

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

#### 4.1 Etapa de Establecimiento

Esta etapa fue fundamental para la introducción de la especie al sistema de cultivo *in vitro*, pues se evaluaron todas las variables que intervienen en el proceso de desinfección, obteniendo un protocolo amigable con la especie para su crecimiento *in vitro* de manera semi heterótrofa, es decir mixotrófico. El establecimiento de un crecimiento *in vitro* sostenible fue fundamental para la investigación, pues se logró evaluar distintas variables específicas en la investigación, circunstancias que se evalúan detenidamente en los siguientes numerales.

##### 4.1.1 Establecimiento *in vitro* de yemas

###### 4.1.1.1 Establecimiento del mejor medio nutritivo

Se probó para la propagación de la especie *Solanum betaceum* dos tipos de medios modificados, el medio MS a un 75% de su concentración de macronutrientes y el medio modificado de Chu llamado N6 aplicado en el ensayo de Jaramillo (2008); lo cual brindó como resultados que el tipo de medio no influyó en la contaminación obtenida con la siembra de los explantes, su influencia se dio al evaluar la oxidación que se presentó en cada medio, obteniendo que al utilizar una concentración de 1,2% de hipoclorito de sodio con medio MS se obtuvo la menor oxidación y la mejor viabilidad de los explantes en su introducción al sistema de cultivo *in vitro*,

En el trabajo expuesto por Espinosa y colaboradores (2005) utiliza el medio de cultivo MS con una concentración de hipoclorito de sodio del 0,6% ; en donde obtuvo una oxidación del 50 %, especificando que en este ensayo se partió de yemas obtenidas a partir de plantas ya desarrolladas en el sistema de cultivo *in vitro*, lo cual reduce la oxidación porque la planta ya se encuentra adaptada a condiciones semi heterótrofas; en el caso del ensayo aplicado en la presente investigación se evidencia que el mejor resultado fue 59,33% de oxidación al aplicar 2% de hipoclorito de sodio en el medio de cultivo MS a un 75% de su concentración de macronutrientes (Tabla 3.3), por lo cual se continuó con esta concentración de hipoclorito de sodio y el medio

de cultivo MS para los ensayos posteriores, pero se vio la necesidad de incorporar al protocolo de desinfección otro químico que nos ayude a reducir la oxidación de los explantes introducidos al sistema de cultivo *in vitro*; pues el resultado obtenido fue similar al de la investigación de Espinosa y colaboradores (2005).

#### **4.1.1.2 Uso de fungicida en la etapa de desinfección.**

De acuerdo a los resultados obtenidos en el primer ensayo de desinfección, en donde se observó que pasados pocos días de siembra se desarrollaba contaminación bacteriana y fúngica en el medio de cultivo; se determinó la necesidad de introducir en el protocolo de desinfección como un paso más, la desinfección de los explantes con químicos especializados en este tipo de contaminación, es así que se probaron cinco marcas comerciales; Captan y Benomil (formulados de manera conjunta), Score 250EC, Bavistin y Phytol (este último además de fungicida, actúa como bactericida por estar compuesto por cobre en su molécula); con los cuales se aplicaron distintos tratamientos para probar su eficiencia en la eliminación de hongos y bacterias endógenas y exógenas de la especie y poder tener explantes prestos para el sistema de cultivo *in vitro*.

Santana (1985) en su investigación comprobó que los contaminantes más frecuentes para la especie *Solanum betaceum* pertenecen a las familias Pseudomonadaceae y Enterobacteriaceae; esto se explica porque estas bacterias Gram negativas son abundantes en la superficie área de la planta y en el ambiente, ya que se han aislado como saprofitas del agua, y del suelo. No se puede descartar la posibilidad de que las bacterias se encuentren en los espacios intercelulares, y por ello escapen a la desinfección, expresándose en el medio de cultivo, cuando el explante está bajo condiciones de estrés.

La introducción de los fungicidas al protocolo de desinfección tuvo una influencia positiva en el sistema de cultivo *in vitro*; pues eliminó en su mayoría la contaminación microbiana que se observaba en ensayos anteriores; resultado que se ratifica estadísticamente, pues se observó una relación de dependencia con el tipo de químico utilizado, el tiempo de inmersión empleado y el porcentaje de hipoclorito de sodio aplicado para los diferentes tratamientos de desinfección estudiados.

En cuanto a la contaminación bacteriana, respecto al tipo de fungicida aplicado, se observó que la marca comercial Score 250EC produjo el menor

porcentaje de contaminación con un 6,67% (Tabla 3.5), lo que demuestra que este químico es apto para incluirlo en el sistema de micropropagación *in vitro*; de igual manera se analizó la concentración de hipoclorito de sodio óptima para la especie; pues una baja concentración no elimina la contaminación endógena y exógena que contienen los explantes introducidos como menciona Santana (1985); como ejemplo a esta aseveración se presenta el ensayo adicional aplicado en la Tabla 3.14, en donde se utilizó 0,6% de cloro, obteniendo un alto porcentaje de contaminación fúngica y bacteriana (60%); ante esto se estableció que una concentración de hipoclorito de sodio al 1,2% es la óptima para obtener la menor contaminación bacteriana (8,47%) en los medios de siembra y que los explantes no generen necrosamiento por la fuerza del químico, obteniendo una viabilidad del 71,43% (Tabla 3.16).

El tiempo de inmersión de los explantes en el hipoclorito de sodio fue la última variable que influyó directamente en los resultados, obteniendo que un tiempo de inmersión de diez minutos en una concentración de 1,2% de cloro fuera lo óptimo para el protocolo (Tabla 3.11), ya que se obtuvo como mejor resultado un 21,15% de contaminación bacteriana en los explantes sembrados.

Analizando en conjunto las variables se observó que los tratamientos 7 y 12 (Tabla 3.14) obtuvieron una contaminación nula, estableciendo que la concentración de hipoclorito de sodio al 1,2% es la óptima para la introducción de *Solanum betaceum* al sistema de cultivo *in vitro*; se obtuvo dos químicos óptimos para la aplicación en este sistema; el compuesto comercial Phyton obtuvo una contaminación nula con un tiempo de inmersión de los explantes de 10 minutos y el químico comercial Score 250EC obtuvo su menor porcentaje de contaminación con un tiempo de inmersión de 15 minutos; lo cual denota que el fungicida Score 250EC es menos agresivo que el compuesto comercial Phyton; pues este químico con su molécula de cobre es fungicida y bactericida a la vez, restando efecto específico para cada grupo de contaminantes además de originar mayor necrosamiento en la especie.

Por otro lado la variable sobrevivencia va a la par con la variable analizada contaminación, pues no solo es necesario obtener una baja contaminación, sino que los explantes resistan a los tratamientos y presenten viabilidad para su desarrollo en el sistema de cultivo *in vitro*, resultados que se reflejaron en los tratamientos 8 y 12 (Tabla 3.16) en donde se obtuvo una viabilidad del 71,43% de los explantes sembrados.

Otra variable muy importante en el análisis aplicado fue la oxidación obtenida por los métodos de desinfección empleados, en donde se reflejó que los fungicidas comerciales Phyton y Score 250EC presentaron los mejores resultados (Tabla 3.17), por lo cual para establecer un protocolo de desinfección estandarizado se procedió a analizar nuevamente estos dos compuestos comerciales Phyton y Score 250EC; en donde se observó que la utilización del químico comercial Score 250EC confirmó su baja contaminación bacteriana y fúngica en los explantes sembrados (Tabla 3.27, Figura 3.8) y que la aplicación de un tiempo de inmersión de 15 minutos genera una mayor sobrevivencia y menor oxidación (Tabla 3.29) de los explantes introducidos al sistema de cultivo *in vitro*.

En la investigación realizada por Espinoza y colaboradores (2005) se presenta como resultados que la utilización de la interacción de los fungicidas Benlate y Captan en proporción 1:1 fue efectivo para el control de los hongos, ya que se obtuvo un bajo porcentaje de explantes con contaminación por el hongo *Cladosporium* (3%), pero que en conjunto obtuvo una alta contaminación bacteriana (93%), lo cual en un sistema de cultivo *in vitro* no es un resultado positivo, resultados similares se obtuvieron con estos fungicidas en la investigación planteada, motivo por el cual los químicos comerciales Phyton y Score 250EC presentaron menores porcentajes de contaminación y mejor viabilidad de los explantes introducidos al sistema de multiplicación *in vitro*.

#### **4.1.1.3 Uso de antibiótico en el protocolo de desinfección**

Para mejorar el protocolo de desinfección se procedió a incluir antibiótico en el método, se utilizó antibióticos de amplio espectro para bacterias Gram positivas y para bacterias Gram negativas los cuales fueron ampicilina y rifamicina respectivamente.

En este ensayo también se incluyó al fungicida comercial denominado Bavistin, pues la investigación realizada por Peña (2009) lo determinó como un químico efectivo para la desinfección de explantes en el sistema de cultivo *in vitro*, al cual se lo aplicó en interacción con los otros dos fungicidas ya utilizados, es decir, Phyton y Score 250EC en relación 1:1.

La mezcla Score 250EC y Bavistin en relación 1:1 presentó los mejores resultados pues se obtuvo un 13,41% de contaminación microbiana (Tabla 3.33) en los medios de siembra y un 40,54% de viabilidad, lo cual indica que no son resultados

alentadores para trabajar en un sistema de laboratorio, pues la viabilidad es indispensable para continuar con todo el proceso de multiplicación *in vitro* de la especie estudiada.

Analizando por separado los antibióticos se obtuvo que el antibiótico rifamicina generó solo un 13,51% de contaminación (Tabla 3.36), resultado independiente del método de desinfección; por lo cual no es un resultado influyente para ser considerado en futuras aplicaciones. De igual manera este antibiótico aunque presentó un buen desempeño en eliminar la contaminación especialmente bacteriana, no fue así con la sobrevivencia que generó en los explantes sembrados, pues obtuvo solo un 40,59% de viabilidad de los explantes libres de contaminación.

En la investigación ya mencionada de Espinosa y colaboradores (2005) concluye que el antibiótico rifamicina aplicado al medio de cultivo, no fue efectivo para controlar la contaminación ocasionada por una bacteria Gram negativa endógena, proveniente de los esquejes de nudos de la especie *Solanum betaceum*; por lo tanto, se debe emplear otra sustancia bactericida adicional que en nuestro caso fue el fungicida de nombre comercial Score 250EC como el químico ideal para eliminar la contaminación sin comprometer la viabilidad de los explantes sembrados.

Al analizar en conjunto todos los métodos de desinfección se determinó que el empleo de antibiótico en el protocolo de desinfección no ayuda a evitar la contaminación generada en la siembra de los explantes; los antibióticos solo influyeron en la viabilidad de los explantes sobrevivientes a la introducción al sistema de cultivo *in vitro* obteniendo que el mejor tratamiento estuvo compuesto por los fungicidas Score 250EC y Bavistin en relación 1:1, una concentración de hipoclorito de sodio del 2% y Rifamicina como antibiótico obtuvo una viabilidad del 42,11% (Tabla 3.38); resultado que no es óptimo para una estandarización del protocolo de desinfección con la especie *Solanum betaceum*.

Con estos antecedentes el método de desinfección se estandarizó con los parámetros descritos en los ensayos anteriores, es decir, como fungicida el químico comercial Score 250EC con un tiempo de inmersión de 15 minutos e hipoclorito de sodio en una concentración de 1,2% con un tiempo de inmersión de diez minutos, sin la aplicación de antibiótico, pues compromete la sobrevivencia y por ende la viabilidad de los explantes introducidos al sistema de cultivo *in vitro*; parámetros que obtuvieron una eficiencia sin contaminación del 100% y un 71,43% de sobrevivencia, condiciones

óptimas para su desarrollo en sistemas de cultivo *in vitro* para esta especie *Solanum betaceum*.

#### 4.1.2 Germinación de semillas *in vitro*

Un punto crucial de esta investigación fue el introducir el regulador de crecimiento Brasinolida al sistema de cultivo *in vitro*, el cual se lo hizo en esta etapa con tres concentraciones diferentes más un tratamiento libre de hormonas; los resultados expuestos demostraron que la aplicación de este biorregulador no influye estadísticamente en la germinación de la especie como se esperaba (Tabla 3.41), aunque con el uso de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de este compuesto en los medios de cultivo si se observó un mejor porcentaje de germinación (79,17%; Tabla 3.42; Figura 3.13), lo cual nos dio una pauta para buscar concentraciones ideales que fueron aplicadas en la siguiente etapa de multiplicación de los explantes obtenidos e introducidos al sistema de cultivo *in vitro*. Así Takeucho, Worsham y Awad (1991) demostraron que la Brasinolida aplicado en la etapa inicial de acondicionamiento de las semillas de *Striga asiática*, acortó el período de acondicionamiento requerido para la germinación de las semillas.

Los brasinoesteroides o también conocidos como brasinolidas (*BRs*) son productos naturales que se encuentran en las plantas a muy bajas concentraciones. Sasse (1997) en su publicación menciona que las respuestas a los brasinoesteroides incluyen efectos sobre la elongación, la división celular, el desarrollo vascular y reproductivo, la polarización de la membrana, el bombeo de protones y la modulación del estrés. Los brasinoesteroides, además, interactúan con las señales ambientales y pueden afectar el desarrollo de insectos y hongos.

En base a las pruebas de varianza aplicadas a cada variable se observó que la inclusión de estas hormonas de crecimiento al medio presentó influencia estadística en cuanto a la obtención de raíces, siendo la concentración más óptima un  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de Brasinolida (Tabla 3.44). En base a estos resultados se establece que las hormonas ayudan a generar un desarrollo radicular en la especie, lo cual es de suma importancia, porque evita realizar una etapa en este sistema de cultivo *in vitro*; ya que de la etapa de multiplicación se salta directamente a la etapa de aclimatación, obviando la etapa de enraizamiento de los explantes desarrollados *in vitro*, ahorrando tiempo y recursos en la propagación de la especie.

Según la publicación hecha por Pérez y colaboradores (1995), menciona que la importancia de incluir las Brasinolidas en la investigación radica en que varios países como Ecuador han visto la necesidad de investigar la forma de sustituir los reguladores de crecimiento sintéticos con productos naturales que puedan ejercer la misma actividad que los productos sintéticos; de esta manera la utilización de biopreparados de producción comercial representan en la última década una alternativa para aumentar los rendimientos agrícolas, disminuir los costos de producción y hacer un mejor uso de los productos naturales.

## **4.2 Etapa de Multiplicación**

Santana y Torelli en sus investigaciones mencionan que encontraron diferencias en cuanto a la capacidad de división celular y regeneración en las plantas de tomate de árbol, estando determinada en gran medida por los reguladores del crecimiento y el tipo de explante usados, aún cuando se utilizan diferentes explantes de una misma planta, aspecto a tener en cuenta a la hora de recomendar el empleo de uno u otro regulador del crecimiento en esta fase de multiplicación *in vitro*.

En esta etapa se utilizaron explantes *in vitro* a partir de dos vías distintas de introducción para su multiplicación como se lo expuso en el capítulo anterior. Las plántulas desarrolladas *in vitro* a partir de semillas sembradas en este sistema se las etiquetó como plántulas "*in vitro*"; y plántulas desarrolladas *in vitro* a partir de yemas introducidas de campo y aplicadas el protocolo de desinfección establecido en el apartado anterior se las denominó "*ex vitro*"; por tal motivo al analizar las variables aplicadas en esta etapa de multiplicación se obtuvieron resultados tanto similares como diferentes dentro de esta misma especie.

### **4.2.1 Obtención de nuevos brotes**

#### **In vitro**

En 1998 Hoyos y Kafuri por medio de su investigación encontraron que para tomate de árbol, un medio de cultivo empleando sales MS complementado con 0,1 mg L<sup>-1</sup> de AIA (Ácido Indol Acético), es adecuado para la propagación de microesquejes

de nudo con una yema. De acuerdo a los resultados expuestos en esta investigación, al analizar individualmente los biorreguladores de crecimiento se evidencia que la presencia de Brasinolidas en el medio de cultivo no es favorable para la germinación de brotes en la yema sembrada a partir de una plántula desarrollada *in vitro* (Tabla 3.48), los biorreguladores AIA y BAP en concentraciones de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  y  $2 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente presentaron los mejores resultados (Tabla 3.46 y Tabla 3.47).

En su investigación Espinosa y colaboradores (2005) encontraron que para la variable longitud de brotes, no se encontró efecto significativo para el factor concentración de BAP, ni para el factor concentración de AIA. Sin embargo, la interacción de ambos factores fue significativa como se observa gráficamente en la Figura 3.14. El análisis de las interacciones hormonales entre los biorreguladores de crecimiento en la investigación planteada generó resultados similares a los detallados con anterioridad, pues la interacción AIA\*BAP sin presencia del biorregulador Brasinolida obtuvo la mayor cantidad de brotes desarrollados *in vitro* a partir de una yema (Tabla 3.49, Tabla 3.52), como se detalla en bibliografía esta interacción es un sinergismo potente para el desarrollo de explantes a partir de una planta madre en el sistema de cultivo *in vitro*.

Por otra parte la interacción AIA\*Brasinolida presentó excelentes resultados en concentraciones de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente (11,5 brotes por explante desarrollado) (Tabla 3.50, Figura 3.15), lo que ratifica la teoría expuesta en donde se menciona que este biorregulador actúa sinérgicamente con la familia de las auxinas haciendo un papel de citoquinina para ciertas variables como la analizada, generación de brotes.

### **Ex vitro**

En los cultivos *in vitro*, la inducción de órganos por efecto de las citoquininas (BAP), está encaminada a la formación de yemas, las cuales son obtenidas con base en una proporción de citoquinina alta con respecto a la auxina. Por otro lado, el AIA es una auxina que interviene en el alargamiento y la división celular, estimulando la formación de brotes. En ausencia de citoquininas, la auxina provoca el alargamiento celular en los tejidos cultivados. Pero, en presencia de la BAP, el efecto que se obtiene por la presencia de la auxina, es una división celular mediada por la citoquinina. Sin embargo, un exceso de auxina puede suprimir la división celular y aún, el crecimiento



celular. Espinosa y colaboradores (2005) en su investigación mencionan que los reguladores de crecimiento utilizados, AIA y BAP estimularon tanto la división como la elongación celular, obteniéndose la formación de yemas y la diferenciación de brotes, a partir de algunos de los nudos cultivados.

En cuanto a la utilización de explantes provenientes de yemas de campo se obtuvo que el mejor resultado para generación de brotes se dio de similar manera que con la aplicación de explantes *in vitro*, es decir con la interacción hormonal AIA\*BAP en concentraciones de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  y  $2 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente por el alto sinergismo que mantienen dichas hormonas, el resultado a resaltar fue que la aplicación en los tratamientos de la interacción hormonal BAP\*Brasinolida en concentraciones de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  y  $4 \text{ mg L}^{-1}$  también generó óptimos resultados para obtener brotes (promedio 11 brotes por explante desarrollado) (Tabla 3.56, Figura 3.17), lo cual se explica la opción de que las brasinolidas funcionen como una citoquinina, éstas puedan potenciar su acción al biorregulador BAP originando mayor división celular encaminada a la producción de yemas axilares y apicales. Según Mandava y Sasse (1981) observaron que la Brasinolida no fue efectiva en los bioensayos clásicos para las auxinas relacionados con la inhibición del crecimiento de la yema lateral en guisantes decapitados; de igual manera encontraron que no estimularon la formación de raíces adventicias en frijol, efecto opuesto al producido por el AIA y BAP actuando sinérgicamente.

#### **4.2.2 Grosor del Tallo**

Key (1969) menciona que la división y el alargamiento celular en un tejido en crecimiento requieren de la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas. Las hormonas vegetales tales como las auxinas, giberelinas y citoquininas, regulan el metabolismo de los ácidos nucleicos en las plantas. Estos estudios claramente indican que los efectos en el crecimiento inducidos por los brasinoesteroides, al igual que los inducidos por auxinas y giberelinas, dependen de las síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas celulares lo cual indicaría un engrosamiento del tallo en la especie.

Los resultados expuestos en conjunto de plántulas *in vitro* y *ex vitro* se denotan similares, pues la supresión de los biorreguladores AIA y BAP en los medios de cultivo origina mayor grosor del tallo de las plántulas desarrolladas en el sistema de cultivo *in*

*vitro* (Tabla 3.58, Tabla 3.61), lo que indica que el sinergismo entre estas familias de fitohormonas no influyen en el engrosamiento del tallo de las plantas.

En 1993 los investigadores Roddick, Rinenberg y Ikekawa mencionan que las brasinolidas son compuestos naturales que poseen una fuerte actividad promotora del crecimiento vegetal debido a las bajas concentraciones en que están presentes en la planta, estimulan el alargamiento y la división celular; lo cual se reafirma en la investigación realizada, pues se generó un resultado adverso al observado con la aplicación de AIA y BAP; ya que el biorregulador Brasinolida en donde en concentración de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  obtuvo el mayor promedio estadístico de grosor de tallo en plantas desarrolladas *in vitro* (Tabla 3.59); pero que al interactuar esta hormona con el biorregulador BAP se atenúa y no se obtiene un buen grosor en el desarrollo de las plántulas *in vitro*.

Mandava en 1988 observó que las giberelinas causan sólo alargamiento del entrenudo tratado y de los superiores y que por otro lado los brasinoesteroides provocan tanto el alargamiento como la división celular, lo que resulta en una elongación, engrosamiento, curvatura y desdoblamiento entrenudo en el tallo de las plantas, resultados que se aprecian en esta variable analizada.

#### **4.2.3 Altura de la Planta**

En base a los análisis de varianza (ADEVA) y recopilando resultados con explantes *in vitro* y *ex vitro* se observó que la supresión del biorregulador BAP originó mayor elongación de los explantes desarrollados *in vitro* (Tabla 3.63), en cuanto al biorregulador AIA se observó que al utilizarlo en una concentración de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  genera el mayor crecimiento longitudinal de las plantas (Tabla 3.64, Figura 3.18 y Tabla 3.67), pero que al aumentar esta concentración, el crecimiento se atenúa, pues se ha determinado que esta especie *Solanum betaceum* posee auxinas endógenas, motivo que hace se potencie la acción de la auxina aplicada (AIA) originando que las plantas se saturan de esta hormona y no la asimilen para su crecimiento, ya que en altas concentraciones las auxinas se vuelven tóxicas.

Los efectos promotores de los Brasinoesteroides sobre la elongación del tejido vegetativo han sido observados en muchas especies, pero solamente en pocas, se han estudiado en detalle. Sasse en 1991 plantea que el tratamiento con las hormonas

vegetales reconocidas afecta la elongación inducida por la brasinolida; las giberelinas tienen un efecto aditivo y la zeatina un efecto inhibitorio. Con las auxinas hay un sinergismo donde la brasinolida permite a éstas inducir elongación cuando solas son inefectivas. La auxina exógena afecta la cinética de la respuesta a la brasinolida; sin embargo, el sinergismo encontrado en la investigación con la planta de pepino puede ser atribuido a un incremento en la amplitud de la respuesta a la auxina.

Acorde a este planteamiento la interacción hormonal que presentó resultados óptimos fue la conformada por los biorreguladores AIA y Brasinolidas en concentraciones de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  y  $4 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente, lo cual indica que las Brasinolidas no siempre funcionan como una citoquinina en relación a su aplicación con una auxina, pues en este caso actúa sinérgicamente pero en razón de potenciar la acción de elongación que producen las auxinas en los explantes sembrados *in vitro* (Tabla 3.68) como se puede observar gráficamente en la figura 3.20; este resultado se ratifica al observar que la sola aplicación de estas hormonas Brasinolidas en el medio sin otro biorregulador obtiene de igual manera gran elongación de los explantes sembrados (Tabla 3.69), ya que como se explicó con anterioridad, la especie en estudio *Solanum betaceum* contiene auxina endógena que permite este fenómeno analizado.

#### **4.2.4 Número de Raíces**

El análisis de esta variable fue un pilar muy importante para el estudio, porque acorde a los mejores resultados se determinó un protocolo de multiplicación que permite adelantar la etapa de enraizamiento en los sistemas de cultivo *in vitro* y pasar directamente a la etapa de aclimatación.

Como menciona en su escrito Moré y colaboradores (2001), los brasinoesteroides se constituyen como biorreguladores con probada actividad en el crecimiento vegetal y con mecanismos de acción diferentes a los de las hormonas clásicas, por lo que ha sido de gran interés científico-técnico la utilización de análogos de brasinoesteroides en la biotecnología vegetal, lo que permitirá validar su acción como reguladores del crecimiento y posibilitará su uso en diferentes estudios *in vitro*.

Trabajando con los explantes provenientes de semillas desarrolladas *in vitro*, se observó que los resultados con más relevancia estadística se dieron al suprimir los

bioreguladores AIA y BAP de los medios de cultivo, pues se obtuvo mayor crecimiento y desarrollo radicular (Tabla 3.72, Figura 3.22). De igual manera se ratificó al analizar los explantes desarrollados *in vitro* a partir de yemas introducidas de campo con algunas diferencias significativas, pues se establece que plántulas desarrolladas *in vitro* a partir de semillas generaron una mayor cantidad de raíces que las plántulas desarrolladas *in vitro* a partir de yemas de campo; ya que el tejido de una yema introducida al sistema de cultivo *in vitro* ya está diferenciado y se tiene que desdiferenciar en el medio de cultivo para luego diferenciarse de nuevo a raíz. En cambio en la semilla desarrollada *in vitro* esto se da a partir del eje radical directamente.

Al analizar los resultados de las plántulas obtenidas *in vitro* a partir de yemas introducidas de campo se observó de igual manera que la supresión del bioregulador BAP origina mayor densidad radicular y que al aplicar una concentración de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA si se obtuvo un mayor crecimiento radicular (Tabla 3.74); pues la cantidad de auxina endógena de la plantas desarrolladas a partir de yema de campo es menor que las auxinas de plantas jóvenes desarrolladas *in vitro*, por lo cual la introducción de auxina sintética compensa la baja de esta hormona en el desarrollo de la planta *in vitro*. Condición similar se obtuvo al observar los resultados presentados por la interacción hormonal AIA\*Brasinolida en concentraciones de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  y  $4 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente como se observa en la Figura 3.15, en donde en promedio el número de raíces por plántula fue del 2,56 (Tabla 3.75); comportamiento equivalente al evaluado en la variable altura de la planta.

Marquardt y Adam (1991), en varios sistemas, observaron que los brasinoesteroides interactúan fuertemente de forma sinérgica con las auxinas para inducir la formación de raíces adventicias, resultado similar al obtenido en esta investigación. Por otra parte, la respuesta de los brasinoesteroides y las giberelinas parecen ser ambas independientes y aditivas. En sistemas diseñados para citoquininas, los brasinoesteroides actúan de varias formas, es decir, los brasinoesteroides pueden funcionar como auxinas en un momento y como giberelinas o citoquininas en otro.

Conforme se va introduciendo las auxinas y suprimiendo las citoquininas en los medios de cultivo, se va logrando un desarrollo radicular sostenido como se observa en la tabla 3.79; lo interesante se suscita con la introducción del bioregulador Brasinolida a los medios de cultivo, en donde se demuestra que esta fitohormona en

acción sinérgica con la auxina AIA en concentración de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , promueve de sobremanera el desarrollo radicular de las plántulas *in vitro* y que su mejor concentración se dio en  $4 \text{ mg L}^{-1}$  como se observa en la Tabla 3.77; obteniendo resultados en promedio de desarrollo radicular que duplican a los otros tratamientos aplicados.

#### 4.2.5 Vigorosis

Esta variable fue evaluada por la necesidad de saber si los explantes que sobrevivieron del tratamiento de desinfección o fueron sometidos a un subcultivo para analizar los distintos tratamientos, son explantes viables, es decir, que a más de estar vivos, tengan la capacidad para crecer y desarrollarse en un sistema de cultivo *in vitro*. Es así que los dos tipos de explantes, ya sean provenientes de semillas desarrolladas *in vitro*, o de yemas introducidas de campo, plántulas denominadas *ex vitro*; presentaron similares resultados estadísticos. La supresión del biorregulador AIA es crucial para obtener plantas que puedan desarrollarse *in vitro* con un 96% de efectividad (Media de 2,9 sobre un máximo de 3) (Tabla 3.80), la interacción hormonal BAP\*Brasinolida arrojó los mejores resultados en cuanto a sobrevivencia y viabilidad de los explantes desarrollados en el sistema de cultivo *in vitro* como se evidencia en las Tablas 3.80 y 3.83, demostrado en la figura 3.26; lo que indica que el biorregulador BAP promueve su sobrevivencia al generar mayor cantidad de brotes de una sola yema sembrada, y que el biorregulador Brasinolida actúa de manera similar al promover mayor crecimiento radicular, es decir, mayor captación de nutrientes del medio con el propósito de que la oxidación fenólica no cause necrosamiento severo en el tejido de los explantes sembrados.

Sasse (1983) explica que las respuestas a los brasinoesteroides incluyen efectos sobre la elongación, la división celular, el desarrollo vascular y reproductivo, la polarización de la membrana y el bombeo de protones, las relaciones fuente/sitio de consumo y la modulación del estrés. Los brasinoesteroides, además, interactúan con las señales ambientales y pueden afectar el desarrollo de insectos y hongos. Es así que estas hormonas gobiernan todos estos factores que son fundamentales para la vigorosis de la especie introducida al sistema de cultivo *in vitro*. De igual forma en influencia de la vigorosis que se da en los explantes tratados con Brasinolida el investigador Hamada (1986), al evaluar los usos prácticos, consideró que una acción importante de este compuesto era acelerar la resistencia a varios estrés, tales como

estrés de bajas temperaturas, de infección por hongos, a los daños por herbicidas y a la salinidad en el suelo

#### 4.2.6 Formación de Callo

La expresión fenotípica de la aplicación hormonal de los diferentes tratamientos en los explantes desarrollados en el sistema de cultivo *in vitro* generó diferencias acorde a la naturaleza de dónde provino el explante, es decir, los resultados de explantes provenientes de semillas llamados *in vitro* son distintos a los resultados de los explantes provenientes de yemas de campo introducidas denominados *ex vitro*.

Las plántulas obtenidas a partir de semillas desarrolladas *in vitro* generaron mayor desdiferenciación celular en su zona radicular con la utilización de las fitohormonas en concentraciones de 0,5 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 1 mg L<sup>-1</sup> de BAP por separado, resultado similar se obtuvo con la interacción BAP\*Brasinolida en concentraciones de 1 mg L<sup>-1</sup> y 4 mg L<sup>-1</sup> respectivamente (Tabla 3.87, Figura 3.27); lo que demuestra que la inclusión de las tres hormonas de crecimiento en los medios de cultivo genera desdiferenciación celular en diferentes proporciones; observando la mayor desdiferenciación celular con la aplicación única de BAP como biorregulador de crecimiento con una media de 2,53 sobre un nivel máximo de 3.

Takematsu y colaboradores (1983), citados por Ikekawa (1991), encontraron que la Brasinolida y la auxina combinadas estimularon el crecimiento de tejidos de callos de un número de plantas más efectivamente que la auxina y la benciladenina. En la investigación realizada se obtuvo resultados diferentes; pues al trabajar con explantes provenientes de yemas de campo se determinó que la supresión del biorregulador AIA promueve la desdiferenciación celular (Tabla 3.89), ya que esta hormona promueve la elongación de la planta evitando que las células retomen su totipotencialidad, resultado diferente al encontrado con explantes desarrollados de semilla *in vitro*; pues estos explantes no provienen de una planta conformada por células con funciones ya definidas; por lo cual es más fácil mantener su totipotencialidad, ya sea con reguladores de crecimiento de las familias de las auxinas o citoquininas; puesto que aún no identifican una función específica dentro del organismo.

En cambio, las plántulas desarrolladas *in vitro* a partir de yemas de campo, para lograr una desdiferenciación celular necesitan de la aplicación de citoquininas como BAP, más no de auxinas (Tabla 3.89); al hacer interactuar este biorregulador BAP en conjunto con las Brasinolidas se obtuvo una mayor desdiferenciación celular en la zona radicular de la planta (Tabla 3.90), pues se genera un sinergismo entre las dos hormonas, las Brasinolidas son especialistas en el desarrollo radicular de los explantes y se ve influenciado por la acción desdiferenciadora del biorregulador BAP obteniendo una mayor cantidad de células totipotentes, metodología que a futuro se podría aplicar a partir de esta interacción hormonal para producir células totalmente totipotentes con diferentes fines, como ejemplo suspensiones celulares en donde es más fácil aplicar un estudio citogenético de la especie.

### **4.3 Aclimatación**

La especie estudiada, *Solanum betaceum* (tomate de árbol), generó en la etapa de multiplicación desarrollo paralelo de formación de raíces como se había explicado, lo cual influyó positivamente en la investigación, pues se obvio esta etapa de enraizamiento y se estudió la etapa de aclimatación detallada a continuación. Cabe mencionar que no todos los tratamientos aplicados en la etapa de multiplicación tuvieron desarrollo radicular, por ende, no todos fueron evaluados en esta etapa, de igual manera las plantas que procedieron de semilla desarrollada *in vitro* tuvieron diferente desempeño y resultado con respecto a las plantas obtenidas a partir de introducción de yemas al sistema de cultivo *in vitro*; todas estas variables se analizaron obteniendo interesantes resultados que serán discutidos posteriormente en este capítulo.

#### **4.3.1 Evaluación del uso de AIA**

Este biorregulador en las plantas procedentes de semilla desarrollada *in vitro* generó una influencia negativa, pues la supresión de esta hormona generó mayor grosor del tallo, mayor número de hojas y mayor altura, (Tabla 3.93, Tabla 3.94), lo cual indica que las plantas al ser jóvenes generan auxina endógena lo cual les ayuda a su desarrollo, y que el aumento de auxina exógena en su crecimiento inhibe la acción de la hormona originando un pobre desarrollo por la toxicidad generada por la saturación hormonal; por otro lado al analizar este biorregulador en las plantas

procedentes de yemas introducidas al sistema de cultivo *in vitro* denominadas *ex vitro* se observó que la auxina AIA en una concentración de  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  (Tabla 3.105) si originó una respuesta positiva en cuanto a su desarrollo longitudinal obteniendo una altura de 96,94 centímetros; acción que se explica por la baja de esta hormona en este tipo de explante, pues es un explante que ya se desarrollo en campo, no es nato del sistema de cultivo *in vitro*, lo cual hace que su línea de vida se conserve así se lo haya introducido a este sistema; entonces la edad de la planta obtenida en aclimatación procedente de yema es mayor a la planta obtenida de semilla desarrollada *in vitro*, lo cual nos lleva a deducir que cantidad hormonal endógena de los explantes *ex vitro* es menor, necesitando de auxina exógena para obtener un desarrollo similar al obtenido de plantas originadas de semilla desarrollada *in vitro*; por lo cual se presenta diferencia de resultados en esta etapa.

En relación con la actividad de estos compuestos en los bioensayos típicos para auxinas, Topp, Mandava y Sasse (1981) al probar la actividad biológica de la brasinolida en comparación con las auxinas en diversos bioensayos, encontraron que la Brasinolida estimuló respuestas similares a las mostradas por las auxinas en los bioensayos con frijol y alargamiento de tallo en maíz, lo cual se demuestra al analizar este biorregulador.

#### **4.3.2 Evaluación del uso de BAP**

Solo los tratamientos aplicados a explantes provenientes de semilla desarrollada *in vitro* presentaron resultados con este biorregulador, pues los tratamientos *ex vitro* no sobrevivieron hasta esta etapa de aclimatación, ya que estos tratamientos demostraron grandes índices de desdiferenciación celular, es decir, generación de callo (Tabla 3.89), con lo cual no se obtuvo un desarrollo radicular sostenido de estas plantas provenientes de yemas de campo.

Seeni y Latha (1992) reportaron que altas concentraciones de citoquininas en el medio de iniciación y de multiplicación, pueden inhibir el enraizamiento. Por su parte, George y Sherrington (1984), también observaron que, los elevados niveles endógenos de citoquininas en algunas especies inhiben el enraizamiento, por lo que se requiere de varios subcultivos sin concentraciones altas de citoquininas a fin de reducirlos y suprimir el bloqueo que ejerce su efecto.



Las variables analizadas, vigorosidad y número de hojas, presentaron dependencia estadística con este biorregulador, evidenciando que la concentración óptima fue  $2 \text{ mg L}^{-1}$  (Tabla 3.97); lo cual indica que este biorregulador sigue generando efectos de multiplicación celular aún cuando la planta ya ha sido cultivada y traspasada a condiciones autótrofas en campo.

#### **4.3.3 Evaluación del uso de Brasinolida**

Schalagnhauser y Arteca (1991) en un estudio del metabolismo de los brasinoesteroides en plantas de tomate, demostraron que al suministrar brasinolida triturada a plántulas de 20 días de edad, en las primeras cuatro horas no hubo metabolismo aparente del compuesto; sin embargo, a las ocho horas aparecieron dos productos metabólicos y después de 24 horas se detectó un incremento sustancial del ACC (ácido aminociclopropano carboxílico), precursor del etileno. Posteriormente, cuando las plantas se transfirieron a una solución que no contenía brasinolida, el contenido de ACC de los tejidos disminuyó; sin embargo, la cantidad de productos metabólicos continuó incrementando, lo que denotó que la planta metaboliza la brasinolida a formas inactivas.

En cuanto a los resultados observados de este biorregulador Brasinolida en las plántulas aclimatadas; su introducción en el sistema de cultivo *in vitro* originó similares resultados tanto en las plantas provenientes de semillas desarrolladas *in vitro*, como en las plantas originarias de una yema de campo introducida al sistema *in vitro*; influyendo especialmente en la variable altura de la planta; en donde al utilizar una concentración de  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de esta hormona se obtiene el mayor crecimiento longitudinal (Tabla 3.99, Tabla 3.107). Este resultado es similar en las plantas obtenidas *in vitro* procedentes de diferente explante, pues la hormona no se encuentra de manera endógena en la planta, originando el mismo efecto en el crecimiento y desarrollo longitudinal de la especie; ya que no diferencia si el tejido es joven o maduro.

#### ***Interacción Hormonal***

Wu y Zhao (1991), concluyeron que la Brasinolida probablemente promovió el crecimiento del epicotilo del frijol a través de la estimulación del nivel endógeno de

AIA, la cual pudo estar asociada a la inhibición de la peroxidasa y la AIA oxidasas, enzimas relacionadas con el metabolismo del AIA; fenómeno que se manifestó con los resultados obtenidos con las plantas *in vitro* aclimatadas a partir de yemas de campo introducidas al sistema de cultivo *in vitro*.

Observando la interacción entre biorreguladores, se establecieron varias diferencias significativas entre los tratamientos aplicados en la etapa de multiplicación y llevados a la aclimatación. En el caso de las plantas obtenidas *in vitro* a partir de semillas desarrolladas en este mismo ambiente se observó que el biorregulador AIA impide un normal crecimiento longitudinal de la especie al estar interactuando con los biorreguladores BAP y Brasinolida; y que éstos sin la aplicación del biorregulador AIA obtuvieron la mayor elongación longitudinal de la especie alcanzando una altura de 171 milímetros (Tabla 3.101), lo que indica que el biorregulador BAP potencia la acción comprobada que tienen las brasinolidas para generar desarrollo longitudinal en una especie, y que al incluir el biorregulador AIA, esta acción se inhibe. Esta misma asociación en concentraciones de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de BAP y  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de Brasinolida originaron la mejor vigorosidad de las plantas aclimatadas (Tabla 3.102), lo cual es muy importante para la investigación, pues se puede deducir que esta carga hormonal permite que las plantas soporten el cambio de ambiente, de *in vitro* a un ambiente de campo *ex vitro* y que hagan que la especie retome su naturaleza autótrofa.

La variable que evidenció mejoría con la interacción de las hormonas fue el número de hojas obtenido, a una concentración estándar de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de cada hormona se obtuvo el mayor número de hojas en las plantas aclimatadas (Tabla 3.103), fenómeno que indica que el tratamiento es ideal cuando se pretenda multiplicar la especie, mas no es factible cuando se desea que se desarrolle como planta, ya que tanta división celular para formar yemas impidió su crecimiento longitudinal.

En 1991 los investigadores Sakurai, Fujioka, Saimoto, Bellincampi y Morpurgo, plantearon que las brasinolidas en combinación con las auxinas, promueven el crecimiento de callos de varias plantas y en el cultivo de células de zanahoria, estos indujeron el alargamiento celular pero no la división. Además, Bellincampi *et al.*, (1991), demostraron que la 24-epibrasinólida aumentó la estimulación del alargamiento celular en el cultivo de la zanahoria, situación similar que se suscitó en esta investigación con tomate de árbol

El biorregulador BAP tiene como función la multiplicación celular, por tal motivo en la mayoría de casos promueve la generación de callo; es así que en plantas ya diferenciadas celularmente, produce su desdiferenciación para obtener células totipotenciales en una planta ya adulta; si ésta hormona es aplicada en plantas jóvenes que recién se están desarrollando y diferenciando sus células, hace que se promueva esta multiplicación en pro de la función ya definida, como ejemplo lo que sucedió al observar la interacción hormonal entre BAP y Brasinolidas en plantas que se desarrollaron de semilla *in vitro*, en donde el biorregulador BAP potenció la acción de las Brasinolidas en el crecimiento y desarrollo longitudinal de las plántulas; por otro lado al aplicar esta hormona en plantas ya adultas que ingresaron al sistema de cultivo *in vitro* no genera el mismo resultado, pues como se trata de células ya diferenciadas funcionalmente, la hormona procura desdiferenciarlas a totipotenciales, y no actúa sinérgicamente con las Brasinolidas para obtener un mayor crecimiento longitudinal, razón por la cual al observar los resultados obtenidos de las plantas *in vitro* a partir de yemas introducidas de campo obtenemos que la supresión de este biorregulador BAP y la asociación de AIA con Brasinolida obtuvieron el mejor resultado en la variable altura de la planta (Tabla 3.109).

Otro motivo que origina este resultado es que las auxinas endógenas de la especie se encuentran en menor proporción en estas yemas de campo introducidas al sistema de cultivo *in vitro* con respecto a las plantas que se han desarrollado a partir de semilla dentro de este sistema, por lo cual la aplicación exógena de esta hormona en el medio origina que se dé un mayor desarrollo de la planta a interactuarla con las Brasinolidas.

Estos resultados se ratifican en la investigación presentada por Pérez (1998), en donde indica que los brotes jóvenes en desarrollo son una rica fuente de producción de auxinas, esto hace que no sea necesaria la adición de auxinas en algunas especies. Es importante mencionar que al existir este regulador en la planta al adicionarle en diferentes concentraciones presenta un efecto inhibitorio.

Estos resultados se reflejan en las investigaciones realizadas por Sasse (1991) en las cuales indica que con las auxinas hay un sinergismo donde la brasinolida permite a éstas inducir elongación cuando solas son inefectivas. La auxina exógena afecta la cinética de la respuesta a la brasinolida; sin embargo, el sinergismo encontrado en pepino puede ser atribuido a un incremento en la amplitud de la respuesta a la auxina.

Es interesante destacar que aunque tanto las auxinas como las brasinolidas promueven la elongación, sus cinéticas son muy diferentes, ya que generalmente las auxinas muestran un lapso de tiempo muy corto (10 a 15 min) entre la aplicación y el comienzo de la elongación; sin embargo, los brasinoesteroides tienen un lapso de al menos 45 minutos con velocidades de elongación que continúan creciendo por varias horas (Clouse *et al.*, 1992; Zurek *et al.*, 1994 y Mayumi y Shibaoka, 1995).