

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Localización del ensayo

La mayor parte de la investigación se realizó en las instalaciones de los laboratorios de Biotecnología en el área de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela Politécnica del Ejército ubicada en la ciudad de Sangolquí, Av. El Progreso s/n con las coordenadas geográficas (00° 18.811 S; 078°26.644 O). El análisis histológicos se lo realizó en el laboratorio de Acuicultura de la Carrera de Ciencias Agropecuarias, IASA, Hacienda el Prado. Su ubicación geográfica está en la Provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, parroquia San Fernando con las coordenadas geográficas (78° 24.44 O; 0°23.20 S) a una altitud de 2748 msnm.

### 2.2 Material Vegetal

Las muestras vegetales fueron colectadas en la provincia de los Tsachilas – Ecuador (00°26.281 S; 079°19.236 O) en la hacienda Molestina vía a Quevedo. Se colectó además en la provincia de Manabí sector el Carmen (00°11.385 S; 0.79°30.435O) vía a Chone.

Se seleccionaron plantas jóvenes de piñón *Jatropha curcas* con buenas características morfológicas, como por ejemplo, tallos y pecíolos libres de heridas y que no hayan presentado necrosis, hojas sanas libres de manchas que no posean encorvamiento del área foliar.

La altura aproximada de las plantas recolectadas fue de 3 m, con gran cantidad de ramas y hojas. Una vez identificadas las plantas con buenas características botánicas, se procedió a cortar estacas de aproximadamente 30 cm de largo, con una podadora previamente desinfectada con hipoclorito de sodio al 3%. Luego se colocó estas estacas en fundas plásticas con tierra del lugar. Para transportarlas a los invernaderos del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la ESPE (Figura 2.1). A los 30 días las plantas comenzaron a presentar brotes, hojas y pecíolos, con lo que se procedió a realizar las primeras pruebas de establecimiento.



Figura 2.1 Plantas de piñón *Jatropha curcas* mantenidas en invernadero Laboratorios de Cultivo de Tejidos ESPE.

### 2.3 Condiciones del cultivo

Una vez establecidas las plantas en el invernadero a una temperatura de  $26\pm 2$  °C, humedad relativa de  $55\pm 5\%$  y un foto período de 12 horas luz. Se

procedió a realizar un tratamiento fitosanitario durante un período de 30 días. El cual consistió en aplicarles a las plantas un fungicida – bactericida comercial a una concentración del 1%, el cual poseía como ingrediente activo sulfato de cobre heptahidratado, aplicándolo cada dos días durante un mes. Además estas plantas fueron regadas continuamente con una solución de Murashige y Skoog (1962) a la mitad de su concentración suplementado con 1 mg/L de bencilaminopurina (BAP) para inducir la proliferación de yemas.

## **2.4 Fase de establecimiento**

### **2.4.1 Desinfección del material vegetal**

Luego del tratamiento fitosanitario se procedió a cortar los pecíolos de las hojas con una tijera previamente desinfectada. El tamaño de los pecíolos fue aproximadamente de 5 cm de largo, los cuales fueron colocados en un vaso de precipitación con detergente y agua potable con agitación durante 20 min. Después de este tiempo el material vegetal fue minuciosamente lavado en agua corriente hasta eliminar por completo el detergente. A continuación se procedió a colocar los pecíolos en un vaso de precipitación que contenía un fungicida con carbendazim como ingrediente activo se trabajo a una concentración del 0.5% y un tiempo de exposición fue de 30 min (Thepsamran, 2006; Kalimutu *et al.*, 2007; Jha *et al.*, 2007). Se colocó los pecíolos en el segundo fungicida que tenia como ingrediente activo sulfato de cobre heptahidratado a una concentración del 1% durante 30 minutos. Se enjuagó los pecíolos con agua estéril y se los trasvaso a un recipiente que contenía etanol al 70% durante un minuto, para volver a enjuagarlos con agua estéril.

Se probó diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio variando los tiempos de inmersión. Además se añadió dos gotas de tween 20 por cada 100 mL

de solución de hipoclorito de sodio como agente detergente. Se realizó un diseño experimental con ocho tratamientos y 10 repeticiones (Tabla 2.1). Se evaluaron porcentajes de contaminación y necrosis a causa de contaminación y efecto del hipoclorito de sodio. Todos los análisis estadísticos se los realizó en el paquete informático SPSS 15.0.

Tabla 2.1 Tratamientos de desinfección aplicados a los pecíolos de piñón.

Tratamientos	NaClO %	Tiempo de inmersión (minutos)
1	0.6	10
2	0.6	15
3	1.2	10
4	1.2	15
5	1.5	10
6	1.5	15
7	1.6	10
8	1.6	15

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

Para la inducción de callos embriogénicos se utilizó como medio base las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), preparadas mediante soluciones stock (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), establecido por stocks

Stock	Sales	Concentración g.L <sup>-1</sup>	Vol. A usar ml.L <sup>-1</sup>
I	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> KNO <sub>3</sub>	82.5 95	20
II	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	37 2.23 0.86 0.0025	10
III	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O KI CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	44 0.083 0.0025	10
IV	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	17 0.62 0.025	10
V	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> EDTA	2.784 3.724	10

Todas las soluciones fueron aforadas con agua destilada estéril, así como la de vitaminas (Tabla 2.3) y la biorreguladores de crecimiento y mantenidas en refrigeración a 4 °C.

Tabla 2.3 Vitaminas de Murashige y Skoog (1962).

Vitaminas	Concentración mg.L <sup>-1</sup>
Tiamina-HCl	0.1
Piridoxina-HCl	0.5
Ácido Nicotínico	0.5
Glicina	2
Mioinositol	100

A lo largo de la investigación se probaron varios tratamientos para la inducción de callo embriónico, utilizándose diferentes concentraciones de

citoquinas combinadas con diferentes concentraciones de auxina (Tabla 2.4) (Moncada, 1997; Jha *et al.*, 2007).

Tabla 2.4 Tratamientos preliminares para la inducción de callo embriogénico

Biorreguladores	T 1 mg.L <sup>-1</sup>			T 2 mg.L <sup>-1</sup>						T 4 mg.L <sup>-1</sup>	T 5 mg.L <sup>-1</sup>	T 6 mg.L <sup>-1</sup>
	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6			
Kinetina	2.5	2.5										
BAP				5.3		5.3	2.7	8	2.7	2	3	0.5
2-4D					0.7	0.7	0.3	0.3	1			2.5
BA			2.5									
AIA											1	
AIB	0.5											

BAP, benzilaminopurina; 2-4D, ácido 2-4 diclorofenoxiacético; BA, benziladenina; AIA, ácido indol acético; AIB, ácido indol butírico.

Una vez identificado los biorreguladores y sus concentraciones, se procedió a realizar los diferentes tratamientos como se puede observar en el Anexo A. Para lo cual se probaron 3 concentraciones de BAP combinadas con 2 de AIA dando un total de 6 tratamientos más un control (Tabla 2.5) donde se evaluó el área de callo formada y sobrevivencia del tejido al medio de cultivo. Todos los análisis estadísticos se los realizó en el paquete informático SPSS 15.0.

Tabla 2.5 Tratamientos para la inducción y multiplicación de callo embriogénico.

Tratamientos	BAP mg.L <sup>-1</sup>	AIA mg.L <sup>-1</sup>
1	1.5	1
2	1.5	2
3	3	1
4	3	2
5	3.8	1
6	3.8	2
Control	0	0

Como fuente carbono se utilizó sacarosa en una concentración de 30 g/L, se ajustó el pH a 5.7 con soluciones de HCL 1 N y NaOH 1N y como agente endurecedor se utilizó bacto agar a una concentración de 5.5 g/L. Una vez listos los medios de cultivo se procedieron a autoclavarlos durante 25 min a 120°C y a una presión de 2 kg.cm<sup>-2</sup>

Para la siembra del material vegetal (pecíolos de las hojas) se lo realizó en una cámara de flujo horizontal, la cual se la desinfectó con una solución de etanol al 70 % y posteriormente con radiación ultravioleta, por un período de 20 a 30 min. Los instrumentos de manipulación para la siembra (pinzas y bisturí) fueron esterilizados en una estufa a 150 °C durante una hora. El tamaño aproximado de los pecíolos para la siembra fue de 2 cm de largo como se observa en la Figura 2.2. A los pecíolos se los sumergió en el medio con la superficie abaxial en contacto con el mismo (Lara *et al.*, 2003).



Figura 2.2 Pecíolos de *Jatropha curcas* desinfectados en la cámara de flujo laminar horizontal listos para ser sembrados.

El material que se sembró se lo colocó en estanterías metálicas en un cuarto de crecimiento en condiciones controladas, a una temperatura de 25±3 °C,

humedad relativa de  $65\pm 5\%$  y un foto período de 14 horas de luz con una intensidad lumínica de aproximadamente 2000 luxes como se muestra en la Figura 2.3.



Figura 2.3 Cultivo de pecíolos de *Jatropha curcas* en la sala de crecimiento del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales ESPE.

Para cuantificar la variable formación y proliferación de callo se utilizó una cinta de papel graduada en 0.5 cm, la cual nos proporcionó de flexibilidad y ajuste muy aproximado en las medidas para obtener el área de callo formada como se observa Figura 2.4. Se analizó el área de callo producida a los 18, 27 y 41 días de crecimiento.

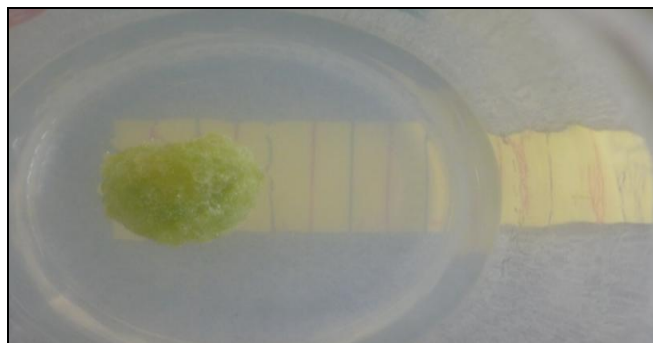


Figura 2.4 Callo medido con cinta graduada en 0.5 cm para determinar el área.



También, se evaluó el porcentaje de necrosis a causa del medio de cultivo. Todos los análisis estadísticos se los realizó en el paquete informático SPSS 15.0.

### 2.4.3 Maduración de los embriones somáticos

Después de 8 semanas de la siembra se observó el apareamiento de estructuras embrionarias en los callos embriogénicos, este material vegetal fue cambiado a otro medio de cultivo que ayudó a formar y madurar los embriones somáticos para lo cual se probó cuatro tratamientos, variando la fuente de nitrógeno orgánico y la concentración de ácido giberélico (Tabla 2.6). Como medio base se utilizó Murashige y Skoog (1962) a la mitad de su concentración se colocó además 0.1 mg.L<sup>-1</sup>de ácido indol acético, 0.8 mg.L<sup>-1</sup>de benzilaminopurina, 2.5 mg.L<sup>-1</sup>sulfato de adenina, 40 g.L<sup>-1</sup>de sacarosa y como agente solidificante fita-gel al 1.7% (Muñoz, 2003; Jha *et al.*, 2007; Sujatha *et al.*, 2008).

Tabla 2.6 Tratamientos de maduración embrionaria.

Tratamientos	GA <sub>3</sub> mg.L <sup>-1</sup>	Fuente de nitrógeno
1	1.5	Agua de coco (15%)
2	3	Agua de coco (15%)
3	1.5	Glutamina 250 mg.L <sup>-1</sup>
4	3	Glutamina 250 mg.L <sup>-1</sup>

Para identificar el mejor tratamiento se evaluó porcentaje de embriones desarrollados, necrosis del material y callo formado.

## 2.5 Análisis histológico de las estructuras embrionarias

Para realizar los cortes histológicos se procedió a seguir los siguientes pasos: selección del material vegetal, fijación del tejido embrionario, deshidratación, inclusión o parafinación, corte con micrótomo, montaje de las secciones, desparafinación y tinción y por ultimo observación al microscopio.

### 2.5.1 Selección y fijación del tejido embrionario

El primer paso en el protocolo fue identificar el tejido en el cual se observe el desarrollo de embriones somáticos en los cultivos establecidos, se eligió callo embriogénico de siete y ocho semanas de desarrollo que presentaba gran cantidad de brotes en diferentes estados de crecimiento, a continuación la muestra fue cuidadosamente seccionada utilizando un bisturí dejando pequeños cortes de al redor de  $0.5 \text{ mm}^3$  (Trigiano *et al.*, 2000). Posteriormente se procedió a fijar el material vegetal en una solución como se indica en la Tabla 2.7. Las pequeñas muestras seccionadas fueron sumergidas en un vaso de precipitación con esta solución fijadora durante 24 horas (Lara *et al.*, 2003).

Tabla 2.7 Solución fijadora para la preparación de muestras histológicas

Compuesto	Volumen (mL)
Alcohol etílico 95%	50
Ácido acético	5
Formaldehido 37%	10
Agua destilada	35

### 2.5.2 Deshidratación del tejido embrionario

Tradicionalmente en este proceso de deshidratación, se utiliza una serie de concentraciones de alcohol. En esta etapa se colocó las pequeñas muestras vegetales fijadas, en varias concentraciones de alcohol etílico. Aumentando la

concentración de forma sucesiva con diferentes tiempos de inmersión como se indica en la tabla 2.8 (Lara *et al.*, 2003). Para lo cual se utilizó tubos de ensayo con un volumen de solución de 20 mL donde se colocaron cinco muestras por tubo. Finalmente las muestras fueron colocadas en xilol que también posee características deshidratantes durante 12 horas, además de ser un disolvente compatible con la parafina (Trigiano *et al.*, 2000).

Tabla 2.8 Soluciones de etanol para la etapa de deshidratación para las muestras de piñón.

Concentración de Etanol (%)	Tiempo de inmersión (horas)
50	4
70	4
70	12
95	4
95	12
100	4
100	12
100	12

### 2.5.3 Parafinación del tejido embrionario

Una vez que se deshidrató las muestras se las colocó en una solución 1:1 de parafina-xilol durante 24 horas y se incubó a 60 °C. A la mañana siguiente se cambió las pequeñas muestras a otro vaso de precipitación con parafina dejándolo otras 24 horas a una temperatura de incubación de 60 °C, y finalmente se volvió a cambiar de parafina dejando 24 horas más a 60 °C, con lo cual se garantiza que la parafina se incluya de manera eficiente en el tejido lo cual nos garantizó una homogeneidad en la delgada lamina de tejido obtenida en el corte realizado con el micrótomo (Lara *et al.*, 2003).

Trascurrida la inclusión o infiltración de la parafina en el tejido, se procedió a formar los moldes para colocar la parafina diluida con las muestras vegetales, para lo cual se realizó moldes de papel de forma de un paralelepípedo. Es importante visualizar el plano exacto de la sección deseada donde se quiere realizar el corte, por lo cual se colocó de forma perpendicular en la base del molde, donde se posiciono el callo embriogénico con los brotes organogénicos y embriogénicos como se observa en la Figura 2.5, teniendo mucho cuidado de que permanezcan en el sitio deseado. Una vez orientada la muestra en el lugar requerido se transfirió rápidamente los moldes de papel a una superficie metálica fría para inmovilizar lo más rápido posible la parafina caliente (Trigiano *et al.*, 2000).



Figura 2.5 Bloques de parafina con las muestras vegetales de piñón.

#### **2.5.4 Corte con micrótopo del tejido embrionario**

Una vez formados los bloques de parafina, con ayuda de una navaja caliente se igualaron los lados del bloque dejando una estructura regular y simétrica para luego ser montados al micrótopo y comenzar el seccionamiento. A

continuación se procedió a realizar el seccionamiento de las muestras, en un micrótopo marca Reichert-Jung 2030. Para lo cual se inició verificando que la cuchilla del micrótopo se encuentre bien fila, se ajusto el ángulo de la cuchilla a 10°, se regulo las posiciones del porta muestras como se observa en la Figura 2.6 y se procedió a establecer el grosor del corte el cual fue de 7 a 13µm. Finalmente se realizó los cortes de los bloques con las muestras, obteniendo pequeñas láminas de tejidos (Trigiano *et al.*, 2000).

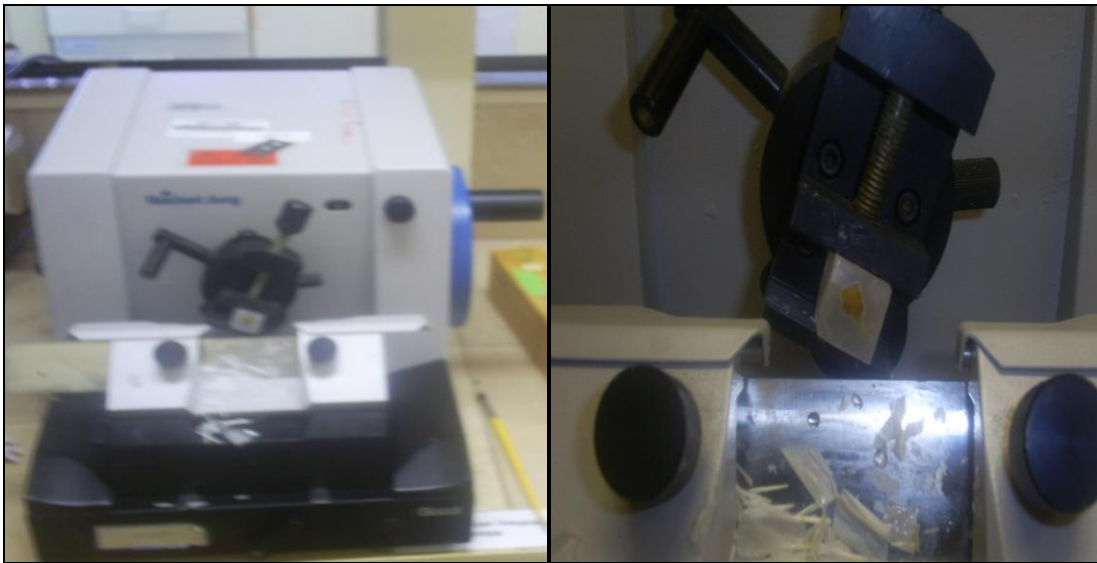


Figura 2.6 Bloques de parafina en el micrótopo para realizar cortes histológicos.

### 2.5.5 Montaje de las secciones cortadas

Una vez obtenido los cortes, las finas laminas de parafina se las colocó en un recipiente con agua fría, después las pequeñas laminas se las transfirió a otro recipiente de agua a una temperatura de 40 °C y finalmente se las monto en un porta objetos, teniendo cuidado de que no se destruyan o doblen. Previamente con ayuda de un pincel se extendió un adhesivo (Haupt) en toda la superficie del porta objetos lo cual fijaba las muestra (Lara *et al.*, 2003).

## 2.5.6 Desparafinación y tinción de las muestras

Una vez colocadas muestras en los porta objetos se procedió con la etapa de desparafinación, la cual consiste en extraer la parafina que se encuentra infiltrada o incluida en las pequeñas laminas de tejido seccionado. En un pequeño recipiente se colocó las placas con las muestras en una solución de xilol durante 15 min para diluir la parafina. A continuación se procedió a hidratar la muestra utilizando concentraciones de alcohol etílico en una escale ascendente para poder realizar la tinción con safranina como se puede observar en la tabla 2.9 (Lara *et al*, 2003).

Tabla 2.9 Pasos para la desparafinación y tinción de las muestras de piñón

Compuestos	Tiempos de inmersión
Xilol	15 minutos
Etanol 95%	3 minutos
Etanol 70%	3 minutos
Etanol 50%	3 minutos
Safranina	24 horas
Etanol-HCl (2:1)	3 segundos
Agua destilada	3 minutos
Etanol 50%	3 minutos
Etanol 70%	5 minutos
Etanol 95%	3 minutos
Etanol 100%	3 minutos
Fast Blue	30 segundos
Etanol 100%	3 minutos

Para la tinción se aplicó el método de safranina – fast blue (Lara *et al*, 2003). El cual consistió en sumergir las placas con las muestras en una solución de safranina 1:1 en agua destilada durante 24 horas, permitiendo así el ingreso del colorante al tejido. Posteriormente se pasó las placas a un recipiente que

contenía una solución 2:1 de etanol – HCl para quitar el exceso de safranina. A continuación se procedió a deshidratar de nuevo el tejido en soluciones de etanol en una escala ascendentes. Finalmente se colocó las placas en el colorante fast-blue el cual proporciona contraste en las muestras (Lara *et al*, 2003).

Una vez teñido y retirado el exceso de colorante con una solución de etanol al 100% con ayuda de papel absorbente se secó la placa, inmediatamente se tapó las muestras con el cubre objetos y se las selló. A continuación se las observó al microscopio óptico.

### **2.5.7 Observación al microscopio de las placas**

Una vez listas las muestras se las observó en un microscopio Olympus BX41 y las fotografías se tomaron con una cámara digital Olympus de 10.1 megapíxeles incorporada al microscopio. Para la observación se colocó las placas en la platina del microscopio y se comenzó enfocando con el lente de menor aumento hasta llegar al de mayor aumento según las necesidades de la observación. El método de tinción nos permitió identificar las diferentes estructuras del tejido analizado. La safranina hizo aparecer de rojo brillante las estructuras: núcleos, cromosomas, paredes cutinizadas y lignificadas, mientras que el fast-blue coloreó de azul brillante el citoplasma y las paredes de la celulosa (Lara *et al*, 2003).