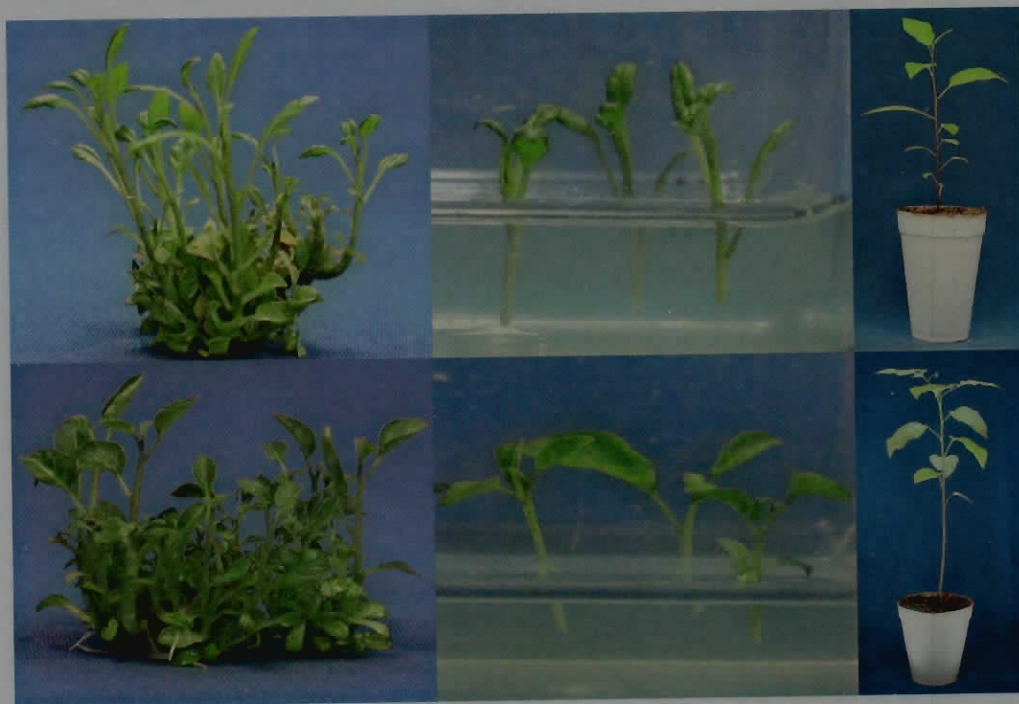


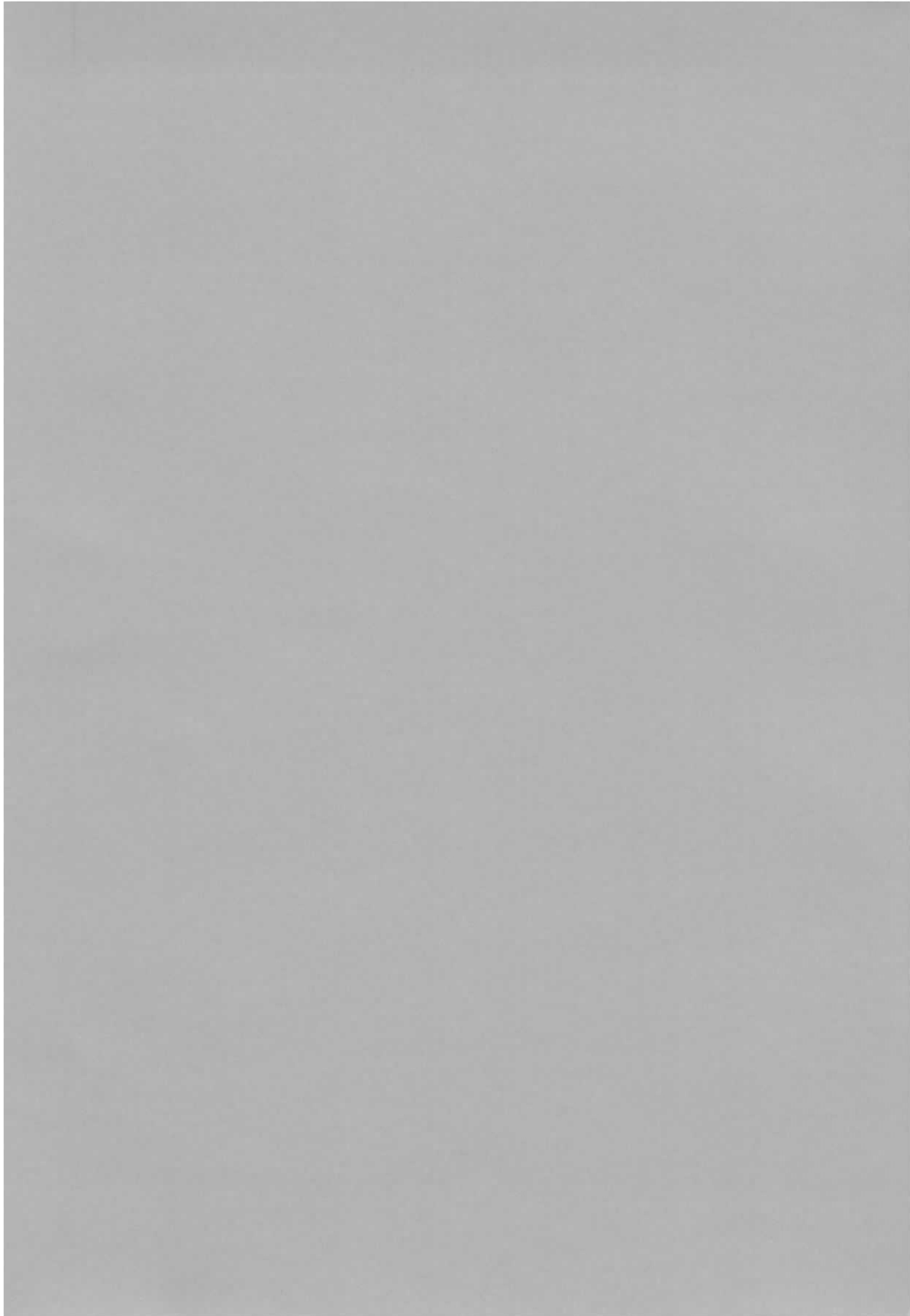
MAESTRÍA EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Regeneración *in vitro* de dos especies silvestres del género *Solanum* (*S. americanum* y *S. donianum*)



Angel Virgilio Domínguez May

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.



POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

REGENERACION *in vitro* DE DOS ESPECIES SILVESTRES DEL
GENERO *Solanum* (*S. americanum* y *S. donianum*)

Tesis que presenta para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Angel Virgilio Domínguez May

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México.
2008



CONTENIDO

Agradecimientos	i
Dedicatoria	ii
Lista de cuadros	iii
Lista de figuras	iv
Lista de abreviaturas	v
Resumen	vi
Abstract	vii
Introducción	1
Bibliografía	2
CAPITULO I. ANTECEDENTES	3
1.1. Solanáceas	3
1.1.1. Importancia	3
1.2. Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV).	4
1.3. Trabajos previos sobre la regeneración <i>in vitro</i>	6
1.4. Hipótesis y Objetivos	8
1.4.1. Hipótesis	8
1.4.2. Objetivo general	8
1.4.3. Objetivos específicos	8
1.5. Bibliografía	9
CAPITULO II. DESARROLLO DEL PROTOCOLO PARA LA MORFOGENESIS <i>in vitro</i> de <i>Solanum americanum</i>	13
2.1. Introducción	13
2.2. Bibliografía	15
2.3 Materiales y métodos	16
2.3.1. Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i>	16
2.3.2. Propagación clonal	16
2.3.3 Inducción de brotes	16
2.3.4. Elongación	17
2.3.5. Enraizamiento	17
2.3.6. Adaptación en condiciones de invernadero	17
2.3.7. Comparación de inducción de brotes de <i>S. americanum</i> con BAP y ZEA	17
2.4. Resultados	18
2.4.1. Propagación clonal	18
2.4.2. Inducción de brotes	19
2.4.3. Elongación	23
2.4.4. Enraizamiento	23
2.4.5. Adaptación en condiciones de invernadero	25
2.4.6. Comparación de inducción de brotes de <i>S. americanum</i> con BAP y ZEA	26
2.5. Discusión	29

2.5.1 Propagación	29
2.5.2 Inducción de brotes	29
2.5.3. Elongación	30
2.5.4. Enraizamiento	30
2.5.5. Adaptación en condiciones de invernadero	30
2.5.6. Comparación de brotes de <i>S. americanum</i> con BAP y ZEA	30
2.6. El protocolo para la regeneración <i>in vitro</i> de <i>Solanum americanum</i>	32
2.7. Bibliografía	33
CAPITULO III. DESARROLLO DEL PROTOCOLO PARA LA MORFOGENESIS <i>in vitro</i> de <i>Solanum donianum</i>	35
3.1. Introducción	35
3.2 Bibliografía	36
3.3. Materiales y métodos	37
3.3.1. Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i>	37
3.3.2. Propagación clonal	37
3.3.3. Inducción de brotes	37
3.3.4. Elongación	38
3.3.5. Enraizamiento	38
3.3.6. Adaptación en condiciones de invernadero	38
3.3.7. Comparación de inducción brotes de <i>S. donianum</i> con BAP y ZEA	38
3.4. Resultados	39
3.4.1. Propagación clonal <i>in vitro</i>	39
3.4.2. Inducción de brotes	40
3.4.3. Elongación	44
3.4.4. Enraizamiento	44
3.4.5. Adaptación en condiciones de invernadero	46
3.4.6. Comparación de inducción de brotes de <i>S. donianum</i> con BAP y ZEA	47
3.5. Discusión	49
3.5.1. Propagación clonal <i>in vitro</i>	49
3.5.2. Inducción de brotes	49
3.5.3. Elongación	50
3.5.4. Enraizamiento	50
3.5.5. Adaptación en condiciones de invernadero	50
3.5.6. Comparación de brotes de <i>S. donianum</i> con BAP y ZEA	50
3.6. El protocolo para la regeneración <i>in vitro</i> de <i>S. donianum</i>	52
3.7. Bibliografía	53
CAPITULO IV. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	55

4.1. Conclusiones generales	55
4.2. Perspectivas	56
Anexo 1	57
Medio de Murashige y Skoog	



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca, la cual me permitió estudiar el postgrado (No. de registro 200010)

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por haberme permitido estudiar la maestría y darme las herramientas necesarias.

A la Dra. Aileen O' Connor Sánchez por aceptarme en su laboratorio, por su paciencia en los momentos más críticos de mi vida y por todo su apoyo durante la realización de la tesis.

A la Dra. Blondy Canto Canché por todo su apoyo en mi trabajo de tesis.

Al Dr. Tomás González Estrada por ayudarme en la parte estadística para calcular los datos de mi trabajo.

A la Dra. Nancy Santana Buzzy por ayudarme en la revisión de mi trabajo de tesis.

Al Dr. Yuri Peña por sus recomendaciones sobre algunos puntos críticos en el contenido de mi trabajo de tesis

A la Dra. Virginia Herrera Valencia por prestarme la computadora para escribir mi trabajo.

A la Q.F.A Ileana Cecilia Borges Argáez por todo su apoyo técnico en la parte experimental de mi trabajo.

Al Biol. Felipe Barredo por sus consejos en la parte experimental.

Al Q.F.B. Miguel Keb Llañes, también, por sus consejos en la escritura de mi tesis.

Al Ing. agrónomo José Luis Chan Rodríguez por permitirme realizar los experimentos en el laboratorio de clonal.

Al M.C. Miguel Alonso Tzec Simá por sus consejos en la parte teórica de mi trabajo de tesis

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido alcanzar mis metas en esta vida

A mis padres, José y Adela, por todo su apoyo, consejos y cariño durante todos estos años, porque sin ellos no habría podido alcanzar mis sueños, el de tener una educación y una nueva oportunidad para vivir.

A cada uno de mis hermanos, especialmente a Elvia, Ezequiel, Eleazar y William por hacer posible mi educación, y su apoyo incansable.

A mis tíos, especialmente a Santiago, Felipe y Renán por todo su apoyo.

A Fabiola, por toda su ayuda, cariño y su amor en los momentos más bonitos y difíciles de mi vida, y por apoyarme durante la realización de mi tesis.



LISTA DE TABLAS

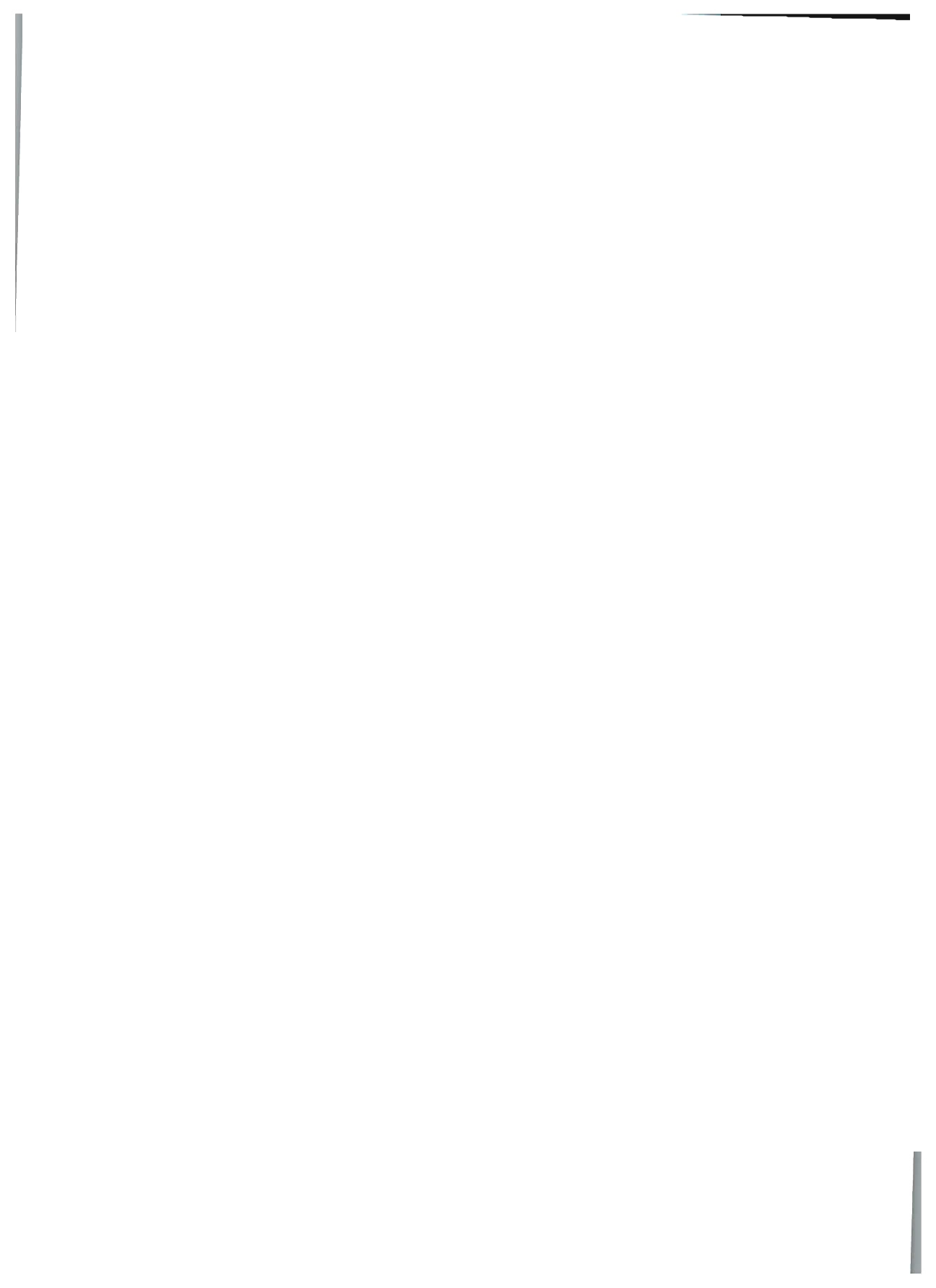
Tabla

1.1	Reportes sobre la inducción de brotes de varias especies del género <i>Solanum</i>	6
2.1	Porcentaje de micropropagación de plántulas completas a los 21 días a partir de nudos	18
2.2	Número promedio de brotes/explante inducidos, bajo diferentes concentraciones de ZEA y ANA a partir de explantes de hoja de <i>S. americanum</i>	22
2.3	Número promedio de brotes/explante que se obtuvieron con los 6 mejores tratamientos	23
2.4	Número promedio de brotes elongados por explante	23
2.5	Reproducibilidad en tiempo del protocolo de enraizamiento <i>in vitro</i> de los brotes aislados de <i>S. americanum</i>	24
2.6	Reproducibilidad del protocolo de adaptación de las plántulas de <i>S. americanum</i> en invernadero	25
2.7a	No. promedio de brotes por explante tratados con ZEA y ANA de <i>S. americanum</i>	27
2.7b	No. promedio de brotes por explante tratados con BAP y ANA de <i>S. americanum</i>	28
3.1	Porcentaje de nudos que formaron plántulas a los 47 días después de la siembra <i>in vitro</i>	39
3.2	Número promedio de brotes/explante inducidos bajo diferentes concentraciones de ZEA y ANA a partir de explantes de hoja de <i>S. donianum</i>	42
3.3	Número promedio de brotes/explante que se obtuvieron con los dos mejores tratamientos	43
3.4	Número promedio de brotes elongados por explante	44
3.5	Reproducibilidad del protocolo de enraizamiento de los brotes de <i>Solanum donianum</i> en el tiempo	46
3.6	Porcentaje de sobrevivencia de las plántulas bajo condiciones de invernadero	47

LISTA DE FIGURAS

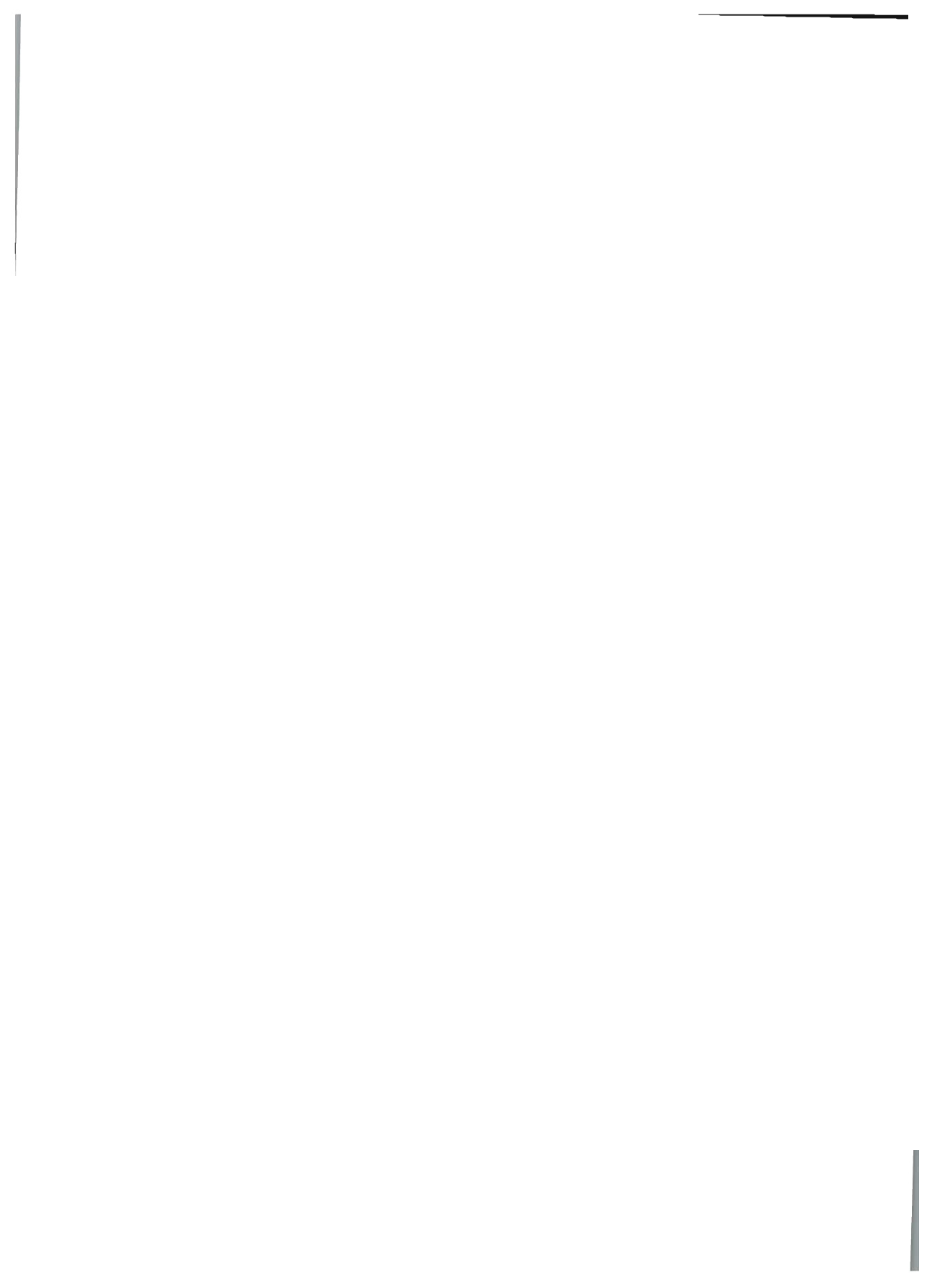
Figura

2.1	Adaptación y producción de <i>Solanum americanum</i>	14
2.2	Multiplicación de plántulas de <i>S. americanum</i>	18
2.3	Inducción de brotes de <i>Solanum americanum</i> , a partir de discos de hoja, en medio de cultivo MS suplementado con distintas combinaciones ZEA y ANA	20
2.4	Proceso de regeneración <i>in vitro</i> de <i>Solanum americanum</i>	21
2.5	Proceso de enraizamiento <i>in vitro</i> de brotes de <i>Solanum americanum</i>	24
2.6	Plántulas en condiciones de invernadero de <i>Solanum americanum</i>	25
2.7	Comparación de inducción de brotes de <i>S. americanum</i> con BAP y ZEA	26
2.8	El protocolo para la regeneración <i>in vitro</i> de <i>S. americanum</i>	32
3.1	Adaptación y producción de <i>Solanum donianum</i>	35
3.2	Multiplicación de plántulas de <i>Solanum donianum</i>	39
3.3	Inducción de brotes de <i>Solanum donianum</i> , con distintas combinaciones de fitohormonas en medio MS, suplementado con ZEA y ANA	41
3.4	Proceso de regeneración <i>in vitro</i> de <i>S. donianum</i>	43
3.5	Organogénesis directa a partir de tejido foliar de <i>S. donianum</i>	45
3.6	Plantas en condiciones de invernadero de <i>Solanum donianum</i>	46
3.7	Comparación de inducción de brotes de <i>S. donianum</i> con BAP y ZEA	48
3.8	El protocolo para la regeneración <i>in vitro</i> de <i>S. donianum</i>	52



LISTA DE ABREVIATURAS

O	Organogénesis
OI	Organogénesis indirecta
OD	Organogénesis directa
ES	Embriogénesis somática
ESI	Embriogénesis somática indirecta
ZEA	Zeatina
ANA	Acido naftalenacético
h	Horas
RCV	Reguladores de Crecimiento Vegetal
S.	<i>Solanum</i>
BAP	6-Bencilaminopurina o benciladenina
MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog
H ₁	Hoja 1
H ₂	Hoja 2
H ₃	Hoja 3
No.	Número



RESUMEN

La Solanácea es una familia de plantas que incluye una gran variedad de especies distribuidas en todo el mundo. Muchas de ellas tienen relevancia económica y son importantes como alimento en varias ciudades; otras son utilizadas como hierbas medicinales. Las especies silvestres pueden ser una fuente de genes para resolver algunos problemas de cultivares domesticados. *Solanum americanum* y *Solanum donianum* son dos especies silvestres que pueden ser encontrados en varias partes de la república mexicana y en otras naciones.

En la península de Yucatán estas especies viven en suelos inundables con agua de mar, por lo que probablemente sean fuentes potenciales de genes de interés biotecnológico. El análisis de estos genes puede hacerse usando transformación genética, la cual requiere de un sistema para la regeneración *in vitro*

Desde hace 20 años, muchas especies del género *Solanum* han sido regeneradas a través de técnicas de cultivo de tejidos, y varios protocolos de transformación genética están disponibles. La mayoría de los trabajos sobre la regeneración de este género han sido mediante la organogénesis para desarrollar brotes y regenerar plantas completas.

No hay reportes sobre la regeneración *in vitro* de *Solanum americanum* y *Solanum donianum*. El objetivo de este trabajo fue estandarizar las condiciones para la regeneración *in vitro* de estas especies. Una clona de cada una fue micropropagada por nudos y diferentes composiciones de medio de cultivo fueron probados por su capacidad para inducir la regeneración de brotes a partir de discos de hoja.

Para *Solanum americanum*, la mejor formulación para inducir la formación de brotes fue MS+2 mg/l ZEA +0.02 mg/l ANA, y la formulación para la elongación y enraizamiento fue MS basal sin reguladores de crecimiento vegetal. Mientras que para *Solanum donianum*, la mejor formulación fue MS+3 mg/l ZEA, y para la elongación y enraizamiento fue MS basal sin reguladores de crecimiento vegetal. En ambas especies, el 100% de las plántulas fueron adaptadas exitosamente a condiciones *ex vitro*, usando una mezcla de agrolita, pit-muss y tierra roja (1:1:1).

Los protocolos desarrollados en este trabajo para regenerar, elongar, enraizar, y adaptar plantas a condiciones *ex vitro*, en las dos especies probadas son fáciles de manejar, y demostraron ser robustos y reproducibles.



ABSTRACT

Solanaceae is a family of plants that includes a large variety of species distributed world wide. Many of them have economic relevance and are important as food in several countries; others are used as medicinal herbs. The wild species might be a source of genes to solve some problems of domesticates cultivares. *Solanum americanum* and *Solanum donianum* are two wild species that can be found in several parts of the Mexicana republic and in other countries.

In the peninsula of Yucatán these species live on sea-water inundable lands, thus they are potential sources of genes of biotechnological interest. The analysis of those genes can be made using genetic transformation, which requires of a system for regeneration *in vitro*.

Since 20 years ago, many species of the genus *Solanum* have been regenerated throw *in vitro* tissue culture techniques, and several genetic transformation protocols are available. Most of the works about regeneration of these genera, have been throw organogenesis to develop shoots and regenerate complete plants.

There are no reports about *in vitro* regeneration of *Solanum americanum* and *Solanum donianum*. The objective of this work was to standardize the conditions for *in vitro* regeneration of these species. One clone of each was micropropagated by knots and different concentrations of culture media were tested for their capacity to induce shoot regeneration from leaf discs.

For *Solanum americanum*, the best formulation to induce shoot formation was MS + 2 mg/l ZEA + 0.02 mg/l ANA, and the formulation for elongation and rooting was basal MS without plant growth regulators. Whereas for *Solanum donianum*, the best formulation to induce shoot formation was MS + 3 mg/l ZEA, and the formulation for elongation and rooting was basal MS without plant growth regulators. In both species, 100% of *in vitro* plants were adapted successfully to *ex vitro* conditions, using a mixture of agrolita, pit-muss and red soil (1:1:1).

The protocols developed in this work to regenerate, elongate, root y adapt plant to *ex vitro* conditions in the two tested species are easy to handle and demonstrated to be robust and reproducible.

INTRODUCCIÓN

El género *Solanum*, es el más diverso de las Solanáceas, cuenta aproximadamente con 1500 especies (Granados-Tochey, et al., 2005) las cuales pueden ser árboles, arbustos, trepadoras o hierbas. Es uno de los géneros más grandes de plantas con flores, distribuidas en todos los continentes, pero mejor representado en América tropical: 53 especies en Nicaragua (Stevens, et al., 2001); en México se han reportado 150 especies, y sólo 10 adicionales en los Estados Unidos. Existen 64 especies de este género en Veracruz, que se localizan en todos los hábitats, desde los más secos hasta los más húmedos, desde el nivel del mar hasta por lo menos los 3500 metros (Nee, 1993). Desafortunadamente en el género *Solanum*, en particular la papa, la belladona y el tomate son atacadas como muchas otras plantas, por virus, hongos, insectos y factores abióticos que de alguna manera reducen su crecimiento y producción (Salinas García et al., 2001).

Algunas de las especies silvestres de *Solanum* son tolerantes a factores que comúnmente atacan a plantas cultivadas, por lo tanto, posiblemente sean una fuente de genes, y se les considera una de las opciones para mejorar cultivos importantes con problemas actuales, ya que de ellos dependemos nuestra alimentación y sobrevivencia (Fári et al., 1995; Bhatia et al., 2004).

En lo particular, con *Solanum americanum* que es nuestra primera especie de interés; es una planta que se distribuye en la parte sur de los Estados Unidos y gran parte de México; Guatemala hasta Panamá, Sudamérica y en muchas de las zonas tropicales del viejo Mundo (Nee, 1993). Forman flores y frutos de febrero a mayo, y de agosto a diciembre, y es una planta silvestre que se utiliza para tratar distintas enfermedades en el ser humano (González, 2006). Otra especie silvestre con la que se trabajó es *Solanum donianum*, la cual crece en bosques bajos del Petén en Honduras, en el Sur de Florida, Bahamas, y en el Sur de México. Esta planta también es llamada *Solanum blodgettii* (Gentry et al., 1974). Es un tipo de arbusto que crece también en selva baja subperennifolia, en manglares y en potreros del municipio de Tenabo, Campeche, México (Zamora -Crecencio, 2003) y da flores todo el año (Coile et al., 2003).

En el estado de Yucatán se han visto que estas dos especies crecen en ambientes salinos (cerca de los manglares), lo que las hacen interesantes para estudios biotecnológicos, ya que posiblemente sean una fuente de genes para tolerancia a la salinidad, lo que serviría a futuro para mejorar genéticamente muchos de los cultivos de importancia agrícola afectados por la salinización de suelos.

BIBLIOGRAFÍA

Gentry Johnnie L., Jr y Standley Paul C. (1974). Flora de Guatemala. Fieldiana, pp. 107-108

Nee Michael. (1993). Flora de Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones sobre recursos bióticos, Xalapa, Veracruz, México. pp. 1-2.

Fári Miklós, Nagy István, Csányi Marta, Mitykó Judit y Andrásfalvy Andrés. (1995). Agrobacterium mediated genetic transformation and plant regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis from cotyledon leaves in eggplant (*Solanum melongena* L. cv. "kecskeméti lila"). Plant Cell Reports. 15. pp. 82-86.

Stevens W.D., Ulloa Ulloa Carmen, Pool Amy and Montiel Olga Martha. (2001). Flora de Nicaragua (Angiospermas, Pandanaceae-Zygophyllaceae). Missouri Botanical Garden Press. pp. 2403 y 2409. Volumen 85. Tomo III.

Coile Nancy C. y Garland Mark A. (2003). Notes on Florida's endangered and threatened plants. Plant industry. 4 th edition. pp. 1-127.

Zamora Crescencio Pedro (2003). Contribución al estudio Florístico y Descripción de la Vegetación del Municipio de Tenabo, Campeche, México. Polibotánica, N° 15, pp. 1-40.

Akbar Anjun Muhammad y Ali Hakoomat (2004). Effect of culture Médium on Direct Organogenesis from Different Explants of Various Potato Genotypes. Biotechnology. Vol. 3(2), pp. 187-193.

Bhatia Poonam, Ashwath Nanjappa, Senaratna Tissa y Midmore David (2004). Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicum esculentum*). Plant cell, tissue and organ culture. 78. pp. 1-21.

Granados Tochoy Juan Carlos y Orozco-P Clara. (2005). Novedades Corològicas y Morfològicas en *Solanum* sección Geminata (Solanaceae). Caldasia. 27(1):1-16.

González José. (2006). Flora Digital de la Selva. Organización para Estudios Vegetales. pp. 1-21.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

1.1.SOLANACEAS

1.1.1. Importancia

Las Solanáceas son una familia de plantas, que comprenden muchas especies de gran relevancia comercial, cultural y nutritiva (dos Reis et al., 2002). Según Knapp y sus colegas en el 2004, la familia *Solanaceae* tiene aproximadamente 90 géneros y más de 3000 especies, casi la mitad de las cuales pertenecen al género *Solanum*. Las especies que conforman esta familia son muy diversas en tamaño, van desde hierbas hasta árboles, pueden ser herbáceas o leñosas, algunas veces inermes o con espinas. Presentan hojas alternas, algunas veces en pares, simples y enteras; generalmente con pecíolos y no tienen estípulas. Sus Inflorescencias son laterales y opuestas a las hojas, algunas veces reducidas a una sola flor; flores unisexuales; cáliz campanulado a tubular y el limbo generalmente plegado. Presentan frutos en bayas o encapsulados, raramente drupáceos; cuentan con numerosas semillas, prismáticas o comprimidas, la testa frecuentemente foveolada (Nee, 1986). Se distribuyen en las zonas tropicales, subtropicales y templadas del mundo, localizándose principalmente en las zonas tropicales de América del Sur, pero están ausentes en las regiones árticas (González, 2006).

Dentro de la familia de las Solanáceas existen especies de gran importancia en la alimentación. Algunas de ellas como la papa, el tomate, la berenjena, y el tabaco son plantas importantes para el ser humano (Knapp et al., 2004). La berenjena es una planta importante agrónomicamente, es nativa de India y China. Sus frutos son deliciosos y muy nutritivos, varias partes de esta planta son usadas para tratar enfermedades como la diabetes, artritis, la bronquitis y el asma (Magioli, 2005). Según Feican (1999), otro de los cultivos que representa importancia alimenticia, es el tomate de árbol, el cual es uno de los cultivos más difundidos en el mundo. Sus frutos son ricos en vitaminas y su jugo es usado para tratar la conjuntivitis en los ojos (González, 2006). En los cultivares de papa, como la criolla, son explotados comercialmente en Colombia, donde se ha desarrollado un cultivar mejorado para contrarrestar problemas de sus enfermedades y plagas (Chaparro et al., 2004). Sus tubérculos son importantes en la dieta de muchas culturas en el mundo, las rodajas finas son usadas en los párpados antes de acostarse, para refrescar ojos irritados a causa de la exposición a alta intensidad luminosa. Otro de los cultivos de importancia nutricional es el chile picante, al natural o aderezados con vinagre, aceite o jugo de limón, se usa como condimento, y a la vez quita la falta de apetito, la diarrea, indigestiones, problemas cardíacos, y es recomendado para dolores musculares. En el caso del tabaco sus semillas son usadas para extraer un aceite con cantidades importantes de ácidos grasos, esenciales para el adecuado funcionamiento de células, ya que estos compuestos no son elaborados por el organismo. Las hojas de esta planta son utilizadas por sus cualidades narcóticas, eméticas e hipocárdicas (González., 2006).

Estas son algunas de las plantas importantes para el sustento de la economía y alimentación en el mundo, cabe mencionar que existen otras especies interesantes no solamente para la alimentación del ser humano sino también para la solución de los problemas que enfrentan actualmente los mismos cultivos al ser domesticados.

Es importante mencionar que la mayoría de las plantas agrícolas son afectadas por diversos problemas ocasionados principalmente por factores abióticos. Sin embargo, el factor más importante que amenaza actualmente el rendimiento de los cultivos, entre los cuales se incluyen algunas Solanáceas, es la salinización de los suelos (Wang Wangxia et al., 2003). En los últimos años, grandes extensiones de tierras cultivadas en el mundo, están siendo afectadas por la salinidad de suelos, se calcula que por minuto se pierden aproximadamente de al menos tres hectáreas de tierra cultivada (IPTRID et al., 2006). Desafortunadamente, el mal manejo del sistema de irrigación, es la principal causa de acumulación de sales en tierras cultivadas, y en consecuencia las plantas afectadas reducen su rendimiento en calidad y cantidad, ocasionando grandes pérdidas a los productores (Loureiro Soares et al., 2002). Dos de las estrategias que se han empleado para el control de la salinización de suelos en el noroeste de Tailandia es la utilización de variedades de plantas resistentes a sal y el uso de pozos poco profundos. Sin embargo con el primer método, se tuvo la desventaja de que no todas las plantas fueron aceptadas por casi la mitad de los agricultores con quienes fue realizado este proyecto, debido a la variedad y el costo de producción de este tipo de plantas, pero con esta estrategia fue posible un control de la salinidad, aunque no del todo. Por otra parte construyendo pozos de poca profundidad por hectárea no fue confiable ya que suelos libres de sales podrían ser afectadas por el transporte de agua subterránea (Im-Erb et al., 2004). Por lo que la nueva alternativa para solucionar el problema de la salinidad y de evitar esas desventajas ocasionadas, es el de generar plantas resistentes a la sal, y esto es posible mediante la transformación genética a través del manejo de tejidos vegetales bajo condiciones de laboratorio, para lo cual se necesita de contar con un sistema de regeneración *in vitro*.

1.2. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES (CTV)

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que sirven para el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas. El CTV es una herramienta que proporciona una serie de sistemas modelo para la investigación fisiológica, bioquímica, genética y estructural, y se aplica en prácticas de clonación, conservación y manipulación *in vitro* de cualquier material vegetal. Actualmente, se están realizando varios tipos de cultivo de tejidos; cultivo de plantas completas, de órganos, tejidos, cultivo de células y cocultivo.

De tomar en cuenta los principios básicos del CTV dependen el éxito o fracaso de cualquier trabajo en esta área. El primero de estos principios es la elección del explante. Este es el órgano, tejido o segmento de tejido vegetal que se utilizará para iniciar el cultivo; puede ser una semilla, un segmento de hoja, un embrión, tallo, un

cotiledón, entre otros. Es importante tener en cuenta que el tipo de explante seleccionado, será determinante para obtener el tipo de respuesta deseada. El segundo principio es la elección del medio de cultivo y de las condiciones de cultivo. Tanto el medio de cultivo como el tipo de explante determinan la respuesta que se obtendrá. El medio de cultivo consiste en dos grupos: los primeros son los esenciales (minerales, la fuente de carbono y algunas vitaminas), aquellos que satisfacen los requerimientos nutricionales básicos del CTV. El segundo grupo, son los llamados opcionales (fitohormonas, la luz, fotoperiodo, temperatura y humedad) ya que no son indispensables para mantener la vida del tejido cultivado, pero sí determina el tipo de respuesta deseada; por lo tanto, de ellos dependen el éxito o fracaso del establecimiento y respuesta de los cultivos *in vitro*.

El último principio básico, es el establecimiento de las condiciones asépticas. Para que un cultivo de cualquier tejido prospere adecuadamente, no debe tener ningún tipo de organismo contaminante. Por lo tanto, para mantener el medio de cultivo bajo condición aséptica, debe ser esterilizado para evitar cualquier tipo de contaminante. Estos son los tres principios básicos del cultivo de tejidos vegetales que hay que tomar en cuenta, para poder tener éxito en proyectos en este campo. Es importante hacer mención que la inducción de brotes a partir de un tejido vegetal se puede realizar principalmente, de dos formas, por organogénesis y por embriogénesis somática. En el caso de la organogénesis *in vitro*, se refiere a la formación de novo de órganos en los explantes cultivados, y se basa en la totipotencialidad celular, es decir, que cada célula tiene toda la información genética necesaria para formar una planta completa o llevar a cabo las funciones de cualquier órgano o tejido vegetal. Sin embargo, en condiciones normales este potencial no se expresa, y es necesario tener las condiciones adecuadas para que la célula exprese su potencial. La organogénesis puede ser directa, que es cuando el brote se origina directamente del explante y la indirecta, cuando del explante se origina primero una masa de callos y de éste se forman los brotes. En el caso de la embriogénesis somática de igual forma puede ser directa o indirecta, solamente que en este proceso se formarán embriones somáticos. Estos embriones tienen, al igual que los cigóticos, la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación, con la diferencia de que la embriogénesis somática es un proceso asexual por lo que la nueva planta será exactamente igual a la donadora de la célula inicial. Entonces para lograr cualquiera de estos procesos se tomarán en cuenta el tipo de especie, el regulador de crecimiento vegetal y entre otros factores involucrados en la morfogénesis *in vitro* (Ramírez Malagón, et al., 1999).

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) tiene una importante aplicación en la conservación de germoplasmas, tales como cultivares vulnerables ante las plagas o cambios ambientales que actualmente no están amenazadas, pero en cualquier momento pueden ser sustituidos; cultivares caducos, que son genotipos que ya no son utilizados por haber sido sustituidos por otros mejorados; cepas reproductoras que nunca llegaron a utilizarse de manera intensiva, pero que sirvieron de progenitores de los cultivares modernos. Es aplicado también en la conservación de especies silvestres relacionadas con las cultivadas, entre otras (Ramírez Malagón, et al., 1999).

1.3. Trabajos previos sobre la regeneración *in vitro*

Muchas de las especies del género *Solanum* han sido regeneradas *in vitro* mediante organogénesis directa o a través de una fase de formación de callos, e incluso a través de la embriogénesis somática. Algunos de estos resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1.1. Reportes sobre la inducción de brotes de varias especies del género *Solanum*.

Especies	Explante	Regulador de crecimiento	Tipo de regeneración	Referencia
<i>Solanum carolinense</i> L.	Tallo	45 μM de 2,4 D + 13.94 μM de KIN	OI	Reynolds, 1986
<i>Solanum melongena</i> L.(Pusa Purple Long)	Hojas y cotiledón	10.7 μM de ANA	ES	Sharma et al;1995
<i>Solanum melongena</i> L.(Pusa Purple Long)	Hipocotilo	11.1 μM de BA + 2.9 μM de AIA	O	Sharma et al;1995
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Entrenudos	9.32 μM de BAP + 0.57 μM de AIA	OI	Opatma et al,1997
<i>Solanum melongena</i> L.	Hojas y cotiledón	0.6 μM de AIA +0.2 μM de TDZ	OI	Magioli et al;1998
<i>Solanum tuberosum</i> L.(<i>Désirée Negora, Superior</i>)	Hojas	0.11 μM de ANA + 5.69 μM de Zeatina + 0.11 μM de GA3	OI	M. et al;1998
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Hojas	0.9 μM de 2,4 D + 10 μM de BA; 10 μM de BA + 22.8 μM de Zeatina	ESI	Jayascre et al;2001
<i>Solanum trilobatum</i> L.	Entrenudos Nudos	22.20 μM de BAP + 0.27 μM de ANA; 22.20 μM de BAP+0.29 μM de AIA+ 9.84 μM IBA	OI,OD	Arockiasamy et al;2002
<i>Solanum esculentum</i>	Cotiledón	2.85 μM de AIA + 1.42 μM de Zeatina	OD	Cortina et al;2003

<i>Solanum melongena</i> L	Raíces	0.45 μ M de TDZ + 13.3 μ M de BA	OI	G. et al;2003
<i>Solanum tuberosum</i>	Entrenudos	5.69 μ M de Zeatina + 5.71 μ M de AIA	OI	Akbar et al;2004
<i>Solanum lycopersicum</i>	Hipocotilo	2.85 μ M de Zeatina + 0.57 μ M de AIA	O	Gubis et al;2004
<i>Solanum surattense</i>	Cotiledón y hojas	32.22 μ M de ANA + 2.22 μ M de BAP; 21.5 μ M de ANA + 2.22 μ M de BAP	ES	Swamy et al;2004
<i>Solanum phureja</i>	Entrenudos	1.07 μ M de ANA+7.10 μ M de Zeatina + 0.06 μ M de GA3;0.11 μ M de ANA + 7.10 μ M de Zeatina + 0.06 μ M de GA3	OI	M. et al; 2005
<i>Solanum tuberosum</i> L c.v (Shepody)	Hojas	5.37 μ M de ANA+ 2.85 μ M de Zeatina	OI	Gustafson et al;2006
<i>Solanum virginianum</i> L	Hojas	5.69 μ M de Zeatina + 0.57 μ M de AIA	OD	Borgato et al;2007

Con base en esta información sobre la regeneración *in vitro* de distintas especies del género *Solanum*, se diseñaron experimentos con la finalidad de establecer un protocolo de regeneración *in vitro* de *Solanum americanum* y *Solanum donianum*.

En este proyecto se trabajaron con técnicas de cultivo de tejidos con segmentos de hojas, para inducir brotes y regenerar plantas completas de *Solanum americanum* y *S. donianum*, esta decisión se tomó de acuerdo con los resultados obtenidos con explantes foliares en la inducción de brotes de algunas especies del género *Solanum* (Gustafson et al; 2006 y Borgato et al; 2007). Además, en trabajos realizados sobre la regeneración de *Solanum tuberosum*, se evaluaron distintos explantes, observando que las hojas formaban una mayor cantidad de brotes en comparación con los tuberculos y microtubérculos de esta planta (M. HAMDÍ et al., 1998). En lo particular, las hojas de *S. americanum* y *Solanum donianum* son más abundantes y fáciles de manejar que cualquier otra parte de estas especies, de allá fue el interés de probar la inducción de brotes a partir de explantes foliares.

1.4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1.4.1. HIPOTESIS

Dado que los fitoreguladores, tales como Zeatina y ácido naftalenacético se han empleado para regenerar plantas en muchas especies del género *Solanum*, entonces, la manipulación de estos fitoreguladores en el medio de regeneración *in vitro* puede inducir la formación de brotes y la regeneración de plantas de *Solanum americanum* y de *Solanum donianum*.

1.4.2. OBJETIVO GENERAL:

Establecer un protocolo para la regeneración *in vitro* de *Solanum americanum* y *Solanum donianum*.

1.4.3. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

Multiplicar material vegetal *in vitro* a partir de una clona de cada una de las especies de interés.

Evaluar la regeneración de explantes foliares bajo diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento.

Encontrar las condiciones adecuadas para la elongación y el enraizamiento de los brotes inducidos *in vitro*.

Encontrar las condiciones adecuadas para el establecimiento en invernadero de las plantas enraizadas, y determinar el porcentaje de sobrevivencia.

1.5. BIBLIOGRAFÍA

Gentry Johnnie L., Jr and Standley Paul C. (1974). Flora of Guatemala. Fieldiana: Botany Fiel Museum of Natural History. pp. 107- 108.

Nee Michael. (1986). Flora de Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones sobre recursos bióticos, Xalapa, Veracruz, México.pp.1-2.

Nee Michael. (1993). Flora de Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones sobre recursos bióticos, Xalapa, Veracruz, México.pp.1-2.

Feican, C. Encalada, C. Larriva, W. (1999).El Cultivo del Tomate de Árbol. Estación Experimental Chuquipata. Granja Experimental Bullcay. Programa de Fruticultura. Cuenca EC.pp.9, 26-45

Pérez Molphe Balch Eugenio Martín, Ramírez Malagón Rafael, Núñez Palenius Héctor Gordon and Ochoa Alejo Neftali. (1999). Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales Universidad Autónoma de Aguascalientes. Pp. 7-179.

Salinas García Gilberto Eduardo (2001). Impacto, Presente y Futuro de la Biotecnología en el Mejoramiento de Solanáceas. Universidad Autónoma de Nuevo León.pp. 1-12.

Stevens W.D., Ulloa Ulloa Carmen, Pool Amy and Montiel Olga Martha. (2001). Flora de Nicaragua (Angiospermas, Pandanaceae-Zygophyllaceae).Missouri Botanical Garden Press. pp. 2403 y 2409.Volumen 85.Tomo III.

Dos Reis Claudia, Gracias Sajo María das and Stehmann Joao Renato. (2002). Leaf structure and Taxonomy of petunia and Calibrachoa (Solanaceae). Brazilian Archives of biology and Technology. pp. 59-66.

Knapp Sandra. (2002). Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspectiva on fruti diversity in the Solanaceae. Journal of experimental Botany. pp 2001-2022, vol. 53, Nº. 377.

Wang Wangxia, Vinocur Basia, Altman Arie. (2003).Plant responses to drought, Salinity and extreme temperature: Towards genetic Engineering for stress tolerance.Planta.218:1-14.

Knapp Sandra, Bohs Lynn, Nee Michael and Spooner David M. (2004). Solanaceae - a model for Linking genomics with biodiversity. Comp Funct Genom.5:285-291.

Carbajal Bernal Diana Angélica, Chaparro Giraldo. (2004). Estudios orientados a la Transformación de la Papa Criolla (*Solanum phureja*) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Acta Biológica Colombiana, Vol.9 No.2.pp. 1

Granados Tochoy Juan Carlos y Orozco-P Clara. (2005). Novedades Corológicas y Morfológicas en *Solanum* sección Geminata (Solanaceae). Caldasia. 27(1):1-16.

Magioli Claudia y Mansur Elisabeth. (2005).Eggplant (*Solanum melongena* L.):tissue cultura, genetic transformation and use as an alternative model plant.Acta bot.bras.19(1):139-148.

Villaseñor Báez José Antonio. (2005). Lo mejor de lo mejor en frutas y hortalizas de México. SAGARPA. pp.3 -16.

González José. (2006).Flora Digital de la Selva. Organización para Estudios Vegetales. pp.1-21.

IPTRID y FAO. (2006). Conferencia electrónica sobre salinizacion. CISEAU. Pp. 1-6.

Gunay L. Alka y Rao P.S. (1986). Plant Regeneration from cultured Hypocotyl Explants of Diploid and Tetraploid *Solanum khasianum* Clarke. Plant Cell Reports, Vol.1, pp. 202 - 204.

Reynolds Thomas L. (1986). Pollen embryogenesis in anther cultures of *Solanum carolinense* L. Plant Cell Reports, Vol. 5, pp. 273-275.

Guri A., Volokita M. y Sink K. C. (1987). Plant regeneration from leaf protoplasts of *Solanum torvum*. Plan Cell Reports, Vol. 6, pp. 302-304.

Lakshmana Rao P.V. y Singh B. (1991). Plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of hybrid *Solanum melongena* L. Plant Cell Reports, Vol.10, pp. 7-11.

Annie Liu T.-H., Stephens Loren C. y Hannapel David J. (1995).Transformation of *Solanum brevidens* using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, Vol.15, pp. 196-199.

Sharma Pankaj y V. Rajam Manchikatla (1995). Genotype, explant and position effects on organogenesis and somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). Journal of Experimental Botany, Vol. 46, N° 282, pp. 135-141.

Magioli C., M. Rocha A.P., de Oliveira D.E. y Mansur E. (1998). Efficient Shoot organogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.) induced by thidiazuron. Plant Cell Reports, Vol. 17,pp. 661-663.

M. HAMDÍ. M., Ceballos E., Ritter E. y Ruiz de Galarreta J.I. (1998). Evaluación de la capacidad de regeneración en *Solanum tuberosum* L. Invest. Agr. Prod. Prot. Veg., Vol 13. 160-166.

JayaSree T., Pavan U., Ramesh M., Rao A. V., Mohan Reddy K. Jagan y Sadanandam A. (2001). Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 64, pp. 13-17.

Arockiasamy D.I., Muthukumar B., Natarajan E. y Britto S. John (2002). Plant Regeneration from node and Internode Explants of *Solanum trilobatum* L. Plant Tissue Cult, Vol.12 (2), pp. 93-97.

Ghaffoor Abdul, Baharshah Gul y Waseen Kashif (2003). In vitro Response of potato (*Solanum tuberosum* L.) to Various Growth Regulators. Biotechnology, Vol.2 N° 3, pp. 191-197.

Akbar Anjun Muhammad y Ali Hakoomat (2004). Effect of culture Medium on Direct Organogenesis from Different Explants of Various Potato Genotypes. Biotechnology. Vol. 3(2), pp. 187-193.

Franklin G., Sheeba C.J. y Lakshmi Sita G. (2004). Regeneration of Eggplant (*Solanum melongena* L.) from Root Explants. Biol- Plant. Vol. 40, pp.188-191.

GuBIS Jozet, Lajchová Zuzana, Faragó Juraj y Jureková Zuzana (2004). Effect of growth Regulators on shoot induction and plant regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). Biológia, Bratislava. Vol.59/3, pp. 405-408.

Jawahar, M., Rabert G. Amalan y Jeyaseelan M. (2004). Rapid Proliferation of Multiple Shoots in *Solanum trilobatum* L. Plant Cell Reports. Vol.14(2), pp. 107-112.

Sheeja T.E., Mondal Asit B. y S. Rathore R. K. (2004). Efficient Plantlet Regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Plant Cell Reports. Vol.14 (1), pp. 45-53.

Swamy N. Rama, Ugandhar T., Praveen M., Venkataiah P., Rambabu M., Upender M. y Subhashk (2004). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledon and leaf explants of *Solanum surattense*. Indian Journal of Biotechnology, Vol. 4, pp. 414-418.

Gustafson V., Mallubhotlas S., MacDonnall J., Sanyal-Bagchi M., Chakravarty B., Wang Pruski G., Rothwell C., Audy P., Dekoeyer D., Siahbazi M., Flinn B. y Regan S. (2006). Transformation and plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L. c.v "Strepody". Springer, Vol. 85, pp. 361-366.

Borgato L., Pisani F. y Furini A. (2007). Plant regeneration from leaf protoplasts of *Solanum virginianum* L. (*Solanaceae*). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, Vol. 88, pp. 247-252.

CAPITULO II

DESARROLLO DEL PROTOCOLO PARA LA MORFOGENESIS DE *Solanum americanum*

2.1. INTRODUCCIÓN

Solanum americanum es una planta herbácea de aproximadamente 1.5 m de altura; su tallo es casi glabro a esparcidamente pubescente con pelos incurvos de 0.2-0.5 mm de largo. Presenta hojas ovadas, de 5-10 cm de largo, 2-5 cm de ancho, son puberulentas, con pelos simples de casi 0.2 mm de largo, el margen entero a situado-dentado, el ápice atenuado, la base atenuada sobre el pecíolo. Inflorescencia extra-axilar, simple, racemosa con apariencia umbeliforme y cuenta con pocas flores, que van de 4 – 8 flores; pedúnculo de 2-3 cm de largo; cáliz de 1 mm de largo en la flor y en el fruto; corola blanca de 3-5 mm de largo, muy lobada. Sus frutos son en forma de baya, verdosa o negra cuando madura, globosa, de 5-8 mm de diámetro con semillas numerosas de 1-1.4mm de diámetro, diminutamente foveoladas (ver figura 2.1).

Forman flores y frutos de febrero a mayo, y de agosto a diciembre, sus hojas son comestibles cuando se cuecen, los frutos tienen glicoalcaloides esteroidales como solanina y demiscina, los cuales son tóxicos por vía oral, y al ingerirse liberan alcalinas que producen estupefacción e insensibilidad (González, 2006).

En Venezuela esta planta es utilizada como analgésica, antibiótica; en las Guayanas utilizan la decocción de la planta entera para purificar la sangre y es usada también como antiespasmódico y vermífugo; en esta zona es usada tópicamente en casos de cardialgia, neuralgia y úlceras. Sus raíces hervidas en agua, mezcladas con limón y sal son administradas en el combate de la malaria. En Hawai emplean la infusión de las hojas y el jugo de los frutos en el remedio del asma, erupciones cutáneas, y le dan propiedades estomáquicas y vulnerarias; su nombre común es yerba mora (González, 2006).

En el estado de Yucatán se ha visto que esta especie crece en ambientes salinos (fue colectada en la Duna costera de San Benito a un lado de la ciénega el 1 de junio del 2005) por lo que posiblemente sea una fuente de genes para tolerancia a la salinidad, lo que serviría para mejorar cultivos de importancia agrícola.

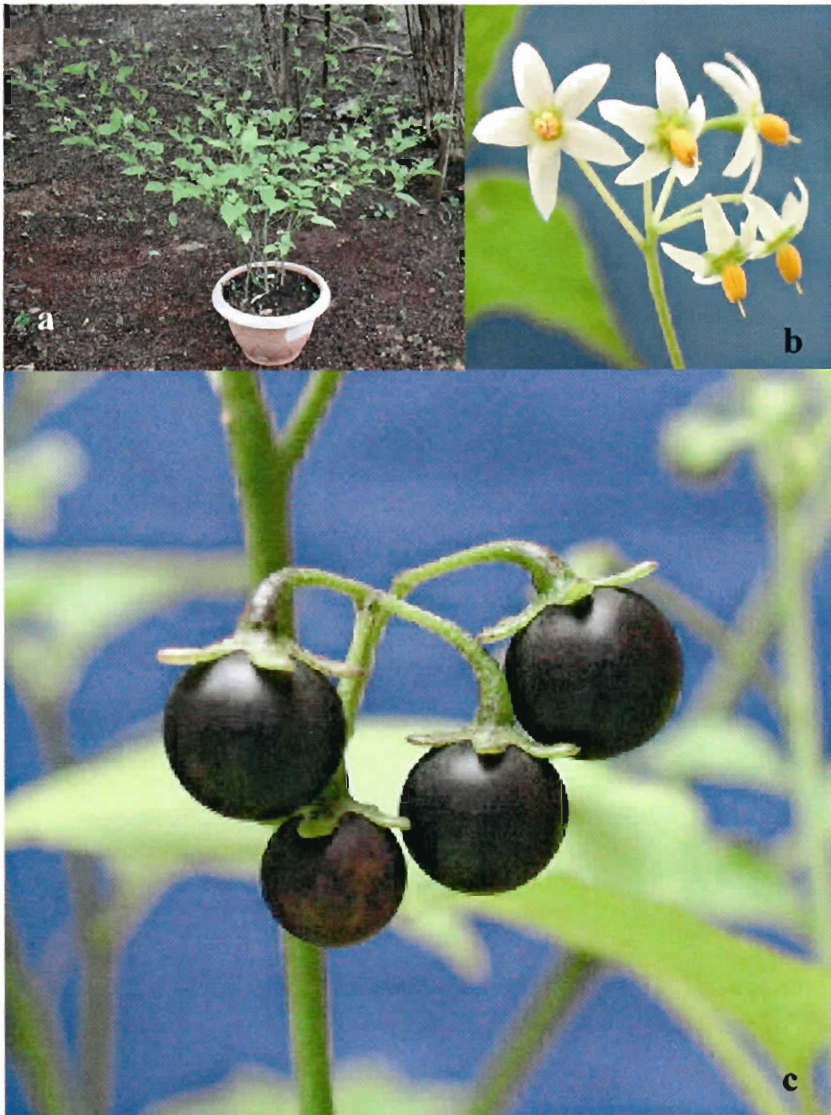


Figura 2.1. Adaptación y producción de *Solanum americanum*: (a) planta con 3 meses en maceta, (b) y (c) flores y frutos de *Solanum americanum*.

2.2. BIBLIOGRAFÍA

Nee Michael. (1993). Flora de Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones sobre recursos bióticos, Xalapa, Veracruz, México.pp.1-2.

González José. (2006).Flora Digital de la Selva. Organización para Estudios Vegetales. pp.1-21.

2.3. MATERIALES Y METODOS

2.3.1. Establecimiento de cultivo *in vitro*

Las semillas de *Solanum americanum* se lavaron con una solución de agua destilada con extrán (1 gota por 100 ml de agua) durante 2 minutos y se enjuagaron posteriormente con agua destilada estéril. En condiciones de asepsia, las semillas se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial (cloralex) más 200 µl/l de tween 20, durante 10 minutos, y finalmente se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Las semillas estériles se sembraron en viales con 5 ml de medio Murashige–Skoog (MS) a la mitad de fuerza iónica, adicionado con 20 g/l de sacarosa, 2.0 g/l de gel-rite y sin reguladores de crecimiento vegetal. El medio de cultivo fue ajustado a un pH de 5.8. Los cultivos se incubaron en condiciones de fotoperíodo 16/8 h, a una temperatura de 25 ± 2 °C.

2.3.2. Propagación clonal *in vitro*

Entre las plantas crecidas *in vitro* se seleccionó una, la que presentó mejores características en apariencia y vigor. Los nudos fueron sembrados en cajas magenta que contenían medio de cultivo MS basal compuesto de 4.31 g/l de sales de MS, 0.1mg/l de tiamina, 0.5 mg/l de piridoxina, 0.5 mg/l de ácido nicotínico, 2 mg/l de glicina, 30 g/l de azúcar estándar, 2 g/l de gel-rite. El medio fue ajustado a un pH de 5.8, y esterilizado en autoclave durante 20 min a 120 libras de presión. Los nudos en el medio de cultivo fueron mantenidos en un cuarto de cultivo con fotoperíodo de 16/8 h a temperatura de 25 ± 2 °C, y a una intensidad lumínica promedio de 47.745 µm.klux/W.m².

2.3.3. Inducción de brotes

Para la inducción *in vitro* (de brotes) se utilizaron hojas vigorosas de aproximadamente 21 días de edad después de la resiembra. Las hojas fueron cortadas dejándoles aproximadamente 1 cm de largo, quitándoles los extremos, y colocadas sobre el medio de cultivo con el haz hacia arriba. Los medios de inducción (medios de cultivo MS suplementados con diferentes concentraciones y combinaciones de ZEA y ANA) con explantes, fueron transferidos a un cuarto de cultivo con fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad a una temperatura de 25 ± 2 °C. Los explantes se mantuvieron 12 días aproximadamente a una intensidad lumínica promedio de 47.745 µm.klux/W.m². A los 12 días aproximadamente fueron colocados a una intensidad de luz promedio más baja de 18.2 µm.klux/W.m²; los explantes se mantuvieron durante 18 días aproximadamente en esas condiciones.

2.3.4. Elongación

Para la determinación del número promedio de brotes elongados por explante se realizaron 4 repeticiones; en cada una fueron empleados tres explantes con un número promedio de 20 brotes por unidad. A los 30 días, los explantes colocados en el medio de inducción (MS suplementado con 2 mg/l de Zeatina y 0.02 mg/l de ANA) fueron transferidos a medio MS sin reguladores de crecimiento para la elongación. Estos se mantuvieron en un cuarto de cultivo a una temperatura de 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y con una intensidad de luz promedio de $18.2 \mu\text{m.klux/W.m}^2$. El tiempo de elongación fue aproximadamente de 8 días.

2.3.5. Enraizamiento *in vitro*

Los brotes elongados *in vitro* fueron cortados, individualizados y transferidos a medio MS sin reguladores de crecimiento vegetal, para probar el enraizamiento antes de su aclimatación. Los brotes individualizados se dejaron en el mismo cuarto usado para la elongación, pero con una intensidad de luz promedio de $47.745 \mu\text{m.klux/W.m}^2$ durante 18 días.

2.3.6. Adaptación en condiciones de invernadero

Las plántulas crecidas y enraizadas *in vitro* fueron transferidas a invernadero. Antes de pasarlas a tierra, las raíces de las plántulas fueron lavadas con agua de llave para eliminar el medio de cultivo restante, y de esta forma evitar una posible infestación de las raíces por hongos u otros microorganismos cuando las plantas ya estén en tierra.

Después del proceso de lavado, las plántulas completas, de 18 días de edad, fueron sembradas en vasos de esterofón con sustrato compuesto de tierra, agrolita y peat-moss (1:1:1). Este sustrato se utilizó, ya que provee humedad y drenaje adecuados a las plántulas para poder sobrevivir. Las plántulas fueron regadas cada 5 días durante 2 meses.

2.3.7. Comparación de brotes de *S. americanum* con BAP y Zea

Dado que el BAP es una citocinina con un costo significativamente menor a la Zeatina y que también ha resultado exitosa para regenerar discos de hoja de Solanáceas, se llevaron a cabo 2 experimentos empleando este fitoregulador. Cada tratamiento se realizó con tres réplicas y con tres explantes en cada una. Para probar las respuestas de la formación de brotes fueron usadas concentraciones equimolares de las dos citocininas (0.00577 mM) pero manteniendo la concentración de ANA en cada uno de los tratamientos. En los tres experimentos realizados se emplearon las mismas condiciones usadas en el proceso de regeneración con Zeatina y ANA.

2.4. RESULTADOS

2.4.1. Propagación clonal *in vitro*

El periodo de multiplicación (micropropagación vegetal) fue de 21 días por repetición. Para determinar la eficiencia fueron realizadas 3 repeticiones, usando 50 nudos en cada una. Los nudos sembrados empezaron a formar pequeñas hojas y raíces a los 7 días después de su siembra en el medio de cultivo MS (ver figura 2.2). El 98% de los nudos sembrados (cada 21 días) formaron brotes con hojas adecuadamente para realizar los experimentos de regeneración *in vitro* de esta especie (ver tabla 2.1).

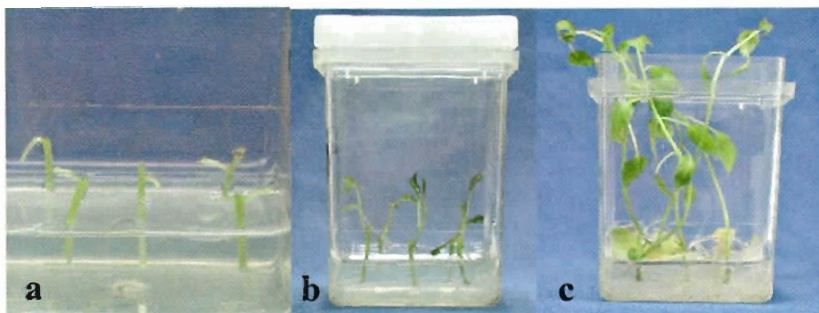


Figura 2.2. Multiplicación de plántulas de *S. americanum*. (a) nudos individuales recién sembrados *in vitro*. (b) plántulas de 7 días de edad *in vitro*. (c) plántulas de 21 días de edad *in vitro*.

Tabla 2.1. Porcentaje de micropropagación de plántulas completas de *S. americanum* a los 21 días a partir de nudos.

Repeticiones	Número de explantes	No. de explantes que formaron brotes (%) a los 21 días
1	50	47 (94)
2	50	50 (100)
3	50	50 (100)

2.4.2. Inducción de brotes

Como se puede ver en la figura 2.3, a los 30 días se observaron claramente brotes formados en la mayoría de los explantes. Estos brotes únicamente surgieron en los extremos cortados y en contacto con el medio de inducción (MS + RCV). Se pudo observar, que los medios de cultivo suplementados solo con ácido naftalenacético (ANA) únicamente indujeron raíces. Al utilizar solamente Zeatina y al ir incrementando su concentración, se logró observar que hubo inducción de brotes desde 0.5 mg/l hasta 5 mg/l de esta fitohormona. Al mantener la concentración de 0.5 mg/l de Zeatina en combinación con concentraciones crecientes de ANA, solamente se logró formar una gran cantidad de raíces. Cuando se mantuvo la concentración de 1 mg/l de ZEA en combinación con las diferentes concentraciones de ANA, se logró ver que a partir de 0.00 y 0.02 mg/l de ANA se formaban brotes, mas no a concentraciones mayores de esta auxina. Sin embargo, con 2, 3 y 5 mg/l de ZEA en combinación con las distintas concentraciones de ANA, se formaron brotes adventicios en todos los explantes. La combinación de estas concentraciones con 0.2 mg/l de ANA, produjo una muy baja cantidad de brotes. De los 30 tratamientos que se utilizaron en el primer experimento, 6 de ellos produjeron una cantidad significativamente mayor de brotes por explante, sin embargo cualitativamente el mejor fue el tratamiento con las concentraciones de 2 mg/l de ZEA y 0.02 mg/l de ANA. Con esta concentración de fitohormonas, se obtuvo una cantidad no significativa en comparación con los otros 5 tratamientos, pero produjo una mejor calidad de brotes a los 30 días (tabla 2.2). Para corroborar que el método fuera reproducible se realizaron dos repeticiones mas con los 6 mejores tratamientos. Los resultados obtenidos demostraron que los 6 tratamientos produjeron una respuesta parecida, con más de 100 brotes por tratamiento. Sin embargo, el tratamiento con 2 mg/l de Zeatina y 0.02 mg/l de ANA volvió a ser el mejor, en cantidad y calidad de explantes a los 30 días y de una respuesta reproducible (tabla 2.3). A los 30 días, ya se veían brotes en la parte cortada del explante. A simple vista, se aprecia que los brotes se forman directamente del explantes de hoja, sin pasar por etapa de callo, por lo que seguramente la regeneración es mediante organogénesis directa (figura 2.4).

Es importante hacer mención que el control negativo usado en el experimento no indujo la formación de brotes.

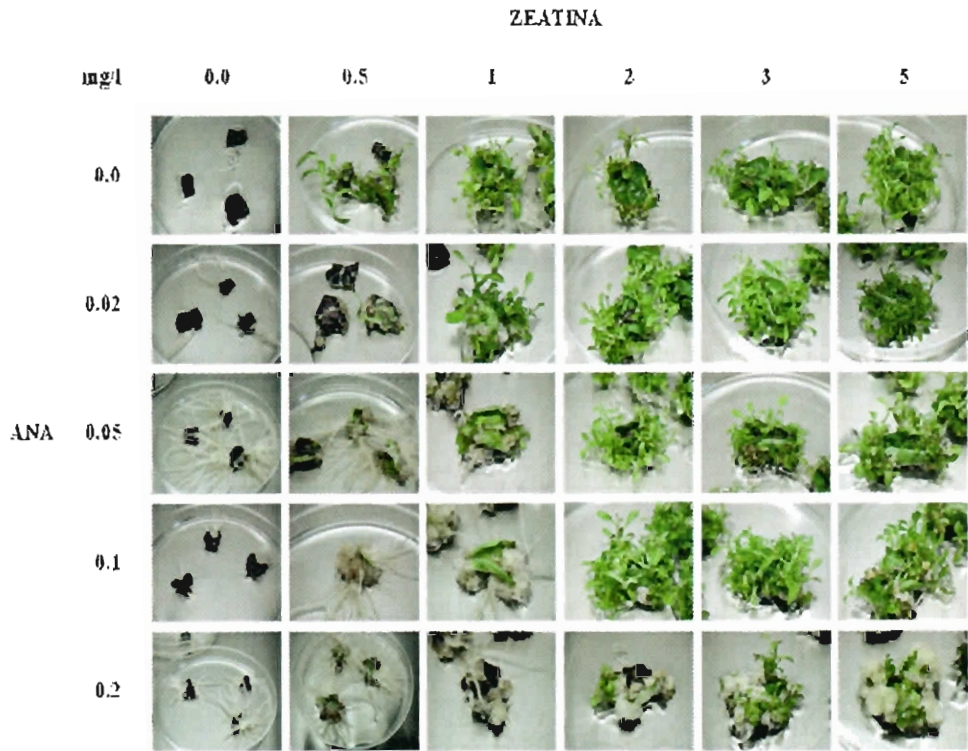


Figura 2.3. Inducción de brotes de *Solanum americanum*, a partir de discos de hoja, en medio de cultivo MS, suplementado con distintas combinaciones de Zeatina y acido naftalenacético.

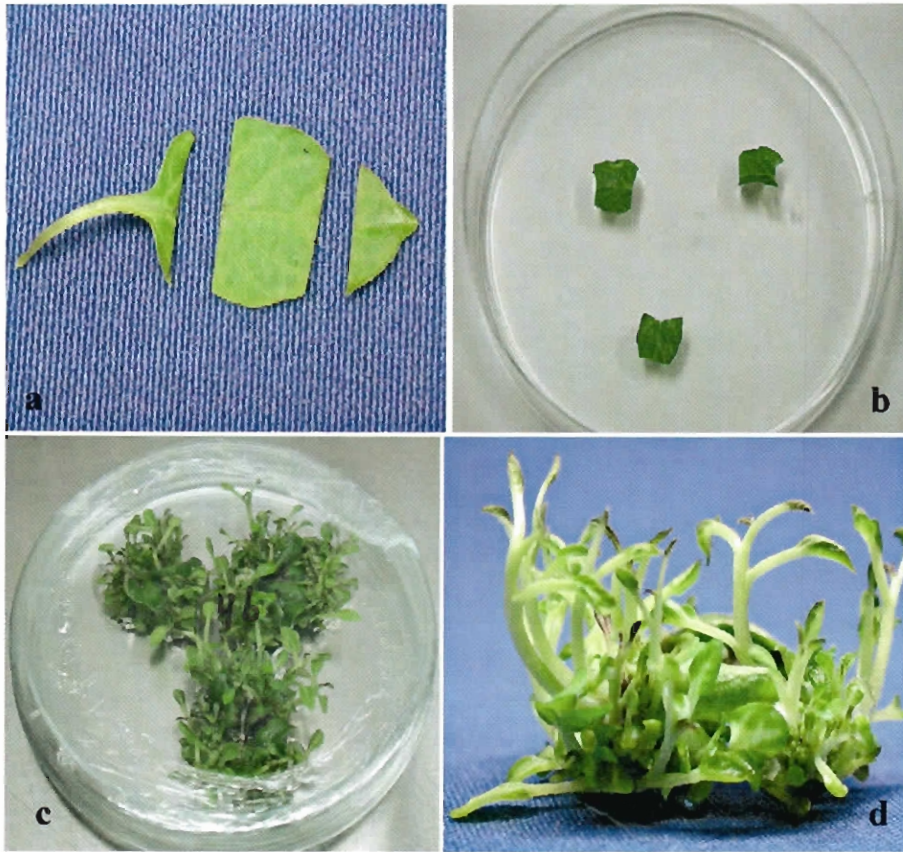


Figura 2.4. Proceso de regeneración *in vitro* de *Solanum americanum*; (a) explante de hoja; (b) explante en el medio de inducción suplementado con 2mg/l de ZEA y 0.02 mg/l de ANA; (c) explante con 29 días en el medio de inducción; (d) explante individualizado de 29 días, listo para su elongación *in vitro*.

Tabla 2.2. Número promedio de brotes/explante inducidos (\bar{x} + SD) bajo diferentes concentraciones de Zeatina y Acido naftalenacético, a partir de explantes de hoja de *Solanum americanum*.

Tratamiento	Concentración de Zeatina (mg/L)	Concentración de ANA (mg/L)	Número promedio de brotes/explante (\bar{x} + SD)
1	0	0	0 (± 0.0)
2	0.5	0	10.67 (± 2.07)
3	1	0	20 (± 1.79)
4	2	0	16 (± 2.38)
5	3	0	11.89 (± 1.41)
6	5	0	8.22 (± 2.83)
7	0	0.02	0 (± 0.0)
8	0.5	0.02	9 (± 2.05)
9	1	0.02	7.89 (± 2.07)
10	2	0.02	12.89 (± 4.88)
11	3	0.02	15.33 (± 2.92)
12	5	0.02	18.56 (± 3.78)
13	0	0.05	0 (± 0.0)
14	0.5	0.05	0 (± 0.0)
15	1	0.05	0.11 (± 0.11)
16	2	0.05	0.78 (± 0.57)
17	3	0.05	11.89 (± 1.98)
18	5	0.05	7.67 (± 2.51)
19	0	0.1	0 (± 0.0)
20	0.5	0.1	0 (± 0.0)
21	1	0.1	0 (± 0.0)
22	2	0.1	4.89 (± 1.55)
23	3	0.1	5.56 (± 1.56)
24	5	0.1	10.67 (± 2.07)
25	0	0.2	0 (± 0.0)
26	0.5	0.2	0 (± 0.0)
27	1	0.2	0 (± 0.0)
28	2	0.2	0.11 (± 0.11)
29	3	0.2	2.22 (± 1.12)
30	5	0.2	1.67 (± 0.71)

Tabla 2.3. Promedio de brotes/explante, que se obtuvieron, en las tres repeticiones realizadas con los 6 mejores tratamientos

Tratamiento	Concentración de Zeatina (mg/L)	Concentración de ANA (mg/L)	No. promedio de brotes / explante ($\bar{x} \pm \sigma_M$)
3	1	0	18.1 (± 2.28)
4	2	0	12.8 (± 3.82)
5	3	0	17.2 (± 4.25)
10	2	0.02	18.6 (± 2.81)
11	3	0.02	19.3 (± 3.32)
12	5	0.02	18 (± 4.59)

2.4.3. Elongación

A los 8 días fueron obtenidos una cantidad suficiente de brotes elongados de buena calidad para la siguiente etapa del proceso de regeneración. Se determinó que el número promedio de brotes elongados por explante fue de 13 unidades (ver tabla 2.4).

Tabla 2.4. Número promedio de brotes elongados por explante

Repeticiones	Número de brotes Elongados	No. de Brotes/ explante ($\bar{x} \pm SD$)
1	46	15.33 \pm 0.58
2	36	11.67 \pm 1.53
3	47	15.67 \pm 3.51
4	39	13.00 \pm 4.36

2.4.4. Enraizamiento

En el proceso de enraizamiento (ver figura 2.4), se observó que los brotes sembrados bajo las condiciones mencionadas produjeron una cantidad suficiente de raíces y una buena calidad de hojas a los 18 días aproximadamente (ver tabla 2.5). Se consideró que las plántulas tenían un desarrollo adecuado para sacarlas al invernadero.



Figura 2.5. Proceso de enraizamiento *in vitro* de brotes de *Solanum americanum*. (a) brotes elongados con 8 días de edad; (b) brotes individualizados *in vitro* para su enraizamiento; (c) brotes enraizados *in vitro* con 15 días de edad aproximadamente; (d) brotes enraizados de 18 días de edad.

Tabla 2.5. Reproducibilidad en tiempo (cada 30 días) del protocolo de enraizamiento *in vitro* de los brotes aislados de *S. americanum* (a los 18 días).

Número de explantes por repetición (R)*	Brotos enraizados (%)
R1: 30	96.7%
R2: 30	100%
R3: 30	100%

(*) Protocolo repetido en el tiempo.

2.4.5. Adaptación en condiciones de invernadero

Todas las plántulas de *S. americanum* producidas *in vitro* sobrevivieron en el invernadero, por lo que se puede decir que el porcentaje de mortalidad fue de cero (ver figura 2.6). A los 30 días, las plantas sembradas en el nebulizador crecieron, se desarrollaron adecuadamente y estuvieron listas para sacarlas a campo. En esta etapa, fueron realizadas tres repeticiones con 20 ejemplares cada una, las cuales se llevaron a cabo cada 30 días (ver tabla 2.6). Cabe mencionar que las plantas sembradas en invernadero se observaron durante dos meses, tiempo durante el cual no hubo mortandad.



Figura 2.6. Plántulas a condiciones de invernadero de *Solanum americanum*; (a) plántulas a los 7 días después de la transferencia; (b) plántulas con 30 días en invernadero.

Tabla 2.6. Reproducibilidad del protocolo de adaptación de las plántulas de *S. americanum* en invernadero.

No. plántulas/ repetición en invernadero (R)*	Sobrevivencia de las plántulas (%)
R1: 20	100%
R2: 20	100%
R3: 20	100%

(*) Protocolo repetido en el tiempo.

2.4.6. Comparación de brotes de *S. americanum* con BAP y ZEA

A los 30 días, los explantes tratados con BAP y ANA (1.3 mg/l, 0.02 mg/l, respectivamente) produjeron un número promedio de 7 brotes por explante (ver tabla 2.7 b). En los bordes de la hoja se vieron pequeños brotes vitrificados y con crecimiento anormal. En contraste, cuando los explantes de hoja fueron tratados con Zeatina y ANA (2 mg/l, 0.02 mg/l) se obtuvo una buena respuesta de inducción, y la formación de un número promedio de 25 brotes por explante (ver tabla 2.7 a). Los brotes producidos con este tratamiento fueron normales en crecimiento tanto en el tallo como en las hojas y no tuvieron problemas de vitrificación durante el tiempo probado en el medio de inducción (MS + RCV) como se muestra en la figura 2.7.



Figura 2.7. Comparación de brotes de *S. americanum* con BAP y ZEA. (a) explante de hoja con brotes inducidos por ZEA ;(b) explante de hoja con brotes inducidos por (BAP).

Los resultados sobre el número promedio de brotes por explante mencionados arriba fueron obtenidos de datos estadísticos realizados del segundo experimento, sumando los tres promedios (ver tabla 2.7 a y 2.7 b).

Tabla 2.7a. No. promedio de brotes por explante obtenidos en medio de cultivo conteniendo Zeatina y ANA.

Explante	No. Brotes/explante con ZEA	Promedio de brotes/explante ($\bar{x} \pm \sigma_M$)
H1	45	36±4.58
H1	30	
H1	33	
H2	26	24.3±1.28
H2	22	
H2	25	
H3	15	15.3±5.49
H3	6	
H3	25	

Tabla 2.7 b. No. promedio de brotes por explante tratados con BAP y ANA.

Explante	No. de brotes por explante tratados con BAP	No promedio de brotes/explante ($\bar{x} \pm \sigma_M$)
H1	11	11±1.15
H1	9	
H1	13	
H2	6	5.33±1.76
H2	2	
H2	8	
H3	10	6±2.00
H3	4	
H3	4	

2.5. DISCUSIÓN

2.5.1. Propagación clonal *in vitro*

Para obtener una buena formación de plántulas fue necesario buscar las condiciones adecuadas para que los nudos de plantas de 21 días pudieran formar hojas y raíces. En menos de este tiempo las plántulas no presentaron buenos nudos (vigor) para ser utilizadas tanto para su multiplicación como para la inducción de brotes. En trabajos previos sobre la micropropagación de algunas especies tales como *Solanum melongena* L. y *Solanum tuberosum* L. se han utilizado plantas de 14 a 35 y de 28 a 42 días (respectivamente) como fuentes de explantes de hojas, y se ha concluido que a esa edad, proporcionan hojas de buena calidad para una eficiente inducción de brotes (Mukherjee et al., 1991; Gustafson et al., 2006). Con *Solanum americanum*, en comparación con lo reportado, su multiplicación fue cada 21 días, sin embargo, los explantes foliares fueron apropiados para una buena multiplicación e inducción de brotes *in vitro*. El 98% de los nudos sembrados en medio MS libre de reguladores de crecimiento formaron plántulas completas a los 21 días.

2.5.2. Inducción de brotes *in vitro*

Para la inducción de brotes de *Solanum americanum* se buscaron concentraciones de fitoreguladores adecuadas para obtener brotes de buena calidad y cantidad (ZEA y ANA). Para poder determinar las condiciones óptimas en la inducción, fueron realizados diferentes experimentos manejando distintas condiciones de intensidad de luz. Finalmente se logró establecer un protocolo para la regeneración de *Solanum americanum*. Las concentraciones usadas fueron similares a las empleadas para la inducción de *Solanum tuberosum* a partir de sus hojas, sin embargo, las condiciones de temperatura, de luz y de los componentes del medio MS manejados fueron diferentes (M. HAMDÍ et al., 1998). Haciendo una comparación entre el número de brotes producidos por explante tanto de *S. americanum* como de *S. tuberosum*, *americanum* produjo un mayor número de brotes. Cabe mencionar que con estas dos especies no fue posible hacer una evaluación comparativa y real, ya que con ellas no se hicieron experimentos al mismo tiempo. Por lo tanto no existe una respuesta lógica y concisa para diferenciar resultados obtenidos de la inducción de *americanum* con respecto a *S. tuberosum* y otras especies. Sin embargo, en los resultados obtenidos de los 30 tratamientos (con tres réplicas cada uno) realizados para encontrar la combinación adecuada de fitoreguladores, Zeatina y ácido naftalenacético, el tratamiento con 2 mg/l de ZEA y 0.02 mg/l de ANA finalmente fue el mejor para inducir la formación de brotes a los 15 días ya que además generó plántulas de buena calidad.

2.5.3. Elongación

Los resultados indican que las condiciones que se manejaron en esta etapa fueron las adecuadas para que los brotes se elongaran a los 8 días. En este experimento no se usó ningún tipo de regulador de crecimiento como en el trabajo publicado por Franklin en el 2004 (sobre la elongación de brotes de *Solanum melongena* L) en donde únicamente se usó medio MS basal. En *Solanum lycopersicum* se ha observado que la presencia de biotina en el medio de inducción incrementa la elongación de brotes (Sheeja et al., 2004). Sin embargo, la cantidad de brotes elongados por explante en *S. americanum* fue exitosa y no hubo la necesidad de utilizar adjuntos orgánicos para enriquecer el medio de cultivo MS basal.

2.5.4. Enraizamiento

Las condiciones utilizadas para la evaluación del porcentaje de enraizamiento de brotes fueron más simples en comparación a las usadas en otros trabajos; en algunas especies se ha usado medio de cultivo MS a la mitad de la fuerza iónica suplementado con ácido indol-butírico o ácido indol-acético (Gunay et al., 1982; Magioli et al., 1998; Arockiasamy et al., 2002; Jawahar et al., 2004; Sheeja et al., 2004; Borgato et al., 2007) para inducir el enraizamiento, pero en el presente trabajo únicamente se empleó medio de cultivo MS basal. Sin embargo el resultado de enraizamiento fue el deseado. El 98.9% de los brotes individualizados y sembrados *in vitro* formaron plántulas con raíces y hojas a los 18 días.

2.5.5. Adaptación en condiciones de invernadero

Para la adaptación de las plantas al invernadero fue necesario buscar un sustrato apropiado para el crecimiento y una buena adaptación de las plantas. El sustrato que se usó está compuesto de agrolita, tierra y peat muss. En muchos trabajos publicados en la adaptación de plantas regeneradas se han utilizado otro tipo de sustrato (solución de Hoagland, soilrite, etc.). Sin embargo, en este presente trabajo se empleó el sustrato mencionado arriba, y se observó que las plantas tuvieron una buena respuesta. El 100% de las plantas sembradas bajo estas condiciones se desarrollaron exitosamente a los 30 días.

2.5.6. Comparación de brotes de *S. americanum* con BAP y ZEA

De acuerdo con los resultados observados, probablemente el mejor regulador de crecimiento que se recomienda, por lo menos en esta especie, para la regeneración de un buen número de brotes y con mejores características morfológicas, es la Zeatina. Este resultado fue observado y cuantificado únicamente con el mejor tratamiento de ZEA seleccionado en comparación a su concentración equimolar (0.00577mM) con BAP. También es importante hacer mención que este resultado puede variar en calidad y cantidad de brotes si se aumenta la concentración de BAP en comparación a ZEA. En muchos reportes previos, tanto la Zeatina como el BAP

han sido utilizados para la regeneración de muchas especies de Solanáceas del género *Solanum*.

Sin embargo, se han comprobado que la Zeatina + AIA da mejores resultados en comparación con BAP + ANA en la inducción de brotes de tomate (Gubis et al., 2004). Pero, en otras especies como *Solanum trilobatum* L. y *Solanum tuberosum* L. se ha usado el BAP, y se han obtenido también mejores resultados en la inducción (Opatrna et al., 1997; Arockiasamy et al., 2002; Jawahar et al., 2004). El resultado también tiene mucho que ver con el tipo de explante que se maneja. En el presente trabajo se concluye que la Zeatina en combinación con el ácido naftaleácetico dió una respuesta eficiente en la inducción de brotes de *Solanum americanum*, mientras BAP produce brotes con malas características morfológicas de tallos y hojas.

2.6. El protocolo para la regeneración *in vitro* de *Solanum americanum*

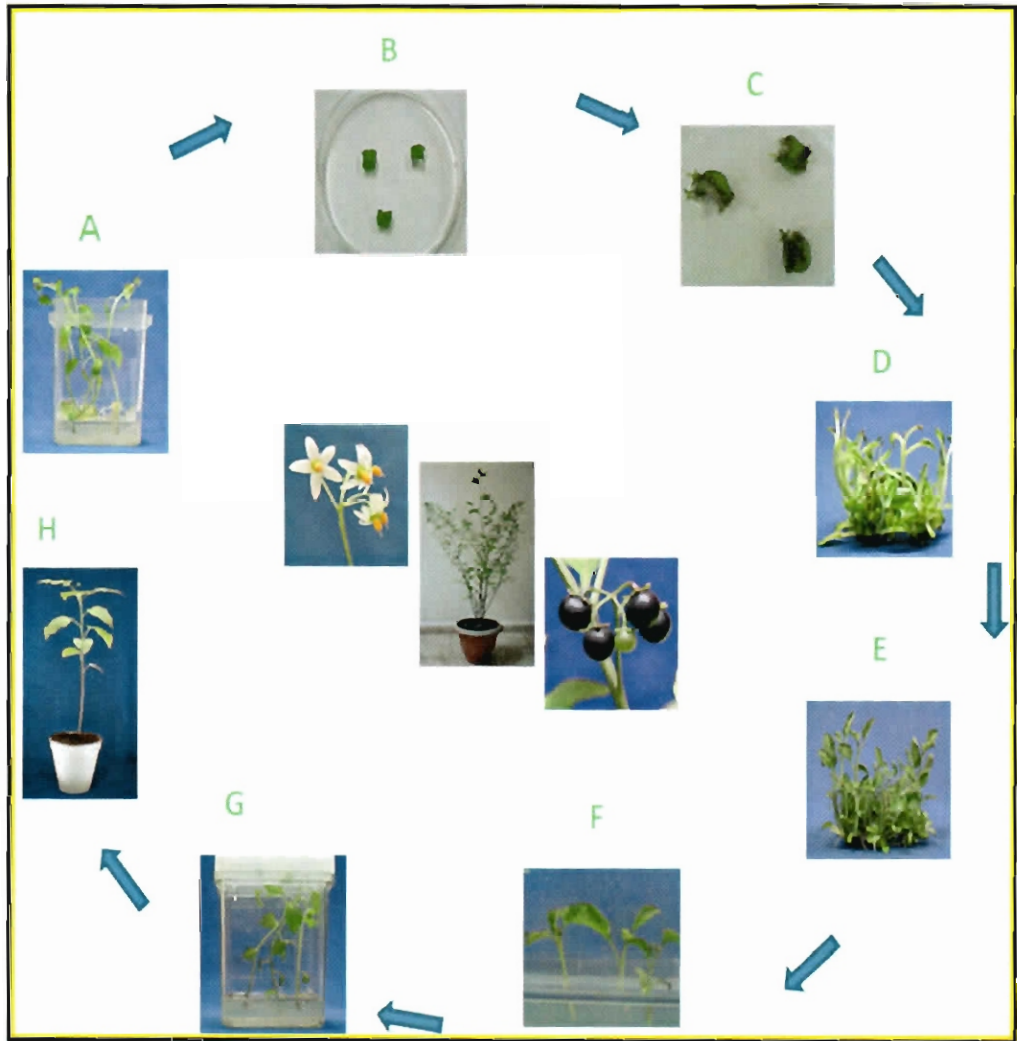


Figura 2.8. El protocolo para la regeneración *in vitro* de *Solanum americanum*. **A**) Multiplicación de plantas (medio MS sin reguladores de crecimiento); **B**) Inducción de brotes (MS+0.02 mg/l ANA +2 mg/l ZEA); **C**) Brotes en medio de inducción a los 15 días, **D**) Brotes de 30 días, **E**) Brotes elongados durante 8 días (medio MS sin reguladores de crecimiento); **F**) Enraizamiento de brotes durante 18 días (medio MS sin reguladores de crecimiento); **G**) Plántulas obtenidas a los 18 días listas para su adaptación en invernadero, **H**) Planta con 30 días de edad en invernadero (sustrato usado: agrolita, tierra y peat-muss, 1:1:1).

2.7. BIBLIOGRAFÍA

Gunay L. Alka y Rao P.S. (1986). Plant Regeneration from cultured Hypocotyl Explants of Diploid and Tetraploid *Solanum khasianum* Clarke. Plant Cell Reports, Vol.1, pp. 202 - 204.

Reynolds Thomas L. (1986). Pollen embryogenesis in anther cultures of *Solanum carolinense* L. Plant Cell Reports, Vol. 5, pp. 273-275.

Guri A., Volokita M. y Sink K. C. (1987). Plant regeneration from leaf protoplasts of *Solanum torvum*. Plant Cell Reports, Vol. 6, pp. 302-304.

Lakshmana Rao P.V. y Singh B. (1991). Plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of hybrid *Solanum melongena* L. Plant Cell Reports, Vol.10, pp. 7-11.

Annie Liu T.-H., Stephens Loren C. y Hannapel David J. (1995). Transformation of *Solanum brevidens* using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, Vol.15, pp. 196-199.

Sharma Pankaj y V. Rajam Manchikatla (1995). Genotype, explant and position effects on organogenesis and somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). Journal of Experimental Botany, Vol. 46, N° 282, pp. 135-141.

Magioli C., M. Rocha A.P., de Oliveira D.E. y Mansur E. (1998). Efficient Shoot organogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.) induced by thidiazuron. Plant Cell Reports, Vol. 17, pp. 661-663.

M. HAMDÍ. M., Ceballos E., Ritter E. y Ruiz de Galarreta J.I. (1998). Evaluación de la capacidad de regeneración en *Solanum tuberosum* L. Invest. Agr. Prod. Prot. Veg., Vol 13. 160-166.

JayaSree T., Pavan U., Ramesh M., Rao A. V., Mohan Reddy K. Jagan y Sadanandam A. (2001). Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 64, pp. 13-17.

Arockiasamy D.I., Muthukumar B., Natarajan E. y Britto S. John (2002). Plant Regeneration from node and Internode Explants of *Solanum trilobatum* L. Plant Tissue Cult, Vol.12 (2), pp. 93-97.

Ghaffoor Abdul, Baharshah Gul y Waseen Kashif (2003). In vitro Response of potato (*Solanum tuberosum* L.) to Various Growth Regulators. Biotechnology, Vol.2 N° 3, pp. 191-197.

Akbar Anjun Muhammad y Ali Hakoomat (2004). Effect of culture Medium on Direct Organogenesis from Different Explants of Various Potato Genotypes. Biotechnology. Vol. 3(2), pp. 187-193.

Franklin G., Sheeba C.J. y Lakshmi Sita G. (2004). Regeneration of Eggplant (*Solanum melongena* L.) from Root Explants. Biol- Plant. Vol. 40, pp.188-191.

GuBIS Jozet, Lajchová Zuzana, Faragó Juraj y Jureková Zuzana (2004). Effect of growth Regulators on shoot induction and plant regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). Biología, Bratislava. Vol.59/3, pp. 405-408.

Jawahar, M., Rabert G. Amalan y Jeyaseelan M. (2004). Rapid Proliferation of Multiple Shoots in *Solanum trilobatum* L. Plant Cell Reports. Vol.14(2), pp. 107-112.

Sheeja T.E., Mondal Asit B. y S. Rathore R. K. (2004). Efficient Plantlet Regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Plant Cell Reports. Vol.14 (1), pp. 45-53.

Swamy N. Rama, Ugandhar T., Praveen M., Venkataiah P., Rambabu M., Upender M. y Subhashk (2004). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledon and leaf explants of *Solanum surattense*. Indian Journal of Biotechnology. Vol. 4, pp. 414-418.

Magioli Claudia y Mansur Elisabeth (2005). Eggplant (*Solanum melongena* L.) : tissue culture, genetic transformation and use as an alternative model plant. Acta bot. bras., Vol. 19(1), pp. 139-148.

González José. (2006). Flora Digital de la Selva. Organización para Estudios Vegetales, pp.1-21

Gustafson V., Mallubhotlas S., MacDonnall J., Sanyal-Bagchi M., Chakravarty B., Wang Pruski G., Rothwell C., Audy P., Dekoeyer D., Siahbazi M., Flinn B. y Regan S. (2006). Transformation and plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L. c.v "Strepody". Springer, Vol. 85, pp. 361-366.

Borgato L., Pisani F. y Furini A. (2007). Plant regeneration from leaf protoplasts of *Solanum virginianum* L. (*Solanaceae*). Plant Cell Tiss Organ Cult, Vol. 88, pp. 247-252.

CAPÍTULO III

DESARROLLO DEL PROTOCOLO PARA LA MORFOGENESIS DE *Solanum donianum*

3.1. INTRODUCCIÓN

Solanum donianum es otra especie silvestre del genero *Solanum*; es un arbusto, de aproximadamente 3 m de altura, hojas elípticas u oblongas de 25 cm de largo y 7 cm ancho, márgenes ondulados, cuenta con inflorescencia asociada terminal; presenta corola blanca de 16 mm ancho y frutos en forma de baya rojo amarillenta y globosa, glabros de 6 mm de ancho (ver figura 3.1). Se cosecha todo el año (Coile C. et al., 2003) y presenta semillas de 2-2.5 mm de largo. Esta especie crece en bosques bajos del Petén en Honduras, en el Sur de Florida, Bahamas, y en el Sur de México. Esta planta silvestre también es llamada *Solanum blodgettii* (Gentry et al., 1974). Es un tipo de arbusto que crece también en selva baja subperennifolia, en manglares y en potreros del municipio de Tenabo, Campeche, México (Zamora -Crecencio, 2003).

En el estado de Yucatán se colectó cerca de los manglares (las semillas fueron colectadas en la zona de Xcambo el 24 de junio del 2005) por lo que posiblemente sea también una fuente de genes de interés biotecnológico, que serviría para mejorar cultivos de importancia agrícola.



Figura 3.1. Adaptación y producción de flores de *Solanum donianum*(a) planta con 3 meses en maceta, (b) flores de *Solanum donianum*

3.2. BIBLIOGRAFÍA

Gentry Johnnie L., Jr y Standley Paul C.(1974).Flora de Guatemala. Fieldiana, pp. 107-108

Coile Nancy C. y Garland Mark A. (2003). Notes on Florida's Endangered and Threatened Plants.Cuarta edicion. Plant Industry,pp. 1- 127.

Zamora Crescencio Pedro (2003). Contribución al estudio Florístico y Descripción de la Vegetación del Municipio de Tenabo, Campeche, México.Polibotánica, N° 15, pp. 1-40.

3.3. MATERIALES Y METODOS

3.3.1. Establecimiento de cultivo *in Vitro* de *S. donianum*

Previo a su cultivo *in vitro*, las semillas de *Solanum donianum* se lavaron con una solución de agua destilada con extrán (1 gota por 100 ml de agua) durante 2 minutos y se enjuagaron posteriormente con agua destilada estéril. En condiciones de asepsia, las semillas se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial (cloralex) más 200 µl/l de tween 20, durante 10 minutos, y finalmente se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Las semillas estériles se sembraron en viales con 5 ml de medio Murashige–Skoog (MS) a la mitad de fuerza iónica, adicionado con 20 g/l de sacarosa, 2.0 g/l de gel-rite y sin reguladores de crecimiento vegetal. El medio de cultivo fue ajustado a un pH de 5.8, y esterilizado en autoclave durante 20 min a 120 libras de presión. Los cultivos se incubaron en condiciones de fotoperíodo 16 h luz y 8 h de oscuridad, a una temperatura de 25 ± 2 °C.

3.3.2. Propagación clonal

Entre las plantas crecidas *in vitro* se seleccionó una con base en su apariencia y vigor. Los nudos fueron sembrados en cajas magenta que contenían el mismo medio de cultivo MS basal utilizado en el caso de *Solanum americanum*. El medio también se ajustó a un pH de 5.8, y se esterilizó en autoclave durante 20 min a 120 libras de presión. Los nudos en el medio de cultivo fueron mantenidos en el cuarto de cultivo en las condiciones descritas para *S. americanum*.

3.3.3. Inducción de brotes

Para la inducción *in vitro* de esta especie se usó un procedimiento similar al empleado con *Solanum americanum*, pero los 30 tratamientos en medio de cultivo MS suplementados con distintas concentraciones de Zeatina y ácido naftalenacético se mantuvieron bajo condiciones distintas. Esto se decidió con base en un primer experimento realizado, ya que las hojas que se mantuvieron en el medio de inducción con las mismas condiciones usadas para *Solanum americanum* no tuvieron buena respuesta de inducción al término de 30 días; probablemente fueron usadas hojas muy maduras o simplemente no fueron las condiciones adecuadas para esta especie. Con base en los resultados que se obtuvieron, se diseñó el procedimiento para *S. donianum*. Las hojas que se usaron en este caso fueron hojas más jóvenes que la primera vez; y éstas fueron colocadas en los medios de cultivo MS suplementados con distintas concentraciones de Zeatina y ácido naftalenacético; cada tratamiento se realizó con tres réplicas con dos explantes en cada uno. Se dejaron 7 días aproximadamente (se envolvieron las cajas con papel aluminio) a una temperatura de 25 ± 2 °C y se colocaron en un espacio con una intensidad luminosa promedio de $9.64 \mu\text{m.klux/W.m}^2$, suponiendo que los primeros días las hojas podrían lograr absorber la cantidad suficiente de Zeatina, ya que esta hormona es muy sensible a la luz. Al término de los 7 días, el papel aluminio fue retirado, y las cajas Petri con explantes se mantuvieron en el mismo cuarto de cultivo con fotoperíodo de 16 h luz y

8 h de oscuridad a una temperatura de 25 ± 2 °C, y a una misma intensidad de luz promedio aproximado de $9.64 \mu\text{m.klux/W.m}^2$. Bajo estas condiciones los explantes se dejaron durante 8 días. A esta intensidad de luz, las hojas en el medio de inducción presentaron pequeños brotes a los 15 días. Al término de este tiempo, fueron transferidos a condiciones de luz promedio de $43.98 \mu\text{m.klux/W.m}^2$, y se dejaron durante 13 días. Posteriormente fueron mantenidos a una intensidad de luz promedio de $18.2 \mu\text{m.klux/W.m}^2$ durante dos días aproximadamente, para que los brotes formados, se elongaran (elongación adicional).

3.3.4. Elongación

A los 30 días, los explantes con brotes fueron transferidos a cajas magenta que contenían medio de cultivo MS (libre de fitohormonas). Para la determinación del número promedio de brotes elongados por explante se realizaron 3 repeticiones con el mejor tratamiento de regeneración seleccionado, en cada uno de ellos, se emplearon 6 explantes con brotes, y se dejaron 9 días aproximadamente en un cuarto de cultivo a una temperatura de 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, y a una intensidad de luz promedio de $18.2 \mu\text{m.klux/W.m}$.

3.3.5. Enraizamiento *in vitro*

Los brotes elongados *in vitro*, fueron cortados, individualizados y transferidos a medio MS sin reguladores de crecimiento vegetal, para probar el enraizamiento antes de su aclimatación. En esta etapa, fueron realizados 4 repeticiones empleando 10 brotes elongados en cada uno. Los brotes individualizados se dejaron en el mismo cuarto usado para la elongación, pero con una intensidad de luz promedio de $47.745 \mu\text{m.klux/W.m}^2$ durante 18 días.

3.3.6 Adaptación en condiciones de invernadero

Las plántulas crecidas y enraizadas *in vitro* fueron transferidas a invernadero. Antes de pasarlas a tierra, las raíces de las plántulas fueron removidas cuidadosamente del medio y lavadas con agua de la llave para eliminar el medio de cultivo restante, y de esta forma evitar una posible infestación de las raíces por hongos u otros microorganismos cuando las plantas ya estén en tierra. Después del proceso de lavado, las plántulas completas, de 18 días de edad, fueron sembradas en vasos de esterafón con sustrato compuesto de tierra, agrolita y peat moss (1:1:1). Las plántulas fueron regadas cada 5 días durante 2 meses.

3.3.7. Comparación de brotes de *S. donianum* con BAP y ZEA

Se realizaron 2 experimentos empleando concentraciones de 3 y 2 mg/l de ZEA. Se llevaron a cabo comparaciones entre concentraciones de 2 y 1.3 mg/l de BAP calculadas en base a cantidades milimolares aproximadas de 0.009 y 0.0057 mM de ZEA, respectivamente. Cada tratamiento se realizó con tres réplicas y con dos

explantes en cada una. En los 2 experimentos realizados se emplearon las mismas condiciones usadas en el proceso de regeneración con Zeatina.

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Propagación clonal *in vitro*

En la propagación *in vitro*, nudos de la plántula que se originó a partir de una clona se fueron multiplicando; el periodo de micropropagación fue de 47 días. Este tiempo se estableció debido a que el crecimiento de esta especie es más lento, ya que plantas de 25 días de edad no fueron adecuadas para el proceso de multiplicación. Para determinar la eficiencia de la micropropagación fueron realizadas 3 repeticiones, usando 55 nudos en cada una. Los nudos sembrados empezaron a formar pequeñas hojas y raíces a los 10 días después de su siembra en el medio de cultivo MS (ver figura 3.1). El 94.5% de los nudos sembrados en medio MS libre de reguladores de crecimiento formaron plántulas completas a los 47 días (ver tabla 3.1)

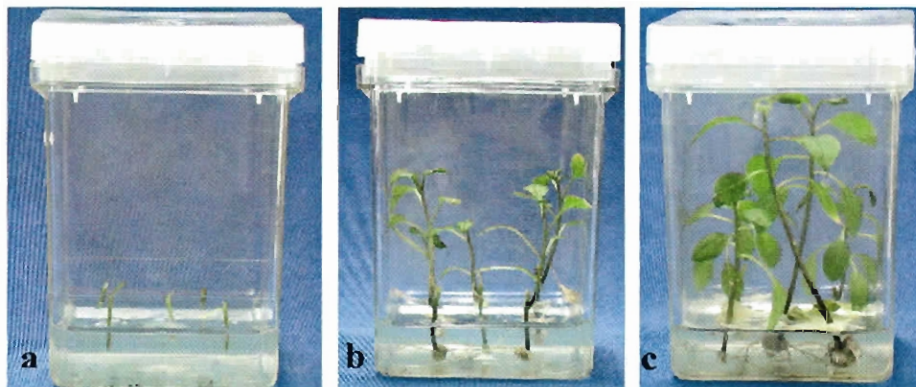


Figura 3.2. Multiplicación de plántulas de *Solanum donianum*. (a) Nudos de 47 días de edad *in vitro*. (b) Plántulas con 25 días de edad *in vitro*. (c) Plántulas de 47 días de edad *in vitro*.

Tabla 3.1. Porcentaje de nudos que formaron plántulas a los 47 días después de la siembra *in vitro*.

No. Explantes/ Repetición (R) *	Proporción de explantes que formaron hojas y raíces (%)
R1: 55	89.1
R2: 55	100
R3: 55	94.5

(*) Repetición en tiempo del protocolo.

3.4.2. Inducción de brotes

Con la matriz de los 30 tratamientos que se probaron, se demostró que únicamente con 1, 2, 3 y 5 mg/l de Zeatina se generó una respuesta positiva en la inducción de brotes. Aunque hubo otros tratamientos que formaron pequeños brotes en ese tiempo, estos no eran de buena calidad y cantidad; únicamente se obtuvieron brotes amorfos, y por lo tanto esos tratamientos no se tomaron en cuenta en la realización de un segundo experimento (ver figura 3.2).

De acuerdo con datos estadísticos, los 4 tratamientos produjeron una buena respuesta; los últimos tres no fueron estadísticamente diferentes con respecto al número promedio de brotes por explante (Tabla 3.2). Sin embargo, para un segundo experimento únicamente fueron evaluados los tratamientos con 2 y 3 mg/l de Zeatina ya que son los tratamientos que produjeron una mejor calidad y cantidad de brotes. Se comprobó que aunque no haya diferencia estadística en relación con la respuesta que dan los dos tratamientos, el mejor fue el de 3 mg/l de Zeatina, ya que los brotes que se obtuvieron fueron superiores en cantidad y presentaron mejores características morfológicas reproduciblemente (Tabla 3.3).

El procedimiento que se siguió para la regeneración de plántulas de *Solanum donianum* con el mejor tratamiento, se muestra en la figura 9.3. A los 30 días, los explantes con brotes fueron transferidos a medio de cultivo MS, sin reguladores de crecimiento, para su elongación.

Es importante hacer mención que el control negativo usado en el experimento no indujo la formación de brotes, por lo tanto, se puede decir que para la formación de ellos está relacionada con la presencia de ZEA.

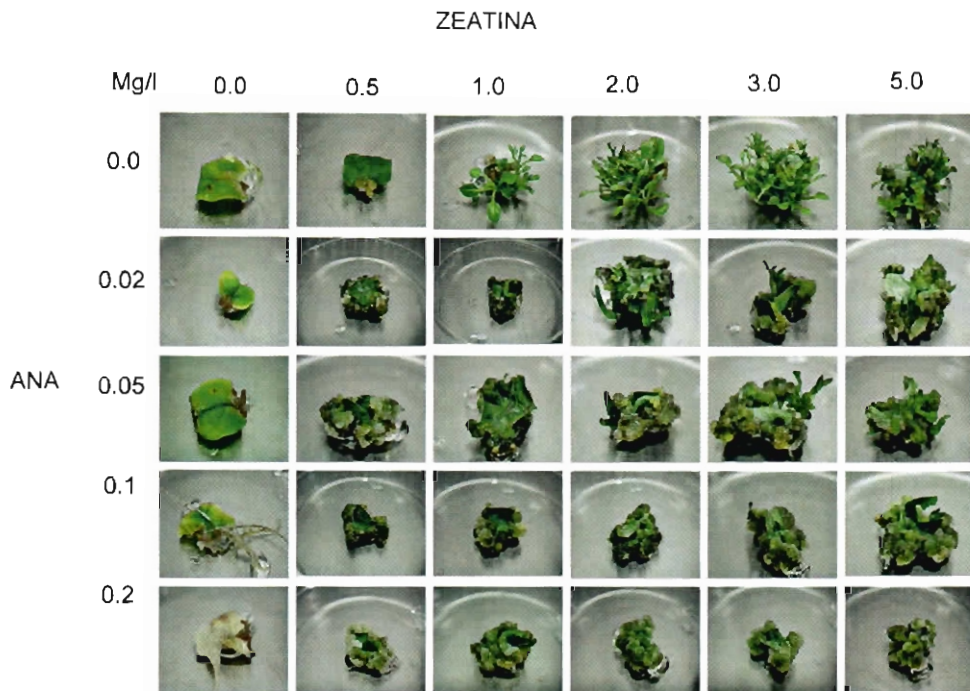


Figura 3.3 Inducción de brotes de *Solanum donianum*, en medio de cultivo MS, suplementado con distintas combinaciones de Zeatina y ácido naftalenacético.

Tabla 3.2. Número promedio de brotes/explante inducidos ($\bar{x} \pm \sigma_M$) bajo diferentes concentraciones de Zeatina y ácido naftalenacético (ANA) a partir de hojas de *Solanum donianum*.

No. de Tratam. (T)	Zeatina (mg/l)	ANA (mg/l)	No. brotes/explante ($\bar{x} \pm \sigma_M$)
T1	0	0	0.00 (± 0.00)
T2	0.5	0	1.00 (± 0.50)
T3	1	0	2.00 (± 0.87)
T4	2	0	4.67 (± 1.59)
T5	3	0	6.17 (± 1.74)
T6	5	0	4.50 (± 1.15)
T7	0	0.02	0.00 (± 0.00)
T8	0.5	0.02	0.00 (± 0.00)
T9	1	0.02	0.17 (± 0.17)
T10	2	0.02	1.83 (± 0.83)
T11	3	0.02	1.83 (± 0.67)
T12	5	0.02	1.00 (± 0.50)
T13	0	0.05	0.00 (± 0.00)
T14	0.5	0.05	0.00 (± 0.00)
T15	1	0.05	0.67 (± 0.44)
T16	2	0.05	0.67 (± 0.17)
T17	3	0.05	1.83 (± 0.88)
T18	5	0.05	1.33 (± 0.17)
T19	0	0.1	0.00 (± 0.00)
T20	0.5	0.1	0.00 (± 0.00)
T21	1	0.1	0.17 (± 0.17)
T22	2	0.1	0.33 (± 0.33)
T23	3	0.1	0.50 (± 0.29)
T24	5	0.1	0.33 (± 0.17)
T25	0	0.2	0.00 (± 0.00)
T26	0.5	0.2	0.00 (± 0.00)
T27	1	0.2	0.00 (± 0.00)
T28	2	0.2	0.00 (± 0.00)
T29	3	0.2	0.00 (± 0.00)
T30	5	0.2	0.00 (± 0.00)

Tabla 3.3. Número promedio de brotes/explante que se obtuvieron con los dos mejores tratamientos.

Repeticiones en tiempo (R)	Tratamiento	Zeatina (mg/l)	ANA (mg/l)	Núm. de brotes/explante ($\bar{x} \pm \sigma_M$)
R1	T4	2	0	4.17(± 0.477)
	T5	3	0	5.67(± 0.667)
R2	T4	2	0	3.33(± 0.422)
	T5	3	0	5(± 0.775)
R3	T4	2	0	6.5(± 1.98)
	T5	3	0	5.58(± 1.72)

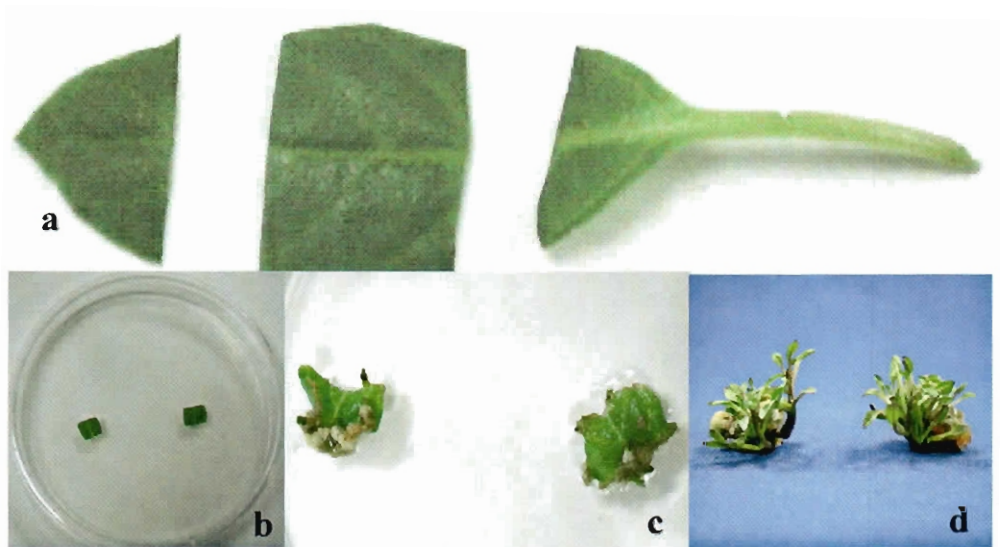


Figura 3.4. Proceso de regeneración *in vitro*. (a) explante de hoja; (b) explantes en medio de cultivo MS suplementado con 3 mg/l de zeatina; (c) explantes con brotes de 15 días; (d) explante con brotes de 30 días

3.4.3. Elongación

A los 9 días fueron obtenidos brotes elongados de buena calidad, listos para su enraizamiento. En esta etapa se obtuvieron un promedio de 4 brotes elongados por explante (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Número promedio de brotes elongados por explante.

Repeticiones (R)*	No. de Brotes elongados	No. de Brotes/ explante ($\bar{x} \pm SD$)
R1	32	4.83 \pm 3.06
R2	23	3.83 \pm 1.72
R3	25	4.17 \pm 2.14

(*) Número de repeticiones del protocolo en el tiempo

3.4.4. Enraizamiento

En el proceso de enraizamiento (ver figura 3.5), se observó que los brotes sembrados bajo las condiciones mencionadas, produjeron una cantidad suficiente de raíces y una buena calidad de hojas, y a los 18 días aproximadamente las plántulas estaban listas para sacarlas al invernadero (Tabla 3.5).



Figura 3.5. a) Organogénesis directa a partir de tejido foliar; b) Elongación y enraizamiento de *Solanum donianum*. (c) brotes elongados a los 47 días de inducción. (d) brotes con raíces a los 18 días listos para su aclimatación a condiciones de invernadero.

Tabla 3.5. Reproducibilidad del protocolo de enraizamiento de los brotes de *Solanum donianum* en el tiempo.

No. de brotes / repetición (R)*	Proporción de brotes enraizados (%)
R1: 10	80
R2: 10	80
R3: 10	90
R4: 10	90

(*) Repetición del protocolo en el tiempo.

3.4.5. Adaptación en condiciones de invernadero de las plantas de *S. donianum* producidas *in vitro*.

Todas las plántulas transferidas sobrevivieron, por lo que se puede decir que el porcentaje de mortalidad fue de cero (ver figura 3.6). A los 30 días, las plantas sembradas en el nebulizador crecieron, se desarrollaron adecuadamente y estuvieron listas para sacarlas a campo. En esta etapa se realizaron 4 repeticiones, las cuales se llevaron a cabo cada 30 días (ver tabla 3.6).



Figura 3.6. Plantas en condiciones de invernadero. (a) plántulas de 30 días; (b) planta de 5 días

Tabla 3.6. Porcentaje de Supervivencia de las plántulas bajo condiciones de invernadero.

Número de plántulas/ Bloque (B)	Supervivencia de las plántulas (%)
B1: 8	100
B2: 8	100
B3: 10	100
B4: 10	100

3.4.6. Comparación de brotes de *S. donianum* con BAP y ZEA

A los 30 días, los explantes tratados con 3 mg/l de ZEA produjeron brotes con tallos alargados y bien formados así como hojas grandes, y con un mayor número de brotes por explante en comparación con la concentración equimolar de 2 mg/l de BAP. La diferencia principal entre estos reguladores de crecimiento fue en relación al número promedio de brotes que produjeron por explante. Con 3 mg/l de ZEA se lograron producir un número promedio aproximado de 6 brotes por explante. En cambio, cuando los explantes de hoja fueron tratados con 2mg/l de BAP se obtuvo un número promedio aproximado de 1 brote por explante. Al comparar el tratamiento con 2 mg/l de ZEA y con 1.3 mg/l de BAP, no hubo diferencia en calidad morfológica de tallos y hojas, sin embargo, la diferencia fue en que con 2 mg/l de ZEA se produjeron un mayor número de brotes en comparación a BAP. Las dos concentraciones de ZEA produjeron un número promedio similar de brotes, sin embargo, los brotes formados con 3 mg/l de ZEA fueron mejores en calidad morfológica de tallos en comparación a 2 mg/l (ver figura 3.6). Es importante hacer mención que estos resultados pueden variar si la concentración de estos dos fitoreguladores disminuye o aumenta. Las observaciones y los resultados finales indicados, únicamente fueron obtenidos de los mejores tratamientos de ZEA y de sus concentraciones equimolares en mg/l de BAP.

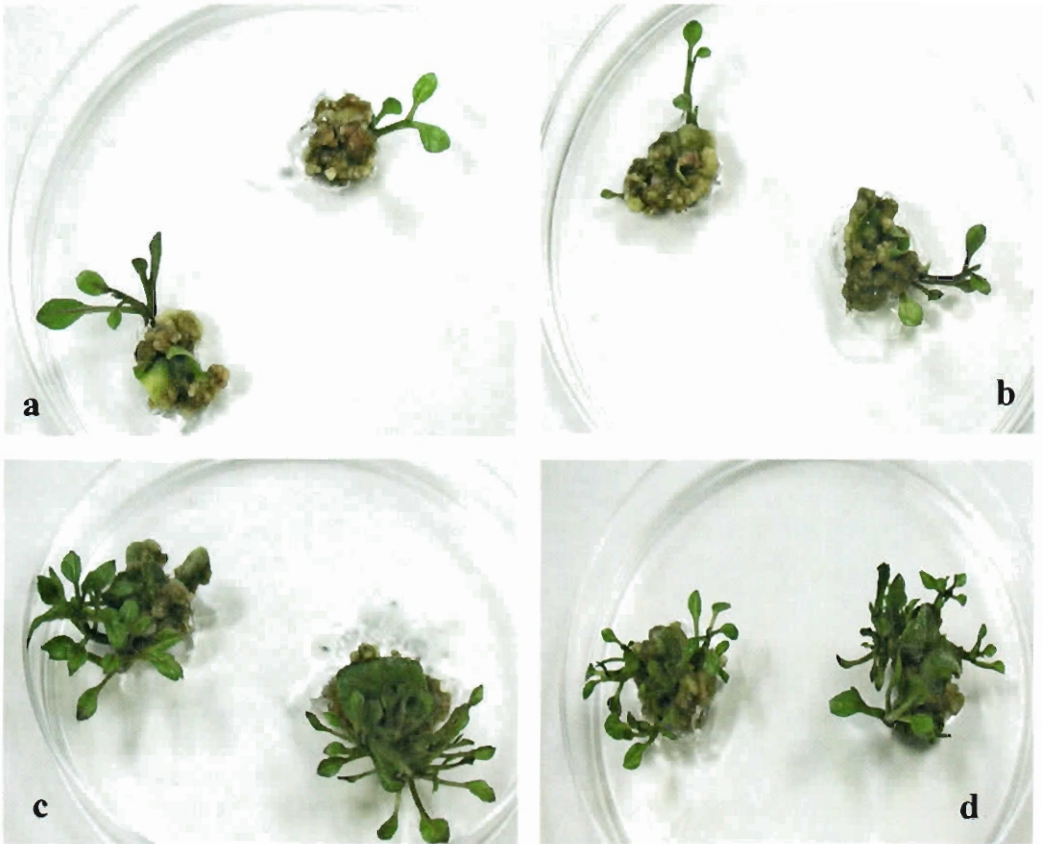


Figura 3.7. Comparación de brotes de *S. donianum* con BAP y Zeatina. (a) explantes tratados con 2 mg/l de BAP; (b) explantes tratados con 1.3 mg/l de BAP; (c) explantes tratados con 3 mg/l de ZEA; (d) explantes tratados con 2 mg/l de ZEA

3.5. DISCUSIÓN

3.5.1 Propagación clonal *in vitro*

Para obtener una buena formación de plántulas se requiere de contar con las condiciones adecuadas para que los nudos logren formarse bien, y de proporcionar buenas hojas y raíces. En trabajos previos sobre la micropagación de algunas especies como *Solanum melongena* L., *Solanum tuberosum* L. se han utilizado plantas de 14 a 35 y de 28 a 42 días (respectivamente) como fuentes de explantes de hojas, y se ha concluido que a esa edad, proporcionan hojas de buena calidad para una eficiente inducción de brotes (Mukherjee et al., 1991; Gustafson et al., 2006). En el presente trabajo se utilizaron hojas (medianas y tiernas) de plántulas con un poco más de edad, de 47 días, en comparación al reportado, pero éstas fueron apropiadas para la regeneración de plantas completas, además produjeron buenos nudos para la micropagación.

3.5.2. Inducción de brotes *in vitro*

Para la inducción de brotes de *Solanum donianum* se buscaron las condiciones adecuadas en la obtención de un buen resultado y cantidad. Para poder determinar las condiciones óptimas en la inducción, se realizaron diferentes experimentos manejando distintas condiciones de intensidad de luz. Finalmente se logró establecer un protocolo para la regeneración de *Solanum donianum*. Las concentraciones usadas fueron similares a las empleadas para la regeneración de *Solanum tuberosum* a partir de sus hojas, sin embargo, las condiciones de temperatura, de luz y de los componentes del medio de cultivo MS manejados fueron diferentes (M. HAMDÍ et al., 1998). Haciendo una comparación entre el número de brotes producidos por explante tanto de *S. donianum* como de *S. tuberosum*, *donianum* produjo un número similar de brotes. Cabe mencionar que con estas dos especies no fue posible hacer una evaluación comparativa real, ya que con ellas no se hicieron experimentos al mismo tiempo. Por lo tanto no existe una respuesta real y concisa para diferenciar resultados obtenidos de la regeneración de *donianum* con respecto a *S. tuberosum* y otras especies. Es importante mencionar como último punto, que las condiciones de luz, temperatura y los componentes del medio de cultivo MS son factores importantes que influyen para que haya una buena inducción. Por otra parte, siguiendo con los resultados que se obtuvieron, de los 30 tratamientos realizados para encontrar la combinación adecuada de fitoreguladores (tanto de Zeatina como de ácido naftalenacético) se observó que el tratamiento con 3 mg/l de ZEA solamente, fue uno de los mejores para inducir la formación de brotes a los 15 días y además generó plántulas con mejores características morfológicas. Por lo tanto, la inducción de brotes de esta especie, fue exitosa.

3.5.3. Elongación

Se evaluó el número promedio de brotes elongados. Las condiciones que se manejaron, en esta etapa, fueron las adecuadas para que los brotes se elongaran a los 9 días. En este experimento no se usó ningún tipo de regulador de crecimiento como en el trabajo publicado por Franklin en el 2004 (sobre la elongación de brotes de *Solanum melongena* L) en donde únicamente se usó medio MS basal. En *Solanum lycopersicum* se ha observado que la presencia de biotina en el medio de inducción incrementa la elongación de brotes (Sheeja et al., 2004). Sin embargo, en el presente trabajo, el medio de cultivo usado sin biotina no produjo un afecto negativo en la elongación, y la cantidad de brotes que se elongaron por explante fue la suficiente para el proceso de enraizamiento.

3.5.4. Enraizamiento

Las condiciones utilizadas para la evaluación del enraizamiento de los brotes fueron más simples en comparación al usado en otros trabajos; según reportes publicados en muchas especies enraizadas se han utilizado medio de cultivo MS a la mitad de la fuerza iónica suplementado con ácido indol-butírico o ácido indol-acético (Gunay et al., 1982; Magioli et al., 1998; Arockiasamy et al., 2002; Jawahar et al., 2004; Sheeja et al., 2004; Borgato et al., 2007) pero en el presente trabajo únicamente se empleó medio de cultivo MS basal. Sin embargo el resultado de enraizamiento fue el deseado. El 87.5% de los brotes individualizados y sembrados *in vitro*, formaron plántulas con raíces y hojas apropiadamente a los 18 días.

3.5.5. Adaptación de las plantas de *S. donianum* producidas *in vitro* a las condiciones de invernadero

Para la adaptación de las plantas en el invernadero fue necesario buscar el sustrato apropiado para el crecimiento y la adaptación de las plantas. El sustrato que se usó está compuesto de agrolita, tierra y peat muss (1:1:1). En muchos trabajos publicados se han utilizado otros tipos de sustrato (solución de Hoagland, soilrite, etc.) en la adaptación de plantas regeneradas de otras especies. Sin embargo, en el presente trabajo se empleó el sustrato mencionado arriba, y se observó que las plantas tuvieron una buena respuesta y no hubo la necesidad de emplear otros. El 100% de las plantas sembradas bajo estas condiciones se desarrollaron exitosamente a los 30 días.

3.5.6. Comparación de brotes de *S. donianum* con BAP y ZEA

De acuerdo con los resultados observados, probablemente el mejor regulador de crecimiento que se recomienda (por lo menos en esta especie) para la inducción de un buen número de brotes y con mejores características morfológicas, es la Zeatina. Este resultado fue observado y cuantificado únicamente con el mejor tratamiento de ZEA seleccionado en comparación a su concentración equimolar (0.00577mM) con BAP.

También es importante hacer mención que este resultado puede variar en calidad y cantidad de brotes si se aumenta la concentración de BAP en comparación a ZEA. En muchos reportes previos, tanto la Zeatina como el BAP han sido utilizados en muchos trabajos para la regeneración tanto de *Solanum tuberosum* como de *S. melongena*. Sin embargo, se han comprobado que la Zeatina + AIA da mejores resultados en comparación con BAP + ANA en la inducción de brotes de tomate (Gubis et al., 2004). Pero, en otras especies como *Solanum trilobatum* L. y *Solanum tuberosum* L. se ha utilizado el BAP, y se ha obtenido mejores resultados en la inducción de brotes (Opatrna et al., 1997; Arockiasamy et al., 2002; Jawahar et al., 2004). El resultado también tiene mucho que ver con el tipo de explante que se maneja. En el presente trabajo se concluye que la Zeatina sin ácido naftalenacético (ANA) dió una respuesta eficiente en la inducción de brotes de *Solanum donianum* y no fue necesario hacer una combinación de las dos, mientras BAP produjo brotes con malas características morfológicas de tallos y hojas.

3.6. El protocolo para la regeneración *in vitro* de *Solanum donianum*

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se ha propuesto un nuevo protocolo de regeneración de plantas de *Solanum donianum* que permitirá su micropropagación *in vitro* (ver figura 3.5).

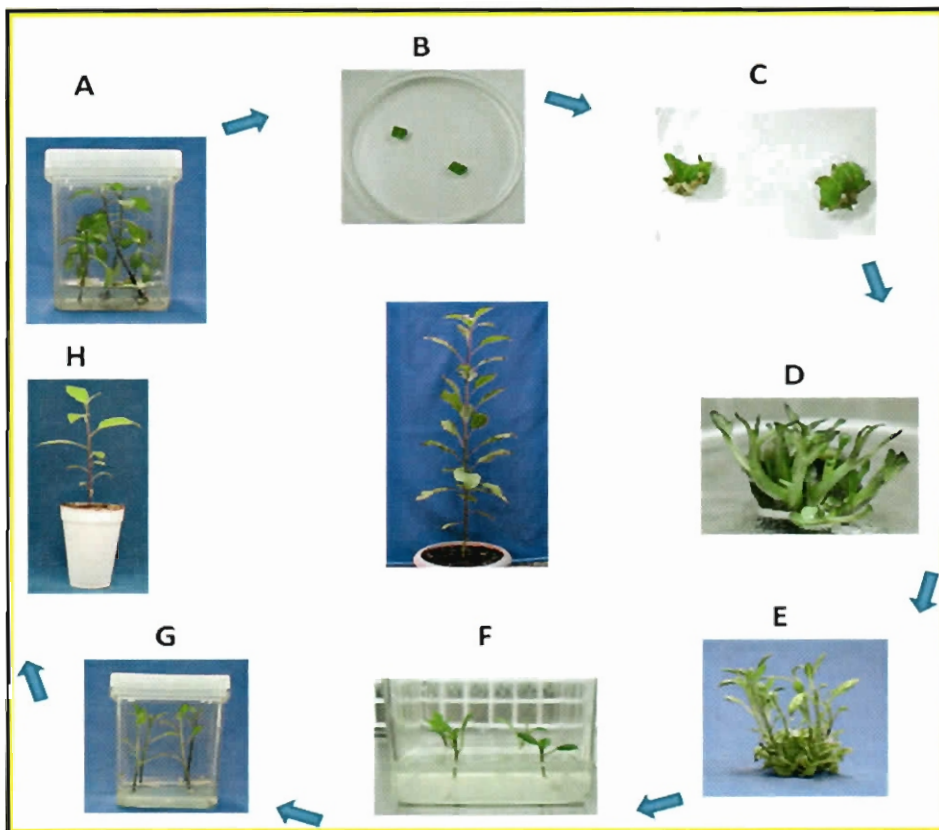


Figura 3.8. El protocolo para la regeneración *in vitro* de *Solanum donianum*. **A)** Multiplicación de plantas (medio MS sin reguladores de crecimiento); **B)** Inducción de brotes (MS +3 mg/l ZEA); **C)** Brotes en medio de inducción a los 15 días, **D)** Brotes de 30 días, **E)** Brotes elongados durante 9 días (medio MS sin reguladores de crecimiento); **F)** Enraizamiento de brotes durante 18 días (medio MS sin reguladores de crecimiento); **G)** Plántulas obtenidas a los 18 días listas para su adaptación en invernadero, **H)** Planta con 30 días de edad en invernadero (sustrato usado: agrolita, tierra y peat-muss, 1:1:1,).

Este presente trabajo representa un gran progreso en la micropropagación y regeneración de *S. donianum* para realizar análisis funcional de genes en el futuro.

3.7. BIBLIOGRAFÍA

Gunay L. Alka y Rao P.S. (1986). Plant Regeneration from cultured Hypocotyl Explants of Diploid and Tetraploid *Solanum khasianum* Clarke. Plant Cell Reports, Vol.1, pp. 202 - 204.

Reynolds Thomas L. (1986). Pollen embryogenesis in anther cultures of *Solanum carolinense* L. Plant Cell Reports, Vol. 5, pp. 273-275.

Guri A., Volokita M. y Sink K. C. (1987). Plant regeneration from leaf protoplasts of *Solanum torvum*. Plant Cell Reports, Vol. 6, pp. 302-304.

Lakshmana Rao P.V. y Singh B. (1991). Plantlet regeneration from encapsulated somatic embryos of hybrid *Solanum melongena* L. Plant Cell Reports, Vol.10, pp. 7-11.

Annie Liu T.-H., Stephens Loren C. y Hannapel David J. (1995). Transformation of *Solanum brevidens* using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, Vol.15, pp. 196-199.

Sharma Pankaj y V. Rajam Manchikatla (1995). Genotype, explant and position effects on organogenesis and somatic embryogenesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). Journal of Experimental Botany, Vol. 46, N° 282, pp. 135-141.

Magioli C., M. Rocha A.P., de Oliveira D.E. y Mansur E. (1998). Efficient Shoot organogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.) induced by thidiazuron. Plant Cell Reports, Vol. 17, pp. 661-663.

M. HAMDÍ. M., Ceballos E., Ritter E. y Ruiz de Galarreta J.I. (1998). Evaluación de la capacidad de regeneración en *Solanum tuberosum* L. Invest. Agr: Prod. Prot. Veg., Vol 13. 160-166.

JayaSree T., Pavan U., Ramesh M., Rao A. V., Mohan Reddy K. Jagan y Sadanandam A. (2001). Somatic embryogenesis from leaf cultures of potato. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Vol. 64, pp. 13-17.

Arockiasamy D.I., Muthukumar B., Natarajan E. y Britto S. John (2002). Plant Regeneration from node and Internode Explants of *Solanum trilobatum* L. Plant Tissue Cult, Vol.12 (2), pp. 93-97.

Coile Nancy C. y Garland Mark A. (2003). Notes on Florida's Endangered and Threatened Plants. Cuarta edición. Plant Industry, pp. 1- 127.

Ghaffoor Abdul, Baharshah Gul y Waseen Kashif (2003). In vitro Response of potato (*Solanum tuberosum* L.) to Various Growth Regulators. Biotechnology, Vol.2 N° 3, pp. 191-197.

Zamora Crescencio Pedro (2003). Contribución al estudio Florístico y Descripción de la Vegetación del Municipio de Tenabo, Campeche, México. Polibotánica, N° 15, pp. 1-40.

Akbar Anjun Muhammad y Ali Hakoomat (2004). Effect of culture Médium on Direct Organogenesis from Different Explants of Various Potato Genotypes. Biotechnology. Vol. 3(2), pp. 187-193.

Franklin G., Sheeba C.J. y Lakshmi Sita G. (2004). Regeneration of Eggplant (*Solanum melongena* L.) from Root Explants. Biol- Plant. Vol. 40, pp.188-191.

GuBIS Jozet, Lajchová Zuzana, Faragó Juraj y Jureková Zuzana (2004). Effect of growth Regulators on shoot induction and plant regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). Biología, Bratislava. Vol.59/3, pp. 405-408.

Jawahar, M., Rabert G. Amalan y Jeyaseelan M. (2004). Rapid Proliferation of Multiple Shoots in *Solanum trilobatum* L. Plant Cell Reports. Vol.14(2), pp. 107-112.

Sheeja T.E., Mondal Asit B. y S. Rathore R. K. (2004). Efficient Plantlet Regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Plant Cell Reports. Vol.14 (1), pp. 45-53.

Swamy N. Rama, Ugandhar T., Praveen M., Venkataiah P., Rambabu M., Upender M. y Subhashk (2004). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledon and leaf explants of *Solanum surattense*. Indian Journal of Biotechnology, Vol. 4, pp. 414-418.

Magioli Claudia y Mansur Elisabeth (2005). Eggplant (*Solanum melongena* L.) : tissue culture, genetic transformation and use as an alternative model plant. Acta bot. bras., Vol. 19(1), pp. 139-148.

González José. (2006). Flora Digital de la Selva. Organización para Estudios Vegetales, pp.1-21

Gustafson V., Mallubhotlas S., MacDonnall J., Sanyal-Bagchi M., Chakravarty B., Wang Pruski G., Rothwell C., Audy P., Dekoeyer D., Siahbazi M., Flinn B. y Regan S. (2006). Transformation and plant regeneration from leaf explants of *Solanum tuberosum* L. c.v "Strepody". Springer, Vol. 85, pp. 361-366.

Borgato L., Pisani F. y Furini A. (2007). Plant regeneration from leaf protoplasts of *Solanum virginianum* L. (*Solanaceae*). Plant Cell Tiss Organ Cult, Vol. 88, pp. 247-252.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

4.1. Conclusiones generales

Se logró establecer por primera vez un protocolo para la regeneración de *Solanum americanum*. En la inducción de brotes fueron utilizados explantes de hojas, los cuales respondieron de manera diferente a las distintas combinaciones y concentraciones de Zeatina y ANA. El tratamiento más adecuado se seleccionó con base en su reproducibilidad y una producción de brotes con mejores características morfológicas; los brotes inducidos (por el mejor tratamiento) no tuvieron problemas en la elongación y enraizamiento en medio MS sin reguladores de crecimiento. Las plantas regeneradas y sembradas en condiciones de invernadero, sobrevivieron a los 30 días en un 100%. Por lo tanto, se concluye que el proceso de regeneración de esta especie se desarrolló exitosamente.

En el caso de *Solanum donianum*, el proceso de regeneración fue similar al de *Solanum americanum*, la diferencia está en las intensidades de Luz y el tiempo de exposición de los explantes bajo estas condiciones. Sin embargo, a pesar de las diferencias que hay, se logró también desarrollar un protocolo para la inducción de brotes y llevarlos hasta la etapa de adaptación de plantas completas en el invernadero.

En el proceso de inducción con los mejores tratamientos seleccionados, en las dos especies empezaron a formar pequeños brotes a los 15 días aproximadamente, aunque con *Solanum donianum* únicamente se utilizó Zeatina, pero la respuesta en el tiempo de inducción fue similar. Con *Solanum americanum* se logró un protocolo eficiente para la inducción de brotes, la cantidad de ellos por explante fueron superiores en comparación al número de brotes que se produjeron en la otra especie. Sin embargo, la calidad de los brotes inducidos por los mejores tratamientos, tanto en *Solanum americanum* como en *Solanum donianum*, fueron iguales en características morfológicas.

La morfogénesis *in vitro* de estas dos especies fue mediante organogénesis, al igual que la mayoría de las especies del género *Solanum* reportadas en trabajos previos sobre regeneración *in vitro*. En la mayoría de los artículos publicados, el tipo de regeneración que más se ha logrado es el de organogénesis indirecta, sin embargo en este trabajo se logró una organogénesis probablemente directa ya que los brotes se forman directamente del explante (segmento de hoja) sin pasar por el proceso de callogénesis.

Según las diferentes respuestas que se obtuvieron (figuras 2.3 y 3.3) en *S. americanum*, la concentración de Zeatina y de ANA determina la respuesta morfogénica. Sin embargo, en el caso de *Solanum donianum* es distinto, ya que, de acuerdo con este trabajo, únicamente se requiere Zeatina para obtener buenos

brotos. Por lo tanto, ciertamente, el tipo de especie y el balance de auxinas y citocininas determinan el tipo de respuesta morfogénica.

4.2. Perspectivas

Se lograron los protocolos de propagación *in vitro* y regeneración en las dos especies, por lo que es posible realizar a futuro estudios de transformación en estas plantas. Para ello deben establecerse los protocolos de transformación genética.

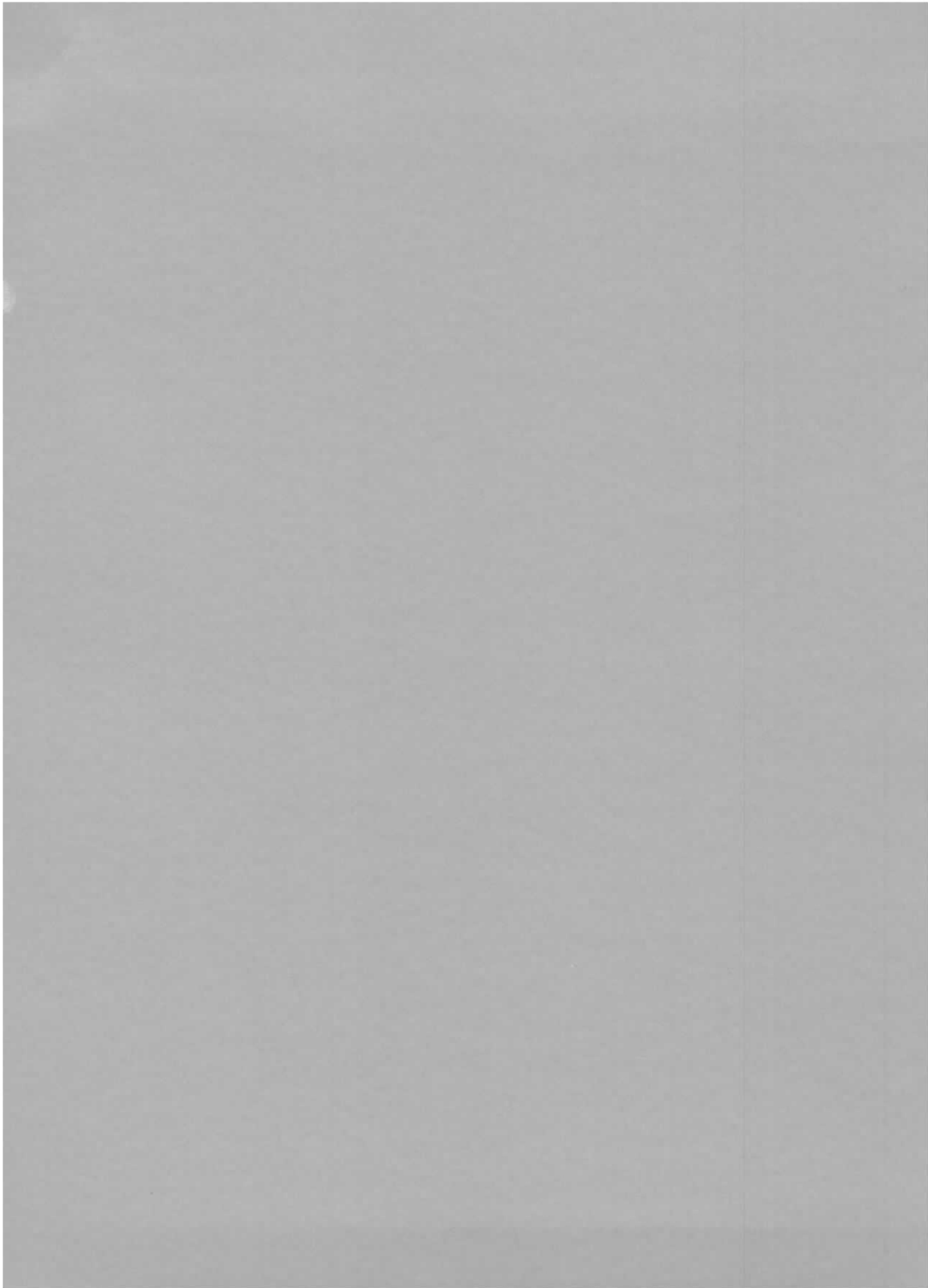
También sería interesante realizar cortes histológicos para conocer el origen de los brotes y determinar el tipo de organogénesis, tanto en *Solanum americanum* como en *Solanum donianum*.

ANEXO 1

Medio de Murashige y Skoog (MS)

COMPONENTES	Cantidades a pesar para preparar X cantidad de medio de cultivo			
	1000 ml	500ml	250 ml	100 ml
Sales del MS	4.31 g	2.16 g	1.08 g	0.43 g
Myo-inositol	100 mg (0.1 g)	50 mg(0.05 g)	25 mg (0.025 g)	10 mg (0.010 g)
Tiamina (1 mg/ml)	100µl	50 µl	25 µl	10 µl
Piridoxina (1 mg/ml)	500 µl	250 µl	125 µl	50 µl
Acido nicotínico (1 mg/ml)	500 µl	250 µl	125 µl	50 µl
Glicina (1 mg/ml)	2000 µl	1000 µl	500 µl	200 µl
Sacarosa	30 g	15 g	7.5 g	3 g
Gel-rite	2 g	1 g	0.5 g	0.2 g
pH	5.8			







CICY

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.