



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS

VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRISLISTOGA. 1948

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LAS PLANTAS

**EFFECTO DE LA 6-BENCILAMINOPURINA EN LA MORFO-
ANATOMÍA Y LA FISIOLÓGÍA DE BROTES DE *Tectona
grandis* L. CULTIVADOS EN SISTEMAS DE INMERSIÓN
TEMPORAL**

Tesis presentada en opción al grado científico de

Doctor en Ciencias Agrícolas

Elisa Quiala Mendoza

Santa Clara

2012

UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LAS PLANTAS

**EFFECTO DE LA 6-BENCILAMINOPURINA EN LA MORFO-
ANATOMÍA Y LA FISIOLÓGÍA DE BROTES DE *Tectona
grandis* L. CULTIVADOS EN SISTEMAS DE INMERSIÓN
TEMPORAL**

Tesis presentada en opción al grado científico de

Doctor en Ciencias Agrícolas

Autor: Ing. Elisa Quiala Mendoza, MSc.

Tutores: Inv. Aux., Lic. Raúl Barbón Rodríguez, Dr. C

Inv. Cated., Lic. María de Jesús Cañal Villanueva, Dr. C

Consultantes: Inv. Lic., Luis Valledor González, Dr. C

Inv. Cated., Lic. Roberto Rodríguez Fernández. Dr.C

Santa Clara

2012

Citación correcta Norma ISO 690

Según Sistema de Referencia Numérico

Quijala Mendoza, Elisa. Efecto de la 6-Bencilaminopurina en la morfo-anatomía y la fisiología de brotes de *Tectona grandis* L. cultivados en sistemas de inmersión temporal [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas] Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu". Instituto de Biotecnología de las plantas, 2012. 121 p.

Según Sistema de Referencia Apellido, año

Quijala Mendoza, Elisa. 2012. Efecto de la 6-Bencilaminopurina en la morfo-anatomía y la fisiología de brotes de *Tectona grandis* L. cultivados en sistemas de inmersión temporal [Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas] Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu". Instituto de Biotecnología de las plantas. 121 p.

ABREVIATURAS

2- DE: Electroforesis bidimensional

6-BAP: 6 bencilaminopurina

ABA: Ácido Abcisico

ACHC: Ácido α -ciano-hidroxidocinámico

ACN: Acetonitrilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AG: Ácido Gálico

AG₃: Ácido giberlico

AIA: Ácido indolacético

AIB: Ácido indolbutírico

AJ: Ácido jasmónico

ANA: Ácido naftalilacético

ANOVA: Análisis de varianza

APX: Ascorbato Peroxidasa

AS: Ácido salicílico

ATC: Ácido tricarboxílico

BH: Brotes hiperhídricos

BIT: Biorreactor de Inmersión Temporal

BSA: Albúmina de Suero Bóvina

DHZ: Dihidroxizeatina

DTT: Ditioneitol

EAG: Equivalente de ácido gálico

EROs: Especies Reactivas de Oxígeno

FDR: Prueba de discriminante

HPLC/MS: Cromatografía líquida de alta
resolución/Espectrometría de Masa

HR: Humedad relativa

HSP: Proteínas de respuesta a estrés térmico

IEF: Isoelectroenfoque

MALDI: Ionización de muestras asistida por
láser

MDHAR: Monodihidroascorbato reductasa

MEB: Microscopio Electrónico de Barrido

MF: Masa Fresca

Mr: Peso Molecular relativo

MS: Medio de cultivo basal propuesto por
Murashige y Skoog (1962)

NAD(P)H: Dinucleótido de nicotinamina
reducido (fosfato)

PAE: Pectina acetilsterasa

PAGE: Electroforesis en Gel de
poliacrilamida

PCA: Análisis de componentes principales

pI: Punto isoelectrico

POX: Peroxidasa

RITA: Recipiente de inmersión temporal
automatizado

SDS: Dodecil sulfato sódico

SIT: Sistema de Inmersión Temporal

SOX: Superóxido dismutasa

TFA: Ácido trifluoroacético

TOF: Tiempo de vuelo en el tubo separador
del equipo de MALDI

TRI: Recipiente de Inmersión Temporal

Z: Zeatina

ZR: Zeatina Ribósido

RECURSOS INFORMÁTICOS

EXPASY: Sistema de analisis experimental, http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html.

KEGG: Enciclopedia de Genes y Genoma de Kioto. <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.

MASCOT: Programa informatico para la busqueda de secuencias pectidos homologos en bases de datos. <http://www.matrixscience.com/home.html>

MOWSE: Algoritmo de búsqueda de secuencias de péptidos homólogos en bases de datos (Daresbury,UK), <http://www.dl.ac.uk/SEQNET/mowse.html>.

NCBI: Centro Nacional de Infomacion para la Biotecnologia (*National Center of Biotechnology Information*). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

OG: Ontología de Genes. <http://www.geneontology.org/>.

SeqKNN: Algoritmo Secuencial de Proximidad (*Sequential KNN imputation method v.101 Cram R project*). <http://cran.r-project.org/web/packages/SeqKnn/index.html>.

A lo mejor de vida:

*mi madre, mis hermanos,
mi esposo y mis amigas*

Este ha sido el capítulo más difícil de escribir de toda la tesis, cómo recoger en unas pocas páginas el agradecimiento eterno a tanta gente que me dio su cariño, su apoyo, amistad o sabiduría durante todos estos años. No obstante hay que hacerlo por lo que trataré de no olvidar a nadie, pero si así sucediera les pido que me perdonen, de todas formas un papel no puede recoger todo lo que abarca el corazón humano.

- *Agradecer a mis tutores de tesis los doctores Raúl Barbón Rodríguez, M^a de Jesús Cañal, Luis Valledor y Roberto Rodríguez por el apoyo y orientación y la confianza depositada en mí.*
- *A mis dos queridas oponentes durante la predefensa las Doctoras Maritza Escalona y Esther Diosdado, cuyos consejos y críticas fueron indispensables para mejorar la redacción, enfoque y presentación de este trabajo científico.*
- *A mis queridos profesores a todos los que he tenido durante mi larga vida como estudiante, tanto los que me enseñaron en las aulas de la universidad, como los que antes de ingresar a ella me transmitieron las primeras enseñanzas y que cuando me ven aún me abrazan con tanto cariño y de los que muchas veces nadie se acuerda, gracias a todos.*
- *Un agradecimiento especial a ti Jiménez por tus enseñanzas, por inculcarme el amor por la investigación y la ciencia, gracias por tus consejos en Oviedo, fueron vitales para aprovechar bien la estancia de investigación, gracias además por la revisión del documento y tus señalamientos.*
- *Igualmente, gracias a todos mis compañeros de trabajo y amigos que de una forma u otra me ayudaron en la revisión del documento o con valiosos y oportunos señalamientos, a Kosky, Laysín, Idalmis, Novisel, Michel, Leyanis, Ma Iliana, el Luiso.*
- *A todo el personal de investigación y producción que han seguido de cerca los avances de la tesis y que me han dado apoyo moral y ánimo para seguir, en especial a mis amigas Alex y Miladys León, Zaida, Blanquita, Maritza, Damaris, Mariana, las niñas de la biofábrica y los niños también para no dejar sin mencionar a Marlon y al gordito Davis.*
- *Igualmente a Marta y a Osmildo, gracias por la ayuda y perdónenme por lo mucho que molesté recopilando bibliografías, encarpitando, imprimiendo.*
- *A Marisol por todo el apoyo de la subdirección de investigaciones y a la dirección del IBP (Oswaldo) por facilitarme todo lo necesario para la preparación y presentación de la tesis y al personal del laboratorio de propagación masiva del IBP.*
- *A Cuquita gracias por garantizarme el tilo que me mantuvo ecuánime y serena durante todo este tiempo.*
- *Agradecer además a los que en algún momento intentaron poner obstáculos durante el camino, no los menciono ellos saben quienes son, gracias también por que esta tesis es resultado de esas dificultades, los obstáculos se convirtieron en retos que me obligaron a trabajar con más firmeza, tenacidad y a superarme a mi misma.*
- *Y llegamos a los agradecimientos especiales los cuales van dirigidos a mis queridas amigas Alina, Nayvi, Neida, la Gre, Anabel, Odalis, mi querido Rul, el Chinito, mi amigo Matos y Alberto, que sería yo sin ustedes. Gracias por compartir tantas y tantas horas de risas y desvaríos, de café y por ayudarme y estar ahí cuando mas lo he necesitado (verdad que sí Rul) y sobre todo por su amistad. La amistad engrandece, fortalece, da energía y eso es cierto sino como justificar entonces que yo haya podido llegar hasta aquí.*
- *Finalmente la escala máxima del agradecimiento: la familia. Para unos padres universitarios que sus hijos lleguen hasta aquí podría ser casi una rutina, pero para ti madre querida sé que fue un reto que*

uno de tus 9 hijos lo lograra y eso solo ha sido posible por el amor, el cariño y los valores de educación, respeto por mi misma y por los demás que me inculcaste, han sido indispensable para sobrevivir en este mundo de profesionales.

- *Gracias a mis hermanos, en especial a los que ya no están, por quererme y apoyarme durante toda mi carrera profesional y por ese orgullo especial que sienten de mi. Gracias Mile y Juancho por cuidar a la vieja durante este tiempo para que pudiera escribir sin preocupaciones la tesis, flaca sabes que te quiero como a una hermana.*
- *Y a ti mi esposo querido, muchas gracias por todo tu amor, tu apoyo, tu incondicionalidad y por ser mi sostén en todos los tiempos.*
- *Me gustaría además agradecer a todas aquellas instituciones gubernamentales que han contribuido a que se lleve a cabo esta tesis doctoral tanto en Cuba como en España. Al IBP, al CITMA y a la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo, sin cuyos fondos no hubiera sido posible esta tesis.*

A todos muchas gracias.

SÍNTESIS

La teca (*Tectona grandis* L.) se ubica entre las cinco especies maderables de mayor importancia a nivel mundial y el cultivo *in vitro* se ha convertido en el método más efectivo para la propagación clonal de individuos adultos de teca. Sin embargo durante la propagación comercial se presentan problemas con la hiperhidricidad de los brotes, lo que ha limitado la aplicación de métodos más ventajosos como los sistemas de inmersión temporal. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto del 6-BAP en la multiplicación *in vitro*, la morfo-anatomía, la fisiología y la supervivencia *ex vitro* de brotes de teca cultivados en los sistemas de inmersión temporal, así como el efecto inductor del 6-BAP en la respuesta hiperhídrica. Se estudió el efecto de tres concentraciones de 6-BAP (2,22; 4,44 y 6,66 μM) y un tratamiento control sin 6-BAP en la multiplicación de los brotes de teca y mediante la evaluación de indicadores morfológicos, anatómicos y fisiológicos se definió la concentración más adecuada. Se realizaron estudios de expresión diferencial de proteínas mediante la comparación del perfil proteómico de brotes cultivados sin 6-BAP y con 4,44 μM de 6-BAP, los cuales presentaban cambios morfológicos. Los mejores resultados en los SIT se alcanzaron con una concentración de 2,22 μM de 6-BAP, con la cual se incrementó el número de brotes (4,1 brotes/explante) sin la presencia de brotes hiperhídricos. Estas plantas presentaron una morfo-fisiología normal, con una elevada capacidad antioxidante y con mecanismos de respuesta a estrés biótico y abiótico activados desde la fase *in vitro*, que les permitió sobrevivir en un alto porcentaje (91,7%) durante la aclimatización. Se determinó que el 6-BAP en concentraciones de 4,44 y 6,66 μM induce un incremento del contenido de agua en los brotes, y desórdenes en el aparato estomático, la acumulación de sustancias antioxidantes, el desarrollo de un sistema vascular hipolignificado y una sobreacumulación de citoquininas en formas activas. Esto se correspondió con un incremento del contenido de agua en los brotes y con cambios morfológicos en la forma y color de las hojas y apariencia hiperhídrica. Se obtuvo el perfil proteómico de la hoja de teca a partir de plantas del banco de donantes y se establecieron las bases para futuros estudios de proteómica en esta especie. Mediante la identificación de proteínas expresadas diferencialmente, se pudo determinar que la respuesta hiperhídrica inducida por el 6-BAP en los brotes, estuvo asociada a una sobreacumulación de citoquininas endógenas en formas activas, que disminuyó la expresión de varias enzimas implicadas en diferentes rutas metabólicas principalmente de tipo Peroxidasa. Esto disminuyó la capacidad antioxidante de los brotes, afectó la xilogénesis, la biosíntesis de la pared celular y la lignificación; lo que constituyó la causa principal de la hiperhidricidad y de la baja capacidad adaptativa de estos brotes.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	5
2.1. EL CULTIVO DE LA TECA (<i>TECTONA GRANDIS L.</i>). ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN.....	5
2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS.....	5
2.3. IMPORTANCIA DEL CULTIVO	6
2.4. PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> VÍA ORGANOGÉNESIS DE ESPECIES FORESTALES.....	6
2.4.1. <i>Propagación in vitro</i> vía organogénesis de <i>Tectona grandis L.</i>	7
2.4.2. <i>Medios de cultivo líquidos. Automatización de la micropropagación</i>	9
2.4.3. <i>Sistemas de Inmersión Temporal</i>	10
2.5. FISIOLÓGÍA DE LAS PLANTAS CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>.....	12
2.5.1. <i>Hiperhidricidad. Descripción y antecedentes. Papel de las citoquininas</i>	15
2.6. APLICACIÓN DE LA PROTEÓMICA EN PLANTAS	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE 6-BAP EN LA MULTIPLICACIÓN, LA MORFO-ANATOMÍA Y LA FISIOLÓGÍA DE BROTES DE <i>TECTONA GRANDIS L.</i> CULTIVADOS EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL	25
3.2. CARACTERIZACIÓN MORFO-ANATÓMICA Y FISIOLÓGICA DE BROTES DE TECA (<i>TECTONA GRANDIS L.</i>) DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA HIPERHÍDRICA.....	31
3.3. PERFIL PROTEÓMICO DE LA HOJA DE TECA (<i>TECTONA GRANDIS L.</i>) E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE SE EXPRESAN DIFERENCIALMENTE EN LOS BROTES DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA HIPERHÍDRICA.....	33
3.3.1. <i>Perfil proteómico a partir de la hoja de teca (<i>Tectona grandis L.</i>)</i>	33
3.3.2. <i>Identificación de proteínas expresadas diferencialmente en los brotes de teca (<i>Tectona grandis L.</i>) durante la inducción de la respuesta hiperhídrica</i>	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE 6-BAP EN LA MULTIPLICACIÓN, LA MORFO-ANATOMÍA Y LA FISIOLÓGÍA DE BROTES DE TECA (<i>TECTONA GRANDIS L.</i>) CULTIVADOS EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL	39
4.2. CARACTERIZACIÓN MORFO-ANATÓMICA Y FISIOLÓGICA DE BROTES DE TECA (<i>TECTONA GRANDIS L.</i>) DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA HIPERHÍDRICA.....	61
4.3. PERFIL PROTEÓMICO DE LA HOJA DE <i>TECTONA GRANDIS L.</i> E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS QUE SE EXPRESAN DIFERENCIALMENTE EN LOS BROTES DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA HIPERHÍDRICA.....	74
4.3.1. <i>Perfil proteómico de la hoja de <i>Tectona grandis L.</i></i>	74

4.3.2. <i>Identificación de proteínas expresadas diferencialmente en los brotes de teca (Tectona grandis L.) durante la inducción de la respuesta hiperhídrica</i>	79
5. CONCLUSIONES	95
6. RECOMENDACIONES	97
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
8. ANEXOS	122

1. INTRODUCCIÓN

La teca (*Tectona grandis* L.) está considerada entre las cinco primeras especies maderables de mayor importancia a nivel mundial, tanto por sus cualidades de fortaleza, durabilidad, talla, belleza de su madera, como por la superficie de plantación que abarca en todo el mundo (Krishnapillay, 2000). La especie se introdujo en América Central (Panamá) en el año 1926 procedente de Colombo (Sri Lanka) y en los siguientes 20 años se naturalizó en casi todos los países de América Central y el Caribe (De Camino *et al.*, 1998).

El material de plantación de teca, se obtiene tradicionalmente por semillas y esquejes. Sin embargo, estos métodos no satisfacen la alta demanda de posturas necesarias para el mantenimiento de las plantaciones comerciales (Tiwari *et al.*, 2002). Esto ha convertido al cultivo de tejidos *in vitro* en el método más eficiente para la propagación clonal a gran escala de plantas de teca con alta uniformidad en un corto período de tiempo (Gupta *et al.*, 1980; Gyves *et al.*, 2007). En consecuencia se han descrito diversos protocolos para la propagación *in vitro* de la teca con el empleo de medios de cultivo semisólidos (Gupta *et al.*, 1980; Monteuuis *et al.*, 1998; Daquinta *et al.*, 2001; Tiwari *et al.*, 2002; Yasodha *et al.*, 2005; Gyves *et al.*, 2007). No obstante, se conoce que la propagación *in vitro* en medios de cultivo semisólidos comprende un gran número de labores, que encarece el proceso de producción. En adición a esto, el uso de agentes gelificantes contribuye significativamente a elevar los costos y limitan la posibilidad de automatización durante la propagación comercial (Ziv, 1991). La solución ha sido el empleo de los medios de cultivo líquidos, lo cual permite reducir los costos de producción y facilita la automatización durante el proceso de propagación *in vitro* (Aitken-Christie *et al.*, 1995).

Para la automatización del cultivo *in vitro* se han descrito diversos diseños (Preil, 2005), pero dentro de ellos los sistemas basados en la inmersión temporal han sido los más exitosos (Etienne y Berthouly, 2002). Este tipo de sistema además de solucionar algunas dificultades que ocasiona el empleo de medios de cultivo líquidos estáticos, como la hipoxia y la hiperhidricidad, abren la posibilidad de automatizar algunas etapas del cultivo *in vitro* (Alvard *et al.*, 1993), permiten una mayor facilidad para el escalado, al mismo tiempo que incrementan la eficiencia biológica y productiva del material vegetal propagado (Escalona *et al.*, 1999; Jiménez *et al.*, 1999). Sin embargo, el control efectivo de la hiperhidricidad podría ser una de las causas de que solo un

reducido número de especies forestales han sido propagadas exitosamente en los sistemas de inmersión temporal. Dentro de estas se destacan el *Eucalyptus sp.* (Castro y González-Olmedo, 2002; Antonio, 2003; McAlister *et al.*, 2005), *Pinus radiata* D. Don (Aitken-Christie y Jones, 1987) y *Crescentia cujete* L. (Murch *et al.*, 2004).

La hiperhidricidad es inducida por una combinación de varios factores físicos y químicos del ambiente *in vitro* (Gaspar, 1991). Aunque muchas plantas pueden adaptarse a estas condiciones ambientales, algunas de ellas se desarrollan anormales, con un aspecto traslúcido y vítreo (Debergh, 1983; Gaspar, 1991). El fenómeno ha sido considerado como un desorden morfofisiológico, teniendo en cuenta la observación en las plantas hiperhídricas de varios cambios anatómicos, fisiológicos y bioquímicos (Ziv 1991; Franck *et al.*, 2004), que pueden conducir a una pérdida irreversible de la capacidad de regeneración y multiplicación *in vitro* (Ochatt *et al.*, 2002) y que afectan la supervivencia *ex vitro* de las plantas (Hazarika, 2006). Estas alteraciones han sido vinculadas con cambios en el patrón de expresión de proteínas y con alteraciones de rutas metabólicas (Sreedhar *et al.*, 2009).

Las causas que generan la hiperhidricidad están relacionadas con varios factores del ambiente *in vitro*, como el pobre intercambio gaseoso y la alta humedad relativa en los frascos de cultivo (Majada *et al.*, 1997; Ziv, 2005), el bajo potencial osmótico de los medios de cultivos (Debergh *et al.*, 1992; Kevers *et al.*, 2004), las altas concentraciones en los mismos de iones NH_4^+ y Cl^- (Ivanova y Van Staden, 2008; Ivanova, 2009) y de reguladores del crecimiento, principalmente citoquininas (Kataeva *et al.* 1991; Moncaleán *et al.*, 2009; Ivanova y Van Staden, 2011).

Las citoquininas son esenciales para la propagación de plantas vía organogénesis, pero existen diferencias en la capacidad de cada tipo de citoquinina y su concentración para afectar la morfogénesis de los brotes (Nagori y Purohit, 2004) e inducir la aparición de desórdenes morfofisiológicos como la hiperhidricidad (Debergh, 1983; Ziv, 1991).

La 6-Bencilaminopurina (6-BAP) es la citoquinina más común empleada en la propagación de diferentes especies leñosas y se utiliza en todos los medios de cultivo descritos para la propagación *in vitro* de la teca, ya sea sola o combinada con kinetina o auxinas (Daquinta *et al.*, 2001; Gangopadhyay *et al.*, 2002; Tiwari *et al.*, 2002; Yasodha *et al.*, 2005; Gyves *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha descrito que tiene un efecto inductor en la respuesta hiperhídrica,

fundamentalmente en concentraciones elevadas (Ivanova, 2009; Moncaleán *et al.*, 2009; Ivanova y Van Staden, 2011).

Por otro lado, aunque se han realizado avances en el conocimiento de la anatomía (Yang *et al.*, 2008) y la fisiología de las plantas cultivadas en los SIT (Roels *et al.*, 2006; Cabrera, 2009; Aragón, 2010), hasta el momento no se ha descrito la fisiología de las plantas leñosas cuando son cultivadas en los SIT. Otros aspectos a investigar a nivel internacional son aquellos cambios morfo-anatómicos y fisiológicos provocados por el 6-BAP, que conllevan a una respuesta hiperhídrica en este tipo de especies, así como la definición de cuáles de estos cambios podrían ser causa o consecuencia de la hiperhidricidad.

El conocimiento de estos cambios podría contribuir a la comprensión de las respuestas fisiológicas de esta especie al cultivo *in vitro*, respuestas que en ocasiones limitan la propagación comercial, como son la alta susceptibilidad de los brotes a la hiperhidricidad y la baja frecuencia durante el enraizamiento *in vitro* y la aclimatización. Este conocimiento permitiría además optimizar las condiciones de cultivo *in vitro* y reducir los desórdenes fisiológicos, lo cual conduciría a un perfeccionamiento de los métodos de propagación *in vitro* de este cultivo.

Desde el punto de vista práctico, los estudios básicos de cambios morfo-anatómicos y fisiológicos en la etapa final de la propagación *in vitro* (crecimiento/enraizamiento), donde se relacione la influencia del tratamiento con 6-BAP empleado *in vitro* con la supervivencia *ex vitro* de los brotes, permitirán definir la concentración más adecuada de 6-BAP para la multiplicación de los brotes de teca en los SIT. Además, se podrá comprobar la necesidad de que en los protocolos actuales se desarrolle un trabajo más preciso para mejorar la calidad morfológica de las plantas al final de la fase *in vitro*, con vistas a aumentar la supervivencia durante la aclimatización.

Sobre la base de la problemática anterior se formuló como hipótesis que:

“Es posible que la 6-Bencilaminopurina induzca cambios morfo-anatómicos y fisiológicos, que afectan la calidad de los brotes de teca cultivados en los sistemas de inmersión temporal”

Y para demostrar o refutar la misma se propusieron los siguientes objetivos:

1. Determinar el efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP en la multiplicación, la morfo-anatomía y la fisiología de brotes de teca cultivados en Sistemas Inmersión Temporal y la supervivencia *ex vitro*.

2. Determinar los cambios morfo-anatómicos y fisiológicos que ocurren en los brotes de teca cultivados con 6-BAP y que conllevan a una respuesta hiperhídrica.
3. Establecer el perfil proteómico de la hoja de teca e identificar proteínas expresadas diferencialmente en los brotes cultivados en los SIT, durante la inducción de la respuesta hiperhídrica.

Novedad científica: Se describió la respuesta de los brotes de teca al incremento de la concentración de 6-BAP en los SIT, mediante la evaluación de diferentes variables morfo-anatómicas y fisiológicas, como es la caracterización de la anatomía foliar mediante microscopía electrónica de barrido y el análisis morfométrico del complejo estomático. Así como la determinación del contenido de agua, de fenoles totales, la detección de ligninas en secciones transversales del tallo, la determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos y de reguladores endógenos del crecimiento, aspectos nunca antes descritos en la literatura internacional para la teca. Los estudios de proteómica constituyen los primeros que se realizan a nivel internacional en esta especie, con los cuales se logra establecer el perfil proteómico de la hoja de teca y se identifican proteínas expresadas diferencialmente inducidas por el 6-BAP y asociadas con la respuesta hiperhídrica de los brotes.

Valor metodológico: Los estudios desarrollados constituyen un aporte al conocimiento de la morfo-anatomía y fisiología de las especies forestales, como la teca, cuando son cultivadas en los SIT. Contribuyen además, a un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares asociados al efecto inductor de las citoquininas en la respuesta hiperhídrica de los brotes propagados, a través de la evaluación y el análisis de indicadores morfo-anatómicos y fisiológicos asociados al 6-BAP. A la vez, se contribuirá al conocimiento sobre el cultivo de las especies forestales en los SIT, mediante el análisis y discusión de resultados científicos relacionados con el tema.

Valor práctico: Se logró por primera vez la multiplicación de los brotes de teca en los SIT y se estableció la concentración de 6-BAP más adecuada para la multiplicación de los brotes en estos sistemas semi-automatizados. Se logró establecer a nivel internacional las bases y procedimientos para futuros estudios de proteómica en la especie *Tectona grandis* L. Por otro lado, al seleccionar a la teca como especie modelo, los resultados y conocimientos obtenidos pueden servir de base para el empleo de los SIT en la propagación de otras especies agroforestales y leñosas.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. El cultivo de la teca (*Tectona grandis L.*). Origen y distribución

La teca (*Tectona grandis L.*) es originaria del sureste asiático (Birmania, India y Tailandia). También se ha encontrado en Java y en algunas pequeñas islas del Archipiélago Indonesio (Alfaro, 2004).

La especie se introdujo en América Central en 1926 con un envío de semillas de Colombo (Sri Lanka) al Jardín Botánico Summit de Panamá, desde el cual se exportaron semillas en los 20 años siguientes a la mayoría de los países de América Central y el Caribe (De Camino *et al.*, 1998). Actualmente esta especie se encuentra entre los 12° y 25° N. También esta presente al sur del Ecuador (Agudelo, 2002).

2.2. Clasificación taxonómica y características botánicas

La clasificación sistemática de la teca fue propuesta por Carlos Linneo en el año 1742 de la siguiente manera:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Verbenaceae*

Género: *Tectona*

Especie: *Tectona grandis L.*

La teca es un árbol maderable de hoja caduca, las mismas son elípticas y de una longitud de 30 a 60 cm (Seth y Kaul, 1978). Sus flores son numerosas y se disponen en panículas erectas terminales, el ovario es cónico con cuatro celdas y los pedicelos miden entre 0,90 y 4,5 mm de largo. La formación de frutos por la autopolinización suele ocurrir, pero su germinación es pobre comparada a la de las frutas resultantes de polinización cruzada (Weaver, 1993).

Bajo condiciones favorables alcanza un tamaño considerable y presenta un fuste cilíndrico, alto y limpio. Presenta talla y forma variables, puede alcanzar alturas de hasta 40 m, con un tronco de 1,0 a 1,5 m de diámetro y un peso de 680 kg.m⁻³ (Alfaro, 2004).

2.3. Importancia del cultivo

La teca es una de las especies maderables de mayor importancia a nivel mundial, muy atractiva por el veteado y la durabilidad de su madera, la cual se considera de primera clase y es muy apreciada para la fabricación de muebles de interior y exterior. Las cualidades físicas y mecánicas de su madera, la cual es además resistente al ataque de termitas debido a la presencia de sesquiterpenos, la ha convertido en la quinta especie maderable de mayor plantación en todo el mundo (Gyves *et al.*, 2007).

2.4. Propagación *in vitro* vía organogénesis de especies forestales

Los estudios sobre la propagación *in vitro* de especies forestales comenzó hace varias décadas y una de las principales ventajas es la capacidad potencial de desarrollar protocolos de propagación optimizados para multiplicar árboles adultos que han demostrado ser fenotípicamente superiores. En este sentido, el método de regeneración de plantas vía embriogénesis somática, ha resultado ser mas prometedor para la propagación de ginospermas, mientras que la organogénesis lo ha sido para las angiospermas (Nehra *et al.* 2005).

Los métodos de propagación *in vitro* vía organogénesis, están basados fundamentalmente en la multiplicación de brotes axilares a partir de una plántula, mediante el cultivo aséptico de un ápice o meristemo (Vasil, 1994). Esta técnica constituye una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, la composición del medio de cultivo depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de propagación *in vitro* (Castillo, 2005). Aplicada a la rama forestal, la organogénesis ha permitido la propagación de plantas de diversos géneros como: *Acacia*, *Bombax*, *Casuarina*, *Dalbergia*, *Eucalyptus*, *Ficus*, *Pinus*, *Gmelina*, *Populus*, *Platanus*, *Salix*, *Shorea*, *Tectona*, *Terminalia*, *Quercus*, *Swietenia*, *Cedrella*, *Hibiscus*, *Tabebuia*, *Castanea*, entre otros (Castillo, 2005)

La inclusión de técnicas de cultivo *in vitro* en los programas de mejoramiento genético y establecimiento de plantaciones comerciales, permite la clonación masiva de árboles élites en tiempo y espacios reducidos, conservando las características valiosas de los materiales, así como la obtención de material de propagación libre de enfermedades. Además facilita la comercialización y transporte de las plantas así propagadas a lugares y países lejanos con menores restricciones aduaneras y menores posibilidades de pérdida de materiales (Nehra *et al.*, 2005). Estas técnicas

permiten la propagación de diversas especies leñosas y proporcionan una ventaja económica importante a la industria forestal (Olmos, 2004).

Sin embargo a pesar del gran número de especies forestales propagadas por cultivo *in vitro*, se presentan problemas derivados de varios factores como: la hiperhidricidad, la oxidación fenólica, la contaminación endógena de los explantes, la necrosis apical, la disponibilidad y respuesta estacional de los explantes, el enraizamiento y la supervivencia *ex vitro* (Merkle y Nairn, 2005).

2.4.1. Propagación *in vitro* vía organogénesis de *Tectona grandis* L.

Krishnapillay (2001) señala que aunque la teca es convencionalmente reproducida a partir de semillas, la producción de propágulos por esta vía se ve frecuentemente afectada a causa del duro pericarpio de las mismas que limita su germinación en un tiempo definido. Otro de los métodos utilizado para la propagación de esta especie es a partir de estacas enraizadas en condiciones controladas (Murillo y Badilla, 2005; Palanisamy *et al.*, 2009). Sin embargo, la propagación vegetativa por esta vía presenta serias limitaciones y solo se producen pocos propágulos a partir de un individuo seleccionado (Tiwari *et al.*, 2002), por lo que el cultivo de tejidos se ha convertido en la técnica más eficiente para la propagación clonal de individuos élites (Gyves *et al.*, 2007; Jiménez-Tello, 2008; Fermio-Junior *et al.*, 2009). En consecuencia, se han descrito diversos protocolos (Tabla 1).

Tabla 1. Protocolos para la propagación vía organogénesis de *Tectona grandis* L.

Fuente de explante	Medio de cultivo	Nro. de brotes/explante	Tiempo de cultivo	Referencia
Material adulto	– MS+6-BAP (4,44 μ M) + KIN (2,32 μ M)	2	4 sem.	Gupta <i>et al.</i> (1980)
Material adulto	– MS+6-BAP (4,44 μ M) + KIN (2,32 μ M)	3,7	8 sem.	Goswami <i>et al.</i> (1999)
Material adulto	– MS+6-BAP (8,88 μ M) – MS+6-BAP (8,88 μ M)+ KIN (2,32 μ M)	4,2-4,3	4 sem.	Daquinta <i>et al.</i> (2001)
Material adulto	– MS+6-BAP (2,22 μ M)	2,5	4 sem.	Castro <i>et al.</i> (2002)
Material adulto	– MS+6-BAP (22,2 μ M) – MS+6-BAP (22,2 μ M)+ AIA (0,57 μ M)	5,63-5,67	8 sem.	Tiwari <i>et al.</i> (2002)
Material adulto	– MS+6-BAP (4,44 μ M)+ KIN (2,32 μ M)	1,95	4 sem.	Cruz y Ramos (2003)
Material adulto	– MS+6-BAP (8,88 μ M) – MS+6-BAP (8,88 μ M)+ AIB (0,98 μ M))	4,6	4 sem.	Abdelnour y Muñoz (2005)
Material adulto	–MS modificado (50% de NH ₄ NO ₃ +pectina (0,8%) + 6-BAP (6,66 μ M) + AIB (0,049 μ M) + AG ₃ (0,1 μ M).	4,0	4 sem.	Gyves <i>et al.</i> (2007)
Material	– MS+6-BAP (8,88 μ M) + AIB (4,92 μ M)	3,4	4 sem.	Akram y Aftab (2008)

juvenil				
Material adulto	– MS+6-BAP (2,22 μ M) + ANA(0,58 μ M)	4,0	8 sem.	Fermino-Junior <i>et al.</i> (2009)
Material adulto	– MS+6-BAP (4,44 μ M)	3,6	4 sem.	Jiménez-Tello (2008)

Durante la fase de multiplicación de los brotes, las citoquininas son esenciales para la formación de nuevos brotes, ya que la elongación y el incremento en la proliferación de los mismos depende de la presencia de una fuente externa de estas hormonas (Kim y Kim, 2002) y son indispensable para el cultivo de las especies leñosas (Billard y Lallana, 2005; Ríos *et al.*, 2005; Quintanilla, 2007).

En el caso de particular de la teca el 6-BAP es la citoquinina que más se utiliza, ya sea sola o combinada con kinetina o auxinas (Gupta *et al.*, 1980; Tiwari *et al.*, 2002; Gyves *et al.*, 2007). Sin embargo, concentraciones muy altas de 6-BAP y Kinetina, pueden causar la producción de una gran cantidad de brotes pequeños que generalmente no se alargan y presentan una forma inusual de sus hojas, e incluso inducir brotes hiperhídricos (BH) (Castro *et al.*, 2002; Adelnour y Muñoz, 2005; Gyves *et al.*, 2007).

Por otro lado, hasta el momento todos los protocolos de propagación *in vitro* descritos para el cultivo de la teca se basan en el empleo de medios de cultivo semisólidos. Este sistema de cultivo tiene como principal desventaja la laboriosidad del proceso, lo cual implica altos costos por mano de obra, bajos coeficientes de multiplicación en comparación con otros sistemas de regeneración y la escasa posibilidad de automatizar el proceso productivo (Ziv, 2001; Kim *et al.*, 2005; Kozai y Kubota, 2005). En adición a esto, el uso de agentes gelificantes contribuye significativamente a elevar los costos y limita la posibilidad de automatización durante la propagación comercial (Ziv, 2005). La solución en otras especies ha sido el empleo de medios de cultivo líquidos, lo cual permite reducir los costos de producción y facilita la automatización durante el proceso de propagación *in vitro* (Aitken-Christie *et al.*, 1995).

La propagación *in vitro* es una industria con un excelente futuro (Ziv, 2005), pero su incremento dependerá del desarrollo de nuevos sistemas de regeneración de plantas y técnicas para la automatización de los procesos, así como del mejoramiento de los sistemas de aclimatización de las plantas (Read, 2007).

2.4.2. Medios de cultivo líquidos. Automatización de la micropropagación

El empleo de medios de cultivo en estado líquido es un aspecto primordial en la automatización de la propagación *in vitro* y el desarrollo de técnicas para la producción de plantas a gran escala (Aitken-Christie *et al.*, 1995).

Existe una sola referencia que describe el empleo de medios de cultivo en estado líquido para el enraizamiento *in vitro* de brotes de teca. Este fue descrito por Gangopadhyay *et al.* (2002) y según estos autores más del 80% de las plantas desarrollan abundantes raíces, sin embargo es necesario utilizar algodón como soporte de los explantes para evitar la hipoxia y la hiperhidricidad, lo cual limita el empleo de esta técnica a escala comercial.

Dentro de las ventajas de los medios de cultivo en estado líquido se incluyen la facilidad de preparación, esterilización y manipulación, mayor rapidez en la absorción de sustancias nutritivas y en la difusión de sustancias tóxicas producidas por el metabolismo de las plantas (Aitken-Christie *et al.*, 1995; Takayama, 2002; Ziv, 2002; Jiménez *et al.*, 2005). Por otro lado, permiten aumentar la productividad de los operarios de cabinas de flujo laminar, debido a que los explantes sólo deben ser colocados en contacto con el medio de cultivo sin necesidad de manipularlos de forma individual (Ziv, 2005). Además, los medios de cultivo líquidos brindan grandes posibilidades para la automatización y pueden reducir los costos de producción, lo que constituye una de sus mayores ventajas (Aitken-Christie *et al.*, 1995; Preil, 2005). No obstante, el medio de cultivo líquido presenta algunas desventajas como son la hipoxia que provoca en las plantas, lo cual implica el empleo de equipos alternativos complejos, fundamentalmente en los Sistemas de Inmersión Permanente. Una de las desventajas más generalizadas es la hiperhidricidad o acumulación de agua en los espacios intercelulares, manifestada en desórdenes fisiológicos y anatómicos que afectan la supervivencia de las plantas durante el tránsito a condiciones *ex vitro* (Ziv, 1995).

La automatización ayuda a disminuir los altos costos de producción de plantas, al disminuir el trabajo manual e incrementar los ritmos de producción (Preil, 2005; Savangikar *et al.*, 2005; Ziv, 2005). A la vez, constituye la mejor solución para evitar el efecto negativo que en ocasiones provocan sobre el crecimiento de los tejidos los medios de cultivo líquidos en condiciones estáticas, tales como la hipoxia y la hiperhidricidad (Preil, 2005; Ziv, 2005).

Para la automatización del cultivo *in vitro* se han descrito diversos diseños (Preil, 2005), pero dentro de ellos los sistemas basados en la inmersión temporal (SIT) han sido los más exitosos (Berthouly y Etienne, 2005).

2.4.3. Sistemas de Inmersión Temporal

Los sistemas de inmersión temporal, además de solucionar algunas dificultades que ocasiona el empleo de medios de cultivo líquidos estáticos, como la hipoxia y la hiperhidricidad, abren la posibilidad de automatizar algunas etapas del cultivo *in vitro* (Alvard *et al.*, 1993), permiten una mayor facilidad para el escalado, al mismo tiempo que incrementan la productividad y la calidad biológica del material vegetal propagado (Escalona *et al.*, 1999; Jiménez *et al.*, 1999; Etienne y Berthouly, 2002).

Varios autores describen un aumento de la eficiencia y productividad del material vegetal propagado en los SIT, lo cual permite la obtención de elevados coeficientes de multiplicación y plantas de mayor calidad en comparación con el empleo de medios de cultivo líquidos estáticos o semisólido y la reducción de los costos de producción (Damiano *et al.*, 2005; Li-Hua *et al.*, 2005, Escalona, 2006; Pérez-Alonso *et al.*, 2009; Aragón *et al.*, 2010a; Cabrera, 2009).

Las ventajas de los SIT sobre la multiplicación tradicional en medios de cultivo semisólidos podría ser el resultado de las condiciones físicas creadas en el recipiente de cultivo, entre ellas se pueden citar:

- Con la inmersión temporal el comportamiento general de los brotes se asemeja más a las plantas *ex vitro* y una causa importante es la renovación periódica del espacio gaseoso del frasco de cultivo. Dicha renovación reduce la humedad relativa e incrementa la asimilación de agua y nutrientes (Teisson y Alvard, 1995).
- La agitación por el flujo de aire durante la fase de inmersión causa expansión de los tejidos y se facilita un mayor contacto de estos con el medio de cultivo (Teisson y Alvard, 1995).
- El contacto directo con el medio de cultivo renovado durante cada inmersión, garantiza una forma más eficiente de suministro de los nutrientes en comparación con la forma estática en que se toman los mismos en el cultivo convencional (semisólido ó líquido) (Etienne y Berthouly, 2002).

- Los tiempos de inmersión son cortos y producto de las inmersiones, los explantes quedan recubiertos por una fina película de medio de cultivo líquido, que evita la desecación sin obstaculizar la difusión de los gases (Shu-Han y Der-Ming, 2008).
- La resistencia a la difusión de gases es baja y existe una mínima ruptura del intercambio gaseoso entre los tejidos y la atmósfera, debido a que se renueva en intervalos regulares de tiempo (Ziv, 2005).
- Mayor optimización biológica por los altos coeficientes de multiplicación que se obtienen, además de una disminución importante de los costos por plantas producida, debido a la reducción del número de frascos y estantes en las cámaras de cultivo y por tanto mayor producción por metro cuadrado de cámara (Escalona *et al.*, 1999; Jiménez, 2005).
- Eliminación de la fase de enraizamiento *in vitro* y mejor respuesta de las plantas *ex vitro* por mayor metabolismo autotrófico durante la fase *in vitro* (Aragón *et al.*, 2010b).

El empleo de los SIT ha permitido la propagación *in vitro* de diferentes especies leñosas (Tabla 2), sin embargo solo un reducido número de especies forestales de los géneros *Eucaliptus*, *Pinus* y *Cresceta* han sido propagadas en estos sistemas semi-automatizados.

Tabla 2. Diferentes especies leñosas propagadas en sistemas de inmersión temporal.

Espece (nombre común)	Vía morfogenética	Tipo de Sistema de inmersión	Referencia
<i>Pinus radiata</i> D. Don	Cultivo de brotes	Sistema de doble capa con inmersión temporal	Aitken-Christie y Jones (1987)
<i>Coffea arabica</i> L.	Emb. somática	RITA®	Berthouly <i>et al.</i> (1995) Etienne <i>et al.</i> (1997a) Etienne-Barry <i>et al.</i> (1999) Albarrán <i>et al.</i> (2005) Menéndez-Yuffá <i>et al.</i> (2010)
<i>Coffea canephora</i> P.	Emb. somática	RITA®	Berthouly <i>et al.</i> (1995) Ducos <i>et al.</i> , 2003
<i>Coffea arabusta</i> L.	Emb. somática	TRI	Afreen <i>et al.</i> (2002)
<i>Citrus deliciosa</i> L.	Emb. somática	RITA®	Cabasson <i>et al.</i> (1997)
<i>Hevea brasiliensis</i> (M.A)	Emb. somática	RITA®	Etienne <i>et al.</i> (1997b)
	Cultivo de callos embriogénicos	RITA®	Martre <i>et al.</i> (2001)
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Cultivo de brotes	TRI	Zobayed <i>et al.</i> (2000)
<i>Camelia sinensis</i> L.	Embriogénesis somática	RITA®	Akula <i>et al.</i> (2001)
<i>Eucaliptus grandis</i> (Hill ex Maiden)	Cultivo de brotes	BIT®	Castro y González-Olmedo (2002) Antonio (2003)
		RITA®	McAlister <i>et al.</i> (2005)
<i>Psidium guajava</i> L. (guayaba)	Embriogénesis somática	RITA®	Vilches, 2001 Gómez-Kosky <i>et al.</i> (2005)
	Cultivo de brotes	BIT®	De Feria <i>et al.</i> (2003)
<i>Cresceta cujete</i> L.	Cultivo de brotes	RITA®	Murch <i>et al.</i> (2004)
<i>Malus domestica</i> (M26) (manzano)	Cultivo de brotes	RITA®	Welander <i>et al.</i> (2001) Zhu <i>et al.</i> (2005)

<i>Malus domestica</i>	Cultivo de brotes	BIT [®]	Damiano <i>et al.</i> (2005)
<i>Prunus sp.</i>	Cultivo de brotes	BIT [®]	Damiano <i>et al.</i> (2005)
<i>Olea europaea L. (Olivo)</i>	Cultivo de brotes	RITA [®]	Grigoriadou <i>et al.</i> (2005)
<i>Rubus idaeus L.</i>	Cultivo de brotes	RITA [®]	Castro y Mora (2007)
<i>Malus domestica</i> (M9 EMLA)	Cultivo de brotes	BIT [®]	Chakrabarty <i>et al.</i> (2007)
<i>Morinda Royoc L.</i>	Cultivo de brotes	BIT [®]	Jiménez <i>et al.</i> (2011)

TRI: Sistema de inmersión temporal de la zona radical (vitropónico). BIT[®]: Biorreactor de inmersión temporal de dos frascos. RITA: Recipiente de Inmersión Temporal

En algunos de los casos antes citados, como en los estudios realizados con eucalipto, la hiperhidricidad fue reducida a través del control de variables como la frecuencia y tiempo de inmersión (Antonio, 2003). La ventilación forzada, la composición de los medios de cultivo y el tiempo estrictamente necesario de contacto del medio de cultivo líquido con los explantes, son algunas de las variables que se pueden controlar para evitar este desorden (Etienne y Berthouly, 2002). La ventilación forzada es un aspecto que genera ventajas desde el punto de vista de calidad morfológica de las plantas (Ziv, 2005), en clavel (*Dyanthus caryophyllus L.*) por ejemplo, la aplicación de ventilación forzada permitió reducir hasta un 25% el número de BH y alcanzar altos porcentajes de supervivencia *ex vitro*.

Los estudios básicos de cambios morfo-anatómicos y fisiológicos en la etapa final de la multiplicación *in vitro* (crecimiento/elongación), donde se relacione la influencia del tratamiento *in vitro* para la multiplicación de los brotes con la supervivencia *ex vitro*, aportarán un conocimiento valioso a la micropropagación de las plantas de teca. Estos estudios, permitirán confirmar la necesidad de mejorar la calidad morfológica de las plantas en las últimas etapas *in vitro*, con vistas a aumentar la supervivencia durante la aclimatización.

2.5. Fisiología de las plantas cultivadas *in vitro*

Las características morfo-anatómicas y fisiológicas de las plantas cultivadas *in vitro* obedecen en gran medida al microambiente de los frascos de cultivos. Este resulta de la interacción de diferentes factores tales como la intensidad de la luz, la concentración de dióxido de carbono (CO₂) y la composición del medio de cultivo (Kozai *et al.*, 1995).

La presencia de sacarosa y sales minerales en los medios de cultivo, sumado a los bajos niveles de luminosidad y CO₂ en los frascos de cultivo, provocan una disminución de la capacidad fotosintética de las plantas cultivadas *in vitro*. Aunque en ocasiones estas plantas pueden parecer normales, en realidad tienen una actividad fotosintética baja (Hazarika, 2003, Aragón *et al.*, 2010a)

En los frascos de cultivos casi herméticos el poco intercambio gaseoso genera un microambiente semi-enrarecido con una reducida disponibilidad de CO₂ atmosférico, por tanto la sacarosa suministrada de manera exógena en el medio de cultivo, se convierte en la fuente primaria de suministro de carbono, lo que provoca que estas plantas no necesiten el desarrollo de un aparato fotosintético normal (Nguyen y Kozai, 2001; Zobayed, 2001).

Como resultado del ambiente *in vitro*, las plantas presentan una anatomía y fisiología diferente a las que son cultivadas en condiciones de campo o casas de cultivo (Kozai y Smith, 1995; Pospíšilová *et al.*, 1997; Majada *et al.*, 2001; Chakrabarty y Subodh, 2008). Los desórdenes afectan todos los órganos de la planta, aunque no todos tienen el mismo peso sobre el comportamiento *ex vitro*. Según Hazarika (2003) dentro de estos desórdenes se encuentran el pobre desarrollo del aparato fotosintético, de las cutículas de las hojas y la emisión de raíces no funcionales sin conexión con los haces conductores. Kevers *et al.* (2004), señalan que en comparación con plántulas de semilla cultivadas en invernadero, las plantas cultivadas *in vitro* generalmente tienen menor contenido de clorofilas y carotenoides, o de enzimas responsables de la fotosíntesis, como por ejemplo la ribulosa bifosfato carboxilasa (RuBisCo), que es una enzima clave en la fijación del CO₂ atmosférico.

Las plantas que crecen durante el cultivo *in vitro*, debido a la baja luminosidad, pueden tener afectadas la concentración de clorofilas y la eficiencia y calidad de los fotosistemas (Pospíšilová *et al.*, 1997; Hazarika, 2003), además de irregularidades en la diferenciación y la distribución de las granas y los tilacoides en los cloroplastos. Por lo tanto las plantas cuando son transferidas a mayores intensidades luminosas tienden a tener reducidos valores de fotosíntesis (Miranda y Williams, 2007). Muchos resultados sugieren que bajo condiciones *in vitro* no controladas ocurre el agotamiento del CO₂ por las plantas o la inhibición por retroalimentación negativa del ciclo de Calvin debido a los azúcares, esto produce un exceso de flujo de electrones en las membranas tilacoidales, lo cual causa fotoinhibición, fotooxidación y reduce la fotosíntesis neta (Desjardins, 1995).

Otros investigadores cambian estos factores para garantizar las reservas que son acumuladas por las plantas durante la etapa *in vitro*, para posteriormente ser utilizadas en la primera etapa de la aclimatización y llevarlas a un metabolismo más cercano al autotrófico (Kadleček *et al.*, 2001; Pospíšilová *et al.*, 2007). No sólo se realizan estudios de cambio de las condiciones ambientales en

la fase *in vitro*, también suelen variarse las condiciones en las primeras etapas de la aclimatización (Aragón *et al.*, 2010b).

Las plantas cultivadas *in vitro* en medios de cultivo semisólidos realizan escasa fotosíntesis (Pospíšilová *et al.*, 2007). Este hecho no está sólo restringido al escaso desarrollo del aparato fotosintético, sino por la alta concentración de sacarosa en el medio de cultivo. En los frascos de cultivos cerrados el CO₂ está en altas concentraciones durante la noche producto de la respiración y las variaciones en la fase lumínica dependen del tipo de planta y de las intensidades de luz a las que se cultiven (Moroni y Melai, 2005).

Para las plantas cultivadas en frascos de cultivos cerrados la mayoría del período de luminosidad transcurre con una fotosíntesis neta baja, lo que retarda el crecimiento autotrófico (Pospíšilová *et al.*, 1997). Varios estudios fisiológicos realizados en plantas cultivadas en los SIT han demostrado que este aspecto no ocurre así en los SIT, debido principalmente a la renovación del espacio gaseoso. En los SIT, las concentraciones de CO₂ recobran los valores de concentración ambiental en el momento de la inmersión, aspecto que favoreció tanto el crecimiento de las hojas, como el de las plantas de *Musa* sp. cultivadas en los SIT, en comparación con las plantas procedentes de medio de cultivo semisólido (Roels *et al.*, 2006). En este mismo cultivo, las hojas de las plantas propagadas en los SIT presentaron una morfología caracterizada por una forma alargada y estrecha, similares al de plantas adultas (Aragón, 2010). De acuerdo a este autor, las condiciones creadas por los SIT, que posibilitan el contacto de toda la superficie de la planta con el medio de cultivo líquido y que favorece una mayor disponibilidad de nutrientes, así como la renovación del espacio gaseoso, pudiera provocar estos cambios morfológicos. El ambiente ventilado en los SIT favorece el metabolismo autotrófico y disminuye la dependencia de la plantas por la sacarosa del medio de cultivo, como única fuente de carbono (Ziv, 2005; Aragón, 2010). Estudios realizados en caña de azúcar, demuestran que en comparación con el medio de cultivo semisólido los SIT, permitieron producir plantas con un metabolismo más cercano a la autotrofia y con un mejor sistema de defensa antioxidante (Aragón *et al.*, 2009). La facilidad que brindan los SIT de manipular las condiciones de cultivo, ha sido aprovechada de forma ventajosa para mejorar la calidad fisiológica de las plantas propagadas de *Anthurium andreaum* L. (González-Olmedo *et al.*, 2005a), *Eucaliptus grandis* L. (Antonio, 2003) y *Musa* sp. (Aragón, 2010), donde tratamientos con ventilación forzada o el suministrado CO₂ a los frascos de cultivos, han sido muy efectivos para lograr este objetivo. Efectos

de fortalecimiento de la cutícula, además de la posible absorción de nutrientes a través de las hojas y la renovación del espacio gaseoso de los frascos, son fenómenos descritos para la fisiología de las hojas de plátanos en los sistemas de inmersión temporal (Ziv, 2002; Escalona *et al.*, 2003).

Sin embargo, al igual que en el sistema de cultivo en medios de cultivo semisólido, las condiciones de cultivo no óptimas en los SIT pueden conducir a la formación de plantas hiperhídricas. Este tipo de plantas desarrollan un grado de desorden morfo-anatómico y fisiológico que afecta su supervivencia en condiciones ambientales cuando son directamente transferidas a condiciones de invernadero o campo (Ziv, 1991; Hazarika, 2003).

2.5.1. Hiperhidricidad. Descripción y antecedentes. Papel de las citoquininas

Las plantas cultivadas *in vitro* son sometidas a condiciones medioambientales específicas, creadas para estimular el rápido crecimiento. Sin embargo, en ocasiones estas condiciones pueden ser perjudiciales y provocar estrés: el corte de los explantes y su transferencia a medio de cultivo fresco, el bajo potencial osmótico del medio de cultivo, que favorece el movimiento rápido del agua al interior de los tejidos, el alto contenido de compuestos nitrogenados, la alta humedad relativa y la acumulación de gases tóxicos en la atmósfera interna de los frascos de cultivo, la baja intensidad luminosa, las altas concentraciones de reguladores del crecimiento, principalmente citoquininas, las cuales pueden reprimir o modificar la respuesta morfogenética de los explantes (Franck *et al.*, 2004).

Aunque muchas de las plantas pueden adaptarse a estas condiciones medioambientales, algunas de ellas se desarrollan anormales, con un aspecto traslúcido, debido a deficiencias de las clorofilas y al alto contenido de agua (Gaspar *et al.*, 1991; Ziv, 1991). Este fenómeno, fue previamente conocido como vitrificación (Debergh *et al.*, 1981) y años más tarde redefinido como hiperhidricidad (Debergh *et al.*, 1992). Es descrito como un desorden fisiológico causado por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos. Las hojas y los tallos de las plantas hiperhídricas muestran una apariencia turgente y acuosa, sus órganos se muestran translúcidos, menos verdes y se quiebran con facilidad (Ziv, 1991).

La hiperhidricidad, bajo condiciones específicas puede evolucionar hacia la pérdida de la capacidad regenerativa, está asociado a un proceso de juvenilidad (Gaspar *et al.*, 2000) e implica problemas de diferenciación de los tejidos (Kevers *et al.*, 2004). Los brotes hiperhídricos (BH) enraízan en un

porcentaje bajo, generalmente no sobreviven durante la aclimatización y cuando lo hacen con frecuencia dan lugar a plantas malformadas (Hazarika, 2003).

En general, estudios morfo-anatómicos realizados en BH de *Prunus avium* L., revelan que los tallos se observan engrosados y con los entrenudos más cortos que las plantas con apariencia normal, con hojas más finas, con frecuencia muy elongadas, arrugadas, risadas y quebradizas (Gaspar, 1991). En *Simmondsia chinensis* (Link) Schn., los BH anatómicamente se caracterizan por una hipertofia en el parénquima cortical y la médula del tallo, con grandes espacios intercelulares, así como un incremento del espacio extracelular y volumen de aire. Los vasos y traqueidas en las plantas hiperhídricas no están lignificadas apropiadamente y se ha determinado un menor contenido de ligninas en comparación con los brotes normales (Apostolo y Llorente, 2000).

En hojas hiperhídricas de *Prunus avium* L., se detectó la no existencia del tejido de empalizada o este se encontraba prácticamente reducido y el mesófilo esponjoso poseía grandes espacios intercelulares (Kevers *et al.*, 2004). En BH de *Vanilla planifolia* L., se detectaron severos daños estructurales en el domo apical y la ausencia de bandas procambiales que descendieran basipetalmente a partir del primordio de la hoja (Sreedhar *et al.*, 2009).

Los tejidos hiperhídricos en comparación con los tejidos normales, presentan diferentes características bioquímicas, algunas de ellas relacionadas con las anomalías morfológicas descritas para este tipo de brotes (Gaspar, 1991), como son:

- Menor contenido de masa seca y mayor contenido de agua, esencialmente localizada en los espacios apoplásticos.
- Menor contenido de ligninas, asociado con una baja actividad de enzimas involucradas en la polimerización de las ligninas o en la síntesis de sus precursores.
- Menos celulosa, lo cual está asociado con una baja relación C/N favorable a la síntesis de aminoácidos que de unidades de azúcar para formar celulosa.
- Elevada actividad glutamato deshidrogenasa, lo que sugiere cambios en la composición de carbohidratos para la síntesis de aminoácidos.
- Menos clorofila, lo cual pudiera ser la causa de la apariencia traslúcida y probablemente una baja capacidad fotosintética.
- Menor contenido de fenoles.

- Elevada actividad Peroxidasa, lo cual pudiera estar asociado a un incremento del catabolismo de las auxinas. El transporte polar de la auxina es aparentemente reducido.
- Menor contenido de Ca^{2+} , Mn^{2+} y Na^+ y más K^+ , al menos en clavel (*Dyanthus caryophyllus* L.)
- Reducida producción de etileno, seguido del daño oxidativo a medida que permanecen las condiciones que favorecen la hiperhidricidad.

La hiperhidricidad es un desorden multicausal y los factores que la generan están relacionados con las condiciones de cultivo *in vitro* (Debergh *et al.*, 1992, Kevers *et al.*, 2004). Por ejemplo, en *Prunus avium* L., la hiperhidricidad de los brotes puede ser inducida en cuatro semanas mediante el reemplazo del agar por el gelrite en el medio de cultivo (Franck *et al.*, 1998), de forma similar ocurre con los brotes de *Alloe pollyphyla* L. (Ivanova y Van Staden, 2011). La alta humedad relativa en los frascos de cultivo de los tratamientos con menor frecuencia de ventilación forzada, favoreció la hiperhidricidad de los brotes de clavel (*Dyanthus caryophyllus* L.) (Majada *et al.* 1997), mientras que una ventilación óptima permitió controlar este desorden en *Scrophularia yoshimurae* L. (Tsay *et al.*, 2006). En *Solanum tuberosum* L., el mayor número de BH observados en los sistemas de cultivo completamente hermético, estuvo asociado con una elevada concentración de etileno y CO_2 en los frascos de cultivo (Park *et al.*, 2004). Los reguladores del crecimiento aplicados de manera exógena al medio de cultivo, principalmente las citoquininas, constituyen uno de los principales factores que generan la hiperhidricidad (Debergh, 1983).

Las citoquininas son esenciales para la morfogénesis vía organogénesis, a partir de que están asociadas con el desarrollo del aparato fotosintético de las plantas (Argita *et al.*, 2005), estas pueden afectar de forma directa la diferenciación de los cloroplastos (Kulaeva *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2008), incrementar la actividad fotoquímica del fotosistema II (PSII) (Goltsev *et al.*, 2001) y reducir la degradación de las clorofilas (Downs *et al.*, 1997). También se ha descrito, que las citoquininas estimulan el desarrollo del sistema vascular y promueven el transporte de nutrientes (Aloni, 2001). Sin embargo, existen diferencias en la capacidad de cada tipo de citoquinina y su concentración para afectar la estabilidad de las membranas fotosintéticas (Genkov *et al.*, 1997), la eficiencia fotosintética (Goltsev *et al.*, 2001), la diferenciación de los cloroplastos y el contenido de clorofilas (Oliveira *et al.*, 2008), así como la morfogénesis de los brotes (Nagori y Purohit 2004) y la

aparición de desórdenes morfo-fisiológicos como la hiperhidricidad (Ivanova, 2009; Moncaleán *et al.*, 2009; Ivanova y Van Staden, 2011).

Castro *et al.* (2002) describen que la hiperhidricidad en la teca se manifiesta por succulencia de los tejidos de las hojas y los tallos y apariencia vidriosa de los mismos, que disminuyen la calidad de los brotes y la eficiencia del proceso de propagación *in vitro*. Asimismo refieren durante la propagación *in vitro* de este cultivo, el estudio de diferentes concentraciones de 6-BAP para la multiplicación de los brotes y destacan que el porcentaje de BH aumentó proporcionalmente con la concentración de esta citoquinina en el medio de cultivo y que el menor porcentaje de BH (5,0%) se obtuvo con 2,22 μM de 6-BAP. Otros autores como Gyves *et al.* (2007), destacan el control efectivo de la hiperhidricidad en brotes de teca, mediante la reducción de los compuestos nitrogenados del medio de cultivo, la sustitución del agar por el gelrite, la adición de pectina y el empleo de una mezcla de auxina, citoquinina y giberelina durante la multiplicación de los brotes, así como la adición de putrescina al medio de cultivo de enraizamiento, no obstante estas estrategias si bien fueron efectivas, probablemente encarecen el proceso de propagación a escala comercial. En otros cultivos como *Actinidia deliciosa* L., la exposición de los brotes a una elevada concentración de 6-BAP (44,4 μM) indujo la hiperhidricidad de los brotes (Moncaleán *et al.*, 2009), mientras que en *Alloe pollyphyla* L., concentraciones de 6-BAP superiores a 4,44 μM incrementaron significativamente el número de BH (Ivanova y Van Staden, 2011).

De acuerdo a Debergh *et al.* (1992) pueden existir varios niveles de hiperhidricidad, de manera que estos desórdenes pueden estar presente en el material vegetal, sin que exista manifestación visual en la morfología de los brotes, por lo que la apariencia vítrea sería el indicador mas distintivo de la etapa final de la hiperhidricidad, el cual generalmente coincide con un grado severo de desordenes anatómicos y fisiológicos e incluso la pérdida de la capacidad morfogenética o la activación de la muerte celular programada (Ziv, 1991).

La hiperhidricidad, al igual que la habituación, se ha considerado como parte de una progresión neoplástica, que conduce en un corto tiempo a una pérdida de la capacidad de diferenciación celular o de regeneración de plantas y a largo plazo a un cáncer o la muerte celular (Gaspar *et al.*, 2000). Se ha podido detectar una distribución anormal de ADN (aneuploidía y poliploidía), en células con una pérdida de la totipotencia organogénica, como por ejemplo en callos habituados e hiperhídricos de *Beta vulgaris* L. (Kevers *et al.*, 1999). También en regenerantes hiperhídricos de guisantes

(*Lathyrus sativus* L.) obtenidos a partir de callos, la hiperhidricidad observada fue asociada con un contenido anormal de ADN (Ochatt *et al.*, 2002). Sin embargo, estudios comparativos realizados mediante citometría de flujo en BH y brotes normales de *Prunus avium* L., no revelaron diferencias en el cariotipo (Franck *et al.*, 2004). Por lo que concluyen que la hiperhidricidad no fue consecuencia de una modificación genética, sino de una respuesta fisiológica a una condición medioambiental específica.

La teoría más aceptada acerca de la causa de la hiperhidricidad sugiere que la hipolignificación de las células hiperhídricas, debido a la alteración de la actividad de enzimas peroxidasas ácidas y de la fenilamonio liasa (PAL) pudiera disminuir la presión parietal y facilitar el contacto entre las células y el medio de cultivo, alterando el balance osmótico de la célula (Gaspar, 1991; Olmos *et al.*, 1997). El agua retenida en los espacios intercelulares (Gribble *et al.*, 1998) pudiera alcanzar niveles de saturación provocando hipoxia celular y bajo esta condición de estrés se ha demostrado existe daños oxidativo por peroxidación lipídica en los tejidos (Monk *et al.*, 1989), además algunas actividades metabólicas que pueden generar H₂O₂ en las plantas (Asada y Takahashi 1987) podrían alterarse, conduciendo a la producción de niveles tóxicos de H₂O₂ y de estrés oxidativo (Olmos *et al.* 1997). Sin embargo, resulta difícil determinar si los BH se encuentran estresados o no y cuáles de estos cambios bioquímicos son los que causan el estado hiperhídrico y cuales son consecuencia (Franck *et al.*, 2004). Además, la escasa bibliografía que refiere la existencia de estrés oxidativo en tejidos hiperhídricos está restringida principalmente a las especies de *Prunus avium* L. (Franck *et al.*, 1995, 1998; Kevers *et al.*, 2004), *Narcissus* sp. (Chen y Ziv 2001), *Dianthus caryophyllus* L. (Olmos *et al.*, 1997; Saher *et al.*, 2004) y más reciente en *Vanilla planifolia* L. (Sreedhar *et al.*, 2009). Todo esto justifica, la necesidad de otros estudios que apoyen esta teoría y más importante aún, que ayuden a dilucidar el mecanismo mediante el cual factores del ambiente *in vitro*, como las citoquininas, generan hiperhidricidad en los brotes propagados. En este sentido, la proteómica podría servir como una herramienta poderosa para el estudio de las respuestas fisiológicas de las plantas al cultivo *in vitro*, respuestas que en ocasiones limitan la propagación comercial, como es el caso de la hiperhidricidad, la baja frecuencia de enraizamiento *in vitro* y la aclimatización (Desjardins, 2007).

2.6. Aplicación de la proteómica en plantas

La proteómica y el estudio de las variaciones cualitativas y cuantitativas en los patrones de expresión de proteínas han permitido un gran avance en la identificación de proteínas y enzimas implicadas en los procesos moleculares y rutas metabólicas que se desarrollan en los organismos vegetales (Jorrín *et al.*, 2009).

Según Vela (2004), existen varias razones por las que el estudio proteómico aplicado a tejidos y organismos vegetales se ha convertido en un área de estudio en expansión en comparación con los estudios a nivel genético. Las investigaciones encaminadas a la secuenciación de genomas de especies vegetales no revelan información acerca de la cantidad y número de proteínas activas que se encuentran en los tejidos vivos. A pesar de que existe información completa y detallada del genoma de diferentes especies vegetales, el estudio de los genes ofrece poca información acerca de la función que desempeñan las proteínas que codifican o de las variaciones de la expresión y síntesis de las diferentes proteínas como respuesta a diferentes estímulos. Un inconveniente añadido es que el estudio de los genomas y los transcriptomas, por sí solo, tampoco aporta respuestas acerca de cuáles son las posibles modificaciones post-traduccionales (fosforilaciones, glicosilaciones, entre otras.), que pueden sufrir las proteínas durante el proceso de maduración hasta que son capaces de desempeñar una función determinada. Sin embargo, mediante el estudio proteómico de tejidos vegetales se pueden abordar preguntas prácticas en el campo de la biología, que permiten identificar proteínas involucradas por ejemplo en el desarrollo de fisiopatologías como la podredumbre apical del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Vela, 2004), el estudio de la resistencia a estrés (Ahsan *et al.*, 2007; Timperio *et al.*, 2008; Ndimba *et al.*, 2010; Rodríguez-Celma *et al.*, 2010; Aranjuelo *et al.*, 2011), la resistencia a patógenos (Orczyk *et al.*, 2010; Ayliffe *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011). Así como a estudios de fisiología vegetal (Mahjoub *et al.*, 2009; Sghaier-Hammami *et al.*, 2009; Agarwal *et al.*, 2010) y la morfogénesis *in vitro* (Novo *et al.*, 2009; Palama *et al.*, 2010; Weeda *et al.*, 2010; Ngara *et al.*, 2011).

Los estudios de proteómica aplicada a la biología de árboles se han incrementado de forma vertiginosa en la última década (Jorrín *et al.*, 2009; Abril *et al.*, 2011) y se han publicado varios estudios en diferentes especies del género *Populus* (Renaut *et al.*, 2004, 2005; Plomion *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2008), *Quercus* (Jorrín *et al.*, 2004; Jorge *et al.*, 2005), *Picea* (Lippert *et al.*, 2007; Cristina-Maria *et al.*, 2008; Kravchenko *et al.*, 2008; Kjellsen *et al.*, 2010), *Pinus* (Dubos *et al.*,

2003; Gion *et al.*, 2005; Valledor *et al.*, 2008; 2010), *Gmelina* (Kumar *et al.*, 2010). Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias de estudios de proteómica aplicado al cultivo de *Tectona grandis* L.

Por otro lado, relacionados con la hiperhidricidad, los estudios de proteómica realizados han tenido como objetivo determinar proteínas que se expresan diferencialmente en tejido hiperhídrico y normal y no a determinar como un factor del cultivo *in vitro* puede influir en la aparición de este fenómeno. Los resultados, señalan que los defectos anatómicos y fisiológicos, podrían ser el resultado de cambios en la síntesis de proteínas, que afectan a diferentes enzimas ligados a rutas metabólicas interconectadas con la fotosíntesis (Rubisco), la síntesis de celulosa y lignina y a procesos asociados a la producción de etileno (Kevers *et al.*, 2004). Así se han encontrado en hojas hiperhídricas niveles de proteínas inferiores a los de hojas normales y se ha detectado una proteína de 30 kD exclusiva de hojas hiperhídricas y otras dos proteínas de 30-32 kD de tipo peroxidasa asociadas a la síntesis de lignina (Kevers *et al.*, 1984; Franck *et al.*, 2004). Sin embargo, el mecanismo molecular mediante el cual diferentes factores del cultivo *in vitro* generan la hiperhidricidad, como es el caso de los reguladores del crecimiento, requiere de mayor estudio (Van Staden *et al.*, 2004).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) adscrito a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas y en el Área de Fisiología Vegetal del Dpto. de Biología, Organismos y Sistemas de la Facultad de Biología, Universidad de Oviedo (España). El trabajo se desarrolló durante el período comprendido entre Septiembre de 2008 y Diciembre de 2011.

Procedimientos generales de la investigación

Material Vegetal

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron brotes de teca multiplicados *in vitro* durante siete subcultivos, los cuales fueron establecidos a partir de plantas del banco de donantes (Fig. 1A). Para el establecimiento del banco de plantas donadoras en casa de cultivo, se utilizaron brotes epicórmicos revigorizados de árboles adultos de teca con más de 30 años de edad, del banco de semilla de la Estación de Manejo Forestal del municipio de Ranchuelo, Villa Clara (Fig. 1B). La revigorización consistió en una poda total de los árboles, a una altura de 50 cm a partir de la base.

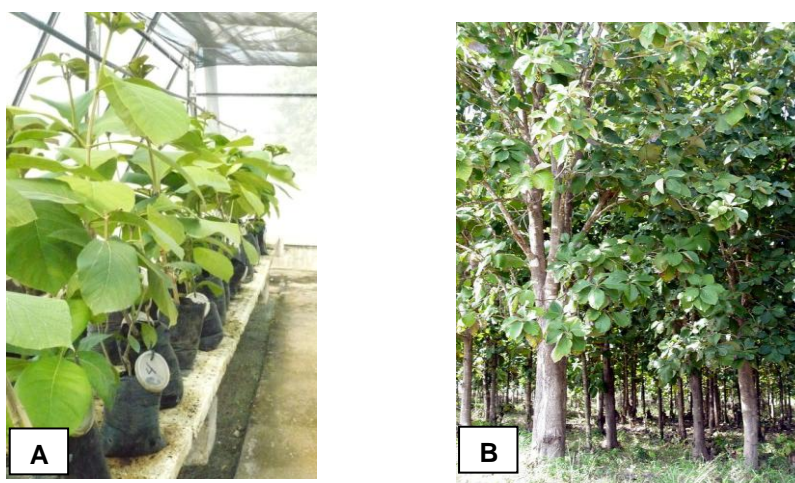


Figura 1. A) Plantas de teca en el banco de donantes establecido en casa de cultivo (IBP) a partir de árboles adultos. B) Árboles adultos de teca de la Estación de Manejo Forestal de Ranchuelo, Villa Clara.

Tratamiento fitosanitario del banco de plantas donantes

El banco de plantas donantes establecido en condiciones de casa de cultivo recibió un tratamiento fitosanitario. Se aplicó dos veces por semana el fungicida sistémico Silvacur Combi CE30 (1,0 ml.L⁻¹) combinado con Mancozeb PH80 a una concentración de 5,0 g.L⁻¹. Para el control de

cóccidos y áfidos se aplicó el insecticida sistémico Tamarón CS60 (2,0 ml.L⁻¹) una vez por semana (Jiménez-Tello, 2008).

Establecimiento y multiplicación de los brotes en medios de cultivo semisólidos

El establecimiento y la multiplicación *in vitro* de los brotes en medios de cultivo semisólidos se realizó según la metodología descrita por Jiménez-Tello (2008).

Para el establecimiento *in vitro* se utilizaron brotes axilares con un tamaño entre 2,0 - 3,0 cm de longitud, estos fueron obtenidos 10 días posteriores a la revigorización de las plantas del banco donante. La revigorización consistió, en la poda del brote apical y de las ramas laterales. Durante la desinfección los brotes fueron lavados con una solución de detergente líquido comercial (5,0 mL⁻¹), posteriormente se realizaron dos lavados con agua corriente. Se procedió a la inmersión de los brotes en etanol al 70% (v/v) y transcurrido 30 segundos se retiró el etanol mediante el lavado con agua desionizada estéril. Los brotes fueron tratados con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2,0% con 0,2 mL de Tween-80 durante 10 minutos y agitación constante a 110 rpm en agitador orbital. Posteriormente se realizaron en la cabina de flujo laminar tres lavados con una solución estéril de ácido cítrico (500 mg.L⁻¹) y se eliminaron las zonas dañadas por el NaClO. Los brotes se colocaron en tubos de ensayos (180 x 21mm) que contenían 10 ml de medio de cultivo de establecimiento en estado semisólido. Se empleó un medio de cultivo compuesto por el 100% de las sales inorgánicas MS, suplementado con 1,0 mg.L⁻¹ de tiamina; 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol; 20 g.L⁻¹ de sacarosa, 2,0 g.L⁻¹ de Gelrite (Duchefa Biochemie, NL) y 4,44 μM de 6-BAP (Jiménez-Tello, 2008).

A las cuatro semanas los brotes establecidos fueron multiplicados en un medio de cultivo en estado semisólido, el cual estuvo compuesto por el 100% de las sales inorgánicas MS; 1,0 mg.L⁻¹ de tiamina; 4,44 μM de 6-BAP; 100 mg.L⁻¹ de mio-inositol; 20 g.L⁻¹ de sacarosa y 3,0 g.L⁻¹ de Gelrite (Duchefa Biochemie, NL). Se colocaron ocho explantes por frasco de cultivo de 250 ml de capacidad, en los cuales se dosificó 25 ml de medio de cultivo.

El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5,8 con NaOH 0,5 mol.L⁻¹. La esterilización de los medios de cultivo se realizó en autoclave a 121°C y 1,1 kg.cm⁻² de presión durante un tiempo de 20 minutos.

Multiplicación de los brotes en los Sistemas de Inmersión Temporal

Diseño del sistema de inmersión temporal (SIT)

El concepto y la operación de los SIT empleados en los experimentos se fundamenta en un diseño de dos frascos, descrito por Escalona *et al.* (1999). Este diseño emplea un frasco como reservorio de medio de cultivo y otro como frasco de cultivo del material vegetal. Ambos frascos se conectaron entre sí mediante una manguera de silicona insertada en la tapa de cada recipiente, la cual desciende hasta el fondo y permite el intercambio del medio de cultivo. El sistema comprende además, una conexión a través de filtros hidrofóbicos de 0,2 μm que garantiza la esterilidad del aire de entrada, cuya presión se controla por un manómetro. La frecuencia y tiempo de inmersión se regularon por un temporizador, el cual controla dos electroválvulas de tres vías que permiten la circulación del aire y por consiguiente del medio de cultivo de un frasco a otro.

Se emplearon frascos de cristal de 2 L de volumen total (Fig. 2), mientras que las condiciones de cultivo fueron similares a las descritas por Chávez, (2007). En los frascos, se distribuyó, en uno de ellos 500 mL de medio de cultivo de multiplicación. En el otro frasco, se colocaron esferas de vidrio como soporte para los explantes y se inocularon 10 explantes (ápices con dos pares de hojas completamente expandidas) por cada SIT. La frecuencia y tiempo de inmersión fue de 40 segundos cada 8h.



Figura 2. Sistema de inmersión temporal que se utilizó para la multiplicación de los brotes de teca (*Tectona grandis* L.).

Condiciones generales de cultivo

El cultivo del material vegetal se desarrolló en cámaras de cultivo a $25\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e iluminación artificial mediante lámparas blancas fluorescentes, que proporcionaron una intensidad de flujo de fotones fotosintéticos de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. El fotoperíodo correspondió a 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad.

Procesamiento estadístico de los datos

Para el análisis estadístico de los datos experimentales se utilizaron los programas SigmaStat versión 3,0 y SPSS versión 15,0 para Windows y para la elaboración de ficheros de datos y gráficos se utilizó el programa EXCEL del paquete Microsoft Office 2007. Se aplicaron las pruebas de Kolmogorov-Smirnov ($p \leq 0,05$) y Levene ($p \leq 0,05$) para comprobar si los datos cumplían con lo supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. En cada experimento se detallan las pruebas estadísticas que se realizaron.

3.1. Efecto de la concentración de 6-BAP en la multiplicación, la morfo-anatomía y la fisiología de brotes de *Tectona grandis* L. cultivados en sistemas de inmersión temporal

El objetivo de este experimento fue determinar el efecto que tiene la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo, en la multiplicación, la morfo-anatomía y la fisiología de los brotes de teca. Como material vegetal se emplearon brotes de teca, procedentes de medio de cultivo semisólido de multiplicación descrito en los procedimientos generales. Un explante se definió como un ápice con dos pares de hojas completamente expandidas. Se estudiaron tres concentraciones de 6-BAP (2,22; 4,44 y 6,66 μM) y un tratamiento control sin regulador del crecimiento.

Este experimento contó con seis repeticiones por cada tratamiento, de ellas se seleccionaron al azar tres repeticiones para las evaluaciones de indicadores morfo-anatómicos y fisiológicos de los brotes.

Evaluación de indicadores morfológicos

Los brotes de los diferentes tratamientos con 6-BAP y del control se colectaron de los SIT después de cuatro semanas de cultivo. Se tomaron 30 brotes de cada tratamiento en cada una de las tres repeticiones, para un total de 90 brotes por tratamiento y se determinó: el número de brotes totales por explante, el número de brotes hiperhídricos (BH) por explante, la longitud de los brotes (cm) por brote, el número de nudos y de hojas por brote, así como el número de plantas con raíces por SIT, el cual se expresó en porcentaje. Se consideró como BH, aquellos que presentaron hojas en forma de cintas y una apariencia traslúcida y cristalina de sus hojas y tallos.

Los datos experimentales de las diferentes variables fueron analizados estadísticamente mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Determinación de la masa fresca, la masa seca y el contenido de agua

Los brotes procedentes de las diferentes concentraciones de 6-BAP y del control, se colectaron de los SIT, se enjuagaron con agua destilada y se secaron con papel de filtro. Se determinó su masa fresca, posteriormente se colocaron en una estufa a una temperatura de 60 °C durante 72 h, una vez que el peso se mantuvo constante, se determinó su masa seca y se calculó el contenido de agua (CA). Para el cálculo del contenido de agua (%), se utilizó la siguiente fórmula descrita por Bandyopadhyay *et al.* (2004):

$$CA (\%) = \frac{(MF - MS)}{MF} \times 100$$

Los datos relativos al contenido de agua fueron transformados utilizando ecuación matemática $x^l = 2 \arccos(x/100)^{0.5}$ y analizados estadísticamente mediante un ANOVA de clasificación simple y para determinar el grado de significación entre las medias se empleó la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Caracterización de la anatomía foliar mediante microscopía electrónica

La caracterización de la anatomía foliar se realizó mediante la observación de la superficie abaxial con énfasis en el complejo estomático. Se tomó el segundo par de hojas completamente expandida del brote principal inicialmente inoculado en los SIT con diferentes concentraciones de 6-BAP. Se utilizó además un tratamiento control en condiciones *in vivo*, con el objetivo de comprobar la semejanza o diferencia morfológica de los estomas de las plantas cultivadas en los SIT con una planta en condiciones *ex vitro*. Este control, consistió en plántulas de semillas, con 30 días después de la germinación en invernadero, en condiciones semicontroladas de HR (70%) y $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ de temperatura. Las muestras fueron colectadas y preparadas el mismo día y hora (8:00 AM). Para la toma de las muestras en los SIT, se realizó una inmersión y transcurrido 15 minutos se tomaron las muestras. Se utilizó el procedimiento descrito por Robinson *et al.* (1987) y modificado por Majada *et al.* (1997), para la fijación, preparación y deshidratación de las muestras para su observación de las mismas al microscopio electrónico de barrido (MEB).

Fijación y deshidratación de las muestras: Las hojas de los brotes *in vitro* y de las plantas de invernadero se seccionaron en fragmentos de 1cm. Estos fragmentos foliares se sometieron a un proceso de fijación con glutaraldehído (3%) y buffer fosfato (0,1M) pH 7,2 durante 16 h. Posteriormente se procedió a la deshidratación en una serie de soluciones de etanol en

concentraciones crecientes. Finalmente se tomó un fragmento de la zona media de 10 hojas de cada tratamiento descrito en el acápite 3.1 y se colocaron en acetona (100%).

Deshidratación mediante “Punto crítico”: Los fragmentos foliares se colocaron en la cámara del equipo de punto crítico (Blazers CDP030) y se mantuvieron en acetona (100%) durante 20 minutos. Durante este proceso la acetona fue sustituida por CO₂ líquido y la temperatura de la cámara se mantuvo a 37°C. Posteriormente las muestras se expusieron al vacío en atmósfera de Argón por 90 segundos a 22 mA (Equipo Blazers SCD 004) y recubiertas con oro. Para la observación y la fotomicrografía de la superficie foliar se utilizó un microscopio electrónico de barrido Jeol (JSM 6100) a 15 -20 Kv.

El análisis morfométrico se realizó mediante un programa informático para el procesamiento de imágenes (Image Pro Plus[®] versión 4.5.0.29 para Windows). Se determinó el área de la hoja (n=20). Para cada fotomicrografía se determinó la densidad estomática (número de estomas por mm², n=25), el largo y ancho del estoma (n=25), las dimensiones del poro estomático (n=25), así como el área del estoma y del poro estomático (n= 25). El largo del estoma se refirió a la longitud de las células oclusivas medido desde los extremos y el ancho a la distancia transversal entre ellas, medido desde el borde exterior (Fig. 3).

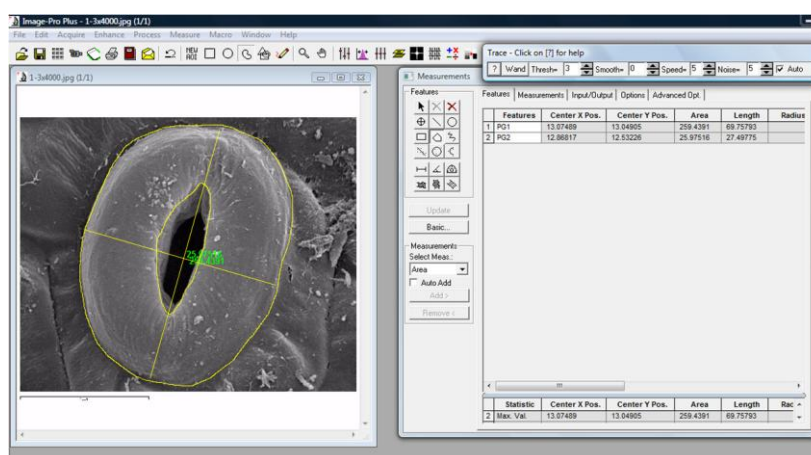


Figura 3. Imagen de un estoma de teca procesado mediante el programa informático Image Pro Plus[®] versión 4.5.0.29 para Windows, utilizado para el análisis morfométrico.

Para el análisis estadístico de los datos se aplicó un ANOVA de clasificación simple y para determinar el grado de significación entre las medias se empleó la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y detección de ligninas en secciones del tallo de los brotes

Se procedió a la cuantificación del contenido de compuestos fenólicos en los brotes completos (excluyendo el callo basal) y a la detección de ligninas en secciones transversales del tallo del brote principal. Para la cuantificación del contenido de fenoles totales, las muestras se homogenizaron con nitrógeno líquido y se deshidrataron mediante liofilización. Por cada tratamiento se tomaron tres muestras liofilizadas, cada una conformada por 75 mg de material vegetal deshidratado. La obtención de los extractos se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Kirca y Arslan (2008) y modificado por Santamaría *et al.* (2010). La extracción de los fenoles totales se realizó en metanol (100%) y el contenido se cuantificó de acuerdo al método de Folin–Ciocalteu descrito por Spanos y Wrolstad (1990). Se determinó la absorbancia de la solución con un espectrofotómetro UV/VIS (Beckman Coulter DU1800) a 765 nm.

El contenido de fenoles totales se calculó con el empleo de una curva patrón de Ácido gálico (AG), de un rango de linealidad de 100–2000 mg.L⁻¹ ($R^2 = 0,9954$). Los resultados son la media de nueve análisis, expresados como miligramos equivalentes de Ácido gálico (AG) por gramos de masa seca (mg EAG.gMS⁻¹).

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un ANOVA de clasificación simple y para determinar el grado de significación entre las medias se empleó la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Para la detección de ligninas se utilizó la porción de tallo comprendida entre el segundo y el tercer par de hojas del brote principal. Se realizaron secciones transversales de 15 μm , con el empleo de un micrótopo de rotación (MOD 1130/Biocut) a -20 °C. Con el objetivo de revelar la presencia de ligninas en las células vasculares, las secciones transversales de tallo se tiñeron, mediante la técnica conocida como reacción de Wiesner, la cual utiliza como agente de tinción el floroglucinol-HCL. Las muestras se trataron con una solución de floroglucinol-HCL al 1% durante 10 min e inmediatamente después se observaron al microscopio óptico (Nikon Eclipse E600).

Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos

Para las determinaciones del contenido de los pigmentos fotosintéticos se cuantificaron la clorofila a, clorofila b y carotenoides. En cada repetición (3 repeticiones) se tomaron tres muestras de 100 mg de masa fresca, a partir de hojas de cada tratamiento con 6-BAP y del tratamiento control, a cada muestra se le realizaron tres determinaciones (n=27). Los pigmentos fotosintéticos se

extrajeron siguiendo el protocolo descrito por Porra (2002). La medición de las concentraciones se realizó en un espectrofotómetro UV/VIS (Beckman Coulter DU1800), a 663,6 nm (clorofila a), 646,6 nm (clorofila b) y 470 (carotenoides). Para calcular el contenido de las diferentes clorofilas se emplearon las siguientes fórmulas:

Clorofila a: $12,25 (A_{663,6}) - 2,55 (A_{646,6})$

Clorofila b: $20,31 (A_{646,6}) - 4,91 (A_{663,6})$

Clorofilas totales: $17,76 (A_{646,6}) + 7,34 (A_{663,6})$

Para calcular el contenido de carotenoides se aplicó la siguiente fórmula (Lichtenthaler y Wellburn, 1983):

Carotenoides: $(1000 \times A_{470} - 3,27x [Cl a] - 104 \times [Cl b]) / 227$

En cada caso los resultados se expresaron en mg.g de masa fresca. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un ANOVA de clasificación simple y para determinar el grado de significación entre las medias se empleó la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Determinación del contenido endógeno de reguladores del crecimiento

Se cuantificó el contenido de Zeatina (Z), Zeatina Ribósido (ZR), Dihidrozeatina (DHZ), Ácido indolacético (AIA), Ácido abscísico (ABA), Ácido Jasmónico (AJ) y Ácido salicílico (AS) en los brotes cultivados en los SIT con 6-BAP y del control. Se utilizaron brotes completos (tallo y hoja). La extracción de los reguladores del crecimiento se realizó a partir de 0,5 g de masa fresca de hojas de cada tratamiento, con una solución de metanol/agua (80:20 v/v) a una temperatura de -20 °C de acuerdo al protocolo descrito por Albacete *et al.* (2008).

Los extractos se filtraron a través de una columna Sep-Pak Plus $\dagger C_{18}$. Cartridge (Sep-pak Plus, Waters, USA) para eliminar los lípidos y pigmentos que pudieran interferir en la cuantificación, e inmediatamente después se evaporaron a 40°C y en condiciones de vacío en un rotavapor Laborata 4000-efficient (Heidolph) hasta que los solventes fueron eliminados. El residuo obtenido se disolvió en 1 ml de metanol/agua (20:80 v/v) con el empleo de un baño de ultrasonidos, posteriormente se filtró a través de filtros Millex de 13mm de diámetro con membrana de nylon de un tamaño de poro de 0,22 μm (Millipore, Bedford, MA, USA). El filtrado se recogió en tubos Eppendorf y se ajustó el volumen a 1,5 ml con la misma solución.

El análisis y cuantificación de los reguladores del crecimiento se realizó en un sistema HPLC/MS que consistió en un HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

equipado con una placa de micropocillos de automuestreo con control de temperatura y una bomba capilar conectada a un trampa del espectrómetro de masas Agilent Ion XCT Plus (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) y un electroaspirador con interfase. Las soluciones control de concentraciones conocidas de cada fitohormona (0,01; 0,05; 0,1 y 0,5 μg) se prepararon con una mezcla de extracción metanol/agua (80:20 v/v) y se filtraron con filtros de 0,22 μm . Posteriormente se aplicó 10 μl de cada estándar o muestra en una columna de HPLC Supelco Discovery C18 (5 μm , 100 x 2,1 mm, Supelco, Pennsylvania, USA) a temperatura de 40°C y un flujo de 0,1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Para la separación cromatográfica se empleó una fase móvil A (99,5:0,5 agua/ácido acético) y una fase móvil B (98,5:1:0,5 metanol/acetona/ácido acético). Antes de cada análisis se equilibró la columna con una composición de la fase móvil B (20%) durante 20 min. La elución consistió en 20% de la fase móvil B durante 5 min, un gradiente lineal de 20 a 70% de la fase móvil B durante 5 min, un gradiente lineal de 70 a 100% de la fase móvil B durante 5 min y finalmente se mantuvo a 100% de la fase móvil B por 10 min. El espectrómetro de masas funcionó en modo positivo con un voltaje de movimiento capilar de 3500 V y una velocidad de escaneo de 26000(m/z)/sec desde 50-400 m/z. La presión del gas nebulizador (He) fue de 30 psi, mientras que el gas de secado se aplicó con un flujo de 8 L. min^{-1} a una temperatura de 350°C. Se fragmentó el cromatograma de cada fitohormona tanto para estándares como para cada muestra y se cuantificó el área de cada pico con el empleo del programa DataAnalysis para LC/MSD Trap versión 3.2 (Bruker Daltonik, GmbH, Alemania). Los datos de cada pico de los estándares se utilizaron para el cálculo de la concentración de los reguladores del crecimiento para cada muestra.

Se analizaron un total de seis determinaciones para cada tratamiento. Los datos se transformaron con la ecuación $x^1 = (x+0,5)^{0,5}$ y posteriormente analizados estadísticamente mediante un ANOVA de clasificación simple, para determinar el grado de significación entre las medias se empleó la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Evaluación de la supervivencia de las plantas en la fase de aclimatización

Los brotes fueron cosechados de los SIT y transferidos a condiciones de invernadero siguiendo el procedimiento descrito por Chávez (2007).

Previo a la plantación en sustrato los brotes fueron separados del medio de cultivo, lavados con agua destilada, individualizados e inmersos en una solución de AIB (492,1 μM) durante dos minutos. Posteriormente fueron sembrados según su tratamiento en bolsas de polietileno negro (5

cm x 10 cm), las cuales contenían un sustrato compuesto por cachaza: zeolita (4:1), la composición del sustrato se muestra en el Anexo 1. Una vez plantados, los brotes fueron colocados en condiciones de casa de cultivo, a una temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa del 70% e intensidad luminosa reducida al 50%, para lo cual se utilizó una malla de sombreo. Se utilizó un sistema de riego automatizado por microaspersión para evitar los daños por desecación. La frecuencia de riego fue de 2 min. de duración cada 20 minutos durante las dos primeras semanas de cultivo, a partir de la tercera semana la frecuencia se incrementó a 40 min.

Se tomaron 30 brotes por tratamiento en cada repetición, el experimento fue repetido tres veces y los datos obtenidos fueron el resultado de la evaluación de 90 plantas por cada tratamiento.

A las cuatro semanas se evaluó el número de plantas vivas y se calculó el porcentaje de supervivencia. Los datos fueron transformados utilizando ecuación matemática $x^l = 2 \arccos(x/100)^{0.5}$ y analizados estadísticamente mediante un ANOVA de clasificación simple, para determinar el grado de significación entre las medias se empleó la prueba de Tukey.

3.2. Caracterización morfo-anatómica y fisiológica de brotes de teca (*Tectona grandis* L.) durante la inducción de la respuesta hiperhídrica

Este experimento tuvo como objetivo caracterizar los cambios morfológicos, anatómicos y fisiológicos que ocurren en los brotes de teca durante el cambio hacia un estado hiperhídrico.

Se utilizó como material vegetal de inóculo, brotes procedentes de medios de cultivo de multiplicación en estado semisólido, los cuales fueron inoculados en los SIT en un medio con 4,44 μM de 6-BAP y en un tratamiento control sin 6-BAP. La densidad de inóculo, volumen de medio de cultivo, así como la frecuencia y tiempo de inmersión en los SIT y las condiciones de cultivo, fueron iguales a las descritas en el acápite 3.1. Se emplearon seis SIT por cada tratamiento.

A las cuatro semanas de cultivo los brotes se colectaron de los SIT y se clasificaron según su morfología y la presencia de síntomas visibles de hiperhidricidad. Las características morfológicas que se analizaron fueron la forma de la hoja, el color e intensidad del color de las hojas y las características de las nervaduras. Para determinar el color se utilizó el código hexadecimal de colores (<http://www.cwp.linnet.edu/cwis/cwp.html>). La clasificación permitió separar cuatro tipos de brotes con una morfología diferente. Para el tratamiento con 6-BAP, se escogió la concentración de 4,44 μM , porque solo en ella se podían observar los brotes con diferencias morfológicas bien definidas (Fig. 4), las cuales se describen a continuación:

Brotos control: Brote con hojas en forma aovada, de color verde oscuro (código: 006400) y nervaduras normales, con presencia de raíces y senescencia de las hojas basales.

Brotos Tipo 1: Brotos con presencia de callo en la base, con hojas en forma aovada, de color verde (código: 008000) y nervaduras normales.

Brotos Tipo 2: Brotos con abundante callo en la base, con hojas en forma lanceolada y bordes encorvados, de color verde claro (código: 90EE90) y nervaduras de color blanco.

Brotos Tipo 3: Brotos con abundante callo en la base, con hojas quebradizas en forma de cinta y bordes encorvados y rizados, con apariencia traslúcida y nervaduras engrosadas.



Figura 4. Brotos de teca clasificados según su morfología, a las cuatro semanas de cultivo en los SIT. Leyenda: **Control**, brotes cultivados sin 6-BAP. **Tipo 1, Tipo 2, Tipo 3**, brotes cultivados con $4,44 \mu\text{M}$ de 6-BAP.

Una vez clasificados los brotes se determinó los siguientes indicadores anatómicos y fisiológicos:

- Contenido de agua (%).
- Anatomía foliar mediante microscopía electrónica
- Contenido de compuestos fenólicos totales y la detección de ligninas en secciones transversales del tallo.
- Contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, clorofila b y carotenoides)
- Contenido endógeno de reguladores del crecimiento (Z, ZR, DHZ, AIA, ABA, AJ y AS).

Para cada uno de los indicadores antes mencionados se utilizaron los mismos métodos y procedimientos del acápite 3.1.

Se analizaron un total de seis determinaciones para cada tipo de brote. Los datos se transformaron con la ecuación $x^1 = (x+0,5)^{0,5}$ y se analizaron mediante un ANOVA de clasificación simple, para determinar el grado de significación entre las medias se empleó la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.3. Perfil proteómico de la hoja de teca (*Tectona grandis* L.) e identificación de proteínas que se expresan diferencialmente en los brotes durante la inducción de la respuesta hiperhídrica

3.3.1. Perfil proteómico a partir de la hoja de teca (*Tectona grandis* L.)

Teniendo en cuenta que no existían antecedentes de estudios de proteómica en teca fue necesario describir primeramente el perfil proteómico de la hoja de teca para establecer condiciones y procedimientos, como paso previo a los estudios de expresión diferencial de proteínas.

Material vegetal y preparación de las muestras: Se utilizaron plantas del banco de donantes (3 plantas) de dos años después de establecidas en invernadero. Para la preparación de los extractos proteicos se utilizaron 250 mg de hojas frescas, las cuales se colocaron directamente en nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización. Se obtuvieron cuatro réplicas analíticas por cada planta (12 réplicas en total).

Extracción de las proteínas y cuantificación del contenido total de proteínas: Las proteínas fueron extraídas utilizando un método clásico de extracción con ácido tricloroacético y acetona de acuerdo al procedimiento descrito por Valledor *et al.* (2008), con una modificación consistente en el incremento de la concentración del ditioneitol (DTT) a 0,21% (p/v) en todos los pasos de aislamiento y lavado, para evitar la alta concentración de compuestos fenólicos y la oxidación inicial de las proteínas.

El material vegetal se maceró con nitrógeno líquido en un mortero. La mezcla se homogenizó en frío con 1,5 mL de tampón de extracción. El tampón de extracción consistió en ácido tricloroacético al 10% (p/v) y Ditioneitol (DTT) al 0,21% (p/v) en acetona (100%). La concentración de las proteínas se determinó según el método Bradford (1976) a 595 nm, se utilizó un lector de placas Elisa (Biorad). El contenido de proteínas se expresó en $\mu\text{g.mgMF}^{-1}$ referidos a una curva patrón de albúmina de suero bovino (SIGMA).

Isoelectroenfoque (IEF): Una vez precipitadas las proteínas, estas fueron resuspendidas en 450 μl de solución de rehidratación compuesta por Urea 8M, CHAPS (2% p/v), DTT (8 mM), anfolitos (0,5% v/v) y azul de bromofenol (0,0001% p/v). Para la corrida electroforética en la primera dimensión, las muestras con un contenido de 600 μl de proteínas, se colocaron en contacto con tiras de IEF (ImmobilineTM DryStrip, GE Healthcare) de 24 cm, con un gradiente lineal inmovilizado de pH 3–11. La rehidratación de las tiras con las muestras de proteínas ocurrió de manera pasiva durante toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente las tiras cargadas con las proteínas se

colocaron en un equipo para IEF (Ettan IPGphor 3) y se expusieron a una serie de diferentes voltajes hasta alcanzar los 85000 voltios x hora, para favorecer la migración de las proteínas, hasta que alcanzaron su punto isoeléctrico (pI). Durante el IEF, la intensidad de la corriente se limita a 50 μA con la finalidad de evitar el sobrecalentamiento de las muestras y la degradación de las proteínas. Finalizado el IEF, las tiras fueron reducidas y alquiladas con un tampón de equilibrado I (TE-I) y un tampón de equilibrado II (TE-II) durante 15 min en cada uno de los tampones. El TE-I estuvo compuesto por Tris-HCL pH 8,8 (50 mM), urea (6M), Glicerol (30% p/v), SDS (2% (p/v) y DTT (2% p/v); mientras que el TE-II estuvo compuesto por Tris-HCL pH 8,8 (50 mM), urea (6M), Glicerol (30% p/v), SDS (2% p/v), Iodoacetamida (135 mM). Una vez reducidas y alquiladas las tiras se procedió a su colocación sobre los geles para la corrida en segunda dimensión (2-DE).

Electroforesis bidimensional: La electroforesis bidimensional (2-DE) se realizó en geles de poliacrilamida (12% p/v) con un tamaño de 24 cm. La polimerización se realizó en una cámara electroforética (Ettan™ DALTsix gel caster, GE Healthcare) durante seis horas. Finalizada la polimerización se colocaron las tiras de IEF en contacto con los geles de acrilamida. En el extremo de cada tira de IEF se incorporó 5 μl de proteínas marcadoras de masa molecular conocida para la determinación del pI y la masa molecular (Mr) de las especies proteicas de los geles. La electroforesis vertical se realizó en cubeta (Ettan™ DALTsix, GE Healthcare) con un tampón de electroforesis. Se programó una potencia de corriente inicial de 35 V durante 30 minutos y posteriormente se elevó a 70V hasta finalizada la corrida electroforética.

Tinción de los geles con azul de Coomassie: Para la tinción de los geles, se procedió según el protocolo de tinción con azul de Coomassie coloidal brillante (G-250) descrito por Mathesius *et al.* (2001). Los geles estuvieron en contacto con el colorante durante 20 h y posteriormente se procedió al lavado de los geles durante tres minutos con una solución tampón compuesta por Tris- H_3PO_4 (0,1 M) pH 6,5. Posteriormente, los geles se lavaron durante un minuto con metanol (25% v/v) y seguidamente se sumergieron en una solución de Sulfato de amonio al 20% (p/v) durante seis horas. El procedimiento de teñido y lavado se repitió tres veces, hasta la visualización de los puntos en los geles.

Digitalización y análisis de imágenes de los geles bidimensionales: Los geles después del proceso de tinción descrito anteriormente, se escanearon con el empleo de un densitómetro calibrado GS-800 (Bio-Rad). Las imágenes de alta resolución generadas se analizaron mediante el

programa informático PDQuest Advanced versión 8.01 (Bio-Rad). Como criterio de detección de los puntos en el gel (presencia/ausencia) se estableció un mínimo de 10 capas sobre el fondo. Con el objetivo de incrementar la fiabilidad del análisis automático, se comprobó el emparejado o correspondencia de cada punto. Se realizó la normalización (punto individual/factor de normalización) de los volúmenes de los puntos para cada gel, basado en la cantidad total de los puntos válidos, los cuales fueron utilizados para el cálculo estadístico de los niveles de expresión de las proteínas.

Determinación del punto isoelectrico (pI) y la masa molecular (Mr) de las proteínas: Para la determinación del pI y Mr se utiliza el programa PDQuest Advanced, el cual asigna un valor de pI y Mr a cada uno de los puntos que componen la imagen digital de cada uno de los geles. La asignación de estos valores la realiza de acuerdo a la información introducida. El programa toma como referencia el Mr de cada una de las seis proteínas del marcador de peso molecular utilizado (*SDS Molecular weight standards*, Broad range, Bio-Rad) (Mr: 66,2; 45; 31; 21,5 y 14,4). Para la asignación de valores de pI experimental se empleó una escala lineal de 11 valores sobre el largo total de las tiras (pI=3; pI=6; pI=6,5; pI=6,8; pI=7,1; pI=7,5; pI=7,8; pI=8; pI=8,2; pI=9,6; pI=11). La asignación del pI a los 11 pixeles del gel se realizó teniendo en cuenta el rango lineal de pH 3-11 de las tiras de IEF utilizadas, además que las diferentes unidades de pI se distribuyen de modo equidistante dentro de la tira de IEF y que los puntos con pI= 3 y pI= 11 se encuentran en cada uno de los extremos. La cuantificación de las proteínas en los puntos se realizó con una curva de calibración. Los volúmenes de los puntos fueron lineales a la cantidad de proteína dentro de un rango de 30 a 3600 ng ($Y=85,192; r^2=0,9982$).

Recuperación de las proteínas de los geles y digestión de las proteínas con tripsina: Los puntos de los geles (fragmentos de gel teñido) fueron recuperados de forma individualizada recortando una fracción de 1 mm² del gel teñido, la operación de corte se realizó de manera precisa evitando tomar gel no teñido o de otro punto adyacente.

Para la identificación de proteínas mediante técnicas de espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF) se siguió el protocolo de digestión de gel con tripsina y extracción de los péptidos descritos por Shevchenko (2001).

Los fragmentos de gel de interés se destiñeron mediante dos lavados a 37°C de temperatura por 30 minutos con 100 µl de bicarbonato de amonio (200 mM) en 40% (v/v) de acetonitrilo (ACN) y

luego expuestos a tres ciclos de deshidratación/rehidratación con ACN puro y 25 mM de bicarbonato de amonio, respectivamente y finalmente se secaron a temperatura ambiente por 10 min. A los fragmentos de gel se le añadió 20 μL de tripsina (12,5 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de tripsina en 25 mM bicarbonato de amonio) y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Los péptidos fueron extraídos de los fragmentos de gel mediante la adición de 30 μL de ACN (50–90%) y ácido trifluoroacético (TFA) al 1%, posteriormente se secaron y purificaron con columnas C-18 (ZipTip, Millipore, Bedford MA, USA). Los péptidos se depositaron en la placa MALDI mediante el método de la gota seca (ProMS, Genomic Solutions) y una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (ACHC) (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en ACN (70%) y TFA (0,1%).

Adquisición del espectro de masas mediante MALDI-TOF-TOF: Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas 4700 Proteomics Analyser MALDI-TOF-TOF (Applied Biosystems), en un rango de 800–4000 m/z, con un voltaje de aceleración de 20 kV, en modo reflectron (*reflectron-delayed extration mode*). Los espectros fueron internamente calibrados con péptidos resultantes de la autólisis de la tripsina. Los tres iones más abundantes fueron entonces expuestos a un análisis de espectrometría en *tandem* (SM/SM).

Identificación de proteínas: Para el análisis de la huella de los péptidos resultantes de la espectrometría de masas (MALDI-TOF-TOF) se utilizó un sistema basado en la búsqueda de la huella péptida de proteínas no redundantes de las bases de datos del NCBI (*National Center of Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para lo cual se empleó el software GPS ExplorerTM 3.5 (Applied Biosystems) más la búsqueda mediante el programa informático MASCOT (<http://www.matrixscience.com/home.html>). El programa MASCOT utiliza el algoritmo de búsqueda denominado MOWSE (Daresbury, UK) (<http://www.dl.ac.uk/SEQNET/mowse.html>), para la comparación de los listados de masas de péptidos medidos con MALDI-TOF-TOF, con las masas de péptidos de digestiones teóricas de proteínas recogidas en bases de datos. Las búsquedas en las bases de datos se llevaron a cabo mediante las últimas versiones de las bases de datos NCBI y SwissProt. El programa genera una lista priorizada de las proteínas que presentan una mayor probabilidad de corresponderse con la identidad de las proteínas analizadas. En la primera posición de la lista aparece la proteína contenida en la base de datos que presenta una mayor similitud (homología) con la proteína analizada. Se permitieron los siguientes parámetros: taxonomía restringida a *Viridiplantae*, en la espectrometría una tolerancia de masas de 100 ppm y

0,5 Da para los datos SM/SM, la carbamidometilación de la cisteína como modificación fija y la oxidación de la metionina como modificación variable. La confianza en el análisis de la huella péptida se basó en el valor asignado por el algoritmo MOWSE y del nivel de exactitud de los péptidos cotejado con el pico más alto del espectro de masas. El número de acceso a la base de datos de cada proteína fue referenciado de acuerdo al SWISS-Prot o el NCBI, mientras que la M_r (kDa) y pI experimental de las proteínas homólogas fueron calculadas mediante la herramienta disponible en Expasy (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). El término de la función molecular y las rutas metabólicas se determinaron de acuerdo a la base de datos de la Enciclopedia de Genes y Genoma de Kyoto (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Cuando no existió información disponible en la base de datos del KEGG se realizó la búsqueda para cada proteína en la base de datos de la Ontología de Genes (OG) (<http://www.geneontology.org/>).

Análisis estadístico: El procesamiento de los datos se realizó acorde a las indicaciones descritas por Valledor *et al.* (2010). Los valores perdidos de intensidad de los puntos fueron imputados con el empleo de un algoritmo secuencial de proximidad SeqKNN (*sequential K-Nearest Neighbor algorithm*) según Kim y Yi, (2008). Los valores de intensidad fueron normalizados a la intensidad total de cada muestra y entonces transformados mediante una función matemática (Log) para reducir la variabilidad. Se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, se aplicó un análisis de varianza simple (ANOVA, $p \leq 0,05$) y los puntos con los menores p-valor fueron seleccionados para su identificación. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete SPSS versión 13.1 para Windows.

3.3.2. Identificación de proteínas expresadas diferencialmente en los brotes de teca (*Tectona grandis* L.) durante la inducción de la respuesta hiperhídrica

Los brotes acorde a su estado de clasificación morfo-fisiológico fueron expuestos al mismo procedimiento descrito en el acápite 3.2.1, para la obtención de los perfiles proteómicos. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta la extracción de las proteínas. Se obtuvieron tres réplicas analíticas por cada estado morfo-fisiológico (12 réplicas en total).

Con el objetivo de identificar proteínas expresadas diferencialmente por efecto del 6-BAP y que pudieran estar asociadas con la respuesta hiperhídrica, los perfiles que se obtuvieron se compararon con el perfil proteómico de los brotes cultivados sin 6-BAP.

Análisis estadístico de los datos: Los puntos diferenciales se definieron después de aplicar un análisis de varianza simple (ANOVA, $p \leq 0,05$) y pruebas de eliminación de falsos positivos (FDR, $p \leq 0,05$). Se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) para reducir la dimensionalidad de los datos y clasificar las proteínas. Para el análisis estadístico se utilizó el programa R versión 2.12 empleando su función `central` y los paquetes `gplots`, `qvalues`, y `SeqKNN`. Los puntos diferenciales definidos a partir de las pruebas de ANOVA, FDR y el PCA fueron seleccionados para su identificación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de la concentración de 6-BAP en la multiplicación, la morfo-anatomía y la fisiología de brotes de teca (*Tectona grandis* L.) cultivados en sistemas de inmersión temporal

En los diferentes tratamientos con 6-BAP se observó una mayor multiplicación de brotes con respecto a los brotes cultivados en los SIT sin la presencia de citoquinina. El número de brotes se incrementó proporcionalmente con la concentración de 6-BAP. El mayor número de brotes (10,3 brotes/explante) se obtuvo en el tratamiento con 6,66 μM de 6-BAP, con diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos, sin embargo también se alcanzó el mayor número de BH (4,6 BH/por explante). Aunque en los tratamientos con 6-BAP, el menor número de brotes se alcanzó con la concentración de 2,22 μM (4,1 brotes/explante), este fue superior al control sin 6-BAP (1,30 brotes/explante), sin la presencia de BH (Tabla 3) (Fig. 5).

Tabla 3. Efecto de la concentración de 6-BAP en la multiplicación de los brotes de teca a las cuatro semanas de cultivo en los sistemas de inmersión temporal.

Indicadores morfológicos	Concentración de 6-BAP (μM)							
	0		2,22		4,44		6,66	
	Media	RM	Media	RM	Media	RM	Media	RM
Número de brotes/explante	1,30	15,50d	4,10	45,50c	7,70	70,50b	10,30	91,50a
Número de BH/explante	0,00	0,00d	0,00	0,00d	2,60	55,50b	4,20	75,50a
Longitud de los brotes/ brote (cm)	6,75	70,30bc	8,80	90,50a	7,25	77,50b	5,80	50,40d
Porcentaje de plantas con raíces/SIT	100	24,40a	50	10,60b	20	3,00c	0,00	0,00d
Número de nudos/brote	5,8	25,50a	6,1	30,50a	6,0	28,40a	5,4	22,50a
Número de hojas/brote	11,0	34,50a	11,8	38,40a	11,2	35,50a	10,8	32,40a

Leyenda: **RM:** Rangos medios, **BH:** Brotes hiperhídricos. Rangos medios con letras distintas en una misma fila difieren según prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para $p \leq 0,05$ ($n=90$).

En el tratamiento sin 6-BAP, el 100% de las plantas emitieron raíces, este porcentaje disminuyó significativamente a medida que se incrementó la concentración de la citoquinina en el medio de cultivo, la rizogénesis se inhibió totalmente en el tratamiento con 6,66 μM de 6-BAP.

En cuanto a las variables número de nudos y número de hojas por explante, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.



Figura 5. Sistema de inmersión temporal con brotes de teca (*Tectona grandis* L.), cultivados durante cuatro semanas de cultivo con $2,22 \mu\text{M}$ de 6-BAP.

Al igual que en el tratamiento control (Fig. 6A), las hojas de los brotes de teca cultivados con $2,22 \mu\text{M}$ de 6-BAP presentaron hojas bien expandidas, con forma ovada y una coloración verde oscuro (Fig. 6B). Esta morfología de las hojas es muy similar a las hojas de plantas de invernadero o campo.

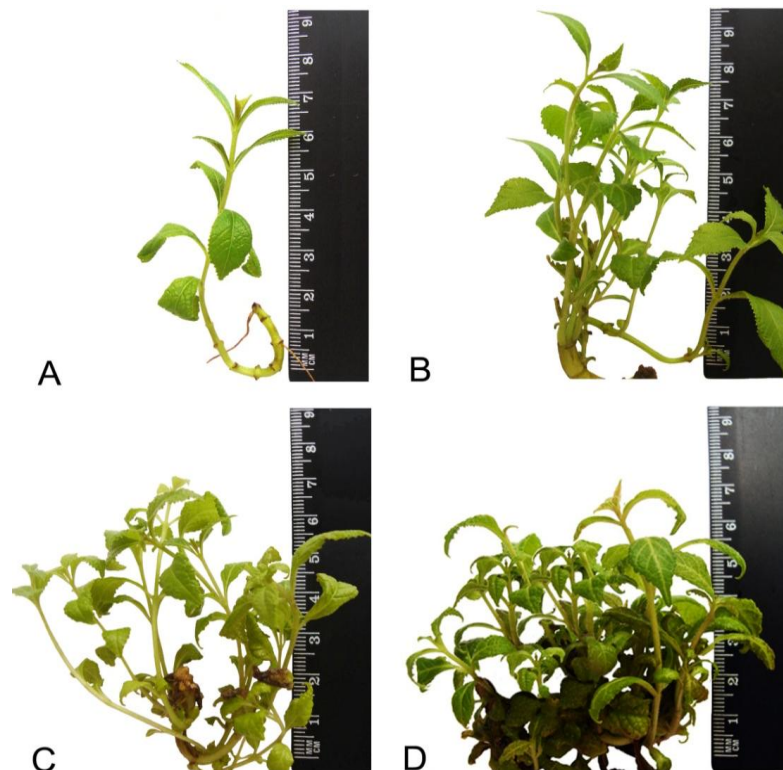


Figura 6. Brotes de *Tectona grandis* L. obtenidos en los SIT con diferentes concentraciones de 6-BAP a las cuatro semanas de cultivo. A) brote cultivado sin 6-BAP. B) con $2,22 \mu\text{M}$ de 6-BAP. C) con $4,44 \mu\text{M}$ de 6-BAP. D) con $6,66 \mu\text{M}$ de 6-BAP.

En el tratamiento con 4,44 μM de 6-BAP las hojas se observaron en su mayoría de un color verde, las hojas menos expandidas, con los bordes y el extremo encorvados (Fig. 6C). En el tratamiento con 6,66 μM de 6-BAP, se observaron brotes con la presencia de hojas lanceoladas, con las hojas más jóvenes en forma de cinta, rizadas y con los bordes encorvados (Fig. 6D) y brotes con apariencia vítrea.

Según Toro (2003) a bajas concentraciones de citoquininas, como el 6-BAP, sólo el brote principal crece, mientras que las yemas axilares permanecen inhibidas, pero concentraciones de 0,6 mg.l^{-1} o superiores logran la brotación de las yemas en los explantes cultivados. Sin embargo, concentraciones elevadas de citoquininas pueden provocar la presencia de brotes pequeños que no se alargan y de brotes hiperhídricos (Ziv, 2005).

El 6-BAP es la citoquinina más empleada para la propagación *in vitro* vía organogénesis de especies leñosas (Cruz y Ramos, 2003; Billard y Lallana, 2005; Ríos *et al.*, 2005; Quintanilla, 2007) como la teca, ya sea sola o combinada con kinetina o auxinas (Gangopadhyay *et al.*, 2002; Tiwari *et al.*, 2002; Yasodha *et al.*, 2005).

Para la propagación de la teca Goswami *et al.* (1999) propusieron un protocolo con el empleo de medio de cultivo MS en estado semisólido, suplementado con 6-BAP y kinetina (4,44 y 0,52 μM , respectivamente), con el cual obtuvieron un promedio de 3,7 brotes/por explante en ocho semanas de cultivo, después de un subcultivo en medio de elongación. Sin embargo similar número de brotes (4,1 brotes/explante) se alcanzó en los SIT con el empleo de 2,22 μM de 6-BAP, en solo cuatro semanas de cultivo.

Aunque el 6-BAP estimuló la proliferación de brotes de teca en los SIT, el número de BH se incrementó proporcionalmente con la concentración de esta citoquinina. Los SIT mejoran la nutrición y la asimilación de nutrientes por toda la superficie de los explantes (Etienne y Berthuly, 2002; Aragón, 2010), sin embargo esto pudo ser una desventaja cuando se utilizaron concentraciones de 6-BAP superiores a 2,22 μM de 6-BAP en los brotes de teca, ya que favoreció la formación de BH, probablemente por una mayor asimilación de compuestos como el NH_4^+ , Cl^- y citoquinina, los cuales son inductores de hiperhidricidad (Debergh, 1992; Moncaleán *et al.*, 2009; Ivanova y Van Staden, 2011). Sin embargo, con bajas concentraciones (2,22 μM de 6-BAP) se logró aprovechar las ventajas del medio de cultivo líquido y se obtuvo una proliferación de brotes (4,1 brotes/explante) superior al control, sin la formación de BH.

La presencia de BH durante el cultivo *in vitro* de la teca también ha sido señalado por otros autores como Gyves *et al.* (2007). Estos autores refieren que la hiperhidricidad pudo ser controlada mediante la reducción al 50% el contenido de amonio en el medio de cultivo, la adición de pectina, el empleo de agar como gelificante y una combinación determinada de citoquinina, auxina y giberelina. Aunque con esta estrategia resolvieron el problema de la hiperhidricidad, esto probablemente contribuyó al incremento de los costos de producción. De acuerdo a Castro *et al.* (2002) la hiperhidricidad disminuye la calidad de los brotes de teca y la eficiencia del proceso de propagación *in vitro* de esta especie. Estos autores refieren que el porcentaje de BH aumentó en la misma medida en que se incrementó la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo y que con 2,22 μM de 6-BAP lograron la mayor proliferación de brotes (2,5 brotes/explante) con el menor porcentaje de BH (5,0%). Sin embargo, en los SIT se logra aprovechar las ventajas del medio de cultivo líquido y con igual concentración de 6-BAP se obtiene una proliferación de brotes mayor (4,1 brotes/explante) sin la formación de BH.

Los resultados obtenidos en este experimento coinciden con los descritos durante el cultivo en SIT de la especie leñosa *Malus domestica* L. (Zhu *et al.*, 2005). Estos autores refieren que durante el estudio de diferentes concentraciones de 6-BAP (1,11; 4,44 y 8,88 μM) el número de BH se incrementó proporcionalmente con la concentración y destacan que los mejores resultados se alcanzaron al combinar 4,44 μM de 6-BAP con 0,5 μM de IBA durante la fase de multiplicación y disminuyendo la concentración a 1,11 μM de 6-BAP y 0,25 μM de IBA durante la elongación de los brotes.

Las condiciones de cultivo en los SIT estimularon la multiplicación de los brotes de teca, independientemente de la concentración de 6-BAP. En la última década diferentes estudios confirman que con el empleo de los SIT es posible lograr un incremento en la proliferación de los brotes y el crecimiento de las plantas en diferentes cultivos como *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden (Castro y González-Olmedo, 2002), *Cresceta cujete* L. (Murch *et al.*, 2004), *Cymbopogon citratus* Stapf (Quiala *et al.*, 2006), *Ananas comosus* L (Escalona *et al.*, 2003), *Alocasia amazónica* L. (Jo *et al.*, 2008); *Digitalis purpurea* L. (Pérez-Alonso *et al.*, 2009); *Saccharum officinarum* L. (Aragón *et al.*, 2009), *Discorea alata* L. (Cabrera, 2009, 2011), *Musa* sp. (Aragón *et al.*, 2010b), *Camptotheca acuminata* L. (Sankar-Thomas y Lieberei, 2011), *Discorea forii* Prain et Burk (Yan *et al.*, 2011), entre otros.

En esta forma de cultivo se conjugan factores que permiten un contacto intermitente del medio de cultivo con el material vegetal, lo cual posibilita un aporte eficiente de elementos nutritivos y una renovación periódica de la atmósfera interna del frasco de cultivo, lo cual evita la acumulación de gases tóxicos como el etileno (Berthouly y Etienne, 2005; Escalona, 2006, Aragón *et al.*, 2010). Estudios realizados durante el cultivo en SIT de *Eucalyptus* sp. y *Musa* sp. confirman que en los SIT es posible luego de finalizada cada inmersión, lograr una concentración de dióxido de carbono (CO₂) y oxígeno (O₂) similares a la concentración atmosférica y eliminar la acumulación de etileno del espacio gaseoso del frasco de cultivo (Zobayed, 2005; Roels *et al.*, 2006).

El uso de los SIT con un medio de cultivo sin 6-BAP favoreció el enraizamiento de las plantas de teca. Este aspecto pudiera estar relacionado, en primer lugar por la ausencia de citoquinina en el medio de cultivo, lo cual pudiera haber provocado que el balance endógeno auxina/citoquinina fuera favorable a las auxinas, permitiendo la rizogénesis (Barceló *et al.*, 2006). El enraizamiento es una de las fases más difíciles durante la propagación *in vitro* de las especies leñosas y debido a la baja eficiencia durante esta fase, las especies forestales y en particular la teca, generalmente son enraizadas *ex vitro* (Tiwari *et al.*, 2002). Al respecto, Fermino-Junior *et al.* (2011) señalan que en la mayoría de los laboratorios comerciales dedicados a la propagación de la teca en países como Indonesia, el enraizamiento se realiza *ex vitro*, debido a la baja frecuencia de enraizamiento de esta especie, lo cual alarga el proceso de aclimatización. De Klerk, (2002) señala que con frecuencia, el enraizamiento *in vitro* es preferible, ya que las plantas tienen mejor desarrollo y responden mejor durante la aclimatización, debido a que se ha inducido en ellas la capacidad para formar raíces.

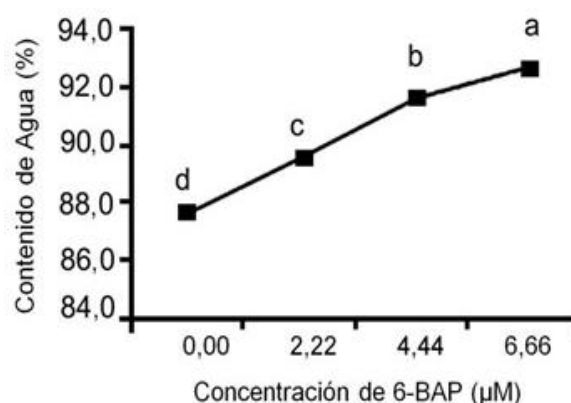
El incremento de la concentración de 6-BAP afectó la rizogénesis, la cual fue nula en la concentración más elevada (6,66µM). Las citoquininas son necesarias para mantener el crecimiento y desarrollo de los brotes, pero son reguladores que a altas concentraciones inhiben el crecimiento de las raíces (Werner *et al.*, 2003).

A partir de los resultados obtenidos se logró definir la concentración de 2,22 µM de 6-BAP como la más adecuada para la multiplicación de los brotes de teca en los SIT, teniendo en cuenta que con esta concentración, se logra alcanzar un número de brotes (4,1 brotes/explante) superior al control sin 6-BAP (1,3 brotes/explante) y similar al descrito por Jiménez-Tello (2008) para el cultivo de la teca en medios de cultivo semisólidos (3,6 brotes/explante), pero con la mitad de la concentración de 6-BAP descrita por este autor y sin la presencia de BH.

Determinación del contenido de agua

El incremento de la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo, provocó un aumento proporcional del contenido de agua en los brotes, los mayores valores se determinaron en el tratamiento con 6,66 μM de 6-BAP (Fig. 7).

Estos resultados coinciden con los descritos por Ivanova *et al.* (2006), quienes al estudiar el efecto del incremento de la concentración de 6-BAP (0, 5 y 15 μM) en la multiplicación de brotes de *Aloe polyphylla* L., determinaron que la hiperhidricidad se incrementó proporcionalmente con la concentración de 6-BAP, lo que coincidió con una mayor acumulación de citoquininas endógenas.



Media general	89,9
Error típico de la media	$\pm 0,98$

Figura 7. Efecto de la concentración de 6-BAP en el contenido de agua de los brotes de *Tectona grandis* L, obtenidos en los SIT, a las cuatro semanas de cultivo. Medias con letras distintas indican diferencias significativas (ANOVA simple; Tukey; $p \leq 0,05$). Para el tratamiento estadístico, los datos fueron transformados de acuerdo con $x' = 2 \arccos(x/100)^{0,5}$. Los datos que se presentan en la figura son no transformados, (n=90).

Moncaleán *et al.* (2009) describen resultados similares durante el cultivo de brotes de *Actinidia deliciosa* L. en sistemas ventilados con medio de cultivo líquido, donde determinaron que el incremento de la concentración de 6-BAP disminuyó la calidad de los brotes, al incrementar significativamente el contenido de agua en los mismos. Estos autores destacan que aunque tanto la concentración, como el tiempo de exposición a la citoquinina, influyeron significativamente en el contenido de agua, este último factor tuvo mayor influencia, a partir de que el mayor tiempo de exposición a concentraciones más altas indujo una sobreacumulación de citoquininas endógenas en formas activas, lo que coincidió con el mayor contenido de agua en los brotes.

La hiperhidricidad ocurre generalmente durante la fase de multiplicación de los brotes y ha sido correlacionada, entre otros factores, con las altas concentraciones de citoquininas durante el

cultivo *in vitro* (Debergh, 1983; Kataeva *et al.*, 1991). En los SIT durante la inmersión tiene lugar la toma de los nutrientes por toda la superficie de la planta, lo cual mejora la nutrición (Teisson y Alvard, 1995) y estimula una mayor cantidad de áreas de crecimiento (Etienne y Berthouly, 2002; Preil, 2005). Esta ventaja de los SIT fue beneficiosa para el cultivo de los brotes de teca cuando se empleó una baja concentración de 6-BAP (2,22 μM), ya que estimuló la formación de brotes de buena calidad morfo-fisiológica. Sin embargo, no fue beneficioso para los brotes de teca cultivados con concentraciones superiores de 6-BAP (4,44 y 6,66 μM). El contacto directo del medio de cultivo con toda la superficie del explante, sumado al bajo potencial osmótico del medio de cultivo líquido y a la alta concentración de citoquinina, podría haber favorecido una mayor absorción por parte de los explantes, del agua, el 6-BAP y otros componentes del medio de cultivo como el NH_4^+ , los cuales tal como se ha descrito por otros autores favorecen la hiperhidricidad (Debergh, 1983; Hazarika, 2006; Ivanova, 2009). Se desconoce el mecanismo mediante el cual las citoquininas favorecen la acumulación de agua en los tejidos vegetales, pero estudios de microscopía electrónica de transmisión realizados en plantas cultivadas *in vitro* de *Triticum sp.* (Criado *et al.*, 2009) demostraron que en comparación con el control sin citoquinina, el 6-BAP provocó un incremento del tamaño de los cloroplastos por agrandamiento del estroma debido a la formación de gránulos de almidón de mayor tamaño. Esto podría incrementar el potencial mátrico de las células y por tanto su capacidad para tomar agua, lo que pudiera ser una de las causas del incremento proporcional del contenido de agua en los brotes de teca.

Caracterización de la anatomía foliar mediante microscopía electrónica

La caracterización mediante MEB de la superficie abaxial de las hojas de los brotes de teca, demostró que la concentración de 6-BAP influyó en la anatomía foliar. En cuanto al área de la hoja, se observaron incrementos significativos con respecto al control sin 6-BAP, solo cuando se utilizó la concentración más baja de 6-BAP (2,22 μM). Lo contrario ocurrió con la densidad estomática, esta se incrementó significativamente en la concentración más alta de 6-BAP (6,66 μM) (Tabla 4).

El análisis morfométrico del complejo estomático demostró que el incremento de la concentración de 6-BAP estuvo acompañado por un aumento tanto del tamaño de los estomas, como de las dimensiones del poro estomático. En comparación con el control, el largo de los estomas se

incrementó proporcionalmente con la concentración de 6-BAP. El ancho y el área de los estomas también aumentó en los tratamientos con 6-BAP, aunque no se observaron diferencias significativas entre el control y el tratamiento con 2,22 μM de 6-BAP. En el tratamiento con 6,66 μM de 6-BAP el ancho de los estomas (26,14 μm) fue casi igual al largo (26,94 μm), lo cual indica que los estomas en este tratamiento, están muy abiertos y adoptan forma de anillos.

De forma similar ocurrió con el largo y ancho del poro estomático, los valores de estas variables se incrementaron significativamente con respecto al control, cuando la concentración de 6-BAP fue superior a 2,22 μM de 6-BAP. En cuanto al área del poro estomático, se pudo determinar que éste se incrementó proporcionalmente con la concentración de 6-BAP, los incrementos fueron aproximadamente el doble entre una concentración y otra, por lo que el aumento de la concentración de 6-BAP en el medio de cultivo al parecer provoca la presencia de estomas más abierto.

Tabla 4. Análisis morfométrico de la superficie de la hoja de brotes de *Tectona grandis* L., cultivados con diferentes concentraciones de 6-BAP a las cuatro semanas de cultivo en los sistemas de inmersión temporal.

Variables morfométricas	Concentración de 6-BAP (μM)			
	0,00	2,22	4,44	6,66
** Área de la hoja (cm^2)	2,34 \pm 0,42 b	2,94 \pm 0,22 a	2,57 \pm 0,13 b	2,31 \pm 0,44 b
*** Densidad estomática (mm^2)	608 \pm 6,36 b	600 \pm 7,01b	618 \pm 6,92 b	647 \pm 5,44 a
*** Largo del estoma (μm)	13,47 \pm 1,56 d	18,25 \pm 1,20 c	22,18 \pm 1,46 b	26,94 \pm 1,61a
*** Ancho del estoma (μm)	10,88 \pm 1,72 c	14,04 \pm 1,33 bc	18,03 \pm 1,00 b	26,14 \pm 2,31a
*** Área del estoma (μm^2)	134,4 \pm 4,74 c	213,70 \pm 5,06 bc	290,82 \pm 3,87 b	486,83 \pm 4,43 a
*** Largo del poro (μm)	6,61 \pm 1,41 d	9,67 \pm 1,32 c	11,91 \pm 1,37 b	15,46 \pm 1,21a
*** Ancho del poro (μm)	1,46 \pm 0,12 c	3,56 \pm 0,17 bc	5,62 \pm 0,25 b	14,00 \pm 0,46 a
*** Área del poro (μm^2)	8,12 \pm 0,50d	21,63 \pm 1,01c	49,66 \pm 1,90 b	91,01 \pm 2,80 a

Medias con letras distintas en una misma fila difieren estadísticamente para cada indicador (ANOVA simple; Tukey; $p \leq 0.05$. Los valores representan la media \pm error estándar (**n=20, ***n=25).

La observación al microscopio electrónico de la superficie abaxial de las hojas mostró que el incremento de la concentración de 6-BAP provocó cambios en la morfología de los estomas. En los brotes cultivados sin 6-BAP los estomas tenían forma elíptica y se encontraban casi cerrados y hundidos en el parénquima de la hoja (Figs. 8A y 8B). Los estomas de los brotes cultivados con