



**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS-POSGRADO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

SISTEMA REPRODUCTIVO, ANÁLISIS CITOGENÉTICO Y  
MICROPROPAGACIÓN DE *Bucquetia glutinosa* y *Monochaetum myrtoideum*  
CON FINES DE RESTAURACIÓN, REPLANTACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL  
PÁRAMO DE RABANAL, BOYACÁ-COLOMBIA.

Requisito para optar el título de Magister en Ciencias Biológicas

CAMILO ANDRÉS CÁRDENAS BURGOS

Tunja  
Mayo, 2018



**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA Y TECNOLÓGICA DE COLOMBIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS-POSGRADO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

SISTEMA REPRODUCTIVO, ANÁLISIS CITOGENÉTICO Y  
MICROPROPAGACIÓN DE *Bucquetia glutinosa* y *Monochaetum myrtoideum*  
CON FINES DE RESTAURACIÓN, REPLANTACIÓN Y CONSERVACIÓN DEL  
PÁRAMO DE RABANAL, BOYACÁ-COLOMBIA.

Requisito para optar el título de Magister en Ciencias Biológicas  
CAMILO ANDRÉS CÁRDENAS BURGOS

PhD. JOSÉ C. PACHECO MALDONADO  
DIRECTOR  
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia  
Grupo de Investigación BIOPLASMA-UPTC

PhD. ANDRÉ LUÍS LAFORGA VANZELA  
CODIRECTOR  
Universidad Estadual de Londrina-Brasil  
Laboratorio de Citogenética y Diversidad Vegetal-LCDV

Tunja  
Mayo, 2018



## CERTIFICADO DE ORIGINALIDAD

José Constantino Pacheco Maldonado Lic. Biología y Química PhD. Biología docente titular escuela de Biología, Facultad de Ciencias Básicas Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y André Luís Laforga Vanzela, Biólogo y PhD. Ciencias Biológicas-Botánica, profesor asociado C de la Universidad Estadual de Londrina, Paraná-Brasil.

### CERTIFICAN:

Que el trabajo de grado realizado bajo nuestra dirección por Camilo Andrés Cárdenas Burgos titulado Biólogo, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al título de **Magister en Ciencias Biológicas** otorgado por la **Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia**.

Y para que así conste, firmamos la siguiente certificación en Tunja, el 21 de Mayo de 2018.

**José Constantino Pacheco Maldonado PhD.**

Director

Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

Grupo de investigación BIOPLASMA-UPTC

**André Luís Laforga Vanzela, PhD**

Codirector

Universidad Estadual de Londrina, Paraná-Brasil.

Laboratorio de Citogenética y Diversidad



## COMITÉ TUTORIAL

---

José C. Pacheco Maldonado PhD

Director

---

André Luís Laforga Vanzela, PhD.

Codirecto

---

María Eugenia Morales Puentes

PhD.

Jurado 1

---

Sandra Liliana Castañeda Garzón

MSc.

Jurado 2



Este trabajo de grado fue desarrollado en el marco de:

**Convenio No. 5211740 ECOPETROL-UPTC 2013**, Proyecto 6 Restauración ecológica de 105 ha en el DMRI Rabanal Departamento de Boyacá (municipios de Samacá y Ventaquemada) y en el departamento de Casanare (municipio de Sabanalarga).

Aplicación de procesos biotecnológicos con fines de replantación, restauración y conservación de ecosistemas de paramo: III) Micropropagación de *Bucquetia glutinosa* (L.F.) DC- **Código SGI 1537**

Sistema reproductivo, análisis citogenético y micropropagación DE *Bucquetia glutinosa* (L. f.) DC y *Monochaetum myrtoideum* (Bonpl.) Naudin con fines de restauración, replantación y conservación del páramo de rabanal, Boyacá-Colombia- **código SGI 1973**



## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más sentido agradecimiento:

A Dios, que siempre está sobre todas las cosas.

A mis, padres, hermanos y sobrinos, porque su apoyo y reflexiones, me permitieron iniciar y terminar este proyecto.

A la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia y a la Maestría en Ciencias Biológicas por la formación académica.

Al profesor Dr. José C. Pacheco Maldonado, director, consejero y formador de profesionales, investigadores y personas íntegras. Por su paciencia y por todos los conocimientos transmitidos antes, durante y después del desarrollo de este proyecto.

Al profesor Dr. André L. Laforga Vanzela, por recibirme en Brasil y enseñarme lo mejor de la citogenética vegetal; por su apoyo durante la codirección de este proyecto y los conocimientos transmitidos.

Al Grupo de Investigación BIOPLASMA-UPTC por colaboración recibida siempre en el desarrollo de este y todos los proyectos; a María de los Ángeles, Johanna y Yecenia por todo el apoyo; a Juan Sebastián por su compañía y ayuda en las salidas de campo.

Al Convenio 5211740 entre Ecopetrol S.A. & UPTC a través del cual se desarrollo esta investigación, al grupo de Investigación SisBio, por el apoyo recibido para el desarrollo del proyecto; especialmente a Pablo Gil, por su orientación y revisión en los aspectos de Biología Reproductiva

A las “meninas” Thaissa, Renata, Paula y Viviane por recibirme en Londrina y por su colaboración en los experimentos de Citogenética Molecular

A las Doctoras María Eugenia Morales y Sandra Liliana Castañeda por su asesoría y colaboración.

A Nataly Poveda y Milena Cárdenas, colegas y verdaderas amigas, que siempre me apoyaron e influyeron en la culminación de este proceso, las quiero.

A todos, nuevamente muchas gracias



## TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO 1 .....	15
INTRODUCCIÓN .....	15
MARCO CONCEPTUAL.....	19
ECOSISTEMAS DE PÁRAMO .....	19
FAMILIA MELASTOMATACEAE .....	23
<i>Bucquetia glutinosa</i> (L. f.) DC .....	24
<i>Monochaetum myrtoideum</i> (Bonpl.) Naudin.....	25
Melastomatáceae y su potencial para restauración.....	27
BIOTECNOLOGÍA Y CONSERVACIÓN.....	29
MICROPROPAGACIÓN .....	30
Etapas de la micropropagación. ....	31
Ventajas y limitaciones .....	33
SISTEMA REPRODUCTIVO.....	34
Autogamia.....	36
Xenogamia.....	36
Apomixis .....	37
Relación Polen/Ovulo (P/O).....	37
Calidad y viabilidad del polen .....	38
CITOGENÉTICA. ....	39



Bandeo cromosómico.....	40
Heterocromatina (HC).....	40
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	42
ESTADO DEL ARTE .....	44
OBJETIVOS.....	48
Objetivo general.....	48
Objetivos específicos.....	48
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....	48
REFERENCIAS.....	49
CAPITULO 2.....	68
PROTOCOLO PARA MICROPROPAGACIÓN DE <i>Bucquetia glutinosa</i> Y <i>Monochaetum myrtoideum</i> .....	68
RESUMEN .....	68
INTRODUCCIÓN .....	69
MATERIALES Y MÉTODOS .....	71
Asepsia superficial de semillas y establecimiento de cultivos in vitro .....	71
Multiplicación y enraizamiento de brotes. ....	72
Aclimatización.....	74
Condiciones generales de cultivo y análisis de datos.....	75
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	76
Asepsia superficial de semillas y establecimiento de cultivos in vitro .....	76





Multiplicación y enraizamiento de microtallos.....	83
Aclimatización de vitroplantas.....	94
CONCLUSIONES.....	95
REFERENCIAS.....	97
CAPITULO 3.....	105
ESTUDIO DEL SISTEMA REPRODUCTIVO, CALIDAD DE POLEN Y RELACIÓN POLEN/ÓVULO EN <i>Bucquetia glutinosa</i> Y <i>Monochaetum myrtoideum</i> .....	105
RESUMEN .....	105
INTRODUCCIÓN .....	106
MATERIALES Y MÉTODOS.....	109
Área de estudio.....	109
Relación polen-ovulo (P/O).....	112
Viabilidad del polen.....	113
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	114
Sistema reproductivo .....	114
Relación polen-óvulo (P/O).....	118
Viabilidad de polen .....	121
CONCLUSIONES.....	126
BIBLIOGRAFÍA .....	127
CAPITULO 4: CARACTERIZACIÓN CITOGÉNÉTICA DE <i>Bucquetia glutinosa</i> Y <i>Monochaetum myrtoideum</i> MEDIANTE DOBLE TENCIÓN DAPI/ CMA3.....	136



RESUMEN .....	136
INTRODUCCIÓN .....	137
MATERIALES Y MÉTODOS .....	141
Conteo de cromosomas.....	141
Tinción directa DAPI/CMA .....	142
Índice meiótico.....	142
RESULTADOS .....	143
Conteo de cromosomas.....	143
Tinción directa DAPI/CMA .....	145
Índice meiótico.....	148
DISCUSIÓN .....	150
Conteo de cromosomas.....	150
Tinción directa DAPI/CMA .....	151
Índice meiótico.....	153
CONCLUSIONES.....	154
REFERENCIAS.....	155
CONCLUSIONES GENERALES .....	163



## ÍNDICE DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1. Cartografía de Páramos de Colombia Esc. 1:100.000 (IAvH, 2012). Fuente: <a href="http://www.humboldt.org.co/images/pdf/CartografiaParamos/1-Mapa%20General-Horizontal.pdf">http://www.humboldt.org.co/images/pdf/CartografiaParamos/1-Mapa%20General-Horizontal.pdf</a> .....	22
--	----

### Capítulo 2

Figura 1. Propagación <i>in vitro</i> de <i>B. glutinosa</i> .....	80
Figura 2. Propagación <i>in vitro</i> de <i>M. myrtoideum</i> .....	81
Figura 3. Variables cuantificadas durante la etapa de multiplicación y enraizamiento de <i>Bucquetia glutinosa</i> .....	88
Figura 4. Variables cuantificadas durante la etapa de multiplicación y enraizamiento de <i>Monochaetum myrtoideum</i> .....	89
Figura 5. Análisis de componentes principales (ACP) para los datos registrados durante la etapa de multiplicación y enraizamiento de <i>B. glutinosa</i> (arriba) y <i>M. myrtoideum</i> (abajo), a partir de microtallos cultivados en diferentes medios de cultivo.....	93
Figura 6. Viabilidad de plántulas de <i>B. glutinosa</i> y <i>M. myrtoideum</i> a través de 60 días de aclimatización.....	95

### Capítulo 3.

Figura 1. Estadios de desarrollo de flores de <i>Bucquetia glutinosa</i> y <i>Monochaetum myrtoideum</i> .....	112
Figura 2. Vista al estereoscopio de ovarios de <i>B. glutinosa</i> y <i>M. myrtoideum</i> ...	120.



Figura 3. Cambios morfofisiológicos que experimentan los granos de polen de *B. glutinosa* y de *M. myrtoideum*, después de tratados con carmín 2%, MTT 1% y mediante la germinación del tubo polínico en medio de cultivo.....124

#### Capítulo 4.

Figura 1. Zonas meristemáticas radicales de *B. glutinosa* (a-c) y de *M. myrtoideum* (d-f) coloreadas con Giemsa 2%.....144

Figura 2. Tinción directa con fluorocromos DAPI (azul) y CMA<sub>3</sub> (amarillo verdoso) en *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*.....145

Figura 3. Desarrollo post-meiótico en *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*.....148



## ÍNDICE DE TABLAS

### Capítulo 1

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Bucquetia glutinosa</i> y <i>Monochaetum myrtoideum</i> . Tomado de Red Nacional de Jardines Botánicos (2008) .....	26
Tabla 2. Ventajas y desventajas del uso de melastomatáceas en algunas estrategias de restauración (Tomado de Silveira <i>et al</i> , 2013) .....	28
Tabla 3. Algunas ventajas y limitaciones de la propagación bajo condiciones <i>in vitro</i> . .....	34
Tabla 4. Sistemas reproductivos estimados con los valores medios de P/O, según Cruden (1977).....	38

### Capítulo 2

Tabla 1. Tratamientos para asepsia superficial de semillas de <i>B. glutinosa</i> y <i>M. myrtoideum</i> .....	73
Tabla 2. Composición de los medios de cultivo utilizados para multiplicación y enraizamiento de microtallos de <i>B. glutinosa</i> .....	74
Tabla 3. Composición de los medios de cultivo utilizados para la multiplicación y enraizamiento de microtallos de <i>M. myrtoideum</i> .....	75
Tabla 4. Efecto de diferentes tratamientos para asepsia superficial en semillas de <i>B. glutinosa</i> y <i>M. myrtoideum</i> .....	78
Tabla 5. Germinación de semillas y viabilidad de plántulas en desarrollo de <i>Bucquetia glutinosa</i> y <i>Monochaetum myrtoideum</i> cultivadas en diferentes medios de cultivo.....	82



Tabla 6. Proliferación y enraizamiento de microtallos de <i>Bucquetia glutinosa</i> y <i>Monochaetum myrtoideum</i> en diferentes medios después de 60 días de cultivo.....	85
---	----

### Capítulo 3.

Tabla 1. Sistemas reproductivos estimados con los valores medios de P/O según Cruden (1977).....	113
Tabla 2. Respuestas obtenidas de los experimentos de polinización controlada en <i>B. glutinosa</i> .....	116
Tabla 3. Numero de óvulos, granos de polen y relación polen-ovulo para <i>B. glutinosa</i> y <i>M. myrtoideum</i> .....	121
Tabla 4. Viabilidad de granos de polen en <i>B. glutinosa</i> y <i>M. myrtoideum</i> estimada mediante pruebas colorimétricas y desarrollo <i>in vitro</i> del tubo polínico.....	122

### Capítulo 4.

Tabla 1. Diferentes tipos de heterocromatina observados en núcleos interfásicos (N. Inter), células en prometafase (Promet.) y metafase (Meta.) de <i>B. glutinosa</i> y <i>M. myrtoideum</i> después de la coloración directa con DAPI/CMA.....	145.
--	------



## **CAPITULO 1.**

### **INTRODUCCIÓN**

Ante el severo y continuo deterioro que vienen sufriendo los ecosistemas naturales, ha surgido la necesidad inaplazable de crear alternativas eficaces que permitan realizar actividades de conservación y/o restauración de tales ecosistemas. Unos de los ecosistemas más afectados son los páramos, los cuales son escenarios naturales que han contribuido a la sobrevivencia y desarrollo del hombre a lo largo de la historia; por tanto, su conservación y recuperación deben ser actividades ineludibles y permanentes, ya que los servicios ambientales que ellos prestan, como la captación de carbono atmosférico, el almacenamiento y regulación hídrica, así como, la disponibilidad de forma continua del recurso hídrico para consumo e impulso de actividades productivas y energéticas, han sido siempre necesario para el desarrollo sustentable y sostenible de la humanidad. Sin embargo, los páramos presentan cierta vulnerabilidad causada por algunas actividades antrópicas, derivadas de la colonización y expansión de asentamientos humanos. Entre las amenazas a las que están expuestos los páramos se pueden mencionar quemas indiscriminadas, ganadería y agricultura extensiva, plantaciones forestales exóticas, pérdida de la biodiversidad, infraestructura vial sin planeación, turismo y minería sin control, entre otros (Ministerio del Medio Ambiente, 2002).

Uno de los ecosistemas de páramo del departamento de Boyacá es El Macizo Páramo de Rabanal, localizado entre los departamentos de Cundinamarca y Boyacá; por su gran importancia y grado de vulnerabilidad, dicho ecosistema ha sido objeto de numerosos estudios durante los últimos años, que han abordado



temas relacionados con las coberturas y composición de flora y fauna, zonificación y ordenación ambiental, diagnósticos ambientales (IAvH *et al.*, 2008), implementación de viveros comunitarios (Aguilar, 2008), planes de manejo participativo (IAvH *et al.*, 2008a) y formulación de proyectos de restauración ecológica a corto, mediano y largo plazo, entre otros (Morales-P. *et al.*, 2014).

La restauración ecológica implica necesariamente disponer de materiales vegetativos de especies nativas adecuadas para replantación de áreas perturbadas y degradadas. Al respecto un estudio sobre el estado actual del Macizo Páramo de Rabanal (IAvH *et al.*, 2008), indica que algunas especies de la familia Melastomataceae, como ***Bucquetia glutinosa*** (L. f.) DC y ***Monochaetum myrtoideum*** (Bonpl.) Naudin, son de gran utilidad potencial en procesos de restauración y conservación del paisaje, así como para la recuperación de las cuencas hidrográficas del Páramo de Rabanal, principalmente en las regiones circundantes de los municipios de Ventaquemada, Ráquira y Samacá. Tales especies son nativas, silvestres y de uso potencial, puesto que de acuerdo con Lane (2006), los parientes silvestres son una fuente vital de genes de resistencia contra enfermedades, plagas y factores de estrés, como las sequías y las temperaturas extremas, características que, además, son aprovechables en programas de mejoramiento genético (Faciutto y Escandon, 2006).

Sin embargo, en la mayoría de especies nativas, como en las melastomatáceas, la regeneración natural se realiza casi exclusivamente por semilla, cuya producción depende de la duración de los ciclos de floración, de la capacidad de fecundación, fertilidad y germinación de la misma (Pacheco y Castellanos, 2005). Aunque la estrategia reproductiva predominante en melastomatáceas es la





xenogamia (Renner, 1989), muchos géneros son agamospérmicos (producen semillas de forma asexual), fenómeno íntimamente relacionado con la fertilidad del polen e irregularidades meióticas (Goldenberg, 1994), que usualmente termina en la producción de semillas no germinables.

Otros factores, como el gradiente altitudinal, pueden condicionar y determinar el éxito en el establecimiento de la plántula, la tasa de crecimiento y los procesos reproductivos (Smith, 1980). La relación entre aumento de altitud y reducción de tamaño de población, puede ser explicado por condiciones ambientales típicas de ecosistemas paramunos como la falta de nutrientes, causada por las bajas tasas de descomposición de materia orgánica, la presencia de neblina que puede bloquear la transpiración, las heladas y los fuertes vientos (Giles, 1975). Sumado a lo anterior, la madera de muchas especies paramunas es muy apetecida para diversos usos: postes, cercos, materiales de construcción, tutores para cultivos, cabos para herramientas, entre otros (IAvH *et al.*, 2008).

Una característica ecológica importante de *B. glutinosa* y *M. myrtoideum* es la de servir como especies colonizadoras de los bordes de los parches resultantes de la fragmentación que han sufrido algunos bosques, ya que muestran un crecimiento óptimo en zonas de potrero (Diaz *et al.*, 2008). Por esta razón, la replantación de tales bordes con dichas especies permitiría restaurar tanto la continuidad como el equilibrio ecológico en zonas de bosques fragmentados.

Por lo anteriormente dicho, *B. glutinosa* y *M. myrtoideum* son importantes desde el punto de vista ecológico, paisajístico y de conservación y, sobre las cuales, es pertinente realizar estudios conducentes a desarrollar nuevas alternativas de propagación que permitan producir materiales vegetativos utilizables en procesos



de restauración, conservación y, por qué no, fomentar su uso como especies ornamentales. En este contexto, la utilización de técnicas de cultivo *in vitro* es una de las herramientas fundamentales que permite la producción de los materiales vegetativos necesarios para satisfacer la demanda que de ellos existe en la actualidad. Además, los estudios sobre aspectos citogenéticos, estrategias reproductivas y calidad del polen, son aportes significativos al conocimiento de estas especies, de las cuales son pocos los estudios hasta ahora reportados.



## MARCO CONCEPTUAL

### ECOSISTEMAS DE PÁRAMO

Los páramos son considerados islas biogeográficas de alta montaña, resultado de la sinergia entre fenómenos geológicos y climáticos que permitieron la configuración de características edáficas, geomorfológicas e hidrográficas y procesos de adaptación y especiación, conformando comunidades florísticas y faunísticas, endémicas y, por lo general exclusivas (Sarmiento *et al.*, 2013).

La consideración de los páramos como regiones naturales se establece por la relación entre el suelo, clima, biota y la influencia humana (Rangel, 2005). Los páramos presentan una vegetación variable en biomasa, de crecimiento lento, baja productividad primaria, lenta en descomposición de materia orgánica y acumulación de vegetación en pie, donde sobresalen mosaicos de formaciones y asociaciones vegetales como pajonales, frailejones, matorrales, prados y chuscales (García y León 2004).

Dichos ecosistemas presentan elevada radiación solar y baja energía térmica, la temperatura media anual fluctúa entre 4°C y 10°C (Meinzer *et al.*, 1985, Rangel 2005). El páramo presta a la población, directa e indirectamente, grandes servicios tales como captación de carbono atmosférico, que ayuda a controlar el calentamiento global, gran potencial de almacenamiento y regulación hídrica que garantizan el ciclo hidrológico, abastecimiento de agua para consumo y para actividades productivas e hidroenergéticas; además, para áreas de influencia de los principales embalses, represas y estrellas hidrográficas puesto que son la fuente y nacimiento de los principales ríos del país (Hofstede 2003, Ministerio del Medio Ambiente 2002, García y León 2004).

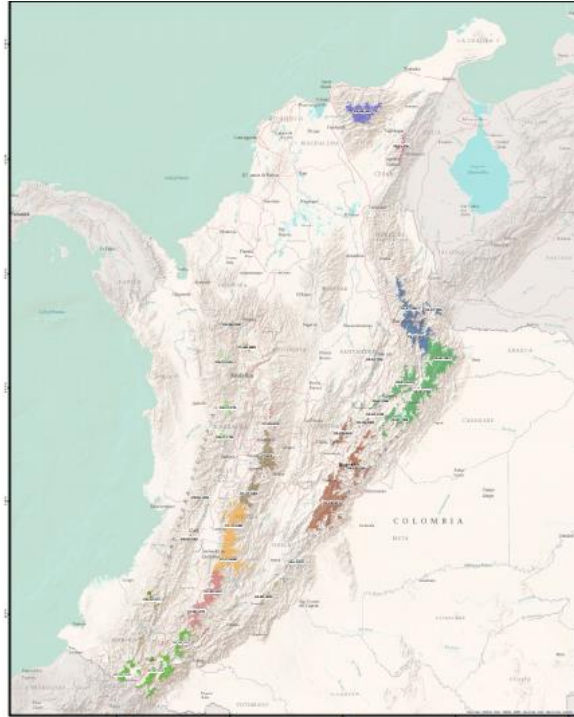


Sarmiento *et al.* (2013), han propuesto una definición que satisface la multiplicidad de visiones y enfoques que hasta ahora ha tenido los páramos, siendo estos, “socioecosistemas propios de la alta montaña ecuatorial ubicado predominantemente entre el límite superior del bosque andino y, si se da el caso, con el límite inferior de los glaciares y bordes de nieve, con predominio de clima frío y relieve modelado predominantemente por la acumulación y retiro de las masas glaciares. Como rasgo distintivo, presentan vegetación de pajonales, frailejonales, chuscales, matorrales y formaciones discontinuas de bosque altoandino, con presencia de turberas, humedales, lagos y lagunas, quebradas y ríos, entre otras fuentes hídricas subterráneas o subsuperficiales. Son, además, territorios pluriétnicos y multiculturales, en la medida que se reconoce que los páramos, en general, han sido habitados, intervenidos y transformados, moldeando los patrones preexistentes. Respecto a la organización de sus ambientes naturales, presenta en el gradiente altitudinal tres franjas generales: el páramo bajo, el páramo alto y el superpáramo. Se incluyen además en esta definición los páramos azonales y aquellos páramos transformados por la actividad humana (páramos antropizados). Los límites altitudinales del páramo varían entre las cordilleras y sus vertientes (exteriores e interiores), debido a factores orográficos, edafológicos y climáticos locales, así como por la trayectoria de las intervenciones humanas. De igual manera que la definición misma la representación cartográfica de los páramos del país está sujeta a la interpretación de los múltiples significados, la escala de mapeo y a la disponibilidad de información que representan las diferentes variables que se pueden derivar de las definiciones previamente propuestas. Hoy en día la disponibilidad de registros biológicos de organismos propios de la alta montaña, imágenes satelitales de alta y media resolución, series de datos climáticos en diferentes escalas, y bases de datos de indicadores socioeconómicos permiten desarrollar diferentes



aproximaciones que pueden dar cuenta de algunas de las definiciones expuestas” (p. 27).

Fisionómicamente, en los páramos se identifica el predominio de vegetación abierta tropicalina, extendida por encima del límite superior de los bosques andinos ecuatoriales de Venezuela, Colombia y Ecuador, con extensiones en Centroamérica, Panamá y Costa Rica, y algunas derivaciones ubicadas en el norte de Perú, llamadas jalcas, consideradas también como regiones paramunas según Cortés y Sarmiento (2013); estos autores, junto con el Ministerio del Medio Ambiente (2002), Castaño-Uribe (2003) y Ospina (2003), afirman que Colombia es considerada como el país núcleo de los páramos, ya que posee la mitad de la superficie de estos ecosistemas a nivel mundial y están distribuidos en las cordilleras Oriental, Central y Occidental y la Sierra Nevada de Santa Marta, abarcan en total 2.906.137 ha. En cuanto a distribución y representatividad del ecosistema de páramo por departamento, Boyacá se destaca con la mayor extensión en el país, y alcanza un 18.3% del área total nacional (Ministerio del Medio Ambiente 2002).



**Figura 1.** Cartografía de páramos de Colombia Esc. 1:100.000 (IAvH, 2012). Fuente: <http://www.humboldt.org.co/images/pdf/CartografiaParamos/1-Mapa%20General-horizontal.pdf>

Teniendo en cuenta la importancia, la condición estratégica, la biodiversidad y servicios ecosistémicos que prestan los páramos, las acciones tendientes a su conservación deben estar enmarcadas en un escenario de planificación, ejecución y monitoreo, definido entre los intereses de la sociedad y el mantenimiento de dichos servicios, con el fin de maximizar el bienestar de las sociedades humanas (PNGIBSE, 2012).



## FAMILIA MELASTOMATACEAE

La familia Melastomataceae es uno de los grupos con mayor representación en el Neotrópico y Colombia, éste es el segundo país con mayor diversidad de especies (aproximadamente 900 especies) distribuidas, principalmente, en los Andes, Chocó Biogeográfico y la Amazonia (Mendoza y Ramírez, 2006). Es la séptima familia más diversa del planeta, con 180 géneros y alrededor de 4400 especies distribuidas en todos los países intertropicales y subtropicales (Quiñones-M. 2001; Penneys 2005).

Según Mendoza y Ramírez (2006), la mayoría de las especies de Melastomataceae se reconocen por la nerviación de sus hojas (acrodódroma), pero, el conjunto de características diagnósticas de la familia comprenden: hojas opuestas, venación acrodódroma, flores dialipétalas, estambres generalmente no muy numerosos (1 a 3 veces el número de pétalos) y flexos durante la fase de botón, conectivo anteridial sencillo o con prolongaciones y fruto capsular o tipo baya.

Renner (1989) estableció que muchas de las especies de Melastomataceae ofrecen polen como única recompensa y son polinizadas por abejas hembras (familias Colletidae, Halictidae, Oxaeidae, Anthophoridae y Apidae) que usan las vibraciones torácicas, transmitidas a las anteras, para coleccionar el polen. Otras especies son visitadas por abejas de tamaño pequeño y mediano del grupo *Trigona*, que obtienen el polen a través de los poros, con sus lenguas o cortando las anteras con sus mandíbulas.

La familia no tiene gran importancia industrial; sin embargo, algunas especies se



usan para tratamiento de heridas, mordeduras de serpientes; también tienen uso alimenticio, debido a que sus frutos son dulces y sus tallos agrios, por lo cual calman la sed. Su madera es utilizada para elaboración de cabos de herramientas, escobas, encofrados, forraje para animales, tinciones, cercas vivas, entre otras (Fierro *et al.*, 2002).

De acuerdo con Albuquerque *et al.* (2013) algunas especies tienen uso potencial para restauración ecológica, ya que actúan como núcleos que atraen a polinizadores y dispersores de semillas, acciones que aumentan el grado de conectividad entre los fragmentos existentes y las zonas en los procesos de restauración ecológica. Por tanto, se estima que el uso de estas especies puede acelerar procesos de restauración ecológica a través de la maximización de las interacciones biológicas; además, existe interés en fomentar y promover el uso ornamental de especies nativas, entre ellas algunas melastomatáceas (Faciutto y Escandón, 2006).

### ***Bucquetia glutinosa* (L. f.) DC**

*Arbusto* de hasta 4 m de altura, con tallo retorcido (tortuoso) del que se desprenden láminas del ritidoma alargadas de color rojizo.

*Hojas* opuestas, con pecíolo de 2,2-8,0 mm; lámina recia, cartácea o subcoriácea, desde elíptico-oblonga hasta elíptico-aovada, de 1,5-5,0 cm de largo por 0,8-2,5 cm de ancho, obtusamente aguda en el ápice, atenuada y subcuneada en la base, entera o débil y párcamente serrulada en la parte superior; 3-nervia o ligeramente 3-plinervia, la haz un poco arrugado, el envés con nervios salientes, venas más o menos obsoletas y diminutos punticos negros en la superficie (Wurdack, 1973).





*Flores*, con cuatro pétalos, densamente agrupadas, con un largo pedicelo grácil de 1,5-2,5 cm, articulado en el vértice; brácteas 2, ovaladas o elípticas, cóncavas, hasta de cerca de 10 mm de largo, obscuramente nervadas, caedizas al llegar la anthesis; hipanto viscoso de 5-6 mm de largo; lóbulos calicinales anchamente triangulares; pétalos violáceos o rosado-violáceos, obovados, de 10-15 mm de largo de vértice redondeado; estambres 8, con filamento rosado de 5,5-7 mm aplanados y estrechados en el vértice; anteras amarillas, oblongas, de 4-5 mm de largo con un pequeño poro apical; conectivo no apendiculado; ovario 4-locular, subesférico y setoso en el vértice; estilo algo arqueado, de 10-12 mm, y estigma puntiforme (Wurdack, 1973).

*Frutos* capsulares, de 1 cm de largo, de color verde, con dehiscencia por poros apicales. Crece en bosques húmedos montanos bajos, bosques secos montanos bajos y muy húmedo montano, entre 2400 y 3100 msnm; se propaga por semillas y, frecuentemente, su madera es usada como leña y para la elaboración de postes para cercas; a veces tiene uso ornamental (Mahecha *et al.* 2004).

### ***Monochaetum myrtoideum* (Bonpl.) Naudin**

*Arbusto* de hasta 2 m de altura, con troncos basales con menos de 1 cm de DAP, glabro, exceptuando ramitas, hojas tiernas e hipanto diminutamente estrellado-furfuráceos al principio, antes de la madurez. *Tallos* jóvenes cuadrangulares, levemente aristados. Ramas jóvenes y peciolo verdes con tintes rojizos (Almeda, 2001).

*Hojas* eventualmente algo viscosas, pecíolo de 0,3-1 cm; lámina rígida, de aovado-oblonga hasta anchamente aovado-elíptica, de 1,5-4 cm de largo por 0,6-1,5 cm de ancho; entera, aguda en el ápice, aguda u obtusa en la base; cortamente (3-)5- nervia, en la haz nítida, en el envés obscuramente punteada



(Wurdack, 1973).

*Inflorescencia* en panículas o cimas terminales o axilares, o flores solitarias; pero muy numerosas, pedicelos de 0,5-1,0 cm. *Flores* 4-meras con bractéolas linear-lanceoladas de algo más de 1 mm, prontamente caedizas; con hipantio angosto de 5-8 mm de largo, ligeramente costillado; sépalos angostamente lanceolados, agudos, de 4-5 mm de largo, persistentes; pétalos violetas, obovados, de 7-10 mm de largo; estambres dimorfos, de color amarillo vivo, de 7-10 mm de largo; anteras mayores subuladas de 5-8 mm de largo y apéndice conectival encorvado de 4,5-6,0 mm de largo; ovario moderadamente furfuráceo con diminutos pelillos estrellados; estilo rosado de 8-10 mm (Wurdack, 1980).

Esta especie y otras del género *Monochaetum*, crecen en sitios húmedos y boscosos de las cordilleras, ocasionalmente en sabanas húmedas y potreros; algunas veces en suelos ácidos y lixiviados, ricos en aluminio, o sobre materia orgánica o sobre suelos turbosos (Calderón y Mendoza, 2000).

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Bucquetia glutinosa* y *Monochaetum myrtoideum*. Tomado de Red Nacional de Jardines Botánicos (2008).

<b>REINO</b>	PLANTAE
<b>CLASE</b>	MAGNOLIOPSIDA
<b>ORDEN</b>	MYRTALES
<b>FAMILIA</b>	MELASTOMATACEAE
<b>GÉNERO</b>	<i>Bucquetia</i> <i>Monochaetum</i>
<b>ESPECIE</b>	<i>B. glutinosa</i> <i>M. myrtoideum</i>



## **Melastomataceae y su potencial para restauración**

Es reconocido que algunas de las especies de esta familia presentan estrategias de vida y adaptaciones, como una gran producción de semillas, dispersión eficiente de propágulos, altas tasas de germinación y de crecimiento; estos atributos propician la activación de procesos ecológicos relacionados con la regeneración natural de hábitats perturbados natural (Elison *et al.* 1993) (Tabla 2). El desarrollo de frutos pequeños y la producción de una gran cantidad de semillas durante todo el año, exhibe tres implicaciones para la restauración, en primera medida, la alta disponibilidad de semillas no previene la mejora de la densidad de las plántulas y el enriquecimiento a través de la siembra de semillas; segundo, las bayas son atractivas para una comunidad diversa de frugívoros generalistas que entregan semillas de otras especies a sitios nucleados y, tercero, las especies con bayas trasplantadas pueden sustituir el uso de perchas artificiales y actuar como peldaños en áreas fragmentadas (Silveira *et al.*, 2013). Además de la abundancia y diversidad en el banco de semillas del suelo, que permite la transferencia de semillas entre sitios conservados cercanos, los altos porcentajes de crecimiento de las plántulas (Ranieri *et al.*, 2003) aumentan tanto la cobertura como la conservación del suelo.



**Tabla 2.** Ventajas y desventajas del uso de melastomatáceas en algunas estrategias de restauración (Tomado de Silveira *et al.*, 2013).

Técnica de Restauración	Ventaja	Desventaja
<b>Protección contra incendios</b>	Un ambiente libre de incendios es probable que aumente el reclutamiento debido a la sensibilidad al fuego de semillas y plántulas	Puede estar implicado en problemas con los agricultores, que requieren pre-acción, movilización social
<b>Perchas</b>	La producción abundante de bayas es atractiva para una amplia gama de vertebrados taxonómicos, la mejora de la nucleación y el bajo costo de implementación	Ninguna
<b>Siembra de semillas</b>	Abundante producción de semillas y bajo costo para la recolección, manipulación y siembra	Bajo reclutamiento de plántulas; sin control del número final de plántulas
<b>Manejo de lluvia de semillas</b>	Gran producción de semillas de vida larga, bajo costo para la recolección de lluvia de semillas	Sin control del número final de plántulas
<b>Bancos de semillas de suelo</b>	Generalidad y abundancia de semillas de Melastomataceae en bancos de semillas tropicales	Puede disminuir la regeneración en fragmentos cercanos
<b>Rebrote de plántulas</b>	Técnica muy limitada	Melastomataceae estudiadas hasta la fecha son sembradas después de una alteración
<b>Trasplante de plántulas</b>	Alta producción de semillas y rápido y fácil crecimiento de plántulas, lo que garantiza el control del número final de plántulas	Costos elevados en la producción de semillas

Una característica importante del uso de melastomatáceas en los programas de restauración, es que estas especies son capaces de crear condiciones adecuadas para el establecimiento de especies de sucesión secundaria y tardía, incluso en suelos contaminados con metales pesados (Rodrigues y Silveira, 2013). De acuerdo con Silveira *et al.* (2013) estas especies son capaces de interactuar con una amplia diversidad de polinizadores y dispersores de semillas; sin embargo, presentan cierta sensibilidad a los incendios, por ende, pueden



tener un rol limitado en la restauración forestal durante etapas sucesionales avanzadas.

## BIOTECNOLOGÍA Y CONSERVACIÓN

La biotecnología es una disciplina científica enfocada a la explotación de las propiedades metabólicas de los organismos vivos para la producción de productos valiosos a diferente nivel estructural y organizacional y en beneficio del hombre (Oksman y Barz, 2002).

Esta disciplina juega un papel importante en los programas de conservación de plantas, preservación y mejoramiento genético, uso eficiente de recursos y producción de plantas con algún grado de amenaza de extinción (Benson, 1999; Bapat *et al.*, 2008). Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales pueden ser aprovechadas para la conservación de la diversidad biológica, mediante la propagación de especies con poblaciones extremadamente pequeñas o con capacidades limitadas de reproducción (Bramwell, 1990), además de la recuperación y reintroducción de plantas en sus hábitats naturales.

Son cuatro las estrategias complementarias para conservar la biodiversidad: *in situ*, *ex situ*, reducción de las presiones antropogénicas y recuperación de las especies en peligro de extinción (Singh *et al.*, 2006). Muchas de las actividades de conservación *ex situ* se han centrado en especies comerciales; sin embargo, la conservación de especies de plantas silvestres y/o endémicas, raras y en peligro de extinción se ha convertido en un tema de gran interés (Engelmann, 2011); de esta forma, los esfuerzos encaminados a la conservación *in situ* y *ex situ* son necesarios y de inmediata aplicabilidad (Wang *et al.*, 1993).



De acuerdo con Paunescu (2009), el avance de la biotecnología proporciona nuevos métodos para la evaluación y conservación de germoplasma vegetal; herramientas como el cultivo *in vitro*, la criopreservación, la citogenética molecular y los marcadores moleculares, ofrecen una alternativa para estudios de diversidad vegetal, gestión de recursos genéticos y para programas de conservación.

El cultivo *in vitro* ha generado un impacto capital en las estrategias de conservación *ex situ*, ya que las técnicas desarrolladas ofrecen nuevas opciones y facilitan la conservación en forma de semillas, polen, embriones y cultivos *in vitro*. Las técnicas *in vitro* que utilizan embriones somáticos o ápices caulinares, vienen contribuyendo al desarrollo de numerosos programas de mejora vegetal, que cada vez más, se aplican a la conservación de especies amenazadas (Bacchetta *et al.*, 2008). La creación de reservas de plantas *in vitro* tiene un beneficio inmediato no solo por la reducción de la presión de colecta sobre las poblaciones silvestres, sino por el suministro continuo de material valioso para la recuperación y restauración de poblaciones silvestres, investigación molecular, estudios ecológicos y usos económicos (Paunescu, 2009).

## **MICROPROPAGACIÓN**

La propagación de un genotipo vegetal a gran escala a través del empleo de técnicas de cultivo de tejidos, es la definición básica de micropropagación (Hartmann *et al.*, 1997 y Olmos *et al.*, 2004). Según Lynch (1999), la micropropagación ha sido un factor clave para el avance del conocimiento de la biología celular, fisiología, bioquímica, y la biología molecular de las plantas. Esta técnica está basada en tres fundamentos principales: la totipotencialidad de las



células vegetales, es decir, la capacidad que poseen para regenerar plantas completas cuando son sometidas a los estímulos adecuados, el control de la promoción de raíces y tallos por la aplicación de reguladores de crecimiento y, la sucesión morfogénica, esto es, proliferación de tallos, elongación y enraizamiento (Lynch, 1999; Olmos *et al.*, 2004).

Las aplicaciones de la micropropagación y del cultivo *in vitro* en general son numerosas y han demostrado ser una herramienta indispensable en muchos campos (Ibañez-Alcocer, 2013). El establecimiento de cultivos *in vitro* es oportuno en estudios de diferenciación celular o morfogénesis (Fukuda *et al.*, 1994) y desde un punto de vista aplicado, permite la obtención de células y plantas bajo presiones de selección experimentales (Ganeshan *et al.*, 1998), y el crecimiento de cultivos con elevada producción de metabolitos secundarios (Verpoorte *et al.*, 1998). Según Ibañez-Alcocer (2013), la capacidad de propagar y almacenar masivamente plantas *in vitro* se aplica a la conservación de la flora amenazada y la multiplicación aséptica de germoplasma.

### **Etapas de la micropropagación.**

Murashige (1974) describió originalmente tres etapas básicas (I a III) para la micropropagación exitosa. El reconocimiento de los problemas de contaminación asociados siempre con el establecimiento *in vitro* de los explantes primarios llevó a Debergh y Maene (1981) a incluir una Etapa 0. Esta etapa describe prácticas específicas de cultivo, las cuales mantienen la sanidad de las plantas madre y disminuyen la frecuencia de contaminación durante el cultivo inicial de explantes primarios. Actualmente, se distinguen cinco etapas (Etapa 0 a IV: Preparación del material vegetal, Establecimiento del cultivo, Multiplicación, Enraizamiento Aclimatización y Endurecimiento) importantes para la micropropagación exitosa.



Estas etapas no solo describen los pasos del procedimiento en el proceso de la micropropagación, también incluyen los diferentes factores que afectan el ambiente de cultivo (Miller y Murashige 1976). El sistema de micropropagación ha sido adoptado por la mayoría de laboratorios comerciales y de investigación pues simplifica los programas de producción, así como la cantidad y costo de los análisis (Kurtz *et al.*, 1991). Los requerimientos para el desarrollo de cada etapa dependerán del material vegetal y de los métodos específicos utilizados (Kane, 2000).

**Etapa 0. Selección de planta donadora:** la elección de la(s) planta(s) donadora(s) o madre, se realiza considerando la sanidad, vigorosidad, edad ontogénica y fisiológica, características de interés y época de colecta de material. Además, se procura aplicar pretratamientos para la preparación del explante o tejidos a emplear (Olmos *et al.*, 2004, Perea y Tirado, 2011).

**Etapa I. Establecimiento *in vitro*:** el objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y asépticos, para lo cual, se realiza selección, aislamiento y desinfección del explante, el cual será inoculado o sembrado en un medio de cultivo artificial de composición química definida, previamente establecido, que garantice las condiciones nutritivas esenciales para su desarrollo (Olmos *et al.*, 2004, Perea y Tirado, 2011).

**Etapa II. Multiplicación o proliferación de brotes:** los explantes desarrollados en la etapa anterior son cultivados en un medio adecuado suplementado con reguladores de crecimiento (auxinas, citoquininas y giberelinas), que promuevan el mantenimiento y la generación de nuevos brotes o propágulos para los posteriores ciclos de multiplicación y las siguientes etapas del proceso (Olmos *et al.*, 2004, Perea y Tirado, 2011).





**Etapa III. Enraizamiento:** en esta etapa se promueve la formación de raíces adventicias en los brotes provenientes de la etapa de multiplicación, para formar plantas completas. Este proceso es de fácil realización en especies herbáceas, de manera contraria a lo que ocurre con plantas leñosas (Olmos *et al.*, 2004, Perea y Tirado, 2011).

**Etapa IV. Aclimatización y Endurecimiento:** las plantas procedentes de la etapa anterior (*in vitro*) son transferidas a condiciones de invernadero y, posteriormente, a su hábitat natural (*ex vitro*), pasando de un medio artificial a un sustrato compuesto por tierra, capote, arena, cascarilla de arroz, turba, entre otros. Los factores temperatura, humedad e iluminación son manipulados paulatinamente, con el fin de producir una adaptación progresiva de las plantas al exterior (Olmos *et al.*, 2004, Perea y Tirado, 2011).

### **Ventajas y limitaciones**

La micropropagación presenta algunas ventajas y limitaciones, las cuales se resumen en la tabla 3 (Olmos *et al.*, 2004, Perea y Tirado, 2011).



**Tabla 3.** Algunas ventajas y limitaciones de la propagación bajo condiciones *in vitro*.

<b>Ventajas</b>	<b>Limitaciones</b>
Producción de un número ilimitado de nuevas plantas en cualquier época del año.	Riesgo de producción incrementada de fenotipos mutantes.
Altas tasas de proliferación en periodos cortos	La producción de materiales es costosa y especializada
Producción de plantas libres de virus.	Ataque de plagas y enfermedades específicas
Control de factores nutricionales, reguladores de crecimiento, luz y temperatura	Mutaciones inducidas no deseadas
No se dependen de ciclos estacionales	Métodos laboriosos y específicos son necesarios para cada especie.
Clonación de plantas difíciles de propagar vegetativamente.	Se debe recuperar la condición autótrofa que pierde el material vegetal al ser cultivado <i>in vitro</i>
Generación de Bancos de Germoplasma	Se requiere capacidad y experiencia en los procedimientos realizados.

### **SISTEMA REPRODUCTIVO.**

La biología reproductiva, a través del estudio del sistema reproductivo, fusiona la ecología de la polinización (diversidad de morfología floral) y el comportamiento de visitantes florales y polinizadores (Waser, 1983); además, proporciona conocimientos para la comprensión de cómo los genes son recombinados y mantenidos por la especie para perpetuar su variabilidad genética natural (Sebbenn *et al.*, 1999) y, por ende, es esencial para el desarrollo de programas



de mejora genética y comprensión de procesos de domesticación de plantas (Silva *et al.*, 2001).

La reproducción en las plantas es afectada por factores ecológicos y genéticos, que generan la aparición de fenómenos de endogamia en las poblaciones, variación espacio-temporal de los taxones de cruzamiento lejano y mecanismos de incompatibilidad (Murawski y Hamrick, 1992); además, variaciones en patrones y duración de la floración y, sincronía y densidad de individuos con flores (Facanali *et al.*, 2009). El estudio de las estrategias reproductivas es de gran importancia en los programas de mejora genética, ya que el mejoramiento difiere entre especies autóгамas o alógamas (Luchi, 1994) y apoya la determinación de la variabilidad genética de las especies (Brasileiro y Amaral, 2007).

Renner (1989) determinó la xenogamia como el sistema reproductivo predominante para la familia Melastomateaceae, la cual es favorecida por la separación espacial entre estigma y anteras y, la necesidad de manipulación, de estas últimas, por vectores para la liberación del polen. La autoincompatibilidad es común en las tribus *Rhexieae*, *Miconieae* y algunas especies de *Melastomeae* y *Microliceae* (Goldenberg y Shepherd, 1998). Sin embargo, estudios recientes han demostrado la ocurrencia de apomixis o agamosperma (Goldenberg y Shepherd, 1998; Melo *et al.*, 1999; Goldenberg, 2000; Santos *et al.*, 2012), que según Mogie (1992) es el fenómeno por el cual una planta es capaz de producir semillas viables sin fusión de gametos o formación de cigoto. Este fenómeno está íntimamente relacionado con la hibridación y poliploidía y como consecuencia produce menor viabilidad de polen en especies no apomícticas (Grant, 1981, Goldenberg, 1994).



### **Autogamia**

Se conoce también como autofecundación, es un sistema de reproducción sexual en el que la planta preferentemente se fecunda así mismo; a diferencia de la alogamia este mecanismo de reproducción no es exclusivo, puesto que todas las especies descritas como autógamas obligadas poseen unos niveles muy bajos de alogamia. Si una especie fuese exclusivamente autógama, estaría condenada al fracaso por no intercambiar genes (Cortez *et al.*, 2012).

Según Bacchetta *et al.* (2008), aunque la autogamia presenta inconvenientes como único mecanismo de reproducción, es considerada una estrategia útil en un momento dado cuando existe un pequeño número de individuos por área, ya que es más importante asegurar el éxito de la propagación que la producción de nuevos genotipos.

### **Xenogamia**

También llamada alogamia o fecundación cruzada, es el mecanismo por el que la planta, aun siendo hermafrodita, se autoimpone barreras de distinta naturaleza para impedir que pueda fecundarse así misma; en otras palabras, las plantas xenógamas se deben cruzar obligatoriamente con otras para formar semillas. En algunas especies la xenogamia es obligada cuando las flores hermafroditas son autoincompatibles, desarrollando obstáculos anatómicos, genéticos y fisiológicos que impiden la germinación del polen o el desarrollo del tubo polínico (Cortez *et al.*, 2012)

Desde el punto de vista evolutivo este sistema de reproducción es el que mejor garantiza el éxito de una especie, ya que elimina la posibilidad de endogamia, favorece la aparición de nuevas combinaciones alélicas dentro de una población y



por ende es una fuente de variabilidad genética, lo cual aumenta las posibilidades de sobrevivencia frente a los cambios del ambiente (Bacchetta *et al.*, 2008).

### **Apomixis**

O agamosperma, es definida como la formación de semillas por vía asexual, a partir de tejidos maternos del óvulo mediante embriogénesis, pero evitando la meiosis y la fertilización. La apomixis se ha descrito en más de 400 especies de más de 40 familias, tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas; se han descrito variantes de la apomixis con desarrollo del saco embrionario (diplosporia y aposporia) y sin desarrollo de saco embrionario (embriónía adventicia) (Cortez *et al.*, 2012).

### **Relación Polen/Ovulo (P/O)**

La relación P/O es un parámetro usado para estimar el tipo de sistema reproductivo de una especie (Cruden, 1977); se determina mediante la relación entre la producción de polen y de óvulos por flor. El valor que se obtiene refleja la eficiencia de la flor durante la transferencia de polen, los valores más bajos de P/O corresponden a plantas de flores cleistógamas (flores que no se abren e inevitablemente son autógamas), mientras que a las xenógamas se les atribuyen los valores de P/O más altos (Tabla 4).



**Tabla 4.** Sistemas reproductivos estimados con los valores medios de P/O, según Cruden (1977).

Sistema Reproductivo	P/O	Log P/O
Cleistogamia	4,7 ± 0,7	0,65 ± 0,07
Autogamia obligada	27,7 ± 3,1	1,43 ± 0,05
Autogamia Facultativa	168,5 ± 22,1	2,15 ± 0,06
Xenogamia Facultativa	796,6 ± 87,7	2,81 ± 0,05
Xenogamia	5895 ± 936,5	3,65 ± 0,06

Para calcular la relación P/O se debe seleccionar entre 10-20 flores de plantas distintas de cada población y se procede a calcular el número de granos de polen, con contador de partículas (Dafni *et al.*, 2005) o de forma manual, mientras que para el cálculo del número de óvulos se disecta el ovario bajo el microscopio estereoscópico y se cuentan todos los óvulos directamente. El valor de P/O de cada flor se calcula dividiendo el valor de la producción de polen por el número de óvulos y, finalmente, se obtiene un valor medio de P/O a partir de todas las muestras (Bacchetta *et al.*, 2008)

### Calidad y viabilidad del polen

La calidad del polen ha sido una expresión controvertida y utilizada indistintamente para referirse a viabilidad y germinabilidad; no obstante, la viabilidad es un término ambiguo que, de acuerdo con Lincoln *et al.* (1982), se ha definido como la capacidad que tiene un grano de polen de vivir, crecer, germinar y desarrollarse, mientras que la germinabilidad se define como la capacidad que tiene el grano de polen de emitir el tubo polínico en condiciones adecuadas (Dafni y Firmage, 2000). Entre los métodos *in vitro* más utilizados para evaluar la calidad del polen están las técnicas de tinción para observar el contenido citoplasmático



(carmín acético, orceína acética, etc.), test enzimáticos (bencidina, sales de tetrazolio, etc.), métodos combinados que permiten determinar la integridad de la membrana plasmática y la presencia de actividad enzimática (reacción fluorocromática mediante diacetato de fluoresceína, DAF) y para evaluar la capacidad de germinación, la germinación del tubo polínico en medio de cultivo (Rejón *et al.*, 2010).

## **CITOGENÉTICA.**

Es la disciplina que estudia la estructura, morfología y comportamiento de los cromosomas y su relación con la transmisión y recombinación de genes (Schubert, 2007). Los estudios citogenéticos han contribuido al entendimiento de la diversidad de cromosomas en diferentes especies (Ibañez-Alcocer, 2013) y han permitido explicar alteraciones en el cariotipo relacionadas con el número y morfología de cromosomas, así como vislumbrar el comportamiento de los cromosomas en mitosis y meiosis (Chester *et al.*, 2010).

Los estudios de citogenética clásica incluyen la utilización de técnicas de coloración convencional como Carmín, Giemsa, Feulgen, entre otros, además del bandeo cromosómico (C, N, Q, CMA/DAPI, entre otros) que permiten la caracterización e identificación de cromosomas. Mientras que la citogenética molecular combina la información citológica clásica con el análisis de las secuencias de ADN y permite el mapeo y la distribución física de secuencias, análisis de relaciones evolutivas y estudio de la organización del genoma y la arquitectura nuclear (Ibañez-Alcocer, 2013). El avance de la citogenética (clásica y molecular) abrió la posibilidad de estudiar regiones específicas de la cromatina,



directamente sobre los cromosomas, gracias a la información derivada de la secuencia misma del ADN, y no solamente por simples características morfológicas (Herrera, 2007).

### **Bandeo cromosómico.**

Es una técnica utilizada para el análisis del cariotipo, (Guerra y Garcia, 2004, Moraes *et al.*, 2007, Barros y Guerra, 2010). Aunque las técnicas de tinción estándar facilitan la determinación de números cromosómicos y sus rasgos morfológicos, no permiten la identificación precisa e inequívoca de todos los cromosomas (Fedak y Kim, 2008); además, la identificación de los diferentes pares de homólogos del cariotipo puede resultar compleja, ya que muchos cromosomas presentan morfología similar, por lo que es necesario la aplicación de tratamientos que revelen regiones cromosómicas con condensación o composición cromatínica diferencial (bandas) y marcadores cromosómicos adicionales (Barros y Guerra, 2010). De esta forma, el tratamiento con una base y la posterior tinción con un colorante, por ejemplo Giemsa, revela regiones de heterocromatina constitutiva y la impregnación argéntica (bandeo Ag-NOR) revela las NORs activas; igualmente, se puede utilizar fluorocromos que tienen la capacidad de intercalarse preferentemente en regiones del ADN con una composición de bases particular, así, regiones ricas en adenina y timina son reveladas con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) o quinacrina, y las ricas en guanina y citosina con CMA3 (cromomicina A3) (Guerra, 2000, Seijo *et al.*, 2004).

### **Heterocromatina (HC)**

Es la fracción de la cromatina que presenta alta condensación durante el ciclo de división celular, principalmente en núcleos en interfase y presenta tinción elevada





con distintos colorantes (Hennig, 1999); la heterocromatina es uno de los componentes cromosómicos con mayor atención de los citogenetistas, debido a que su función es desconocida; no obstante, uno de los aspectos más básicos, pero de ninguna manera menos importantes de la investigación de la HC, es el estudio de su distribución en bloques o bandas a lo largo del cariotipo, cuyo análisis en relación a los patrones de distribución de bandas, permite verificar si las bandas están localizadas preferentemente en ciertas regiones cromosómicas, lo que sugiere que la HC tiene un propósito funcional (Guerra, 2000).

De acuerdo con Summer (1990) y Guerra (2000), la comparación de patrones de bandas de HC de diferentes especies tiene en consideración los siguientes aspectos:

1. La HC no es homogénea, variando cualitativa y cuantitativamente entre especies.
2. Dentro de una sola especie, el polimorfismo para el número y el tamaño de las bandas es frecuente.
3. La cantidad de HC varía independientemente de la cantidad de eucromatina o el contenido de ADN nuclear.
4. Tanto HC como eucromatina pueden sufrir grandes cambios en un tiempo relativamente corto.
5. Diferentes técnicas de tinción pueden revelar diferentes fracciones de HC.
6. Especies muy disímiles pueden presentar diferencias simultáneas en el número de cromosomas, tamaño y morfología, así como en la cantidad, composición y distribución de HC.



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Teniendo en cuenta la evidente necesidad de disponer de materiales vegetativos adecuados y suficientes para los procesos de conservación y de restauración ecológica, las técnicas básicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, entre ellas la micropropagación, son alternativas eficaces a los métodos tradicionales, que en muchos casos son poco productivos, de propagación de especies nativas. Al aplicar dichas técnicas, es posible establecer procedimientos eficaces y rentables que permiten desarrollar programas de multiplicación masiva y mejora genética, sin depender de los ciclos sexuales para la producción de semilla.

Frente a las técnicas habituales de propagación, el desarrollo y aplicación de biotecnologías permite un ahorro considerable de tiempo, de recursos físicos y humanos; además, la pérdida acelerada de recursos genéticos vegetales ha hecho imprescindible el desarrollo de nuevos métodos de conservación *ex situ*, que proporcionan nuevos sistemas para la evaluación y conservación de germoplasma vegetal. Biotecnologías como el cultivo *in vitro*, uso de marcadores moleculares, criopreservación, citogenética, entre otros, ofrecen una excelente alternativa para estudios de diversidad vegetal, gestión de los recursos genéticos y, en este contexto, para programas de restauración y conservación (Paunescu, 2009).

Así mismo, la micropropagación facilita la clonación de individuos, proceso que permite conservar y multiplicar genotipos seleccionados, abriendo la posibilidad de mantener líneas clonales con características fenotípicas de interés específico (Pacheco, 1995). Además, los materiales clonados pueden ser utilizados para el establecimiento de huertos semilleros y de huertos vegetativos, necesarios en



cualquier programa de mejora genética, así como para la conservación y suministro de materiales seleccionados con fines de restauración.

De otro lado, la determinación de estrategias reproductivas y su relación con calidad de polen y aspectos citogenéticos, contribuyen en gran medida al conocimiento básico sobre la identidad y evolución de las especies y la aparición de posibles daños genéticos (Poggio *et al.*, 2004). En especies en las que es poco el avance en dichos aspectos cualquier esfuerzo es significativo, ya que apoya el entendimiento biológico y evolutivo de la familia a la cual pertenecen.

Además, se debe resaltar la escasa investigación para el desarrollo de metodologías de cultivo *in vitro* de especies nativas, principalmente de especies paramunas como *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*, de las cuales no se conoce ningún reporte con enfoque biotecnológico y que, por su eficacia, están llamadas a constituirse en apoyo fundamental para procesos de recuperación, conservación, restauración y uso sostenible de recursos vegetales.



## **ESTADO DEL ARTE**

En la zona del Macizo Páramo de Rabanal se han adelantado algunos proyectos enfocados tanto a la conservación y restauración de los ecosistemas, como al desarrollo de acciones de manejo para recuperación de zonas degradadas. Entre las acciones más importantes se señalan la compra de predios en las zonas de reserva y nacimiento de agua por parte de alianzas entre los municipios, gobernaciones y las corporaciones, tal como lo ha hecho Villapinzón, Lenguaque, Chocontá y Turmequé. También se han formulado planes de manejo para la recuperación del río Bogotá (Morales *et al.*, 2007); al respecto se destaca algunos estudios e investigaciones realizados en esta zona por las corporaciones regionales, el IAvH y el MAVDT.

La CAR, CORPOBOYACÁ y CORPOCHIVOR (2006) caracterizaron las condiciones físico-bióticas, sociales, culturales y económicas de los pobladores de la Cuenca del Río Garagoa y formularon el Plan de Ordenación y Manejo Ambiental, con el cual se propusieron estrategias y acciones para la conservación de esta cuenca.

Vieira (2008), dentro del Convenio Interadministrativo IAvH, CAR, CORPOBOYACÁ y CORPOCHIVOR, realizó un Diagnóstico Sociocultural del Páramo de Rabanal, el cual se utilizó como instrumento para continuar, a través de la construcción colectiva, la formulación e implementación del plan de manejo ambiental para la región. Estas mismas corporaciones, realizaron un estudio sobre el estado actual del Macizo del Páramo de Rabanal y formularon y caracterizaron biofísica y socioeconómicamente las áreas del Páramo de Rabanal y, además, establecieron las bases para la zonificación e incluyen zonas



de conservación y de restauración.

El Plan de manejo ambiental para el Macizo Páramo de Rabanal (IHvA-CAR-CORPOBOYACÁ-CORPOCHIVOR, 2008), fue uno de los soportes para la formulación de proyectos para el manejo del paisaje y restauración ecológica en el Macizo Páramo de Rabanal en áreas protegidas, plantaciones forestales exóticas, restauración de paisajes agropecuarios, de zonas mineras y prácticas de viverismo.

Además, se ha establecido una acción participativa para la implementación de herramientas de manejo del paisaje en la Reserva Forestal el Robledal, así como para la implementación de viveros comunitarios en el área de influencia del páramo de Rabanal (Aguilar, 2008); dicha acción, prioriza tres núcleos de conservación y cinco zonas para el establecimiento de corredores, enriquecimiento de bordes de bosques y matorrales y establecimiento de cercas vivas.

Finalmente, el estudio más reciente contempla el Plan Participativo de Manejo y Conservación del Macizo del Páramo de Rabanal (Tapia, 2009), en el cual se citan tanto las principales problemáticas ambientales como las propuestas de manejo y conservación, gestión social del agua, manejo del paisaje y restauración ecológica, participación, educación y sistemas agropecuarios sostenibles y minería responsable.

De otro lado, a la fecha, no se conocen estudios *in vitro* relacionados *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*. En algunas especies de la familia Melastomataceae se han realizado algunos trabajos de micropropagación, como el de Cid-Barrueto *et al.*



(1997), en el que se reportó el primer protocolo de regeneración de plantas, a partir de hojas y segmentos nodales de plántulas de *Miconia* sp. cultivadas *in vitro*, utilizando diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento. Posteriormente, Song *et al.* (2008), establecieron un protocolo para micropropagación de *Tigridiopalma magnifica* a partir de tejidos foliares cultivados en medio de Murashige and Skoog suplementado BA, TDZ, ANA y AIB.

También, se conoce un protocolo para inducción de callos y multiplicación de brotes a partir de hojas y segmentos nodales de *Memecylon edule* (Elavazhagan y Arunachalam, 2010). Además, Kozak y Wnuk (2012) reportaron que la utilización del medio de Murashige y Skoog, MS, tuvo un efecto positivo sobre el crecimiento de tallo principal y sobre la inducción de brotes axilares en cultivos de *Tibouchina urvilleana*, en comparación con el MS a la mitad de su concentración original, el Woody Plant Medium, WPM (Lloyd & McCown, 1981) y el medio Nitsch & Nitsch (NN) (1969).

En contraste, a la fecha, no se han encontrado estudios sobre sistema reproductivo y calidad de polen en las especies de interés para este trabajo. Otros géneros como *Tibouchina*, *Clidemia*, *Miconia*, *Microlicia*, *Macaire*, *Lavoisiera*, entre otros, han sido objeto de algunos estudios realizados por Goldenberg y Shepherd (1998), Andrade *et al.* (2007) y Santos *et al.* (2012). Renner (1989) determinó que el sistema reproductivo predominante en Melastomataceae es la Xenogamia, aunque algunos géneros como *Miconia* son agamospérmicos (Goldenberg, 2000). Adicionalmente, los trabajos de análisis citogenético en la familia se han enfocado, principalmente, hacia la determinación de números cromosómicos (Almeda, 1993; 1997a; 1997b; 1997c; 2003). Recientemente,



Almeda (2013) reportó el conteo cromosómico en 69 especies en 19 géneros y, además, propuso cinco modelos de citoevolución para la familia. El estudio más actual es realizado por Meyer *et al.* (2018), quienes además de realizar el conteo para 15 especies del género *Chaetogastra*, presentan una discusión en el contexto sistemático con generos relacionados.

Los estudios e investigaciones descritas presentan resultados de caracterización, diagnóstico y proyección ambiental en el Macizo Páramo de Rabanal, sin embargo, no se han implementado estrategias de restauración ecológica ni se ha estudiado la propagación *in vitro* de especies estratégicas a nivel funcional y de paisaje, como *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*. Por tanto, ésta trabajo incluye una metodología que permite la producción de material vegetal de *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*, que en condiciones naturales presentan crecimiento y desarrollolento, con el fin de fomentar la creación de estrategias de restauración. Además, este trabajo pretende la implementación de viveros ecológicos semipermanentes propuestos para la zona de influencia, así como de servir de apoyo directo al Proyecto “Restauración Ecológica de 105 Ha en el Parque Natural Rabanal en el departamento de Boyacá (municipios de Samacá y Ventaquemada) y en el departamento de Casanare (Sabanalarga) Código SGI 1219, Convenio N° 5211740 Ecopetrol-Uptc 2013”.



## OBJETIVOS.

### Objetivo general

Determinar las estrategias reproductivas y los niveles de ploidía, así como los protocolos de micropropagación para *B. glutinosa* y *M. myrtoideum* con fines de restauración, replantación y conservación en el Páramo de Rabanal (Boyacá-Colombia).

### Objetivos específicos

- Establecer un procedimiento para micropropagación de *B. glutinosa* y *M. myrtoideum* a partir explantes primarios obtenidos de plantas localizadas en el Páramo Rabanal.
- Determinar la calidad de polen, la relación polen/óvulo y su correspondencia con los sistemas reproductivos en *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*.
- Obtener y caracterizar los núcleos interfásicos y el cariotipo de *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*.

### PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son las condiciones fisicoquímicas más adecuadas para establecer un protocolo de micropropagación de *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*, que permita la producción de material vegetal suficiente para realizar programas de restauración, recuperación y conservación en el Macizo Páramo de Rabanal-Boyacá?

¿Cómo se relaciona el sistema reproductivo, calidad de polen y la relación polen/óvulo con los niveles de ploidía de *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*?





## REFERENCIAS

- Albuquerque, L.B., Aquino, F. G., Costa, L. C., Miranda., Z. & Sousa, S. R. (2013).  
Especies de Melastomataceae Juss. com potencial para restauração  
ecológica de mata ripária no cerrado. *Polibotánica* [en línea] 2013,  
(Febrero-Sin mes)
- Almeda, F. (1993). *Pilocosta* (Melastomataceae) revisited: a new species,  
polyploidy, and the base chromosome number of the genus. *Novon* 3:311-  
316.
- \_\_\_\_\_. (1997a). Chromosome numbers and their evolutionary significance in some  
Neotropical and Paleotropical Melastomataceae. *BioLlania Ed. Esp.* 6:  
167-190.
- \_\_\_\_\_. (1997b). Chromosomal observations on the Alzateaceae (Myrtales). *Ann.  
Missouri Bot. Gard.* 84:305- 308.
- \_\_\_\_\_. (1997c). Cytological and nomenclatural notes on the Mesoamerican  
species of *Aciotis* (Melastomataceae). *Novon* 7:333-337.
- \_\_\_\_\_. (2001). Melastomataceae, En: W. D. Stevens, C. Ulloa Ulloa, A. Pool & O.  
M. Montiel (eds.). Flora de Nicaragua. *Monographs in Systematic Botany.  
Missouri Botanical Garden* 85: 1339-1419.



- \_\_\_\_\_. (2003). Chromosome cytology and taxonomy of the red goblet-flowered species of *Clidemia* (Melastomataceae: Miconieae) in Central and South America. *Novon* 13:161-169.
- \_\_\_\_\_. (2013). Systematic and phylogenetic significance of chromosome number diversity in some Neotropical Melastomataceae. *Mem. New York Bot. Garden* 108:167-189.
- Aguilar, M. G. (2008). Viveros: Una experiencia comunitaria en el páramo de Rabanal. Proyecto páramo Andino. Informe final Proyecto No 07-06/263-07/408-0523PS. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH), Corporación Autónoma Regional de Boyacá (CORPOBOYACÁ), Corporación Autónoma de Chivor (CORPOCHIVOR), Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR). 35p.
- Andrade, P. M., Forni-Martins, E. R. & Martins, F. R. (2007). Reproductive system of *Eriocnema fulva* Naudin (Melastomataceae), an endemic species of Minas Gerais state, SE Brazil. *Braz. J. Biol.*, 67(2): 313-319.
- Bacchetta, G., Bueno Sánchez, A., Fenu, G., Jiménez-Alfaro, B., Mattana, E., Piotto, B. & Virevaire, M. (eds). (2008). Conservación ex situ de plantas silvestres. Principado de Asturias / La Caixa. 378 pp.
- Bapat, V. A., Yadav, S. R. & Dixit, G.B. (2008). Rescue of endangered plants through biotechnological applications. *Natl. Acad. Sci. Lett.* 31pp.



Barros, A. E. & Guerra, M. (2010). The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotech. Histochem.* 85:115-125.

Benson, E. E. (1999). Cryopreservation. En: Benson, E. E. (ed). 2008. Plant conservation biotechnology, Taylor and Francis, London. 83-95 pp.  
Benson, E. E. 2008 Cryopreservation theory. En: Reed, B.M (ed.). Plant cryopreservation, A Practical Guide, Springer, New York. 15-32 pp.

Bramwell, D. (1990). The role of *in vitro* cultivation in the conservation of endangered species. En: Hernández, B., M. Clemente & V. Heywood (eds.). Proc. Int. Congress of Conserv. *Techniques in Botanic Gardens, Koeltz Scientific Books.* 3(15): 201-210.

Brasileiro, B. P. & Amaral, C. L. (2007). Caracterização do sistema reprodutivo de acessos de *Ocimum* spp. (Lamiaceae) do banco de germoplasma de plantas medicinais da UESB, Bahia, Brasil. *Magistra, Cruz das Almas,* 19(4):333-336.

Calderón, E. & Mendoza, H. (2000). Melastomatáceas de los géneros *Axinaea*, *Blakea*, *Castratella*, *Centronia*, *Killipia*, *Meriania*, *Monochaetum* y *Tibouchina* en Colombia. *Biota Colombiana* 1(3):336-356.

Castaño-Urbe, C. (2003). Aproximación al efecto del global climatic tensor en el bioma páramo. Colombia alto andina y la significancia ambiental del bioma páramo en el contexto de los andes tropicales: una aproximación a los efectos futuros por el cambio climático global (global climatic tensor).



Chester, M., Leitch, A. R., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2010). Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (polyploidy/hybridisation). *Genes* 1: 166-192. Ibañez-Alcocer, M.R. 2013. Propagación *in vitro* y estudio con marcadores moleculares y cromosómicos de *Limonium perplexum* L. Sáez & Rosselló. Tesis Doctoral, Universitat de València Departamento de Biología Vegetal, Valencia España, 107 pp.

Cid-Barrueto, L. P., Adriane-Mendes, C. G., Silvia da B. R. C. & Joao, B. T. (1997). Micropropagation of *Miconia* sp., a woody Melastomaceae from Brazil, using thidiazuron as plant growth regulator. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 9(1):21-25.

Corporación Autónoma Regional De Cundinamarca (CAR), Corporación Autónoma Regional de Boyacá (CORPOBOYACÁ), Corporación Autónoma Regional de Chivor (CORPOCHIVOR) (2006). Plan de Ordenamiento y Manejo Ambiental de la Cuenca del Río Garagoa-Subcuenca del río Machetá. 82 p.

Cortés, D. J. & Sarmiento, C. (Eds). (2013). Visión socioecosistémica de los páramos y la alta montaña colombiana: memorias del proceso de definición de criterios para la delimitación de páramos. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C. Colombia.

Cortez, P. A., Carmello-Guerreiro, S. M. & Teixeira, S. P. (2012). Understanding male sterility in *Miconia* species (Melastomataceae): a morphological



approach. *Australian Journal of Botany, Collingwood*, 60(6):506-516.

Cruden, R. W. (1997). Implications of evolutionary theory to applied pollination ecology. *Acta Horticulturae* 437:27-51.

Dafni, A. & Firmage, D. (2000). Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Syst Evol.* 222:113-132.

Dafni, A., Kevan, P. G. & Husband, B. C. (2005). Practical pollination biology. Enviroquest Ltd., Cambridge, ON, Canada.

Debergh, P. & Maene, L. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. En: Kane, M. 2000. Propagation from preexisting meristems. En R. N. Trigano, & D.J. Gray. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises: 75-85. CRC Press. United States of America.

Elavazhagan, T. & Arunachalam K. D. (2010). *In vitro* Callus Induction and shoot multiplication from nodal explants and leaves of *Memecylon edule*. *Asian Journal of Biotechnology* 2:110-119.

Ellison, A. M., Denslow, J. S., Loiselle, B. A. & Brenés, D. M. (1993). Seed and seedling ecology of neotropical Melastomataceae. *Ecology*, 74:1733-1749.

Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. Invited review. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant.* 47:5-16. DOI 10.1007/s11627-010-9327-2.



- Faciutto, E. & Escandon, A. (2006). Convenio INTA-ICA. Desarrollo de germoplasma nativo con interés ornamental. Instituto de recursos Biológicos, Centro Tecnológico en Floricultura, Fruticultura y Horticultura, INTA Castelar, Buenos Aires.
- Facanali, R., Campos, M. M. S., Pocius, O., Ming, L. C., Soares-Scott, M. D. & Marques, M. O. M. (2009). Biología reproductiva de populações de *Ocimum selloi* Benth. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu 11(2): 141-146.
- Fedak, G. & Kim, N. S. (2008). Tools and methodologies for cytogenetic studies of plant chromosomes. *Cytology and Genetics*. 42:189-203.
- Fierro, A. F., Fernández, D. & Quintana, C. (2002). Usos de Melastomataceae en el Ecuador. *SIDA Contributions to Botany* 20(1):233-260.
- Fukuda, H., Ito, M., Sugiyama, M. & Komamine, A. (1994). Mechanisms of the proliferation and differentiation of plant cells in cell culture systems. *Int. J. Dev. Biol.* 38:287-299.
- Ganeshan, D., Fautrier, A. G. & Conner, A. J. (1998). A cell culture system for somatic cell selection in *Asparagus*. *Plant Tissue Culture Biotechnol.* 4:104-112.
- García, A. & León, P. (2004). Bajo la mentoría de Dra Amelia Mantilla Villegas. Estudio de Antecedentes Sobre el Proyecto de Ley N° 032 de 2003 por



Medio del cual se crean las zona de páramos, bosques de niebla y estrellas hídricas y fluviales y se establecen otras disposiciones para la protección de las fuentes de agua. Congreso de la República de Colombia. Programa de Fortalecimiento Legislativo Oficina de Asistencia Técnica Legislativa.

Giles, E. Jr. (1975). Structure and climate in tropical rain forest. *Annual Review of Ecology and Systematics* 6:67-86.

Goldenberg, R. (1994). Estudios sobre a biologia reproductiva de especies de Melastomataceae de Cerrado em Itiripina, SP. Libro Tesis Maestría en Ciencias Biológicas, área de Biología Vegetal. Universidad de Campinas, Campinas- Brazil. 88p.

Goldenberg, R. & Shepherd, G. J. (1998). Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "Cerrado" vegetation. *Pl. Syst. Evol.* 211:13-29.

Goldenberg, R. (2000). Apomixia como alternativa a reproducao sexuada em Melastomataceae. In: Cavalcanti, T. B., Walter, B. M. T. (Eds.). *Temas atuais de botanica*. Brasília: EMBRAPA – Recursos Geneticos, 225-230.

Grant, V. (1981). *Plant speciation*. New York: Columbia University, 563 p.

Guerra M. (2000). Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet Mol Biol.* 23 (4):1029-1041.

Guerra, M. & Garcia, M. (2004). Heterochromatin and rDNA sites distribution in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximata* Bab. (Convolvulaceae). *Genome* 47:134-140.



Hartmann, H., Kester, D., Davies, F & Geneve, R. (1997). Plant Propagation: Principles and Practices. Ed. Prentice Hall. New Jersey. 770p

Hennig, W. (1999). Heterochromatin. *Chromosoma* 108: 1-9.

Herrera, J.C. (2007). La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales. *Agronomía Colombiana* 25(1): 26-35,

Hofstede, R. (2003). Los páramos en el mundo: Su diversidad y sus habitantes. En: Hofstede, R., P. Segarra & P. Mena (Eds). 2003. Los Páramos del mundo. Proyecto Atlas Mundial de Páramos. Global Peatland Initiative/NC-UICN/EcoCiencia. Quito.

Ibañez-Alcocer, M. R. (2013). Propagación *in vitro* y estudio con marcadores moleculares y cromosómicos de *Limonium perplexum* L. Sáez & Rosselló. Tesis Doctoral, Universitat de Valencia Departamento de Biología Vegetal, Valencia España, 107 pp.

Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humbolt (IAvH), Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR), Corporación Autónoma Regional de Boyacá (CORPOBOYACÁ), Corporación Autónoma Regional de Chivor (CORPOCHIVOR). (2008). Estudio sobre el estado actual del Macizo del Páramo de Rabanal. Convenio interadministrativo No. 07-06-263-048 (000404). 544p.

\_\_\_\_\_. (2008a). Plan de manejo ambiental del Macizo del Páramo de Rabanal. Componente Programático. Convenio interadministrativo No. 07-





06-263-048 (000404). 77p.

IAvH. (2012). Cartografía de páramos de Colombia Esc. 1:100.000. Proyecto: Actualización del Atlas de Páramos de Colombia. Convenio Interadministrativo de Asociación 11-103, Instituto Humboldt y Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Bogotá D.C. Colombia.

Luchi, V. L. (1994). Morfologia, biologia floral, propagação e crescimento de “rainha do abismo” (*Sinningia leucotrichia* Hoene) Moore. 1994. 168 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. En: Campos, F.C. 2010. Biologia reprodutiva de *Tibouchina heteromalla* Cogn. (Melastomataceae) e *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG. 83 p.

Kane, M. (2000). Propagation from preexisting meristems. En: R. Trigano, & D. Gray. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press. United States of America. 75-85 pp.

Kozak, D. & Wnuk, K. (2012). The influence of the salt composition of basal medium and growth regulators on *in vitro* growth and development of *Tibouchina urvilleana* (DC.) Cogn. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus* 11(6): 59-68.

Kurtz, S., Hartmann, R. & Chu, I. (1991). Current methods of commercial micropropagation. En: Kane, M. 2000. Propagation from preexisting



meristems. En: R. N. Trigano, & D. J. Gray. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises: 75-85. CRC Press. United States of America.

Lane, A. (2006). Una introducción a los parientes silvestres de cultivos. © Bioversity International En: Ruth, D. Raymond. 2006. Parientes silvestres de cultivos © Bioversity International.

Lincoln, R J., Boxshall, G. A. & Clark, P. F. (1982). A dictionary of ecology, evolution and systematics. New York: Cambridge University Press, p. 298.

Lloyd, G. & McCown, B. (1981). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 30: 421-427.

Lynch, P. T. (1999). Tissue culture techniques in *in vitro* plant conservation. En: Benson, E. (ed.), Taylor & Francis. Plant conservation biotechnology. 41-62 pp.

Mahecha, G., Ovalle, A., Camelo, D., Rozo, A. & Barrero, D. (2004). Vegetación del territorio CAR. 450 especies de sus llanuras y montañas. Bogotá, Colombia.

Meinzer, F., Goldstein, G. & Rundell, P. (1985). Morphological changes and altitudinal gradient and their consequences for an Andean giant rosette plant. *Oecologia.* 65:278-283.



Melo, G. F., Machado, I. C. & Luceño, M. (1999). Reproducción de tres especies de *Clidemia* (Melastomataceae) en Brasil. *Revista de Biología Tropical* 47:359-363.

Mendoza, H. & Ramírez, B. (2006).- Guía ilustrada de géneros de Melastomataceae y Memecylaceae de Colombia. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt - Universidad del Cauca.

Meyer, F. S., Braga, K. R., Forni-Martins, E. R., & Goldenberg, R. (2018). Chromosome *Chaetogastra* (Melastomataceae, Melastomateceae). *Brittonia*, 1-8.

Miller, L. & Murashige, T. (1976). Tissue culture propagation of tropical foliage plants. En: Kane, M. 2000. Propagation from preexisting meristems. En: R. N. Trigano & D. J. Gray. *Plant tissue culture concepts and laboratory excercises*. 75-85 pp. CRC Press. United States of America

Ministerio del Medio Ambiente. (2002). Programa para el manejo sostenible y restauración de ecosistemas de la alta montaña colombiana: páramos. República de Colombia. Ministerio del Medio Ambiente. Dirección General de Ecosistemas. Bogotá D.C. 72p.

Mogie, M. (1992). *The evolution of asexual reproduction in plants*. London: Chapman & Hall, 276p.



- Moraes, A.P., Soares Filho, W. S. & Guerra, M. (2007). Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Res.* 15:115-121.
- Morales, M., Otero, J., van der Hammen, T., Torres, A., Cadena, C., Pedraza, C., Rodríguez, N., Franco, C., Betancourth, J. C., Olaya, E., Posada, E. & Cárdenas, L. (2007). Atlas de páramos de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos. Alexander von Humboldt. Bogotá, D. C. 208 p.
- Morales-P., M. E., Pacheco-C., J., Diaz, C., Gil, P., Simbaqueba, A., Medina, W., Alvarado, V., Zabala, J., Gil, J., Muñoz, J., Macana, D., Carrillo, M & Sanchez, L. (2014). Restauración ecológica de 105 ha en el Parque Natural Regional Rabanal, en el departamento de Boyacá (municipios de Samaca y Ventaquemada) y en el departamento de Casanare (municipio de Sabanalarga). Proyecto 6. SGI 1219. Convenio No. 5211740 Ecopetrol-Uptc 2013.
- Murashige, T. (1974) Plant Propagation through Tissue Cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 25, 135-166.
- Murashige, T & Skoog, (MS). (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Phys. Plant.* 15:473-497.
- Murawski, D. A., & Hamrick, J. L. (1992). Mating system and phenology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in central Panama. *Journal of Heredity, Washington.* 83(1):401-404.



Nitsch, J. P., & Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science* 163:85-87.

Oksman, C. M. & Barz, W. H. (2002). Plant Biotechnology—An Emergin. New York: Marcel Dekker. 19-29 pp. En: Plant Biothechnologyand trasnsgenic plants. New York: Marcel Dekker. Plant Biothechnologyand trasnsgenic plants. New York: Marcel Dekker.194 pp.

Olmos, S., Luciani, G. & Galdeano, E. (2004). Parte V métodos de propagación y conservación de germoplasma. Micropropagación. En: Levitus, G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopps & L. Mroginski. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. 161-172 pp.

Ospina, M. (2003). El páramo de Sumapaz un ecosistema estratégico para Bogotá. Sociedad Geográfica de Colombia. Academia de Ciencias Geográficas. 1-17 pp.

Pacheco, J. (1995). Revigorizacion de material adulto de *Pinus nigra* Arn: Criterios morfológicos y moleculares. Ph.D. Tesis Doctoral. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo, Oviedo-España. 95 p.

Pacheco, J. & Castellanos M. C. (2005). Roble y pino colombiano: Aspectos biotecnológicos. Colombia. Ed: Publicaciones E Imprenta Uptc ISBN: 9586601021. Pags. 218



- Paunescu, A. (2009). Biotechnology for endangered plant conservation: A critical overview. Review. Romanian Biotechnological Letters. Bucharest University Printed in Romania. *Romanian Society of Biological Sciences. Romania*. 14(1):409-410.
- Penneys, D. S. (2005). Página WEB Melastomataceae. Webmaster: dpenneys@ufl.edu Page last updated: 13 March. En: Mendoza, H. & Ramírez, B. 2006. Guía ilustrada de géneros de Melastomataceae y Memecylaceae de Colombia. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt - Universidad del Cauca.
- Perea, M. & Tirado, A. (2011). Cultivo de tejidos *in vitro*. Manual de prácticas de laboratorio. Facultad de Ciencias Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- PNGIBSE. (2012). Política Nacional para la Gestión Integral de la Biodiversidad y los Servicios Ecosistémicos. Bogotá, D.C.: Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible. 133 p.
- Poggio, I., González, G., M. Ferrari, A. García, A. Wulff, A. Greizerstein, P. Tomas & G. Schrauf. (2004). Aportes de la citogenética al estudio de genomas vegetales. En: Levitus, G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp & L. Mroginski (eds). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. 337 pp.
- Quiñones-M., L. M. (2001). Diversidad de la familia Melastomataceae en la Orinoquia colombiana. Biblioteca José Jerónimo Triana No. 5



- Ranieri, B. D., Lana, T. C., Negreiros, D., Araújo, L. M. & Fernandes, G.W. (2003). Germinação de sementes de *Lavoisiera cordata* e *Lavoisiera francavillana* (Melastomataceae), espécies simpátricas da Serra do Cipó, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 17:523-530.
- Rangel, J. (2005). Biodiversidad en la región del páramo: con especial referencia a Colombia. 25 pp.
- Red Nacional de Jardines Botánicos. (2008). Fichas de especies de plantas útiles de los jardines botánicos de Colombia (L.f.) DC.
- Rejón, J. D., Suárez, C. G., Alché, J. D., Castro, A. J. & Rodríguez-García, M. I. (2010). Evaluación de diferentes métodos para estimar la calidad del polen en distintos cultivares de olivo (*Olea europaea* L.) *Polen*, 20:61-72.
- Renner, S. S. (1989). Systematic studies in the Melastomataceae: *Bellucia*, *Loreya*, and *Macairea*. *Mem. New York Bot. Gard.* 50:1-112.
- Rodrigues, E. R. S. & Silveira, F. A. O. (2013). Seed germination requirements of *Trembleya laniflora* (Melastomataceae), an endemic species from Neotropical montane rocky savannas. *Pl. Species Biol.* 28:165-168.
- Santos, A. P. M., Fracasso, C. M., Santos, M. L., Romero, R., Sazima, M. & Oliveira, P. E. (2012). Reproductive biology and species geographical distribution in the Melastomataceae: a survey based on New World taxa. *Annals of Botany*. 110:667-679.



- Sarmiento, C., Cadena, C., Sarmiento, M., Zapata, J. & León, O. (2013). Aportes a la conservación estratégica de los páramos de Colombia: Actualización de la cartografía de los complejos de páramo a escala 1:100.000. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C. Colombia.
- Schubert, I. (2007). Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 109-115.
- Sebbenn, A. M., Siqueira, A. C., Kageyama, P. Y. & Dio Junior, O. J. (1999). Variação genética entre e dentro de populações de amendoim: Pterogyne nitens. *Scientia Florestalis, Piracicaba*. 56(1):29- 40.
- Seijo, G., Lavia, G. I., Robledo, I., Fernández, A. & Solís-Neffa, V. (2004). La citogenética molecular e inmunocitogenética en el estudio de los genomas vegetales. En: Levitus, G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp & L. Mroginski (eds). *Biotechnología y mejoramiento vegetal II*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. 337 pp.
- Silva, R. M., Gerhard-Bandel, M. I. & Martins, P. S. (2001). Biología reproductiva de etnovariedades de mandioca. *Scientia Agrícola, Piracicaba*. 58(1):101-107.
- Silveira, F. A. O., Fernandes, G. W. & Lemos, J. P. (2013). Seed and seedling ecophysiology of Neotropical Melastomataceae: implications for conservation and restoration of savannas and rainforests. *Mo Bot Gard* 99:82-99.





- Singh, J., Singh, S. & Gupta, S. (2006). Ecology, environment and resource conservation. Anamaya Publishers, New Delhi, India.
- Smith, A. (1980). The paradox of plant height in Andean giant rosette species. *Journal of Ecology*. 68:63-73.
- Song, J. Z., Nali, L., Wu, K. L., Chen, Z. L. & Duan, J. (2008). Plant regeneration from Explants of *Tigridiopalma magnifica* (Melastomataceae). *Pak. J. Bot.*, 40:1179-1184.
- Summer, A. T. (2003). Chromosomes: organization and function. Blackwell Publishing Company, Berlin 286 pp.
- Tapia, C. (2009). Plan participativo de manejo y conservación del macizo del Páramo de Rabanal. Instituto Alexander von Humboldt Contribución IAvH 425. 09 p.
- Verpoorte, R., van der Heijden, R., Ten Hoopen, H. J. G. & Memelink, J. (1998). Metabolic engineering for the improvement of plant secondary metabolite production. *Plant Tissue Culture Biotechnol.* 4:3-20.
- Vieira, M. (2008). Diagnóstico sociocultural páramo de Rabanal. Disponible en <http://co.chmcbd.net/servicios/jsp/buscador/documentos/Diagnostico%20sociocultural%20Páramo%20de%20Rabanal.pdf>.



Wang, B., Charest, P. & Downie, B. (1993). *Ex situ* storage of seeds, pollen, and *in vitro* cultures of perennial woody plant species. FAO Forestry Paper. 113: 83 pp.

Waser, N. M. (1983). Competition for pollination and floral character differences among sympatric plant species: A review of evidence. In: Handbook of Experimental Pollination Biology, eds. C. E. Jones and R. J. Little, Van Nostrand Reinhold, N.Y., 277-293.

Wurdack, J. J. (1973). Melastomataceae (Memecyleae by T. Morley). En T. Lasser (ed.), Flora de Venezuela, No. 8 (pp. 1-819). Caracas: Instituto Botánico, Ministerios de Agricultura y Cría.

Wurdack, J. J. (1980). Melastomataceae. En: G. Harling y B. Sparre (eds.). Flora of Ecuador. No. 13. Univ. Göteborg y Riksmuseum, Stockholm.



## PRODUCTOS GENERADOS DE ESTA TESIS

Propagación *in vitro* de *Bucquetia glutinosa*, especie endémica de los páramos colombianos. Aceptado para publicación Revista *Rodriguésia*

X Encuentro Facultad de Ciencias, II Encuentro Nacional Ciencia, Tecnología e Innovación en la Sociedad. XIX Jornada de la Investigación. Ponencia: Establecimiento de Cultivos *in vitro* de *Bucquetia glutinosa* (Melastomataceae), Octubre de 2015, Tunja – Colombia.

II Congreso Latinoamericano III Nacional de Alta Montaña Tropical. UPTC Ponencia: Biología Reproductiva de *Bucquetia glutinosa* presente en el Páramo de Rabanal, Boyacá-Colombia, Octubre de 2016, Tunja – Colombia.

Pasantía Internacional: Laboratorio de Citogenética y Diversidad Vegetal (LCDV) Universidad Estadual de Londrina, Brasil. Mayo-Agosto 2016.



## CAPITULO 2.

### PROTOCOLO PARA MICROPROPAGACIÓN DE *Bucquetia glutinosa* Y *Monochaetum myrtoideum*

#### RESUMEN

Se establecieron los protocolos para multiplicación *in vitro* de *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*, especies utilizables en programas de conservación y restauración de ecosistemas paramunos. Los cultivos *in vitro* se establecieron, a partir de semillas colectadas en el Páramo de Rabanal (Boyacá-Colombia). Un 57% de semillas asépticas de *Bucquetia* se obtuvo utilizando NaOCl al 5 y 10% durante 15 minutos; después de 30 días de cultivo en MS-1 el 61,4% de las semillas germinaron y desarrollaron plántulas de apariencia normal. El 75% de las plántulas desarrolladas se cultivaron MS/2+0,5 mg l-1 AIB y alcanzaron una longitud promedio de 2,06 cm y formaron hasta 10 yemas axilares; y después de 60 días de cultivo se individualizaron 2-4 brotes basales de 2 cm de longitud. La germinación (43%) de semillas de *M. myrtoideum* se logró en MS/4, previamente esterilizadas superficialmente con NaOCl al 10% (v/v) durante 15 minutos (98,5% de semillas asépticas). La multiplicación de microtallos se realizó en MS/2+0,02 mg/L de AIB, medio en el que, después de 60 días de cultivo se produjeron microtallos con longitud promedio de 3 cm, con cuatro yemas axilares, con seis a siete raíces y cuatro brotes individualizables. Tanto en *B. glutinosa* como en *M. myrtoideum* se presentó desarrollo de raíces y multiplicación de microtallos de manera simultánea. Las plántulas mostraron un 94,4% (*B. glutinosa*) y un 80,6% (*M. myrtoideum*) de sobrevivencia durante la aclimatación en invernadero, en un sustrato compuesto por tierra y capote (1:1). En este trabajo se presentan los primeros protocolos de micropropagación de melastomáceas nativas colombianas, de uso potencial en la restauración y conservación de ecosistemas alto andinos en estado de deterioro y vulnerabilidad.



**Palabras clave:** Melastomataceae, plantas nativas, propagación *in vitro*, restauración, semillas.

## INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas paramunos han venido siendo afectados negativamente tanto por la alteración de las condiciones climáticas como por el desarrollo de actividades antrópicas; el uso que el hombre le ha dado a los suelos de páramo se ve reflejado en su transformación y en el deterioro de muchas especies nativas de gran importancia para el equilibrio natural de los páramos (García y León, 2004; Sarmiento *et al.*, 2013). Según el IAvH *et al.* (2008), por ser una de las principales fuentes abastecedoras para muchos sistemas hídricos, el Macizo Páramo de Rabanal es un ecosistema de gran importancia para los departamentos de Boyacá y Cundinamarca; no obstante, la intervención humana ha transformado, casi por completo, su paisaje y su riqueza natural. Por dicha razón surge la necesidad de emprender acciones conducentes no solo a la conservación, sino a la restauración y rehabilitación de estos sistemas estratégicos, que proporcionan al hombre servicios tan indispensables como captación de carbono atmosférico (ayudando al control del calentamiento global) y el suministro de agua potable (Hofstede, 2003).

Con mucha frecuencia los procesos de restauración ecológica se ven considerablemente afectados por la escasez de propágulos de especies claves (nativas) que inicien la sucesión, o de especies en estado sucesional avanzado que permitan recuperar la estructura y composición del área a restaurar (Cubiña y Aide, 2001, Florentine y Westbrooke, 2004, Cardona y Vargas, 2008, Romero *et al.*, 2016). Especies nativas, entre ellas algunas de la familia Melastomataceae,



como *Bucquetia glutinosa* (L. f.) DC y *Monochaetum myrtoideum* (Bonpl.) Naudin, son de gran utilidad potencial en procesos de restauración y conservación del paisaje, así como para la recuperación de las cuencas hidrográficas; su óptimo crecimiento y desarrollo en zonas de potrero, las caracteriza como especies colonizadoras de los bordes de los parches resultantes de la fragmentación que han sufrido algunos bosques (Díaz *et al.*, 2008, Velazco-Linares *et al.*, 2008).

Adicionalmente, debido a sus vistosas flores y follajes llamativos, algunos de los géneros de la familia, entre éstos *Bucquetia* y *Monochaetum*, son de uso potencial ornamental (Smith *et al.*, 2004, Woodgyer, 2009), aspecto que puede ser explotado como una característica de interés que permite promover el uso de especies nativas como nuevas variedades de plantas ornamentales (Ibáñez-Alcocer, 2013). No obstante, la mayoría de especies nativas se reproducen por semilla sexual, y la rapidez de la multiplicación depende de la duración de los ciclos de floración, de la capacidad de fecundación, fertilidad y germinación de la misma (Pacheco & Castellanos, 2005), factores que, además, en algunas ocasiones presentan dificultades o son inciertas, pues están determinadas tanto por la dispersión como por la disponibilidad de sitios para su establecimiento y desarrollo (Schupp *et al.*, 2010).

En este contexto, el desarrollo de biotecnologías relacionadas con procedimientos de propagación masiva de especies silvestres, sobre todo de aquellas que por muy diversas razones se encuentran en estado de vulnerabilidad y amenaza de extinción (Bapat *et al.*, 2008; Bacchetta *et al.*, 2008; Paunescu, 2009; Ibáñez-Alcocer, 2013; Pathak y Abido, 2014) o que son necesarias para procesos de restauración, es una alternativa efectiva que puede contribuir a la conservación de los ecosistemas en general y de los páramos en



particular (Engelmann, 2011, Cruz-Cruz *et al.*, 2013, Ibáñez-Alcocer, 2013). Por dichas razones, el objetivo de este estudio fue establecer un procedimiento adecuado para multiplicar, bajo condiciones *in vitro*, plántulas de *Bucquetia glutinosa* y *Monochaetum myrtoideum* a partir de semillas, que posteriormente puedan ser utilizables en procesos de restauración y conservación del Páramo de Rabanal, Boyacá (Samacá y Ventaquemada).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales Bioplasma de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, siguiendo algunas de las consideraciones propuestas por Cid-Barrueto *et al.* (1997) para *Miconia aff. cinnamomifolia*. En febrero y marzo de 2014 se colectaron frutos maduros de poblaciones de plantas adultas de *Bucquetia glutinosa* y de *Monochaetum myrtoideum* entre Octubre y Noviembre de 2015; las poblaciones de ambas especies están localizadas en el Páramo de Rabanal, sector Matanegra de la Vereda Montoya (05°24'N 73°32'W), a 3370 m de altitud, en el municipio de Ventaquemada, Boyacá-Colombia.

### **Asepsia superficial de semillas y establecimiento de cultivos *in vitro***

En el laboratorio, bajo estereomicroscopio, las semillas se extrajeron manualmente de los frutos usando bisturí y pinzas de punta fina; para la asepsia superficial, en cámara de flujo laminar, se agruparon en lotes de 100 semillas, contenidos en bolsas de muselina estéril; posteriormente se sumergieron en 50 ml de agua destilada estéril con Tween 20 (0,1%, v/v) por un minuto, seguido de una inmersión en Alcohol al 70% (v/v) durante 30 segundos e inmersión en Hipoclorito de Sodio (NaOCl) o Hipoclorito de Calcio (Ca(ClO)<sub>2</sub>) a diferentes



concentraciones y tiempos de exposición (Tabla 1). Finalmente se enjuagaron cuatro veces (un minuto cada una) con agua destilada estéril.

**Tabla 1.** Tratamientos para asepsia superficial de semillas de *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*. NaOCl: Hipoclorito de Sodio; Ca (ClO)<sub>2</sub>: Hipoclorito de Calcio.

Trato.	<i>Bucquetia glutinosa</i>		<i>Monochaetum myrtoideum</i>	
	Agente desinfectante	Tiempo exposicion (min.)	Agente desinfectante	Tiempo exposicion (min)
T1	NaOCl 5% (v/v)	10	NaOCl 5% (v/v)	8
T2	NaOCl 10% (v/v)	10	NaOCl 5% (v/v)	15
T3	Ca(ClO) <sub>2</sub> 5% (p/v)	10	NaOCl 10% (v/v)	8
T4	Ca(ClO) <sub>2</sub> 10% (p/v)	10	NaOCl 10% (v/v)	15
T5	NaOCl 5% (v/v)	15	-	-
T6	NaOCl 10% (v/v)	15	-	-

Posteriormente, las semillas desinfectadas se cultivaron durante 30 días en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin reguladores de crecimiento (T1), MS con sales minerales (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>+2H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>+7H<sub>2</sub>O) diluidas a 1/2 (MS/2, T2) y a 1/4 (MS/4, T3), MS/2 con 3 mg l<sup>-1</sup> de Tiamina, Piridoxina, Ácido Nicotínico y Pantotenato de Calcio (MS<sup>-1</sup>, T4) (Cid- Barrueto *et al.*, 1997) y en agua destilada estéril (T5). En cada tratamiento se cuantificó el porcentaje de semillas germinadas y la contaminación por hongos y bacterias.

### **Multiplicación y enraizamiento de brotes.**

Previa eliminación de la raíz, las plantas obtenidas de la etapa anterior se transfirieron a diferentes medios de multiplicación propuestos por Barrueto *et al.* (1997) y Kozak y Wnuk (2012) para otras especies de melastomatáceas, MS completo y MS/2 suplementados con Ácido indolacético (AIA), Bencil Adenina



(BA), Acido Giberelico (GA<sub>3</sub>) y/o Ácido Indolbutírico (AIB) (Tablas 2 y 3). Después de 60 días de cultivo (con un subcultivo a 30 días), se cuantificó la longitud total promedio de microtallos, el promedio de yemas axilares basales desarrolladas y el porcentaje de microtallos enraizados.

**Tabla 2.** Composición de los medios de cultivo utilizados para multiplicación y enraizamiento de microtallos de *B. glutinosa*. T1: propuesto por Barrueto *et al.* (1997), T2: propuesto por Kozak y Wnuk (2012), T3-T4: modificaciones realizadas con base en T1 y T2. MS/2: Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con sales minerales reducidas a la mitad de su concentración original; ANA: Ácido Naftalen-acético, AIA: Ácido Indol-acético, BA: Bencil-adenina, AIB: Ácido Indol-butírico; GA<sub>3</sub>: Ácido Giberélico. Cantidades dadas en mg L<sup>-1</sup>.

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



**Tabla 3.** Composición de los medios de cultivo utilizados para la multiplicación y enraizamiento de microtallos de *M. myrtoideum*. T1: propuesto por Barrueto *et al.* (1997), T2: propuesto por Kozak y Wnuk (2012), T3-T4: modificaciones realizadas con base en T1 y T2. MS/2: Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con sales minerales reducidas a la mitad de su concentración original; ANA: Ácido Naftalen-acético, AIA: Ácido Indol-acético, BA: Bencil-adenina, AIB: Ácido Indol-butírico; GA<sub>3</sub>: Ácido Giberélico. Cantidades dadas en mg L<sup>-1</sup>.

Componentes	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Macroelementos	MS/2	MS	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2	MS/2
Microelementos	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Mioinositol	50	100	100	100	100	100	100
Pantotenato de Calcio	1,0	--	--	--	--	--	--
Tiamina	1,0	0,1	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Ácido Nicotínico	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Piridoxina	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Glicina	--	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Sacarosa	3%	3%	3%	3%	3%	3%	3%
Carbón activado	--	--	--	--	--	3,0	--
ANA	0,1	-	--	--	--	--	--
AIA	--	0,5	--	--	--	--	--
BA	0,2	1,0	--	--	--	--	--
GA <sub>3</sub>	0,7	--	--	--	--	--	--
AIB	--	--	0,1	0,2	0,5	0,2	0,02

### Aclimatización

Plántulas obtenidas en la etapa anterior se extrajeron de los recipientes de cultivo, se les eliminó el agar adherido a las raíces con agua corriente y se transfirieron a un sustrato compuesto por tierra y capote (mantillo de bosque), en proporción 1:1, contenido en bandejas de icopor de 21 x 21 x 5.5 cm. Las bandejas se colocaron dentro de cajas de vidrio de 50 x 30 x 10 cm, cubiertas con plástico extensible; las condiciones del ambiente interior de las cajas fueron 23°C y humedad relativa de 97%. Las cajas se mantuvieron en cuarto de incubación y las bandejas se regaron diariamente por aspersion manual.



Después de 15 días, el plástico extensible se eliminó de forma progresiva. Posteriormente, las plántulas se transfirieron a bolsas de encapachar de 10 x 15 cm con tierra y capote (1:1) se llevaron a invernadero y se regaron cada tres días por aspersión manual, durante 30 días. En esta etapa se cuantificó el porcentaje de plántulas viables.

### **Condiciones generales de cultivo y análisis de datos.**

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

Los explantes se cultivaron en recipientes de vidrio de 100 ml, con alícuotas de 20 ml de medio de cultivo, con pH 5,8 ajustado con HCl y/o NaOH (1N), gelificado con agar-agar, 6,5 g/L, y esterilizado en autoclave a 15 psi y 121°C durante 20 minutos. Los cultivos se incubaron a 24±1°C con iluminación continua de 70-80 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, suministrada por lámparas fluorescentes de 75W.

Los datos se procesaron en el programa IBM SPSS Statistics versión 22; para determinar diferencias significativas entre los tratamientos de asepsia superficial y germinación de semillas se realizó la prueba de Chi<sup>2</sup>, para los datos de multiplicación la prueba H de Kruskal-Wallis para muestras independientes y para observar el comportamiento multivariable de los tratamientos ensayados, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) utilizando el programa PAST versión 3.06; los datos de aclimatización se registraron y analizaron como porcentajes.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Asepsia superficial de semillas y establecimiento de cultivos *in vitro***

Los procedimientos de desinfección realizados con *B. glutinosa*, permitieron obtener un 42,8% (642) de semillas asépticas; en los tratamientos en los que se usó Hipoclorito de sodio como agente desinfectante (T1, T2, T5 y T6) el 57% de las semillas cultivadas resulto superficialmente asépticas, mientras que con Hipoclorito de calcio (T3 y T4) tan solo se cuantificó un 14,4%. No obstante, los tratamientos en los que se expusieron las semillas al NaOCl durante 15 minutos (T5 y T6) fueron en los que no se observó desarrollo de microorganismos (100% de semillas asépticas). En *M. myrtoideum* el porcentaje promedio total de semillas asépticas fue 56,3%; y de forma similar a *B. glutinosa*, los tratamientos en los que se obtuvo mayor porcentaje de semillas asépticas fueron aquellos en los que la inmersión en el agente desinfectante, NaOCl, fue más prolongada, T2 (93,5%) y T4 (98,5%) (Tabla 1).

En los resultados de la prueba Chi<sup>2</sup> se observa un efecto proporcional entre concentración-tiempo de inmersión del NaOCl y porcentaje de contaminación; en este sentido Diomedi *et al.* (2017), han afirmado tanto la concentración como el tiempo de inmersión es determinante en la eliminación de microorganismos, tal como lo indican los resultados de este estudio, siendo evidente que a medida que aumentó la concentración del agente desinfectante y el tiempo de exposición, disminuyó el porcentaje de contaminación: T1 y T2 vs. T5 y T6 en *B. glutinosa* ( $X^2= 31,104$ ) y T1 vs. T2 en *M. myrtoideum* ( $X^2= 13,05$ ) (Tabla 4). Resultados semejantes se han reportado para *Fragaria X ananassa* Duch, utilizando concentraciones de 10, 20 y 30% de NaOCl por 10, 20 y 30 min, en donde el incremento del tiempo de inmersión registra una mejor respuesta representada por una desinfección del 80% (Sánchez-Cuevas y Salavarría, 2004); de forma



similar en *Miconia squamulosa* con 6% durante 3 y 6 minutos (Jardín Botánico de Bogotá, 2011), *Eupatorium angustifolium* en concentración de 3% durante 15 minutos (Jardín Botánico de Bogotá, 2009) y *Dioscorea alata* al 1,5% por 15 minutos (Borges *et al.*, 2009) entre otros, en los cuales la contaminación de explantes disminuyó utilizando la solución desinfectante a base de hipoclorito de sodio e incrementando el tiempo de inmersión.

**Tabla 4.** Efecto de diferentes tratamientos para asepsia superficial en semillas de *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*.

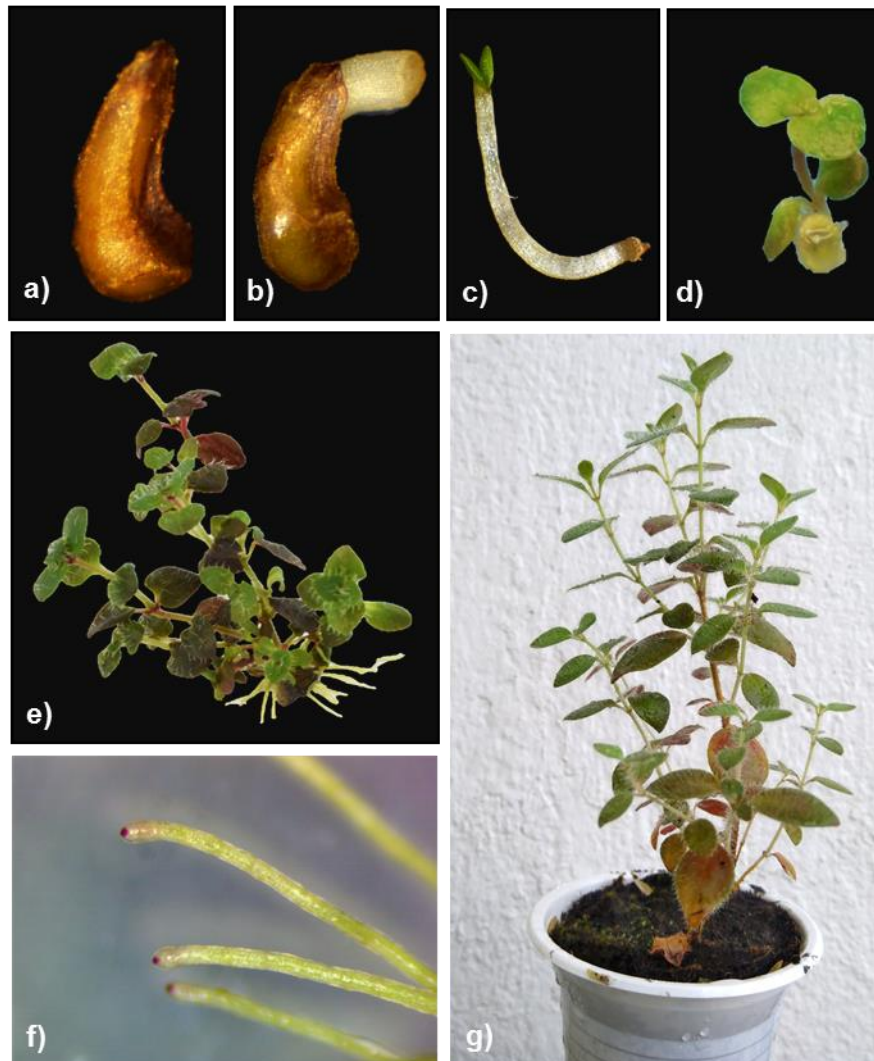
Respuesta	T1	T2	T3	T4	T5	T6	Total
<b><i>Bucquetia glutinosa</i></b>							
<b>Asép.</b>	0.24±0.42 <sup>a</sup>	0.04±0.21 <sup>b</sup>	0.26±0.44 <sup>a</sup>	0.03±0.16 <sup>b</sup>	1±0.00 <sup>c</sup>	1±0.00 <sup>c</sup>	0.43±0.49
<b>Cont.</b>							
<b>Bact.</b>	0.81±0.39	0.96±0.21	0.99±0.10	0.97±0.16	0±0	0±0	0.60±0.49
<b>Hong.</b>	0.43±0.50	0.42±0.49	0.99±0.09	0.48±0.50	0±0	0±0	0.33±0.47
<b><i>Monochaetum myrtoideum</i></b>							
<b>Asép.</b>	0.12±0,32 <sup>a</sup>	0.93±0,24 <sup>b</sup>	0.22±0,41 <sup>a</sup>	0.98±0,12 <sup>b</sup>	-	-	0.56±0.49
<b>Cont.</b>							
<b>Bact.</b>	0.45±0.49	0.04±0.19	0.18±0.38	0±0	-	-	0.17±0.37
<b>Hong.</b>	0.42±0.49	0.02±0,15	0.6±0.49	0.01±0.12	-	-	0.26±0.44

Asép.: Aséptico, Cont.: Contaminado, Bact.: Bacteria, Hon.: Hongo. Letras distintas en la misma fila indican diferencias entre tratamientos. Los valores se presentan como promedio ± la desviación estándar.

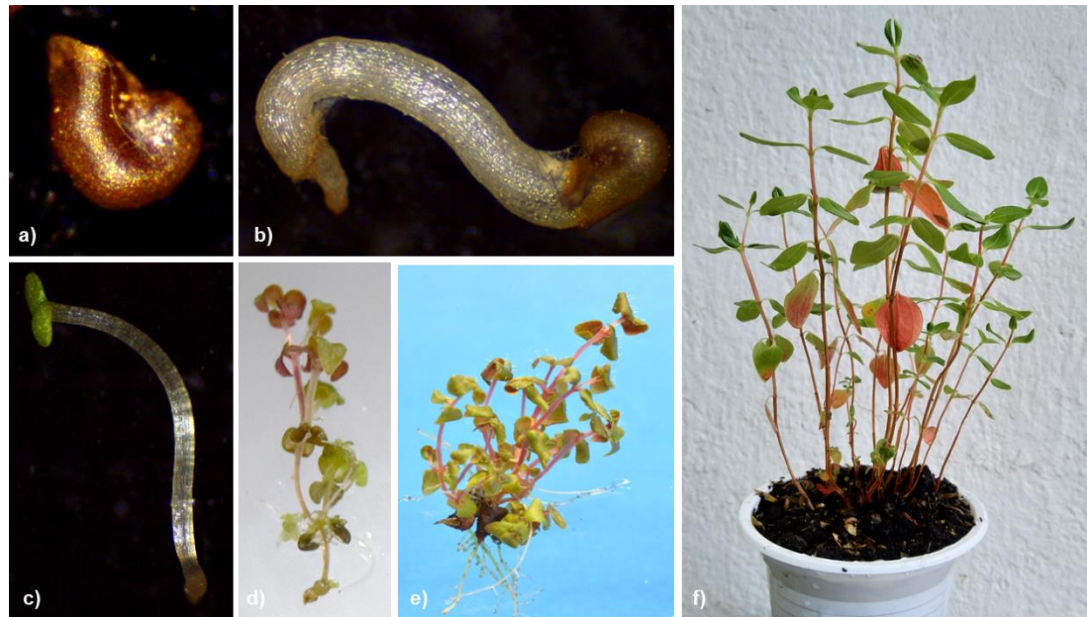
Con relación a los microorganismos contaminantes de *B. glutinosa*, las bacterias fueron los más frecuentes, observándose en un 57,8% de las semillas cultivadas, comparado con un 30,6% de semillas contaminadas por hongos, mientras que en *M. myrtoideum*, los hongos resultaron ser los microorganismos predominantes, 26,6% frente a un 17% con bacterias; sin embargo, es necesario mencionar que algunas semillas presentaron contaminación tanto bacteriana con fúngica.



Aunque los procedimientos de asepsia con NaOCl al 5% y 10% fueron efectivos para eliminar microorganismos presentes en la superficie de las semillas sin afectar su viabilidad y, por ende, facilitar su establecimiento en condiciones *in vitro*, en algunos tratamientos se observó un elevado porcentaje de contaminación (T3 y T4 en *B. glutinosa*, T1 y T3 en *M. myrtoideum*), respuesta que puede estar influenciada por la morfología de las semillas que son reniformes (Fig. 1a) y cloqueadas (Fig. 2a), con superficie papilosa granulada e irregular, características que permiten que gran parte de los microorganismos superficiales eludan la acción de los desinfectantes, ya que estos permanecen protegidos entre las superficies irregulares de las semillas (Ramírez *et al.*, 2016); adicionalmente, las condiciones del origen de la planta madre, relacionados con factores bioclimáticos, suelo, pH, condiciones fitosanitarias, entre otros, también alteran el estado de limpieza de las semillas (Ramírez, 2013); acorde con lo anterior, Rodríguez *et al.* (2008), han indicado que los contaminantes de cultivos *in vitro*, corresponden, a los mismos que habitan de manera normal en condiciones naturales.



**Figura 1.** Propagación *in vitro* de *B. glutinosa*; a) semilla desinfectada superficialmente, b) emergencia de radícula, c) emergencia de plúmula y radícula, d) plántula obtenida de una semilla germinada, e) plántula con desarrollo de brotes axiales y crecimiento de raíces, f) vista al estereoscopio de puntas radicales, g) planta aclimatizada y mantenida en invernadero.



**Figura 2.** Propagación *in vitro* de *M. myrtoideum*; a) vista al estereoscopio de la semilla desinfectada superficialmente, b) emergencia de radícula, c) emergencia de plúmula y radícula, d) plántula obtenida de semilla germinada, e) plántula con desarrollo de microtallos axilares y crecimiento de raíces, f) planta aclimatizada y mantenida en invernadero.

Después de 30 días de cultivo, en las semillas de *B. glutinosa* se observó germinación (Fig. 1b y 1c) en todos los medios de cultivo probados, alcanzándose un 38,1% de semillas germinadas en y en *M. myrtoideum* un 28,2% (Fig. 2b y 2c) (Tabla 5).

Para los datos registrados en cada una de las dos especies se establecieron diferencias significativas entre los tratamientos ( $p \leq 0,05$ ); del total de semillas de *B. glutinosa*, el 2,5% (19 semillas) germinaron MS, el 5,1% (39 semillas) en MS/2, el 5,3% (40 semillas) en MS/4, el 61,4% (307 semillas) en MS<sup>-1</sup> y el 71,2% (356 semillas germinadas) en agua; para el caso de *M. myrtoideum* el porcentaje de





germinación osciló entre 14 y 43%, este último registrado en MS/4 (86 semillas), en MS/2 y MS-1 33,5% y 30,54, respectivamente, mientras que en agua se registró el valor más bajo de germinación (28 semillas) (Tabla 5). Tanto la adecuada respuesta germinativa como el exitoso establecimiento *in vitro* obtenidos en este estudio, se debe en gran parte al efecto positivo del procedimiento de asepsia superficial de las semillas; de acuerdo con Rache y Pacheco (2012) y Ramírez (2013), se considera que el NaOCl estimula la germinación, mantiene la viabilidad, facilita la reactivación del crecimiento, brotación y/o desarrollo del explante, activa la diferenciación celular y produce un bajo daño fitotóxico, facilitando procesos morfógenicos rápidos y eficientes (Elinorovololona y Martial, 2014).

**Tabla 5.** Germinación de semillas y viabilidad de plántulas en desarrollo de *Bucquetia glutinosa* y *Monochaetum myrtoideum* cultivadas en diferentes medios de cultivo.

Respuesta	Medios de Cultivo					TOTAL
	MS	MS/2	MS/4	MS <sup>-1</sup>	Agua	
<b><i>Bucquetia glutinosa</i></b>						
<b>Semillas Germinadas</b>	0.05±0.21 <sup>a</sup>	0.10±0.30 <sup>b</sup>	0.10±0.30 <sup>b</sup>	0.77±0.42 <sup>c</sup>	0.89±0.31 <sup>c</sup>	0.38±0.49
<b>Plántulas Viables</b>	0.26±0.45 <sup>a</sup>	0.15±0.37 <sup>b</sup>	0.15±0.36 <sup>b</sup>	0.39±0.49 <sup>c</sup>	0.56±0.50 <sup>d</sup>	0.44±0.50
<b><i>Monochaetum myrtoideum</i></b>						
<b>Semillas Germinadas</b>	0.20±0.40 <sup>b</sup>	0.33±0.47 <sup>a</sup>	0.43±0.49 <sup>a</sup>	0.30±0.46 <sup>a</sup>	0.14±0.34 <sup>b</sup>	0.28±0.45
<b>Plántulas Viables</b>	0.12±0.32 <sup>a</sup>	0.18±0.38 <sup>b</sup>	0.35±0.47 <sup>b</sup>	0.24±0.43 <sup>b</sup>	0.03±0.17 <sup>c</sup>	0.18±0.38

Letras distintas en una misma fila indican diferencias entre tratamientos. Los valores se presentan como promedio ± la desviación estándar.



Con respecto a la composición de los medios de cultivo, el MS/4, MS-1 y el agua permitieron recuperar los mayores números de semillas germinadas, datos que indican que las semillas tanto de *B. glutinosa* como de *M. myrtoideum*, aunque no presentan endospermo, poseen un balance adecuado de nutrientes endógenos y, por lo tanto no requieren cantidades elevadas de inductores orgánicos y químicos externos que estimulen su germinación; los resultados concuerdan con observaciones reportadas en especies afines como *Miconia squamulosa*, en la que se obtuvo un 33,33% de germinación en MS reducido a la mitad de su concentración original y libre de reguladores de crecimiento (Jardín Botánico Bogotá, 2011). Con base a lo anteriormente, se puede indicar que las semillas de *B. glutinosa* y *M. myrtoideum* son utilizadas para el ensayo de germinación cuando contaron con la madurez fisiológica adecuada, y que tanto el medio de cultivo como las condiciones ambientales de los cultivos *in vitro* fueron óptimas para estimular su proceso germinativo.

En el caso de la viabilidad, también se registraron diferencias entre los tratamientos evaluados ( $p=0,001254$ ); de las 761 plántulas obtenidas de *B. glutinosa* (Fig. 1d), el 44,2% (336 plántulas) fueron viables después de 70 días de cultivo, mientras que en *M. myrtoideum* (Fig. 2d) el porcentaje fue mucho más bajo, 18% (186 plántulas). En términos generales, las plántulas de ambas especies presentaron un adecuado crecimiento y desarrollo, con tallos gruesos (4-7 mm de diámetro) y con 2 o 3 nudos cortos (2-3 mm de longitud), formación abundante de hojas y de aspecto vigoroso; además, los medios en los que se registraron los más altos porcentajes de plántulas viables, fueron los mismos en los que se cuantificaron los mayores porcentajes de germinación, MS/4, MS<sup>-1</sup>, agua (Tabla 5); sin embargo, las plantas desarrolladas de semillas germinadas en agua presentaron tallos y hojas hiperhidratados; por esta razón, se prefirieron



los medios semisólidos (MS<sup>-1</sup> y MS/4) para continuar el proceso de establecimiento de cultivos *in vitro*.

La fase de establecimiento *in vitro* permitió obtener el material vegetal necesario para el desarrollo de las etapas siguientes del proceso de micropropagación. Además, las dificultades que presenta la recuperación de plantas, observada en condiciones naturales, a causa de la germinación no homogénea de las semillas, fue superada de manera eficiente a través de la germinación en condiciones *in vitro*

### **Multiplicación y enraizamiento de microtallos.**

Durante esta etapa los datos registrados en cada una de las variables evaluadas mostraron diferencias significativas (Prueba H de Kruskal-Wallis;  $P \leq 0,05$ ) (Tabla 6). Aunque, en los tratamientos realizados no se observó un alto incremento en la elongación de los microtallos de las dos especies de estudio, en *B. glutinosa* se cuantificó una mayor longitud promedio en T4 (MS/2 + 0,5 mg/L de AIB), tratamiento en el que 75% de éstos alcanzó una longitud entre 2,5 cm y 3,5 cm (Fig. 1e), mientras que en T1 (medio propuesto por Cid-Barrueto *et al.*, 1997), T2 (Kozak y Wnuk, 2012) y T6 (MS/2+0,2 mg/L de AIB + 0,5 mg/L de BA) el 75% de los microtallos presentaron una longitud promedio de 0,7 cm (Figura 3). A diferencia de *B. glutinosa* en *M. myrtoideum*, se observó una relación inversamente proporcional entre la longitud de los microtallos y la concentración de AIB, ya que la disminución en la cantidad de AIB en los medios generó microtallos de mayor longitud, hasta de 3,5 cm en T7 (MS/2+0,02 mg/L de AIB) (Fig. 2e), mientras que en MS/2+0,1mg/L de AIB (T3) y MS/2+0,2mg/L de AIB (T4), esta longitud se redujo hasta 2,26 y 2,08 cm, respectivamente.



Aunque, las plántulas de *Bucquetia* y *Monochaetum* mostraron *in vitro* un desarrollo continuo, después de los primeros 10 o 12 días de cultivo se observó que las hojas que estaban en contacto con el medio sufrieron necrosis, desencadenándose un proceso de fenolización que produjo la muerte de los explantes; según Azofeifa (2009) las plantas superiores en condiciones adecuadas, producen metabolitos secundarios de naturaleza fenólica y liberación y acumulación, generalmente, alteran la composición química del medio cultivo, inhibiendo el crecimiento del explante y causando progresivamente su muerte (Borges *et al.*, 2009); por esta razón, para evitar la fenolización del medio, en cada transferencia se les eliminó los dos pares de hojas más basales a los microtallos.

**Tabla 6.** Proliferación y enraizamiento de microtallos de *Bucquetia glutinosa* y *Monochaetum myrtoideum* en diferentes medios después de 60 días de cultivo.

Tratamiento	Longitud total (cm)	No. Yemas axilares ( $\bar{x}$ )	No. raíces ( $\bar{x}$ )	No. microtallos individualizables ( $\bar{x}$ )
<b><i>Bucquetia glutinosa</i></b>				
T <sub>1</sub>	0,69 <sup>a</sup>	7,70 <sup>a</sup>	0,53 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
T <sub>2</sub>	0,64 <sup>a</sup>	7,12 <sup>a</sup>	0,60 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
T <sub>3</sub>	0,65 <sup>a</sup>	2,00 <sup>b</sup>	0,08 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
T <sub>4</sub>	2,06 <sup>b</sup>	10,47 <sup>c</sup>	7,00 <sup>b</sup>	2,87 <sup>b</sup>
T <sub>5</sub>	1,49 <sup>b</sup>	8,73 <sup>ac</sup>	6,80 <sup>b</sup>	3,00 <sup>b</sup>
T <sub>6</sub>	0,68 <sup>a</sup>	6,24 <sup>a</sup>	1,76 <sup>c</sup>	0,40 <sup>c</sup>
T <sub>7</sub>	1,04 <sup>ab</sup>	7,20 <sup>a</sup>	3,23 <sup>b</sup>	0,37 <sup>c</sup>
<b><i>Monochaetum myrtoideum</i></b>				
T <sub>1</sub>	0,95 <sup>a</sup>	7,20 <sup>a</sup>	4,17 <sup>a</sup>	5,45 <sup>a</sup>
T <sub>2</sub>	1,22 <sup>a</sup>	6,31 <sup>a</sup>	3,76 <sup>b</sup>	4,12 <sup>b</sup>



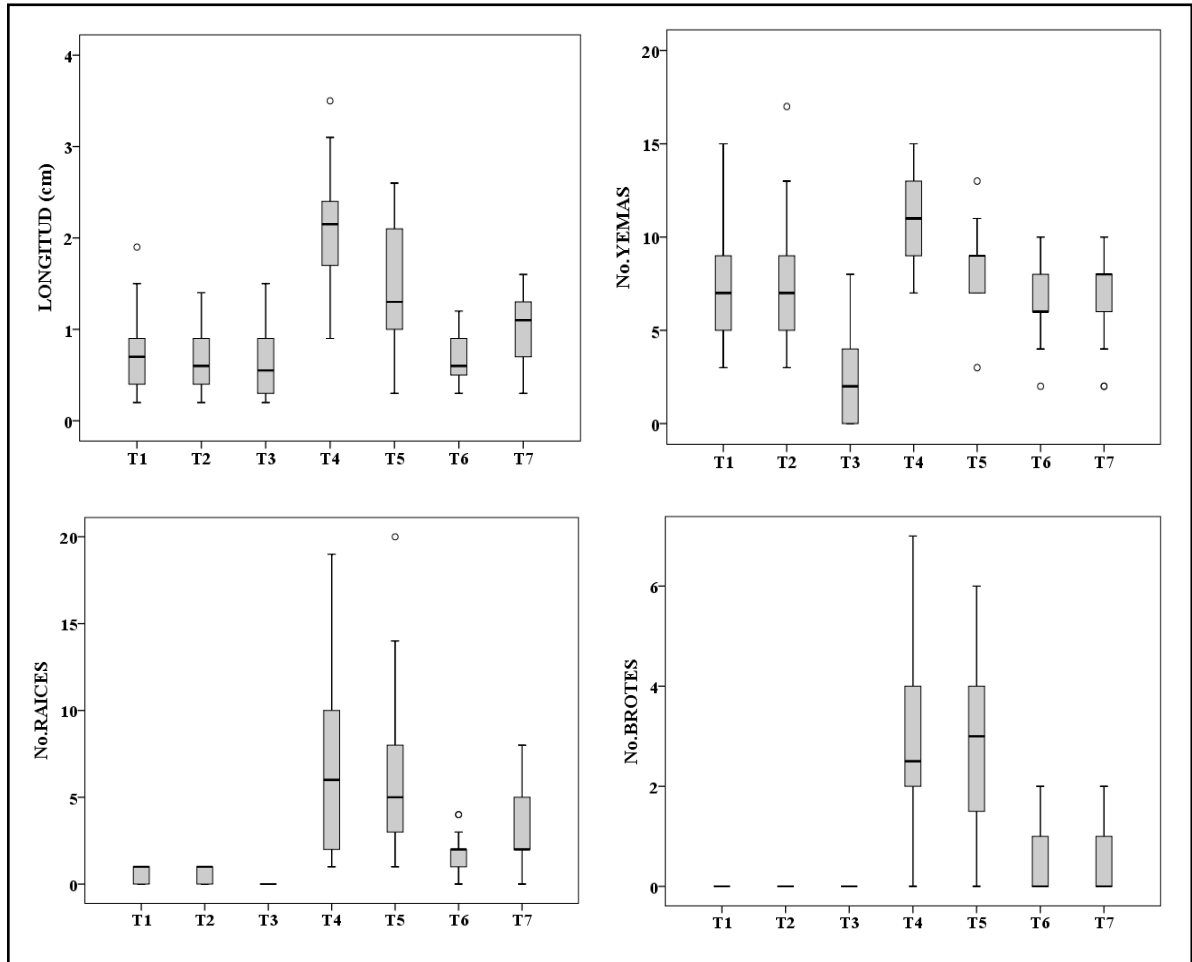
T <sub>3</sub>	2,26 <sup>b</sup>	3,73 <sup>b</sup>	8,27 <sup>c</sup>	3,74 <sup>b</sup>
T <sub>4</sub>	2,08 <sup>b</sup>	3,20 <sup>b</sup>	7,43 <sup>c</sup>	2,37 <sup>c</sup>
T <sub>5</sub>	2,19 <sup>ab</sup>	5,02 <sup>c</sup>	8,88 <sup>c</sup>	3,32 <sup>bc</sup>
T <sub>6</sub>	2,79 <sup>b</sup>	3,47 <sup>b</sup>	6,99 <sup>c</sup>	3,33 <sup>b</sup>
T <sub>7</sub>	3,01 <sup>b</sup>	4,19 <sup>c</sup>	6,78 <sup>c</sup>	4,50 <sup>b</sup>

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ )  $\pm$  la desviación estándar.

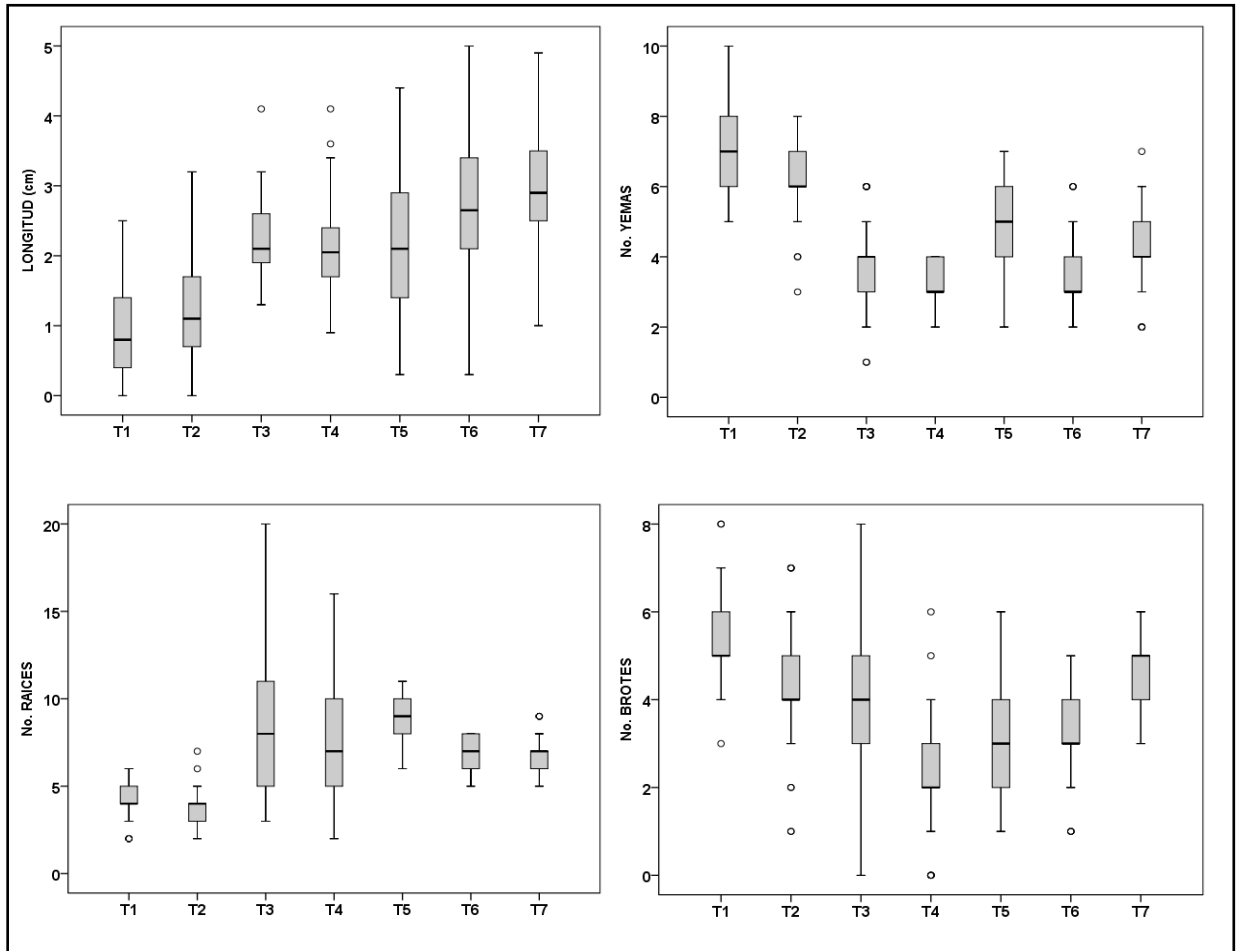
Por otra parte, se observó que la formación de yemas axilares y el desarrollo de microtallos individualizables fueron afectados principalmente por el tipo de auxina utilizada y su combinación o no con otras hormonas; al respecto, los microtallos de *B. glutinosa* cultivados en T<sub>4</sub> y T<sub>5</sub> (medios suplementados solo con AIB) desarrollaron, en promedio, el mayor número de yemas axilares basales, 10 y 8 respectivamente, y desarrollaron a 2-3 microtallos individualizables; sin embargo, algunos de estos desarrollaron hasta 7 microtallos basales. Por su parte la producción de yemas en *M. myrtoideum*, se vio favorecida por presencia de ciertas combinaciones BAP, GA<sub>3</sub> y AIA, en los medios de proliferación, en los cuales el 75% de los microtallos cultivados generar ocho yemas en T<sub>2</sub> (MS+0,5 mg/L de AIA+ 1 mg/L BAP) y nueve en T<sub>1</sub> (MS/2+0,2 mg/L de BAP+0,7 mg/L de GA<sub>3</sub>) (Figura 2); en contraste con *M. myrtoideum* en *B. glutinosa* las mismas concentraciones de reguladores no estimularon de forma efectiva el desarrollo de yemas axilares, observándose por ejemplo en T<sub>3</sub>, los microtallos formaron en promedio 2 yemas; estos resultados difieren de los obtenidos en T<sub>1</sub>, en el que los microtallos formaron aproximadamente 8 yemas axilares (Tabla 6; Figura 1). Sin embargo, se debe tener en cuenta que T<sub>1</sub> solo difiere de T<sub>3</sub> en la concentración de sales minerales, la presencia de Pantotenato de Calcio y de Glicina. Las variaciones de comportamiento *in vitro* de *B. glutinosa* y *M.*



*myrtoideum* pueden explicarse, en parte, por diferencias en la capacidad de regeneración y multiplicación celular de cada especie (Pedroza-Manrique & Caballero-Arévalo, 2009), puesto que, a pesar de pertenecer a la misma familia, dicha capacidad está definida tanto por el estado fisiológico de cada planta como por su carga genética (Viñas & Jiménez, 2011). Adicionalmente, los resultados obtenidos en este trabajo contrastan con los reportados para otras melastomatáceas, en las que se ha reportado una respuesta proliferativa óptima cuando los explantes se cultivan en medios suplementados con citoquininas y auxinas diferentes al AIB (Ravoniarison & Ephrem, 2014; Zhang *et al.* 2015; Prudente *et al.*, 2016). En este sentido y, aunque al BA se le conoce como una citoquinina de gran efectividad durante la regeneración de brotes en varias especies de Melastomataceae (Elavazhagan & Arunachalam 2010; Kozak & Wnuk 2012; Mahmud 2013), los medios suplementados con esta hormona no resultaron efectivos para *B. glutinosa*, cuyos brotes presentaron retraso en su crecimiento.



**Figura 3.** Variables cuantificadas durante la etapa de multiplicación y enraizamiento de *Bucquetia glutinosa*: Longitud de microtallos, Número de yemas axilares desarrolladas, Número de raíces y Número de microtallos individualizables. Las cajas indican el valor de los cuartiles superior e inferior y la mediana para cada tratamiento. Los círculos son datos atípicos máximos o mínimos que no están en el rango.



**Figura 4.** Variables cuantificadas durante la etapa de multiplicación y enraizamiento de *Monochaetum myrtoideum*: Longitud de microtallos, Número de yemas axilares desarrolladas, Número de raíces y Número de microtallos individualizables. Las cajas indican el valor de los cuartiles superior e inferior y la mediana para cada tratamiento. Los círculos son datos atípicos máximos o mínimos que no están en el rango.

Con relación al enraizamiento, se pudo observar un efecto positivo del AIB sobre la formación y desarrollo de raíces en los microtallos tanto de *B. glutinosa* como de *M. myrtoideum*. En *Bucquetia* el AIB en concentraciones de 0,5 y 0,2 mg/L (T4





y T5) estimuló, en promedio el desarrollo de 7 raíces; sin embargo, como se observa en la figura 3, en T4 algunos microtallos desarrollaron hasta 18 raíces. En *Monochaetum*, la mayor cantidad de raíces se desarrolló en los tratamientos con AIB (T3 -T7), en los cuales se registró entre 7 y 11 raíces por microtallo (Figura 4). Las raíces producidas y desarrolladas en microtallos de *Bucquetia* y *Monochaetum* mostraron una apariencia normal, con origen en la base del microtallo, típicamente fasciculadas, de consistencia semileñosa, de color blanquecino y ápice meristemático rojizo (Fig. 1f).

En este trabajo se observó, de manera evidente, el efecto positivo de las auxinas sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de los explantes *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*; dichos reguladores estimularon simultáneamente la multiplicación y elongación celular, actividades que se tradujeron en formación de yemas y desarrollo de brotes, respuestas que en la gran mayoría de las especies, es estimulada, principalmente, solo en presencia de citoquininas (Pedroza-Manrique & Caballero-Arévalo, 2009); no obstante, el control que ejercen las auxinas (en concentraciones adecuadas) sobre los niveles de citoquininas endógenas activas, puede mediar la formación de N- glucósidos o la activación de citoquinina oxidasa, enzima que regula la biosíntesis de citoquininas endógenas producidas en los tejidos meristemáticos (Segura, 2008). Respuestas similares fueron obtenidas por Cid-Cid-Barrueto *et al.* (1997) quienes indujeron formación de raíces en la fase de multiplicación de *Miconia* sp. cultivada en un medio suplementado con 0,5 mg l<sup>-1</sup> AIB. Guohua *et al.* (2007) también estimularon la regeneración de plantas y desarrollo de raíces en *Melastoma affine* en medio MS/2 enriquecido con 0,1 mg l<sup>-1</sup> de AIB y, de manera semejante, Changxin *et al.* (2010), multiplicaron microtallos de *Tigridiopalma magnifica* con desarrollo de raíces en MS/2 suplementado con 4,92 μM de AIB. Debe señalarse, que el



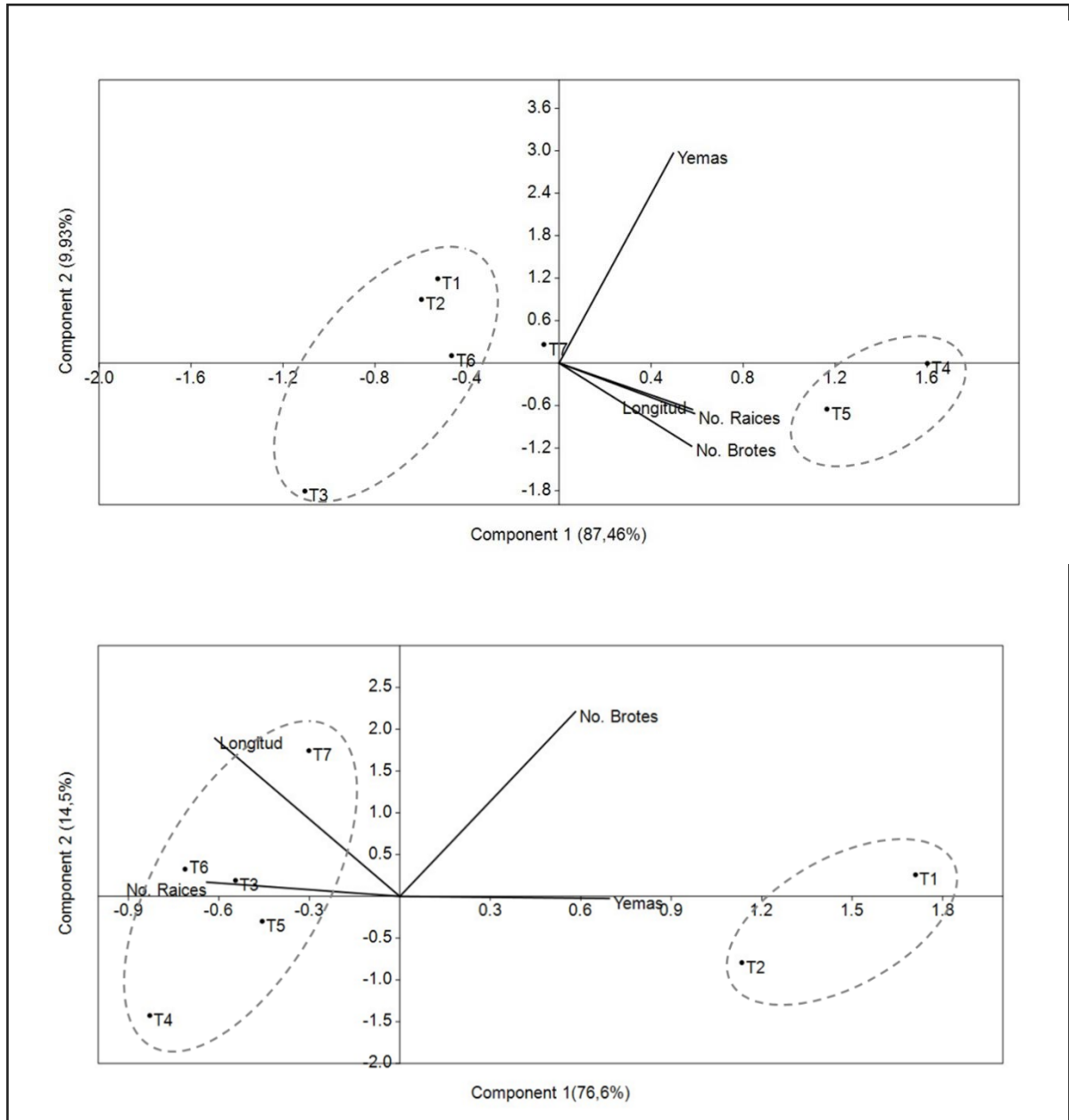
enraizamiento espontáneo de microtallos durante la etapa de multiplicación es una respuesta de gran beneficio, puesto que permite a los explantes absorber adecuadamente los nutrientes presentes en el medio de cultivo. Además, se debe tener en cuenta que el AIB es una de las auxinas sintéticas más utilizadas en procesos de propagación *in vitro* o en invernadero, debido a que es una sustancia fotoestable y de poca sensibilidad a la degradación biológica (Fachinello *et al.*, 1995), y que estimula el crecimiento por su acción sobre la división y elongación celular, el desarrollo de la raíz embrionaria y postembrionaria, como también sobre el gravitropismo (Overvoorde *et al.*, 2010).

Por otro lado, la producción de microtallos individualizables presento diferencias en las dos especies; mientras que en *B. glutinosa* la producción de hasta 7 microtallos individualizables por explante (y un promedio de 3 brotes en el tratamiento cuatro) revalida el efecto positivo del AIB sobre su multiplicación (Fig. 3), en *M. myrtoideum*, fue evidente el efecto sinérgico de citoquinina-ácido giberelico, que en concentraciones adecuadas (0,2 y 0,7 mg/L, respectivamente), los explantes producen entre tres y cinco microtallos individualizables después de 60 días de cultivo (Fig. 4).

La correlación de las variables evaluadas mediante análisis de componentes principales (ACP), permitió corroborar las diferencias encontradas mediante el estadístico H de Kruskal Wallis en las respuestas cuantificadas en *B. glutinosa*; el análisis muestra que la variación de las respuestas obtenidas durante la etapa de multiplicación y enraizamiento de esta especie está explicada con un 97,39% en dos componentes principales y, separa los tratamientos evaluados en dos grupos: el primero compuesto por los medios de cultivo correlacionados positivamente con longitud, el número de yemas, brotes y raíces de los



microtallos (T4 y T5) y el segundo en los que la correlación no es significativa, es decir, los medios con microtallos con menor longitud y número de yemas, sin desarrollo de brotes axilares ni raíces (T1, T2, T3, T6 y T7) (Figura 5). No obstante, es posible inferir que el tratamiento cuatro es el más apropiado para llevar a cabo una propagación masiva de *B. glutinosa*, puesto que en éste se obtuvo la mejor correlación para las cuatro variables: microtallos con una longitud promedio de 2,06 cm, los cuales formaron hasta 10 yemas axilares basales, desarrollaron en promedio siete raíces y de estos microtallos se individualizaron entre dos y cuatro brotes basales (Figuras 3 y 5). El tratamiento T3 no mostró correlación entre los componentes resultantes ni con las variables evaluadas (Figura 5), confirmando así que en los medios con sales minerales MS en su concentración original suplementados con auxinas, citoquininas y giberelinas, por lo menos en las concentraciones utilizadas en este estudio, no se obtiene una proliferación adecuada de *B. glutinosa*.



**Figura 5.** Análisis de componentes principales (ACP) para los datos registrados durante la etapa de multiplicación y enraizamiento de *B. glutinosa* (arriba) y *M. myrtoideum* (abajo), a partir de microtallos cultivados en diferentes medios de cultivo.



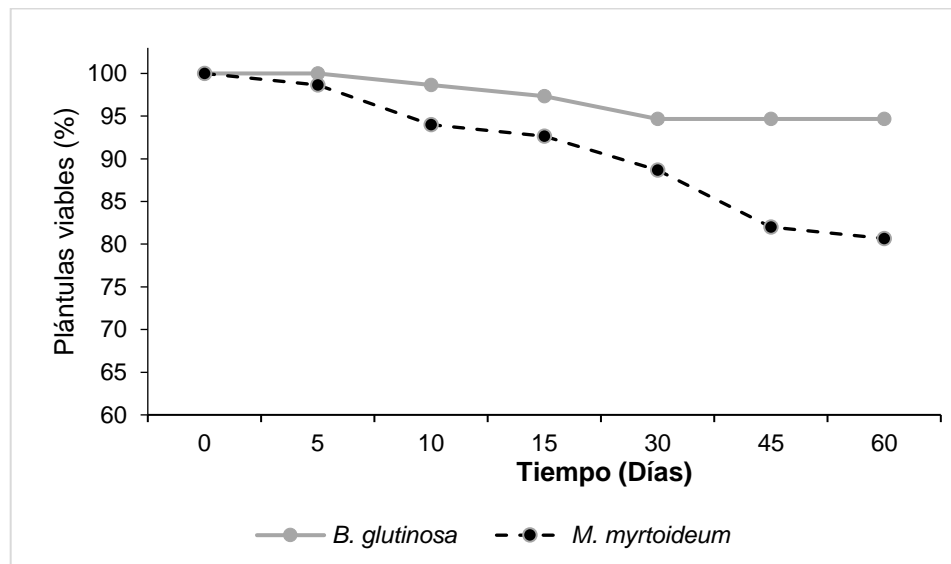
De forma semejante al ACP en *B. glutinosa*, el ACP en *M. myrtoideum*, resultó explicado por dos componentes principales (explicados en un 91,1%) y separó los tratamientos en dos grupos, uno compuesto por los medios correlacionados positivamente con las variables número de brotes y número de yemas (T1 y T2) y, otro con los medios correlacionados significativamente con longitud y número de raíces (T3, T4, T5, T6, T7); estas dos agrupaciones resultaron ser opuestas, es decir, los tratamientos que entre si armonizan para el desarrollo de yemas y brotes individualizables no lo hacen para el crecimiento de los microtallos y la producción de raíces, y viceversa (Fig. 5). No obstante, la ubicación del tratamiento siete en el plano principal y la generación de los ángulos más pequeños al proyectarlo ortogonalmente con todas las variables, permite seleccionarlo como el medio adecuado para multiplicar *in vitro* *M. myrtoideum*, puesto que después de 60 días de cultivo en dicho medio se producen microtallos con longitud promedio de 3 cm, con cuatro yemas axilares, con seis a siete raíces y cuatro microtallos individualizables.

Finalmente, se destaca la importancia de la utilización de semillas sexuales como explantes, para iniciar el proceso de micropropagación de *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*, puesto que, al reintroducir en su habitat natural las plantas producidas *in vitro* se mantiene y/o aumenta la diversidad genética existente en las poblaciones y ecosistemas de origen. Así mismo, micropropagar este tipo de especies, además de ser una alternativa eficaz para incrementar el número de individuos en poblaciones con dificultades de reproducción y/o extremadamente reducidas (González-Benito & Martín, 2011), es una estrategia para contribuir a la conservación de la biodiversidad de los ecosistemas paramunos y altoandinos (Bohórquez *et al.*, 2016) que se encuentran en alto riesgo de vulnerabilidad.



### Aclimatización de vitroplantas

Aunque la aclimatización puede ser una etapa crítica al final del proceso de propagación, la adaptación progresiva de las plántulas de *B. glutinosa* y *M. myrtoideum* a condiciones *ex vitro* fue exitosa, observándose que los tallos y hojas conservaron su turgencia (Figs. 1g y 2f) y mostraron crecimiento activo esto como respuesta al funcionamiento del sistema radical desarrollado exitosamente en los medios de multiplicación y enraizamiento. Después de 60 días de aclimatización se encontró una correlación significativa entre el sustrato (tierra y capote) y la viabilidad de las plantas, cuantificándose una disminución de 5,3% en *B. glutinosa* y 19,3% en *M. myrtoideum* (Fig. 6).



**Figura 6.** Viabilidad de plántulas de *B. glutinosa* y *M. myrtoideum* a través de 60 días de aclimatización.

El periodo de permanencia de las vitroplantas en condiciones iniciales de aclimatización (en bandejas cubiertas), afectó significativamente la sobrevivencia y crecimiento de las mismas, corroborando así, la importancia de la regulación



de humedad/aireación y el cambio de una atmósfera saturada de agua en condiciones *in vitro*, a un ambiente con humedad variable (en todo caso menor) bajo condiciones *ex vitro*, que debe ser realizado de forma gradual, para evitar la muerte de las plántulas micropropagadas (Chandra *et al.*, 2010). A diferencia de los reportes en otras especies de esta familia, en las que el sustrato para aclimatar vitroplantas fue, turba, arena, ceniza y/o perlita (Zeng *et al.*, 2008, Changxin-He *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2015, entre otros), el sustrato compuesto por tierra y capote aportó los requerimientos necesarios para el acondicionamiento y funcionalidad progresiva de raíces y tallos; por lo tanto, puede ser considerado como un sustrato adecuado para el endurecimiento de vitroplantas tanto de *B. glutinosa* como de *M. myrtoideum*. Los resultados de aclimatización registrados con los de otros estudios son consistentes con estudios realizados con *Miconia squamulosa* (Jardín Botánico de Bogotá, 2011) bajo la premisa que la aclimatización es la etapa más importante de la micropropagación, puesto que debe garantizar que las vitroplantas que se extraen de un ambiente controlado deben permanecer viables y, de esta manera mostrar el éxito y la calidad del proceso *in vitro* (Borges *et al.*, 2009).

## CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de la propagación *in vitro* de *B. glutinosa*, la desinfección superficial de las semillas fue efectiva (57%) empleando NaOCl al 5 y 10%, mientras la germinación se vio favorecida en el medio MS<sup>-1</sup>, en el cual se estimuló, de manera adecuada, los procesos de crecimiento y desarrollo de plántulas. Después de 60 días de cultivo, con transferencia a medio fresco cada 30 días, los microtallos cultivados en MS/2+0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIB alcanzaron hasta 3,5 cm de longitud con 10 yemas axilares y produjeron hasta tres brotes basales



individualizables; además, el desarrollo de raíces fue simultáneo con la multiplicación de microtallos.

La micropropagación de *M. myrtoideum* se logró a partir de semillas cultivadas en MS/4 (43% de germinación), previamente esterilizadas con NaOCl al 10% (v/v) durante 15 minutos (98,5% de semillas asépticas). La multiplicación de microtallos se realizó adecuadamente en medio MS/2+0,02 mg/L de AIB, en el que, después de 60 días de cultivo, se produjeron microtallos con longitud promedio de 3 cm, con cuatro yemas axilares, con seis a siete raíces y cuatro microtallos individualizables

Los resultados obtenidos permiten proponer una alternativa efectiva para multiplicar *B. glutinosa* y *M. myrtoideum* ya que, además de usar medios de cultivo reducidos en sales minerales y suplementado únicamente con AIB, las vitroplantas obtenidas mostraron un alto grado de adaptabilidad y funcionalidad durante el proceso de aclimatización en un sustrato compuesto por tierra y capote, alcanzándose un elevado porcentaje de sobrevivencia (94,4% y 80,6%, respectivamente).

Los protocolos establecidos, son los únicos estudios de micropropagación para melastomáceas nativas colombianas, constituyéndose un referente replicable en otras especies relacionadas y seleccionadas bajo criterios similares. El material vegetal micropropagado es utilizable en procesos de reintroducción, restauración y conservación de ecosistemas en estado de deterioro y vulnerabilidad, como lo es el páramo de Rabanal.





## REFERENCIAS

- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana*, 20(1):153-175.
- Bacchetta, G., Bueno Sánchez, A., Fenu, G., Jiménez-Alfaro, B., Mattana, E., Piotto, B. & Virevaire, M. (eds). (2008). Conservación *ex situ* de plantas silvestres. Principado de Asturias / La Caixa. 378 pp.
- Bapat, V. A., Yadav, S. R. & Dixit, G. B. (2008). Rescue of endangered plants through biotechnological applications. *Natl. Acad. Sci. Lett.* 31 pp.
- Bohórquez, M., Araque, E., & Pacheco, J. (2016). Propagación *in vitro* de *Espeletia paipana* S. Díaz y Pedraza, frailejón endémico en peligro de extinción. *Actualidades Biológicas*, 38(104):23-36.
- Borges, M., Estrada, E., Pérez, I., & Meneses, S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2):127-135.
- Cardona, C. A. & Vargas, O. R. (2004). Plántulas procedentes del banco de semillas germinable de un bosque subandino. *Pérez-Arbelaezia*, 15:113-149.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V. & Chandra, R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land *Biotechnol Lett* 32: 1199. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0290-0>



- Changxin, He, Binxuan, Wu & Guohua, Ma. (2010). TDZ-induced callus and adventitious shoot formation from leaf, petiole and calyx explants of *Tigridiopalma magnifica* (Chen). *Floculture And Ornamental Biotechnology (Special Issue 1)*:88-91.
- Cid-Barrueto, L. P., Adriane-Mendes, C. G., Silvia da, B. R. C. & Joao, B. T. (1997). Micropropagation of *Miconia* sp., a woody Melastomaceae from Brazil, using thidiazuron as plant growth regulator. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 9(1):21-25.
- Cruz-Cruz, C., Gonzalez-Arno, Ma. T. & Engelmann, F. (2013). Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources* 2:73-95.
- Cubiña, A. & Aide, T. M. (2001). The effect of distance from forest edge on seed rain and soil seed bank in a tropical pasture. *Biotropica*, 33(2):260-267.
- Díaz, E. A., León, O. A. & Vargas, O. (2008). Sobrevivencia y crecimiento de plántulas debajo de *Lupinus bogotensis* implicaciones para la restauración. En: Vargas, O. 2008. Estrategias para la restauración ecológica del bosque Alto andino: El caso de la Reserva Forestal Municipal de Cogua, Cundinamarca. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 372 p.
- Diomedi, A., Chacón, E. Delpiano, L., Hervé, B., Jemenao, I., Medel, M., Quintanilla, M, Riedel, G., Tinoco, J. & Cifuentes, M. (2017). Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. *Revista Chilena de Infectología*, 34(2):156-174.



- Elavazhagan, T. & Arunachalam, K. D. (2010). *In vitro* callus induction and shoot multiplication from nodal explants and leaves of *Memecylon edule*. *Asian Journal Biotechnology* 2:110-119.
- Elinorovololona, R. N. & Martial, E. L. (2014). Effects of growth regulators 6-Benzylaminopurine and 2-Naphtalene Acetic Acid on the *in vitro* shoot multiplication from nodal segment of *Medinilla mandrakensis* (Melastomataceae). *International Journal of Biochemistry and Biotechnology* 3(1): 504-510.
- Engelmann, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. Invited review. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant.* 47: 5–16 DOI 10.1007/s11627-010-9327-2.
- Fachinello, J.C., Hoffmann, A., Nachtigal, J.C., Kersten, E. & Fortes, G.R. (1995). Propagação de plantas frutíferas de clima temperado. 2a ed. Ufpel, Pelotas, Brasil.
- Florentine, S. K. & Westbrooke, M. E. (2004). Evaluation of alternative approaches to rainforest restoration on abandoned pasturelands in tropical north Queensland, Australia. *Land Degradation and Development* 15:1-13.
- García, A & León, P. (2004). Bajo la Mentoría de Dra Amelia Mantilla Villegas. Estudio de Antecedentes Sobre el Proyecto de Ley N° 032 de 2003 por Medio del Cual se Crean las Zona de Páramos, Bosques de Niebla y Estrellas Hídricas y Fluviales y se establecen otras disposiciones para la Protección de las Fuentes de Agua. Congreso de la Republica de Colombia. Programa de Fortalecimiento Legislativo Oficina de Asistencia Técnica Legislativa.



- González-Benito, M. E & Martín, C. (2011). *In vitro* preservation of Spanish Biodiversity. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 47(1):46-54.
- Guohua, M. Yong, L., Genlin, J., Xiaoping, F. & Yourum L. (2007). Adventitious shoot and callus formation in vitro from young leaves of *Meslatoma affine*. *Floriculture and ornamental biotechnology*, 181: 27-29.
- Ibañez-Alcocer, M. R. (2013). Propagación *in vitro* y estudio con marcadores moleculares y cromosómicos de *Limonium perplexum* L. Sáez & Rosselló. Tesis Doctoral, Universitat de València Departamento de Biología Vegetal, Valencia España, 107 pp.
- Hofstede, R. (2003). Los páramos en el Mundo: Su diversidad y sus habitantes. En: Hofstede, R., P. Segarra & P. Mena (Eds). 2003. Los Páramos del Mundo. Proyecto Atlas Mundial de Páramos. Global Peatland Initiative/NC-UICN/EcoCiencia. Quito.
- Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humbolt (IAVH), Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR), Corporación Autónoma Regional de Boyacá (CORPOBOYACÁ), Corporación Autónoma Regional de Chivor (CORPOCHIVOR). (2008). Estudio sobre el estado actual del Macizo del Páramo de Rabanal. Convenio interadministrativo No. 07-06-263-048 (000404). 544p.
- Jardín Botánico José Celestino Mutis. (2009). Generación de protocolos de propagación *in vitro* de las especies: *Holodiscus argenteus*, *Eupatorium angustifolium* y *Morella parvifolia*. Bogotá D.C.



- Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis. (2011). Protocolos de propagación *in vitro* de 3 especies vegetales priorizadas en el marco del proyecto 318 (*Miconia squamulosa*, *Hypericum mexicanum* y *Orthrosanthus chimboracensis*). Contrato 228-2011. Bogotá
- Kozak, D. & Wnuk, K. (2012). The influence of the salt composition of basal medium and growth regulators on *in vitro* growth and development of *Tibouchina urvilleana* (DC.) Cogn. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus* 11(6):59-68.
- Mahmud, K. N. (2013). The effects of plant growth regulators and amino acids on the germination of *Melastoma Malabathricum* L. through tissue culture. Faculty of Biosciences and Medical Engineering. Universiti Teknologi Malaysia. 68 p.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays for tobacco tissue culture". *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- Overvoorde, P., Fukaki, H. & Beeckman, T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a001537.
- Pacheco, J. & Castellanos, M. C. (2005). Roble y Pino Colombiano: Aspectos Biotecnológicos. Colombia. Ed: Publicaciones E Imprenta Uptc. ISBN: 9586601021. 218p.
- Pathak, M. R. & Abido, M. (2014). The role of biotechnology in the conservation of biodiversity. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. 2(4): 352-363.



- Paunescu, A. (2009). Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview. Review. Romanian Biotechnological Letters. Bucharest University Printed in Romania. Romanian Society of Biological Sciences. *Romania*. 14(1):409-410.
- Pedroza-Manrique, J. & Caballero-Arévalo ????. (2009). Evaluación del efecto del medio MS y la temperatura en el desarrollo de propágulos de *Marchantia polymorpha* L. (Marchantiaceae) bajo condiciones *in vitro* y *ex vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 11(2): 85-104.
- Prudente de O.D, Nery F.C, Paiva R, dos Reis M.V, de Oliveira Paiva P.D, & Nery M.C (2016). Cultivo *in vitro* de *Miconia ligustroides* (DC.) Naudim. *Plant Cell Culture Micropropagation* 12:13-19.
- Rache, L. & Pacheco, J. (2012). Establecimiento de un protocolo de propagación de *Physalis peruviana* L. a partir de yemas axilares adultas. *Revista Ciencia en Desarrollo* 4(1): 71–86.
- Ramírez, L. (2013). Evaluación de tratamientos de desinfección en segmentos nodales de *Guadua angustifolia* para el establecimiento del cultivo *in vitro*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia- UNAD, 59p.
- Ramírez, S., Osuna, F. de J., García, F., Canul, J., & Palacios, A. (2016). Molecular identification of bacteria associated to ornamental plants obtained *in vitro*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(2):173–183.
- Ravoniarison N. E. & Ephrem L.M. (2014). Effects of growth regulators 6-Benzylaminopurine and 2-Naphtalene Acetic Acid on the *in vitro* shoot



multiplication from nodal segment of *Medinilla mandrakensis* (Melastomataceae). *Int. J. Biochem. Biotechnol.* 3(1): 504-510.

Rodríguez, M., Matehus, J., Gerstl, A. & Santana, M. (2008). Identificación del agente causal de una bacteriosis en ñame (*Dioscorea alata* L). *Interciencia.* 33(7):532-536.

Romero, A. M., Baquero, N., & Beltrán, H. E. (2016). Banco de semillas en áreas disturbadas de bosque subandino en San Bernardo (Cundinamarca, Colombia). *Colombia Forestal* 19(2):181-194.

Sánchez-Cuevas, M. & Salaverría, J. L. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Rev Científica UDO Agrícola*, 4(1):21-26.

Sarmiento, C., C. Cadena, M. Sarmiento, J. Zapata & O. León. (2013). Aportes a la conservación estratégica de los páramos de Colombia: Actualización de la cartografía de los complejos de páramo a escala 1:100.000. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C. Colombia, 89p.

Segura, J. (2008). Morfogénesis *in vitro*. En: Azcon, J. y Talon, M. (eds.). *Fundamentos de Fisiología vegetal* 2da Edición. Madrid: Mac Graw Hill: 381-392.

Schupp, E. W., Jordano, P. & Gómez, J. M. (2010). Seed dispersal effectiveness revisited: a conceptual review. *New Phytologist* 188:333-353.



- Smith, N. S., Mori, A., Henderson, D., Wm. Stevenson & S. V. Heald (eds.) (2004). Flowering plants of the neotropics. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Velasco-Linares, P., Díaz-Martín, R. & Vargas, O. (2008). Los parches de plantas herbáceas colonizadoras de potreros y el crecimiento y supervivencia de especies heliófilas leñosas. En: Vargas, O. 2008. Estrategias para la restauración ecológica del bosque Altoandino: El caso de la Reserva Forestal Municipal de Cogua, Cundinamarca. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 372p.
- Viñas, M., & Jiménez, V. (2011). Factores que influyen en la embriogénesis somática in vitro de palmas (Arecaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2): 229-242.
- Woodgyer, E.M. (2009). Neotropical Melastomataceae. In: Milliken, W., Klitgard, B. & Baracat, A. 2009. Neotropikey - Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics. Disponible en: <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Melastomataceae.htm>.
- Zeng, S. J., Duan, J. & Li, L. N. (2008). Plant regeneration from leaf explants of *Tigridiopalma magnifica* (Melastomataceae). *Pakistan Journal of Botany*, 40, 1179-1184.
- Zhang, X. H., Dai, S. P., Jaime A., da Silva, T. & Ma, G. H. (2015). *In vitro* shoot organogenesis and plant regeneration in *Tibouchina aspera* Aubl. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 51:482-487.





### CAPITULO 3.

## ESTUDIO DEL SISTEMA REPRODUCTIVO, CALIDAD DE POLEN Y RELACIÓN POLEN/ÓVULO EN *Bucquetia glutinosa* Y *Monochaetum myrtoideum*

### RESUMEN

*Bucquetia glutinosa* y *Monochaetum myrtoideum* son especies endémicas de Colombia, de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Meta y Santander entre 2100 y 3300 m, colonizadoras de los bordes de parches resultantes de la fragmentación, y utilizadas en procesos de restauración y conservación del paisaje. Se hizo un estudio de la biología reproductiva mediante experimentos de polinización controlada, que permitieron determinar el efecto de la autopolinización espontánea, autogamia, xenogamia, geitonogamia, apomixis y polinización natural sobre la producción de semillas y frutos; además, se determinó la relación polen/óvulo y la calidad del polen mediante pruebas colorimétricas y de crecimiento *in vitro* del tubo polínico. En todos los cruces realizados se observó formación de frutos y desarrollo de semillas; por lo tanto, se deduce que *B. glutinosa* es una especie autocompatible, parcialmente autógena, ya que se autopoliniza sin intermediario y parcialmente apomíctica, puesto que produce semillas sin participación del gameto masculino. Los valores obtenidos de la relación P/O, permitieron determinar, que tanto *B. glutinosa* como *M. myrtoideum*, son xenógamas facultativas, debido a que durante su reproducción predomina la polinización cruzada, sin que exista algún mecanismo que condicione la autopolinización, estrategia típica de especies que habitan ecosistemas altamente disturbados y en etapas de sucesión temprana, como el Páramo de Rabanal. El desarrollo de semillas de origen asexual en *B. glutinosa*, permite inferir la participación de una agamosperma facultativa en esta especie, es decir,



la coexistencia de la reproducción sexual y asexual. Respecto a la calidad del polen, en las dos especies se cuantificó una disminución del porcentaje de viabilidad proporcional a la confiabilidad de la técnica utilizada, esto es, con carmín acético (colorante de menor confiabilidad) se registró altos porcentajes de viabilidad (hasta 97,6%), con MTT 94% y mediante la evaluación del crecimiento del tubo polínico (una de las técnicas más confiables) la viabilidad disminuyó hasta 50%; la baja confiabilidad de las pruebas de coloración, se fundamenta en que los granos de polen teñidos y clasificados como viables, no siempre son capaces de germinar. Este es el primer reporte de algunos aspectos de la biología reproductiva para las especies objeto de estudio, por esta razón, los resultados presentados contribuyen al conocimiento biológico y evolutivo de la familia Melastomataceae.

**Palabras clave:** autocompatibilidad, agamosperma facultativa, germinación de polen viabilidad polínica, xenogamia.

## INTRODUCCIÓN

La familia Melastomataceae es una de las mejor representadas en el Neotrópico, siendo la séptima familia más diversa del planeta, con 180 géneros y alrededor de 4400 especies, distribuidas en todos los países intertropicales y subtropicales (Penneys, 2005 y Quiñones, 2001); Colombia es el segundo país con mayor diversidad de especies ( $\approx 900$ ), distribuidas principalmente en la región Andina, Chocó Biogeográfico y Amazonia (Mendoza y Ramírez, 2006). A diferencia de otras familias tropicales, Melastomataceae es constante en cuanto a su morfología floral, pues la mayoría de los géneros presentan flores dialipétalas, estambres generalmente no muy numerosos (1 a 3 veces el número de pétalos)



y flexos durante la fase de botón, conectivo anteridial sencillo o con prolongaciones (Mendoza & Ramírez, 2006).

La biología reproductiva, a través del estudio del sistema reproductivo, fusiona la ecología de la polinización (diversidad de morfología floral) y el comportamiento de visitantes florales y polinizadores (Waser, 1983); además, proporciona conocimientos para la comprensión de como los genes son recombinados y se mantienen en la especie para perpetuar su variabilidad natural (Sebbenn *et al.*, 1999); por ende, es esencial para el desarrollo de programas de mejora genética y entendimiento del proceso de domesticación de plantas (Silva *et al.*, 2001).

La reproducción en las plantas es afectada por factores ecológicos y genéticos, que generan la aparición de fenómenos de endogamia en las poblaciones, variación espacio-temporal de los taxones de cruzamiento lejano y mecanismos de incompatibilidad (Murawski y Hamrick, 1992), además de variaciones en patrones y duración de la floración, así como sincronía y densidad de individuos con flores (Facanali *et al.*, 2009). Renner (1989) determinó la xenogamia como el sistema reproductivo predominante en la familia Melastomateaceae, la cual es favorecida por la separación espacial entre anteras y estigma y, la necesidad de manipulación, de estas últimas, por vectores para la liberación del polen. La autoincompatibilidad es común en las tribus Rhexieae, Miconieae y algunas especies de Melastomeae y Microliceae (Goldenberg y Shepherd, 1998); sin embargo, estudios recientes han demostrado la ocurrencia de autogamia y de apomixis (o agamospermia) (Goldenberg y Shepherd, 1998, Melo *et al.*, 1999, Goldenberg, 2000, Santos *et al.*, 2012), esta última es el fenómeno por el cual una planta es capaz de producir semillas viables sin fusión de gametos y/o formación de cigoto (Mogie, 1992); esta manifestación está íntimamente



relacionada con la hibridación y la poliploidía y, como consecuencia, produce menor viabilidad de polen en las especies (Grant, 1981; Goldenberg, 1994).

Al parecer la familia se encuentra pre-adaptada a la agamospermia, ya que muestra altos niveles de poliploidía e hibridación: no obstante, esta predisposición no necesariamente está limitada a fenómenos cromosómicos o fisiológicos, ya que mecanismos de polinización no específicos también pueden conducir a la formación de semillas asexuales (Richards, 1990).

Por otro lado, de acuerdo con Amela *et al.* (2014), la relación polen/óvulo (P/O), puede predecir el sistema reproductivo en angiospermas; valores bajos corresponden a especies autógamas obligadas, mientras que los valores más altos a especies xenógamas obligadas. La información obtenida al cuantificar el número de granos de polen producidos por antera que pueden llegar a polinizar la cantidad determinada de óvulos que produce una flor, también se ha convertido en una herramienta para determinar el tipo de reproducción de una especie (Cruden, 2000).

Consecuentemente con lo anterior, la información que se genera a partir de la determinación de las estrategias reproductivas y su relación con la calidad de polen, y contribuye en gran medida al conocimiento básico sobre la identidad, la evolución de las especies y la aparición de posibles daños genéticos (Poggio *et al.*, 2004). El objetivo de este trabajo fue determinar el sistema reproductivo, la calidad de polen y relación polen/óvulo en *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*, especies que pueden ser empleadas en procesos de restauración y conservación del paisaje, pues debido a su óptimo crecimiento y desarrollo en zonas de potrero, colonizan los bordes de los parches resultantes de la fragmentación que han sufrido algunos bosques (Díaz *et al.*, 2008; Velazco-Linares *et al.*, 2008).



## MATERIALES Y MÉTODOS.

### Área de estudio.

Se localizó en el Páramo de Rabanal (municipio de Ventaquemada, Boyacá-Colombia), sector Matanegra, vereda Montoya (05°24'N; 73°32'W), entre 3000 y 3370 m. La población objeto de *Bucquetia glutinosa* se ubicó en bordes de fragmento de bosque altoandino con pendiente  $\approx 30^\circ$ ; la población de *Monochaetum myrtoideum* crece en áreas abiertas, preferible en bordes de carretera camino al páramo; estas especies crecen asociadas a otras de las familias Ericaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Lauraceae, Araliaceae, Poaceae, Asteraceae, Melastomataceae y musgos de *Sphagnum*, entre otras; las áreas de distribución colindan con áreas de cultivo de papa y potreros para ganadería.

### Sistema reproductivo.

En 10 individuos adultos de *Bucquetia glutinosa* se realizaron experimentos de polinización controlada; para evaluar el efecto de la polinización sobre la producción de frutos y semillas (Goldenberg, 1994) se realizaron seis experimentos para verificar y cuantificar los procesos de:

1. Autopolinización espontánea (T1): se realizó marcando flores ya abiertas sin manipulación alguna (Fig. 1b), las cuales se embolsaron.
2. Autogamia (T2): consistió en tomar polen de una flor y depositarlo en el estigma de la misma.
3. Xenogamia (T3): se colectó polen de una flor y se depositó en el estigma de otra flor de un individuo diferente.
4. Geitonogamia (T4): se transportó polen de una flor a otra en el mismo individuo.



5. Apomixis (T5): consistió en la emasculación de las anteras de flores en preantesis (Figura a).

Realizados los cruces, los botones fueron cubiertos con bolsas de tela tul para aislarlos de los polinizadores.

6. Se marcaron botones florales recién abiertos, de individuos diferentes, no embolsados y expuestos a los polinizadores (T6: Control-Polinización natural).

Para cada tratamiento se utilizaron 50 botones en pre-antesis formados de 5 individuos y las observaciones periódicas se realizaron hasta que se desarrollaron los frutos (Goldenberg y Shepherd, 1998); posteriormente fueron colectados y trasladados al laboratorio para cuantificar el porcentaje de fructificación y número de semillas por fruto; con estos datos se identificó la existencia o no de diferencias significativas entre los resultados de los experimentos de polinización, aplicando la prueba H de Kruskal-Wallis para muestras independientes con el software IBM SPSS Statistics versión 22; se calculó el índice de autocompatibilidad (ISI), el índice de autogamia (IAS) propuestos por Ruíz y Arroyo (1978) y el índice de polinización cruzada (OCI) propuesto por Cruden (1977); las fórmulas utilizadas fueron:

**ISI**= Número semillas producidos por autopolinización manual (autogamia) / número de semillas producidos por polinización cruzada (xenogamia).

**IAS**= % flores que formaron frutos por autopolinización espontánea / % flores que formaron frutos por autopolinización manual (autogamia).



**Figura 1.** Estadios de desarrollo de flores de *Bucquetia glutinosa* (a y b) y *Monochaetum myrtoideum* (c y d); a) y c) botones en preantesis, b) y d) flores en antesis.

Aunque, al igual que *B. glutinosa*, *M. myrtoideum* es una especie abundante en individuos y de floración continua, no fue posible concluir los experimentos de polinización controlada, debido a que durante el periodo de muestreo no se encontró la cantidad de individuos con flores en preantesis necesarias para realizar los cruces y para el monitoreo.



Por consiguiente, la determinación de estrategia reproductiva de *M. myrtoideum*, se realizó a través de la relación Polen-Óvulo (P/O), método propuesto por Cruden (1977); obtenida dicha relación, se procedió a verificar su correspondencia con el sistema reproductivo propuesto por el mismo autor (Tabla 1).

### Relación polen-ovulo (P/O)

Para cada especie, la cuantificación del número de óvulos por flor se realizó bajo estereoscopio, disectando 100 botones florales provenientes de 10 individuos. El número de granos de polen por antera se determinó con el método de Lloyd (1965), con algunas modificaciones: se suspendieron 8 anteras (total por flor) de un botón floral en 80  $\mu$ L de agua destilada estéril y Tween 20, se centrifugó a 6000 rpm durante cinco minutos y utilizando un hematócmetro se cuantificó los granos de polen en microscopio óptico. Para estimar el número de granos de polen por flor, se multiplicó el número de granos por antera por el promedio de anteras por flor; en total se utilizaron 50 botones. Finalmente, la relación polen/óvulo (P/O) se estableció dividiendo el número promedio de granos de polen por flor entre el promedio de óvulos por flor (Cruden, 1977).

**Tabla 1.** Sistemas reproductivos estimados con los valores medios de P/O según Cruden (1977).

Sistema Reproductivo	P/O	Log P/O
Cleistogamia	4,7 $\pm$ 0,7	0,65 $\pm$ 0,07
Autogamia obligada	27,7 $\pm$ 3,1	1,43 $\pm$ 0,05
Autogamia Facultativa	168,5 $\pm$ 22,1	2,15 $\pm$ 0,06
Xenogamia Facultativa	796,6 $\pm$ 87,7	2,81 $\pm$ 0,05
Xenogamia	5895 $\pm$ 936,5	3,65 $\pm$ 0,06





### **Viabilidad del polen**

Se determinó mediante pruebas colorimétricas, aplicando el test de Carmín Acético, colorante afín al contenido citoplasmático y el test MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazolil-1-2)-2,5-difenil tetrazolio, que tiñe los granos de polen con actividad enzimática de la deshidrogenasa; también se registró el porcentaje de granos de polen que desarrollaron tubo polínico en condiciones *in vitro* mediante la germinación *in vitro* de polen.

*Test carmín acético:* se utilizaron 50 botones florales de 5 individuos, fijados en solución FAA (Formol, Ácido acético y Alcohol) durante 24 horas a 4°C. Bajo estereoscopio y en lámina portaobjetos se extrajeron los granos de polen de las 8 anteras (por botón) y se agregó una gota de colorante carmín acético al 2%; se colocó la lámina cubreobjetos se flameó suavemente y, al microscopio óptico, se contaron 100 gr de polen; se consideró como viables aquellos que adquirieron una coloración roja y no viables aquellos sin coloración (Radford *et al.*, 1974). En cada lámina se realizaron 8 conteos, en uno, dos o tres campos visuales, para un total de 400 en los 5 individuos.

*Test MTT:* según la metodología propuesta por França-Neto *et al.* (2009), secolectaron 50 botones florales y de cada uno de ellos, con ayuda de aguja hipodérmica, se vaciaron los granos de polen en tubos eppendorf con 200  $\mu$ L de Bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazolil-1-2)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) al 1%, diluido en DMSO e isopropanol (1:1); posteriormente los tubos se centrifugaron a 6000 rpm durante cinco minutos y se incubaron a 30°C durante 12 horas. Luego, de cada tubo se extrajeron 80  $\mu$ L y se depositaron sobre una lámina portaobjetos; al microscopio óptico se contaron 100 granos de polen y se clasificaron en viables



e inviables, los primeros de coloración amarilla, los segundos con una coloración diferente.

*Germinación in vitro*: en cajas de Petri se cultivaron los granos de cinco plantas en el medio de germinación propuesto por Cortez *et al.* (2012), compuesto por 2% de gelatina sin sabor, 20% de Sacarosa, 0,01% de Ácido Bórico ( $H_3BO_3$ ), 0,05% de Nitrato de Calcio ( $Ca(NO_3)2 \cdot 2H_2O$ ) y con pH 6,0. La siembra de polen se realizó en 5 cajas de Petri con alícuotas de 20 mL de medio; en cada una se depositaron granos de polen extraídos de 160 anteras pertenecientes a 20 botones florales cada planta. Previamente a la dispersión en el medio de cultivo, con el fin de restaurar los lípidos en las membranas celulares (França Neto *et al.*, 2010), los granos de polen fueron rehidratados en cámara húmeda durante dos horas. Después de la incubación a 25°C durante 3 horas, los granos de polen fueron observados al microscopio para identificar la presencia de tubos polínicos; se consideraron granos viables cuando el tubo polínico alcanzó una longitud mayor o igual al ancho del grano de polen; para una mejor observación al montaje se adicionó azul de toluidina.

Para los tres test aplicados, el porcentaje de polen viable se calculó mediante la relación: número de granos de polen viable / total de los granos observados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Sistema reproductivo

En todos los experimentos de polinización controlada en *Bucquetia glutinosa*, se identificó la formación de frutos y desarrollo de semillas; no obstante, la prueba de Kruskal Wallis determinó diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0,05$ ),



tanto para el porcentaje de fructificación ( $X^2(1)=64,23$ ) como para el número promedio de semillas formadas ( $X^2(1)=87,63$ ). La autopolinización espontánea (T1) y el tratamiento control (T6), generaron los porcentajes más altos de formación de frutos (86% y 96%, respectivamente), mientras la apomixis no superó el 32%; en los dos tratamientos de polinización cruzada (xenogamia y geitonogamia) se registró el mismo porcentaje de fructificación (80%) (Tabla 2). El desarrollo de semillas por fruto, previsiblemente, presentó una correlación negativa alta (Rho de Spearman;  $r_s = -0,76$ ), a mayor porcentaje de fructificación, mayor número de semillas formadas y viceversa.

**Tabla 2.** Respuestas obtenidas de los experimentos de polinización controlada en *B. glutinosa*. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (H de Kruskal-Wallis  $P \leq 0,05$ ).

Tratamientos	No. Flores utilizadas	Fructificación (%)	No. semillas formadas ( $\bar{x}$ )
T1 Autopolinización espontánea	50	86 (ab)	246,6±128,8 (ab)
T2 Autogamia	50	70 (b)	194,8±143,1 (ac)
T3 Xenogamia	50	80 (ab)	217,1±129,8 (ab)
T4 Geitonogamia	50	80 (ab)	215,7±114,2 (a)
T5 Apomixis	50	32 (c)	66,7±114,1 (c)
T6 Control	50	96 (a)	329,2±92,5 (b)

Según índices de Ruiz y Arroyo (1978), la relación entre el número de semillas producidas, por flor cruzada en la prueba de autopolinización manual, y el número de semillas producidas por flor cruzada en la prueba de polinización cruzada manual (ISI) fue 0,9; por su parte, la relación entre el porcentaje de frutos por polinización automática (Autogamia) y la autopolinización espontánea (IAS) fue



0,81, datos que indican que *B. glutinosa* es autocompatible, parcialmente autógena (se autopoliniza sin intermediario) y parcialmente apomítica (produce semillas sin participación del gameto masculino), conclusión apoyada por la formación de frutos por reproducción sexual y asexual.

La relación polen-óvulo estimada para *Monochaetum myrtoideum*, determina a la especie como xenógama facultativa ( $P/O=1637,371$ ;  $\text{Log}=3,21$ ), existiendo una predominancia por la polinización cruzada sin mecanismos que prevengan la autopolinización (Ferreira *et al.*, 2000); sin embargo, para otras especies de *Monochaetum*, la reproducción por autopolinización también es frecuente (Almeda, 1978, Renner, 1989).

La autocompatibilidad no está ligada exclusivamente a altos niveles de autogamia, ya que ésta es condicionada por la presencia de anteras poricidas y hercogamia (Santos *et al.*, 2012) en *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*, la autopolinización puede ocurrir cuando se activa el mecanismo de polinización a través del viento o la lluvia, que ocasiona movimientos de las anteras y el contacto del polen con el estigma (Hokche y Ramírez, 2008).

La formación exitosa de frutos en *B. glutinosa* puede ser el resultado de una adecuada manipulación de las flores y la disponibilidad y eficiencia de sus polinizadores (abejas y abejorros), cuya visita se da exclusivamente por pisoteo de polen (Andrade *et al.*, 2007), comportamiento observado en campo; evolutivamente se ha sugerido que las flores polinizadas por movimientos vibratorios se modificaron a partir de flores poliandrias y nectaríferas con número de estambres reducidos y presencia de poco polen, que con el tiempo dejaron de producir néctar (Dukas y Dafni, 1990), y que originaron flores con anteras oblongo



alargadas de apertura espontánea a través de poros (Endress, 1994); según Renner (1989), en Melastomataceae la polinización vibratoria es tan eficiente, que, una vez este establecida, es difícil que un mecanismo alternativo de polinización evolucione, incluso en grupos con alta abundancia de especies.

La polinización cruzada presente en ambas especies, es explicada por la actividad de los polinizadores y la densidad de las flores; en poblaciones con baja densidad floral se experimenta un incremento en la dispersión del polen y, por ende, una baja incidencia de la autopolinización (Scheepens, 2012). Igual que en *Tibouchina heteromalla*, las dos especies de este estudio se caracterizan por un sistema sexual xenógamo facultativo autocompatible, que puede estar relacionado con la unión de gametos de especies genéticamente diferentes (Campos *et al.*, 2009).

Cuando las especies dependen de vectores externos que transportan el polen, la polinización cruzada es ventajosa, más aún cuando existe una escasés de flores por unidad de tiempo (Santos, 2003), que se traduce en la disminución de los niveles de geitonogamia y que los polinizadores se obliguen a buscar recursos en otros individuos, así, aumenta la posibilidad de cruzamiento xenogámico (Montoro y Santos, 2007).

La formación y desarrollo de frutos y semillas en el experimento de apomixis, indica que *B. glutinosa* puede ser una especie agamospérmica, respuesta que puede deberse a la derivación del óvulo de una célula materna diploide sin reducción meiótica y su posterior desarrollo, independiente de la fecundación, en un embrión (Hand y Koltunow, 2014), a la infectiva emasculación de las flores que produjo autopolinización o, por la posible autopolinización originada en flores



en estado de preantesis (Caetano *et al.*, 2013). Hand y Koltunow, (2014) determinaron que los mecanismos que explican el desarrollo de semillas de origen asexual son el desvío de la meiosis durante la formación del saco embrionario (apomeiosis), el desarrollo de un embrión independiente de la fertilización (partenogénesis), y la formación de endosperma viable por medios independientes de la fertilización.

Aunque en Melastomataceae la apomixis es común (Melo *et al.*, 1999, Goldenberg, 2000, Santos *et al.*, 2012, Vinicius *et al.*, 2012, Caetano *et al.*, 2013), de las tres especies descritas de *Bucquetia*, este es el primer reporte de este mecanismo de reproducción; en cuanto a *M. myrtoideum*, la información generada en este estudio no permite hacer determinaciones aún más contundentes; sin embargo, hasta la fecha no existe algún reporte de especies agamospérmicas en *Monochaetum*.

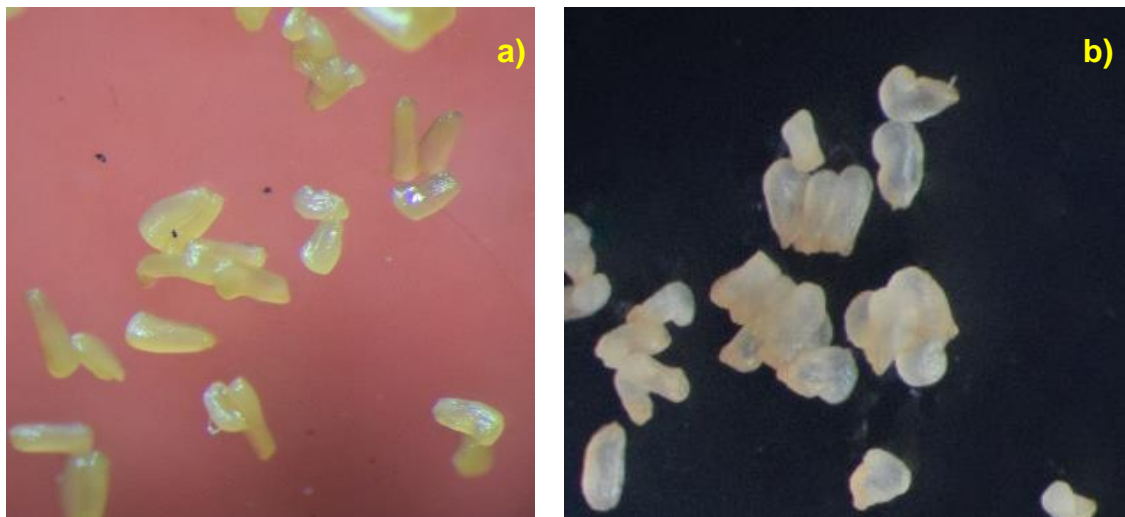
Si existiera alguna correspondencia de la apomixis en la reproducción de las especies objeto de estudio, la estrategia reproductiva sería agamospermia facultativa, caracterizada por la coexistencia de la reproducción sexual y asexual (Maia *et al.*, 2016).

### **Relación polen-óvulo (P/O)**

En *B. glutinosa* se cuantificaron en promedio, 191426,5 granos de polen y 343,9 óvulos por flor, en *M. myrtoideum* 161029,1 granos de polen y 323,6 óvulos por flor; en los óvulos de ambas especies se observó una curvatura (Figs. 2a y 2b) que indica su naturaleza anatrópica, éstos nacen sobre intrusiones placentarias fuertemente peltadas y la micrópila (porción apical) se encuentra enfrentada a la placenta (Almeda 1978; Souza-Pérez, 2010). Aunque la cuantificación de de



granos de polen fue similar en las dos especies, este valor puede variar en función del comportamiento meiótico de cada una de ellas (Erbar y Langlotz, 2005).



**Figura 2.** Vista al estereoscopio de ovarios de *B. glutinosa* (a) y *M. myrtoideum* (b).

La relación polen/óvulo fue relativamente alta (555,6 y 522,3), con el índice de polinización cruzada (OCI=3), característico de especies xenógamas facultativas (Tabla 3); aunque la mayoría de eventos de fertilización se dan producto del entrecruzamiento, también se presenta autopolinización (Jiménez *et al.*, 2009); no obstante, estas especies se caracterizan por ser nativas colonizadoras y su grado de entrecruzamiento puede ser limitado, y por lo general, habitan ecosistemas altamente disturbados y en etapas de sucesión temprana (Cruden, 2000), como es el caso del Páramo de Rabanal.



**Tabla 3.** Número de óvulos, granos de polen y relación polen-ovulo para *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*.

Especie	Óvulos por flor ( $\bar{x}$ )	Granos de polen por antera ( $\bar{x}$ )	Granos de polen por flor ( $\bar{x}$ )	Relación P/O	Log	Sistema reproductivo (Cruden, 1977)
<i>Bucquetia glutinosa</i>	343,9 ± 53,9	23928,3 ± 6713,2	191426,5 ± 53705,7	556,63	2,74	XENOGAMIA FACULTATIVA
<i>Monochaetum myrtoideum</i>	323,6 ± 46,9	21128,6 ± 6914,1	169029,1 ± 55312,5	522,33	2,71	XENOGAMIA FACULTATIVA

La alta relación P/O no concuerda con lo reportado por Cruden (2000), quien indica que, a diferencia de las especies sexualmente dimórficas, en las hermafroditas, como *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*, se encuentran bajas relaciones P/O y granos de polen de un gran tamaño (Erbar y Langlotz, 2005); de acuerdo con Cruden y Miller-Ward (1981) las especies con mecanismos de transferencia de polen muy eficientes deben presentar bajas relaciones P/O en comparación con las especies con flujo de polen menos eficiente, lo que no solo está determinado por los medios de polinización, sino también por aspectos fisiológicos, metabólicos y cromosómicos (Hokche y Ramírez, 2008)

Si bien las relaciones P/O pueden variar inter e intra-poblacionalmente y/o entre flores de una misma inflorescencia (Lord, 1980), su resultado conserva una estrecha correlación con la estrategia reproductiva de las especies (Cruden, 2000), por lo tanto, este valor permite hacer una aproximación válida en el conocimiento de los mismos; esta premisa se corrobora con lo observado en *B. glutinosa*, cuya relación P/O coincide con los resultados obtenidos de los experimentos de polinización. Adicionalmente, algunos autores han sugerido la existencia de una conexión indirecta de la relación P/O con la taxonomía y la





filogenia (Jürgens *et al.*, 2002), ésto como consecuencia de la combinación de caracteres típicos de cada grupo taxonómico, que se traduce en afinidades taxonómicas relacionadas con la similitud de valores P/O (Galloni *et al.*, 2007), semejanza observada en las especies objeto de estudio.

### Viabilidad de polen

Durante la evaluación de la calidad del polen, en *B. glutinosa* y en *M. myrtoideum* se observó una disminución del porcentaje de viabilidad, proporcional a la confiabilidad de la técnica utilizada (tabla 4); con el test acetocarmín (colorante de menor confiabilidad) se cuantificaron altos porcentajes de viabilidad (hasta 97,6%), con MTT 94% y mediante la evaluación del crecimiento del tubo polínico (técnica más confiable) la viabilidad disminuyó hasta 50,3%. La baja confiabilidad de las pruebas de coloración se fundamenta en que los granos de polen teñidos y clasificados como viables, no siempre son capaces de germinar y mucho menos producir semillas (Santos *et al.*, 2012).

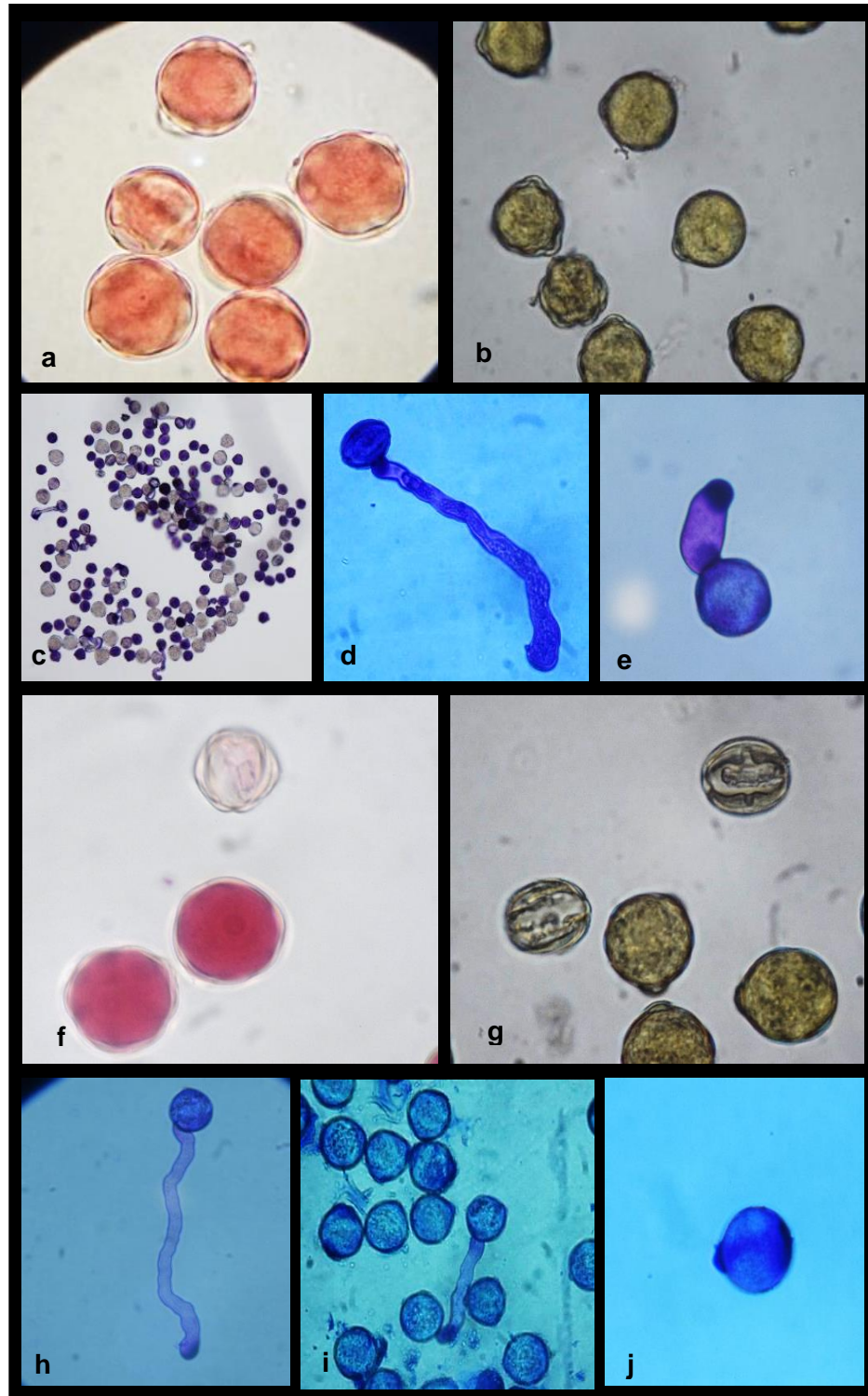
**Tabla 4.** Viabilidad de granos de polen en *B. glutinosa* y *M. myrtoideum* estimada mediante pruebas colorimétricas y desarrollo *in vitro* del tubo polínico.

Técnica	Granos de polen				
	Viables ( $\bar{x}$ )	Inviabiles ( $\bar{x}$ )	Total	% Viables	% Inviabiles
<b><i>Bucquetia glutinosa</i></b>					
Carmín acético	122,56±18,92	2,97±3,11	50216	97,6%	2,4%
MTT	129,64±19,65	8,37±6,26	55188	93,9%	6,1%
Germinación	246,78±60,46	186,45±53,50	86647	56,9%	43,1%
<b><i>Monochaetum myrtoideum</i></b>					
Carmín acético	111,60±15,57	5,28±5,81	46755	95,4%	4,6%
MTT	111,89±13,50	15,64±9,82	51014	87,7%	12,3%
Germinación	224,68±74,43	221,64±84,10	89265	50,3%	49,7%



Se observaron cambios en la morfología y fisiología de los granos de polen en cada uno de los test utilizados; en aquellos que fueron tratados con colorante carmín (Figuras 3a, f), fue perceptible una coloración roja indicadora de la integridad de la membrana citoplasmática (Marks, 1954); con MTT (Figura 3b,g) una coloración amarillo pálido que se manifiesta en granos de polen con actividad enzimática metabolizada por deshidrogenasas mitocondriales y, durante la germinación *in vitro* (Figura 3c-e y h-j) se observó el crecimiento del tubo polínico, facilitado por la composición del medio de cultivo que simula el mucílago del estigma (Rodríguez-Riano y Dafni, 2000).

La viabilidad implica la estimación de la capacidad que tiene un grano de polen de vivir, crecer, germinar y desarrollarse (Lincoln *et al.*, 1982), mientras la germinabilidad es definida como la capacidad que tiene el grano de polen de emitir el tubo polínico en condiciones adecuadas (Dafni y Firmage, 2000); mediante las técnicas utilizadas en este estudio se evaluaron dichos parámetros en las dos especies, lo que permitió realizar una valoración más completa de los granos de polen.



**Figura 3.** Cambios morfofisiológicos que experimentan los granos de polen de *B.*



*glutinosa* (a-e) y de *M. myrtoideum* (f-j), después de tratados con carmín 2% (a y f), MTT 1% (b y g) y mediante la germinación del tubo polínico en medio de cultivo (c, d, e, h, i y j).

Puntualmente, la disminución de la viabilidad del polen encontrada en las pruebas colorimétricas (3,7% y 7,7% en *B. glutinosa* y *M. myrtoideum* respectivamente), indica que en algunos granos de polen, aparentemente íntegros, no se activan enzimas deshidrogenasas y peroxidadas relacionadas con la respiración celular (Kearns y Inouye, 1993, Hoffmann y Varassin, 2011), es decir, que aunque el citoplasma del grano de polen mantiene su afinidad por la tinción citológica, el mecanismo fisiológico responsable del crecimiento exitoso del tubo de polen no necesariamente lo hace, por lo que, incluso, los granos de polen teñidos resultan inviables (Cortez *et al.*, 2012); no obstante algunas veces, la disminución de la viabilidad polínica, además de su capacidad de fertilización, también pueden verse afectadas por la desecación, debido a la baja humedad relativa, la disponibilidad de sustancias de reserva, la edad de la flor, alteraciones morfológicas de la antera y la temperatura, entre otros (Dafni y Firmage, 2000).

Tal como ha sido reportado para especies de *Leandra* y *Miconia* (Melastomataceae) (Goldenberg, 2000), los bajos porcentajes de viabilidad derivados de la prueba del crecimiento del tubo polínico, posiblemente se obtienen en función de malformaciones polínicas de individuos de origen poliploide, modelo de citoevolución explicado por el aumento de un número base disploide (Almeda, 2013), que también ha sido confirmado a partir de descripciones cromosómicas previas para *B. glutinosa* y *M. myrtoideum* (ver capítulo 4); en efecto, en primera medida, se ha comprobado en varias especies



apomicticas de esta familia, que irregularidades meióticas son las responsables de la baja viabilidad polínica (Goldenberg y Shepherd, 1998). Por otro lado, factores biológicos y ecológicos como la longevidad de la flor, el dimorfismo y dehiscencia de las anteras, entre otras, también pueden asociarse con las variaciones de los porcentajes de fertilidad masculina (Hoffmann y Varassin, 2011); de forma particular Pacini (1990) señala que la baja capacidad germinativa en granos de polen tomados de flores en estadios tempranos (preantesis), se debe a que en dicho estado, no se han sintetizado carbohidratos que participan durante el desarrollo del gametofito y su posterior germinación, lo que explicaría, en parte, la disminución de viabilidad del polen encontrada en *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*.

A pesar de lo expuesto anteriormente, es probable que estratégicamente, estas especies compensen la baja viabilidad polínica con el gran número de granos de polen producidos por antera: en promedio 23928 en *B. glutinosa* y 21128 en *M. myrtoideum*.

Relacionando los datos de viabilidad de polen con las estrategias de reproducción, se corrobora la posible condición de apomixis facultativa para estas dos melastomatáceas, ya que de acuerdo con Goldenberg y Varassin (2001), es posible suponer que los valores superiores a 85% de granos de polen viables representen poblaciones no apomícticas, mientras que los que están por debajo del 20% revelan las apomícticas; para *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*, se obtuvieron valores intermedios, 50,3 y 56,9%, respectivamente.



## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos de los experimentos de polinización se puede determinar que *B. glutinosa* es una especie autocompatible, parcialmente autógena, ya que se autopoliniza sin intermediario y parcialmente apomíctica, pues produce semillas sin participación del gameto masculino.

Mediante la relación P/O obtenida, se infiere que tanto *B. glutinosa* como *M. myrtoideum* son especies xenógamas facultativas, es decir, existe una predominancia por la polinización cruzada pero no hay algún mecanismo que prevenga la autopolinización; esta estrategia de reproducción es típica en especies que habitan ecosistemas altamente disturbados y en etapas de sucesión temprana. No obstante, el desarrollo de semillas de origen asexual en *B. glutinosa*, permite inferir la participación de una agamosperma facultativa, es decir, la concomitancia de la reproducción sexual y asexual.

Las diferencias encontradas entre las pruebas de estimación de la viabilidad del polen indican que, aunque el citoplasma del grano de polen sea afín a la tinción citológica (carmin acético y bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazolil-1-2)-2,5-difenil tetrazolio), en realidad resultan inviables, ya que la emergencia exitosa del tubo de polen no se da; esta respuesta se debe a malformaciones polínicas e irregularidades durante la meiosis.

*B. glutinosa*, *M. myrtoideum* con frutos en cápsula, producen un gran número de semillas y es posible que esta abundancia, actué como un mecanismo de compensación a las variaciones de su hábitat que en gran medida determina su comportamiento reproductivo, ayudando a la supervivencia de la especie al elevar las probabilidades de que más semillas encuentren hábitats adecuados.



Si la relación entre el sistema de reproducción y la distribución geográfica se aplica a la familia como un todo, se podría anticipar que las especies de Melastomataceae con distribuciones restringidas probablemente sean especies sexuales, de esta forma, su éxito reproductivo dependería de la polinización cruzada; sin embargo, esta relación no fue objeto de este estudio por lo que se recomienda realizar trabajos en los que se genere esa información. Finalmente, a la fecha no se conocen otros estudios de biología reproductiva para *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*; por esta razón, los resultados presentados aquí, constituyen un aporte significativo al conocimiento biológico y evolutivo de la familia.

## BIBLIOGRAFÍA

Almeda F. (1978). Systematics of the genus *Monochaetum* (Melastomataceae) in Mexico and Central America. University of California Publications in Botany 75:1-134.

Amela, G. M., Miguez, M., & Gottsberger, G. (2014). Pollen: ovule ratio and its relationship with other reproductive traits in some *Passiflora* species (Passifloraceae). Anales del Jardín Botánico de Madrid, 71(2), e009. doi:<http://dx.doi.org/10.3989/ajbm.2360>

Andrade, P. M., Forni-Martins, E. R. & Martins, F. R. (2007). Reproductive system of *Eriocnema fulva* Naudin (Melastomataceae), an endemic species of Minas Gerais state, SE Brazil. *Braz. J. Biol.*, 67(2):313-319.

Campos, C. C. F., Duarte, J. F., Bore´m, R. A. T. & de Castro, D. M. (2009). Floral



biology and breeding mechanisms of *Tibouchina heteromalla* Cong. in rocky outcrops in the south of Minas Gerais. *Braz J Ecol.*, 1:1-12.

Caetano, A., Teixeira, S., Forni-Martins, E., & Carmello-Guerreiro, S. (2013). Pollen Insights into Apomictic and Sexual *Miconia* (Miconieae, Melastomataceae). *International Journal of Plant Sciences*, 174(5):760-768. doi:10.1086/669927

Cortez, P. A., Carmello-Guerreiro, S. M. & Teixeira, S. P. (2012). Understanding male sterility in *Miconia* species (Melastomataceae): a morphological approach. *Australian Journal of Botany, Collingwood*, 60(6):506-516.

Cruden, R. W. (1977). Pollen-ovule ratios: A conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 31:32-46.

Cruden, R. W. (2000). Pollen grains: why so many? *Plant Systematics and Evolution*, 222:143-165. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00984100>

Cruden, R. W. & Miller- Wards, S. (1981). Pollen-ovule ration, pollen size, amd the ratio pf stigmatic area to thepollen-bearing area pollinator: an hypothesis. *Evolution*, 35: 964-974

Dafni, A. & Firmage, D. (2000). Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution*, 222:113-132.

Díaz, E. A., León, O. A. & Vargas, O. (2008). Sobrevivencia y crecimiento de





plántulas debajo de *Lupinus bogotensis* implicaciones para la restauración. En: Vargas, O. 2008. Estrategias para la restauración ecológica del bosque Alto andino: El caso de la Reserva Forestal Municipal de Cogua, Cundinamarca. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 372 p.

Dukas, R. & Dafni, A. (1990). Buzz pollination in three nectariferous Boraginaceae and possible evolution of buzz-pollinated flowers. *Plant Systematic and Evolution*, 169:65-68.

Endress, P. K. (1994). Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press, Cambridge. 551 pp.

Erbar, C. & Langlotz, M. (2005). Pollen to ovule ratios: standard or variation—a compilation. *Bot. Jahrb. Syst.*, 126(1):71-132.

Facanali, R., Campos, M. M. S., Pocius, O., Ming, L. C., Soares-Scott, M. D., & Marques, M. O. M. (2009). Biología reproductiva de populações de *Ocimum selloi* Benth. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai, Botucatu.*, 11(2):141-146.

Ferreira, J. J., Álvarez, E., Fueyo, M. A., Roca, A. & Giraldez, R. (2000). Determination of the outcrossing rate of *Phaseolus vulgaris* L. using seed protein markers. *Euphytica*, 113:259-263.

França Neto, L. V., Nascimento, W., Carmona, R. E. & De Freitas, R. (2009). Viability of eggplant pollen. *Crop Breeding Appl. Biotechn.*, 9(4):320-327.



França Neto, L. V., Nascimento, W., Carmona, R. E., & De Freitas, R. (2010). Tolerância à dessecação de pólen de berinjela. *Rev. Bras. Sementes*, 32(1):53-59.

Galloni, M., Podda, L., Vivarelli, D. & Cristofolini, G. (2007). Pollen presentation, pollen-ovule ratios, and other reproductive traits in Mediterranean legumes (Fabaceae- Faboideae). *Plant Systematics and Evolution*, 266:147-164. <http://dx.doi.org/10.1007/s00606-007-0526-1>

Goldenberg, R. (1994). Estudos sobre a biologia reproductiva de especies de Melastomataceae de Cerrado em Itiripina, SP. Libro Tesis Maestría en Ciencias Biológicas, área de Biología Vegetal. Universidad de Campinas, Campinas- Brazil. 88 p.

Goldenberg, R. & Shepherd, G.J. (1998). Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "Cerrado" vegetation. *Pl. Syst. Evol.*, 211:13-29.

Goldenberg, R. (2000). Apomixia como alternativa a reproducao sexuada em Melastomataceae. In: Cavalcanti TB, Walter BMT. eds. *Topicos atuais de botanica*. Brasilia: EMBRAPA – Recursos Geneticos, 225-230.

Goldenberg, R. & Varassin, I.G. (2001). Sistemas reproductivos de espécies de Melastomataceae da Serra do Japi, Jundiaí, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 24:283-288.

Hand, M. & Koltunow, A. (2014). The genetic control of apomixis: asexual seed formation. *Genetics* 197:441–450. doi: 10.1534/genetics.114.163105



- Hokche, D. O. & Ramírez, N. (2008). Sistemas reproductivos en especies de Melastomataceae en la Gran Sabana (Estado Bolívar, Venezuela) *Acta Botanica Venezuelica*, 31:387-408.
- Hoffmann, G. M. & Varassin, I. G. (2011). Variação da viabilidade polínica em *Tibouchina* (Melastomataceae). *Rodriguésia*, 62:223-228.
- Jiménez, C. L., Matias, M. L. & Jiménez, M. G. (2009). Aspectos demográficos y reproductivos de *Pachycereus weberi* (J.M.Coult) Backeb (Cactaceae) en una nueva localidad en el Estado de Hidalgo, México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 54(2):36-47. 32.
- Jürgens, A., Witt, T. & Gottsberger, G. (2002). Pollen grain numbers, ovule numbers and pollen-ovule ratios in Caryophylloideae: correlation with breeding system, pollination, life form, style number, and sexual system. *Sexual Plant Reproduction*, 14:279-289. <http://dx.doi.org/10.1007/s00497-001-0124-2>
- Kearns, C. A. & Inouye, D. W. (1993). Pollen. In: Techniques for pollination biologist. Colorado University Press, Niwot. Pp. 77-151.
- Lincoln, R. J., Boxshall, G. A. & Clark, P. F. (eds.) (1982). A dictionary of ecology, evolution and systematic. Cambridge University Press. New York.
- Lloyd, D.G. 1965. Evolution of self-compatibility and racial differentiation in *Leavenworthia* (Cruciferae). *Contr. Gray Herb.* 195: 3-134.



- Maia, F.R., Varassin, I. G., & Goldenberg, R. (2016). Apomixis does not affect visitation to flowers of Melastomataceae, but pollen sterility does. *Plant Biology*, 18:132-138.
- Melo, G.F., Machado, I. C. & Luceño, M. (1999). Reproducción de tres especies de *Clidemia* (Melastomataceae) en Brasil. *Revista de Biología Tropical*, 47:359-363.
- Mendoza, H. & Ramírez, B. (2006). Guía ilustrada de géneros de Melastomataceae y Memecylaceae de Colombia. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt - Universidad del Cauca.
- Montoro G. R. & Santos M. L. (2007). Fenología e biología reproductiva de *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae) no Parque Estadual da Serra dos Pirineus, Goiás. *Biol. Neutron.*, 4(1):21-29.
- Murawski, D. A., & Hamrick, J. L. (1992). Mating system and phenology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in central Panama. *Journal of Heredity*, Washington, 83(1):401-404.
- Pacini, E. (1990). From anther and pollen ripening to pollen presentation. In: Dafni, A., Hesse, M. & Pacini, E. (Eds.) Pollen and pollination. Springer-Verlag. New York, 14-94.
- Penneys, D. S. (2005). Página WEB Melastomataceae. Webmaster: dpenneys@ufl.edu Page last updated: 13 March. En: Mendoza, H. y



Ramírez, B. 2006. Guía ilustrada de géneros de Melastomataceae y Memecylaceae de Colombia. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt - Universidad del Cauca.

Poggio, I., González, G., Ferrari, M., García, A., Wulff, A., Greizerstein, A., Tomas, P. & Schrauf, G. (2004). Aportes de la citogenética al estudio de genomas vegetales En: Levitus, G., V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (eds). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. 337 pp.

Quiñones-M., L. M. (2001). Diversidad de la familia Melastomataceae en la Orinoquia colombiana. Biblioteca José Jerónimo Triana No. 5. Pp???

Radford, A. E., Dickison, W. C., Massey, J. R. & Bell, C. R. (1974). Vascular plant systematics. Harper y Row Publishers. New York. 891 p.

Renner, S. S. (1989). A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 76(2):496-518.

Richards, A. J. (1990). Plant breeding systems. George Allen y Unwin, Londres.

Ruiz, T. & Arroyo, M. T. (1978). Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica*, 10:221-230.

Santos, M. L. (2003). Florística e biologia reprodutiva de espécies de Melastomataceae no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas e Parque



Estadual da Serra dos Pireneus, Goiás. Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Santos, A. P. M., Fracasso, C. M., Santos, M. L., Romero, R., Sazima, M. & Oliveira, P. E. (2012). Reproductive biology and species geographical distribution in the Melastomataceae: a survey based on New World taxa. *Annals of Botany*, 110:667-679.

Scheepens, J. F., Frei, E. S., Armbruster, G. F. & Stöcklin, J. (2012). Pollen dispersal and gene flow within and into a population of the alpine monocarpic plant *Campanula thyrsoides*. *Ann. Bot.*, 110:1479-1488. doi: 10.1093/aob/mcs131

Sebbenn, A. M., Siqueira, A. C., Kageyama, P. Y. & Dio Junior, O. J. (1999). Variação genética entre e dentro de populações de amendoim: *Pterogyne nitens*. *Scientia Florestalis, Piracicaba*, 56(1):29-40.

Silva, R. M., Gerhard-Bandel, M. I. & Martins, P. S. (2001) Biología reproductiva de etnovariedades de mandioca. *Scientia Agrícola, Piracicaba*, 58(1):101-107.

Souza Pérez, M. (2010). Anatomía y morfología de la flor de *Leandra lacunosa* Cogn. (Melastomataceae). Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias. 38 p.

Velasco-Linares, P., Díaz-Martín, R. & Vargas, O. (2008). Los parches de plantas herbáceas colonizadoras de potreros y el crecimiento y supervivencia de especies heliófilas leñosas. En: Vargas, O. 2008. Estrategias para la restauración ecológica del bosque Altoandino: El caso de la Reserva



Forestal Municipal de Cogua, Cundinamarca. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 372p

Waser, N. M. (1983). Competition for pollination and floral character differences among sympatric plant species: A review of evidence. In: Handbook of Experimental Pollination Biology, eds. C. E. Jones & R. J. Little, Van Nostrand Reinhold, N.Y., pp. 277-293.



## CAPITULO 4.

### CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA DE *Bucquetia glutinosa* Y *Monochaetum myrtoideum* MEDIANTE DOBLE TENCIÓN DAPI/ CMA3

#### RESUMEN

El conocimiento cromosómico de las especies permite explicar su comportamiento reproductivo, sobre todo en aquellas que habitan ecosistemas perturbados. *Bucquetia glutinosa* y *Monochaetum myrtoideum*, son dos melastomatáceas nativas, con gran potencial para la restauración de los páramos colombianos y cuyas estrategias reproductivas pueden estar limitadas por la producción de polen con baja viabilidad. Aplicando técnicas de coloración convencional, coloración con fluorocromos, DAPI y CMA<sub>3</sub>, y analizando el índice meiótico, se caracterizó el cariotipo y la de distribución de la heterocromatina en *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*. Con base a la coloración con Giemsa 2%, se observó que tanto *B. glutinosa* como *M. myrtoideum*, presentan núcleos interfásicos de tipo arreticulado, en los cuales se observan cromocentros de forma irregular, con tamaño superior al de los cromosomas metafásicos; con los cariotipos obtenidos se cuantificó un complemento cromosómico  $2n=36$ . Las observaciones realizadas corroboran la agrupación de *Heterocentrum* de la tribu Melastomeae, conformado por *Bucquetia*, *Monochaetum*, *Castratella* y *Chaetolepis*, géneros con flores tetraméricas, ovarios tetraloculares, y por lo menos los dos primeros con número base  $x=18$ , cuyo origen, posiblemente, es paleopoliploide; además, la presencia de heterocromatina altamente compactada en forma de cromocentros. El uso conjunto de dos fluorocromos, permitió identificar heterocromatina constitutiva DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>-</sup>, DAPI<sup>-</sup>/CMA<sup>+</sup>, DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>+</sup>, DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>0</sup> y DAPI<sup>0</sup>/CMA<sup>+</sup>; no obstante, la intensidad de las señales GC (relacionadas con NOR-CH) fue mayor y aún más representada en *M.*





*myrtoideum*. A partir de la cuantificación de tétradas normales, se puede inferir que *M. myrtoideum* y *B. glutinosa* son especies meióticamente estables con producción de gametos masculinos balanceados; sin embargo, el desarrollo de anomalías postmeióticas (triadas, diadas o monadas con microcitos), infiere la aparición de problemas durante la polinización y por ende la producción de semillas asexuales con pocas probabilidades de germinar. Finalmente, se recomienda replicar las metodologías empleadas en este trabajo con la mayor cantidad de especies y géneros posibles, con miras a la comparación de cariotipos basada en la señalización de sitios ricos en AT- GA, lo cual permite establecer relaciones evolutivas dentro de familia.

#### **Palabras clave.**

Bandas DAPI/CMA, Cromosomas, heterocromatina, Índice meiótico, Melastomataceae.

#### **INTRODUCCIÓN**

El conocimiento de la dotación cromosómica de las especies tiene una importante aplicabilidad sistemática, evolutiva y citológica (Keisham *et al.*, 2015); no obstante, la información sobre la distribución de la heterocromatina en los cromosomas, permite comprender los posibles cambios estructurales de los cromosomas durante su evolución (Guerra *et al.*, 2000). Se distinguen dos tipos de heterocromatina, la facultativa, asociada a los cromosomas sexuales y la diferenciación sexual; y la heterocromatina constitutiva (HC), que aparentemente esta desprovista de genes (Medeiros-Neto, 2012), pero que su localización preferente en ciertas regiones cromosómicas, determina su propósito funcional y evolutivo (Guerra *et al.*, 2000, Wallace & Orr-Weaver, 2005). De acuerdo con



Guerra (2000), los patrones de distribución de bandas de HC en diferentes especies están determinados por su heterogeneidad, su variación cuantitativa y cualitativa, la frecuencia de polimorfismos de número y tamaño de las bandas dentro de una misma especie, entre otros; con base en el análisis y comparación de estos parámetros se han establecido relaciones evolutivas en varios géneros vegetales y animales (Moares & Guerra, 2010).

Aunque, los primeros estudios citogenéticos de las plantas estaban restringidos a determinar número y morfología cromosómica, con el uso de los colorantes y procedimientos convencionales (Guerra, 2000), en las especies vegetales con cromosomas de tamaño y morfología semejante, este análisis es limitado y poco informativo (Medeiros-Neto, 2012). De esta forma, la introducción de las técnicas de bandeamiento cromosómico mediante la coloración diferencial de determinadas regiones de los cromosomas (Casperson *et al.*, 1970), ha propiciado la exploración de nuevos enfoques para caracterización cromosómica. La técnica de bandeamiento C es ampliamente usada y se caracteriza por revelar bloques de heterocromatina constitutiva, que permanece condensados durante todo el ciclo celular y se distribuyen diferencialmente en las regiones terminales o proximales de los cromosomas (Guerra, 2000, Summer, 2003).

Posteriormente, se incorporó el uso de fluorocromos, colorantes con propiedades fluorescentes base-específicas que permiten caracterizar secuencias repetitivas por la proporción de pares de bases GC y AT (Schweizer y Ambros, 1994); las reacciones de estos colorantes con los cromosomas depende, principalmente, de la combinación de las bases nitrogenadas de la molécula de ADN, de tal forma que cada región del cromosoma puede presentar reacciones positivas (+), negativas (-) y/o neutras (0) (Schweizer, 1981).



Por otro lado, la caracterización de núcleos interfásicos, compuestos por cromatina difusa (eucromatina) y cromocentros (heterocromatina), es otro parámetro que permite establecer relaciones taxonómicas, puesto que generalmente, su estructura es constante dentro de una especie (Siljak-Yakovlev *et al.*, 2017), pero puede variar entre géneros o categorías superiores. Según Fajardo (2008), las diferencias entre los tipos de núcleos se atribuye a la reducción del volumen nuclear, a la diversificación en el contenido de ADN y la consecuente variación de la densidad del retículo cromatínico; adicionalmente, la poliploidización también afecta significativamente la estructuración de los núcleos interfásicos, ya que va acompañada del aumento tanto del contenido de DNA (dotación génica), como del tamaño de las células (Mondin & Neto, 2006) y la presencia de alteraciones drásticas en la estructura cromatínica.

Guerra (2000) distingue tres tipos de núcleos interfásicos: reticulado, arreticulado, y semireticulado, cuya diferencia radica en la formación y localización del retículo cromatínico y la presencia de cromocentros (Mondin & Neto, 2006); la manifestación de cada tipo sigue un patrón relacionado con el tamaño de los cromosomas, es decir, las especies que presentan cromosomas con una longitud inferior a 3  $\mu\text{m}$ , generalmente tienen núcleos arreticulados con cromatina condensada, en especies con cromosomas medianos, que varían de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud, la heterocromatina se distribuye de forma irregular y los núcleos son semirreticulados; finalmente, en cromosomas con longitud superior a 5  $\mu\text{m}$ , se observan núcleos reticulados con condensación cromosómica más o menos homogénea.

Además de la cuantificación de cromosomas durante la mitosis, el estudio del comportamiento meiótico presenta gran importancia, porque durante la meiosis es cuando ocurre la recombinación de genes (Fachinetto & Tedesco, 2009),



considerada como una de las fuentes de variabilidad genética (Pangliarini, 2000) y garantía de adaptación a los ambientes frecuentemente cambiantes. Los productos postmeióticos, permiten evaluar si las microsporas desarrolladas son viables, garantizando su participación durante la polinización (Krycki *et al.*, 2016); sin embargo, debido a la aparición de cromosomas rezagados, ocasionados por daños del huso mitótico o por la formación de cromosomas sin centrómero (Pandey & Kumar, 2012), se desarrollan microsporas anormales con uno, dos, tres o más de cuatro micronúcleos (triadas, diadas, monadas o poliadas); estas células producen granos de polen inviables y se dan con frecuencia en especies agamospermas, capaces de producir semilla sin la combinación de gametos (Goldenberg y Shepherd, 1998), que aunque a veces logran germinar, no sobreviven más allá del estado de plántula.

Para el caso de la familia Melastomataceae no se han realizado estudios previos sobre ADN repetitivo concretos a la heterocromatina, lo cual puede deberse al tamaño reducido de los cromosomas que limita la construcción de cariotipos de alta resolución y buena separación de cromosomas (Keisham *et al.*, 2015). Sin embargo, se encuentran reportes sobre cuantificaciones cromosómicas (Almeda, 2013, Meyer, 2018) y estudios del comportamiento meiótico para algunas especies (Andrada y Páez, 2014). Dichos estudios han propuesto cinco modelos de citoevolución que explican la gran variación de dotaciones cromosómicas conocidas en la familia, las cuales comprenden números diploides estáticos, poliploidías interespecíficas, poliploidías y disploidías intraespecíficas, paleopoliploidías interespecíficas constantes y paleoploidías seguidas por una disploidia limitada (Almeda, 2013) y, aunque se han constituido como grandes aportes, no abarcan más del 10% de las especies de la familia; por esta razón, como aporte al conocimiento de la identidad, evolución y a la explicación de



posibles daños genéticos en la familia Melastomataceae, se propuso como objetivo el desarrollar este estudio y en marco de caracterizar el cariotipo y la distribución de la heterocromatina en células de *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*, con la aplicación de procedimientos de coloración convencional, de coloración de fluorocromos base específicos (DAPI y CMA<sub>3</sub>) y el análisis mediante el índice meiótico.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Conteo de cromosomas**

De microtallos enraizados *in vitro* mantenidos en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales Bioplasma de la Universidad....., se tomaron puntas de raíz, tanto de *B. glutinosa* como de *M. myrtoideum* y se procesaron según la metodología propuesta por Nardy *et al.* (2010), con algunas modificaciones. Los ápices meristemáticos fueron pretratados con 2 mM de 8-hidroxiquinoleína durante 24 horas y fijadas en etanol absoluto: ácido acético glacial (3:1, v/v) (Carnoy) durante 12 h a 4 °C. Luego se enjuagaron 3 veces con agua destilada y se sumergieron en una solución de HCl 1M, a 60°C por 10 min; para realizar el montaje del tejido sobre lámina portaobjetos, nuevamente se enjuagaron con agua destilada y, posteriormente, se disgregó la punta de la raíz en una gota de ácido acético al 45%, se colocó una lámina cubreobjetos y se realizó el squash. Luego, el cubreobjetos se retiró con ayuda de nitrógeno líquido y el tejido se tiñó con Giemsa al 2%; el montaje permanente se realizó utilizando Entellan; al microscopio óptico (10, 40, y 100X), se analizaron 10 láminas (aproximadamente 50 núcleos por lámina), buscando núcleos interfásicos y metafases mitóticas, que permitieran establecer el número de cromosomas.



### **Tinción directa DAPI/CMA**

Se prepararon láminas siguiendo el mismo procedimiento aplicado para el conteo de cromosomas; no obstante, la hidrolisis se realizó con una solución enzimática celulasa: pectinasa (2:20%), a 37 °C durante tres horas. Después del montaje se separó el cubreobjetos, y se seleccionaron placas con núcleos interfásicos, prometafásico y metafásicos, estas se dejaron (envejecer) al ambiente durante tres días; posteriormente, se tiñeron con dos fluorocromos: primero con 25 µl de 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (2µg/ml) durante 30 minutos en oscuridad, luego se lavaron con tampón glicerol/McIlvaine (1:1, pH 7.0) y se tiñeron con el segundo fluorocromo: Cromomicina CA<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) 25µl (0,5 mg/ml) durante 80 minutos en oscuridad. El montaje permanente se llevó a cabo con solución antifade (90% glycerol, 2.3% DABCO, 2% 20 mM Tris-HCl, pH 8.0) (Vanzela & Guerra, 2000). Las imágenes cromosómicas se tomaron utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DM 4500 B equipado con una cámara DFC 300FX y superpuesto con filtros azul para DAPI y amarillo verdoso para CMA<sub>3</sub>. Las imágenes se analizaron utilizando el software Leica Application Suite.

### **Índice meiótico**

Se colectaron botones florales de diferentes tamaños de plantas adultas localizadas en el Páramo de Rabanal, Boyacá (05°24'N 73°32'W). En el laboratorio, de acuerdo con la metodología propuesta por Almeda (2013), los botones se fijaron en solución de Alcohol, Ácido Acético Glacial, Carmín Acético (10:4:1), durante 36 horas (con cambios de la solución cada cuatro horas). Luego se descartó la solución fijadora y los botones se almacenaron en alcohol al 70% a 4 °C. Posteriormente, sobre un lámina portaobjetos, al estereomicroscopio se extrajeron las anteras y, con ayuda de una aguja de hipodérmica, se disectaron para liberar las células madres del grano de polen (CMPs); luego se adicionó una gota de carmín acético al 2% por 30 minutos y posteriormente se colocó la lámina



portaobjetos, se flameó suavemente y entre dos hojas de papel absorbente se realizó el squash.

Los botones florales utilizados para realizar el proceso descrito antes, se colectaron de cinco individuos y, de cada uno se realizó montaje de cuatro anteras por placa. Se realizaron tres conteos, registrando tétradas (célula con tres microsporas), triadas, diadas y monadas celulares en no menos de 50 campos visuales a 10x y 40x; la estimación del índice meiótico (IM) se llevó a cabo de acuerdo con Love (1949), donde  $IM = \frac{\text{número de tétradas normales}}{\text{número de tétradas observadas}} \times 100$ .

## RESULTADOS

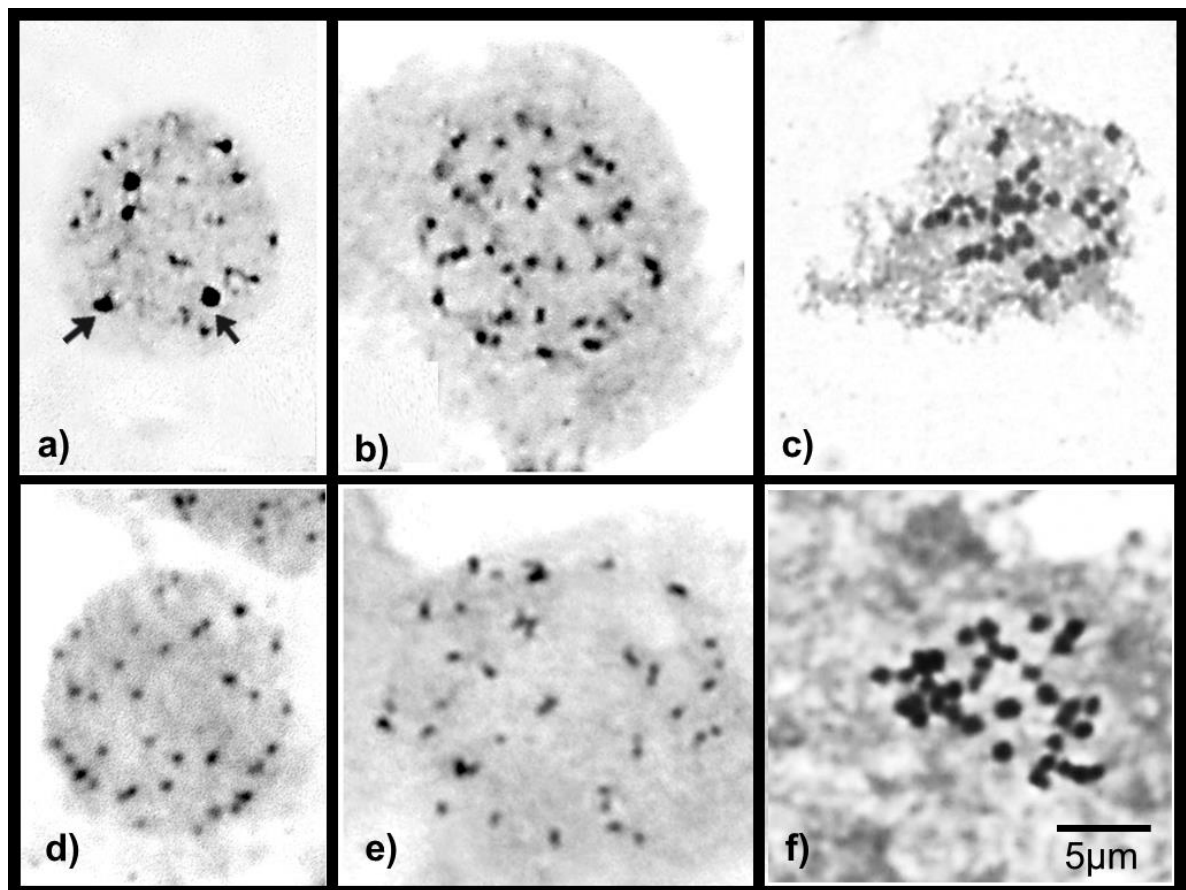
### Conteo de cromosomas

Los núcleos interfásicos de ambas especies resultaron ser de tipo arreticulado, lo cual indica, ausencia de retículo cromatínico y cromocentros (heterocromatina compactada) de forma irregular. En *B. glutinosa* se observó variación en la densidad de la cromatina, lo cual está relacionada con el número (entre 25 y 43) y con el tamaño de los cromocentros (Fig. 3a y 3b); en algunos núcleos se observaron cromocentros fusionados y de tamaño superior al de los cromosomas metafásicos (procromosomas). Por su parte, en *M. myrtoideum* se cuantificaron hasta 38 cromocentros, de forma regular, presentes de manera constante en la mayoría de los núcleos analizados, en los cuales no fue perceptible la presencia de procromosomas (Fig. 3d y 3e).

En los cariotipos *M. myrtoideum* y *B. glutinosa* se cuantificó un complemento cromosómico  $2n=36$  y un número base  $x=18$ . El citoplasma de *B. glutinosa* se



observó coloreado con cromosomas bien contrastados de aproximadamente  $0,5\mu\text{m}$  (Fig. 3c), en *M. myrtoideum* resultaron ser un poco más grandes ( $0,9\mu\text{m}$ ) (Fig. 3f); los cariotipos presentaron un patrón de condensación profásica proximal y con, aparentemente, poca variación en la morfología cromosómica, lo cual fue de difícil determinar con precisión debido a su tamaño reducido.



**Figura 1.** Zonas meristemáticas radicales de *B. glutinosa* (a-c) y de *M. myrtoideum* (d-f) coloreadas con Giemsa 2%; a-e): Núcleos interfásicos arreticulado con cromocentros de forma irregular; c y f) Núcleos metafásicos  $2n=36$ ; las flechas señalan los procromosomas.





### Tinción directa DAPI/CMA

En ambas especies el patrón de tinción de heterocromatina constitutiva (HC) mostró fluorescencia verde brillante, positiva con CMA, calificada como CMA<sup>+</sup>, y fluorescencia azul brillante, positiva con DAPI, calificada como DAPI<sup>+</sup>. Las regiones heterocromáticas adicionales de CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup> mostraron señales de fluorescencia tanto con CMA como DAPI mostraron señales de fluorescencia; una banda se consideró neutra (CMA<sup>0</sup> o DAPI<sup>0</sup>) cuando el cromosoma no presentó coloración diferenciada por alguno de los fluorocromos, a pesar de mostrarse positivo con el otro (Fig. 2). En la tabla 1 se resumen las reacciones de los tipos de bandas de HC observadas en las dos especies de estudio.

**Tabla 1.** Diferentes tipos de heterocromatina observados en núcleos interfásicos (N. Inter), células en prometafase (Promet.) y metafase (Meta.) de *B. glutinosa* y *M. myrtoideum* después de la coloración directa con DAPI/CMA.

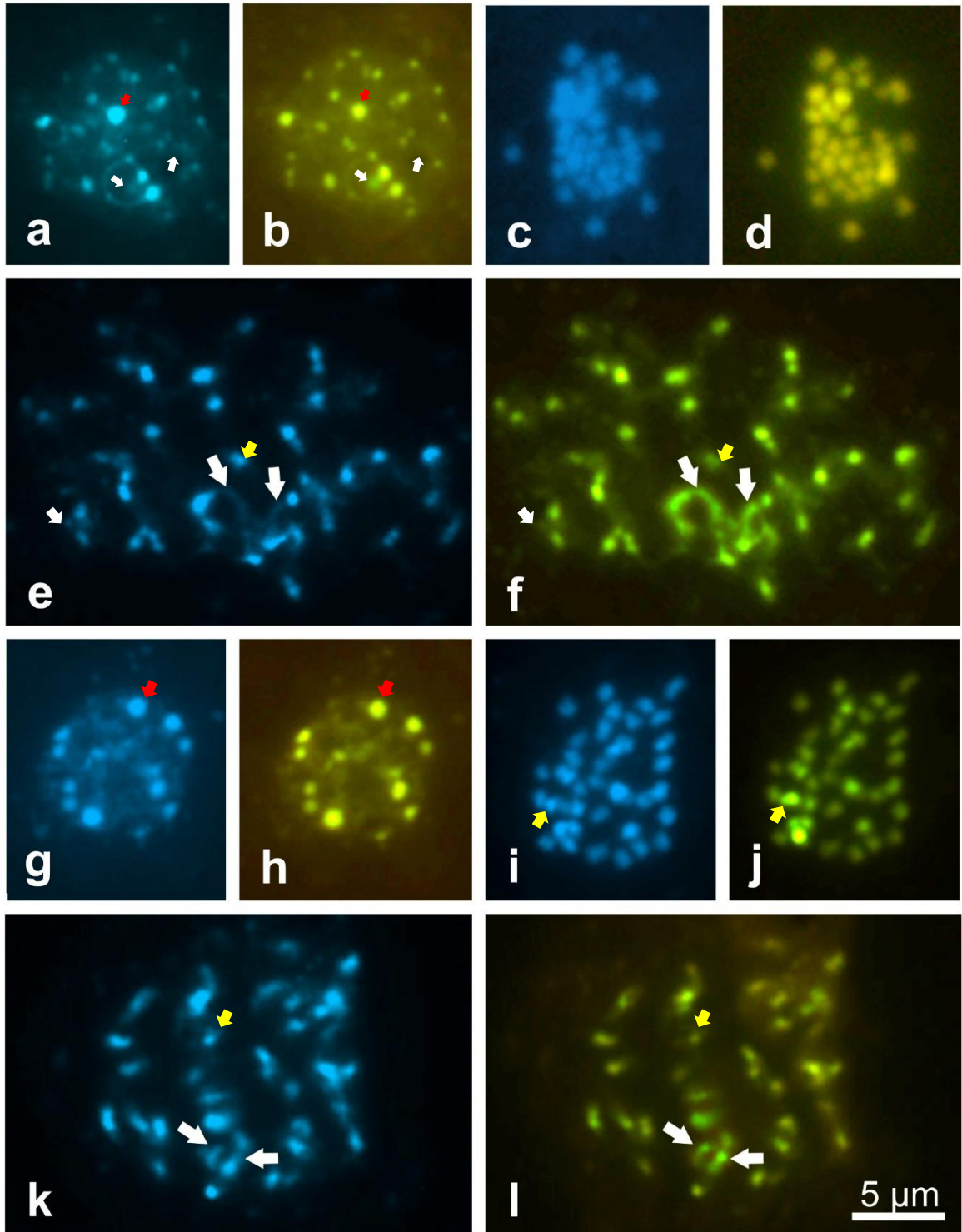
Tipos de Heterocromatina	<i>Bucquetia glutinosa</i>			<i>Monochaetum myrtoideum</i>		
	N. Inter.	Promet.	Meta.	N. Inter.	Promet.	Meta.
DAPI/CMA <sup>+</sup>	+	++	+	-	++	+
DAPI <sup>+</sup> /CMA <sup>-</sup>	+	+	+	-	-	-
DAPI <sup>+</sup> /CMA <sup>+</sup>	+	+	+	++	+	+
DAPI <sup>+</sup> /CMA <sup>0</sup>	+	+	-	-	+	-
DAPI <sup>0</sup> /CMA <sup>+</sup>	-	-	-	-	-	+

La reacción de la coloración fue estimada como: presente (+), fuertemente brillante (++) o ausente (-).

Debido al tamaño tan pequeño de los cromosomas de las dos especies, fue difícil la localización exacta de las bandas a lo largo del genoma; no obstante y de acuerdo con Guerra (2000) en cromosomas de menos de 3 μm, la heterocromatina se localiza de manera conspicua en regiones proximales,



localización constante en la mayoría de los cromosomas observados en el presente estudio. Los núcleos interfásicos de *B. glutinosa* (Fig. 2a, b) presentaron regiones ricas en GC y AT (DAPI<sup>-</sup>/CMA<sup>+</sup> o DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>-</sup>); en células en prometafase (Fig. 2c,d) y metafase (Fig. 2e,f) las regiones organizadoras del nucléolo (NOR-HC) asociadas a la HC (DAPI<sup>-</sup>/CMA<sup>+</sup>) se localizaron proximalmente y algunas fueron altamente señalizadas (++); los sitios ricos en AT y neutros en GC (DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>0</sup>) solo se percibieron en prometafase y en posición terminal. En *M. myrtoideum* se observaron señales positivas de ambos fluorocromos (DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>+</sup>) tanto en núcleos interfásicos (Fig. 2h, g) como en prometafases (Fig. 2k, l), siendo de mayor intensidad (++) en los primeros; en células prometafásicas, las NOR-HC también se percibieron más brillantes que DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>+</sup> y DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>0</sup> (Fig. 2k, l), mientras que en las células metafásicas fueron distinguibles todos los tipos de bandas, menos DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>0</sup> (Fig. 2i, j); en esta fase mitótica las bandas DAPI<sup>-</sup>/CMA<sup>+</sup> se observaron en posición terminal.

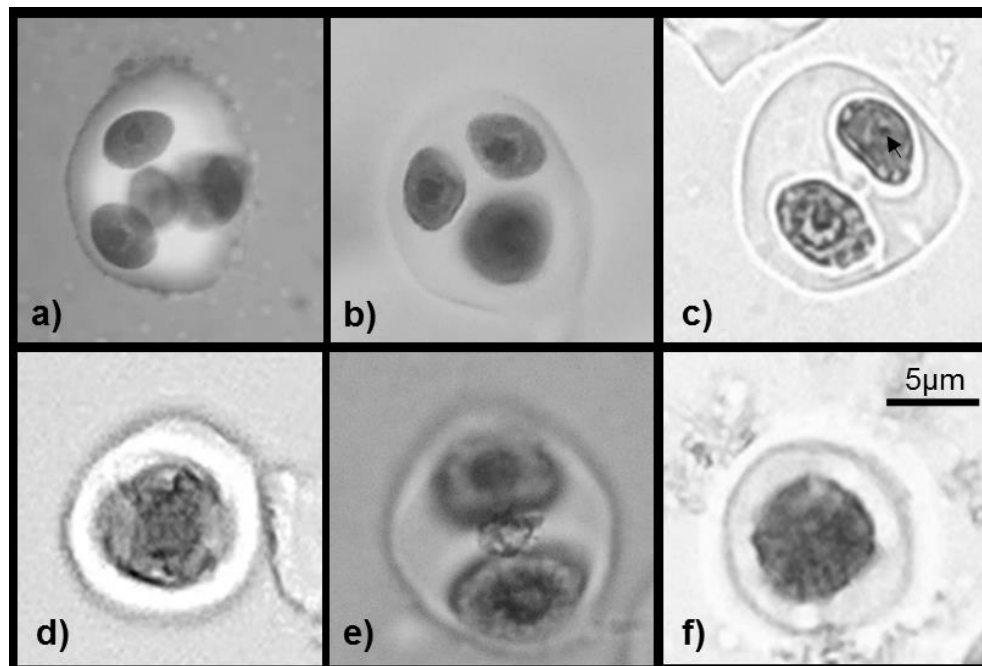




**Figura 2.** Tinción directa con fluorocromos DAPI (azul) y CMA<sub>3</sub> (amarillo verdoso) en *B. glutinosa* (a-f) y *M. myrtoideum* (g-l); a-h) núcleos interfásicos; c-d), i-j) metafases; e-f), k-l) prometafases. Las flechas blancas indican sitios DAPI<sup>-</sup>/CMA<sup>+</sup> o DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>-</sup>, las flechas rojas los sitios DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>+</sup> y las flechas amarillas sitios DAPI<sup>0</sup>/CMA<sup>+</sup> o DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>0</sup>.

### Índice meiótico

Se observaron diferencias relacionadas con la cuantificación de tétradas normales de las dos especies estudiadas (Tabla 2). De las 5729 células contadas en *B. glutinosa*, el 9,23% presentaron anomalías consistentes en la presencia de triadas, diadas o monadas celulares (Fig. 3b-d); en promedio, 260 células desarrollaron una tétrada normal con cuatro microsporas (tétrada normal), cada una con nucléolo visible (Fig. 1a) y en las células con dos microsporas se diferenciaron microcitos (Fig. 1c).





**Figura 3.** Desarrollo post-meiótico en *B. glutinosa* (a-d) y *M. myrtoideum* (e-f); a) tétrada normal, b) triada con nucléolos definidos, c) diada con microcitos (flecha), d) monada celular, e) triada con microspora de forma irregular, f) monada sin nucléolo definido.

En *M. myrtoideum* se cuantificaron 9614 células, de las cuales el 4,32% resultaron ser anormales y el 95,67% normales; en algunas triadas se observaron microsporas de forma irregular (Fig. 3c), mientras que en las monadas no se identificaron nucléolos (Fig. 3d).

Aunque el índice meiótico (Tabla 2), resultó ser más bajo en *B. glutinosa* (90,76%) que en *M. myrtoideum* (95,67%), las dos especies pueden considerarse como citológicamente estables, pues las anomalías meióticas (triadas, diadas, monadas o poliadas) que generan la aparición de gametos sin reducción meiótica, pueden tener poca influencia en los procesos reproductivos de cada una de las especies.

**Tabla 2.** Productos post-meióticos e índice meiótico cuantificados en *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*.

Especie	Total células contadas	Número de células ( $\bar{x}$ )	Índice meiótico
<b><i>Bucquetia glutinosa</i></b>			
Tétradas	5200	260,0 ± 148,52	90,76%
Triadas	248	12,4 ± 12,99	
Diadas	137	6,85 ± 12,33	
Monadas	144	7,2 ± 9,29	
<b><i>Monochaetum myrtoideum</i></b>			
Tétradas	9198	459,9 ± 168,83	95,67%
Triadas	229	11,45 ± 17,44	
Diadas	114	5,7 ± 6,84	
Monadas	73	3,65 ± 8,88	



## DISCUSIÓN

### Conteo de cromosomas

La diferencia en el tamaño entre los cromosomas de las dos especies estudiadas (aproximadamente  $0,4 \mu\text{m}$ ), confirma la pequeña variación intra e interespecífica en la longitud de los cromosomas de la familia Melastomataceae (Almeda, 2013, Andrada y Páez, 2014, Meyer, 2018). El conteo de 36 cromosomas, tanto en *B. glutinosa* como en *M. myrtoideum*, permite la determinación de un número base  $x=18$ . Sin embargo, de acuerdo con la hipótesis planteada por Almeda (2013), el número básico para estos géneros parece ser  $x^2=18$ , cuyo origen es paleopoliploide, el cual envuelve un aumento poliploide de un número base disploide; este es uno de los modelos citoevolutivos propuestos para la familia y que explican el conjunto de números cromosómicos conocidos. De manera general, los conteos cromosómicos reportados para *B. glutinosa* y *M. myrtoideum* contribuyen a la ampliación del conocimiento citogenético de la familia de las Melastomataceae de la cual solo existen reportes del número de cromosomas para el 10% de las especies presentes en todo el mundo (Almeda, 2013). Además, concuerdan con el único reporte existente para *M. myrtoideum* (Solt & Wurdack, 1980) y en el caso de *B. glutinosa* constituye el primer conteo hasta ahora publicado.

La caracterización de las interfases observadas concuerda con Guerra (2000), quien define que, en las especies con cromosomas pequeños, cuya longitud es inferior a  $3 \mu\text{m}$  (como en *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*), existe una correspondencia con el tipo de núcleos interfásicos, pues generalmente son arreticulados y con la cromatina altamente condensada, manifestándose en la presencia de cromocentros. De acuerdo con Pedroza *et al.* (1999), este tipo de información contribuye con el entendimiento de alteraciones genéticas



involucradas en la evolución a nivel de familia y a la delimitación taxonómica de las especies; razón por la cual, los resultados obtenidos corroboran la agrupación propuesta por Michelangeli *et al.* (2013) de la tribu Melastomeae y su grupo *Heterocentrum*, conformado por los géneros *Monochaetum*, *Castratella*, *Chaetolepis* y *Bucquetia*, cuya asociación se da por la presencia de flores tetraméricas con ovarios tetraloculares y desde el punto de vista cito-taxonómico coinciden en el número gametofítico de 18 cromosomas y la presencia de núcleos interfásicos arreticulados.

#### **Tinción directa DAPI/CMA**

La coloración con los fluorocromos DAPI y CMA<sub>3</sub>, en las dos especies en estudio, mostró heterocromatina constitutiva CMA<sup>+</sup>, DAPI<sup>+</sup>, DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>+</sup>, DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>0</sup> y DAPI<sup>0</sup>/CMA<sup>+</sup>; no obstante, la intensidad de las señales GC fue mayor y aún más representada en *M. myrtoideum*. Después de la coloración CMA<sub>3</sub>, las señales profundas de HC-DAPI<sup>+</sup>, tanto en profase como en metafase, resultaron ser o más brillantes o más débiles, probablemente representando constricciones secundarias que, como en muchas especies, también son profundamente HC-DAPI<sup>-</sup> (Deumling y Greilhuber, 1982, Winterfeld & Röser, 2007). A su vez, la ubicación proximal de las bandas señalizadas, tanto en *B. glutinosa* como *M. myrtoideum*, además de estar determinada por el reducido tamaño de los cromosomas, puede relacionarse con la alta frecuencia de núcleos procromosómicos (o cromocéntricos), ultraestructuralmente definidos como finas fibrillas continuas a cromocentros densos (Echevarria *et al.*, 1999), y cuya correspondencia está dada a porciones centroméricas en los cromosomas.

Como consideración general, se debe tener en cuenta que los patrones de distribución de HC en plantas son muy variables (Medeiros-Neto, 2012) y los



sitios de unión a DAPI<sup>+</sup> son más comunes que los sitios CMA<sup>+</sup> (Guerra, 2000, Rego, 2009, Keisham, 2015); no obstante, la situación inversa ha sido reportada en algunos taxones, como en géneros de la familia Arecaceae (Roser, 1994), Fabaceae (Nardy *et al.*, 2010), Orchidaceae (Medeiros-Neto, 2012), entre otras y, en las dos melastomatáceas de este estudio y razón por la cual, no es posible establecer un patrón evolutivo común en las especies vegetales (D'emerico *et al.*, 2003); la causa de la variación en el comportamiento de regiones ricas en AT y GC, podría ser la reestructuración extensiva del cariotipo y la consecuente amplificación masiva de algunas secuencias repetitivas (Heslop-Harrison, 2000, Keisham, 2015).

De acuerdo con Schweizer y Loidl (1987), las secuencias de ADN altamente repetitivo, comienzan en regiones terminales y posteriormente pueden contaminar las regiones intersticiales de los cromosomas adyacentes no homólogos, modelo que es ejemplificado a través de la manifestación de un dominio proximal en las bandas DAPI<sup>-</sup>/CMA<sup>+</sup> de *B. glutinosa* y *M. myrtoideum* y, de algunas terminales en esta última especie. Adicionalmente, debido a que la distancia entre cada brazo cromosómico tiene diferentes patrones de condensación o descondensación (Ito *et al.*, 2000), un mismo tipo de banda puede señalar en diferentes posiciones en metafase o interfase, comportamiento representado también en las NOR-CH, que en núcleos interfásicos de *M. myrtoideum* se localizan proximalmente mientras que en prometafase y metafase se asumen como bandas terminales.

Aunque en la familia Melastomataceae no se han llevado a cabo estudios citogenéticos mas allá de la cuantificación de cromosomas y la binarización de cariotipos (Almeda, 2013, Meyer *et al.*, 2018), trabajos realizados en otras familias confirman la importancia de las similitudes o diferencias significativas en





la cantidad total y la distribución de heterocromatina, pues proporcionan información sobre el origen de las especies en un grupo determinado (Badaeva *et al.*, 2002, Raskina *et al.*, 2008). Por tanto, la información generada, en este estudio, con el uso conjunto de dos fluorocromos CMA/DAPI, permitirá comparar cariotipos y establecer relaciones evolutivas dentro de esta familia, una vez se obtenga información de géneros relacionados con *Bucquetia* y *Monochaetum*, tal como ha sido indicado para especies de otras familias (Moraes, 2007, Moraes y Guerra, 2010).

### Índice meiótico

Es un indicador de regularidad de la microsporogenesis (Love, 1949, Pozzobon *et al.*, 2011), por esta razón, a partir de los porcentajes de tétradas normales, se puede inferir que *M. myrtoideum* y *B. glutinosa* son especies meióticamente estables, con producción de gametos masculinos balanceados, tal como ha sido reportado en otras especies de las familias Asteraceae (Auler *et al.*, 2006), Myrtaceae (Franzon & Raseira, 2004) y Solanaceae (Pozzobon Schifibi-Wittmann, 2006), entre otras.

Con respecto a la viabilidad del polen algunos autores han indicado que está directamente relacionada con la formación de tétradas normales (Guerra *et al.*, 2011, Pozzobon *et al.*, 2011, Krycki *et al.*, 2016), puesto que la consecuencia más común de irregularidades durante la división meiótica (Mendes-Bonato *et al.*, 2006) es la baja producción de granos de polen viables; esta apreciación se ve reflejada en *M. myrtoideum* y *B. glutinosa*, especies en las que se han cuantificado porcentajes de viabilidad polínica entre 50,3 y 56,9% (capítulo 3), sobre las cuales probablemente, ha influenciado la activación de algunos genes que afectan la formación de fibras del huso acromático principalmente durante la segunda meiosis (Zhou y Pawlowski, 2014) y en consecuencia, el desarrollo de



anormalidades post-meióticas como la formación de tétradas, diadas, monadas o poliadas (Souza & Periera, 2011). Adicionalmente, la presencia de microcitos en algunas diadas celulares, que pueden ser cromosomas rezagados ocasionados por daños del huso mitótico, o bien, fragmentos de cromosomas sin centrómero (Pandey & Kumar, 2012) predice los problemas de estas especies durante la microsporogenesis, problemas que se traducen en los eventos fallidos de polinización influenciados por bloqueo del crecimiento del tubo polínico y, posteriormente, la producción de semillas asexuales que pocas probabilidades de a germinar.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten establecer que tanto *B. glutinosa* como *M. myrtoideum*, presentan núcleos interfásicos de tipo arreticulado con cromocentros de forma irregular, algunas veces de tamaño superior al de los cromosomas. A partir de los cariotipos obtenidos, se cuantificó un complemento cromosómico de  $2n=36$  y un número base  $x=18$ , aunque podría asociarse un número base origen paleopoliploide.

Los resultados también corroboran la agrupación de *Heterocentrum* de la tribu Melastomeae, conformado por *Bucquetia* y *Monochaetum*, junto con *Castratella* y *Chaetolepis*, géneros con morfología floral semejante, número gametofítico de 18 cromosomas, y presencia de heterocromatina altamente compactada en forma de cromocentros.

El uso conjunto de dos fluorocromos, permitió heterocromatina constitutiva DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>-</sup>, DAPI<sup>-</sup>/CMA<sup>+</sup>, DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>+</sup>, DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>0</sup> y DAPI<sup>0</sup>/CMA<sup>+</sup>; no obstante, la intensidad de las señales GC (relacionadas con NOR-CH) fue mayor



y aún más representada en *M. myrtoideum*; es importante replicar las metodologías empleadas en este trabajo con la mayor cantidad posible de especies y géneros, con el fin de comparar cariotipos con base a la señalización de sitios ricos en AT-GA para establecer relaciones evolutivas dentro de familia.

A partir de la cuantificación de tétradas normales se puede inferir que *M. myrtoideum* y *B. glutinosa* son especies meióticamente estables, con producción de gametos masculinos balanceados: sin embargo, la producción de anomalías presentes como diadas o monadas con microcitos, inducen problemas para la polinización, además de la producción de semillas asexuales que nunca llegan a germinar.

Los procedimientos aplicados para el desarrollo de este trabajo resultaron efectivos; no obstante, se podría evaluar el uso de otros mitodepresores, de tal forma que se pueda obtener un mayor grado de condensación y separación de los cromosomas, y por ende complementar la observación de la distribución de la heterocromatina definida para *B. glutinosa* y *M. myrtoideum* estas dos especies y, posteriormente, con observaciones en otras, construir un modelo de distribución para la familia Melastomataceae.

## REFERENCIAS

Almeda, F. (2013). Systematic and phylogenetic significance of chromosome number diversity in some Neotropical Melastomataceae. *Memoirs of TheNew York Botanical Garden*, 108:155-177.

Andrada, A. R. & Páez, V. A. (2014). Estudios meióticos y viabilidad del pólen de



tres especies de *Tibouchina* (Melastomataceae). *Lilloa* 51:131-140.

Auler, N. M. F., Battistin, A. & Reis, M. S. (2006). Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8:55-63.

Badaeva, E. D., Amosova, A. V., Muravenko, O. V., Samatadze, T. E., Chikida, N. N., Zelenin, A. V., Friebe, B. & Gill, B. S. (2002). Genome differentiation in *Aegilops*. 3. Evolution of the D-genome cluster. *Plant Systematics and Evolution*, 231:163-190.

Casperson, T., Zech, L. & Johansson, C. (1979). Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exptl. Cell Res.*, 60:315-319.

Deumling, B. & Greilhuber, J. (1982). Characterization of heterochromatin in different species of the *Scilla siberica* group (Liliaceae) by *in situ* hybridization of satellite DNAs and fluorochrome banding. *Chromosoma*, 84:535-555.

D'emerico, S., Pignone, D., Vita, F. & Scrugli, A. (2003). Karyomorphological analyses and chromatin characterization by banding techniques in *Euphorbia characias* L. and *E. wulfenii* Hoppe (= *E. veneta* Willd.) (Euphorbiaceae). *Caryologia*, 56(4):501-508.

Goldenberg, R. & Shepherd, G. J. (1998). Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "cerrado" vegetation. *Plant Systematics and Evolution*



211:13-29.

Guerra, M. (2000). Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet. Mol. Biol.*, 23:1029-1041.

Guerra, M., Santos, K. G. B., Barros & Silva, A. E. (2000). Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantioideae- a case of parallel chromosomal evolution. *American Journal of Botany*, 87(5):735-747.

Guerra, D., Pacheco, M. T. & Federizzi, L. C. (2011). Analysis of self-fertilization and meiotic behavior of eleven Brazilian triticale cultivars at two sowing dates. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11:114-124.

Fachinetto, J. M. & Tedesco, S. B. (2009). Número cromossômico, análise meiótica e estimativa da viabilidade polínica em populações de *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, 11(1):110-116.

Fajardo, G. C. (2008). Estrutura de núcleos interfásicos e distribuição da heterocromatina em *Pennisetum* sp. Universidade Federal de Lavras, 58 p.

Franzon, R. C. & Raseira, M. C. B. (2004). Meiotic index in Myrtaceae native fruits trees from southern Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 4:344-349.

Heslop-Harrison, J. S. (2000). Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. *Plant Cell*, 12:617-



636.

Ito, M., Ohmido, N., Akiyama, Y., Fukui, K. & Koba, T. (2000). Characterization of Spinach chromosomes by condensation patterns and physical mapping of 5S and 45S rDNAs by FISH. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 125:59-62.

Keisham, M., Kattukunnel, J. J., Yadav, S. R., Bhat, K. V. & Rao, S. R. (2015). Comparative analysis of heterochromatin distribution in wild and cultivated *Abelmoschus* species based on fluorescent staining methods. *Protoplasma*, 252:657-664.

Krycki, K. C., Simioni, C. & Dall'Agnol, M. (2016). Cytoembryological evaluation, meiotic behavior and pollen viability of *Paspalum notatum* tetraploidized plants. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16(4):282-288.

Love, R. M. (1949). Estudos citológicos preliminares de trigos rio-grandenses. Porto Alegre: Secretaria do Estado dos Negócios da Agricultura, Indústria e Comércio. 23 p.

Meyer, F. S., Braga, K. R., Forni-Martins, E. R. & Goldenberg, R. (2018). Chromosome *Chaetogastra* (Melastomataceae, Melastomateae). *Brittonia*, 1-8.

Medeiros-Neto, E. (2012). Padrões de distribuição de bandas CMA/DAPI em *Epidendrum* L. subgênero *Amphiglotium* e híbridos naturais interespecíficos. Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Paraíba, Campina Grande- Brasil.



- Mendes-Bonato, A. B., Pagliarini, M. S., Risso-Pascotto, C. & Valle, C. B. (2006). Chromosome number and meiotic behavior in *Brachiaria jubata* (Gramineae). *J. Genet.*, 85:83-87.
- Meyer, F. S., Braga, K. R., Forni-Martins, E. R., & Goldenberg, R. (2018). Chromosome *Chaetogastra* (Melastomataceae, Melastomateae). *Brittonia*, 1-8.
- Michelangeli, F. A., Guimaraes, P. J. F., Penneys, D. S., Almeda, F. & Kriebel, R. (2013). Phylogenetic relationships and distribution of New World Melastomeae (Melastomataceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171:38-60.
- Moraes, A. P., Soares Filho, W. S. & Guerra, M. (2007). Karyotype diversity and the origin of grapefruit. *Chromosome Res.*, 15:115-121.
- Moraes, A. P. & Guerra, M. (2010). Cytological differentiation between the two subgenomes of the tetraploid *Emelia fosbergii* Nicolson and its relationship with *E. sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 287:113-118.
- Nardy, M., Yuyama, P. M., Rego, L. & Vanzela, A. L. (2010) Chromosome banding patterns and localization of 5S and 45S rDNA sites in three shrub-tree species of *Erythrina* L. (Leguminosae: Papilionoideae) from Brazil. *Braz J Biosci*, 8:149-153.



- Pandey, S. & G. Kumar, (2012). Induced pollen sterility via microcyte formation in linseed (*Linum usitatissimum* L.). *Chromosome Botany*. 6(2):37-40.
- Pedroza A, Gitaí J, Barros e Sila AE, Felix LP & Guerra M (1999). Citogenética de Angiospermas coletadas em Pernambuco – V. *Acta Botanica Brasílica* 13: 49–60
- Pozzobon M. T. & Schifino-Wittmann MT. (2011). A meiotic study of the wild and semi-domesticated Brazilian species of genus *Capsicum* L. (Solanaceae). *Cytologia* 71: 275-287.
- Pozzobon, MT, Souza KRR De, de Carvalho SIC & Reifschneider FJB (2011). Meiosis and pollen viability in advanced lines of pepper. *Horticultura Brasileira* 29: 212–216.
- Raskina O, Barber J, C, Nevo E. & Belyayev A. (2008). Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenet Genome Res*,120:351-357
- Rego L.N, Silva C.R, Torezan J.M, Gaeta M.L & Vanzela A.L (2009). Cytotaxonomical study in Brazilian species of *Solanum*, *Lyciantes* and *Vassobia* (Solanaceae). *Pl Syst Evol* 279:93–102.
- Schweizer, D (1981). Counterstains- enhanced chromosome banding, *Hum. Genet.* 57:1-14
- Schweizer, D & Ambros, P.F. (1994). Chromosome banding *In*: Godsen, J.R. (ed)





Methods in molecular biology, vol 29. Chromosome analysis protocols, Humana Press, Totowa: 97-113

Schweizer, D. & Loidl, J. (1987) A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-banded patterns. *Chrom Today* 9:61-74.

Siljak-Yakovlev, S.; Godelle, B.; Zoldos, V.; Vallès, J.; Garnatje, T. & Hidalgo, O. (2017). Evolutionary implications of heterochromatin and rDNA in chromosome number and genome size changes during dysploidy: A case study in *Reichardia* genus. *PLoS ONE*, 12, e0182318.

Solt, M. L. & Wurdack, J. J. (1980). Chromosome numbers in the Melastomataceae. *Phytologia* 47: 199–220.

Souza M.M & Pereira T.N.S (2011) Meiotic behavior in wild and domesticated species of *Passiflora*. *Rev Bras Bot* 34:63–72

Summer, A. T. (2003). Chromosomes: organization and function. Blackwell Publishing Company, Berlin 286 pp.

Vanzela, ALL. & Guerra, M (2000) Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Genet. Mol. Biol.* 23: 453 – 456 .

Wallace, J.A. & Orr-Weaver, T.L. (2005). Replication of heterochromatin: insights into mechanisms of epigenetic inheritance. *Chromosoma*, 114: 389-402



Winterfeld G. & Röser M. (2007). Chromosomal localization and evolution of satellite DNAs and heterochromatin in grasses (Poaceae), especially tribe Aveneae. *Plant Systematics and Evolution* 264:75–100.

Zhou, A. & Pawlowski, W.P. (2014) Regulation of meiotic gene expression in plants. *Fron. Plant Sci.* 5, 413.



## CONCLUSIONES GENERALES

*Bucquetia glutinosa* y *Monochaetum myrtoideum*, son consideradas especies potenciales para la restauración, pues su óptimo crecimiento y desarrollo en zonas de potrero, las caracterizan como especies colonizadoras de los bordes de los parches, resultantes de la fragmentación de los bosques; sin embargo, el éxito de su establecimiento se ve afectado tanto por los procesos reproductivos, que son muy variables, por la presencia de irregularidades meioticas y por ende la producción de granos de polen con baja viabilidad, pocas probabilidades de formar un cigoto y semillas asexuales inviables.

En este proyecto se establecieron los protocolos para multiplicación *in vitro* a *B. glutinosa* y *M. myrtoideum*, procedimientos que son una alternativa efectiva para multiplicar estas dos especies, ya que, además de usar medios de cultivo reducidos en sales minerales y suplementado únicamente con AIB, las vitroplantas obtenidas, muestran un alto grado de adaptabilidad y funcionalidad durante el proceso de aclimatización.

El estudio de la biología reproductiva, permitió determinar que *B. glutinosa* es una especie autocompatible, parcialmente autógena y apomítica, ya que, produce semillas sin participación del gameto masculino; no obstante, los valores obtenidos de la relación P/O, infieren que, tanto *B. glutinosa* como *M. myrtoideum* son xenógamas facultativas, es decir, que existe una predominancia de la polinización cruzada, pero no hay algún mecanismo que evite la autopolinización.

El desarrollo de semillas de origen asexual en *B. glutinosa*, permite deducir la participación de una agamosperma facultativa en esta especie. La disminución en el porcentaje de viabilidad del polen, resulto proporcional a la confiabilidad de



la técnica utilizada, que se fundamenta en que en los granos de polen teñidos y clasificados como viables (con Carmín y MTT), no siempre se da la emergencia del tubo polínico; esta respuesta se debe a malformaciones polínicas e irregularidades durante la meiosis.

Los aspectos de citogenéticos evaluados, utilizando fluorocromos base específicos y abordados por primera vez en estas dos especies, corroboran la agrupación de *Heterocentrum* de la tribu Melastomeae, conformado por *Bucquetia* y *Monochaetum*, junto con *Castratella* y *Chaetolepis*, géneros con morfología floral semejante, número gametofítico de 18 cromosomas (cuyo origen, posiblemente es paleopoliploide) y presencia de heterocromatina altamente compactada en forma de cromocentros. Aunque se identificó HC DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>-</sup>, DAPI<sup>-</sup>/CMA<sup>+</sup>, DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>+</sup>, DAPI<sup>+</sup>/CMA<sup>0</sup> y DAPI<sup>0</sup>/CMA<sup>+</sup>, la intensidad de las señales GC (relacionadas con NOR-CH) fue mayor y aún más representada en *M. myrtoideum*; se recomienda replicar las metodologías empleadas en este trabajo con la mayor cantidad posible de especies y géneros, con el fin de comparar cariotipos en base a la señalización de sitios ricos en AT-GA para establecer relaciones evolutivas dentro de familia.

Adicionalmente, a partir de la cuantificación de tétradas normales se puede inferir que *M. myrtoideum* y *B. glutinosa* son especies meióticamente estables, con producción de gametos masculinos balanceados; sin embargo, la producción de anomalías presentes como diadas o monadas con microcitos, se ven reflejados en problemas durante la polinización y la producción de semillas asexuales con pocas probabilidades de germinar.

Es importante mencionar que los resultados presentados en este documento de las especies objeto de estudio, son los primeros reportes, tanto de aspectos de



la biología reproductiva, como análisis de citogenética molecular, por esta razón contribuyen al conocimiento biológico y evolutivo de la familia Melastomataceae. Además, los protocolos, son los únicos estudios de micropropagación para melastomáceas nativas colombianas y son un referente replicable en otras especies relacionadas y seleccionadas bajo criterios similares.

El material vegetal micropropagado es utilizable en procesos de reintroducción, restauración y conservación de ecosistemas en estado de deterioro y vulnerabilidad, como lo es el páramo de Rabanal.