

## CAPÍTULO 4: DISCUSIONES

### 4.1 Desinfección del material vegetal

En la etapa de desinfección se obtuvo altos porcentajes de contaminación fúngica, con las muestras traídas directamente del campo por lo que se recurrió a mantener a las plantas en condiciones de invernadero donde se realizó un tratamiento fitosanitario. Este procedimiento nos ayudó a disminuir considerablemente los porcentajes de contaminación fúngica, empleando un fungicida con carbendazim como principio activo en la etapa de desinfección como lo usan otros autores al desinfectar explantes de piñón *Jatropha curcas* (Jha *et al.*, 2007; Datta, Mukherjee, Ghosh & Jha, 2007).

Para establecer un tratamiento de desinfección óptimo fue necesario evaluar cuatro concentraciones de hipoclorito de sodio en dos diferentes tiempos de inmersión donde después de realizar los análisis estadísticos se observó que mientras mayor concentración de NaClO y tiempo de inmersión, se obtenía menores porcentajes de contaminación. Para establecer un tratamiento de desinfección óptimo hay que evaluar la sobrevivencia del tejido, ya que el NaClO causa estrés fisiológico debido a que es un compuesto químico altamente oxidante, por lo cual se debe tener mucho cuidado con las concentraciones con las que se trabaje ya que puede causar la muerte del explante como se evidenció en el tratamiento 8 el cual tenía una concentración de hipoclorito de sodio del 1.6% y un tiempo de inmersión de 15 min (Pierik, 1990; Roca *et al.*, 1991).

En los tratamientos de desinfección 0.6%, 10min; 0.6%, 15min; 1.2 %, 10min; 1.2%, 15min se presentó altos porcentajes de contaminación fúngica lo cual causó la muerte de los pecíolos debido a que los metabolitos que producen los hongos, son

liberados al medio los cuales son tóxicos para los explantes, además de la elevada tasa de crecimiento del hongo lo cual recubrió por completo a los pecíolo sembrados en condiciones *in vitro*, causando la muerte de los pecíolos (Lázzari, 1993).

El tratamiento 7 el cual contenía una concentración de hipoclorito de sodio del 1.6% y 15 min de tiempo de inmersión fue el mejor tratamiento de desinfección ya que se obtuvo una contaminación fúngica del 23% y una necrosis de tejido del 10%, teniendo una pérdida total del 33%, confirmando de esta manera que el hipoclorito de sodio es un buen compuesto para la desinfección del material vegetal en este caso pecíolo de piñón (Roca *et al.*, 1991).

#### **4.2 Inducción y multiplicación de callos embriogénicos**

En la etapa de establecimiento y multiplicación de callo, se probaron diferentes concentraciones y combinaciones de citoquinas y auxinas como las que realizó Jha *et al.*, 2007, con embriogénesis somática de piñón *Jatropha curcas*. Algunos autores han determinado que para un desarrollo eficiente del fenómeno de embriogénesis somática, el uso de concentraciones considerables de citoquinas es de vital importancia en el proceso, sin embargo en otras especies la presencia de auxinas exógenas es necesario (Lara *et al.*, 2003).

En esta investigación se realizaron varios ensayos con combinaciones de auxinas y citoquinas además de sólo auxina y citoquina como se muestra en la Tabla 2.4. Donde se obtuvo como mejor resultado la combinación de AIA y BAP siendo las concentraciones del tratamiento 6 (3.8 mg.L<sup>-1</sup> de BAP y 2 mg.L<sup>-1</sup> de AIA) las que mejor respuesta a la inducción y formación de callo se tuvieron. Por lo tanto una concentración específica o aproximada de estos dos reguladores van a formar callo embriogénico. Se observó que la inducción de callo dependió más o exclusivamente de la concentración de auxina (Evans *et al.*, 2003) ya que en el tratamiento 2 con igual

concentración de AIA 2 mg/L, también se evidenció un buen desarrollo de callo como lo presenta Jha *et al.*, 2007.

La utilización del biorregulador BAP en la etapa de inducción y multiplicación de callo fue muy útil para la diferenciación de los embriones somáticos y brotes organogénicos ya que en los análisis realizados se observó que el BAP no estaba involucrado directamente a la formación de callo porque que no presentaba una diferencia entre las concentraciones utilizadas para la obtención de esta variable, pero como ya se mencionó esto contribuyó a la diferenciación del tejido calloso induciendo embriones somáticos como menciona (Kärkönen, 2001).

En el tratamiento 1 (1.5 mg/L de BAP y 1 mg/L de AIA) se tuvo una necrosis o muerte del tejido del 50% debido a la falta o exceso de reguladores, lo cual va a ocasionar problemas a nivel fisiológico del tejido en el normal desarrollo del tejido (Pierik, 1990). Se observó necrosis en los pecíolos sembrados del control, el cual no poseía ningún regulador. Por lo cual, las concentraciones de reguladores de crecimiento establecidas para una especie en lo que se refiere a inducción de callo, no van a tener el mismo efecto en otra especie vegetal o incluso en otro tejido de la misma planta ya que los tejidos poseen fitohormonas, por lo cual un exceso o déficit de reguladores puede ocasionar inhibición del crecimiento, muerte del tejido o no causen el efecto deseado como menciona Evans *et al.*, 2003.

Para un buen desarrollo del callo embriogénico hay que tener presente los varios factores que intervienen en el desarrollo de los explantes como es la edad del material vegetal y la parte del tejido que se va a usar (Roca *et al.*, 1991). Para lo cual en esta investigación se utilizó pecíolo de hojas jóvenes de plantas mantenidas en condiciones de invernadero las cuales presentaron un buen desarrollo de callo embriogénico efecto que indica (Kärkönen, 2001).

Al obtener embriones somáticos por vía indirecta siempre se corre el riesgo de que se produzca una variación somaclonal, por lo cual hay que evitar hacer subcultivos de los callos embriogénicos ya que este tipo de células sufre constantes divisiones celulares lo que puede ocasionar mutaciones (Evans *et al.*, 2003). La ventaja que se tiene al inducir callo embriogénico es que se puede utilizar este tejido totipotente para suspensiones celulares en las cuales cada célula de las miles que se encuentran en los envases, tendrían la capacidad de desarrollar un embrión somático y tener el potencial de poder convertirse en una planta totalmente funcional con las características de la planta madre (Hall, 1999).

### **4.3 Maduración de los embriones somáticos**

Para la maduración de los embriones somáticos es importante colocar fuentes extras de nitrógeno orgánico y carbono, para un buen desarrollo de las estructuras embrionarias y evitar una germinación precoz (Kyte *et al.*, 1996). En la mayoría de las especies el paso más limitante para el desarrollo de la embriogénesis somática es el proceso de maduración, ya que en esta etapa los embriones deben acumular sustancias de reserva. Por lo tanto, el estudio del proceso de maduración del embrión cigótico puede servir para definir un modelo que sea aplicable a la embriogénesis somática, principalmente para establecer un medio de cultivo (Celestino, Hernández, Carneros, López & Toribio, 2005).

En esta investigación se observó una mejor respuesta en el desarrollo de embriones somáticos en los tratamientos que poseían glutamina como fuente de nitrógeno orgánico a comparación del agua de coco. Los tratamientos que poseían glutamina como fuente de nitrógeno orgánico presentaron mejores resultados a lo que se refiere al incrementado del número de estructuras embrionarias en el tejido además de disminuir necrosis en el tejido a comparación de los tratamientos con agua de coco

respuesta semejante obtuvo (Márquez *et al.*, 2003) en estudios de embriogénesis somática en aguacate.

En la Figura 3.14 de resultados se puede observar necrosis del tejido embrionario, lo cual podría deberse a causa de un estrés osmótico causado por el mioinositol que en los tratamientos de maduración se trabajó con una concentración más alta respecto a los tratamientos de inducción de callo, efecto semejante reporta (Vidales, Salgado, García, Gómez, Palomares & Guillén, 2003), en la maduración de embriones somáticos de aguacate. La necrosis también puede deberse al  $\text{NH}_4 \text{NO}_3$  compuesto que causa estrés fisiológico presentando la necrosis por lo cual en la maduración de los embriones somáticos también se redujo a la mitad las sales de M & S para disminuir la necrosis el mismo efecto menciona Márquez *et al.*, 2003.

Es difícil establecer cultivos de embriones somáticos que mantengan una uniformidad de sus células en el desarrollo de nuevos clones o individuos, ya que el desarrollo de los embriones se produce independientemente uno del otro, por lo que en un mismo tejido podemos tener embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo (Moncada *et al.*, 1997; Muñoz, 2003) como se puede observar en la Figura 3.15. Además, no todas las células responden a la formación de embriones somáticos de igual manera, aunque tengan un mismo genotipo, debido a que solamente ciertas células parecen estar aptas a responder a la embriogénesis somática dado a la influencia de los reguladores del crecimiento ya que no todas están simultáneamente listas desde el punto de vista fisiológico para expresar su totipotencia, aún en un medio favorable para su desarrollo (González, Morejón, Hernández, Coronado & Silva, 2008).

El fenómeno de organogénesis y embriogénesis se puede dar en paralelo en el mismo tejido como se muestra en la Figura 3.17 de resultados, por lo que los brotes de origen organogénico tienen la capacidad de desarrollarse más rápido que un embrión somático gracias a que los brotes poseen conexión con el tejido vascular del tejido

madre lo que le ayuda a absorber de mejor manera los nutrientes del medio de cultivo (Lara *et al.*, 2003).

Para alcanzar un alto grado de sincronización en el crecimiento de los embriones somáticos en un mismo tejido o en suspensión celular se utiliza ácido abscísico (ABA), además este compuesto tiene la facultad de disminuir anomalías en el cultivo embrionario como la formación de embriones somáticos secundarios, lo que quiere decir la formación de un embrión a partir de otro embrión somático, fenómeno que se puede presentar en los tejidos (Roca *et al.*, 1991; Dixon & Gonzales, 1994).

#### **4.4 Análisis histológico de las estructuras embrionarias**

Se observó que el pecíolo de la hoja de piñón *Jatropha curcas* en condiciones *in vitro* presentó un alto potencial morfogénico aunque no se sabe con certeza a que se debe este fenómeno, pero autores como Lara *et al.* 2003 sugieren que bajo condiciones adecuadas que proporcionan los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, las células que deberían formar el mesófilo de empalizada y en regiones vasculares, continúan dividiéndose formando así centros de actividad meristemática como se puede observar en la Figura 3.18, los cuales son precursores de ápices como: raíz, primordios incipientes lo que se denomina organogénesis y embriones somáticos (Evans *et al.*, 2003; Lara *et al.* 2003).

Al observar un embrión en la etapa cotiledonar se pudo identificar los meristemas apical y radical conectados vascularmente, como se puede observar en la Figura 3.24, estas estructuras se formaron simultáneamente desarrollándose a lo largo de las diferentes etapas de la embriogénesis somática: globular, acorazonado, torpedo y cotiledonar, con lo cual se pudo identificar las diferentes fases embrionarias como menciona (Endress, 1994). Las cuales son semejantes a las fases de desarrollo de la

embriogénesis cigótica (Paniagua, Nistal, Sesma, Alvarez, Fraile, Anadón, & Saez, 2007).

En la Figura 3.24 se observa secciones longitudinales del embrión somáticos mostraron la naturaleza bipolar propia de los mismos y la posterior diferenciación. Se pudo observar la gran variación existente en cuanto a forma, tamaño y apariencia de los embriones somáticos desde las fases iniciales hasta la cotiledonar, lo que demuestra que es necesario realizar estudios histológicos detallados desde el inicio del callo hasta la completa formación y desarrollo de los embriones somáticos, lo cual puede ser muy útil para optimizar la efectividad de las condiciones físicas y químicas de los cultivos durante la embriogénesis somática como se lo realizó en un trabajo de embriogénesis por (González *et al*, 2008).

Para diferenciar entre embriogénesis somática y organogénesis se acudió al criterio de que los embrioides no tenía una conexión con el tejido vascular del explante y su separación del tejido madre era muy fácil de que suceda, además los embriones somáticos tiene la característica semejante a los embriones cigóticos de pasar por diversas fases de desarrollo las cuales son otra herramienta para distinguirlas como se puede observar en la Figura 3.22. En tanto si se observaba conexión vascular de los brotes entonces se podía mencionar que es de origen es organogénico como se presenta en la Figura 3.25 (Roca *et al*, 1991; Chanatásig, 2004).

Los cortes histológicos de los callos originados a partir de pecíolos presentaron estructuras embriogénicas además de organogénicas lo cual es común que ocurra en un mismo tejido. Una explicación de la ocurrencia de estos dos tipos de fenómenos es la utilización de los reguladores de crecimiento tanto auxinas como citoquinas van a desarrollar estos dos tipos de fenómenos en paralelo (Lara *et al*, 2003), además se debe del tipo de callo del cual se origina. El callo tipo I o duro tiene la característica de

generar embriogénesis somática y organogénesis, en cambio un callo tipo II o friable tiene la característica de generar solo embriogénesis somática lo cual ayuda al desarrollo de suspensiones celulares (Evans *et al.*, 2003). Lo cual evidencio en los cultivos ya que se obtuvo mayor porcentaje de callos tipo I por lo que se tenía organogénesis y embriogénesis somática en paralelo.