing normal appearance seedlings; 75% of the micro-stems cultivated in MS / 2 + 0.5 mg l⁻¹ IBA reached an average length of 2.06 cm, formed up to 10 axillary buds and among these, around two and four basal shoots were individualized. Root development was parallel to multiplication phase. Plants showed a 94.4% survival rate during acclimation in the greenhouse, on a substrate composed of soil and ground mulch (1:1). This is the first micropropagation protocol of native Colombian melastomáceas with a potential use for restoration and conservation of high Andean ecosystems in a state of deterioration and vulnerability.

Key words: native melastomatáceas, paramo, *in vitro* propagation, restoration, seeds.

Introducción

Los ecosistemas paramunos vienen siendo afectados negativamente por la alteración de las condiciones climáticas y por ciertas actividades antrópicas; el uso que el hombre le ha dado a los suelos de páramo ha causado la alteración y

deterioro de muchas especies nativas importantes para el equilibrio natural del ecosistema (Leon *et al.* 2011; Sarmiento *et al.* 2013). Un caso real de esta situación ha sucedido en el Macizo Páramo de Rabanal, ecosistema de gran interés para los departamentos de Boyacá y Cundinamarca por ser

¹ Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Facultad de Ciencias, Lab. Cultivo de Tejidos Vegetales-BIOPLASMA-UPTC, Sistemática Biológica, Herbario UPTC, Ave. Central del Norte 39-115, Tunja-Colombia.

² Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Facultad de Ciencias, Lab. Cultivo de Tejidos Vegetales-BIOPLASMA-UPTC, Avenida Central del Norte 39-115, Tunja-Colombia.

³ ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1944-9134>

⁴ Autor para correspondencia: camilo.cardenas@uptc.edu.co

zona de nacimiento de fuentes abastecedoras de numerosos sistemas hídricos (IAvH *et al.* 2008) y, sin embargo, las comunidades que lo habitan lo han transformado, afectando su paisaje y su riqueza natural; por tanto, es evidente la necesidad de abordar acciones que, de manera inmediata, contribuyan a la conservación y/o restauración de dicho sistema estratégico, que presta servicios imprescindibles como la captación de carbono atmosférico (contribuyendo al control del calentamiento global) y el suministro de agua potable (Sarmiento *et al.* 2013).

Los procesos de restauración ecológica se ven considerablemente afectados por la escasez de propágulos de especies claves (nativas) que inicien la sucesión, o de especies de estados sucesionales avanzados que permitan recuperar la estructura y composición del área a restaurar (Romero *et al.* 2016). Numerosas especies nativas, entre ellas algunas Melastomataceae, como *Bucquetia glutinosa* (L. f.) DC, presentan una gran utilidad potencial en procesos de restauración y conservación del paisaje, así como en la recuperación de las cuencas hidrográficas; además, su óptimo crecimiento en zonas de potrero, la caracteriza como especie colonizadora de los bordes de los parches que se han formado después de la fragmentación que han sufrido algunos bosques (Díaz *et al.* 2008).

Adicionalmente, debido a sus vistosas flores y follajes llamativos, algunos de los géneros de la familia, entre estos *Bucquetia*, tienen uso potencial ornamental (Woodgyer 2009), aspecto que puede ser explotado por las comunidades cercanas a los páramos (Ibáñez-Alcocer 2013). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la mayoría de especies nativas se reproducen por semilla sexual, cuya disponibilidad depende de la duración de los ciclos de floración, de la capacidad de fecundación, fertilidad y germinación (Pacheco & Castellanos 2005) y, además, dicha reproducción puede presentar dificultades por falta de una dispersión adecuada y de sitios para su establecimiento y desarrollo (Schupp *et al.* 2010).

Aunque, en *B. glutinosa* a través de métodos tradicionales y en condiciones de laboratorio, se han cuantificado porcentajes de germinación hasta del 60%, no es posible establecer un patrón que explique claramente la viabilidad de las semillas a través del tiempo, algunos estudios reportan porcentajes entre el 15-60% (Pérez-Martínez *et al.* 2014); además, por ser una especie con amplia distribución la germinación se ve limitada

a mayor elevación (Salehani *et al.* 2013), esto por el aumento de la severidad de las condiciones climáticas (Wagner & Simons 2008), que en los páramos es bastante extrema. Sumado a esto, en especies leñosas con semillas de un tamaño reducido, como la mayoría de las melastomatáceas (Mendoza & Ramírez 2006), tanto la exigencia de altos requerimientos de luz como la presencia de reservas nutricionales limitadas, restringen el establecimiento y la supervivencia de las plántulas (Moles & Westoby 2004), que a su vez no toleran los altos niveles de radiación y bajas temperaturas (Puentes 2010), característicos de estos ecosistemas

Al respecto, el desarrollo de biotecnologías relacionadas con procedimientos de propagación masiva de especies silvestres, sobre todo de aquellas que por muy diversas razones se encuentran en estado de vulnerabilidad y amenaza de extinción (Pathak & Abido 2014) o que son necesarias para procesos de restauración, pueden contribuir de manera efectiva a la conservación de los páramos (Cruz-Cruz *et al.* 2013). No obstante, la mayoría del material vegetal colectado en campo contiene patógenos endógenos que limitan su viabilidad (Andreolli *et al.* 2016); en las semillas, que son los explantes que garantizan el mantenimiento y aumento de la diversidad genética de una especie, estos contaminantes afectan negativamente su sobrevivencia retrasando el crecimiento de las plántulas (Rache & Pacheco 2012), pues generan una relación de competencia (Ramírez *et al.* 2016); de esta forma la propagación *in vitro* permite producir plantas libres de patógenos que al ser llevadas a campo, con seguridad tendrán mayor probabilidad de sobrevivencia (Cruz *et al.* 2013). Por tal razón, el objetivo de este estudio fue establecer, a partir de semilla sexual, un procedimiento para multiplicar *in vitro* plántulas de *B. glutinosa*, utilizables en procesos de restauración y conservación del Páramo de Rabanal (Boyacá: Samacá y Ventaquemada).

Materiales y Métodos

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales BIOPLASMA-UPTC de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Se colectaron, entre febrero y marzo de 2016, frutos maduros de plantas adultas de *Bucquetia glutinosa*, localizadas en el Páramo de Rabanal (Ventaquemada, Boyacá-Colombia), en el sector Matanegra de la Vereda Montoya (05°24'N y 73°32'W), a 3370 m de altitud.

Asepsia superficial y establecimiento *in vitro*

En el laboratorio, las semillas se extrajeron manualmente de los frutos usando pinzas de punta fina y estereomicroscopio. En cámara de flujo laminar, las semillas se agruparon en lotes de 250, contenidas en bolsas de muselina estéril; posteriormente, se sumergieron en 50 ml de agua destilada estéril con Tween 20 (0,1%, v/v) por 10 min, en Alcohol 70% (v/v) durante 30 segundos y posteriormente se sumergieron en Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 5 y 10% durante 10 minutos (T1 y T2), Hipoclorito de Calcio (Ca(ClO)₂), al 5 y 10% durante 10 minutos (T3 y T4), NaOCl al 5 y 10% durante 15 minutos (T5 y T6, respectivamente). Finalmente, las semillas se enjuagaron cuatro veces consecutivas con agua destilada estéril.

Posteriormente, las semillas desinfectadas se cultivaron en medio MS (Murashige & Skoog 1962) sin reguladores de crecimiento (T1), MS con sales minerales diluidas a ½ (MS/2, T2) y ¼ (MS/4,

T3), MS/2 con 3 mg l⁻¹ de Tiamina, Piridoxina, Ácido Nicotínico y Pantotenato de Calcio (MS⁻¹, T4) (Cid *et al.* 1997) y agua destilada estéril (T5). Se realizaron observaciones cada cinco días durante 30 días y se cuantificó el porcentaje de semillas germinadas y la ocurrencia de contaminación por hongos y bacterias.

Multiplicación y enraizamiento de brotes

Previa eliminación de la raíz, las plantas obtenidas en la etapa anterior fueron transferidas, teniendo como referencia los trabajos de Cid *et al.* (1997) y Kozak & Wnuk (2012), a los siguientes medios de multiplicación: MS completo y/o MS/2 suplementado con Ácido Indolacético (AIA), 6-bencilaminopurina (BAP), Ácido Giberélico (GA₃) y/o Ácido Indolbutírico (AIB) (Tab. 1). Después de 60 días de cultivo, con un subcultivo a 30 días, se cuantificó la longitud total promedio de microtallos, el promedio de yemas axilares

Tabla 1 – Medios de cultivo utilizados durante la etapa de multiplicación y enraizamiento de brotes de *B. glutinosa*. T1 (Barrueto *et al.* 1997), T2 (Kozak & Wnuk 2012), T3-T4 (modificaciones realizadas con base en T1 y T2). MS (Murashige & Skoog, 1962). ANA: Ácido Naftalen-acético, AIA: Ácido Indol-acético, BA: Bencil-adenina, AIB: Ácido Indol-butírico; GA₃: Ácido Giberélico. Cantidades dadas en mg l⁻¹

Table 1 – Culture media used during the stage of multiplication and rooting of *B. glutinosa* shoots. T1 (Barrueto *et al.*, 1997), T2 (Kozak and Wnuk 2012), T3-T4 (modifications made based on T1 and T2). MS (Murashige and Skoog, 1962). ANA: Naphthalene-acetic acid, AIA: Indole-acetic acid, BA: Benzyl-adenine, AIB: Indole-butyrac acid; GA3: Gibberellic acid. Amounts given in mg l⁻¹

Componentes	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Macroelementos	MS/2	MS	MS	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2
Microelementos	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Mioinositol	50	100	100	100	100	100	100
Pantotenato de Calcio	1,0	--	--	--	--	--	--
Tiamina	1,0	0,1	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Ácido Nicotínico	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Piridoxina	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Glicina	--	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
ANA	0,1	-	1,0	--	--	--	--
AIA	--	0,5	--	--	--	--	--
BAP	0,2	1,0	2,0	--	--	0,5	1,0
GA ₃	0,7	--	0,7	--	--	--	--
AIB	--	--	--	0,5	0,2	0,2	0,5

Todos los medios de cultivo se suplementaron con 30 g l⁻¹ de Sacarosa y se gelificaron con 6,5 g l⁻¹ de Agar.

All culture media were are supplemented with 30 g l⁻¹ of Sucrose and gelled with 6.5 g l⁻¹ Agar.

basales desarrolladas y de brotes individualizables, así como el porcentaje de microtallos enraizados.

Aclimatación

Plántulas desarrolladas en la etapa anterior se extrajeron de los recipientes de cultivo, se les eliminó el agar adherido a las raíces con agua corriente y se transfirieron a bandejas de icopor (poliespam) de $21 \times 21 \times 5,5$ cm con tierra y capote (mantillo de bosque) en proporción 1:1. Las bandejas se colocaron dentro de cajas de vidrio de $50 \times 30 \times 10$ cm, cubiertas con plástico extensible; las condiciones ambientales del interior de las cajas fueron $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa de 97%. Las cajas se mantuvieron con fotoperiodo de 16 h luz, en cuarto de incubación y las plántulas se regaron diariamente por aspersión manual. Después de 15 días, el plástico extensible se eliminó de forma progresiva y, posteriormente, las plántulas se transfirieron a bolsas de encapuchar de 10×15 cm con tierra y capote (1:1) y se llevaron a invernadero, con riego cada tres días por aspersión manual durante 30 días. En esta etapa se cuantificó el porcentaje de plántulas viables.

Condiciones generales de cultivo y análisis de datos

La unidad experimental en la etapa de germinación fue un recipiente de vidrio con 25 semillas con diez repeticiones para un total de 250 semillas por tratamiento. En la etapa de multiplicación la unidad experimental fue un recipiente de vidrio con cinco explantes (explante = microtallo con uno o dos segmentos nodales) con 15 repeticiones.

Los explantes se cultivaron en recipientes de vidrio de 100 ml, con alícuotas de 20 ml de medio de cultivo con pH 5,8 ajustado con HCl y/o NaOH (1N) y esterilizado en autoclave a 15 psi y $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. Los cultivos se incubaron a $24 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ con iluminación continua de $70\text{--}80\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, suministrada por lámparas fluorescentes de 75W.

Los datos obtenidos se procesaron en el programa IBM SPSS Statistics versión 22. Para determinar diferencias significativas entre los tratamientos de asepsia superficial y germinación, se realizó la prueba de Chi-cuadrado; para los datos de multiplicación y enraizamiento, la prueba H de Kruskal-Wallis para muestras independientes; y finalmente, para observar el comportamiento multivariable de los tratamientos ensayados, se

realizó un análisis de componentes principales (ACP) utilizando el programa PAST versión 3.06. Los datos de aclimatización se registraron y analizaron como porcentajes.

Resultados

Asepsia superficial y establecimiento *in vitro*

Los distintos procedimientos de desinfección permitieron obtener un 42,8% (642) de semillas asépticas, registrándose el mayor porcentaje, 57% (570 de 1000 semillas) utilizando NaOCl como agente desinfectante (T1, T2, T5 y T6), frente a un 14,4% (72 de 500 semillas) con $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ (T3 y T4); no obstante, los tratamientos T1 y T3 (con 23,6 y 26% de semillas asépticas) y, T2 y T4 (con 4,4 y 2,8% de semillas asépticas) (NaOCl y $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, respectivamente) registran un comportamiento semejante.

Los resultados de la prueba Chi-cuadrado mostraron un efecto significativo entre la concentración y el tiempo de inmersión en NaOCl, observándose que a medida que aumenta el tiempo de exposición disminuye el porcentaje de contaminación (T1 y T2 vs. T5 y T6), de tal manera que en los tratamientos T5 y T6 se registraron los mayores porcentajes de desinfección, 100%, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos ($p=9,325\text{E-}256$).

En los tratamientos en los que se presentó contaminación, las bacterias fueron el contaminante más frecuente, observándose en el 57,8% de las semillas cultivadas, mientras que el 30,6% del total de semillas cultivadas presentó contaminación por hongos; no obstante, se observó que algunas semillas mostraron contaminación tanto bacteriana con fúngica.

Después de 30 días de cultivo, se observó una cantidad progresiva de semillas germinadas en todos los tratamientos aplicados, alcanzándose un 38,1% (761) de semillas germinadas (Tab. 2). Del total de semillas germinadas, el 2,5% (19 semillas) germinaron en medio MS (T1), el 5,1% (39) en MS/2 (T2), el 5,3% (40) en MS/4 (T3), el 61,4% (307) en MS^{-1} (T4) y el 71,2% (356) en agua (T5), estableciéndose diferencias significativas entre los tratamientos ($p=0,00$).

De las 761 plántulas obtenidas, el 44,2% (336 plántulas) fueron viables después de 70 días de cultivo, registrándose respuestas variables entre los tratamientos ($p=0,001254$); sin embargo, se debe resaltar que los medios que exhibieron los

Tabla 2 – Semillas germinadas y plántulas en desarrollo de *Bucquetia glutinosa* cultivados en diferentes medios.
Table 2 – Germinated seeds and seedlings in development of *Bucquetia glutinosa* grown in different media

Respuesta	Medios de cultivo					
	MS	MS/2	MS/4	MS ⁻¹	Agua	TOTAL
Semillas germinadas	0,05±0,21 a	0,10±0,30 b	0,10±0,30 b	0,77±0,42 c	0,89±0,31 c	0,38±0,49
Plántulas viables	0,26±0,45 a	0,15±0,37 b	0,15±0,36 b	0,39±0,49 c	0,56±0,50 d	0,44±0,50

Letras distintas en la misma fila indican diferencias entre tratamientos. Los valores se presentan como promedio ± la desviación estándar.
 Different letters in the same row indicate differences between treatments. Values are presented as average ± the standard deviation.

más altos porcentajes de plántulas viables, 39% y 56% son los mismos que permitieron alcanzar mayor porcentaje de germinación, MS⁻¹ y agua, respectivamente (Tab. 2).

En general, las plántulas presentaron un adecuado crecimiento y desarrollo con tallos gruesos (0,4–0,7 cm de diámetro), con 2 o 3 entrenudos y 3 a 5 cm de longitud, formación y desarrollo vigoroso de hojas y yemas; no obstante, aquellas que germinaron en agua mostraron hiperhidratación en tallos y hojas, razón por la cual, aunque en este tratamiento se registró un elevado promedio de germinación (Tab. 2), las plántulas desarrolladas presentaron una apariencia anormal.

Multiplicación y enraizamiento de brotes

Durante esta etapa los datos registrados para cada una de las variables evaluadas mostraron diferencias significativas (Prueba H de Kruskal-Wallis; $P \leq 0,05$) Aunque en los tratamientos realizados no se observó un alto incremento en la elongación, los microtallos con mayor longitud promedio se obtuvieron en T4 (MS/2 + 0,5 mg l⁻¹ AIB), en el cual el 75% alcanzó una longitud entre 2,5 cm 3,5 cm, mientras en T1 (medio propuesto por Cid *et al.* 1997), T2 (Kozak & Wnuk, 2012) y T6 (MS/2+0,2 mg l⁻¹ AIB + 0,5 mg l⁻¹ BA) el 75% de los microtallos presentaron una longitud promedio de 0,7 cm (Fig. 1).

Por otra parte, se observó que la formación de yemas axilares y el desarrollo de brotes individualizables fueron afectados, principalmente, por el tipo de auxina utilizada y su combinación o no con otros reguladores. De esta forma en T4 y T5 (medios suplementados solo con AIB) los microtallos desarrollaron el mayor número de yemas axilares basales, 10 y 8, respectivamente, los cuales produjeron 2–3 brotes individualizables; sin

embargo, algunos de estos microtallos desarrollaron hasta 7 brotes. También se observó que, la concentración original de sales minerales del MS suplementada con auxina, citoquinina y giberelina (T3) no estimuló el desarrollo de yemas axilares, ya que en este tratamiento los microtallos formaron, en promedio, 2 yemas. Estos resultados contrastan con los obtenidos en T1, que solo difiere de T3 en la concentración de sales minerales y la presencia de Pantotenato de Calcio y Glicina y, en los cuales los microtallos formaron aproximadamente 8 yemas axilares (Fig. 1).

Con relación al enraizamiento, el AIB tuvo un efecto positivo sobre el desarrollo de raíces en los microtallos de *B. glutinosa*, ya que esta auxina en concentraciones de 0,5 y 0,2 mg l⁻¹ (T4 y T5) estimuló el desarrollo de 7 raíces en promedio; sin embargo, en T4 algunos microtallos desarrollaron hasta 18 raíces (Fig. 1) con apariencia normal, forma típica fasciculada, de consistencia semileñosa, color blanquecino y ápice meristemático rojizo. En los demás tratamientos (T1, T2, T3, T6 y T7) los microtallos solo formaron entre 1 y 3 raíces, con valores máximos y atípicos de 8 y 4 raíces (T7 y T6 respectivamente) (Fig. 1). Por otro lado, la individualización de hasta 7 brotes por explante (y un promedio de 3 brotes/explante) en el tratamiento cuatro, confirma el efecto positivo del AIB solo, sobre la multiplicación *in vitro* de *B. glutinosa*, ya que en los tratamientos suplementados con otros reguladores fue casi imposible individualizar microtallos desarrollados a partir de yemas axilares (Fig. 1).

La correlación de las variables evaluadas mediante el análisis de componentes principales (ACP), permitió corroborar las diferencias encontradas con el estadístico H de Kruskal Wallis. El análisis muestra que la variación de las respuestas obtenidas durante la etapa de

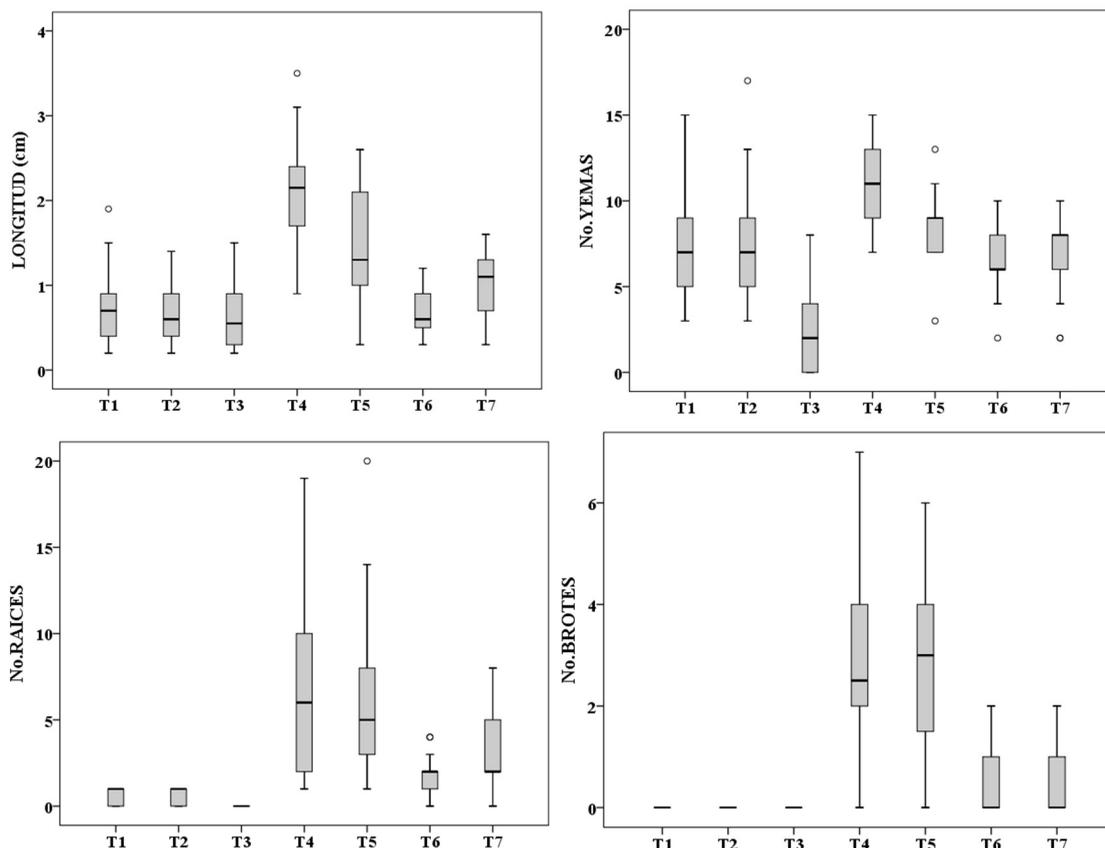


Figura 1 – Longitud de microtallos, número de yemas axilares desarrolladas, número de raíces desarrolladas y número de brotes individualizables registrados en diferentes medios de proliferación de microtallos de *B. glutinosa*.
Figure 1 – Length of micro-stems, number of developed axillary buds, number of developed roots and number of individualizable outbreaks registered in different proliferation media of *B. glutinosa* micro-stems.

multiplicación y enraizamiento está explicada con un 97,39% en dos componentes principales y separa los tratamientos evaluados en dos grupos: el primero compuesto por los medios de cultivo correlacionados positivamente con la longitud, el número de yemas, brotes y raíces de los microtallos (T4 y T5) y el segundo en los que la correlación no es significativa, es decir, los medios con microtallos con menor longitud y número de yemas, sin desarrollo de brotes axilares ni raíces (T1, T2, T3, T6 y T7) (Fig. 1); no obstante se puede inferir que T4 es el más apropiado para llevar a cabo una propagación masiva de *B. glutinosa*, ya que en este se obtuvo la mejor correlación para las cuatro variables: microtallos con una longitud promedio de 2,06 cm, los cuales formaron hasta 10 yemas axilares basales, desarrollaron en promedio siete raíces y de estos microtallos se individualizaron entre dos y cuatro brotes

basales (Fig. 1 y 2). El tratamiento T3 no mostró correlación entre los componentes resultantes ni con las variables evaluadas (Fig. 2), confirmando así que en los medios con sales minerales MS al 100% suplementados con auxinas, citoquininas y giberelinas, por lo menos en las concentraciones utilizadas en este estudio, no se obtiene una proliferación adecuada de *B. glutinosa*.

Aclimatación

La adaptación progresiva de las plántulas a condiciones *ex vitro* fue exitosa; tallos y hojas conservaron su turgencia, y se observó crecimiento activo como respuesta al adecuado funcionamiento activo del sistema radical. Después de 30 días de aclimatización, se encontró una correspondencia significativa entre el sustrato (tierra y capote) y la viabilidad de las plantas, registrándose un 94,4% de sobrevivencia.

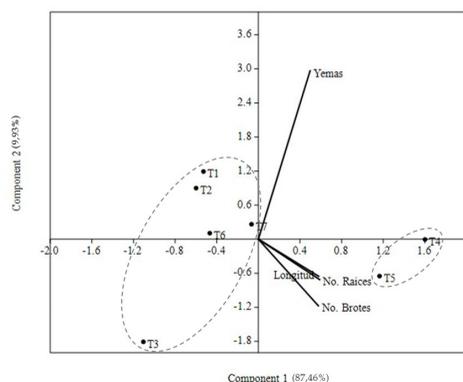


Figura 2 - Análisis de componentes principales (ACP) para la etapa de multiplicación de microtallos de *B. glutinosa* cultivados en diferentes medios de proliferación.

Figure 2 – Principal component analysis (PCA) for the multiplication stage of *B. glutinosa* micro-stems cultivated in different proliferation media.

Discusión

Se ha descrito una indudable interacción entre plantas y microorganismos, en los que se establecen relaciones de tipo patogénico, benéfico o neutral (Hardoim *et al.* 2015; Andreolli *et al.* 2016); generalmente, la contaminación *in vitro* causada por hongos y bacterias retrasa el crecimiento de los explantes, al competir con ellos y generar modificaciones en el medio que afectan negativamente su sobrevivencia y desarrollo (Ramírez *et al.* 2016), por lo tanto, establecer un adecuado procedimiento de asepsia superficial de los tejidos es indispensable para alcanzar una elevada viabilidad y facilitar la reactivación del crecimiento y desarrollo de los explantes (Rache & Pacheco 2012).

El NaOCl al 5% y 10% durante 15 minutos permitió establecer *in vitro* semillas de *B. glutinosa*, haciendo efectiva la eliminación de microorganismos sin afectar su viabilidad; en este sentido Diomedí *et al.* (2017), han afirmado que la relación dependiente entre la concentración y el tiempo de inmersión es determinante en la eliminación de poblaciones de microorganismos, principalmente de bacterias, contaminantes más frecuentes en el cultivo de *B. glutinosa*. Resultados semejantes se han reportado con NaOCl para *Miconia squamulosa* en concentración de 6% durante 3 y 6 minutos, en donde el incremento del tiempo de inmersión registra una desinfección del 80–90% (Jardín Botánico de Bogotá 2011) y

en *Dioscorea alata* en concentraciones de 1,5% (Borges *et al.* 2009).

Aunque los procedimientos de asepsia con NaOCl al 5% y 10% fueron efectivos, se observó un elevado porcentaje de contaminación en los demás tratamientos (T1, T2, T3 y T4), respuesta que puede estar influenciada por la morfología de las semillas reniformes, con superficie papilosa granulada de *Bucquetia* (Vargas & Pérez-Martínez 2014), carácter que permitió que gran parte de la población de microorganismo haya escapado a la acción de los productos desinfectantes, pues permanecen protegidos en las superficies irregulares del explante (Ramírez *et al.* 2016); además, las características del origen de la planta madre (factores bioclimáticos, suelo, pH, condiciones fitosanitarias, etc.) afectan heterogéneamente las condiciones de cultivo (Ramírez 2013), ya que usualmente la contaminación expresada en el medio corresponde a los mismos patógenos presentes en su habitat natural (Rodríguez *et al.* 2008).

La germinación y viabilidad embrionaria no se vio afectada por el procedimiento de asepsia, alcanzándose un porcentaje de germinación favorable, 38,1%. Algunos autores consideran que el NaOCl estimula la germinación, mantiene la viabilidad y facilita la reactivación del crecimiento, brotación y/o desarrollo del explante (Rache & Pacheco 2012; Ramírez 2013), debido a que dicho compuesto activa la diferenciación celular, con bajo daño fitotóxico, facilitando una regeneración más rápida y eficiente (Elinorovololona & Martial 2014).

En cuanto al medio de cultivo, el medio MS⁻¹ (T4) y el agua (T5), permitieron recuperar mayor número de semillas germinadas, esto indica que las semillas de *B. glutinosa* presentan un balance nutricional endógeno adecuado y por lo tanto no requieren elevadas cantidades de inductores orgánicos y/o químicos externos que estimulen su germinación, resultado que concuerda con observaciones anteriores en especies afines como *M. squamulosa*, en la que se obtuvo un 33,33% de germinación en medio MS reducido a la mitad de su concentración original y sin reguladores de crecimiento (Jardín Botánico Bogotá 2011). De lo anterior se infiere, que tal como las semillas de *M. squamulosa*, las de *B. glutinosa* se encontraban en estado de madurez fisiológico adecuado, y que las condiciones nutricionales y ambientales suministradas a través del cultivo *in vitro* fueron óptimas para estimular su proceso germinativo. No obstante, los explantes desarrollados en agua

destilada estéril presentaron hiperhidratación que progresivamente fue causa de inviabilidad de plántulas, por lo que se prefirió el medio semisólido (MS^{-1}), para continuar el proceso de establecimiento.

El medio MS^{-1} demostró un efecto significativo sobre el crecimiento, desarrollo y vigor de las plántulas, principalmente sobre los procesos de diferenciación, formación y extensión de hojas y crecimiento y desarrollo de tallos, tal como fue descrito por Borges *et al.* (2009) para *Dioscorea alata*, especie en la que el contenido nutritivo del medio de cultivo permitió un crecimiento y desarrollo vegetativo continuo, expresado en la formación de nuevas hojas y yemas, producto de una importante actividad de crecimiento y diferenciación desplegada por los tejidos meristemáticos.

La fase de establecimiento *in vitro* permitió obtener el material vegetal necesario para continuar con las etapas siguientes, de tal forma que la dificultad germinativa observada en condiciones naturales, a causa de la germinación no homogénea de las semillas, fue superada de manera eficiente en condiciones *in vitro*

Durante la multiplicación de *B. glutinosa*, el medio de cultivo más adecuado resultó ser $MS/2$ suplementado con $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ de AIB (T4), en el que el desarrollo y elongación de brotes basales fue simultáneo con la formación de raíces. Respuestas similares fueron obtenidas por Cid *et al.* (1997) quienes indujeron la formación de raíces en la fase de multiplicación en *Miconia* sp. cultivada en un medio suplementado con $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ AIB. Ma *et al.* (2007) también estimularon la regeneración de plantas y desarrollo de raíces en *Melastoma affine* en medio $MS/2$ enriquecido con $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ de AIB y, de manera semejante, He *et al.* (2010), obtuvieron microtallos de *Tigridiopalma magnifica* con desarrollo de raíces en $MS/2$ suplementado con $4,92 \mu\text{M}$ de AIB. Cabe señalar, que el enraizamiento espontáneo durante la multiplicación fue una respuesta benéfica, ya que permitió a los explantes absorber adecuadamente los nutrientes presentes en el medio de cultivo, entre estos el AIB, una de las auxinas sintéticas más utilizadas en procesos de propagación, ya que es fotoestable y de poca sensibilidad a la degradación biológica (Rodríguez *et al.* 2012), estimula el crecimiento y tiene acción sobre la división o elongación de las células, el desarrollo de la raíz embrionaria y postembrionaria, así como también el gravitropismo (Overvoorde *et al.* 2010)

Durante los primeros días de cultivo para la multiplicación de *B. glutinosa*, las plántulas mostraron un desarrollo continuo; sin embargo, se observó que el tejido foliar en contacto con el medio de cultivo se necrosó produciendo fenolización y senescencia de tejidos. Según Azofeifa (2009) las plantas superiores en condiciones adecuadas, producen varias sustancias secundarias (metabolitos) que son de naturaleza fenólica y su acumulación, con frecuencia, altera la composición química del medio, inhibiendo el crecimiento del explante y causando progresivamente su muerte (Borges *et al.* 2009); por esta razón, y para evitar la fenolización del medio, en cada transferencia a los microtallos se les eliminó los primeros dos pares de hojas basales, lo cual produjo resultados favorables a través de varios subcultivos.

Por otra parte, el desarrollo de 8 a 10 yemas axilares y la individualización de hasta 7 brotes basales, en medios suplementados solo con AIB (T4 y T5), son resultados contrastantes con los obtenidos en otras melastomáceas, puesto que se ha reportado respuesta proliferativa óptima en medios suplementados con citoquininas y auxinas diferentes al AIB (Ravoniarison & Ephrem 2014; Zhang *et al.* 2015; Prudente *et al.* 2016). En este sentido y, aunque al BA se le conoce como una citoquinina de gran efectividad durante la regeneración de brotes en varias especies de Melastomataceae (Elavazhagan & Arunachalam 2010; Kozak & Wnuk 2012; Mahmud 2013), los medios suplementados con esta hormona no resultaron efectivos para *B. glutinosa* ya que los brotes presentaron retraso en el crecimiento. Las variaciones de comportamiento en cultivo *in vitro* de melastomáceas se pueden explicar por diferencias en la capacidad de regeneración y multiplicación celular de cada especie (Pedroza-Manrique & Caballero-Arévalo 2009), pues a pesar de pertenecer a la misma familia, dicha capacidad está definida por el estado fisiológico de cada planta y su carga genética (Viñas & Jiménez 2011).

Son notorias las respuestas registradas en los tratamientos T4 y T5, cuyos medios fueron suplementados solo con auxina, respuesta que en la gran mayoría de las plantas es estimulada, principalmente, solo por la presencia de citoquininas (Pedroza-Manrique & Caballero-Arévalo 2009); no obstante el control que ejercen las auxinas (en concentraciones adecuadas) sobre los niveles de citoquininas endógenas activas, puede mediar la formación de N-glucósidos o la activación de citoquinina oxidasa, la que regula la biosíntesis

de citoquininas endógenas producidas por el tejido meristemático (Segura 2008).

Finalmente, es de destacar la importancia de la utilización de semillas sexuales como explantes iniciales, para llevar a cabo la micropropagación, por ejemplo de *B. glutinosa*, ya que, al reintroducir material vegetal producido bajo condiciones *in vitro* se mantiene y/o aumenta la diversidad genética existente en las poblaciones y ecosistemas de origen. Así mismo, micropropagar este tipo de especies, además de ser una alternativa eficaz para incrementar el número de individuos en poblaciones con problemas de reproducción y/o extremadamente reducidas (González-Benito & Martín 2011), es una estrategia para contribuir a la conservación de la biodiversidad de los ecosistemas paramunos y altoandinos (Bohórquez *et al.* 2016) que se encuentran en alto riesgo de vulnerabilidad.

El tiempo de permanencia de las plantas de *B. glutinosa* en condiciones iniciales de aclimatación (en bandejas cubiertas), afectó significativamente la sobrevivencia y crecimiento de las mismas, resaltándose la importancia de la regulación de humedad/aireación y corroborándose que el cambio de atmósfera saturada de agua en condiciones *in vitro*, a un ambiente con humedad variable, (en todo caso menor) en condiciones *ex vitro*, debe ser realizado de forma gradual, para evitar la muerte de las plántulas micropropagadas (Chandra 2010). El sustrato compuesto por tierra y capote aportó los requerimientos necesarios para el acondicionamiento y funcionalidad progresiva de raíces y tallos, proponiéndose como sustrato adecuado para el endurecimiento de vitroplantas de *B. glutinosa*; Estos resultados son consistentes con estudios realizados con *Miconia squamulosa*, (Jardín Botánico de Bogotá 2011) bajo la premisa que la aclimatación es la etapa más importante de la micropropagación, puesto que debe garantizar que las plantas que se extraen de un ambiente controlado deben permanecer viables y, de esta manera mostrar la calidad de todo el proceso *in vitro*. (Borges *et al.* 2009).

El protocolo establecido, es el único estudio de micropropagación de melastomáceas nativas colombianas, constituyéndose en un referente replicable en otras especies relacionadas y que sean seleccionadas bajo criterios similares. El material vegetal micropropagado es utilizable en procesos de reintroducción, restauración y conservación de ecosistemas en estado de deterioro y vulnerabilidad, como lo es el Páramo de Rabanal.

Conclusiones

Para la propagación *in vitro* de *Bucquetia glutinosa*, la desinfección superficial de las semillas fue efectiva (57%) al emplear NaOCl al 5 y 10% mientras la germinación se vio favorecida en el medio MS⁻¹, estimulando los procesos de crecimiento y desarrollo de plántulas.

Después de 60 días de cultivo, con transferencia a nuevo medio cada 30 días, los microtallos cultivados en MS/2+0,5 mg l⁻¹ AIB alcanzaron hasta 3,5 cm de longitud con 10 yemas axilares y dieron lugar hasta tres brotes basales individualizables; el desarrollo de raíces fue simultáneo con la multiplicación de microtallos. Estos resultados evidencian una alternativa efectiva para multiplicar *B. glutinosa*, ya que, además de usar un medio reducido en sales minerales y suplementado únicamente con AIB, las vitroplantas obtenidas demostraron un alto grado de adaptabilidad y funcionalidad durante el proceso de aclimatación en sustrato de tierra y capote, alcanzándose un elevado porcentaje de sobrevivencia.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los integrantes de los grupos de investigación BIOPLASMA-UPTC y SISBIO, por la colaboración recibida durante el desarrollo de esta investigación, así como al convenio de colaboración No. 5211740 suscrito entre la UPTC y ECOPETROL S.A. el cual brindó apoyo logístico, en campo, en laboratorio, entre otros; también a la Dirección de Investigaciones (DIN) de la UPTC por los recursos económicos otorgados para tal fin.

Referencias

- Andreolli M, Lampis S, Zapparoli G, Angelini E, & Vallini G (2016) Diversity of bacterial endophytes in 3 and 15 year-old grapevines of *Vitis vinifera* cv. Corvina and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. *Microbiological Research* 183: 42-52.
- Bohórquez M, Araque E & Pacheco J (2016) Propagación in vitro de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza, frailejón endémico en peligro de extinción. *Actualidades Biológicas* 38: 23-36.
- Cid LPB, Gomes ACM, Costa SBR & Teixeira JB (1997) Micropropagation of *Miconia* sp, a woody melastomataceae from Brazil, using thidiazuron as plant growth regulator. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 9: 21-25.
- Borges M, Estrada E, Pérez I, & Meneses S (2009) Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología* 11: 127-135.

- Cruz-Cruz C, Gonzalez-Arno MT & Engelmann F (2013) Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources* 2: 73-95.
- Díaz EA, León OA & Vargas O (2008) Sobrevivencia y crecimiento de plántulas debajo de *Lupinus bogotensis* implicaciones para la restauración. In: Vargas O (ed.) Estrategias para la restauración ecológica del bosque Alto andino: el caso de la Reserva Forestal Municipal de Cogua, Cundinamarca. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 372p.
- Diomedí A, Chacón E, Delpiano L, Hervé B, Jemenao I, Medel M, Quintanilla M, Riedel G, Tinoco J & Cifuentes M (2017) Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. *Revista Chilena de Infectología* 34: 156-174.
- Elavazhagan T & Arunachalam KD (2010) *In vitro* callus induction and shoot multiplication from nodal explants and leaves of *Memecylon edule*. *Asian Journal Biotechnology* 2: 110-119.
- Elinorovololona RN & Martial EL (2014) Effects of growth regulators 6-benzylaminopurine and 2-naphthalene acetic acid on the *in vitro* shoot multiplication from nodal segment of *Medinilla mandrakensis* (Melastomataceae). *International Journal of Biochemistry and Biotechnology* 3: 504-510.
- González-Benito ME & Martín C (2011) *In vitro* preservation of Spanish biodiversity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 47: 46-54.
- Hardoim P, Overbeek L Van, Berg G, Pirttilä M, Compant S, Campisano A & Sessitsch A (2015) The hidden world within plants : ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79: 293-320.
- Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humbolt (IAVH), Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR), Corporación Autónoma Regional de Boyacá (CORPOBOYACÁ), Corporación Autónoma Regional de Chivor (CORPOCHIVOR) (2008) Estudio sobre el estado actual del Macizo del Páramo de Rabanal. Convenio interadministrativo No. 07-06-263-048 (000404). 544p.
- Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis (2011) I. Protocolos de propagación *in vitro* de 3 especies vegetales priorizadas en el marco del proyecto 318 (*Miconia squamulosa*, *Hypericum mexicanum* y *Orthrosanthus chimboracensis*). Contrato 228-2011. Bogotá. 96p.
- Kozak D & Wnuk K (2012) The influence of the salt composition of basal medium and growth regulators on *in vitro* growth and development of *Tibouchina urvilleana* (DC.) Cogn. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus* 11: 59-68.
- Mahmud KN (2013) The effects of plant growth regulators and amino acids on the germination of *Melastoma Malabathricum* L. through tissue culture. Universiti Teknologi Malaysia, Skudai. 68p.
- Mendoza H & Ramírez B (2006) Guía ilustrada de géneros Melastomataceae y Memecylaceae de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt; Univerisad del Cauca, Bogotá. 288p
- Moles A & Westoby M (2004) Seedling survival and seed size: a synthesis of the literature, *Journal of Ecology* 92:372-383
- Overvoorde P, Fukaki H, & Beeckman T (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a001537.
- Pacheco J & Castellanos MC (2005) Roble y pino colombiano: aspectos biotecnológicos. Ed. Publicaciones E Imprenta UPTC, Tunja. 218p.
- Pathak, MR & Abido M (2014) The role of biotechnology in the conservation of biodiversity. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. 2: 352-363.
- Pedroza-Manrique J & Caballero-Arévalo M (2009) Evaluación del efecto del medio MS y la temperatura en el desarrollo de propágulos de *Marchantia polymorpha* L. (Marchantiaceae) bajo condiciones *in vitro* y *ex vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 11: 85-104.
- Pérez-Martínez LV, Rodríguez NA, Melgarejo LM & Vargas RO (2014) Propagación por semilla de 13 especies de páramo. In: Vargas O & Pérez- Martínez LV (eds.) Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Pp. 116-174
- Prudente OD, Nery FC, Paiva R, Reis MV, Oliveira Paiva P.D, & Nery M.C 2016. Cultivo *in vitro* de *Miconia ligustroides* (DC.) Naudim. *Plant Cell Culture Micropropagation* 12: 13-19.
- Puentes J (2010) Patrones y mecanismos de establecimiento de dos especies leñosas en la zona de transición entre el Bosque Paramero y el Páramo en los Andes Tropicales. Tesis de Maestría. Universidad de los Andes en Venezuela, Mérida. 130p.
- Rache L & Pacheco J (2012) Establecimiento de un protocolo de propagación de *Physalis peruviana* L. a partir de yemas axilares adultas. *Revista Ciencia En Desarrollo* 4: 71-86.
- Ramírez L (2013) Evaluación de tratamientos de desinfección en segmentos nodales de *Guadua angustifolia* para el establecimiento del cultivo *in vitro*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia-UNAD, Bogotá. 59p.

- Ramírez S, Osuna FJ, García F, Canul J & Palacios A (2016) Molecular identification of bacteria associated to ornamental plants obtained *in vitro*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 34:173-183.
- Ravoniarison NE & Ephrem LM (2014) Effects of growth regulators 6-benzylaminopurine and 2-naphthalene acetic acid on the *in vitro* shoot multiplication from nodal segment of *Medinilla mandrakensis* (Melastomataceae). *International Journal of Biotechnology and Biochemistry* 3: 504-510.
- Romero AM, Baquero N & Beltrán HE (2016) Banco de semillas en áreas disturbadas de bosque subandino en San Bernardo (Cundinamarca, Colombia). *Colombia Forestal* 19: 181-194.
- Salehani MK, Mahmoudi J, Mahdavi SK & Habibzadeh R (2013) El efecto de la altitud en la interrupción de la latencia de la semilla y la estimulación de la germinación de la semilla de la algodoncillo persa (*Heracleum Persicum*). *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines* 10: 555-558.
- Sarmiento C, Cadena C, Sarmiento M, Zapata J & León O (2013) Aportes a la conservación estratégica de los páramos de Colombia: actualización de la cartografía de los complejos de páramo a escala 1:100.000. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá. 89p.
- Segura J (2008) Morfogénesis *in vitro*. In: Azcon J & Talon M (eds.) *Fundamentos de fisiología vegetal*. 2^{da} ed. MacGraw Hill, Madrid. Pp. 381-392.
- Schupp EW, Jordano P & Gómez JM (2010) Seed dispersal effectiveness revisited: a conceptual review. *New Phytologist* 188: 333-353.
- Vargas O & Pérez-Martínez LV (2014) Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica. Grupo de Restauración Ecológica. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 176p.
- Velasco-Linares P, Díaz-Martín R & Vargas O (2008) Los parches de plantas herbáceas colonizadoras de potreros y el crecimiento y supervivencia de especies heliófilas leñosas. In: Vargas O (ed.) *Estrategias para la restauración ecológica del bosque Altoandino: el caso de la Reserva Forestal Municipal de Cogua, Cundinamarca*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 372p.
- Viñas M & Jiménez V (2011) Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología* 13: 229-242
- Wagner I & Simons AM (2008) Intraspecific divergence in seed germination traits between highland low-latitude populations of the arctic-alpine annual *Koenigia islandica*. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 40: 233-239.
- Woodger EM (2009) Neotropical Melastomataceae. In: Milliken W, Klitgard B & Baracat A (eds.) *Neotropikey - interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics*. Disponible en <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Melastomataceae.htm>>. Acceso en 15 diciembre 2017.
- Zhang XH, Dai SP, Jaime A, Silva, T & Ma GH (2015) *In vitro* shoot organogenesis and plant regeneration in *Tibouchina aspera* Aubl. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 51: 482-487.