

**Instituto Tecnológico de Costa Rica  
Sede San Carlos**

**Escuela de Agronomía**

**Vicerrectoría de Investigación y Extensión**

**Caracterización de *Quassia amara* para su manejo sostenible  
en ecosistemas naturales y agroforestales en Costa Rica**

**Código:  
5402 – 2151 – 6201**

**Investigadores Responsables**

**M.Sc. Sergio Torres P.**

**Investigadores Participantes**

**Omar Gätjens Boniche  
Wayner A Montero Carmona**

**Agosto 2008**

## ÍNDICE

Contenido	Página
<b>DOCUMENTO I</b>	
<b>Resumen</b>	
<b>Lista de cuadros</b>	
<b>Lista de figuras</b>	
1. <b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. <b>Objetivo General</b>	<b>2</b>
1.2. <b>Objetivos Específicos</b>	<b>2</b>
2. <b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1. <b>Usos</b>	<b>3</b>
2.2. <b>Composición química</b>	<b>4</b>
2.3. <b>Marcadores moleculares</b>	<b>4</b>
2.4. <b>Micropropagación de <i>Quassia amara</i></b>	<b>5</b>
3. <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>7</b>
3.1.1 <b>Caracterización molecular de <i>Quassia amara</i></b>	<b>7</b>
3.1.2 <b>Purificación del ADN</b>	<b>7</b>
3.1.3 <b>Pruebas de marcadores moleculares con RAPDs</b>	<b>10</b>
3.2. <b>Micropropagación de <i>Quassia amara</i></b>	<b>10</b>
3.2.1. <b>Introducción de nudos</b>	<b>10</b>
3.2.2. <b>Pruebas de desinfección de los nudos</b>	<b>11</b>
3.2.3. <b>Evaluación de reguladores de crecimiento</b>	<b>12</b>
3.2.4. <b>Evaluación de medios de cultivo</b>	<b>14</b>
3.2.5. <b>Subcultivos</b>	<b>15</b>
4. <b>RESULTADOS</b>	<b>15</b>
4.1. <b>Caracterización molecular de <i>Quassia amara</i></b>	<b>15</b>
4.1.1. <b>Extracción del ADN y marcadores moleculares</b>	<b>15</b>
4.2. <b>Micropropagación de <i>Quassia amara</i></b>	<b>16</b>

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
4.2.1. <b>Introducción de nudos</b>	<b>16</b>
4.2.2. <b>Pruebas de desinfección de los nudos</b>	<b>16</b>
4.2.3. <b>Evaluación de reguladores de crecimiento</b>	<b>18</b>
4.2.4. <b>Evaluación de medios de cultivo</b>	<b>20</b>
4.2.5. <b>Subcultivos</b>	<b>21</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>24</b>
<b>6. RECOMENDACIONES</b>	<b>24</b>
<b>7. APORTES Y ALCANCES</b>	<b>24</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>25</b>
<b>DOCUMENTO II</b>	
<b>1. CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS DEL PROYECTO</b>	<b>27</b>
<b>2. LIMITACIONES Y PROBLEMAS ENCONTRADOS</b>	<b>29</b>
<b>3. OBSERVACIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>31</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>33</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>34</b>
<b>ANEXO II</b>	<b>35</b>

## **CARACTERIZACIÓN DE QUASSIA AMARA PARA SU MANEJO SOSTENIBLE EN ECOSISTEMAS NATURALES Y AGROFORESTALES EN COSTA RICA**

Sergio Torres, Wayner Montero, Omar Gätjens,

El Hombre grande (*Quassia amara*) es una planta medicinal y tiene actividad biocida, la cual la hace ser de gran importancia en la producción de cultivos orgánicos. Sin embargo, existe una serie de limitaciones, como son la falta de una semilla apropiada para el establecimiento de las plantaciones. El objetivo principal de este proyecto fue caracterizar los genotipos de *Quassia amara* y su clonación. El estudio realizó una serie de evaluaciones para determinar la metodología para la micropropagación de esta planta, así como estudios preliminares de extracción de ADN para la caracterización molecular del hombre grande. Los resultados de estas investigaciones permitieron desarrollar una metodología para la extracción del ADN, pero no la caracterización molecular de los genotipos. Además, determinaron, que el explante recomendado para la micropropagación es el uso de nudos, la desinfección de estos explantes no se encuentra definida, el medio de cultivo para el establecimiento de nudos que dio el mejor resultado fue el medio de Gamborg o B5, suplementado con 1.5 mg/l de ANA.

### **Palabras claves**

Micropropagación, clonación, *in vitro*, ADN extracción, hombre grande, *Quassia amara*.



## Lista de cuadros

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
<b>Cuadro 1</b>	<b>Tratamientos de desinfección, utilizando diferentes concentraciones de cloro a diferentes tiempos.</b>	<b>12</b>
<b>Cuadro 2</b>	<b>Evaluación de diferentes concentraciones de dos reguladores de crecimientos (ANA y BAP) en el medio de establecimiento de <i>Quassia amara</i>.</b>	<b>13</b>
<b>Cuadro 3</b>	<b>Evaluación del efecto de dos concentraciones de cloro como desinfectantes y cuatro concentraciones de ANA en el medio de establecimiento de <i>Quassia amara</i>.</b>	<b>13</b>
<b>Cuadro 4</b>	<b>Medios de cultivo evaluados y número de explantes</b>	<b>15</b>
<b>Cuadro 5</b>	<b>Tratamientos de desinfección y porcentaje de contaminación a los 5 días después de establecidos los nudos en los medios de cultivo.</b>	<b>17</b>
<b>Cuadro 6</b>	<b>Cuadro resumen del grado de cumplimiento de los objetivos del proyecto</b>	<b>27</b>

## Lista de figuras

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	<b>Estaca de <i>Quassia amara</i> donadora de nudos.</b>	<b>11</b>
<b>Figura 2.</b>	<b>Nudos de <i>Quassia amara</i>. A). Nudo con exudado bacteriano y B) Nudo con yema en desarrollo.</b>	<b>18</b>
<b>Figura 3</b>	<b>Efecto del uso de diferentes concentraciones (mg/l) de ANA sobre el desarrollo de la yema de <i>Quassia amara</i></b>	<b>20</b>
<b>Figura 4.</b>	<b>Desarrollo de yemas en nudos de <i>Quassia amara</i>. Primer subcultivo en medio de crecimiento Gamborg a los 21 dds.</b>	<b>21</b>
<b>Figura 5.</b>	<b>Comportamiento de brotes de <i>Quassia amara</i> en el medio de subcultivo a los 21 dds.</b>	<b>22</b>
<b>Figura 6.</b>	<b>Desarrollo de yemas en nudos de <i>Quassia amara</i> a los 68 dds</b>	<b>22</b>
<b>Figura 7.</b>	<b>Vitroplantas de <i>Quassia amara</i> desarrolladas a partir de nudos a los 68 dds.</b>	<b>23</b>
<b>Figura 8.</b>	<b>Formación de plantas completas a partir de nudos de <i>Quassia amara</i> y multiplicación a los 92 días después del subcultivo. A) Nudos con diferente grado de desarrollo del brote y B) Nudos en multiplicación</b>	<b>23</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

La importancia de los productos no maderables del bosque se ha empezado a entender debido a que son productos nativos, poseen antecedentes históricos en su aprovechamiento, son importantes en la economía local y constituyen un vínculo sociocultural en el acercamiento hacia el desarrollo del bosque. Uno de estos productos es el hombre grande (*Quassia amara*).

El hombre grande es un arbusto de 3 a 6 m de altura, que se encuentra distribuido desde México hasta Brasil y que se usa para la fabricación de medicamentos y como insecticida natural (Villalobos, 1996). Las hojas de este arbusto ha sido utilizado para el control de la malaria (Bertani *et al* 2007) y extractos de la corteza han permitido el control en laboratorio de *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Stapylococcus aureus* y *Aspergillus niger* ([Ajaiyeoba y Krebs, 2003](#)). Como insecticida ha sido utilizado para el control del gusano barrenador de las meliáceas *Hypsipyla grandella* (Zeller), el cual es considerado como la principal plaga forestal en América Central y el Caribe (Hilje *et al.* 2000), por último, al ser un insecticida natural, éste puede ser utilizado en sistemas de producción orgánicos y en cultivos certificados como orgánico

Existen una serie de limitaciones para poder satisfacer la demanda no solo a nivel nacional sino a mercados internacionales. Primero es la falta de selección de genotipos con altas concentraciones de alcaloides, segundo es la falta de viveros que suplan material de siembra apropiados para cada región, tercero es la falta de capacitación técnica para el manejo del material reproductivo.

Actualmente el Instituto Tecnológico Costa Rica (ITCR), Sede San Carlos tiene una plantación de hombre grande que sule semilla sexual a los productores de la región y un banco de germoplasma con materiales provenientes de todo Centroamérica y de diferentes regiones país. Sin embargo, ambas plantaciones no están caracterizadas molecularmente, ni fitoquímicamente.

La caracterización fitoquímica podría permitir seleccionar los genotipos con las mayores concentraciones de alcaloides, los cuales podrían ser clonados por medio de técnicas biotecnológicas y distribuidos a los productores, haciendo de este cultivo, una alternativa para el desarrollo de los pequeños y medianos productores.

## 1.1. Objetivo General

Caracterizar genotipos de *Quassia amara* para ofrecer una alternativa de desarrollo a productores de la Región Huetar Norte sobre el manejo sostenible de este producto no maderable en ecosistemas naturales y agroforestales

## 1.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar la colección de genotipos silvestres de *Quassia amara* de la finca de la Sede Regional San Carlos en Santa Clara, mediante las técnicas RAPD bajo condiciones uniformes de clima, suelo y edad de la planta.
2. Relacionar los genotipos según procedencia con su afinidad genética.
3. Seleccionar los genotipos más apropiados de *Quassia amara* para su manejo en ecosistemas naturales y agroforestales, tomando como base los resultados y la información obtenida por medio de los análisis moleculares.
4. Caracterizar fitoquímicamente mediante contenido de alcaloides y quasinoídes los genotipos de la colección de *Quassia amara* presente en la unidad de recursos genéticos de productos no maderables del bosque de la Sede San Carlos
5. Establecer una metodología de micropropagación para *Quassia amara*.
6. Fortalecer el desarrollo de productos no maderables del bosque en la Zona Huetar Norte mediante establecimiento de viveros de genotipos de *Quassia amara* seleccionados que se integren en las plantaciones de bosque.

A continuación se presenta los trabajos de investigación desarrollados para establecer una metodología para caracterizar molecularmente los genotipos de hombre grande (objetivo específico # 1) y los estudios realizados para micropropagar este arbusto (objetivo específico # 5). En el documento II se

presentan el grado de cumplimiento de cada uno de los objetivos planteados originalmente, así como las limitaciones y problemas encontrados durante el desarrollo de este proyecto. Se adjunta dos anexos, el anexo I corresponde a los trabajos de investigación realizados de enero a junio del 2004 y el anexo II se incluye todos los experimentos realizados en esta planta desde junio del 2004 a junio del 2008.

## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

*Quassia amara* es un arbusto del sotobosque propio del trópico húmedo americano. Se extiende desde México hasta Brasil. En Costa Rica, se encuentra distribuida por todo el territorio nacional debido a que se ha localizado tanto en la costa del Caribe, Valle Central, como en la costa Pacífica y en la zona Norte (Villalobos, 1996).

En Costa Rica, a esta planta se le como hombre grande; sin embargo en otros países recibe otros nombres, como por ejemplo: amargo, bitter ash, bitterholz, bitterwood, bois amer, bois de quassia, crucete, quassia, cuassia, foliegenholz, guabo, hombre grande, jamaica bark, kashshing, maraubá, marupá, palo muneco, pau amarelo, quassia amarga, quassiawood, ruda, simaruba, simarubabaum, quassiahholz, quassia de cayenne, quassie, quina, simaba, Suriname wood (Villalobos, 1996, Taylor 2005).

El hombre grande pertenece a la familia Simaroubaceae, género *Quassia* especie *amara*. Es un arbusto que mide de 3 a 6 m de alto, con hojas de pecíolo y raquis alados. Inflorescencia en racimos, flores grandes y rojas y sus frutos son verdes, los cuales se tornan rojos cuando maduran (Medrano 1997, Taylor 2005).

### **2.1. Usos**

Esta planta ha sido utilizada por nuestros indígenas para el control de enfermedades, tales como: fiebres, dolor de estómago y cólicos. Su uso medicinal se reporta también en Europa desde el s. XVIII (Badilla *et al* 1998) Actualmente la literatura menciona otros usos, como por ejemplo: control de la fiebre amarilla, problemas digestivos, cálculos renales, así como en el control en laboratorio de las bacterias *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Stapylococcus aureus* and

*Aspergillus niger* ([Ajaiyeoba y Krebs, 2003](#), Medrano 1997, Taylor 2005, Badilla *et al* 1998). Además extractos de esta planta se utilizan en la fabricación de bebidas (Villalobos *et al* 1999) y como estimulante del apetito (Badilla *et al* 1998).

El hombre grande tiene propiedades biocidas y ha sido utilizado, tanto en Europa como en Estados Unidos (Villalobos *et al* 1999). Medrano (1997) menciona que en 1844 se utilizó extractos de madera para el control de áfidos en Inglaterra. Recientemente, investigaciones han demostrado el potencial de esta planta para controlar el barrenador de la meliáceas (Hilje *et al* 2000).

Badilla *et al* (1998) reporta que existe una demanda en Costa Rica de 675 kg de materia prima, mientras que un informe de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, siglas del nombre en inglés), indica que la demanda es de 2298 kg/año (FAO, 2000)

## **2.2. Composición química**

El efecto medicinal y biocida de esta planta se debe a los quasinoídes, siendo la quassina y los neoquisainoídes los principales componentes y se encuentran principalmente en el tallo y las hojas de la planta. Estudios realizados por Villalobos *et al* (1999) demostraron que la concentración de estas sustancias variaban de acuerdo al grosor de tallo. Estas eran mayores en tallos más gruesos. Otros factores que también afectan la concentración de quasinoídes son los ambientales (precipitación y luz solar). De acuerdo a estos investigadores, las plantaciones de la zona Atlántica tienen una mayor concentración de quasinoídes que las de la zona del Pacífico. Ellos atribuyen a esta diferencia a la menor precipitación y a los períodos secos a que son expuestas las plantas en el Pacífico. Estas condiciones ambientales no permiten un desarrollo muy vigoroso del tallo, los cuales tienen un menor diámetro que los tallos de las plantas del Atlántico y por ende una menor concentración de estas sustancias.

## **2.3. Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares son indicadores de diferentes regiones del genoma. Estos permiten determinar variaciones en la secuencia del ADN entre dos individuos, pueden ser morfológicos, isoenzimáticos, proteicos o basados en el ADN.

Para la caracterización molecular de una planta se requiere utilizar marcadores moleculares basados en el ADN. Por ejemplo un marcador molecular utilizado con este fin son fragmentos polimórficos de ADN amplificados aleatoriamente o RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs), los cuales se basa en la utilización de un único oligonucleótico de 10 bp que hibrida al azar con el ADN en estudio.

La metodología de RAPDs tiene como principio la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La técnica de PCR permite la amplificación específica de regiones de un genoma flanqueadas por secuencias conocidas de nucleótidos. Oligonucleótidos diseñados con homología a las secuencias flanqueantes son utilizados como iniciadores para la polimerización y amplificación del ADN de la región de interés. La técnica de RAPDs es una modificación de la técnica de PCR, en la cual se utilizan uno o dos tipos de oligonucleótidos cortos (decámeros) conteniendo secuencias aleatorias. Esto permite la amplificación aleatoria de diferentes bandas de ADN o regiones del genoma de un organismo, flanqueadas por las secuencias de los respectivos oligonucleótidos, sin que se conozca su genoma, pues estos decámeros siempre encuentran una secuencia complementaria (Williams *et al.*, 1990; Welsh y McClelland, 1990; Anollés y Gresshoff, 1997; Micheli y Bova, 1997).

Ventura (1999) realizó un estudio sobre la caracterización morfológica y molecular de *Quassia amara* provenientes de diferentes países de Centroamérica, así como de varias zonas de Costa Rica, utilizando la técnica molecular RAPDs. Como resultado de esa investigación no se encontró diferencias entre los diferentes materiales estudiados.

#### **2.4. Micropropagación de *Quassia amara***

La micropropagación o cultivo *in vitro* es la técnica de propagación de plantas en condiciones controladas y asépticas. Este método de propagación es asexual y se basa en el concepto de totipotencia, que es la capacidad que tiene toda célula vegetal de regenerar un nuevo individuo.

Algunos usos del cultivo *in vitro* son la clonación de materiales con características agronómicas deseables, así como para la producción masiva en períodos cortos y espacios reducidos de estos materiales.

Esta metodología consta de cuatro etapas: establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatización. La fase de establecimiento consiste en colocar el explante en el medio de cultivo para su desarrollo. Se divide en desinfección y medio de cultivo.

La desinfección del explante consiste en utilizar desinfectantes que eliminen las bacterias, hongos y otros organismos de su superficie. Para lograr este objetivo, se sumerge el explante en el desinfectante, el cual puede ser hipoclorito de sodio (Cloro), hipoclorito de Calcio, alcohol, extractos de semilla de cítricos (Kilol®), etc. En algunos casos, esta desinfección no es efectiva para reducir los agentes contaminantes, por lo que se debe aplicar productos químicos, como fungicidas y bactericidas a las plantas madres, las cuales son las donadoras de explantes. Esta práctica se hace para reducir el nivel de inóculo de estos agentes, mejorando la eficiencia de los desinfectantes.

Los medios de cultivo están compuestos por las sales minerales (macro y micro nutrientes), reguladores del crecimiento, azúcar, agua, vitaminas y un agente gelificante. Existen diferentes medios de cultivo, como por ejemplo: MS (Murashige y Skoog), B5 o medio de Gamborg, WPM (medio para especies leñosas). Cada uno de estos medios tiene diferentes composiciones de cada uno de los ingredientes antes mencionados.

Los reguladores de crecimiento son sustancias que estimulan el desarrollo de la planta. Los principales reguladores utilizados en el cultivo de tejidos son las auxinas y las citoquininas. De la relación que se establezca de estos dos grupos de reguladores va a depender el desarrollo de la planta. Por ejemplo, auxinas estimula la formación de raíces y callo, mientras que las citoquininas estimulan la formación de brotes. Las auxinas más utilizadas son: Ac. Naptalén acetico (ANA) y Ac. Indol 3 acético (AIA), mientras que las citoquininas más importantes esta la Benzilademina purina (BAP).



La fase de multiplicación consiste en estimular la formación de brotes, la cual se realiza por medio de la incorporación de citoquininas en el medio de cultivo o manteniendo una alta concentración de este regulador y una concentración muy baja de auxinas.

La fase de enraizamiento consiste en estimular la formación de las raíces de las vitroplantas. Por lo general no se usan reguladores de crecimiento en el medio de cultivo y esta es una etapa previa de endurecimiento a la fase de aclimatización.

La etapa de aclimatización consiste en transferir las vitroplantas del medio aséptico al invernadero para proceder a la fase de adaptación a las condiciones ambientales existen.

La literatura reporta pocas investigaciones sobre la micropropagación del hombre grande. Martin y Madassery (2005) investigaron el uso de hojas y nudos como explantes para la clonación de esta especie. Sin embargo, sus resultados fueron negativos debido a los problemas de contaminación y oxidación. A pesar de lo anterior, desarrollaron una metodología para la producción directa e indirecta de embriones a partir de cotiledones. Scragg *et al* 1990 desarrollo una metodología para la producción de callo a partir de hojas y tallo.

### **3. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Caracterización molecular de *Quassia amara***

##### **3.1.1. Purificación de ADN**

Se probaron tres metodologías para la extracción y purificación de los ácidos nucleicos, la elección del método de purificación más adecuado se realizó de acuerdo a la cantidad y calidad de las moléculas de ADN purificadas. La calidad de los ácidos nucleicos se estimó visualmente por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Para tal fin se colectaron hojas de las plantas de *Quassia amara* provenientes de la colección presente en el Instituto Tecnológico de Costa Rica para realizar las extracciones de ADN. Las hoja se lavaron con agua y jabón líquido, posteriormente a este material se le realizaron un par de lavados con etanol al 70%. Todas las muestras colectadas se identificaron de acuerdo a la localidad de procedencia y se guardaron en un recipiente conteniendo etanol al 70% y en otro

recipiente con etanol al 95% (de dos a tres hojas de cada genotipo). Posteriormente las hojas lavadas se guardaron en un congelador a  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para realizar la extracción de los ácidos nucleicos se tomaron tres muestras colectadas para cuatro localidades de procedencia diferentes. Las muestras utilizadas fueron las siguientes: muestras LP1, LP2 y LP3 para el pacífico, BT1, BT2 Y BT3, para la localidad de Boca Tapada de San Carlos, SCla1, SCla2 y SCla3, para la comunidad de Santa Clara y H490, H495 y H495-2 de Honduras.

El primer método de purificación correspondió a un equipo de reactivos para la purificación de ADN genómico de la compañía Fermentas (Fermentas Life Sciences, Lituania). Para realizar la extracción se siguió el protocolo descrito por el fabricante

La segunda metodología utilizada correspondió a un protocolo de extracción tomado y modificado a partir de Dellaporta *et al.* (1983), e implementado en el CIAT de Colombia. El primer paso para llevar a cabo la extracción fue lavar las hojas con jabón líquido y etanol al 70%. Esto permite eliminar posibles contaminaciones de la muestra con el ADN de microorganismos, ácaros y algunos tipos de insectos, que bajo ciertas condiciones pueden desarrollarse y crecer en la superficie de las hojas. Posteriormente se les adicionó 1.0 ml de solución amortiguadora de extracción de ADN (100 mM Tris – HCl, pH: 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, Mercaptoetanol al 0.7 % y Polivinil Pirrolidona al 2 %). Se procedió luego a triturar aproximadamente de 250 – 500 mg de material vegetal en morteros limpios esterilizados, previamente tratados con hipoclorito de sodio al 3.5% y lavados con etanol al 70% y agua destilada estéril. Posteriormente el material vegetal triturado fue transferido homogenizado en tubos plásticos limpios de 1.5 ml. Manteniendo los tubos siempre sobre hielo se agregan 75  $\mu\text{l}$  de SDS al 20 %; la mezcla se incubó luego en un baño de agua a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos y después se adicionaron 340  $\mu\text{l}$  de acetato de potasio 5 M, mezclando vigorosamente. Después se incubó la mezcla resultante en hielo por 30 minutos y se centrifugó la misma a 15 000 rpm durante 20 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se colectó la fase superior y se transfirió a tubos plásticos limpios de 1.5 ml, luego a la fase superior obtenida se le realizaron dos o tres extracciones con un volumen de fenol-cloroformo–alcohol isoamilo, para lo cual se agitó la solución en el mezclador “vórtex” por 1 –2 minutos y después se centrifugó la misma por 2 a 3

minutos, colectando la fase superior y transfiriéndola nuevamente a tubos limpios. Posteriormente se agregó un volumen de cloroformo–alcohol isoamilo y se agitó la mezcla en el “vórtex” durante 1 a 2 minutos, luego se centrifugó por 2 a 3 minutos a 10 000 rpm, colectando la fase acuosa superior y transfiriendo la misma a tubos limpios de 1.5 ml. Los ácidos nucleicos se precipitaron con un volumen de isopropanol, la mezcla se agitó suavemente y se dejó reposar por dos horas o toda la noche a 4°C. La solución resultante se centrifugó por 15 minutos a 14 000 rpm, luego se secó el precipitado con los ácidos nucleicos a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió en un volumen de 50 µl de agua bidestilada estéril, a la cual se le agregó la cantidad de ARNasa necesaria para obtener una concentración final de 10 µg/ml y se incubó por 30 minutos a 37°C. Posteriormente se realizaron dos o tres extracciones con un volumen de cloroformo–alcohol isoamilo y una extracción adicional con un volumen de cloroformo, repitiendo para tal fin la secuencia de mezcla, centrifugación y colecta de la fase acuosa superior precedida para la extracción con fenol-cloroformo–alcohol isoamilo. Seguidamente se tomaron aproximadamente 700 µl de la fase acuosa superior y se transfirieron a tubos plásticos limpios de 1.5 ml. Los ácidos nucleicos se precipitaron con un volumen de isopropanol, agitando suavemente la mezcla y dejándola reposar por dos horas o toda la noche a 4°C. El precipitado se obtuvo centrifugando la mezcla anterior por 15 minutos a 14 000 rpm. Al precipitado obtenido se le agregó 1 ml de etanol frío al 70% y se centrifugó por 3 minutos a 14 000 rpm, repitiendo la secuencia del paso anterior dos veces. Finalmente se secó el precipitado de ADN a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µl de agua estéril calidad PCR (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA). Posteriormente los ácidos nucleicos purificados se guardaron en un congelador a –20 °C.

Para la tercera metodología, la extracción de los ácidos nucleicos totales se realizó mediante el procedimiento de extracción con buffer CTAB descrita por Gibbs y Mackenzie (1997). Para ello se tomaron 300 mg de tejido foliar de cada una de las muestras de plantas en un tubo de 1,5 ml y se maceraron con ayuda de un pistilo de vidrio o de madera debidamente esterilizado, manteniendo la muestra siempre en hielo escarchado. Se añadieron 600 µl de buffer de extracción CTAB (2% Bromuro de Cetiltrimetil Amonio, 1,4 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl pH 8, 0,5% β-mercaptoetanol), se continuó con la maceración y la muestra se incubó a 55°C por 30 minutos.

Transcurrida la incubación, se añadieron 400 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y la muestra se centrifugó a 14 500 rpm por 10 min. En un tubo nuevo se rescató la fase acuosa y se mezcló con 0,1 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M y un volumen de isopropanol. Esta mezcla se incubó 10 min a 4°C y posteriormente se centrifugó a 14 500 rpm otros 10 minutos, para luego descartar la fase acuosa. El precipitado de ácidos nucleicos se lavó con 1 ml de etanol 70% y luego se dejó secar. Finalmente los ácidos nucleicos totales fueron resuspendidos en 50 µl de agua destilada estéril.

La calidad del ADN extraído se estimó visualmente cargando 4 µl del ADN resuspendido en agua calidad PCR, en un gel de agarosa al 0.8 % y en solución amortiguadora TBE 0.5 X, a 75 voltios por aproximadamente una hora y quince minutos.

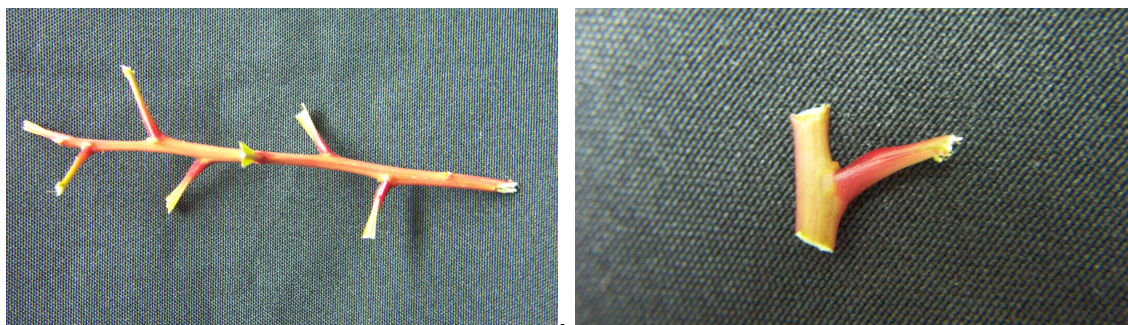
### **3.1.2. Pruebas de marcadores moleculares con RAPDs**

Para establecer las condiciones para la realización de las pruebas de RAPDs, se realizó una revisión de literatura con el fin de encontrar investigaciones relacionadas con el tema. A partir de esta revisión se identificaron algunos parámetros y condiciones para realizar las pruebas, así mismo se seleccionaron 14 iniciadores de RAPDs que podrían generar los mayores patrones de amplificación, esto de acuerdo a los resultados reportados en la literatura. Los iniciadores en mención fueron sintetizados por la compañía Applied Biosystem, por lo que actualmente se dispone de los mismos en el laboratorio de Biología Molecular de la Sede San Carlos, laboratorio adscrito a la Escuela de Ciencias y Letras. Los iniciadores escogidos y sintetizados fueron: UBC- 283, UBC- 284, OPB- 06, OPC-06, OPC-18, OPE- 01, OPE- 02, OPE- 15, OPE- 18, OPE- 19, OPE- 20, OPF- 06 Y OPH-13. Todos estos iniciadores fueron sintetizados y comercializados originalmente por la Operon Technologies, Alameda, California, USA.

## **3.2. Micropropagación de *Quassia amara***

### **3.2.1. Introducción de nudos**

Los explantes utilizados en esta investigación provinieron de nudos de diferentes árboles de la colección. Los nudos seleccionados fueron los primeros cinco de la rama (distal a proximal) y de textura tierna (Fig. 1).



**Figura 1.** Estaca de *Quassia amara* donadora de nudos.

### 3.2.2. Pruebas de desinfección de los nudos

Al no tenerse definido un protocolo de desinfección para la introducción de nudos de *Quassia amara*, se procedió a probar el efecto de diferentes procesos de desinfección, los cuales variaron en concentración y tiempo de exposición al agente químico utilizado. Los protocolos de desinfección utilizados fueron:

#### a) Tratamientos de desinfección de los nudos con cloro

Se colocaron los nudos en un flujo constante de agua durante cinco horas, luego, se lavaron con jabón y se sumergieron en una solución con 3 mg/l PVP. Posteriormente se colocaron en una solución con 3 ml/l de extracto de semilla de cítricos y se mantuvieron en el limpiador ultrasónico por 5 minutos. En el cuadro 1 se presentaron los diferentes tratamientos utilizados. Finalmente, los nudos fueron lavados con agua estéril en una cámara de transferencia. Se utilizaron 10 nudos por tratamiento.

#### b) Aplicación en el campo de fungicidas a las plantas donadoras de explantes.

Se aplicó Benomil (5 g/l) a los árboles donadores de explantes, durante 15 días. Posteriormente, los nudos fueron cosechados y colocados en una solución con 1 mg/l de extractos de semilla de cítricos y se mantuvieron en el limpiador ultrasónico durante 5 minutos. Posteriormente, los explantes fueron colocados en una solución de cloro al 2% por 20 minutos. Por último, los explantes fueron llevados a la cámara de transferencia donde fueron lavados con agua estéril. Se utilizaron 50 explantes.

El medio de cultivo utilizado en estos estudios fue un Murashige y Skoog (1962), al 50%, suplementado con 1.5 mg/l de Benziladenina Purina (BAP), 1 mg/l de Ácido Naftalén Acético (ANA), 30 g/l de sacarosa y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v) y 0.3 mg/l de PVP como agente antioxidante.

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de contaminación, clasificación de la contaminación en hongos y bacterias, porcentaje de sobrevivencia y porcentaje de oxidación.

**Cuadro 1.** Tratamientos de desinfección, utilizando diferentes concentraciones de cloro a diferentes tiempos.

Tratamiento	Cloro (%)	Tiempo (min)
1	2	5
2	2	10
3	3	5
4	3	10
5	4	5
6	4	10

### 3.2.3. Evaluación de reguladores de crecimiento

a) Evaluar el efecto de la combinación de diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas sobre el desarrollo de yemas de *Q. amara*.

El medio de cultivo utilizado fue un Murashige y Skoog (1962), al 50%, suplementado con diferentes reguladores de crecimiento (Cuadro 2), 30 g/l de sacarosa y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v) y 0.3 mg/l de PVP como agente antioxidante. Se utilizaron 10 explantes por tratamiento para la primera y segunda repetición, mientras que para la tercera se utilizaron 30 tubos.

**Cuadro 2.** Evaluación de diferentes concentraciones de dos reguladores de crecimientos (ANA y BAP) en el medio de establecimiento de *Quassia amara*.

ANA (mg/l)	BAP (mg/l)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
0	X				
1	X	X	X	X	X
1.5	X	X	X	X	X
2.0	X	X	X	X	X
2.5	X	X	X	X	X

b) Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de auxinas (ANA) sobre desarrollo de yemas de *Q. amara*.

Las plantas madres fueron tratadas con fungicida durante dos semanas. Posteriormente los nudos fueron cosechados. Un grupo fue desinfectado con cloro al 2% y otro grupo al 3% durante 20 minutos. Una vez desinfectados, los nudos fueron colocados en los diferentes tratamientos con auxinas (Cuadro 3). Se utilizaron 10 nudos por tratamiento. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de contaminación, porcentaje de oxidación y porcentaje de desarrollo de yemas.

**Cuadro 3.** Evaluación del efecto de dos concentraciones de cloro como desinfectantes y cuatro concentraciones de ANA en el medio de establecimiento de *Quassia amara*.

Cloro (%)	ANA (mg/l)				
	0	1	1.5	2.0	2.5
2	X	X	X	X	X
3	X	X	X	X	X

### 3.2.4. Evaluación de medios de cultivo

La metodología de desinfección utilizada en esta etapa fue la siguiente:

- a. Los nudos fueron colocados en una solución de Benomil (2 g/l) durante 1 hora.
- b. Los explantes fueron puestos en una corriente de agua durante 3 horas para la eliminación de exudados.
- c. Los explantes fueron colocados en una solución con jabón líquido en el ultrasonido.
- d. Los explantes fueron colocados en dos tratamientos: El tratamiento #1 consistió en colocar los explantes en una solución con extractos de semillas de cítricos (3 ml/l) en ultrasonido durante 15 minutos y el tratamiento #2 consistió en colocar los explantes en una solución de Benomil (2 g/l) y Estreptomina + oxitetraciclina (6 g/l) en ultrasonido durante 15 minutos. Se utilizaron 90 explantes por tratamiento.
- e. Los explantes fueron colocados en una solución con cloro al 2% durante 15 minutos.
- f. Los explantes fueron lavados tres veces con agua destilada estéril.
- g. Antes de realizar la siembra en el medio de cultivo seleccionado, los nudos fueron sumergidos en una solución de PVP (10 mg/l), con el objetivo de reducir la oxidación.

Una vez realizado el proceso de desinfección, los explantes fueron colocados en los siguientes medios de cultivo (Cuadro 4), suplementados con 30 g/l de sacarosa, solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v) y 10 mg/l de PVP como agente antioxidante. La cantidad de nudos utilizados por cada medio de cultivo fue de 30. Las variables evaluadas fueron: Porcentaje de contaminación, tipo de contaminación (hongos o bacterias), porcentaje de oxidación, porcentaje de sobrevivencia y porcentaje de explantes con formación de brotes.



### 3.2.5. Subcultivos

Los explantes sobrevivientes de los diferentes experimentos (reguladores de crecimiento y medios de cultivos) que desarrollaron la yema o bien que no mostraron necrosis del tejido fueron transferidos a medio Gamborg, con 1.5 mg/l de ANA y suplementado con 30 g/l de azúcar.

**Cuadro 4.** Medios de cultivo evaluados y número de explantes

Tratamiento	Medio de cultivo	Número de explantes
1	MS <sup>1</sup> 100% <sup>2</sup>	30
2	MS 75%	30
3	MS 50%	30
4	MS 25%	30
5	WPM (Medio para plantas leñosas)	30
6	Gamborg o B5	30

<sup>1</sup>MS = Medio Murashige y Skoog (1962). <sup>2</sup>Porcentaje de sales (macro y micronutrientes del medio)

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterización molecular

#### 4.1.1. Extracción de ADN y marcadores moleculares

Algunas de las muestras correspondientes a las metodologías de extracción 2 y 3 produjeron precipitados visibles. Estos precipitados se resuspendieron posteriormente en agua calidad PCR. La calidad del ADN extraído fue determinada mediante un gel de agarosa al 0.8 %, lo que produjo bandas visibles que muestran poca degradación y de un alto peso molecular (resultado no mostrado).

De acuerdo al análisis visual de la separación electroforética de los ácidos nucleicos purificados, la metodología que mejor resultados produjo, correspondió al protocolo de extracción tomado y modificado a partir de Dellaporta *et al.* (1983), e

implementado en el CIAT de Colombia, no obstante la concentración aparente de ácidos nucleicos no fue muy alta, incluso en algunas de las muestras no se logró observar ADN. También se pudo observar en algunas de las muestras lo que parece ser ARN o ADN degradado de bajo peso molecular (resultado de separación electroforética no mostrado).

Por otra parte, de acuerdo a los resultados obtenidos, la mayor concentración y calidad de las purificaciones se observó en las muestras que estuvieron guardadas en etanol al 70%.

## **4.2. Micropropagación de *Quassia amara***

### **4.2.1. Introducción de nudos**

### **4.2.2. Pruebas de desinfección de los nudos**

Investigaciones previas realizadas por el Laboratorio demostraron que la contaminación por hongos era uno de los principales limitantes en la clonación *in vitro* de *Quassia amara*. De los tratamientos establecidos para evaluar el comportamiento de los nudos en el medio de establecimiento, el 100% presentó problemas de contaminación por hongos. Esto obligó a realizar una evaluación sobre dosis de cloro y tiempo de exposición del explante al desinfectante.

#### **a) Tratamientos de desinfección con cloro**

Los resultados obtenidos de este ensayo, mostraron que la contaminación por hongos fue superior al 80% y en algunos casos hasta el 100% (Cuadro 5). Los tratamientos que presentaron los menores porcentajes de contaminación fueron los explantes tratados con 2% de cloro por 10 minutos y por 4% de cloro por 10 minutos. Sin embargo, los nudos expuestos al 2% de cloro tenían una coloración verde, mientras que los nudos tratados con 4% de cloro estaban negros. Este daño se debió a una quema del tejido por la alta concentración de cloro. De los nudos sobrevivientes ninguno brotó.

**Cuadro 5.** Tratamientos de desinfección y porcentaje de contaminación a los 5 días después de establecidos los nudos en los medios de cultivo.

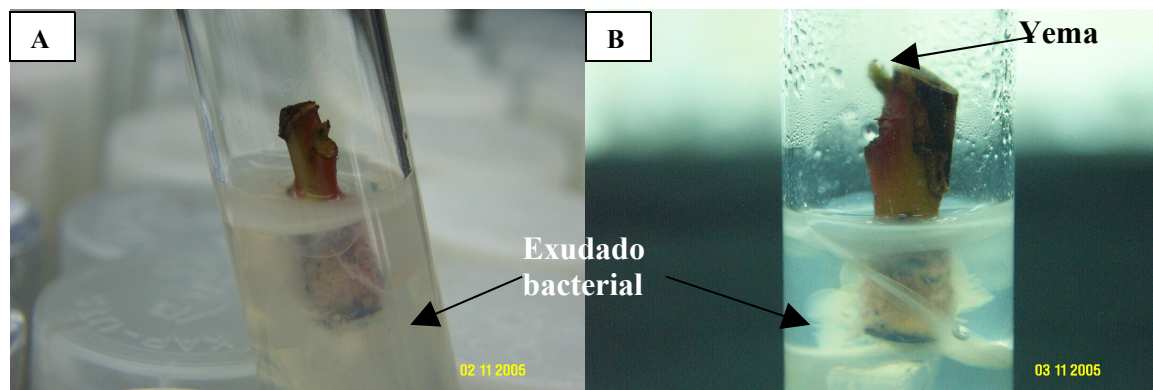
Tratamiento	Cloro (%)	Tiempo (min)	Contaminación (%)
1	2	5	90
2	2	10	80
3	3	5	100
4	3	10	100
5	4	5	100
6	4	10	80

b) Aplicación de fungicidas a las plantas donadoras de explantes.

Debido a los altos porcentajes de contaminación obtenidos en el trabajo anterior, lo cual coincidía con los resultados obtenidos previamente, se decidió aplicar a los árboles donantes de nudos un fungicida protector y erradicante con actividad sistémica, de amplio espectro, para lo cual se seleccionó el Benomil. El adecuado manejo agronómico de las plantas madres o donadoras de explantes ha sido considerada como una etapa en el proceso de cultivo de tejidos y se le conoce como la fase 0. En esta fase, las plantas donadoras se les da una adecuada fertilización y aplicaciones constantes de fungicidas para reducir la contaminación de los explantes una vez establecidos en condiciones *in vitro*.

La primera evaluación de los resultados de esta investigación se realizó los 9 días después de la siembra (dds) *in vitro*. El 26% de los explantes presentaban contaminación por hongos, un 68% presentaba contaminación por bacterias, un 2% de oxidación y un 4% no presentó ningún problema de contaminación. De los nudos contaminados con hongos, todos fueron eliminados, mientras que los que presentaban problemas con bacterias, dos fueron eliminados y el resto (32) se les hizo un tratamiento con alcohol al 95% y se subcultivaron en un nuevo medio. A los

15 dds, se realizó otra evaluación de la contaminación. De los 32 explantes tratados con alcohol, siete fueron eliminados debido a problemas con bacterias o muerte del tejido, uno no presentó exudado bacteriano y el resto (24) presentaron algún grado de contaminación por este organismo (Figura 2A), por lo que se colocaron en una solución con extractos de semillas de cítricos (1 ml/l) durante 5 min y luego fueron subcultivados en un nuevo medio. Durante esta evaluación se observó por primera vez el desarrollo de la yema (Figura 2B). Los explantes que presentaron desarrollo de yemas, mostraron un engrosamiento de la base de nudo. Esto probablemente se debió al efecto de la auxina. A los 45 dds se realizó la última evaluación y solo 10 nudos de los 50 iniciales presentaron desarrollo de yema. Sin embargo, todos mostraron contaminación por bacterias.



**Figura 2.** Nudos de *Quassia amara*. (A. Nudo con exudado bacteriano y B. Nudo con yema en desarrollo).

#### 4.2.3. Evaluación de reguladores de crecimiento

- a) Evaluar el efecto de la combinación de diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas sobre el desarrollo de yemas de *Q. amara*.

El protocolo de desinfección utilizado: fumigación a los árboles donantes de material, colocación de los explantes en una solución de extractos de semilla de cítricos, limpiador ultrasónico y cloro al 2% por 20 min no funcionó para este ensayo. En las dos primeras repeticiones el porcentaje de contaminación por hongo fue del 100%. Esto pudo deberse a factores ambientales, como por ejemplo: la humedad. En el ensayo donde se obtuvo un resultado aceptable con este protocolo de desinfección la precipitación fue baja, por lo tanto, el nivel de humedad también fue bajo, mientras que durante el establecimiento de los trabajos con reguladores de

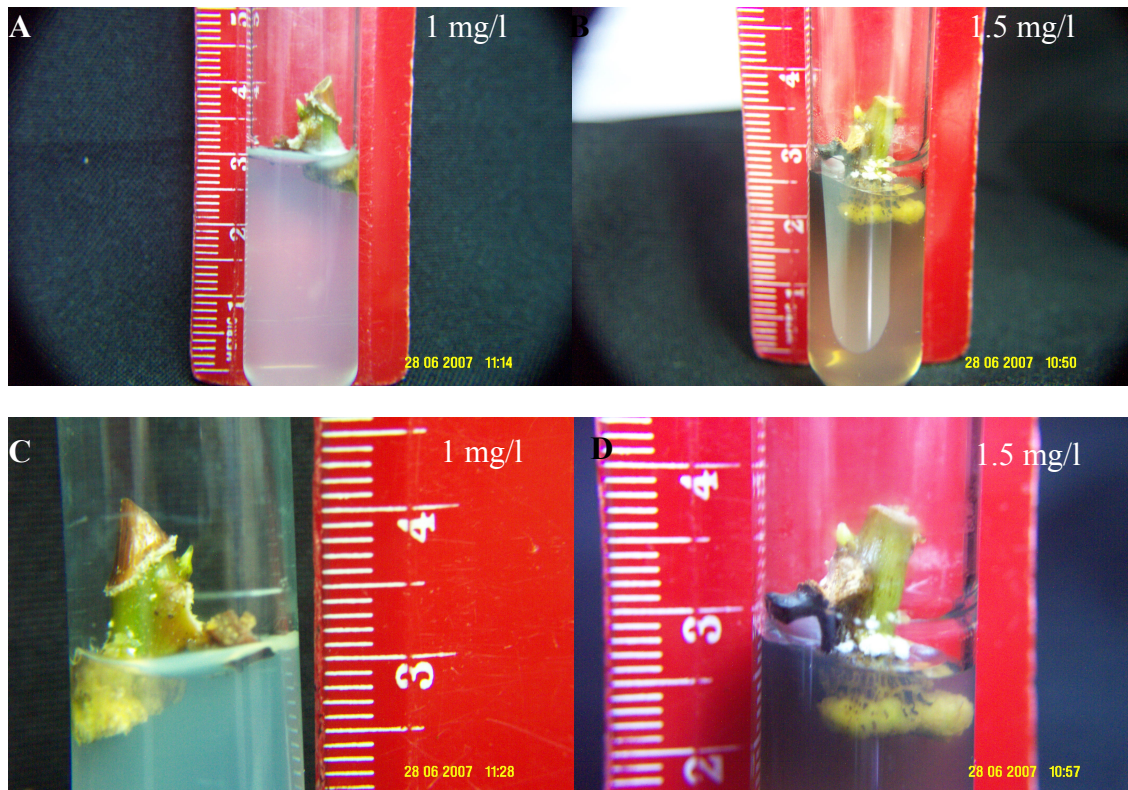
crecimiento había mucha precipitación. Las condiciones de humedad y altas temperaturas favorecen el desarrollo de cualquier hongo y durante el establecimiento de estos ensayos, estas dos variables ambientales eran óptimas para el desarrollo de estos organismos. Esto obligó hacer una modificación en el procedimiento de desinfección, el cual consistió en incrementar la concentración de cloro de 2 a 3% y se incrementó la cantidad de nudos por tratamiento de 10 a 30. Los resultados obtenidos en la tercera repetición con la modificación del protocolo de desinfección fueron: un 66.2% de explantes contaminados por hongos, los cuales fueron eliminados, un 4.8% contaminados por bacterias, los cuales se dejaron, un 25.5% con problemas de oxidación, los cuales también se dejaron y un 3.5% no presentaron ningún problema de contaminación ni oxidación. Esta evaluación se realizó a los 15 dds. La última evaluación se realizó a los 179 dds, donde sobrevivieron cinco explantes, de los cuales tres desarrollaron las yemas y formaron una planta. Estos tres nudos provenían de los siguientes tratamientos: 1.5 mg/l de ANA y sin BAP (2 explantes) y 1.5 mg/l de ANA con 1.5 mg/ de BAP (1 explante).

Se concluyó que el regulador de crecimiento a utilizar para el establecimiento *in vitro* de nudos de *Quassia amara* era la auxina ANA. Sin embargo se recomendó realizar una evaluación de diferentes concentraciones

**b) Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de auxinas (ANA) sobre desarrollo de yemas de *Q. amara*.**

A los nueve dds se realizó la primera evaluación. Los explantes desinfectados con cloro al 2% presentaron un 58% de contaminación por hongos, un 8% de bacterias y un 38% con oxidación, mientras que aquellos que fueron desinfectados con cloro al 3% , porcentajes de contaminación por hongos, bacterias y oxidación fue de 78%, 2% y 20% respectivamente. Todos los nudos que presentaron hongo fueron eliminados (68 explantes). A los 94 dds se realizó la última evaluación. De los 32 explantes, solamente ocho sobrevivieron y tres de ellos mostraron desarrollo de la yema. Estos explantes provenían del tratamiento con 1.5% (2 explantes) y de 2.5% de ANA (1 explante). El desarrollo de la yema no muestra una diferencia entre los dos tratamientos (Figura 3). Sin embargo, el tratamiento con

una mayor concentración de auxinas, muestra un mayor engrosamiento de la base del tallo de la microestaca (Figura 3C-D).



**Figura 3.** Efecto del uso de diferentes concentraciones (mg/l) de ANA sobre el desarrollo de la yema de *Quassia amara*.

#### 4.2.4. Evaluación de medios de cultivo

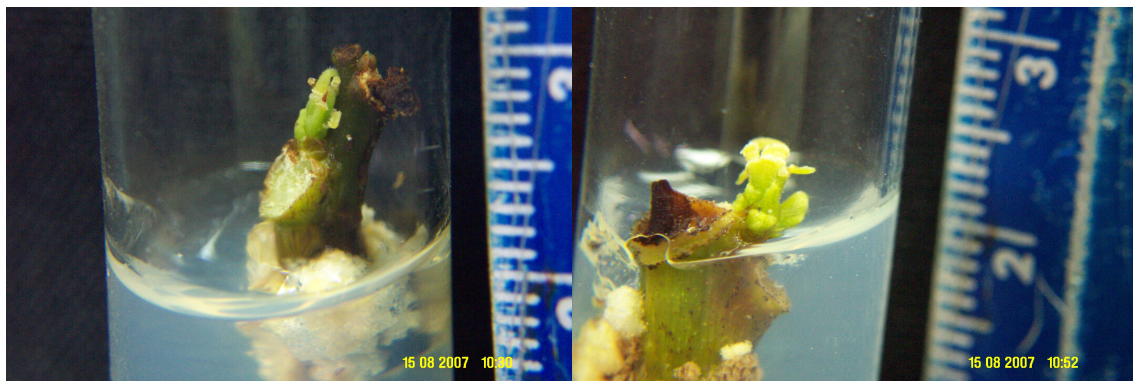
La contaminación sigue siendo un factor limitante en el desarrollo de un protocolo para la micropropagación de la *Quassia amara*. Debido a lo anterior, se establecieron dos tratamientos de desinfección en este ensayo. A los 21 dds, se evaluó la contaminación por hongos y bacterias, para el tratamiento con extractos de semilla de cítricos (T1) ésta fue de un 77.5%, mientras que con el tratamiento del fungicida y bactericida (T2) fue de un 74.4%. La diferencia entre ambas metodologías fue de un 3.1%. Los hongos fueron la causa principal de la contaminación, éste fue el 98.5 % y 89.5% para T1 y T2 respectivamente. La oxidación fue menor en el T1, con un 12%, mientras que en T2 fue de un 22%. Los resultados obtenidos no ayudaron a definir una metodología eficiente para la desinfección de este material.



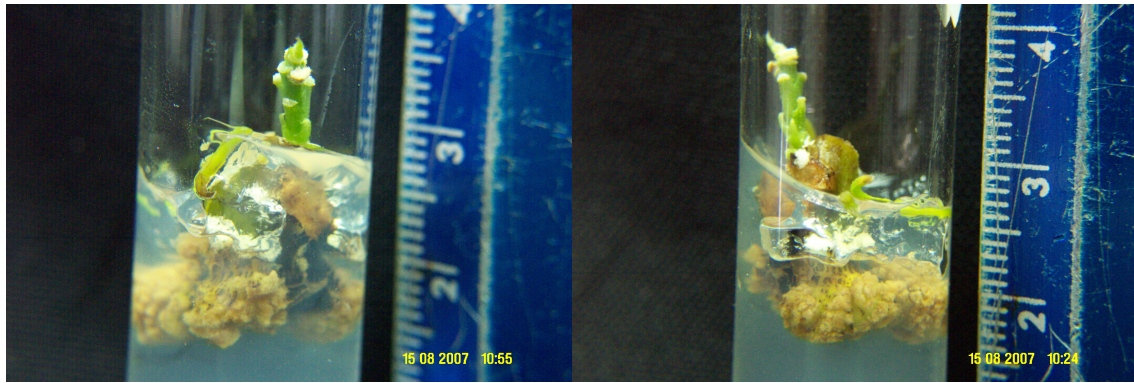
La primera evaluación del comportamiento de los nudos en los medios de cultivo se realizó a los 21 dds. Como resultado de esta evaluación se observó sólo un explante desarrollando la yema en el medio de Gamborg o B5. A los 53 dds, se realizó la segunda evaluación. De los 90 explantes iniciales, solo sobrevivieron 12 (13.3%). De éstos solo dos nudos presentaron desarrollo de brotes (2.2%) y estos provenían de los medios WPM y Gamborg.

#### 4.2.5. Subcultivos

Los explantes que sobrevivieron a los diferentes tratamientos, principalmente en los experimentos con reguladores de crecimiento y medios de cultivo, fueron transferidos al medio Gamborg o B5, con 1.5 mg/l de ANA. Los nudos que no presentaron desarrollo de la yema y que se encontraban sin engrosar fueron subcultivados. A los 21 días después del subcultivo (dds), se realizó la primera evaluación. La respuesta de estos explantes fue el desarrollo de la yema (Figura 4) y del engrosamiento en la base del corte inferior del nudo. El segundo grupo de nudos, fueron los que desarrollaron la yema, éstos al ser subcultivados botaron las hojas y mantuvieron el tallo verde (Figura 5). Sin embargo, algunos nudos se mantuvieron sin ninguna respuesta.

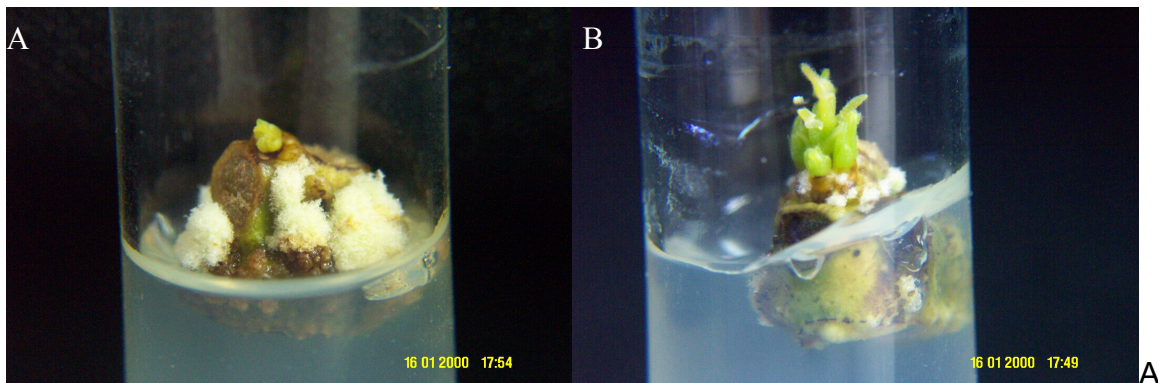


**Figura 4.** Desarrollo de yemas en nudos de *Quassia amara*. Primer subcultivo en medio de crecimiento Gamborg a los 21 dds.



**Figura 5.** Comportamiento de brotes de *Quassia amara* en el medio de subcultivo a los 21 dds.

A los 68 dds, se realizó la segunda evaluación. Los nudos que no habían presentado ninguna respuesta en la evaluación anterior, iniciaron el desarrollo de la yema (Figura 6A), mientras que aquellos nudos que habían presentado desarrollo de yemas en la primera evaluación, se observó un mayor crecimiento de ésta (Figura 6B).



**Figura 6.** Desarrollo de yemas en nudos de *Quassia amara* a los 68 dds

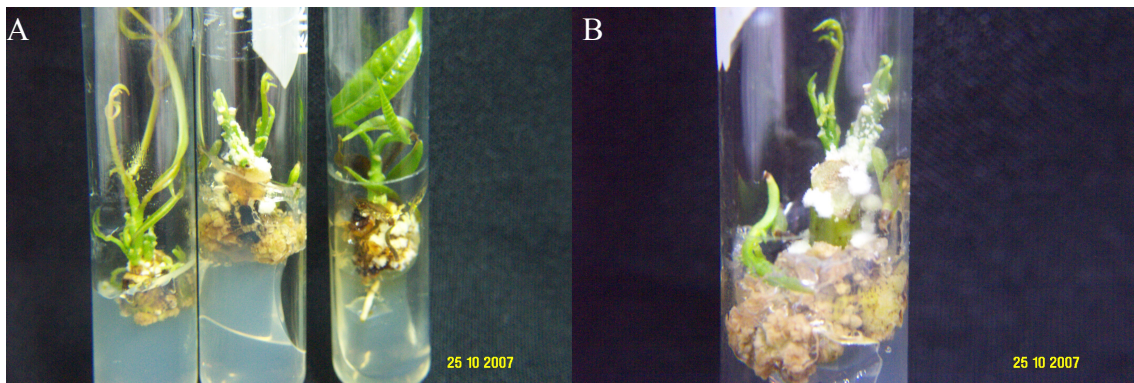
Los nudos que habían presentado un mayor desarrollo de las yemas en la primera evaluación, presentaron un mayor desarrollo de esta y en la mayoría de los casos, se dio la formación de la planta con hojas, tallo y raíz (Figura 7), a los 68 dds.





**Figura 7.** Vitroplantas de *Quassia amara* desarrolladas a partir de nudos a los 68 dds

A los 92 días del primer subcultivo se realizó la tercera evaluación. Se observa la formación de una planta completa (Figura 8A). Además, algunos brotes formaron otros brotes laterales, los cuales salieron de la masa de "callo" que se formó en la base del nudo, lo cual es el principio del proceso de multiplicación *in vitro* (Figura 8B).



**Figura 8.** Formación de plantas completas a partir de nudos de *Quassia amara* y multiplicación a los 92 días después del subcultivo (A. Nudos con diferente grado desarrollo del brote y B. Nudos en multiplicación).

## 5. CONCLUSIONES

1. Se tiene un protocolo preliminar para la extracción de ADN
2. La clonación de *Quassia amara* se logró a partir del uso de nudos como explantes
2. El proceso de desinfección para el establecimiento *in vitro* de los nudos no se encuentra definido.
3. El uso de reguladores de crecimiento, como auxinas (ANA), favorecieron el desarrollo de las yemas.

## 6. RECOMENDACIONES

1. Se debe continuar con los estudios que permitan hacer una adecuada caracterización molecular de la colección de *Quassia amara*, ubicada en las instalaciones del ITCR.
2. A pesar de que se tiene un protocolo para la propagación clonal de la *Quassia amara*, éste no es eficiente para la propagación masiva de esta especie. Se debe mejorar la desinfección y a la vez desarrollar una metodología para la multiplicación y aclimatización de las vitroplantas.
3. Se debe de realizar la caracterización química de la colección. De esta forma, se podrán clonar los árboles que presentan la mayor concentración de quasinoídes.

## 7. APORTES Y ALCANCES

1. La micropropagación de *Quassia amara* ha sido a través de la formación de callo embriogénico, lo cual no garantiza la clonación de la especie, mientras que el protocolo desarrollado en esta investigación permite clonar el hombre grande, garantizando su homogeneidad genética.
2. La posibilidad de clonar esta especie podría permitir entregar a los agricultores árboles seleccionados por su contenido de quasinoídes, convirtiendo a esta planta en una alternativa más para la diversificación agrícola.
3. La clonación permitiría multiplicar los materiales con la mayor concentración de quasinoídes, lo que permitiría a la industria poder contar con una mejor material prima.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [Ajaiyeoba EO](#), [Krebs HC](#). 2003. Antibacterial and antifungal activities of *Quassia undulata* and *Quassia amara* extracts *in vitro*. [Afr J Med Med Sci](#). (4):353-356.
- Anollés G., Gresshoff P., 1997. DNA Markers: Protocols, Applications and Overview. Ed. Wiles-Liss. New York. USA 364 pp.
- Badilla B., Miranda T., Mora, G., Vargas, K. 1998. Actividad gastrointestinal del extracto acuoso bruto de *Quassia amara* (Simarubaceae). *Revista Biología Tropical*. 46(2):203-216
- Bertani S, Houël E, Bourdy G, Stien D, Jullian V, Landau I, Deharo E. 2007. *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) leaf tea: effect of the growing stage and desiccation status on the antimalarial activity of a traditional preparation. *J Ethnopharmacol*. 111(1):40-42.
- Dellaporta S.L., Woodd J., Hicks J.B. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol Rep* 1:19-21
- FAO, 2000: Evaluación de los Productos Forestales no Madereros en América Central - Costa Rica. Editorial FAO. Roma, Italia. 14-25 pp
- Gibbs, A., Mackenzie, A. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *Journal of Virology Methods* 63:9–16.
- Hilje L.M.F., Mora A. G., Salazar R. 2000. Antifeedant activity of *Quassia amara* (Simaroubaceae) extracts on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Crop Protection* 19(5):301-305.
- Martin K.P., Madassery, J. 2005. Direct and indirect somatic embryogenesis on cotyledon explants of *Quassia amara* L., antileukaemic drug plant. *In vitro Cell Dev Biol Plant*. 41:51-57
- Medrano R. 1997. Estudio de sistemas de producción de Hombre Grande (*Quassia amara*), en la Región Huetar Norte. Tesis, Licenciatura en Ingeniería Agronómica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Departamento de Agronomía, Sede Regional de San Carlos (Costa Rica). 86 p.
- Micheli M.R., Bova R. 1997. Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR. Editorial Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York. 444 p.
- Murashige, T. F., Skoog F. 1962 . A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473 - 497.
- Scragg A.H., Ashton S., Steward D., Allan E. 1990. Growth and quassin accumulation by cultures of *Quassia amara*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 23:165-169.

- Taylor L. 2005. The Healing Power of Rainforest Herbs. <http://www.rain-tree.com/amargo.htm>. Tomado el 23 de julio del 2008, a las 8 pm.
- Ventura L. 1999. Caracterización morfológica y molecular de genotipos silvestres de *Quassia amara* L. ex Blom de Centroamérica. Tesis Mag. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 118 pp.
- Villalobos R., Marmillod D., Ocampo R., Mora G., Rojas C. 1999. Variations in the quassin and neoquassin content in *Quassia amara* (Simaroubaceae) in Costa Rica: Ecological and management implications. *Acta Horticulturae*. 502:369-375
- Villalobos R. 1996. Caracterización de la distribución de una planta medicinal (*Quassia amara*) como base para su manejo técnico. *In*. X Congreso Nacional Agronómico. San José, C.R. 17-22 pp
- Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research*. 18:7213-7218.
- Williams J.G., Kubelic A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*. 18:5631-6535.

## DOCUMENTO II

### 1. CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS DEL PROYECTO

En el cuadro 6 se presentan los objetivos específicos de este proyecto, actividades que se debieron realizar y el grado de cumplimiento. De los seis objetivos específicos de este proyecto, se trabajó en dos de ellos, la caracterización molecular, donde se avanzó en un 25% y sobre la clonación, donde se presentó un 90% de avance.

Cuadro 6. Cuadro resumen del grado de cumplimiento de los objetivos del proyecto

Objetivo Específico	Actividades	Producto Esperado	Fecha propuesta de cumplimiento	% avance	Comentarios
Caracterizar la colección de genotipos silvestres de <i>Quassia amara</i> de la finca de la Sede Regional San Carlos en Santa Clara, mediante las técnicas RAPD bajo condiciones uniformes de clima, suelo y edad de la planta.	Aislamiento y determinación de la concentración de ADN.  Desarrollo de RAPIDs	Metodología para la caracterización molecular de <i>Quassia amara</i>  Caracterización molecular de la colección	Dic 2005	25%	Falta de recursos para biología molecular Falta de asistente
Relacionar los genotipos según procedencia con su afinidad genética.		Determinación de parentesco según región de procedencia	Dic 2005	0	No se realizó proceso de caracterización molecular por lo tanto no se pudo realizar este objetivo
Seleccionar los genotipos más apropiados de <i>Quassia amara</i> para su manejo en ecosistemas naturales y agroforestales, tomando como base los resultados y la información obtenida por medio de los			Dic 2005	0	

análisis moleculares.					
Caracterizar fitoquímicamente mediante contenido de alcaloides y quasinoídes los genotipos de la colección de <i>Quassia amara</i> presente en la unidad de recursos genéticos de productos no maderables del bosque de la Sede San Carlos	Desarrollo de metodología para la determinación de quasinoídes mediante HPLC	Metodología para la caracterización fotoquímica de la colección.  Determinación de la concentración de los alcaloides y quasinoídes por genotipo	Dic 2005	0	No se contaba con personal capacitado en el manejo de HPLC  HPLC no confiable  Falta de recursos para pagar análisis
Establecer una metodología de micropropagación para <i>Quassia amara</i> .	Desarrollo de metodología para el cultivo de embriones inmaduros  Desarrollo de metodología para cultivo de yemas	Metodología para la micropropagación	Dic 2005	90	Problemas de contaminación de explantes
Fortalecer el desarrollo de productos no maderables del bosque en la Zona Huetar Norte mediante establecimiento de viveros de genotipos de <i>Quassia amara</i> seleccionados que se integren en las plantaciones de bosque.	Establecimiento de un vivero de los genotipos seleccionados	Siembra de árboles de <i>Quassia amara</i> seleccionados	Dic 2005	0	No se realizó la caracterización fotoquímica ni molecular de la colección

## **2. LIMITACIONES Y PROBLEMAS ENCONTRADOS**

Al evaluar los objetivos de este proyecto con el cronograma de las actividades planteado, se observa una serie de inconsistencias que afectaron el desarrollo de este proyecto.

- Cambio de investigador principal

Este podría ser considerado como la principal limitante en el incumplimiento de los objetivos planteados. El Ing. T. Palma se pensionó en junio del 2004 y fue sustituido por el Ing. Sergio Torres, el cual continuó con el proyecto a partir de agosto del 2004. Este proceso de transición afectó el normal desarrollo del proyecto, ya que las visiones y experiencias que cada investigador tiene a la hora de planear y desarrollar un proyecto son diferentes.

- Recursos insuficientes

Se asignó poco recursos (tiempo y reactivos) para los estudios moleculares. El 50% de los objetivos están relacionados a esta área y solo se asignó 5 horas. Los recursos asignados para la compra de reactivos fueron insuficientes y no se asignó recursos para la contratación de un asistente a medio tiempo. En el área de fitoquímica no se asignó tiempo ni reactivos para realizar estos estudios. Los recursos asignados fueron utilizados principalmente para los estudios de microprogación.

- Se parte de supuestos

Una de las supuestas fortalezas del proyecto es que se contaba con un HPLC para los análisis de fitoquímica, sin embargo, esta fortaleza se convirtió en una debilidad debido a que el equipo presentaba problemas de funcionamiento y calibración y no había personal capacitado en su manejo. Tampoco se presupuestó recursos para pagar los análisis.

- Falta de coordinación

Este proyecto involucró a investigadores de dos escuelas. Sin embargo, no hubo una adecuada discusión a la hora de plantear los objetivos específicos y el presupuesto. Estos fueron conocidos por el resto de los investigadores octubre del 2004, 10 meses después de que el proyecto había empezado. Al evaluar los objetivos del proyecto original, el equipo de investigadores decidió concentrarse en la micropropagación y en desarrollar algunas técnicas moleculares para la extracción de ADN. Esta decisión se tomó debido a que los recursos para el 2004 ya habían sido gastados en un 50% en el área de la micropropagación y el resto estaba comprometido.

- Falta de planificación

A pesar de existir un cronograma de actividades, éste fue hecho sin evaluar la complejidad de los objetivos que se estaban planteando. Por ejemplo, desarrollar una metodología para la caracterización molecular de una planta requiere de por lo menos tres años de trabajo o más, de acuerdo a la carga académica que fue asignada. Algo parecido se ha dado en el estudio de la micropropagación de esta especie.



### 3. OBSERVACIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

#### Evaluadores del proyecto

Para que este proyecto pudiera ejecutarse, éste debió pasar por dos grupos de evaluadores. El primero fue el comité técnico del CIDASTH y el segundo fueron los evaluadores de los proyectos de la Vicerrectoría de Investigación. Tal parece que con los errores que tiene este proyecto en cuanto a cronograma de actividades, presupuesto, duración y metodología, estos dos grupos de evaluadores no hicieron adecuadamente su trabajo de evaluación. Por ejemplo:

1. De los seis objetivos específicos que tenía este proyecto, tres (50%) estaban relacionados con la caracterización molecular. Sin embargo, en la distribución de cargas de investigación por parte de la VIE, le asignaron solamente 5 horas al investigador responsable de estos objetivos. Esto demuestra el desconocimiento de lo que significa este tipo de trabajos por parte de la VIE.
2. Uno de los objetivos específicos de este proyecto era establecer viveros de materiales seleccionados. Se supone que si son materiales seleccionados, éstos deberían de partir de material *in vitro*. Sin embargo, en el proyecto no se menciona nada con respecto a esta etapa, ni se destinan recursos ni existe una metodología ni existe una infraestructura para cumplir con este objetivo. Por ejemplo: la aclimatización de vitroplantas requiere de un invernadero, sistema de riego automático, mesas, esterilizador de sustratos, bandejas, etc. Este objetivo es un ejemplo de la mala evaluación del proyecto, porque a pesar de que el trabajo esta planeado en el cronograma de labores, no tiene una metodología de cómo hacerlo.
3. Se presenta un informe a la VIE de avances de labores del proyecto con una serie de problemas de metodología, redacción, etc. Sin embargo, la VIE no hace ningún comentario, ni observaciones, no hace nada. Oficialmente acepta el documento y punto. La pregunta es para qué se solicitan informes de avances si estos no son revisados?

#### Investigadores

La persona que planteó este proyecto tenía una idea de cómo se iba a desarrollar. Esta idea estaba en función al trabajo que él hacia y con las políticas planteadas por la VIE. Sin embargo, esa idea no se pudo desarrollar con el planteamiento original. Por un lado el investigador original de este proyecto se pensionó, dejando el trabajo en otra persona y la VIE cambió de políticas al no financiar extensiones de proyectos.

Quien planteó este proyecto, solo pudo ejecutarlo por cinco o seis meses y quien continuó con la ejecución por los 18 meses restante es quien escribe este informe. Acepto que cometí varios errores, el primero de ellos fue aceptar el proyecto sin conocerlo y el segundo desconocer los procedimientos internos, tanto los de la Escuela de Agronomía, como los de la VIE. Sin embargo, la Escuela me lo asignó.

## **Escuela de Agronomía**

Cuando se presentan situaciones como esta, donde el investigador principal, se tiene que retirar de la institución, la Escuela debería definir si se continúa o no el proyecto y no hacer lo que actualmente hace que es asignar el trabajo al investigador sustituto. Cuando un investigador es sustituido por otra persona, por lo general esta persona desconoce la metodología del proyecto. Por ejemplo; en mi caso soy especialista en cultivo de tejidos de especies vasculares, pero no leñosas, no soy especialista en fitoquímica, ni tampoco tengo experiencia en el uso de un HPLC.

## **Recomendaciones**

1. Solicitar al CIDASTH una evaluación más rigurosa de las propuestas de investigación, haciendo énfasis en metodología, recursos y cronograma para el desarrollo de los objetivos planteados. Creo que actualmente esta labor se está haciendo por el grupo encabezado por el actual director del centro, Dr. M. Villarreal.
2. Solicitar a la Dirección de Proyectos de la VIE un trabajo más riguroso y responsable de los evaluadores de proyectos. Esta evaluación debe ser más profesional y no simplemente ver si cumple con el formato. Por otro lado, los informes de avances deberían de servir para algo y si no son evaluados, entonces no se deberían de solicitar y evitar la pérdida de tiempo en que incurre el investigador y el evaluador del proyecto por parte de la VIE
3. Los informes de avances de los proyectos deberían también ser revisados por parte del CIDASTH.
4. La VIE, la Escuela o el Centro debería de solicitar un informe de avances de proyectos aquellos investigadores que se retiran de la institución y que son coordinadores de proyectos. Este informe debería tener un formato como un informe final y debería ser revisado por el CIDASTH y aprobado por el Consejo de Escuela. Este informe debería ser el insumo principal para determinar si el proyecto continúa o no por parte del Consejo de Escuela.
5. Hacer una solicitud al Consejo de la Escuela de Agronomía para discutir este caso. La idea es presentar lo errores que cometieron los investigadores, los evaluadores del Comité Técnico del CIDASTH, del momento, los evaluadores de la VIE, para mejorar y hacer conciencia de que esto no debe de repetirse. En esta actividad debería de participar también los evaluadores de la VIE, así como la persona coordinadora de la Dirección de Proyectos.
6. Se debe de hacer un llamado de atención a las autoridades de investigación de nuestra institución para que hagan una mejor evaluación de este tipo de proyectos, donde se evalúe el cronograma de trabajo con los objetivos propuestos y el tiempo que se está asignando.

## **ANEXOS**

## ANEXO I

Informe presentado a la VIE por parte del investigador responsable en 2004

### Tabla de Contenidos

<u>Los explantes sobrevivientes de los diferentes experimentos (reguladores de crecimiento y medios de cultivos) que desarrollaron la yema o bien que no mostraron necrosis del tejido fueron transferidos a medio Gamborg, con 1.5 mg/l de ANA y suplementado con 30 g/l de azúcar.....</u>	<u>15</u>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>15</b>
<u>Tabla de Contenidos.....</u>	<u>34</u>
<u>1.Objetivos.....</u>	<u>1</u>
<u>Objetivo General.....</u>	<u>1</u>
<u>Objetivos Específicos.....</u>	<u>1</u>
<u>Metodología.....</u>	<u>2</u>
<u>Material experimental y tratamientos evaluados .....</u>	<u>2</u>
2.1.Introducción de óvulos .....	2
2.1.1.1Medio de Cultivo.....	2
2.1.1.2Desinfección utilizada.....	3
2.1.1.3Tratamientos evaluados.....	4
2.1.2Introducción de embriones.....	5
2.1.1.4Medio de Cultivo.....	5
2.1.1.6Tratamientos evaluados.....	7
2.1.3Introducción de semillas maduras.....	9
2.1.1.7Tratamientos evaluados .....	9
2.1.2Inducción a callo .....	12
2.1.2.1Tratamientos evaluados.....	12
<u>Variables Evaluadas .....</u>	<u>17</u>
<u>Resultados y Observaciones.....</u>	<u>19</u>
<u>Porcentaje de supervivencia y contaminación.....</u>	<u>19</u>
3.1.1Introducción de óvulos.....	19
3.1.2Introducción de embriones inmaduros.....	20
3.1.3Introducción de semillas maduras.....	21
Observaciones.....	21
Los óvulos fue el explante que mayor problema de oxidación presentó, esto debido posiblemente es el explante cuyo tejido es mas sensible, además que en el procesote de disección sufre un mayor daño físico. ....	21
La oxidación fue el problema constante en las introducciones de óvulos y embriones, esto probablemente debido al carácter leñoso de la especie.....	21
El grupo de desinfecciones fuertes, fueron las que mayores porcentajes de supervivencia obtuvieron en las introducciones de embriones inmaduros.....	21
En el caso de las semillas sexuales maduras, se puede decir que los métodos de desinfección utilizados, no fueron eficientes en eliminar los distintos agentes contaminantes especialmente los fúngicos. esto debido probablemente a la estructura irregular de las semillas, la cual a su vez presenta un cierto grado de porosidad por su corchosa externa, lo que dificulta la correcta desinfección del mismo.....	21
El agente antioxidante utilizado para la introducción de ovulos y embriones inmaduros, no causo un efecto determinante sobre el detrimento en la oxidación de los explantes.....	21

Las desinfecciones utilizadas en la introducción de óvulos y embriones libran eficientemente de agentes contaminantes (hongos, bacterias y levaduras) a los explantes introducidos.....22

**Porcentaje de Germinación .....23**

**Desarrollo de área de callo.....24**

# 1. Objetivos

## ***Objetivo General***

Evaluar la respuesta de diferentes explantes de *Quassia amara* a diferentes protocolos de desinfección, concentración de sales, sustratos inertes y reguladores de crecimiento.

## ***Objetivos Específicos***

- a. Cuantificar el porcentaje de supervivencia de diferentes explantes de *Quassia amara* como respuesta a diferentes protocolos de desinfección, concentración de sales, medios de cultivo y reguladores de crecimiento.
- b. Cuantificar el porcentaje de respuesta de diferentes explantes de *Quassia amara*, como respuesta a diferentes concentraciones de sales, medios de cultivo y reguladores de crecimiento.
- c. Cuantificar el desarrollo de área de callo de diferentes explantes de *Quassia amara* como respuesta a diferentes concentraciones de sales, medios de cultivo y reguladores de crecimiento.

## Metodología

### **Material experimental y tratamientos evaluados**

#### 2.1.1 Introducción de óvulos

Se colectaron flores de diferentes tamaños las cuales fueron clasificadas en dos categorías previamente establecidas (pequeñas y grandes), con el fin de determinar posteriormente la existencia o no de algún tipo de comportamiento o respuesta diferente en el momento del establecimiento *in vitro*. Las flores clasificadas como tamaño pequeño rondaban los 1,5 cm de longitud (ver figura 1), para el caso de las segundas (grandes) estas tenían longitudes de entre 3 y 4 cm (ver figura 1). La procedencia de las mismas, varió dentro de la población de árboles, sin embargo en su totalidad fueron colectadas de la colección general (no incluye la colección de individuos traídos de diferentes latitudes centroamericanas).

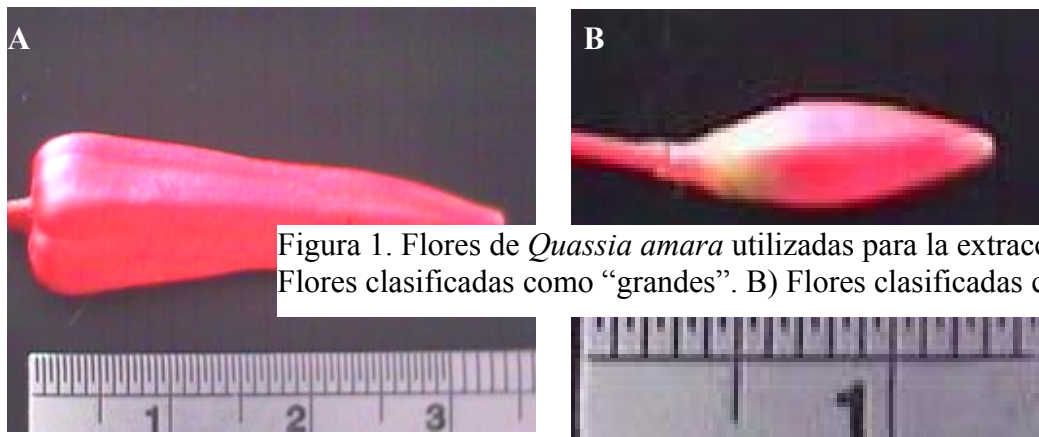


Figura 1. Flores de *Quassia amara* utilizadas para la extracción de óvulos. A) Flores clasificadas como “grandes”. B) Flores clasificadas como “pequeñas”

1.1.1. 1.1.1. ed

#### 2.1.1.1 Medio de Cultivo

Partiendo de la posibilidad de que el material a introducir presenta algún tipo de oxidación se utilizaron dos medios de cultivo diferentes, los cuales de alguna forma permitan evaluar el efecto sobre la oxidación. El primero constó de sales según concentraciones de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y solidificado con Bacto

Agar® (0,075% m/v). El segundo medio constó de sales según concentraciones de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y 1.2 g l<sup>-1</sup> de carbón activado, solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).

#### 2.1.1.2 Desinfección utilizada

Al no tenerse definido un protocolo de desinfección para la introducción de explantes de *Quassia amara*, se procedió a probar el efecto de diferentes procesos de desinfección, los cuales variaron en intensidad y agentes químicos utilizados, dependiendo del tipo de explante.

Para el caso de la introducción de flores, se probaron los siguientes protocolos de desinfección:

- a) Se tomaron una a una las flores, se sumergieron en alcohol al 96%, por un lapso no mayor a 3 segundos; procediéndose luego a realizar un flameo de las mismas en exposición a un mechero de alcohol por aproximadamente 5 segundos. Realizándose luego la extracción de los óvulos contenidos en ella, y colocándolos en el medio de cultivo respectivo. Este procedimiento se repitió completo para cada flor.
- b) Se tomaron una a una las flores, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1.5 % (v/v) por 2 segundos, luego fueron sumergidas en alcohol al 96% (v/v), por un lapso no mayor a 3 segundos; procediéndose luego a realizar un flameo de las mismas en exposición a un mechero de alcohol por aproximadamente 5 segundos. Realizándose luego la extracción de los óvulos contenidos en ella, y colocándolos en el medio de cultivo respectivo. Este procedimiento se repitió completo para cada flor.
- c) Se tomaron una a una las flores, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1,5 % (v/v) durante 5 minutos, luego fueron sumergidas en alcohol al 96% (v/v), por un lapso no mayor a 3 segundos; procediéndose luego a realizar un flameo de las mismas en exposición a un mechero de alcohol por aproximadamente 5 segundos. Realizándose luego la extracción de los óvulos contenidos en ella, y colocándolos en el medio de cultivo respectivo. Este procedimiento se repitió completo para cada flor.



- d) Se tomaron una a una las flores, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1,5 % (v/v) durante 5 minutos, luego fueron sumergidas en alcohol al 96% (v/v), por un lapso de 5 minutos; procediéndose luego a realizar un flameo de las mismas en exposición a un mechero de alcohol por aproximadamente 5 segundos. Realizándose luego la extracción de los óvulos contenidos en ella, y colocándolos en el medio de cultivo respectivo. Este procedimiento se repitió completo para cada flor.

Estos procesos de desinfección fueron aplicados tanto para los explantes colocados en medio 1, como para los del medio 2 (con carbón activado).

#### 2.1.1.3 Tratamientos evaluados

- 1) Desinfección con alcohol y flameo; en medio MS mas carbón activado.
- 2) Desinfección con alcohol, flameo y cloro; en un medio MS mas carbón activado.
- 3) Desinfección con alcohol y flameo; en medio MS simple.
- 4) Desinfección con cloro, alcohol y flameo; en un medio MS simple.
- 5) Desinfección con cloro (durante 5 minutos), alcohol y flameo; en un medio MS mas carbón activado.
- 6) Desinfección con cloro (durante 5 minutos), alcohol (durante 5 minutos) y flameo; en un medio MS mas carbón activado.



Figura 2. Óvulo extraído de *Quassia amara*, introducido a condiciones *in vitro*.

### 2.1.2 Introducción de embriones

Se colectaron semillas inmaduras de diferentes tamaños las cuales fueron clasificadas en dos categorías previamente establecidas (pequeñas y grandes), con el fin de determinar posteriormente la existencia o no de algún tipo de comportamiento o respuesta diferente en el momento del establecimiento *in vitro* de los embriones extraídos. Las semillas clasificadas como tamaño pequeño oscilaban el 0.5 cm de longitud (ver figura 3), para el caso de las segundas (grandes) estas tenían longitudes de entre 1 y 1,5 cm de longitud (ver figura 3). La procedencia de las mismas, varió dentro de la población de árboles, sin embargo en su totalidad fueron colectadas de la colección general (no incluye la colección de individuos traídos de diferentes latitudes centroamericanas).



Figura 3. Semillas inmaduras de *Quassia amara* (escala en centímetros). A) Semilla clasificada como “grande”. B) Semilla clasificada como pequeña.

#### 2.1.1.4 Medio de Cultivo

Con el fin de poder determinar el efecto de medio de cultivo sobre la oxidación de los embriones inmaduros introducidos se procedió a realizar dos moedisos de cultivo; uno que consistió de de sales según concentraciones de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v). Para el caso del

segundo, se utilizaron los mismos componentes y en iguales concentraciones al primero, adicionado además con  $1,2 \text{ g l}^{-1}$  de carbón activado (antioxidante de captura).

#### 2.1.1.5 Desinfección utilizada

Con el fin de cuantificar el porcentaje de supervivencia de dos tamaños de semillas inmaduras de *Quassia amara*, se probaron dos grupos de protocolos de desinfección diferentes; los cuales fueron llamadas de la siguiente forma: uno grupo de desinfecciones fuertes y otro de desinfecciones un poco más leves, esto de acuerdo a la agresividad y cantidad de los químicos utilizados.

##### A. Grupo de desinfecciones leves

- 1) Semillas inmaduras sumergidas en una solución al 10% (v/v) de jabón líquido de uso doméstico, durante 20 minutos con agitación periódica. Seguido de eso se realizaron tres enjuagues con agua destilada, con lo cual las semillas estaban listas para ser llevadas a cámara de flujo laminar. Ya dentro de la cámara se sumergieron en alcohol de 96% (v/v) por un lapso de 2 segundos, siendo estos expuestos luego a la llama de un mechero de alcohol durante un tiempo no mayor a 3 segundos.
- 2) Semillas inmaduras sumergidas en una solución al 10% (v/v) de jabón líquido de uso doméstico, durante 20 minutos con agitación periódica. Seguido de eso se realizaron tres enjuagues con agua destilada, con lo cual las semillas estaban listas para ser llevadas a cámara de flujo laminar. Ya dentro de la cámara se sumergieron en alcohol de 96% (v/v) por un lapso de 5 minutos, siendo estos expuestos luego a la llama de un mechero de alcohol durante un tiempo no mayor a 3 segundos.

##### B. Grupo de desinfecciones fuertes

- 1) Semillas inmaduras sumergidas en una solución al 10% (v/v) de jabón líquido de uso doméstico, durante 20 minutos con agitación periódica; seguido de eso se realizaron tres enjuagues con agua destilada. Luego estas fueron colocadas en una solución de Kilo<sup>®</sup> a una concentración de  $1,5 \text{ ml l}^{-1}$  (I.A propanodiol), durante 5 minutos en un limpiador ultrasónico y 5 minutos fuera

de este, terminado esta parte del proceso con un enjuague de las semillas con agua destilada (repetido en tres ocasiones). Seguidamente el grupo de semillas fue colocado en una solución de hipoclorito de sodio al 1,5 % (v/v), siguiendo el mismo procedimiento de la desinfección en KiloI®, al término del cual las semillas estaban listas para ser llevadas a cámara de flujo laminar. Ya dentro de la cámara, se le realizaron 2 lavados con agua destilada estéril, después estas fueron sumergieron en alcohol de 96% (v/v) por un lapso de 2 segundos, siendo estos expuestos luego a la llama de un mechero de alcohol durante un tiempo no mayor a 3 segundos.



Figura 4. Embrión inmaduro de *Quassia amara* introducido a condiciones *in vitro*.

#### 2.1.1.6 Tratamientos evaluados

De las etapas anteriores se desprende que se combinaron diferentes factores los cuales se pueden resumir en la siguiente lista de tratamientos:

1. Embriones “pequeños” tratados en una desinfección con jabón (10% v/v), sumergidos en alcohol (96 % v/v) por 2 segundos, más flameo en un medio MS adicionado con carbón activado (1,2 g l<sup>-1</sup>).
2. Embriones “pequeños” tratados en una desinfección con jabón (10% v/v), sumergidos en alcohol (96 % v/v) por 2 segundos, más flameo en un medio MS simple.

3. Embriones “grandes” tratados en una desinfección con jabón (10% v/v), sumergidos en alcohol (96 % v/v) por 2 segundos, más flameo en un medio MS simple.
4. Embriones “grandes” tratados en una desinfección con jabón (10% v/v), sumergidos en alcohol (96 % v/v) por 2 segundos, más flameo en un medio MS adicionado con carbón activado (1,2 g l<sup>-1</sup>).
5. Embriones “grandes” tratados en una desinfección con jabón (10% v/v), sumergidos en alcohol (96 % v/v) por 5 minutos, más flameo en un medio MS adicionado con carbón activado (1,2 g l<sup>-1</sup>).
6. Embriones “grandes” tratados en una desinfección con jabón (10% v/v), sumergidos en alcohol (96 % v/v) por 5 minutos, más flameo en un medio MS simple.
7. Embriones “pequeños” tratados en una desinfección con jabón (10% v/v), tratados con kilol<sup>®</sup> (I.A propanodiol) a una concentración de 1,5 g l<sup>-1</sup> durante 10 minutos (5 en limpiador ultrasónico y 5 minutos fuera de este), luego fueron desinfectados con hipoclorito de sodio (1,5 % v/v) bajo el mismo procedimiento con que se realizó la desinfección en Kilol<sup>®</sup>. Pasando luego a ser sumergidos en alcohol (96 % v/v) por 2 segundos, más flameo en un medio MS.
8. Embriones “pequeños” tratados en una desinfección con jabón (10% v/v), tratados con kilol<sup>®</sup> (I.A propanodiol) a una concentración de 1,5 g l<sup>-1</sup> durante 10 minutos (5 en limpiador ultrasónico y 5 minutos fuera de este), luego fueron desinfectados con hipoclorito de sodio (1,5 % v/v) bajo el mismo procedimiento con que se realizó la desinfección en Kilol<sup>®</sup>. Pasando luego a ser sumergidos en alcohol (96 % v/v) por 2 segundos, más flameo en un medio MS adicionado con carbón activado (1,2 g l<sup>-1</sup>).
9. Embriones “grandes” tratados en una desinfección con jabón (10% v/v), tratados con kilol<sup>®</sup> (I.A propanodiol) a una concentración de 1,5 g l<sup>-1</sup> durante 10 minutos (5 en limpiador ultrasónico y 5 minutos fuera de este), luego fueron desinfectados con hipoclorito de sodio (1,5 % v/v) bajo el mismo procedimiento con que se realizó la desinfección en Kilol<sup>®</sup>. Pasando luego a ser sumergidos en alcohol (96 % v/v) por 2 segundos, más flameo

en un medio MS adicionado con carbón activado (1,2 g l<sup>-1</sup>).

10. Embriones “grandes” tratados en una desinfección con jabón (10% v/v), tratados con kilol<sup>®</sup> (I.A propanodiol) a una concentración de 1,5 g l<sup>-1</sup> durante 10 minutos (5 en limpiador ultrasónico y 5 minutos fuera de este), luego fueron desinfectados con hipoclorito de sodio (1,5 % v/v) bajo el mismo procedimiento con que se realizó la desinfección en Kilol<sup>®</sup>. Pasando luego a ser sumergidos en alcohol (96 % v/v) por 2 segundos, más flameo en un MS simple.
11. Embriones “grandes” tratados en una desinfección con jabón (10% v/v), tratados con kilol<sup>®</sup> (I.A propanodiol) a una concentración de 1,5 g l<sup>-1</sup> durante 10 minutos (5 en limpiador ultrasónico y 5 minutos fuera de este), luego fueron desinfectados con hipoclorito de sodio (1,5 % v/v) bajo el mismo procedimiento con que se realizó la desinfección en Kilol<sup>®</sup>. Pasando luego a ser sumergidos en alcohol (96 % v/v) por 2 segundos, más flameo en un medio MS simple.
12. Embriones “grandes” tratados en una desinfección con jabón (10% v/v), tratados con kilol<sup>®</sup> (I.A propanodiol) a una concentración de 1,5 g l<sup>-1</sup> durante 10 minutos (5 en limpiador ultrasónico y 5 minutos fuera de este), luego fueron desinfectados con hipoclorito de sodio (1,5 % v/v) bajo el mismo procedimiento con que se realizó la desinfección en Kilol<sup>®</sup>. Pasando luego a ser sumergidos en alcohol (96 % v/v) por 2 segundos, más flameo en un medio MS adicionado con carbón activado (1,2 g l<sup>-1</sup>).

### 2.1.3 Introducción de semillas maduras

Se colectaron semillas maduras de diferentes árboles de *Quassia amara* procedentes del banco de germoplasma. Los racimos de semillas fueron cubiertos con una tela de malla para evitar su caída al suelo. Las semillas fueron recolectadas en los siguientes 5 días después su abscisión.

Las semillas recolectadas fueron agrupadas de acuerdo al árbol de las cuales provenían, esto para no mezclar materiales con diferentes posibles características genéticas.

#### 2.1.1.7 Tratamientos evaluados

Partiendo del hecho que la semilla posee las condiciones nutricionales necesarias para llevar a cabo el proceso de germinación se decidió colocar las semillas en dos tipos de sustratos inertes, teniendo el único fin el de proporcionarle soporte en condiciones *in vitro*.

Por lo cual se utilizaron dos sustratos inertes para la colocación de las semillas en condiciones *in vitro*; el primero consistió en algodón para uso en laboratorios. Se colocaron 3 cm longitudinales de este en el tubo de ensayo, para luego ser humedecidos con 5 ml de agua destilada antes de ser esterilizado durante 30 minutos a una presión 1,4 Kg cm<sup>2</sup> y 120 °C.

El otro medio utilizado consistió arena extraída de río previamente tamizada y esterilizada (en autoclave por 30 minutos a una presión 1,4 Kg cm<sup>2</sup> y 120 °C). Se colocó aproximadamente 5 cm (longitudinales del tubo de ensayo) de dicho sustrato por cada tubo de ensayo el cual fue humedecido con 5 ml de agua destilada, y a su vez fueron autoclavados durante 30 minutos a una presión 1,4 Kg cm<sup>2</sup> y una temperatura de 120 °C.

Además del tipo de sustrato se evaluó efecto de la oscuridad sobre la germinación de las semillas, por lo tanto la mitad de las semillas se colocaron en oscuridad hasta el momento de observar algún tipo de respuesta germinativa. La otra mitad será colocada en condiciones controladas de luminosidad, teniendo un fotoperíodo de 12 horas luz.

Con el fin de evaluar el efecto de diferentes protocolos de desinfección, todas las semillas introducidas *in vitro*, fueron sometidos a dos diferentes procesos de desinfección. El primero consistió en un protocolo de desinfección llamado “fuerte” en donde las semillas se colocaron en una solución de jabón líquido para uso doméstico (10% v/v) durante 10 minutos con agitación ocasional, seguidamente estas fueron sumergidas en un solución de hipoclorito de sodio al 1,5% (v/v), concluyendo con la colocación de las semillas en Kilol® a una concentración de 1,5 ml l<sup>-1</sup> (I.A propanodiol).

En el caso del segundo protocolo (llamado “leve”) las semillas se colocaron en una solución de jabón líquido para uso doméstico (10% v/v) durante 10 minutos con agitación ocasional, seguidamente estas fueron colocadas en una solución de Kilol® a una concentración de 1,5 ml l<sup>-1</sup> (I.A propanodiol). Concluyéndose con el

sumergimiento de las semillas en alcohol (95% v/v) durante 5 minutos y exponiéndolas a la llama de un mechero para alcohol.

Es importante aclarar, que entre la exposición de las semillas a cada agente químico se realizaron tres lavados con agua destilada.

Por otro lado, un grupo de semillas fueron puestas a germinar bajo condiciones de invernadero, estas tuvieron por sustrato arena de las mismas características a la utilizada a nivel *in vitro*. Las semillas fueron colocadas bajo condiciones controladas de humedad. Además fueron divididas en dos grupos; el primero estuvo en condiciones de oscuridad total y el segundo estuvo expuesto a un fotoperíodo natural

Todas estas combinaciones de factores se pueden resumir de la siguiente forma:

A. Grupo de semillas introducidas a condiciones *in vitro*

1. Semillas sometidas a desinfección “fuerte”, colocadas en sustrato arenoso, bajo condiciones de oscuridad total.
2. Semillas sometidas a desinfección “fuerte”, colocadas en sustrato algodonoso, bajo condiciones de fotoperíodo de 12 horas.
3. Semillas sometidas a desinfección “leve”, colocadas en sustrato arenoso, bajo condiciones de fotoperíodo de 12 horas.
4. Semillas sometidas a desinfección “leve”, colocadas en sustrato algodonoso, bajo condiciones de fotoperíodo de 12 horas.
5. Semillas sometidas a desinfección “fuerte”, colocadas en sustrato algodonoso, bajo condiciones de oscuridad total.
6. Semillas sometidas a desinfección “leve”, colocadas en sustrato arenoso, bajo condiciones de oscuridad total.
7. Semillas sometidas a desinfección “fuerte”, colocadas en sustrato algodonoso, bajo condiciones de fotoperíodo de 12 horas.
8. Semillas sometidas a desinfección “fuerte”, colocadas en sustrato algodonoso, bajo condiciones de oscuridad total.

B. Grupo de semillas introducidas a condiciones de invernadero



1. Semillas colocadas en sustrato arenoso bajo condiciones de oscuridad total.
2. Semillas colocadas en sustrato arenoso bajo condiciones de fotoperíodo natural.

### 2.1.2 Inducción a callo

Con el fin de evaluar el efecto de diferentes combinaciones de dosis y tipos de reguladores, además de concentración de sales sobre diferentes explantes de *Quassia amara*, se evaluaron los siguientes tratamientos.

#### 2.1.2.1 Tratamientos evaluados

1. Embriones “pequeños” colocados en un medio de cultivo con concentraciones al 25 % de sales según Murashige y Skoog (1962), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, sin reguladores de crecimiento y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).
2. Embriones “pequeños” colocados en un medio de cultivo con concentraciones al 25 % de sales según Murashige y Skoog (1962), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, suplementado con 1 ppm de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), 0,5 ppm de BA (6- bencil adenina) y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).
3. Embriones “pequeños” colocados en un medio de cultivo con concentraciones al 25 % de sales según Murashige y Skoog (1962), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, suplementado con 2 ppm de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), 0,5 ppm de BA (6- bencil adenina) y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).
4. Embriones “pequeños” colocados en un medio de cultivo con concentraciones al 25 % de sales según Murashige y Skoog (1962),

suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, sin reguladores de crecimiento y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).

5. Embriones “pequeños” colocados en un medio de cultivo con concentraciones al 25 % de sales según Murashige y Skoog (1962), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, suplementado con 1 ppm de ANA (ácido naftalén acético), 0,5 ppm de BA (6- bencil adenina) y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).

6. Embriones “pequeños” colocados en un medio de cultivo con concentraciones al 25 % de sales según Murashige y Skoog (1962), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, suplementado con 2 ppm de ANA (ácido naftalén acético), 0,5 ppm de BA (6- bencil adenina) y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).

7. Embriones “grandes” colocados en un medio de cultivo con concentraciones al 25 % de sales según Murashige y Skoog (1962), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, sin reguladores de crecimiento y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).

8. Embriones “grandes” colocados en un medio de cultivo con concentraciones al 25 % de sales según Murashige y Skoog (1962), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, suplementado con 1 ppm de ANA (ácido naftalén acético), 0,5 ppm de BA (6- bencil adenina) y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).

9. Embriones “grandes” colocados en un medio de cultivo con concentraciones al 25 % de sales según Murashige y Skoog (1962), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, suplementado con 2 ppm de ANA (ácido naftalén acético), 0,5 ppm de BA (6- bencil adenina) y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).

10. Embriones “grandes” colocados en un medio de cultivo con concentraciones al 25 % de sales según Murashige y Skoog (1962), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, sin reguladores de crecimiento y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).

11. Embriones “grandes” colocados en un medio de cultivo con concentraciones al 25 % de sales según Murashige y Skoog (1962), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, suplementado con 1 ppm de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), 0,5 ppm de BA (6- bencil adenina) y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).

12. Embriones “grandes” colocados en un medio de cultivo con concentraciones al 25 % de sales según Murashige y Skoog (1962), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, suplementado con 2 ppm de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), 0,5 ppm de BA (6- bencil adenina) y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).

13. Embriones “grandes” colocados en un medio de cultivo con concentraciones de sales según Gamborg (1968), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de

sacarosa, sin reguladores de crecimiento y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).

14. Embriones “grandes” colocados en un medio de cultivo con concentraciones de sales según Gamborg (1968), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, suplementado con 1 ppm de ANA (ácido naftalén acético), 0,5 ppm de BA (6- bencil adenina) y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).

15. Embriones “grandes” colocados en un medio de cultivo con concentraciones de sales según Gamborg (1968), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, suplementado con 2 ppm de ANA (ácido naftalén acético), 0,5 ppm de BA (6- bencil adenina) y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).

16. Embriones “grandes” colocados en un medio de cultivo con concentraciones de sales según Gamborg (1968), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, sin reguladores de crecimiento y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).

17. Embriones “grandes” colocados en un medio de cultivo con concentraciones de sales según Gamborg (1968), suplementado con 400 mg l<sup>-1</sup> de glicina, 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, suplementado con 1 ppm de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), 0,5 ppm de BA (6- bencil adenina) y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).

18. Embriones “grandes” colocados en un medio de cultivo con concentraciones de sales según Gamborg (1968), 100 mg l<sup>-1</sup> de myo-inositol, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 0,50 mg l<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl, 0,1 mg l<sup>-1</sup> de tiamina, 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, suplementado con 2 ppm de 2,4-D

(ácido 2,4 diclorofenoxiacético), 0,5 ppm de BA (6- bencil adenina) y solidificado con Bacto Agar® (0,075% m/v).

Tabla 1 Esquema de de los tratamientos evaluados, en la inducción de callo de embriones inmaduros *Quassia amara*.

Número Tratamiento	Tamaño Embrión	Tipo Sales	Concentración ANA (ppm)	Concentración 2,4-D (ppm)	Concentración BA (ppm)
1	Pequeño	MS 25%	0	0	0
2	Pequeño	MS 25%	0	1	0,5
3	Pequeño	MS 25%	0	2	0,5
4	Pequeño	MS 25%	0	0	0
5	Pequeño	MS 25%	1	0	0,5
6	Pequeño	MS 25%	2	0	0,5
7	Grande	MS 25%	0	0	0
8	Grande	MS 25%	1	0	0,5
9	Grande	MS 25%	2	0	0,5
10	Grande	MS 25%	0	0	0
11	Grande	MS 25%	0	1	0,5
12	Grande	MS 25%	0	2	0,5
13	Grande	B <sub>5</sub>	0	0	0
14	Grande	B <sub>5</sub>	1	0	0,5
15	Grande	B <sub>5</sub>	2	0	0,5
16	Grande	B <sub>5</sub>	0	0	0
17	Grande	B <sub>5</sub>	0	1	0,5
18	Grande	B <sub>5</sub>	0	2	0,5

### ***Variables Evaluadas***

Las variables evaluadas variaron de a cuerdo al objetivo del estudio, cada una de ellas fueron aplicadas semana a semana, o cada dos semanas dependiendo de la variable aplicada.

- b) Porcentaje se supervivencia. El porcentaje de supervivencia fue evaluado tanto en todas las etapas evaluadas (introducción de óvulos, embriones, semillas maduras e inducción de callo). Se realizó un conteo visual de los individuos muertos (explantos)

necrosados sin respuesta), con lo cual se obtendrá el cociente entre éste y el número de individuos vivos, para su posterior multiplicación por cien. Se identificó las posibles causas de muerte por métodos visuales, con el fin de determinar y analizar los posibles problemas de orden patológico o fisiológico (oxidación o vitrificación) presentes durante la investigación.

- c) Porcentaje de respuesta. Variable determinada cualitativamente de forma visual, mediante la cual se determinó algún cambio en el tamaño, volumen o color del explante y fue aplicada a la etapa inducción de callo. A cada explante se contabilizó un “sí” o un “no” (presenta o no presenta respuesta), al final de la evaluación se sumaron los explantes que presentaron un “sí” siendo este total dividido entre el total de explantes presentes.
- d) Área de callo. El análisis del desarrollo del callo se realizó mediante mediciones semanales de la determinación del área del callo (método de medición no destructivo), en el cual se mide dos longitudes del callo a lo largo y ancho. El área se determina por la siguiente formula:  $d_1 \times d_2$  (mm<sup>2</sup>).

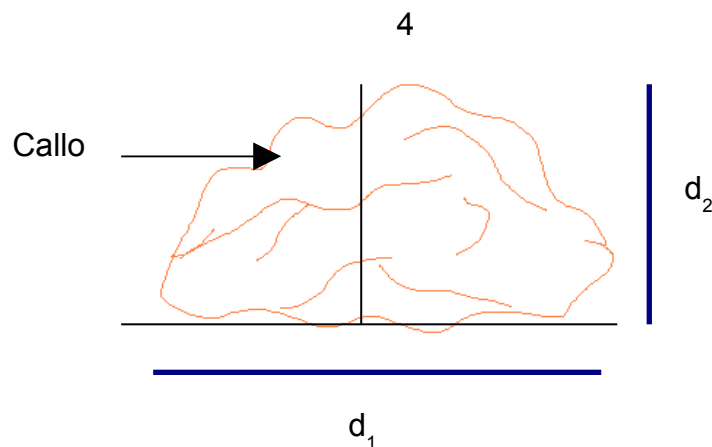


Figura 4. Fórmula de medición del área de callo

- e) Porcentaje de germinación. Variable aplicada a la introducción de semillas maduras con el fin de cuantificar cuanta de estas lograron germinar, dicho se resultado es producto de la división del número de plántulas germinadas entre el total de plantas disponibles.

## Resultados y Observaciones

### Porcentaje de supervivencia y contaminación

#### 3.1.1 Introducción de óvulos

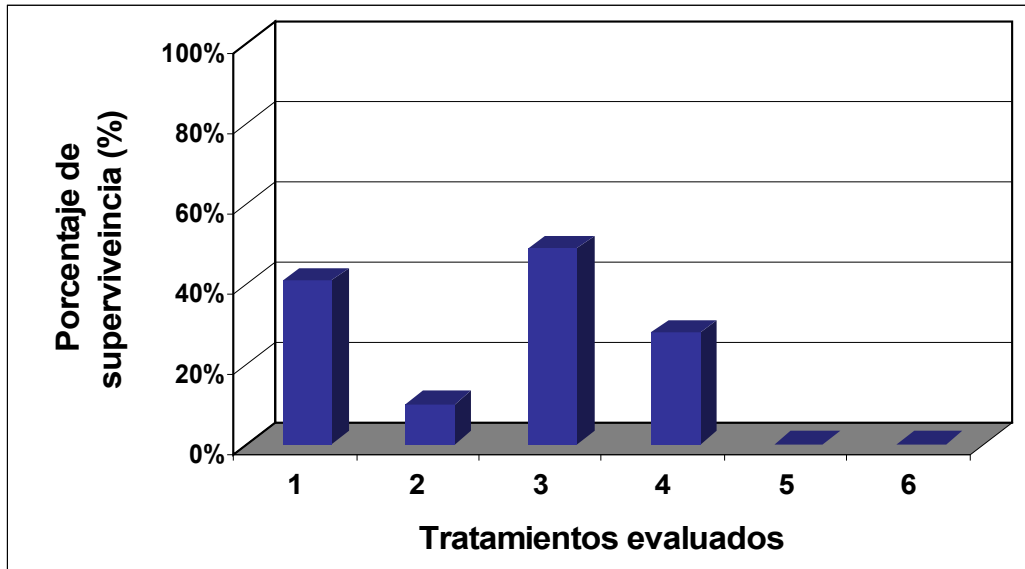


Figura 5. Porcentaje de supervivencia final obtenido después de la introducción de óvulos de *Quassia amara*

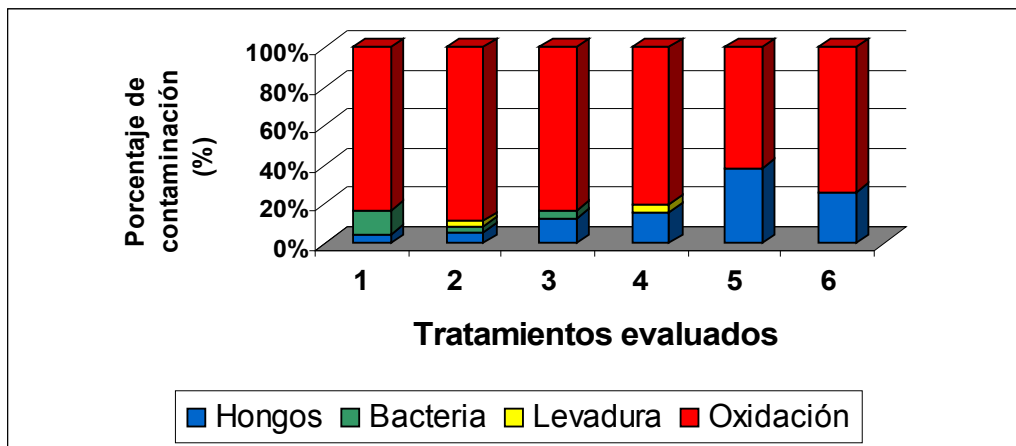


Figura 6. Porcentaje de contaminación final según el agente causal, obtenido después de la introducción de óvulos de *Quassia amara*



### 3.1.2 Introducción de embriones inmaduros

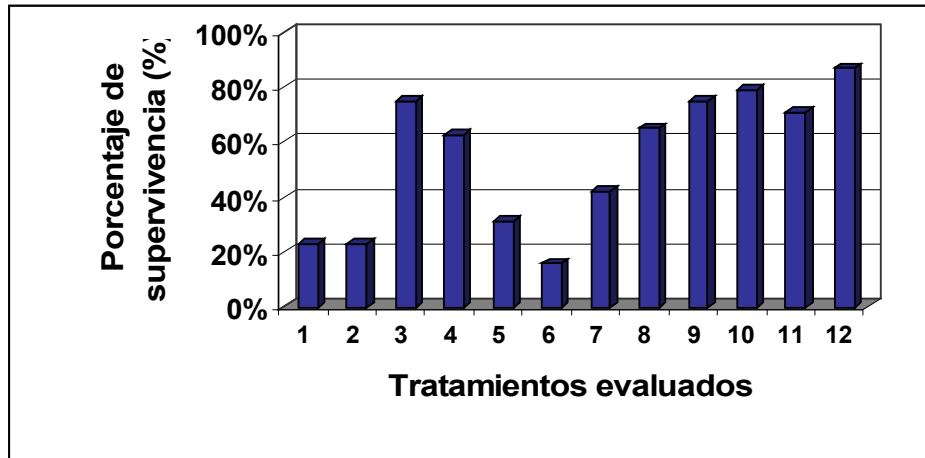


Figura 7. Porcentaje de supervivencia obtenido después de la introducción de embriones inmaduros de *Quassia amara*

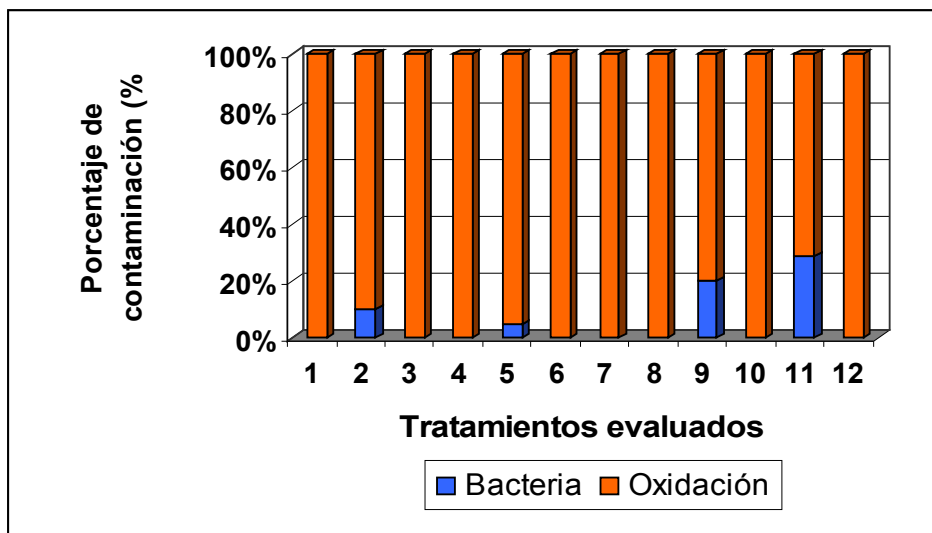


Figura 8. Porcentaje de contaminación según el agente causal, obtenido después de la introducción de embriones inmaduros de *Quassia amara*

### 3.1.3 Introducción de semillas maduras

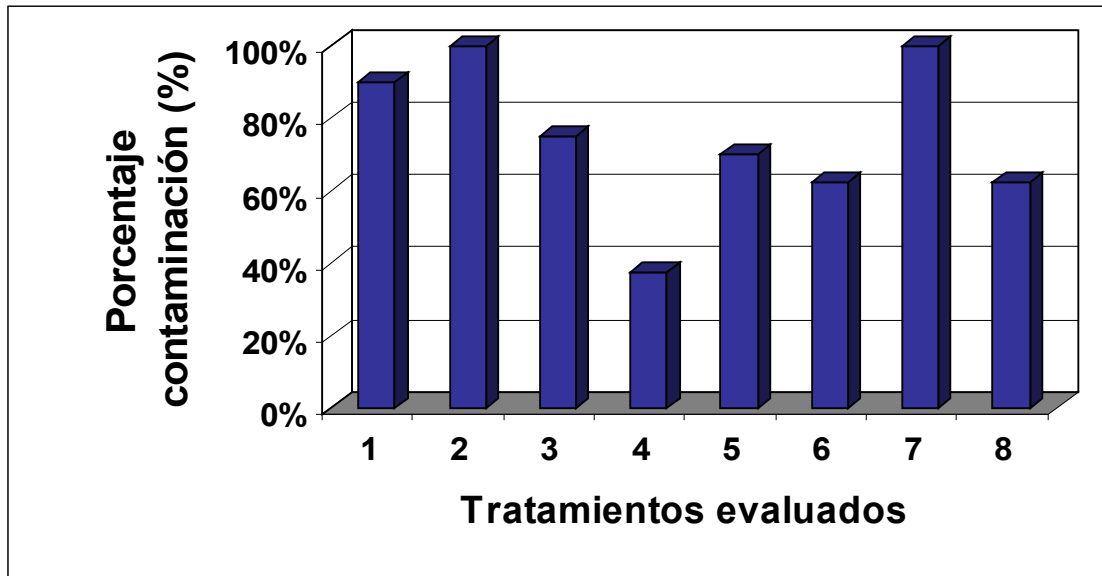


Figura 9. Porcentaje de contaminación obtenido después de una introducción de semillas sexuales maduras de *Quassia amara*, a condiciones *in vitro*

#### Observaciones

- Los óvulos fue el explante que mayor problema de oxidación presentó, esto debido posiblemente es el explante cuyo tejido es mas sensible, además que en el procesote de disección sufre un mayor daño físico.
- La oxidación fue el problema constante en las introducciones de óvulos y embriones, esto probablemente debido al carácter leñoso de la especie.
- El grupo de desinfecciones fuertes, fueron las que mayores porcentajes de supervivencia obtuvieron en las introducciones de embriones inmaduros.
- En el caso de las semillas sexuales maduras, se puede decir que los métodos de desinfección utilizados, no fueron eficientes en eliminar los distintos agentes contaminantes especialmente los fúngicos. esto debido probablemente a la estructura irregular de las semillas, la cual a su vez presenta un cierto grado de porosidad por su corchosidad externa, lo que dificulta la correcta desinfección del mismo.
- El agente antioxidante utilizado para la introducción de ovulos y embriones inmaduros, no causo un efecto determinante sobre el detrimento en la oxidación de los explantes.

- Las desinfecciones utilizadas en la introducción de óvulos y embriones libran eficientemente de agentes contaminantes (hongos, bacterias y levaduras) a los explantes introducidos.

## Porcentaje de Germinación

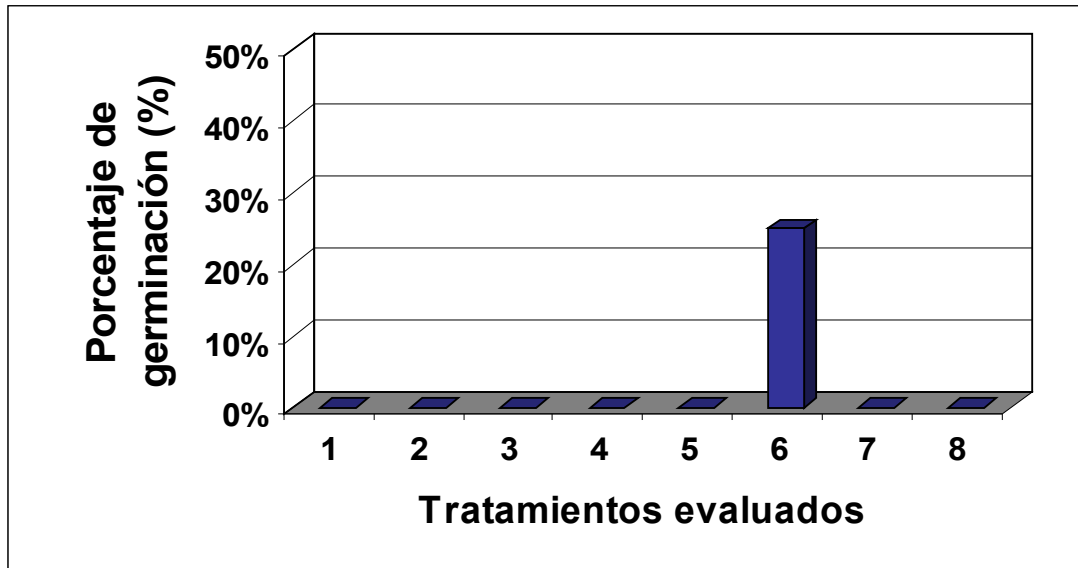
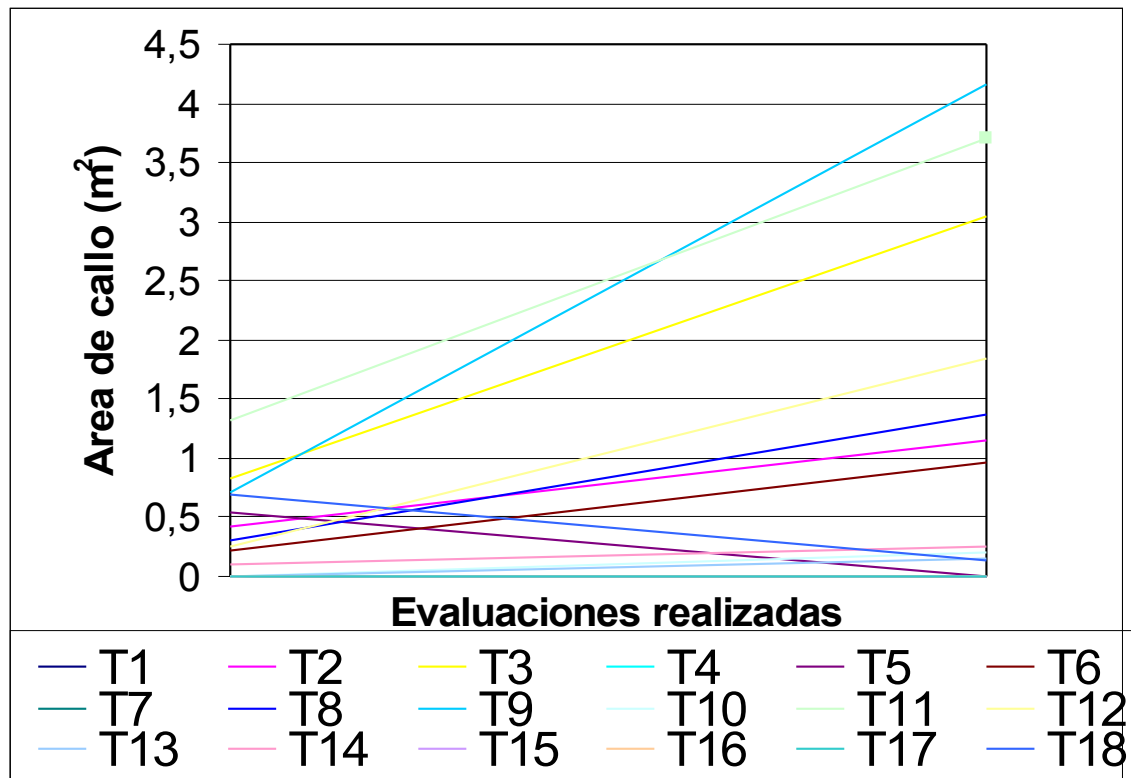


Figura 9. Porcentaje de germinación obtenido después de una introducción de semillas sexuales de *Quassia amara* a *in vitro*

### Observaciones

- Probablemente las desinfecciones utilizadas sean una de las principales causantes del bajísimo porcentaje de germinación obtenido, esto debido que pueden causar la muerte o latencia de las mismas.
- El tratamiento cuyo sustrato fue arena en condiciones de oscuridad, con desinfección fuerte fue el único que presentó germinación de alguno de sus individuos.

## Desarrollo de área de callo



### Observaciones

- Los tratamientos que presentaron un desarrollo creciente en el área de callo fueron los que presentaron mayores concentraciones de auxinas (tanto 2,4-D como ANA), sin embargo fue mas frecuente bajo presencia de 2,4-D.
- Los medios que sin reguladores de crecimiento, no presentaron desarrollo de callo, generando en algunos casos la germinación de embriones “grandes” y en la mayoría de los casos la oxidación de los mismos.
- El desarrollo del callo fue siempre creciente y constante durante el periodo de evolución en la mayoría de los tratamientos.

## ANEXO II

### Informe de experimentos desarrollados durante junio del 2004 a junio del 2008

#### Micropropagación *in vitro*:

Estudios preliminares en el laboratorio de biotecnología de plantas tropicales del ITCR-SSC permitió estimular la formación de callo usando como explantes, embriones inmaduros en un medio de cultivo conteniendo M.S, suplementando con 100 mg/L de myo-inositol, 0,5 mg/L piridoxina, 0,1 mg/L de tiamina, 2 mg/L de glicina y 3% de sacarosa y 0,5 mg/L de 2,4-D. A pesar de que el callo fue subcultivado a un medio de organización para la formación de embriones somáticos no hubo respuesta positiva.

#### Trabajo de desinfección

1. Evaluación de protocolo de desinfección

Medio de cultivo: M.S + 1.5 mg/L BAP + 1 mg/L ANA + 0,3 mg/L PVP.

Desinfección: Se colocaron los explantes con flujo constante de agua por 12 horas, luego se lavaron con jabón. Posteriormente se realizo desinfección con Kilol (3 ml/L), seguidamente se desinfecto con cloro al 2% por 15 min. Resultado: 100% contaminación

2. Evaluación de protocolo de desinfección # 2

Medio de cultivo: M.S + 1.5 mg/L BAP + 1 mg/L ANA + 0,3 mg/L PVP.

Desinfección: Se colocaron los explantes con flujo constante de agua por 12 horas, luego se lavaron con jabón. Posteriormente se realizo desinfección con Kilol (3 ml/L) manteniendo en el limpiador ultrasónico, seguidamente se desinfecto con cloro al 2% por 20 min. Resultado: disminución de oxidación debido al PVP y 100% contaminación

3. Evaluación de protocolo desinfección # 3

Medio de cultivo: M.S + 1.5 mg/L BAP + 1 mg/L ANA + 0,5 mg/L PVP.

Desinfección: Se colocaron los explantes con flujo constante de agua por

5 horas, luego se lavaron con jabón. Los explantes fueron sumergidos en 3 mg/L PVP. Posteriormente se realizó desinfección con Kilol (4 ml/L) manteniéndolo en el limpiador ultrasónico por 10 minutos, seguidamente se desinfectó con cloro al 2% por (5, 10 min). Seguidamente se mantuvo en el agitador con agua destilada por 4 horas.

4. Evaluación de desinfectantes cloro vs alcohol en dos medios de cultivo  
Medio de cultivos utilizados: Gamborg y WPM  
Desinfectantes cloro al 2% y alcohol al 98%

Resultados: 100% contaminación

### **Evaluación del tamaño del explante**

Explantes:

- i. 20 a 1.5 cm.
- ii. 20 a 3 cm

Desinfección:

1) Fumigación con Benlate 2 g/L y Milagro 2 g/L (Nutrigold), además de BB5 60% 5 L buffer dispersante.

2) Los explantes se desinfectaron con Benlate en el campo durante 15 días, luego se colocaron en el limpiador ultrasónico durante 5 min con Biocto 1 ml/L. Posteriormente se realizó desinfección con cloro al 2% por 20 min, también con el limpiador ultrasónico.

Resultados: 100% contaminación

### **Evaluación de reguladores de crecimiento (auxinas vs citoquininas)**

Desinfección: 15 min con disolución de jabón. 15 min con Biocto + BB5. 15 min con cloro al 4%. 5 min en limpiador ultrasónico. 3 enjuagues con agua destilada autoclavada en la cámara de transferencia.

El medio de cultivo utilizado fue un Murashige &.Skog, suplementado con las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento que se muestran a continuación:

1. 1 mg/L ANA + 0,5 mg/L BAP
2. 1,5 mg/L ANA + 0,5 mg/L BAP
3. 2 mg/L ANA + 0,5 mg/L BAP
4. 2,5 mg/L ANA + 0,5 mg/L BAP
5. 1 mg/L ANA + 1 mg/L BAP
6. 1,5 mg/L ANA + 1 mg/L BAP
7. 2 mg/L ANA + 1 mg/L BAP
8. 2,5 mg/L ANA + 1 mg/L BAP
9. 1 mg/L ANA + 0 mg/L BAP
10. 1,5 mg/L ANA + 0 mg/L BAP
11. 2 mg/L ANA + 0 mg/L BAP
12. 2,5 mg/L ANA + 0 mg/L BAP
13. 1 mg/L ANA + 1,5 mg/L BAP
14. 1,5 mg/L ANA + 1,5mg/L BAP
15. 2 mg/L ANA + 1,5 mg/L BAP
16. 2,5 mg/L ANA + 1,5 mg/L BAP
17. 1 mg/L ANA + 2 mg/L BAP
18. 1,5 mg/L ANA + 2 mg/L BAP
19. 2 mg/L ANA + 2 mg/L BAP
20. 2,5 mg/L ANA + 2 mg/L BAP
21. 1 mg/L ANA + 2 mg/L BAP

Este experimento se estableció cuatro veces y en la cuarta vez se obtuvieron los resultados presentados en el informe. Los resultados de las 3 repeticiones fue 100% contaminación.



## **Evaluación de medios de cultivo**

Se evaluaron diferentes concentraciones de las sales del medio Murashige & Skoog (100, 75, 50, 25%) y otros medios como por ejemplo el WPM, que es un medio específico para plantas leñosas y el medio de Gamborg (B5). Este experimento se estableció dos veces. Resultados: la primera vez que se estableció se obtuvo un 100% de contaminación, mientras que en la segunda, se obtuvieron los resultados mostrados en el informe.