



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



---

---

**QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**



**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA

**MARÍA LUISA GALICIA ESPINOSA**

**“Influencia del análogo del brasinoesteroide BSS4 en  
el desarrollo de plántulas de *Laelia anceps*”**

DIRECTORES

**DRA. MARICELA RODRÍGUEZ ACOSTA**

**DR. JESÚS SANDOVAL RAMÍREZ**

Octubre de 2014

### **Agradecimientos académicos**

A la Dra. Maricela Rodríguez, por sus enseñanzas y consejos no solo como directora sino como ser humano, por brindarme la confianza para realizar nuevos proyectos en el Jardín Botánico.

Al Dr. Jesús Sandoval Ramírez por su apoyo para la realización de este trabajo en conjunto como asesor y sumar más esfuerzos a favor de mi crecimiento académico.

A mis sinodales la Dra. Isabel, la Dra. Socorro y la Dra. Penélope por sus valiosas aportaciones que dieron un acabado más esmerado de mi tesis.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por haber otorgado el apoyo para la realización de este trabajo.

**María Luisa Galicia Espinosa**

### **Agradecimientos personales**

Primero que nada a mi Dios por haberme permitido realizar mi sueño, no dejarme vencer y seguir adelante, por que hicimos un pacto y yo solo sigo escuchando en el silencio de su presencia. Gracias por estar conmigo siempre.

Al amor de mi vida, Ximena, porque nunca podré remplazar el tiempo sin ti, pero mi trabajo es la muestra de que aunque no esté contigo todo lo hago por ti, mi mundo tomó sentido y eres el motor más grande y fuerte que tengo en esta tierra, te amo mi niña.

A mis padres Adrianita y Chavita, por que sin ellos no hubiera cumplido mis sueños, porque un día me dijeron que todos íbamos a sacrificar un poco de nuestros días por hacer que mis días se tornaran menos difíciles y ha sido para mí la muestra más grande de amor que han tenido para conmigo y para con mi hija, perdóneme, los amo con todo el corazón.

A mis hermanos, Margarita, Adriana, Salvador y Gloria porque nunca me han dejado sola, los he tenido siempre y aun cuando hay adversidades nunca he dejado de quererlos. A mi sobrina Sofía y a bebé por ser ángeles para mi hija y llenar su vida de alegría.

A mi novio Héctor, porque llegaste a mi vida llenándola con tu grata compañía, dándome tu incondicional apoyo, amor y cariño, sabes que es mutuo, por jamás soltarme... gracias cariño mío.

A mis amigos y familiares por su inmenso apoyo y por creer en mí, gracias por estar con mi familia y conmigo.

**María Luisa Galicia Espinosa**

Índice General		
Capítulo	Contenido	Página
	Índice de Figuras	IV
	Índice de Gráficas	V
	Índice de Tablas	VI
	Resumen	VII
<b>I</b>	Introducción	1
	I.1 Hormonas vegetales de crecimiento	2
	I.2 Brasinoesteroides	5
	I.3 Estructura Química	7
	I.4 Actividad Biológica	8
	I.5 Localización y Mecanismo de acción de los brasinoesteroides en la célula.	9
<b>II</b>	Estructura y actividad biológica de las Auxinas	11
<b>III</b>	Estructura y actividad biológica de las Citocininas	12
<b>IV</b>	Sinergismo	13
<b>V</b>	<i>Laelia anceps</i> como planta de estudio.	14
	V.1 Origen y descripción	14
	V.2 Descripción morfológica de <i>Laelia anceps</i>	16
	V.3 Importancia del cultivo de <i>Laelia anceps</i>	18
<b>VI</b>	Antecedentes	19
<b>VII</b>	Justificación	23
<b>VIII</b>	Objetivo	24
	VIII.1 General	24
	VIII.2 Especifico	24
<b>IX</b>	Hipotesis	25
<b>X</b>	Diseño experimental	26
<b>XI</b>	Material y Reactivos	27
<b>XII</b>	Material Químico	28
<b>XIII</b>	Metodología	29
	XIII.1 Primera etapa	29
	XIII.2 Segunda Etapa	30
	XIII.3 Tercera etapa	32
	XIII.4 Cuarta etapa	32
<b>XIV</b>	Diagrama de Flujo	33
<b>XV</b>	Resultados	34
<b>XVI</b>	Evaluación a los 30 días	34
	XVI.1 Peso fresco a los 30 días	35
	XVI.2 Numero de hojas a los 30 días	38
	XVI.3 Altura a los 30 días	41
	XVI.4 Numero de raíces a los 30 días	44
<b>XVII</b>	Evaluación a los 60 días	47
	XVII.1 Peso fresco a los 60 días	48
	XVII.2 Numero de hojas a los 60 días	51
	XVII.3 Altura a los 60 días	54
	XVII.4 Numero de raíces a los 60 días	57
<b>XVIII</b>	Discusión de resultados	60
<b>XIX</b>	Conclusiones	67
<b>XX</b>	Referencias	68
<b>XXI</b>	Anexos	73

<b>Figura</b>	<b>Leyenda</b>	<b>No. de página.</b>
<b>Figura No 1.</b>	Primeros brasinoesteroides naturales caracterizados.	6
<b>Figura No 2.</b>	Estructura química de la brasinólida.	7
<b>Figura No 3.</b>	Vía de señalización de los BR.	10
<b>Figura No 4.</b>	Estructura de la Auxina.	11
<b>Figura No 5.</b>	Estructura de la Citocinina.	12
<b>Figura No 6.</b>	a) Parte radicular, b) Rizoma, Pseudobulbos, c) Hojas solitarias.	16
<b>Figura No 7.</b>	Estructura de la flor de <i>Laelia anceps</i> .	16
<b>Figura No 8.</b>	Estigma y ovario.	17
<b>Figura No 9.</b>	Estructura de análogo de brasinoesteroide BSS4.	22
<b>Figura No 10.</b>	Plántula de <i>Laelia anceps</i> .	27
<b>Figura No 11.</b>	Incremento con respecto al control en el peso fresco de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a los 60 días en T1 en la concentración 0.001 mg/L.	61
<b>Figura No 12.</b>	Incremento con respecto al control en el peso fresco de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a los 60 días en T4 en la concentración 0.1 mg/L.	61
<b>Figura No 13.</b>	Incremento con respecto al control en el número de hojas de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a los 60 días en T3 en la concentración 0.001 mg/L.	63
<b>Figura No 14.</b>	Porcentajes de incremento con respecto al control en el número de hojas de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a los 60 días en T2 y T4 en la concentración 0.01 mg/L.	63
<b>Figura No 15.</b>	Porcentajes de incremento con respecto al control en el número de hojas de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a los 60 días en T4 en la concentración 0.01 mg/L.	63
<b>Figura No 16.</b>	Incremento con respecto al control en el número de hojas de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a los 60 días en T2 y T4 en la concentración 0.01 mg/L.	65

<b>Tabla</b>	<b>Leyenda</b>	<b>No. de página.</b>
<b>Tabla No 1.</b>	Características más importantes de las fitohormonas.	3
<b>Tabla No 2.</b>	Clasificación científica de <i>Laelia anceps</i> .	14
<b>Tabla No 3.</b>	Especificaciones químicas de los reguladores de crecimiento.	28
<b>Tabla No 4.</b>	Unidades experimentales y número total de Plántulas por tratamiento	31
<b>Tabla No 5.</b>	Resultados del peso fresco de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a 30 días de iniciado el experimento	35
<b>Tabla No 6.</b>	Resultados del numero de Hojas de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a 30 días de iniciado el experimento.	38
<b>Tabla No 7.</b>	Resultados en Altura de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a 30 días de iniciado el experimento	41
<b>Tabla No 8.</b>	Resultados en el no. de raíces de <i>Laelia anceps</i> a 30 días de iniciado el experimento.	44
<b>Tabla No 9.</b>	Resultados del peso fresco de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a 60 días de iniciado el experimento.	48
<b>Tabla No 10.</b>	Resultados del número de hojas de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a 60 días de iniciado el experimento.	51
<b>Tabla No 11.</b>	Resultados en la Altura de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a 60 días de iniciado el experimento.	54
<b>Tabla No 12.</b>	Resultados en el número de raíces de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a 60 días de iniciado el experimento.	57
<b>Tabla No 13.</b>	Medio Murashige and Skoog	74
<b>Tabla No 14.</b>	Concentraciones stock para la preparación de medio MS	75

<b>Grafica</b>	<b>Leyenda</b>	<b>No. de página.</b>
<b>Gráfica No 1.</b>	Porcentajes de incremento del día inicial al día 30 en el peso fresco en plántulas de <i>Laelia anceps</i> a la concentración A) 0.001 mg/L, B) 0.01mg/L, C) 0.1mg/L.	36
<b>Grafica No 2.</b>	Porcentajes de incremento del día inicial al día 30 en el número de Hojas de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a la concentración A) 0.001 mg/L, B) 0.01mg/L, C) 0.1mg/L.	39
<b>Grafica No 3.</b>	Porcentajes de incremento del día inicial al día 30 en la Altura de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a la concentración A) 0.001 mg/L, B) 0.01mg/L, C) 0.1mg/L.	42
<b>Grafica No 4.</b>	Porcentajes de incremento del día inicial al día 30 en el número de Raíces de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a la concentración A) 0.001 mg/L, B) 0.01mg/L, C) 0.1mg/L.	45
<b>Grafica No 5.</b>	Porcentajes de incremento del día inicial al día 60 en el Peso fresco de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a la concentración A) 0.001 mg/L, B) 0.01mg/L, C) 0.1mg/L.	49
<b>Grafica No 6.</b>	Porcentajes de incremento del día inicial al día 60 en el número de hojas de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a la concentración A) 0.001 mg/L, B) 0.01mg/L, C) 0.1mg/L.	52
<b>Grafica No 7.</b>	Porcentajes de incremento del día inicial al día 60 en la Altura de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a la concentración A) 0.001 mg/L, B) 0.01mg/L, C) 0.1mg/L.	55
<b>Grafica No 8.</b>	Porcentajes de incremento del día inicial al día 60 en el número de raíces de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a la concentración A) 0.001 mg/L, B) 0.01mg/L, C) 0.1mg/L.	58
<b>Grafica No 9.</b>	Porcentajes de incremento con respecto al control en el peso fresco de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a los 60 días en la concentración 0.001 mg/L.	60
<b>Grafica No 10.</b>	Porcentajes de incremento con respecto al control en el peso fresco de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a los 60 días en la concentración 0.1mg/L.	60
<b>Grafica No 11.</b>	Porcentajes de incremento con respecto al control en el número de hojas de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a los 60 días en la concentración 0.001 mg/L.	62
<b>Grafica No 12.</b>	Porcentajes de incremento con respecto al control en el número de hojas de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a los 60 días en la concentración 0.01 mg/L.	62
<b>Grafica No 13.</b>	Porcentajes de incremento con respecto al control en el número de raíces de plántulas de <i>Laelia anceps</i> a los 60 días en la concentración 0.01 mg/L.	64

## Resumen

Los brasinoesteroides, como un nuevo tipo de fitohormona, se han evaluado en múltiples bioensayos para mostrar su efecto en el desarrollo de las plantas principalmente de uso comestible y de forraje de los cuales se han obtenido resultados favorables, mejorando su respuesta cuando los análogos de brasinoesteroides se combinan con otras hormonas.

Es por eso que en la presente investigación se plantea el uso de reguladores de crecimiento vegetal en plántulas de *Laelia anceps*, una planta ornamental de alto valor en condiciones *in vitro*, para conocer el efecto de este en el desarrollo de la misma, con el objetivo de reducir los tiempos de estancia en el laboratorio.

## I. Introducción

Las orquídeas son una amplia familia con 800 géneros y 35,000 especies, las cuales poseen una gama extraordinaria de flores hermosas de diversos tamaños colores y formas que en su mayoría son de larga duración. México ha registrado 1254 especies y 21 taxones sub específicos de los cuales un 35% de estas son endémicas en especie y un 8% en género (Hágsater and Arenas 1998). En los mercados internacionales el cultivo de orquídeas es un negocio que cubre alrededor del 8% del comercio de la floricultura a nivel mundial impactando en la economía de un país. (Singh, Sherpa et al. 2007).

Las orquídeas se cultivan principalmente como plantas ornamentales y se valoran como flor cortada no sólo debido a su exótica belleza, sino también por su larga vida en estantería. En la actualidad, los países que mayormente las cultivan son: Tailandia, Australia, Singapur y Malasia principalmente. Su propagación se hace a través de semillas, las cuales son producidas en grandes números en cada cápsula, son muy frágiles y prácticamente no poseen alimento almacenado o endospermo (Mitra 1971). En la naturaleza no pueden utilizar sus propias reservas de lípidos escasas, descomponen el almidón o emplean la fotosíntesis. Después de la absorción de agua, lo que provoca hinchazón, las semillas de la orquídea pueden ponerse de color verde pero no para desarrollarse aún más en ausencia de infección fúngica, conocida como germinación simbiótica (McKendrick 2000).

Para la propagación de orquídeas tropicales se recurre a la germinación asimbiótica siendo el medio de cultivo más complejo que el empleado para la germinación simbiótica puesto que los nutrientes orgánicos e inorgánicos y las fuentes de carbono deben estar lo más disponibles para la planta de una manera regulada y ajustada en ausencia de la micorriza específica para promover la germinación (McKendrick 2000).

## I.1 Hormonas vegetales de crecimiento

Uno de los aspectos más importantes en la propagación *in vitro* de orquídeas es la intervención de algunas fitohormonas y reguladores de crecimiento como son auxinas y citocininas de tipo natural y sintético así como las vitaminas y el inositol para un adecuado desarrollo. Recientemente se ha visto que los brasinosteroides también se han utilizado como reguladores del crecimiento en orquídeas. Morel en 1964 (Fonnesbech 1972), indicó que en los explantes de ápices de orquídea del género *Cymbidium* que fueron cultivados *in vitro* desarrollaron un tipo bulbillo de embrión muy parecido a un protocormo, logrando desarrollarse y proliferarse como una nueva plántula. Así mismo si estos protocormos se fragmentan y se vuelven a cultivar da lugar a más protocormos.

Se llega a estimar que es posible producir alrededor de 4 millones de plantas en un año con el método antes mencionado por Morel utilizando un solo explante, pero no es la única manera de reproducir orquídeas de forma masiva, también se recurre al cultivo de meristemas como una buena alternativa de propagación libre de enfermedades provocadas por virus.

Tabla No. 1, Se listan las características más importantes de las fitohormonas.

<b>CARACTERÍSTICAS MÁS IMPORTANTES DE LAS FITOHORMONAS</b>	
<b>FITOHORMONAS</b>	
Auxinas	
Citocininas	Terrestres
Giberelinas	Acuáticas
Ácido abscísico	Geófitas
Etileno	Arbustivas
Jasmonatos	Desérticas
Ácido salicílico	
Brasinoesteroides	
Poliaminas	
<b>INTERACCIÓN Y RESPUESTA</b>	
Crecimiento	
Desarrollo y Diferenciación	Citocininas
Ontogenia de la planta	Auxinas
<b>ESTRUCTURA</b>	
Simple	
No asociación con proteínas	Etileno
Algunos son gases	
<b>ACCIÓN</b>	
No específico	
A corto y largo plazo	Brasinoesteroides en polinios
En mismo sitio de síntesis	
<b>SINERGISMO</b>	
Expresión morfogénica	Auxinas y Citocininas
	Brasinoesteroides y Auxinas
<b>REGULADORES DE CRECIMIENTO</b>	
Efectos similares a la hormona	Auxina sintética (NAA)
Respuesta intensa	Citocinina sintética (BAP)
Reconocidos por receptores de fitohormonas	Análogo de BR (aBSS4)

**FUENTE:** Jordán, M., & Casaretto, J. (2006).

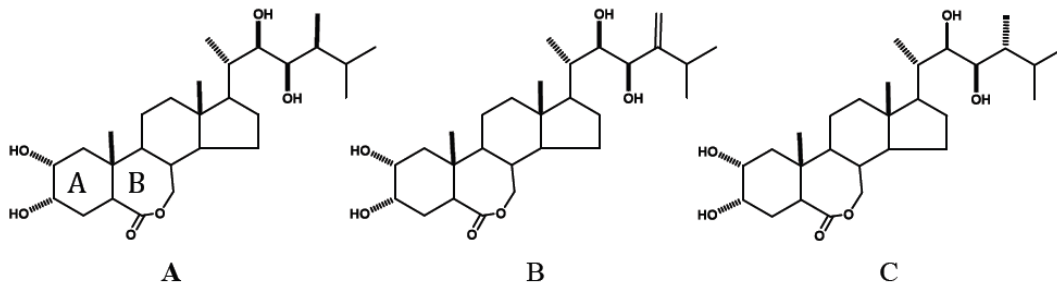
Las hormonas presentes en las células de las plantas permiten que desarrollen diferentes rutas morfogénicas que pueden lograrse dependiendo de la ontogenia de la planta. Lo más recurrente es que la célula en potencial crecimiento promovido por la acción de diferentes fitohormonas den lugar a división y elongación celular, pero se ha observado que en condiciones *in vitro* estas mismas células llevan a cabo procesos de diferenciación con ciertos niveles hormonales, por ejemplo la generación de elementos xilemáticos con la combinación de auxinas con citocininas (Jordán and Casaretto 2006).

En este proyecto se busca evaluar el efecto de un regulador de crecimiento sintético como lo es el aBSS4 en el crecimiento de las plántulas de orquídeas en condiciones *in vitro* cuando se aplica directamente al medio de cultivo y cuando este se combina con otros reguladores frecuentemente utilizados en el cultivo *in vitro*. Algunos reguladores de crecimiento como NAA y BAP han sido muy estudiados, sin embargo se desconoce si el análogo de brasinosteroide aBSS4 tiene un efecto en el crecimiento de las plántulas cultivadas *in vitro* y cómo reaccionará cuando se combine con otros reguladores de crecimiento. De lograrse un incremento en el crecimiento de las plántulas se demostraría que este análogo no solo puede utilizarse en cultivos alimenticios como el maíz, frijol y jitomate, sino que también podría utilizarse sin riesgo alguno en el cultivo de plantas ornamentales.

## I.2 Brasinoesteroides

El descubrimiento de compuestos que promueven el crecimiento de plantas que posteriormente se demostró eran esteroides (McKendrick 2000), se llevó a cabo de forma independiente por la investigación en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y de la Universidad de Nagoya en Japón (Yokota 1997). En un esfuerzo para aislar nuevas hormonas vegetales, Mitchell y sus colaboradores en el departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) obtuvieron un camión cargado de 227 kg de polen de *B. napus* para extraer con una extensa columna cromatografía la partes más activas los cuales fueron denominado “brassins” (Steffens 1991). El resultado neto fue de 4 mg de una sustancia pura que fue identificado por análisis de rayos X, una lactona esteroideal, que fue nombrado brasinolida (Grove, Spencer et al. 1979). Los Brassins tenían un efecto marcado en un bioensayo con elongación y división celular en el grano de segundo entrenudo del frijol (Mandava 1988), y se encontraron aumento en los rendimientos cuando fue rociado en plantas jóvenes de rábanos, hortalizas de hoja y papa. Basandose en estos datos preliminares, Mandava y colaboradores habían atribuido el estado hormonal a los “brassins” puesto que son compuestos orgánicos translocables específicos aislados de una planta, ellos predijeron incorrectamente que el componente activo de los brassins era un éster de ácido graso (Mitchell, Mandava et al. 1970).

El primer compuesto esteroidal de carácter hormonal caracterizado se aisló e identificación del primer compuesto. La brasinolida (BL) se aisló y se en 1979, castasterona (CS) en 1982 y posteriormente muchos otros compuestos afines. Figura No. 1.



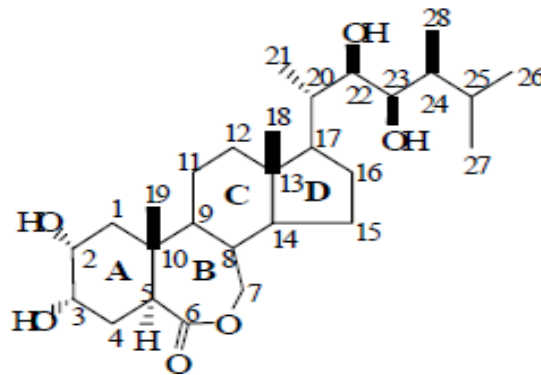
**Figura 1 Primeros brasinoesteroides naturales caracterizados.**

En la figura 1 se muestran algunos de los primeros brasinoesteroides naturales caracterizados como la A) Brasinólida; B) Dolicólida y C) Epibrasinólida.

En un período de dos años, la brasinolida (BL) y su isómero estéreo, 24 - epiBL, había sido sintetizado químicamente, eliminando la necesidad de extraer de manera masiva esta fitohormona de la planta. Con un amplio compuesto sintético en la mano, en la década de 1980 las investigaciones se enfocaron en determinar si los BR ejercían efectos fisiológicos con el fin de aplicar esta hormona en pruebas de invernadero y campo para mejorar el rendimiento de los cultivos (Cutler, Yokota et al. 1991). Las pruebas genéticas y bioquímicas fueron importantes para evaluar el crecimiento normal de la planta y su desarrollo por lo que los BR fueron rápidamente aceptados por la mayoría de los científicos como una nueva clase de hormona vegetal y el número de investigadores que estudian su actividad comenzó a aumentar.

### I.3 Estructura química

Los brasinoesteroides son polihidroxiesteroides de 27-29 átomos de carbono, y se encuentran en el reino vegetal distribuidos a muy bajas concentraciones considerándose la sexta hormona vegetal por su mecanismo de acción y pueden ser sintetizados químicamente. A continuación se muestra en la Figura 2 la estructura química. (Zullo and Adam 2002).



**Figura 2 Estructura química de la brasinólida.** Se muestran los anillos con el número de carbonos correspondiente.

Los Brasinoesteroides se encuentran de forma endógena, son esenciales para el crecimiento normal de la planta y el desarrollo, inducen la elongación celular, la división y el alargamiento, lo que resulta en engrosamiento y curvatura, así como el incremento de la actividad de la polimerasa de ADN y ARN (Saenz 2005). En varios sistemas, los brasinoesteroides interactúan en forma sinérgica con las auxinas. Por otra parte, la respuesta de los brasinoesteroides y las giberelinas parecen ser ambas independientes y aditivas. En sistemas para citocininas, los brasinoesteroides actúan de varias formas. De acuerdo con esto, los brasinoesteroides pueden funcionar como auxinas en un momento y como giberelinas o citocininas en otro. Por otra parte se ha demostrado que los brasinoesteroides estimulan la producción de etileno inducidas por las auxinas, aumentan la tolerancia a la temperatura, agua, la salinidad y el estrés. Ellos se observan en muchas especies del reino vegetal y están presentes en casi todas

las partes de la planta, aunque las concentraciones más altas se encuentran en los órganos reproductivos, como los polinios en las orquídeas (Okleštková, Rárová et al. 2013).

Las fitohormonas esteroidales o brasinoesteroides (BR), son las únicas hormonas vegetales con una estructura química de este tipo en las plantas que agrupaba 59 miembros. Para el año 2003 se habían determinado alrededor de 60 brasinoesteroides (BRs) en diversas especies vegetales terrestres y marinas. Los BR participan en procesos de expansión, división y diferenciación celular en los tejidos jóvenes de las plantas en crecimiento (García 2006; Jordán and Casaretto 2006).

## **I.4 Actividad biológica**

Al comparar los efectos de los brasinoesteroides con los de otras sustancias reguladoras del crecimiento vegetal se destacan el hecho de que los brasinoesteroides tienen actividad a concentraciones extremadamente bajas ( $0.1-0.001 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), que es un rango 100 veces menor que el de los otros reguladores de crecimiento vegetal; estimulan el enraizamiento; no causan deformaciones en las plantas; ejercen su efecto principalmente cuando las plantas están bajo condiciones de crecimiento adversas (Garciglia, Rodríguez et al. 2013). En los últimos años, varios autores han estudiado la protección que los BRs le confieren a las plantas ante determinados tipos de estrés tanto bióticos como abióticos (Kagale, Divi et al. 2007), (Núñez, Mazorra et al. 2007). Entre estos se encuentran altas y bajas temperaturas (Ogwen, Song et al. 2008), sequía y salinidad (Kagale, Divi et al. 2007) y exceso de metales pesados así como la disminución de los efectos del estrés causado por la falta de nutrientes y el incremento en la resistencia a herbicidas y agentes patógenos (Hayat, Ali et al. 2007), estudio toxicológicos demuestran que estos compuestos no son genotóxicos, ni ecotóxicos y ni antigenotóxicos (Díaz Llera and Fonseca López 1999).

Los efectos fisiológicos reportados se muestran en el crecimiento, diferenciación y morfogénesis esto en la elongación de epicotilos, hipocotilos, coleoptilos y mesocotilos en monocotiledóneas.

## **I.5 Localización y Mecanismo de acción de los brasinoesteroides en la célula.**

En cuanto a la localización intracelular de los brasinoesteroides, se ha indicado que los plastidios son orgánulos importantes para estos compuestos. El estroma puede ser el sitio de síntesis mientras que los gránulos de almidón se asumen como sitios de almacenaje de estos potentes reguladores del crecimiento (Sasse, Yokota et al. 1992).

La respuesta de la planta a los brasinoesteroides incluye efectos sobre los sistemas de señalización para la defensa contra insectos y hongos, en la elongación celular y del tallo, la división celular, el desarrollo vascular y reproductivo, la polarización de las membranas y el bombeo de protones, las relaciones fuente/sitio de consumo y la modulación de estrés. También se ha reportado su influencia en el gravitropismo y en el retraso de la abscisión de hojas y frutos (Clouse 1996).

En la Figura 3 se muestran las vías de señalización propuestas para explicar el mecanismo de acción de los brasinosteroides. En ausencia de BR, las proteínas transmembrana (receptores de BR) se encuentran inactivas y como monómeros. Dentro de la célula, en el citoplasma el complejo enzimático BIN2 tiene una acción dual sobre BZR1/BES1: primero, por fosforilación y la promoción de retención citoplasmática por la proteína 14-3-3; y segundo, mediante la fosforilación de BZR1/BES1 en el núcleo estas acciones en conjunto provocan que éste sea degradado en el proteosoma y no transcurra la señalización dependiente de BR.



## II. Estructura y actividad biológica de las Auxinas

Se denominan auxinas los compuestos caracterizados por su capacidad de inducir elongación en células, Figura 4. Son numerosos los ejemplos de auxinas sintéticas utilizados en cultivo de tejidos vegetales, fundamentalmente porque su acción es más prolongada que la de sus análogos naturales y su costo es inferior como en el caso de NAA ó ácido  $\alpha$  naftalen acético (Hall 1983).

Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales naturales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de plantas. La forma predominante en las plantas es el ácido indolacético (IAA), muy activo en bioensayos y presente comúnmente en concentraciones nanomolares. Otras formas naturales de auxinas son el ácido 4-cloro-indolacético (4-Cl-IAA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (Ludwig-Müller 2011).

La síntesis de esta hormona se lleva a cabo en los meristemos apicales en hojas jóvenes y frutos en desarrollo, sus efectos fisiológicos se han identificado en el crecimiento y la formación de raíces, tallos y coleóptilos así como la inhibición de raíces primarias y la estimulación en raíces secundarias. La elongación de tallos se lleva a cabo concentraciones de  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M, se observan efectos en el control de tropismo, se mantiene la dominancia apical y retarda la caída de hojas, flores y frutos jóvenes.

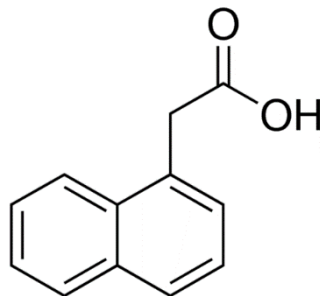


Figura 4 Estructura de la Auxina

### III. Estructura y actividad biológica de las Citocininas

Son hormonas esenciales en la acción de varios procesos vinculados al crecimiento y desarrollo de las plantas y relacionados a la acción de varios genes, Figura 5. El reconocimiento de las citocininas como hormonas vegetales se inició con el descubrimiento de la kinetina en la época de los 50, siendo este un artefacto producto de la degradación del ADN en espermátidas de arenque sometidas al autoclavado (temperatura y presión).

Según su origen se pueden distinguir dos tipos de citocininas: aquellas naturales generadas por las plantas y otras artificiales, sintetizadas por el hombre. Su síntesis acontece principalmente en la raíz en apoplastos y simpoplastos, aunque también en el meristema apical y en semillas inmaduras, (Kakimoto 2003). Sus efectos fisiológicos más notables son la división celular, da lugar a la organogénesis y androgénesis, retarda la senescencia.

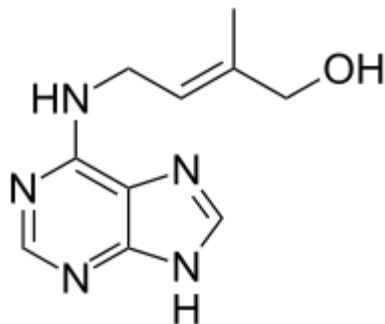


Figura 5 Estructura de la Citocinina

## IV. Sinergismo

Se descubrió que las citocininas tienen un efecto hormonal cuando se provocan diferentes tipos de morfogénesis en tejidos de tabaco en conjunto con auxinas bajo condiciones in vitro. Si los niveles de citocininas son mayores al de las auxinas provoca la formación de brotes en tejidos, de lo contrario si se maneja un nivel alto de auxinas y bajo en citocininas, se puede observar la formación de callos. (Skoog, Strong et al. 1965).

La citocininas junto a auxinas, promueven la producción de tejidos no organizados denominados callos, de los cuales es también posible inducir la formación de brotes y/o raíces (Skoog, Strong et al. 1965), como también de embriones somáticos conducentes a plantas. Las respuestas de totipotencialidad celular, de morfogénesis in vitro y de regeneración de plantas, ocurre en presencia de niveles apropiados de citocininas contra auxinas (Coenen and Lomax 1997).

En varios sistemas, los brasinoesteroides interactúan en forma sinérgica con las auxinas y se reporta que los brasinoesteroides pueden funcionar como auxinas en un momento y como giberelinas o citocininas en otro (Mandava 1988).

La elongación celular estimulada por la aplicación de brasinoesteroides se ha determinado que se debe a un efecto sinérgico o aditivo a la originada por auxinas y giberelinas (Tominaga et al. 1994).

En forma sinérgica con auxina, los BRs promueven un incremento de la curvatura gravitrópica en maíz (Kim, Chang et al. 2000), inducen la proliferación de callo in vitro y la inducción de raíces adventicias.

## V. *Laelia anceps* como planta de estudio.

### V.1 Origen y descripción

*Laelia anceps* fue descrita por John Lindley en 1835, con base en ejemplares importados por la firma Loddiges y Sons, y que florecieron en diciembre de 1834, en Hackney Inglaterra. Las plantas originales eran la forma más común con sépalos y pétalos rosados y el lóbulo medio del labelo oscuro (Soto Arenas 1993).

*Laelia* es un género que agrupa aproximadamente 11 especies. Son orquídeas silvestres epífitas originarias de México, y han sido reportadas en las sierras de la vertiente del Golfo de México en los Estados de Hidalgo, Puebla, Veracruz, Tamaulipas, Michoacán, Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí, Morelos, Chiapas y Oaxaca, y probablemente en Guerrero y Jalisco (Bechtel 1990). El enlace tropical de Norte, Centro y Sudamérica puede albergar a miembros distintivos de la alianza *Cattleya*, y entre las miríadas de especies de *Epidendrum* y *Encyclia*, las *Laelias* de México, sobresalen como un vistoso grupo de gran atractivo. En la Tabla No. 2 se presenta su taxonomía.

Reino	Plantae
<b>DIVISION</b>	Magnoliophyta
<b>CLASE</b>	Liliopsida
<b>ORDEN</b>	Aparagales
<b>FAMILIA</b>	Orchidaceae
<b>SUBFAMILIA</b>	Epidendroideae
<b>TRIBU</b>	Epidendreae
<b>SUBTRIBU</b>	Laeliinae
<b>ALIANZA</b>	Catleya
<b>GENERO</b>	<i>Laelia</i> (Lindl. 1831)

Tabla No. 2 Clasificación científica de *Laelia anceps*

Las diferencias en color es la característica más notable por lo que se ha preferido incluir a todo el complejo dentro de una sola especie variable, con dos subespecies geográficamente definidas una, en la vertiente atlántica de México, Guatemala y Honduras; y otra subespecie en la vertiente pacífica de la Sierra Madre del Sur.

La diferencia de colores tan notables entre las plantas de la sierra madre del sur justifican el establecimiento de formas, que además han sido reconocidas informalmente por en la horticultura (Soto Arenas 1993).

*Laelia anceps* posee pétalos angostamente elípticos, callo poco alzado, con 3 lamelas terminales, lóbulo medio del labelo oblongo, poblaciones de flores rosa y púrpura, se localiza en el este u sureste de México, Guatemala y Honduras. (Sánchez Roldán 2009).

A nivel internacional la propagación de orquídeas del género *Laelia* se ha realizado para obtener diferentes beneficios e intereses desde los farmacéuticos con la finalidad de encontrar vasodilatadores y antihipertensivos de extracto de metanol de las raíces de *Laelia anceps* que son mediadas por el antagonismo de canales de calcio (Vergara-Galicia, Ortiz-Andrade et al. 2010). Se ha realizado trabajos para la embriogénesis regenerando y caracterizando *in vitro* *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*, una de las orquídeas silvestres mexicanas con potencial ornamental por sus atractivas características que le permiten cumplir estándares internacionales de calidad y la convierten en una especie económicamente importante. Se ha visto afectada ya que la colecta excesiva ha generado que se encuentre en riesgo de extinción. Para asegurar su conservación, es necesario que desarrollen protocolos eficientes de propagación para esta especie, que permitan su uso sustentable y reduzcan la colecta (Lee Espinosa, Laguna Cerda et al. 2010).

## V.2 Descripción morfológica de *Laelia anceps*

Nombre común: "Vara de San Diego" (Varita de San Diego), "Flor de San Miguel", flor de Todos Santos". Planta epífita, ligeramente escandente y agrupadas, 25-50 cm de altura con exclusión de la inflorescencia.

**Planta epífita**, ligeramente escandente bastante agrupadas, 25-50 cm de altura con exclusión de la inflorescencia.

**Raíces** redondeadas, de color blanquecino, 1.3 a 1.5 mm de espesor.

**Rizoma** alargado, formado por 5-6 entrenudos, 3.4 a 3.5 cm de largo, 5-7.5 mm de espesor, ligeramente dorsiventralmente comprimidos.

**Pseudobulbos** elipsoide-ovoide, alargado, comprimido, rómbico en sección transversal, poco (1-2.5 cm) estipitado, acumulado de 3 entrenudos, cubierto por los restos de escariosa.

**Hoja solitaria**, color verde oblongo-elípticas a lanceoladas, agudos a obtusos, coriáceas-carnosas, rígidas, sub peciolo en la base, 12.5-23.3 x 2.3 a 5.4 cm, Figura 6.

**Flores** grandes y muy vistosas, resupinadas, sustancialmente bien débil, 7.3-12 cm de alto, 5.5 a 8.0 cm de ancho, tépalos de color rosa a rosa-púrpura, labio púrpura con un disco de color amarillo pálido, columna color

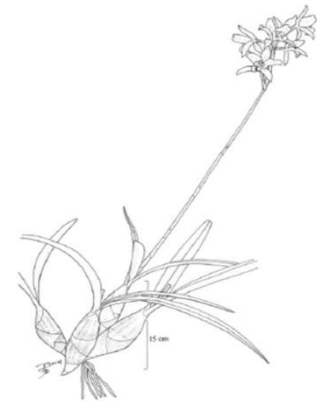


Figura 6 a) Parte radicular, b) Rizoma, Pseudobulbos, c) Hojas solitarias.

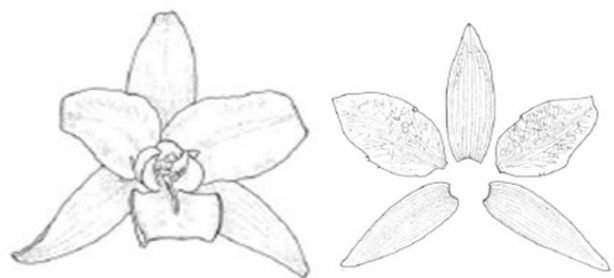


Figura 7 Estructura de la flor de *Laelia anceps*

púrpura, magenta o rayas de color marrón-rojizo, lóbulo medio generalmente más oscuro que tépalos, callo oscuro amarillo, brillante, la columna de color blanco verdoso, a menudo con lines púrpura y las rayas; débil fragancia dulce, Figura 7.

**Ovario y Estigma** ligeramente engrosado hacia el ápice, erecto-arqueado, torcido ligeramente, glutinoso, no furfuráceo, verde, aprox. 3.4 a 4.8 cm de largo, 4-5 mm de espesor Figura 8.

Cápsula elipsoide-ovoide, con 3 costillas poco visibles y otros 3 cordilleras, en general, no está bien definido, verde, 4.0-4.8 cm de largo, 2-2.2 cm de espesor, con un pedicelo 15 mm de largo, y un 7 mm pico largo apical.



**Figura 8 Estigma y Ovario.**

**Etimología:** anceps = doble filo, de las brácteas florales de doble filo y pseudobulbos.

### V.3. Importancia del cultivo de *Laelia anceps*

Esta especie florece en los meses de Octubre a diciembre (Soto-Arenas and Halbinger 1997) , tarda en crecer desde semilla hasta plántula aproximadamente 5 años para poder obtener la primera floración y el estadio en plántula es crucial para fortalecer el crecimiento y desarrollo de la plántula.

En la actualidad se tiene una alta demanda de en el mercado nacional para esta especie con gran importancia económica pero son obtenidas de su hábitat desmedidamente.

Por tal motivo es de gran importancia establecer un sistema de propagación más sustentable con la intervención de la biotecnología vegetal utilizando hormonas de crecimiento y promotores vegetales que induzcan a un buen desarrollo para poder conseguir la reproducción de orquídeas de manera masiva desarrollándolas después en invernaderos de amplia capacidad.

Una orquídea de esta especie cuesta en el mercado de \$350 a \$500 pesos dependiendo del estadio de la planta.

## VI. ANTECEDENTES

Desde hace tres décadas el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ha demostrado su utilidad en la propagación de especies porque ofrece la posibilidad de multiplicar plantas a escalas mayores que las obtenidas a través de los procedimientos tradicionales (Seeni and Latha 1992; Rao 1998; Murthy and Pyati 2001; Lee and Lee 2003; Shimura and Koda 2004).

Trabajos anteriores han realizado estudios con brasinoesteroides con el objetivo de evaluar el efecto que ejercen las aspersiones foliares de dos sustancias, como son PECTIMORF y BIOBRAS-16, en dos especies de orquídeas pertenecientes al género *Cattleya*. Se evaluó el número total de pseudobulbos, tallos y raíces formadas, se tomó en cuenta la coloración de la planta. Se tuvo como resultado un aumento significativo en las variables antes mencionadas, así como mejoras en la coloración y calidad de sus flores (Suárez 2007).

Autores como (Malabadi and Nataraja 2007) evaluaron el efecto de la 24 epibrasinolida aplicándolo por primera vez en la micro propagación de orquídeas, se utilizó secciones de puntas apicales con 24 epibrasinolida suplementado en medio basal demostrando que esta tiene un alto potencial para inducir la proliferación de brotes o protocormos con la formación de callos de las puntas apicales de *Cymbidium elegans* (Mitra, Prasad et al. 1976).

Se evaluó la germinación, crecimiento inicial en dos variedades de tomate (INCA 9 y Amalia) que fueron sometidas a estrés salino y tratadas con un brasinoesteroide natural (24-epibrasinólida, EBL) y un análogo espirostánico de brasinoesteroide (Biobras-16) al igual que un inhibidor de la biosíntesis de los brasinoesteroides (Brz2001) evidenciando un efecto protector de la EBL en la longitud del tallo y la masa seca de las plántulas estresadas (Guerrero, Ayan et al. 2013).

El efecto de un análogo de brasinoesteroides (Biobras-16) sobre la nodulación *in vitro* de plántulas de soya (*Glycine max* L.) mostró una mejor respuesta de la interacción simbiótica *Bradyrhizobium*-soya cuando se embebieron las semillas de

soya, obteniéndose valores similares o superiores al control en todas las variables de nodulación analizadas con las concentraciones ensayadas (0.01, 0.05 y 0.10 mg.L<sup>-1</sup>) (Costales, Nápoles et al. 2008).

En otro estudio con el objetivo de conocer las potencialidades antiestres del análogo de brasinoesteroide MH-5 se trabajó en plántulas de arroz expuestas a predios cortos de estrés hidrico y evaluar el efecto en su crecimiento. Semillas de dos variedades fueron sembradas en medios que contenian las sales Murashige y Skoog (MS) y diferentes concentraciones del análogo del brasinoesteroide MH-5 (0, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-1</sup> mgL<sup>-1</sup>) donde a las concentracion 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-2</sup> se obtuvo una mejor respuesta favoreciendo la respuesta de las plantas ante condiciones de deficit hidrico y confiriendole potencialidades antiestres (García, Rodríguez et al. 2005).

El análogo de brasinoesteroide BSS4 ha sido evaluado en otros trabajos con modelos biológicos experimentales tales como maíz en el caso de la tesis denominada “Efectos de análogos de brasinoesteroides en diferentes variedades de Maíz” (Moreno, Acosta et al. 2009), los resultados obtenidos para este bioensayo fueron que el BSS1 y BSS4 favorecieron incrementos en la mayoría de los parámetros evaluados en invernadero. Reportó incrementos del 60% con el BSS1 en la concentración 10.0 mg/l y del 86% con el BSS4 con la concentración 0.1 mg/l, en la biomasa del maíz cremoso cultivado en invernadero. En el maíz amarillo, el BSS1 incrementó la biomasa en un 3% y con el BSS4 en un 35%.

Así también se ha trabajado con frijol en la tesis “Evaluación de Análogos de Brasinoesteroides mediante el bioensayo del frijol (*Phaseolus vulgaris*)”, se pudo comprobar que el análogo BSS4 fue el que presentó mayor actividad promotora del crecimiento vegetal (Hidalgo Peña, Rodriguez Acosta et al. 2012).

Para la tesis “Efecto de un análogo de brasinoesteroide en la inclinación de la lámina de arroz y en los cultivos de frijol” se confirmó que el aBSS4 favoreció el crecimiento de la biomasa en las plantas del frijol bajo condiciones de estrés.

Ejerce efectos importantes a concentraciones de 1mg/L y 0.1 mg/L ayudando a la planta de frijol a soportar el estrés hídrico; además promovió el crecimiento y aumento de la biomasa de las plantas mostrando mejores respuestas que la epibrasinolida (Andrade Rosales, Rodriguez Acosta et al. 2013).

Para la tesis “Efecto del análogo de Brasinoesteroide en la lámina de arroz” el aBSS4 tuvo sus mayores respuestas a la concentración 0.01mg/L aun cuando la variedad del arroz no era la misma (Gomez Sanchez, Rodriguez Acosta et al. 2013).

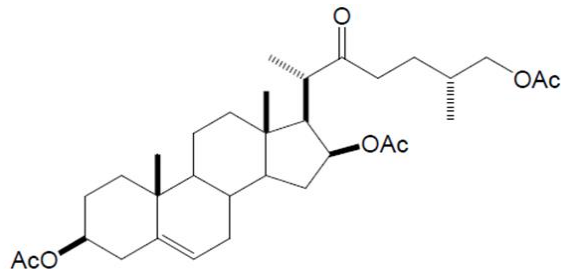
En la tesis Efecto de Análogos de Brasinoesteroide en el Bioensayo de la inclinación de la Lámina de Arroz (*Oryza sativa* L.) se evaluó una serie de análogos de brasinoesteroide en la inclinación de la lámina de arroz de los cuales el aBSS18 mostró tener una mejor respuesta promoviendo un mayor ángulo de inclinación que el resto de los análogos lo cual se manifestó en las tres variedades de arroz, también se observó que en otros análogos como aBSS16, aBSS17 y aBSS19 presentaron buena actividad pero no específicos para una sola variedad (Rivera Espinoza, Rodriguez Acosta et al. 2013).

El uso del análogo del brasinoesteroide BSS4 en conjunto con el cultivo in vitro de plantas se convierte en una herramienta de gran innovación y mejoramiento para la agricultura.

Mediante el uso de reguladores de crecimiento como los brasinoesteroides, las auxinas y las citoquininas se plantea una nueva alternativa para promover el crecimiento de las plantas.

El análogo BSS4 fue sintetizado en nuestro grupo de investigación. La síntesis de este y su uso ya se han empleado en otros trabajos de tesis. Uno de los intereses dentro del grupo de trabajo es el análisis de los efectos en los cultivos de maíz, jitomate y frijol, pero para ampliar más el uso de esta se decidió emplear el uso de este análogo BSS4 con orquídeas *Laelia anceps*. Su aplicación permite observar la influencia y efecto de este análogo en el desarrollo de la plántula cultivada *in vitro* así como su efecto sumatorio con otras hormonas de crecimiento. Esto

también nos accede a moldear la estructura activa del compuesto sintetizado y así efectuar nuevas modificaciones estructurales dirigidas a incrementar la actividad promotora del crecimiento vegetal obteniendo un mayor efecto en la plántula, saber a qué concentración es la más adecuada para el trabajo con orquídeas así como la mejor combinación con otras hormonas de crecimiento vegetal Figura 10.



**Figura 9 Estructura del análogo de  
Brasinoesteroide BSS4.**

## VII. JUSTIFICACIÓN

Ha sido demostrado en diferentes trabajos experimentales que el análogo de brasinoesteroide BSS4 ejerce su efecto positivo cuando se aplica en plantas de interés alimenticio como el maíz, frijol y jitomate sin embargo este análogo no se ha utilizado en plantas de interés ornamental. Dado que las orquídeas son un grupo de plantas con gran demanda comercial, se busca con la aplicación de este análogo, probar si sus efectos favorecen el crecimiento de las mismas tal y como se ha demostrado tener en los cultivos antes mencionados.

Al igual que en otros análogos de brasinoesteroide se pretende conocer si el efecto ejercido por el análogo BSS4 da resultado cuando se utiliza en condiciones con otras hormonas vegetales ampliamente conocidas como el NAA y BAP.

El lograr la reducción del tiempo de cultivo en condiciones in vitro de las orquídeas, permitirá reducir el tiempo de cultivo en invernadero y por lo tanto reducirá su costo.

## VIII. OBJETIVO

### VIII.1. GENERAL

- ✓ Evaluar el efecto del análogo de brasinoesteroide aBSS4 en el desarrollo y/o crecimiento de las plántulas de *L. anceps* cultivadas *in vitro*.

### VIII.2. ESPECÍFICO

- ✓ Evaluar el efecto del análogo BSS4 a diferentes concentraciones en el crecimiento de la parte aérea y raíz de *Laelia anceps*.
- ✓ Determinar si existe un efecto aditivo del análogo BSS4 cuando se combina con otras hormonas vegetales como NAA y BAP

## IX. HIPÓTESIS

De acuerdo a los efectos ejercidos por el análogo de BSS4 en plántulas de maíz y frijol, se espera que este actuará de la misma manera en la plántula de la orquídea *Laelia anceps*, y que su efecto se intensificara con la presencia de hormonas adicionales.

## X. DISEÑO EXPERIMENTAL

En este trabajo experimental se evaluó el efecto del brasinoesteroide BSS4 solo y en conjunto con otras hormonas de crecimiento como NAA (ácido alfa naftalen acético) y BAP (Bencil aminopurina) en plántulas de una orquídea mexicana *Laelia anceps* que fueron germinadas en el laboratorio del Jardín Botánico Universitario.

Las plántulas se cultivaron en el medio de cultivo MS y se aplicaron los siguientes tratamientos:

MS control

Tratamiento 1 T1 MS adicionado con BSS4

Tratamiento 2 T2 MS adicionado con BSS4 y NAA

Tratamiento 3 T3 MS adicionado con BSS4 y BAP

Tratamiento 4 T4 MS adicionado con BSS4, NAA y BAP

Cada tratamiento constó de 5 repeticiones distribuidas completamente al azar para cada concentración de análogo de brasinoesteroide.

La unidad experimental consistió de una plántula (s) de *Laelia anceps* de aproximadamente 1 año de edad. Para lo cuál en cada frasco se colocaron las cantidades requeridas en cada tratamiento y se aforó a 25 ml de volumen final. Los frascos ya preparados fueron esterilizados y llevados a una campana de flujo laminar para depositar una plántula de *Laelia anceps*. Después de la siembra, se incubaron a  $25^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  a un fotoperiodo de 16h luz 8 oscuridad con 40% de humedad relativa. Las variables peso fresco, altura, número de hojas y número de raíces fueron evaluadas a los 30 y 60 días.

Una vez terminado el experimento, los resultados se analizaron mediante una ANOVA del programa Graphpad 6.0 y una prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia del 95%.

## XI. MATERIAL Y REACTIVOS

### UBICACIÓN DE EXPERIMENTO

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación del Jardín Botánico Universitario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a partir del mes de marzo del 2014.

### MATERIAL VEGETAL.

Se trabajó con plántulas de *Laelia anceps in vitro* cultivadas con anterioridad en el laboratorio. Las plántulas fueron seleccionadas de acuerdo a su aspecto y tamaño. Se escogieron las plantas de apariencia saludable, con 1 a 2 hojas verdaderas y con una altura de aproximadamente 5 mm de longitud (Fig. 11).



**Ilustración 10 Plántula de  
*Laelia anceps*.**

## XII. MATERIAL QUÍMICO

Se contó con 1 mg de BSS4, dicho compuesto fue proporcionado y sintetizado por el Laboratorio de “Síntesis y modificación de productos naturales” de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. La auxina NAA y citocinina BAP fueron adquirida en la compañía Sigma-Aldrich con No. De catálogo 86-87-3 y 1214-39-7 respectivamente. Las características fisicoquímicas de los productos se muestran a continuación en la Tabla No. 3.

ESPECIFICACIONES FISICOQUÍMICAS					
NOMBRE	INGREDIENTE ACTIVO	FÓRMULA CONDENSADA	TIPO DE FORMULACION	Pf	INFORMACIÓN
BSS4	Cetona esteroideal polihidroxilada (sólido).	C <sub>33</sub> H <sub>52</sub> O <sub>8</sub>	Sólido (polvo, cristales); muy poco soluble en agua.	222-224 °C	Es estable bajo almacenamiento en el refrigerador, en frasco ámbar bien cerrado bajo atmósfera de argón y protegido de la luz.
NAA	1-Acido naftalen acético	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	Forma cristalina de color blanco a amarillo claro para cultivo de tejidos vegetales.	129 - 131.5 °C	Ácido 1-Naftalenacético es una fitohormona auxina sintética que se añade a los medios de cultivo celular tales como Murashige & Skoog.
BAP	6-Bencilamino purina	C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub>	Polvo de color amarillo claro	230 - 233 °C	Es una citocinina sintética que, junto con las auxinas provoca crecimiento y desarrollo de la planta. Se añade al medio de cultivo como Murashige y Skoog

Tabla No. 3 Especificaciones químicas de los reguladores de crecimiento.

## **XIII. METODOLOGÍA**

La evaluación de los reguladores del crecimiento vegetal utilizados en este trabajo se desarrolló en cuatro etapas:

PRIMERA ETAPA: Preparación de los medios de cultivo con tratamientos.

SEGUNDA ETAPA: Sembrado de plántulas.

TERCERA ETAPA: Crecimiento de las Plántulas.

ETAPA CUATRO: Evaluación de los tratamientos a los 30 y 60 días después del trasplante.

### **XIII.1. Primera etapa**

Preparación de los medios de cultivo con tratamientos.

#### **Soluciones y diluciones de las fitohormonas**

Los brasinoesteroides empleados son muy poco solubles en agua por lo que se utilizó etanol al 96% como co-disolvente. La solución Stock se preparó disolviendo 1 mg del análogo de brasinoesteroide aBSS4 en 10 ml de etanol al 96% y se aforó a 50 ml con agua destilada a  $38 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . A partir de ella se realizaron diluciones seriadas al 10%, para obtener las concentraciones 0.1 mg, 0.01, 0.001, aforadas a 50 ml. Todas las soluciones ya antes mencionadas se agregaron a 1 L de medio de cultivo MS sólido en cada frasco los cuales fueron esterilizados junto con frascos de agua destilada, cajas Petri de vidrio todo en autoclave a 115 Lb/pulg<sup>2</sup> por 15min.

## XIII.2. Segunda etapa

### Sembrado de plántulas

Como se mencionó anteriormente, la selección de plántulas de *Laelia anceps*, se realizó de acuerdo a tres criterios de exclusión.

1. Individuos sanos
2. 2 a 3 hojas
3. 3 y 5 mm de longitud

Para el cultivo de las plántulas, se emplearon recipientes de plástico de polipropileno No. 10, previamente lavados y desinfectados con hipoclorito de Sodio al 10%.

En cada frasco se colocaron las siguientes soluciones de acuerdo al tratamiento.

MS control

Tratamiento 1 T1 MS adicionado con BSS4

Tratamiento 2 T2 MS adicionado con BSS4 y NAA

Tratamiento 3 T3 MS adicionado con BSS4 y BAP

Tratamiento 4 T4 MS adicionado con BSS4, NAA y BAP

Para la siembra, se limpió la campana de flujo laminar con alcohol al 70% y el instrumental necesario. Posteriormente se esterilizó con la luz ultravioleta incluida en la campana por 20 min. Se apagó la lámpara de UV después del tiempo establecido y se activó el flujo de corriente estéril.

En las Tablas 4 se presentan el número total de unidades experimentales y número de plántulas por tratamiento.

TRATAMIENTOS	Control MS	BSS4 + MS	BSS4 + NAA	BSS4 + BAP	MS+ BSS4 + NAA + BAP
BSS4 mg/L		T1	T2	T3	T4
0.1	5x5	5x5	5x5	5x5	5x5
0.01	5x5	5x5	5x5	5x5	5x5
0.001	5x5	5x5	5x5	5x5	5x5

Repartiendo 5 plántulas para cada frasco dando un total de 375 plántulas de *Laelia anceps*

**Tabla No. 4 Unidades experimentales y número total de Plántulas por tratamiento.**

### Medidas de seguridad

Antes de la manipulación experimental, se realizaron medidas asépticas y de seguridad, consistentes en: lavado de las manos con agua y jabón, uso de bata cofia, cubre bocas, etanol y se encendió el mechero para tener garantizada la zona estéril.

### **XIII.3. Tercera etapa**

#### Crecimiento de las plántulas.

Terminado el traspaso de las plántulas se llevan a cámara de germinación donde se mantuvieron en crecimiento las plántulas bajo un fotoperiodo 16/8 luz oscuridad. Durante este período los frascos se mantuvieron a una temperatura de 25°C y se revisaron periódicamente las condiciones de la cámara, para comprobar la estabilidad de las condiciones determinadas.

### **XIII.4. Cuarta etapa**

#### Evaluación de los tratamientos a los 30 y 60 días después del cultivo.

A los 30 días de iniciado el experimento, se evaluó el crecimiento de las plántulas, cuantificando el peso fresco, el número de hojas, así como la longitud y número de raíces, todo ello en condiciones estériles en campana de flujo laminar.

Las mediciones se llevaron a cabo en el mismo ambiente y al terminar, las plántulas fueron regresadas al mismo medio de cultivo en su frasco de procedencia, evitando al máximo su contaminación. Una vez terminadas las mediciones se regresaron a la cámara de crecimiento y se repitió la evaluación a los 60 días de iniciado el experimento.

## XIV. DIAGRAMA DE FUJO



## **XV. RESULTADOS**

A continuación se describen los resultados obtenidos en los parámetros evaluados con la aplicación del análogo de brasinoesteroide BSS4 y de los reguladores de crecimiento NAA y BAP utilizados. Las observaciones fueron realizadas a los 30 y 60 días después de iniciado el experimento.

### **XVI. Evaluación a los 30 días**

Para cada tabla se presentan los promedios y desviaciones estándar de cada parámetro evaluado desde el día inicial hasta el día 30 a las tres diferentes concentraciones, así como los porcentajes de incremento de cada uno de ellos en los 30 días de experimento.

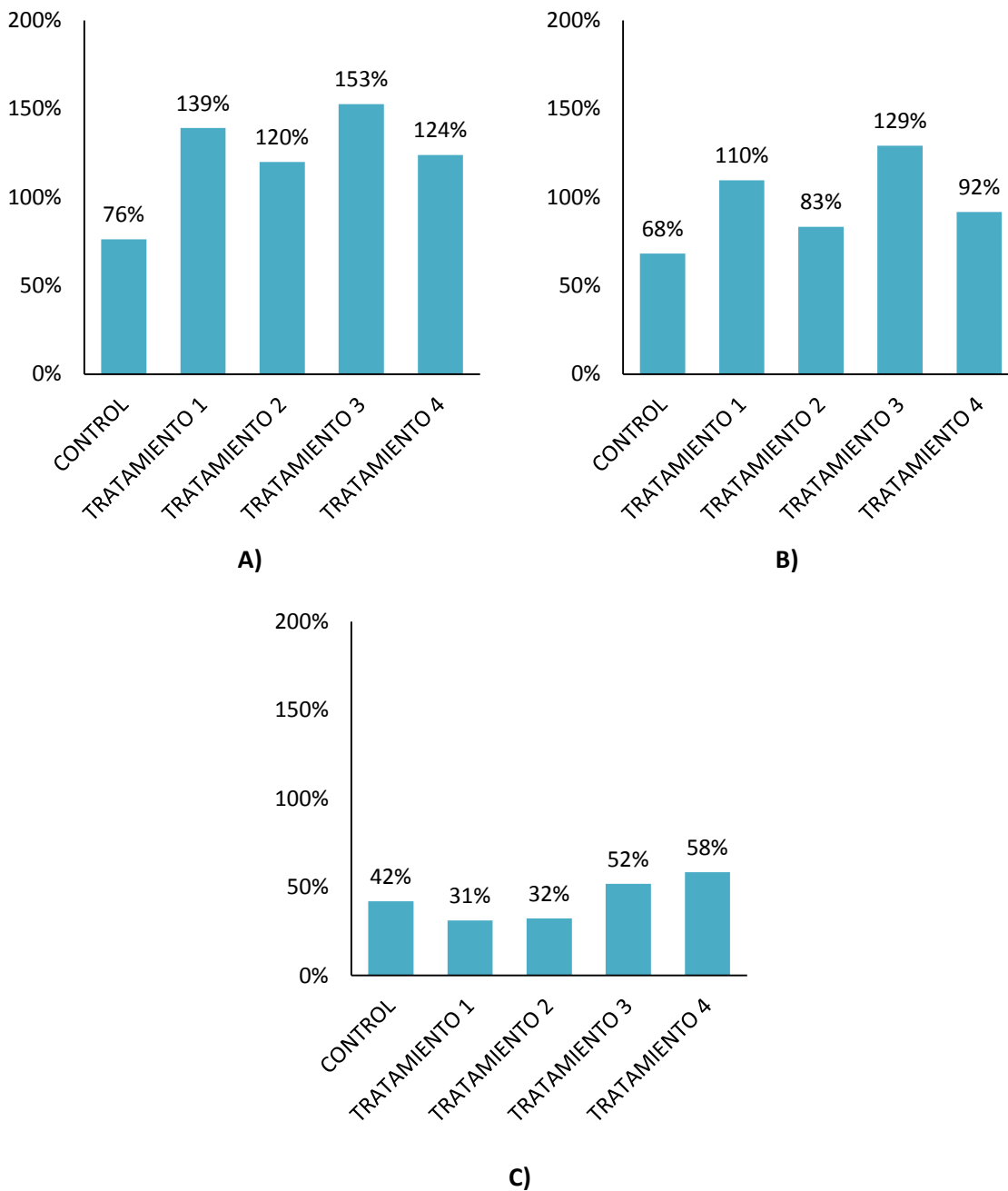
## XVI.1. Peso fresco a los 30 días

En la tabla 5, se pueden apreciar los valores del peso fresco obtenidos con su desviación estándar para los diferentes tratamientos, en las tres concentraciones utilizadas. Se indican también los porcentajes de incremento que se obtuvieron en el control y en las plántulas evaluadas con los diferentes tratamientos.

	Dia inicial	Dia 30		% incremento 0 a 30 días
TRATAMIENTOS	PESO FRESCO ± DE	PESO FRESCO ± DE		
<b>0.001 mg/L</b>				
CONTROL	0.021 ± 0.009	0.037 ± 0.019	ns	76%
TRATAMIENTO 1	0.023 ± 0.010	0.055 ± 0.031	ns	139%
TRATAMIENTO 2	0.020 ± 0.007	0.044 ± 0.028	ns	120%
TRATAMIENTO 3	0.019 ± 0.005	0.048 ± 0.015	ns	153%
TRATAMIENTO 4	0.021 ± 0.008	0.047 ± 0.019	ns	124%
<b>0.01 mg/L</b>				
CONTROL	0.022 ± 0.011	0.037 ± 0.000	ns	68%
TRATAMIENTO 1	0.021 ± 0.009	0.044 ± 0.000	ns	110%
TRATAMIENTO 2	0.024 ± 0.008	0.044 ± 0.000	ns	83%
TRATAMIENTO 3	0.024 ± 0.010	0.055 ± 0.000	ns	129%
TRATAMIENTO 4	0.024 ± 0.014	0.046 ± 0.000	ns	92%
<b>0.1 mg/L</b>				
CONTROL	0.031 ± 0.006	0.044 ± 0.019	ns	42%
TRATAMIENTO 1	0.029 ± 0.015	0.038 ± 0.014	ns	31%
TRATAMIENTO 2	0.028 ± 0.009	0.037 ± 0.000	ns	32%
TRATAMIENTO 3	0.029 ± 0.011	0.044 ± 0.000	ns	52%
TRATAMIENTO 4	0.024 ± 0.012	0.038 ± 0.000	ns	58%

**Tabla 5 Resultados del peso fresco de plántulas de *Laelia anceps* a 30 días de iniciado el experimento. Se muestran los promedios y las desviaciones estándar de las tres concentraciones del análogo de brasinoesteroide (mg/L) y control.**

El comportamiento en los diferentes tratamientos se puede observar en la gráfica 1 A), B) y C).



Gráfica 1 Porcentajes de incremento del día inicial al día 30 en el peso fresco de plántulas de *Laelia anceps* a la concentración A) 0.001 mg/L, B) 0.01 mg/L, C) 0.1 mg/L.

En ellas se observa que con excepción del tratamiento 1 en la concentración más alta (0.1 mg/L), todos los tratamientos mostraron un incremento en el peso fresco de las plántula mayor que el control. En el caso del aBSS4, la respuesta más alta (139%) ocurrió cuando se utilizó la menor concentración (0.001mg/L), mientras que la respuesta más baja se tuvo a la concentración más alta, en la cual el incremento en peso fresco no supero el incremento en las plántulas control.

En el tratamiento 2, también se mostró mayor incremento en la concentración más bajas (0.001mg/L), mientras que en las restantes concentraciones el incremento fue casi el mismo y muy similar al del control.

En el tratamiento 3, demostró un efecto decreciente de acuerdo al incremento de concentraciones, sin embargo, este fue considerablemente alto ya que duplicó al del control entre un 76 y 61%.

Finalmente, se puede observar que el tratamiento 4 tuvo su mejor respuesta cuando se utilizó la mayor concentración, donde supero al control por un 16% mientras que en la concentración más baja solo lo hizo por 48%.

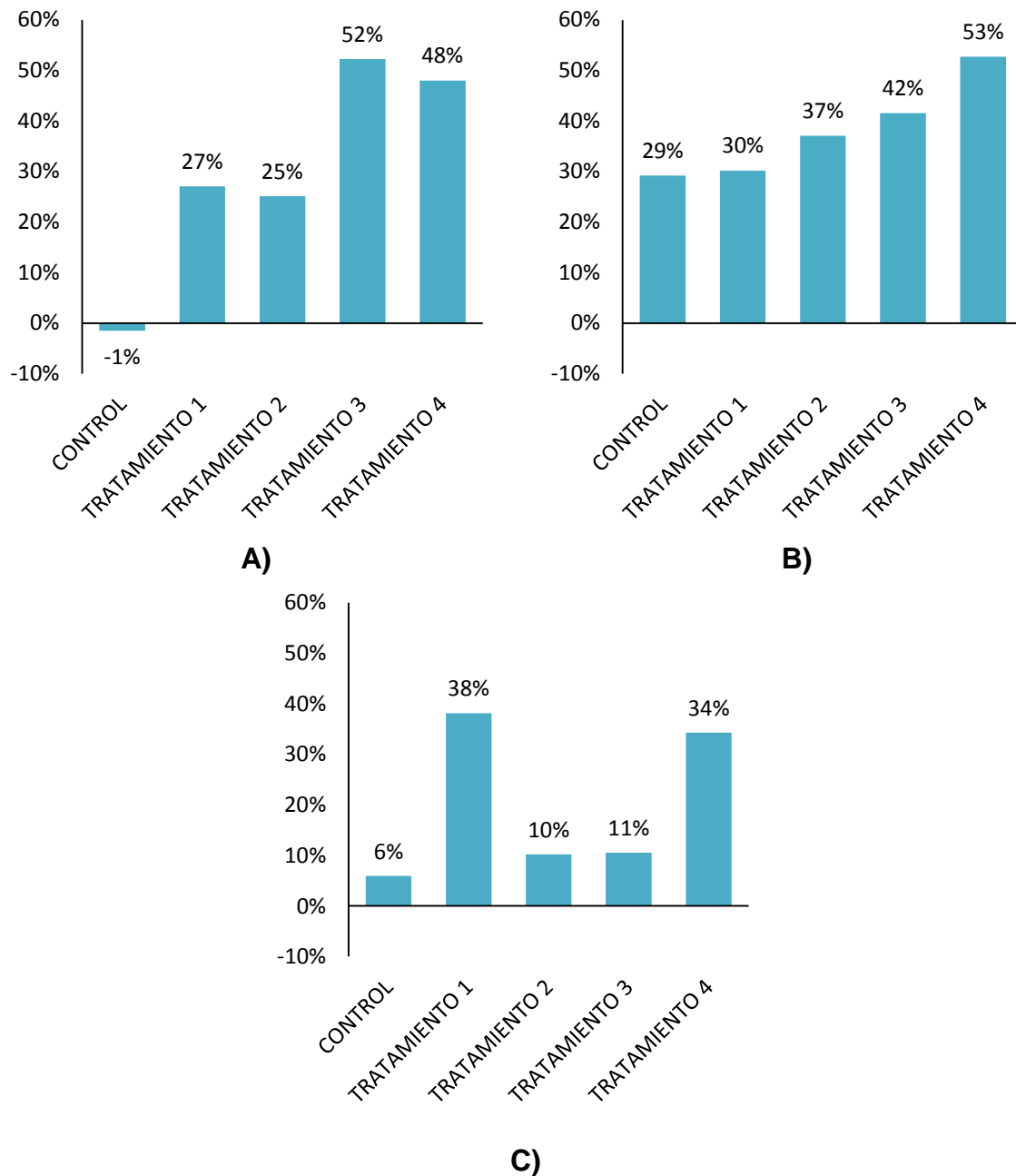
## XVI.2. Número de Hojas a los 30 días

En la tabla 6, se pueden apreciar los valores promedios obtenidos para el número de hojas, con su desviación estándar para los diferentes tratamientos, en las tres concentraciones utilizadas. Se indican también los porcentajes de incremento que se obtuvieron en el control y en las plántulas evaluadas con los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTOS	Día inicial	Día 30	% incremento	
	No. de HOJAS ± DE	No. de HOJAS ± DE	0 a 30 días	
<b>0.001 mg/L</b>				
CONTROL	3.68 ± 1.32	3.63 ± 1.52	ns	-1%
TRATAMIENTO 1	4.76 ± 1.70	6.05 ± 2.77	ns	27%
TRATAMIENTO 2	3.44 ± 1.86	4.30 ± 1.68	ns	25%
TRATAMIENTO 3	3.80 ± 1.20	5.79 ± 2.48	ns	52%
TRATAMIENTO 4	3.80 ± 0.98	5.63 ± 2.80	ns	48%
<b>0.01 mg/L</b>				
CONTROL	3.80 ± 1.41	4.91 ± 3.18	ns	29%
TRATAMIENTO 1	3.52 ± 1.39	4.58 ± 2.47	ns	30%
TRATAMIENTO 2	3.56 ± 1.86	4.88 ± 2.05	ns	37%
TRATAMIENTO 3	3.72 ± 1.56	5.27 ± 3.36	ns	42%
TRATAMIENTO 4	3.64 ± 0.97	5.56 ± 2.52	ns	53%
<b>0.1 mg/L</b>				
CONTROL	5.31 ± 1.40	5.63 ± 1.87	ns	6%
TRATAMIENTO 1	4.37 ± 2.08	6.04 ± 2.49	ns	38%
TRATAMIENTO 2	4.45 ± 2.27	4.90 ± 2.02	ns	10%
TRATAMIENTO 3	4.85 ± 1.56	5.36 ± 1.98	ns	11%
TRATAMIENTO 4	4.50 ± 1.59	6.04 ± 2.16	ns	34%

**Tabla 6 Resultados del número de Hojas de plántulas de *Laelia anceps* a 30 días de iniciado el experimento. Se muestran los promedios y las desviaciones estándar de las tres concentraciones del análogo de brasinoesteroide (mg/L) y control.**

El comportamiento en los diferentes tratamientos se puede observar en la gráfica 2 A), B) y C).



Gráfica 2 Porcentajes de incremento del día inicial al día 30 en el número de hojas de plántulas de *Laelia anceps* a la concentración A) 0.001 mg/L, B) 0.01mg/L, C) 0.1mg/L.

Respecto al número de hojas, se observa que los mayores incrementos ocurrieron en las dos concentraciones más bajas, donde el mayor efecto se observó en los tratamientos 3 y 4. Sin embargo, en la gráfica C, se observó que el tratamiento 1 y 4 fueron los que respondieron de manera positiva, superando al control.

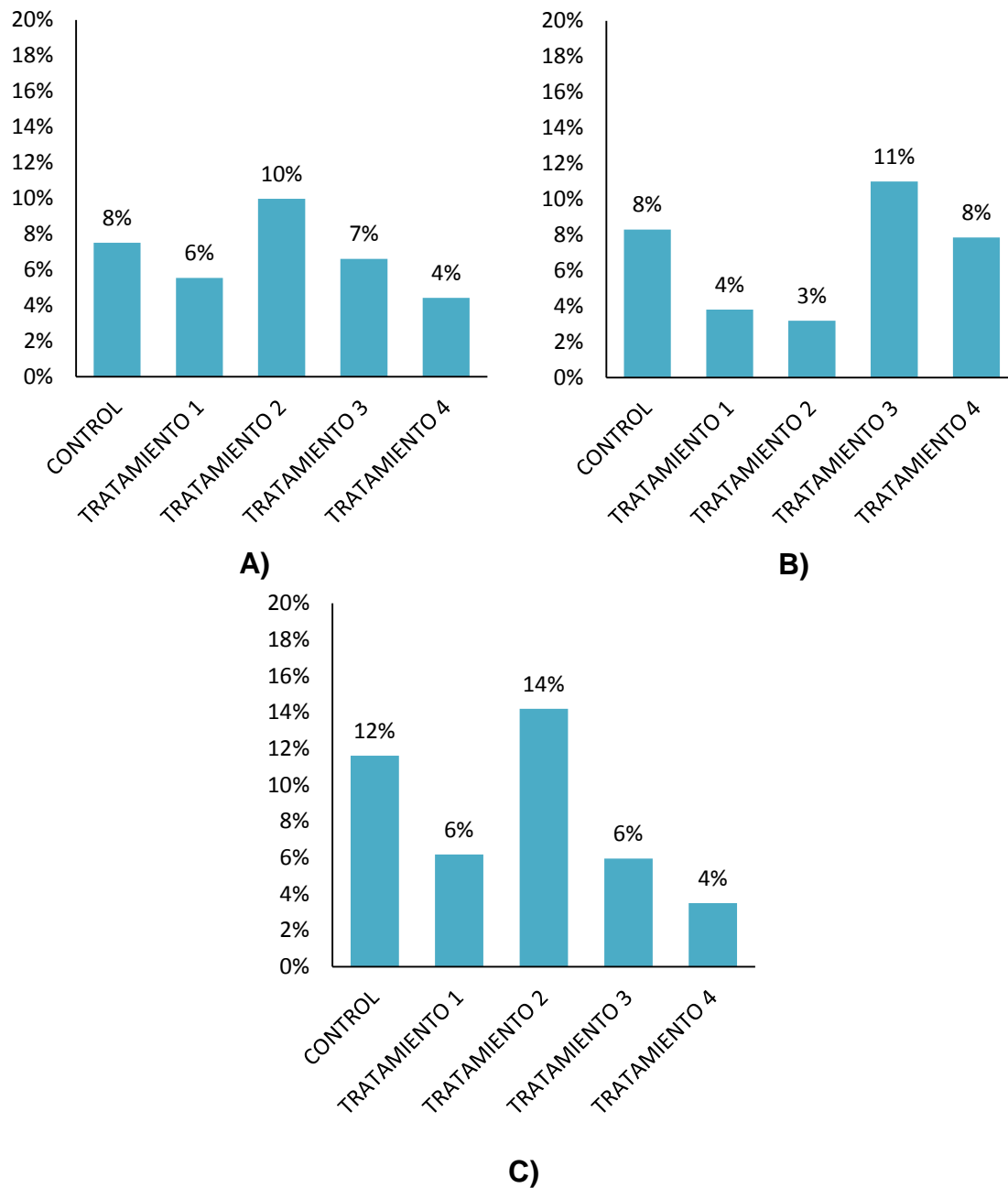
### XVI.3. Altura a los 30 días

En la tabla 7, se pueden apreciar los valores de la altura, con su desviación estándar para los diferentes tratamientos, en las tres concentraciones utilizadas. Se indica también los porcentajes de incremento que se obtuvieron en el control y en las plántulas evaluadas con los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTOS	Día inicial	Día 30	% incremento	
	ALTURA ± DE	ALTURA ± DE	0 a 30 días	
<b>0.001 mg/L</b>				
CONTROL	17.17 ± 3.18	18.46 ± 4.02	ns	8%
TRATAMIENTO 1	19.86 ± 3.20	20.96 ± 4.83	ns	6%
TRATAMIENTO 2	16.64 ± 3.70	18.30 ± 3.62	ns	10%
TRATAMIENTO 3	18.95 ± 4.30	20.20 ± 3.23	ns	7%
TRATAMIENTO 4	18.11 ± 4.26	18.91 ± 3.36	ns	4%
<b>0.01 mg/L</b>				
CONTROL	18.08 ± 4.15	19.58 ± 4.30	ns	8%
TRATAMIENTO 1	18.63 ± 3.56	19.34 ± 4.44	ns	4%
TRATAMIENTO 2	19.72 ± 3.79	20.35 ± 4.68	ns	3%
TRATAMIENTO 3	19.83 ± 4.96	22.01 ± 8.34	ns	11%
TRATAMIENTO 4	18.86 ± 3.58	20.34 ± 4.67	ns	8%
<b>0.1 mg/L</b>				
CONTROL	17.74 ± 4.62	19.80 ± 5.45	ns	12%
TRATAMIENTO 1	18.93 ± 4.36	20.10 ± 5.08	ns	6%
TRATAMIENTO 2	17.34 ± 4.78	19.80 ± 3.56	ns	14%
TRATAMIENTO 3	20.01 ± 3.87	21.20 ± 3.67	ns	6%
TRATAMIENTO 4	18.84 ± 4.04	19.50 ± 4.30	ns	4%

Tabla 7 Resultados en Altura de plántulas de *Laelia anceps* a 30 días de iniciado el experimento. Se muestran los promedios y las desviaciones estándar de las tres concentraciones del análogo de brasinoesteroide (mg/L) y control.

El comportamiento en los diferentes tratamientos se puede observar en la gráfica 3 A), B) y C).



Gráfica 2 Porcentajes incremento del día inicial al día 30 en la altura en plántulas de *Laelia anceps* a la concentración A) 0.001 mg/L, B) 0.01mg/L, C) 0.1mg/L.

En general, se puede observar que en las tres concentraciones no hubo incrementos muy contrastantes con respecto al control y que con excepción del tratamiento 2 y 3, el resto de los tratamientos no superaron el incremento en la altura de la planta control.

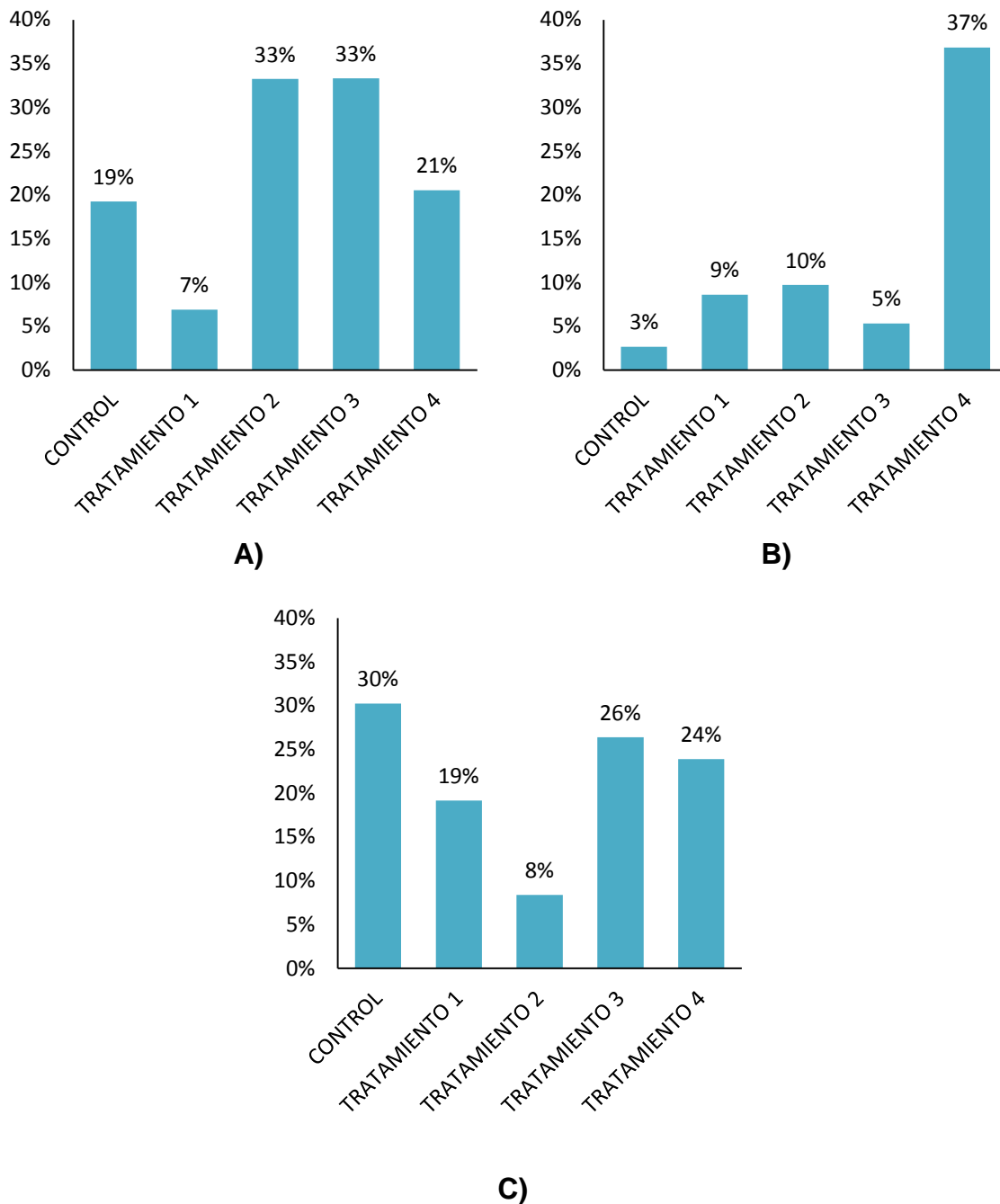
## XVI.4. Número de Raíces a los 30 días

En la tabla 8, se puede apreciar los valores del número de raíces obtenidos, con su desviación estándar para los diferentes tratamientos, en las tres concentraciones utilizadas. Se indica también los porcentajes de incremento que se obtuvieron en el control y en las plántulas evaluadas con los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTOS	Día inicial	Día 30	% incremento	
	No. de RAICES ± DE	No. de RAICES ± DE	0 a 30 días	
<b>0.001 mg/L</b>				
CONTROL	2.76 ± 1.11	3.29 ± 1.59	ns	19%
TRATAMIENTO 1	2.76 ± 1.11	2.95 ± 0.97	ns	7%
TRATAMIENTO 2	2.48 ± 0.85	3.30 ± 1.43	ns	33%
TRATAMIENTO 3	2.84 ± 1.05	3.79 ± 1.82	ns	33%
TRATAMIENTO 4	2.80 ± 1.13	3.38 ± 1.91	ns	21%
<b>0.01 mg/L</b>				
CONTROL	2.88 ± 1.11	2.96 ± 1.16	ns	3%
TRATAMIENTO 1	2.32 ± 1.01	2.52 ± 1.02	ns	9%
TRATAMIENTO 2	2.88 ± 2.08	3.16 ± 1.71	ns	10%
TRATAMIENTO 3	3.00 ± 1.46	3.16 ± 1.59	ns	5%
TRATAMIENTO 4	3.04 ± 1.28	4.16 ± 1.85	ns	37%
<b>0.1 mg/L</b>				
CONTROL	2.69 ± 0.92	3.50 ± 1.50	ns	30%
TRATAMIENTO 1	2.30 ± 0.90	2.74 ± 1.14	ns	19%
TRATAMIENTO 2	2.68 ± 1.10	2.90 ± 1.38	ns	8%
TRATAMIENTO 3	2.88 ± 0.97	3.64 ± 1.41	ns	26%
TRATAMIENTO 4	1.93 ± 0.88	2.39 ± 1.50	ns	24%

**Tabla 8 Resultados en el número de raíces de *Laelia anceps* a 30 días de iniciado el experimento. Se muestran los promedios y las desviaciones estándar de las tres concentraciones del análogo de brasinoesteroide (mg/L) y control. La diferencia significativa \* = P < 0,05; \*\* = P < 0,01; \*\*\* = P < 0,001; ns = no significativo.**

El comportamiento en los diferentes tratamientos se puede observar en la gráfica 4 A), B) y C).



Gráfica 4 Porcentajes del día inicial al día 30 en el número de Raíces de plántulas de *Laelia anceps* a la concentración A) 0.001 mg/L, B) 0.01mg/L, C) 0.1mg/L.

En esta gráfica, se puede observar que solo en las concentraciones de 0.001 y 0.01 mg/L, en los tratamientos 2, 3 y 4 se observaron incrementos superiores al control,

Mientras que en caso de la concentración 0.1 mg/L, ninguno de los tratamientos superó el crecimiento promedio del control.

## **XVII. Evaluación a los 60 días**

Para cada tabla se presentan los resultados de los promedios y desviaciones estándar para cada parámetro evaluado desde el día inicial hasta el día 60 a las tres diferentes concentraciones.

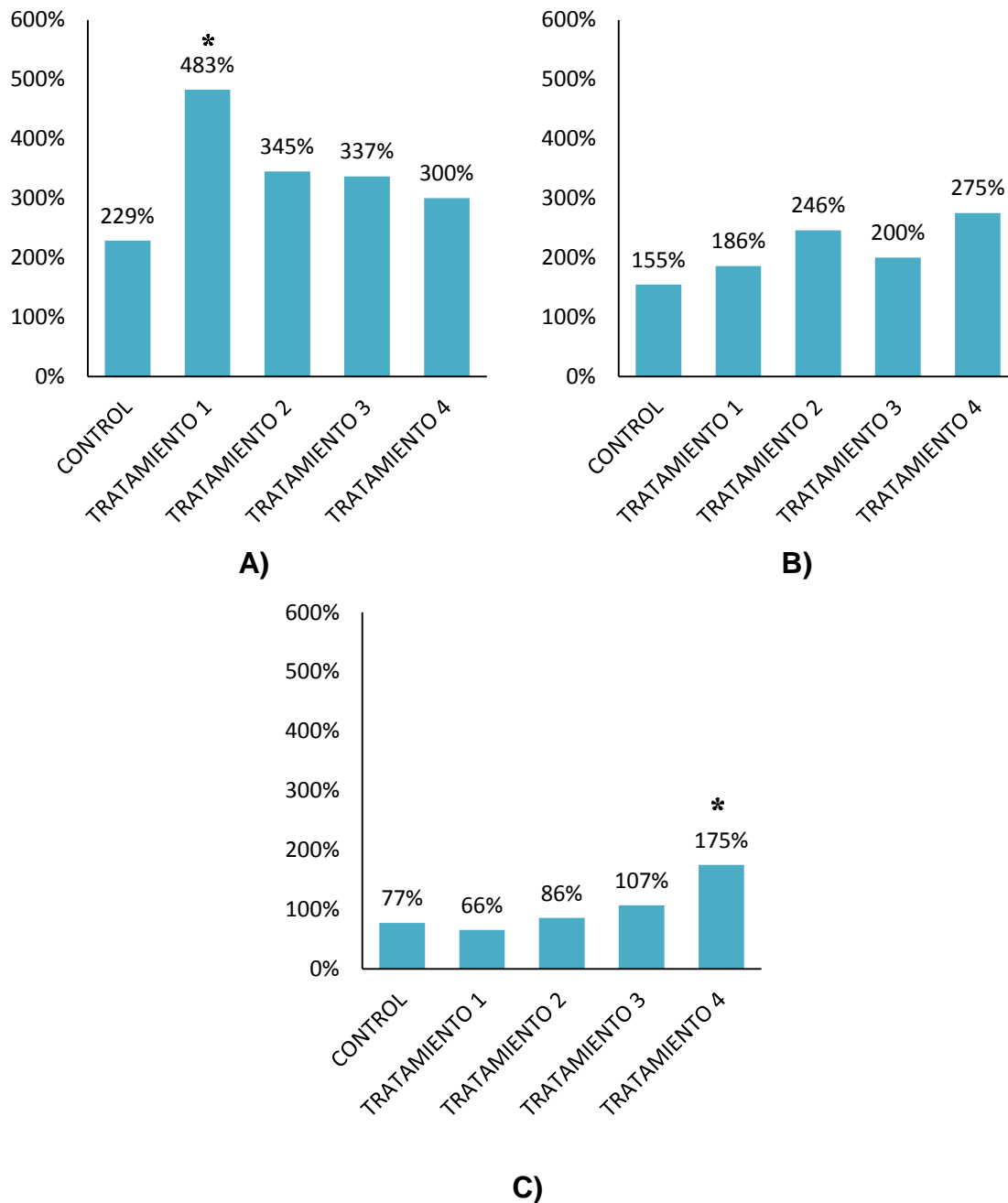
## XVII.1. Peso fresco a los 60 días

En la tabla 9, se puede apreciar los valores del peso fresco obtenidos, con su desviación estándar para los diferentes tratamientos, en las tres concentraciones utilizadas. Se indica también los porcentajes de incremento que se obtuvieron en el control y en las plántulas evaluadas con los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTOS	Dia inicial	Dia 60	% incremento	
	PESO FRESCO ± DE	PESO FRESCO ± DE	0 a 60 días	
<b>0.001 mg/L</b>				
CONTROL	0.021 ± 0.009	0.069 ± 0.030	ns	229%
TRATAMIENTO 1	0.023 ± 0.010	0.134 ± 0.100	***	483%
TRATAMIENTO 2	0.020 ± 0.007	0.089 ± 0.043	ns	345%
TRATAMIENTO 3	0.019 ± 0.005	0.083 ± 0.032	ns	337%
TRATAMIENTO 4	0.021 ± 0.008	0.084 ± 0.040	ns	300%
<b>0.01 mg/L</b>				
CONTROL	0.022 ± 0.011	0.056 ± 0.015	ns	155%
TRATAMIENTO 1	0.021 ± 0.009	0.060 ± 0.026	ns	186%
TRATAMIENTO 2	0.024 ± 0.008	0.083 ± 0.037	ns	246%
TRATAMIENTO 3	0.024 ± 0.010	0.072 ± 0.027	ns	200%
TRATAMIENTO 4	0.024 ± 0.014	0.090 ± 0.054	ns	275%
<b>0.1 mg/L</b>				
CONTROL	0.031 ± 0.006	0.055 ± 0.024	ns	77%
TRATAMIENTO 1	0.029 ± 0.015	0.048 ± 0.023	ns	66%
TRATAMIENTO 2	0.028 ± 0.009	0.052 ± 0.017	ns	86%
TRATAMIENTO 3	0.029 ± 0.011	0.060 ± 0.025	ns	107%
TRATAMIENTO 4	0.024 ± 0.012	0.066 ± 0.038	***	175%

Tabla 9 Resultados del peso fresco de plántulas de *Laelia anceps* a 60 días de iniciado el experimento. Se muestran los promedios y las desviaciones estándar de las tres concentraciones del análogo de brasinoesteroide (mg/L) y control. La diferencia significativa \* = P < 0,05; \*\* = P < 0,01; \*\*\* = P < 0,001; ns = no significativo.

El comportamiento en los diferentes tratamientos se puede observar en la gráfica 5 A), B) y C)



Gráfica 5 Porcentajes de incremento del día inicial al día 60 en el Peso fresco de plántulas de *Laelia anceps* a la concentración A) 0.001 mg/L, B) 0.01mg/L, C) 0.1mg/L.

En estas gráficas se puede observar que a pesar de que en la mayoría de los casos se obtuvieron incrementos muy altos con respecto al control, éstos fueron menores, es decir inversamente proporcional a la mayor concentración.

También se observa que para el caso del tratamiento 1 el incremento máximo ocurrió en la concentración de 0.001 mg/L, donde el aBSS4, tuvo un incremento del 483% que duplica el incremento del 229% alcanzado por el control y fue significativo al  $P \leq 0.001$ .

El incremento de los pesos frescos en los T2, T3 y T4 fueron mucho menores que los obtenidos con el aBSS4, sin embargo se incrementaron con las concentraciones de 0.01 y 0.1 mg/L, siendo significativo el valor obtenido en el T4 cuando se utilizó una concentración de 0.1 mg/L.

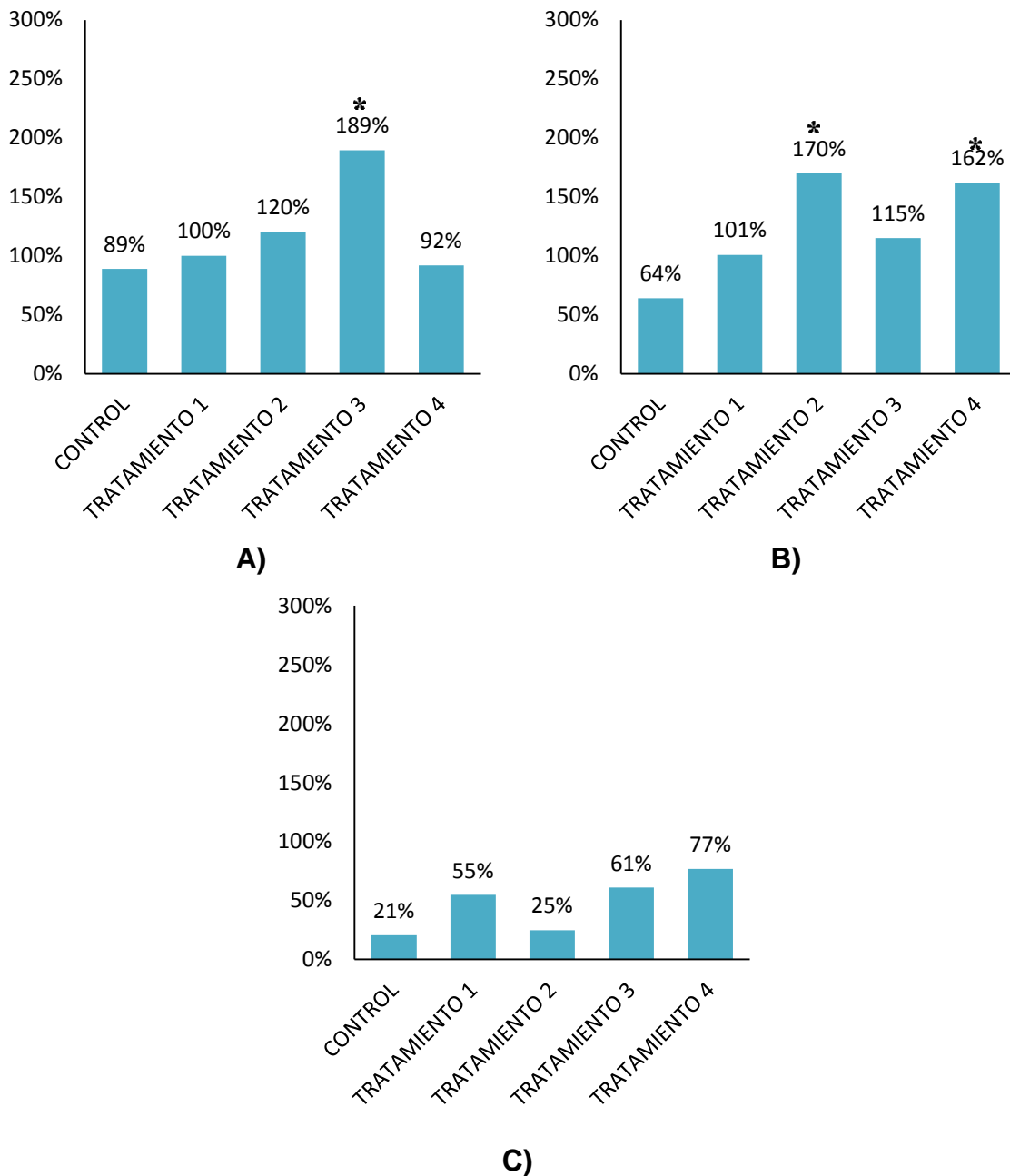
## XVII.2. Número de Hojas a los 60 días

En la tabla 10, se puede apreciar los valores del número de hojas obtenidos, con su desviación estándar para los diferentes tratamientos, en las tres concentraciones utilizadas. Se indica también los porcentajes de incremento que se obtuvieron en el control y en las plántulas evaluadas con los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTOS	Día inicial	Día 60	% incremento	
	No. de HOJAS ± DE	No. de HOJAS ± DE	0 a 60 días	
<b>0.001 mg/L</b>				
CONTROL	3.68 ± 1.32	6.95 ± 3.34	ns	89%
TRATAMIENTO 1	4.76 ± 1.70	9.53 ± 4.51	ns	100%
TRATAMIENTO 2	3.44 ± 1.86	7.57 ± 3.46	ns	120%
TRATAMIENTO 3	3.80 ± 1.20	11 ± 7.45	**	189%
TRATAMIENTO 4	3.80 ± 0.98	7.29 ± 2.94	ns	92%
<b>0.01 mg/L</b>				
CONTROL	3.80 ± 1.41	6.24 ± 2.60	ns	64%
TRATAMIENTO 1	3.52 ± 1.39	7.07 ± 3.13	ns	101%
TRATAMIENTO 2	3.56 ± 1.86	9.61 ± 3.96	*	170%
TRATAMIENTO 3	3.72 ± 1.56	8.00 ± 6.36	ns	115%
TRATAMIENTO 4	3.64 ± 0.97	9.52 ± 4.25	*	162%
<b>0.1 mg/L</b>				
CONTROL	5.31 ± 1.40	6.40 ± 2.24	ns	21%
TRATAMIENTO 1	4.37 ± 2.08	6.76 ± 5.53	ns	55%
TRATAMIENTO 2	4.45 ± 2.27	5.55 ± 2.89	ns	25%
TRATAMIENTO 3	4.85 ± 1.56	7.80 ± 4.27	ns	61%
TRATAMIENTO 4	4.50 ± 1.59	7.95 ± 5.94	ns	77%

Tabla 10 Resultados del número de hojas de plántulas de *Laelia anceps* a 60 días de iniciado el experimento. Se muestran los promedios y las desviaciones estándar de las tres concentraciones del análogo de brasinoesteroide (mg/L) y control. La diferencia significativa \* = P < 0,05; \*\* = P < 0,01; \*\*\* = P < 0,001; ns = no significativo.

El comportamiento en los diferentes tratamientos se puede observar en la gráfica 6 A), B) y C)



Gráfica 6 Porcentajes de incremento del día inicial al día 60 en el número de hojas de plántulas de *Laelia anceps* a la concentración A) 0.001 mg/L, B) 0.01mg/L, C) 0.1mg/L.

En estas gráficas se observa que en las tres concentraciones existen incrementos en el número de hojas, y que en el caso del T1, los valores son positivos, sin embargo únicamente en el T2 en la concentración de 0.01 mg/L, en el T4 en la concentración de 0.01 mg/L y en el T3 en la concentración de 0.001 mg/L, respectivamente, los valores fueron significativos respecto al control. Cabe mencionar que los incrementos en el número de hojas se observó claramente a los 30 y 60 días en el aBBS4, sin embargo, el efecto no fue significativo.

Por el contrario, en la Grafica C se observan que solo en el T2 hubo una gran respuesta muy similar al control, y el resto de los tratamientos fueron el doble del mismo. A pesar de ello, ninguno de los resultados a la concentración 0.1 mg/L resultó significativamente diferente con respecto al control.

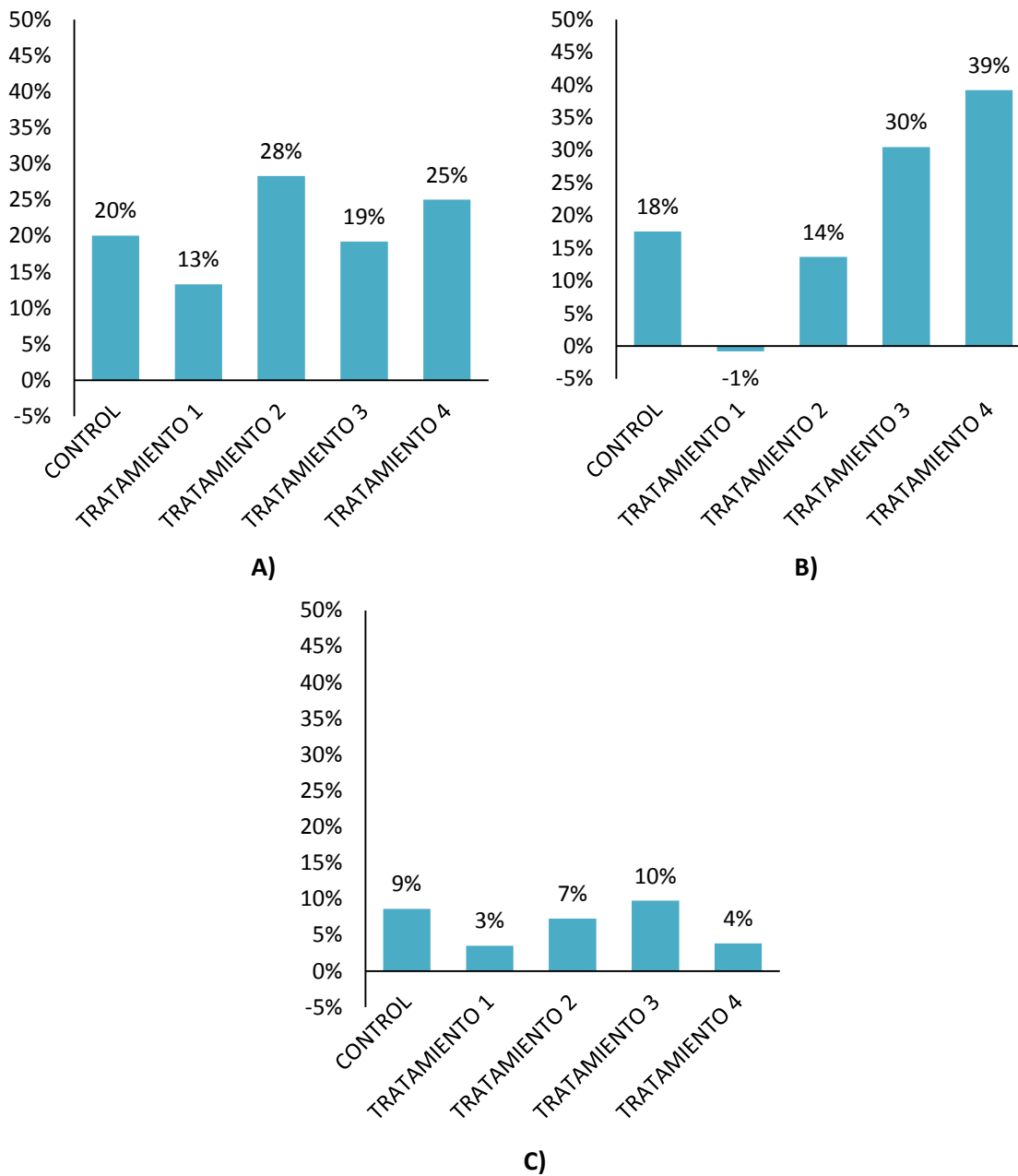
### XVII.3. Altura a los 60 días

En la tabla 11, se puede apreciar los porcentajes de incremento que se obtuvieron con respecto al control. Los cuáles fueron obtenidos descontando el porcentaje del crecimiento del control para cada tratamiento en las plántulas cultivadas en el medio de cultivo. El porcentaje negativo indica que la plántula tuvo un crecimiento menor al del control.

	Día inicial	Día 60	% increm 0 a 60 días	
TRATAMIENTOS	ALTURA ± DE	ALTURA ± DE		
<b>0.001 mg/L</b>				
CONTROL	17.17 ± 3.18	20.61 ± 4.29	ns	20%
TRATAMIENTO 1	19.86 ± 3.20	22.50 ± 4.50	ns	13%
TRATAMIENTO 2	16.64 ± 3.70	21.35 ± 5.82	ns	28%
TRATAMIENTO 3	18.95 ± 4.30	22.59 ± 4.80	ns	19%
TRATAMIENTO 4	18.11 ± 4.26	22.64 ± 5.77	ns	25%
<b>0.01 mg/L</b>				
CONTROL	18.08 ± 4.15	21.25 ± 4.51	ns	18%
TRATAMIENTO 1	18.63 ± 3.56	18.48 ± 3.14	ns	-1%
TRATAMIENTO 2	19.72 ± 3.79	22.41 ± 5.64	ns	14%
TRATAMIENTO 3	19.83 ± 4.96	25.87 ± 8.70	ns	30%
TRATAMIENTO 4	18.86 ± 3.58	26.25 ± 6.48	ns	39%
<b>0.1 mg/L</b>				
CONTROL	17.74 ± 4.62	19.27 ± 3.94	ns	9%
TRATAMIENTO 1	18.93 ± 4.36	19.59 ± 4.63	ns	3%
TRATAMIENTO 2	17.34 ± 4.78	18.60 ± 3.66	ns	7%
TRATAMIENTO 3	20.01 ± 3.87	21.96 ± 5.23	ns	10%
TRATAMIENTO 4	18.84 ± 4.04	19.56 ± 5.42	ns	4%

**Tabla 11 Resultados en la Altura de plántulas de *Laelia anceps* a 60 días de iniciado el experimento. Se muestran los promedios y las desviaciones estándar de las tres concentraciones del análogo de brasinoesteroide (mg/L) y control. La diferencia significativa \* = P < 0,05; \*\* = P < 0,01; \*\*\* = P < 0,001; ns = no significativo.**

El comportamiento en los diferentes tratamientos se puede observar en la gráfica 7 A), B) y C)



Gráfica 7 Porcentajes del día inicial al día 60 en la Altura en plántulas de *Laelia anceps* a la concentración A) 0.001 mg/L, B) 0.01mg/L, C) 0.1mg/L.

En estas gráficas se observa un claro incremento en altura de la planta en el T2 y T4, y en el T3 y T4 en las concentraciones 0.001 mg/L y 0.01 mg/L, respectivamente, aunque en ningún caso los valores fueron significativamente diferentes que los del control. En las plántulas evaluadas a la concentración de 0.1 mg/L, no se observaron incrementos mayores que el control, por el contrario, se observa que el crecimiento fue inhibido o muy similar al mismo.

Cabe resaltar que todas las alturas de las plántulas evaluadas en los T2, T3 y T4 tuvieron mayores incrementos que el aBSS4, a todas las tres concentraciones utilizadas en este experimento.

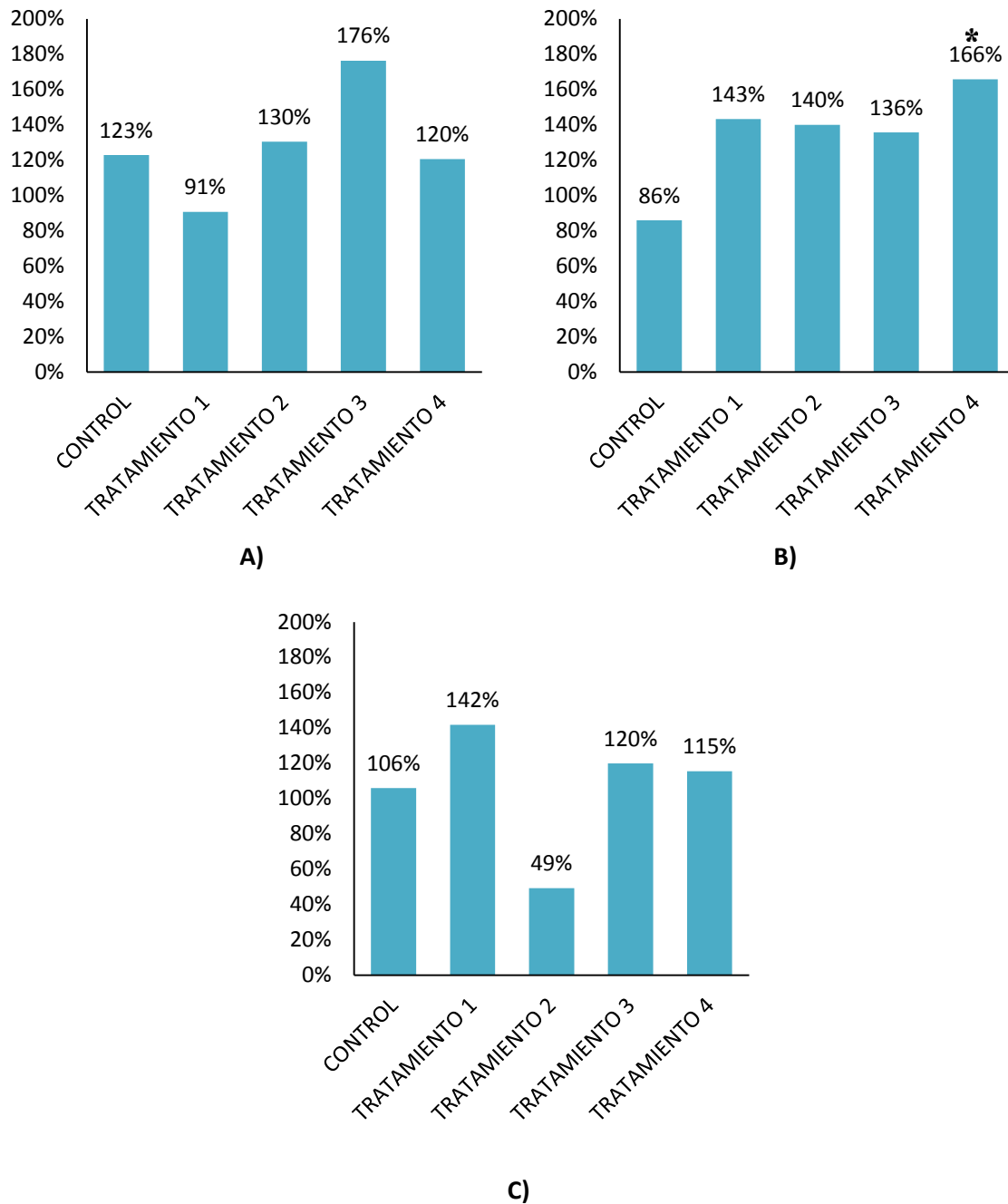
## XVII.4. Número de Raíces a los 60 días

En la tabla 12, se puede apreciar los porcentajes de incremento que se obtuvieron con respecto al control. Los cuáles fueron obtenidos descontando el porcentaje del crecimiento del control para cada tratamiento en las plántulas cultivadas en el medio de cultivo. El porcentaje negativo indica que la plántula tuvo un crecimiento menor al del control.

TRATAMIENTOS	Dia inicial	Dia 60	% increme 0 a 60 días	
	No. de RAICES ± DE	No. de RAICES ± DE		
<b>0.001 mg/L</b>				
CONTROL	2.76 ± 1.11	6.15 ± 2.82	ns	123%
TRATAMIENTO 1	2.76 ± 1.11	5.26 ± 2.31	ns	91%
TRATAMIENTO 2	2.48 ± 0.85	5.71 ± 3.44	ns	130%
TRATAMIENTO 3	2.84 ± 1.05	7.85 ± 3.13	ns	176%
TRATAMIENTO 4	2.80 ± 1.13	6.17 ± 2.93	ns	120%
<b>0.01 mg/L</b>				
CONTROL	2.88 ± 1.11	5.35 ± 2.54	ns	86%
TRATAMIENTO 1	2.32 ± 1.01	5.64 ± 2.32	ns	143%
TRATAMIENTO 2	2.88 ± 2.08	6.91 ± 4.24	ns	140%
TRATAMIENTO 3	3.00 ± 1.46	7.07 ± 4.48	ns	136%
TRATAMIENTO 4	3.04 ± 1.28	8.08 ± 3.40	*	166%
<b>0.1 mg/L</b>				
CONTROL	2.69 ± 0.92	5.53 ± 2.25	ns	106%
TRATAMIENTO 1	2.30 ± 0.90	5.56 ± 4.62	ns	142%
TRATAMIENTO 2	2.68 ± 1.10	4.00 ± 1.95	ns	49%
TRATAMIENTO 3	2.88 ± 0.97	6.33 ± 3.48	ns	120%
TRATAMIENTO 4	1.93 ± 0.88	4.16 ± 2.30	ns	115%

Tabla 12 Resultados en el número de raíces de plántulas de *Laelia anceps* a 60 días de iniciado el experimento. Se muestran los promedios y las desviaciones estándar de las tres concentraciones del análogo de brasinoesteroide (mg/L) y control. La diferencia significativa \* = P < 0,05; \*\* = P < 0,01; \*\*\* = P < 0,001; ns = no significativo.

El comportamiento en los diferentes tratamientos se puede observar en la gráfica 8 A), B) y C)



Gráfica 8 Porcentajes de incremento del día inicial al día 60 en el número de raíces de plántulas de *Laelia anceps* a la concentración A) 0.001 mg/L, B) 0.01mg/L, C) 0.1mg/L.

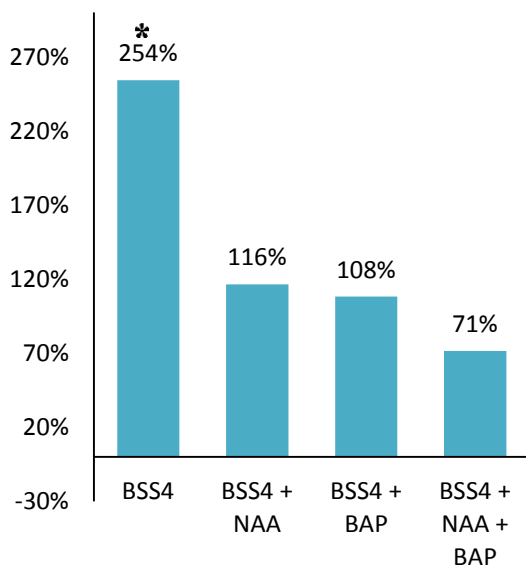
En estas gráficas se observa que con excepción del aBSS4, hubo incrementos importantes en el número de raíces, cuando se usaron los T2, T3 y T4. El análogo tuvo mayores incrementos en las concentraciones 0.001 y 0.01 mg/L.

Sin embargo, este factor evaluado solo fue significativo en el T4 en la concentración 0.01 mg/L. Nuevamente, los incrementos obtenidos en la concentración más alta (Grafica C) fueron más semejante al porcentaje obtenido para el control, o menores como en el caso del tratamiento 2.

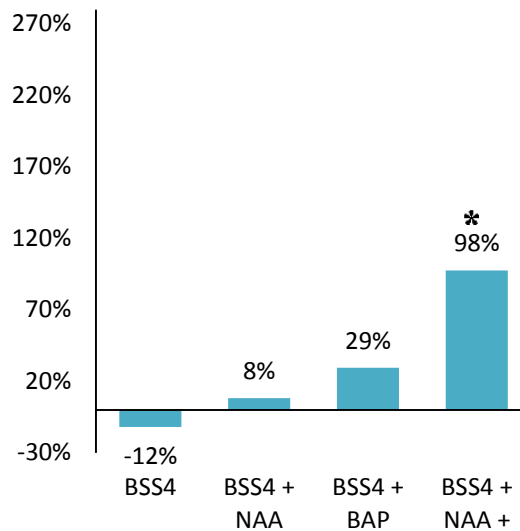
## XVIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El análogo del brasinoesteroide presenta una importante influencia en el desarrollo de plántulas de *Laelia anceps*. De acuerdo al bioensayo, las bajas concentraciones presentan una mejor actividad y así mismo actúa el aBSS4 mejor con la auxina NAA.

Para el peso fresco pudimos observar que a la concentración más baja del análogo empleada en este bioensayo 0.001mg/L (0.174µM) se tuvo una destacada actividad en comparación con otros promotores de crecimiento tal como lo describen Garciglia, R. S., Rodríguez, M. A. C., & Rosa, E. (2013) y García, A., Rodríguez, T., Héctor, E., & Núñez, M. (2005) Figura 1 y 1A. Grafica No. 9 y 10.



**Gráfica 9** Porcentajes de incremento con respecto al control en el peso fresco de plántulas de *Laelia anceps* a los 60 días en la concentración 0.001 mg/L.



**Gráfica 10** Porcentajes de incremento con respecto al control en el peso fresco de plántulas de *Laelia anceps* a los 60 días en la concentración 0.1mg/L.

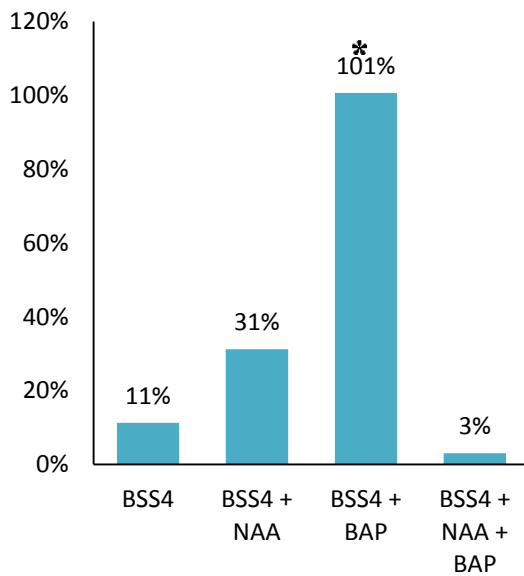


**Figura 11** Incremento con respecto al control en el peso fresco de plántulas de *Laelia anceps* a los 60 días en T1 en la concentración 0.001 mg/L.

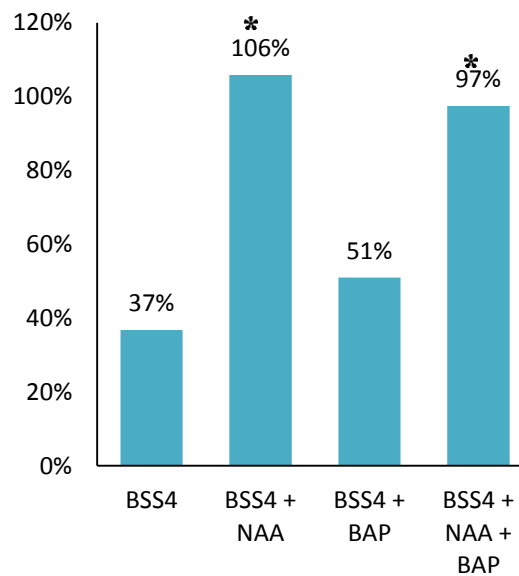
**Figura 12** Incremento con respecto al control en el peso fresco de plántulas de *Laelia anceps* a los 60 días en T4 en la concentración 0.1 mg/L.

En el mismo parámetro evaluado, a la concentración 0.1 mg/L en el tratamiento de T4 se tuvo un incremento significativo en peso fresco, esto se le atribuye al efecto potencializador que existe entre las fitohormonas pero no de manera marcada con el análogo del brasinoesteroide sino solo la auxina y citocinina ya que pudimos observar que a concentraciones altas el análogo tiene efecto inhibidores como lo describen Guerrero, Y. R., Ayan, L. R., González, L. M., Morales, L. M. M., & Vázquez, M. N. (2013) donde aplicaron de manera exógena 24-epibrasinólida en plantas de tomate y mostraron que a  $0.1\mu\text{ML}^{-1}$  ocurre una inhibición en la elongación y crecimiento.

Porcentaje de incremento con respecto al control a los 60 días en el número de hojas, datos más destacados. Grafica No. 11 y 12



**Gráfica 11** Porcentajes de incremento con respecto al control en el número de hojas de plántulas de *Laelia anceps* a los 60 días en la concentración 0.001 mg/L.



**Gráfica 12** Porcentajes de incremento con respecto al control en el número de hojas de plántulas de *Laelia anceps* a los 60 días en la concentración 0.01 mg/L.

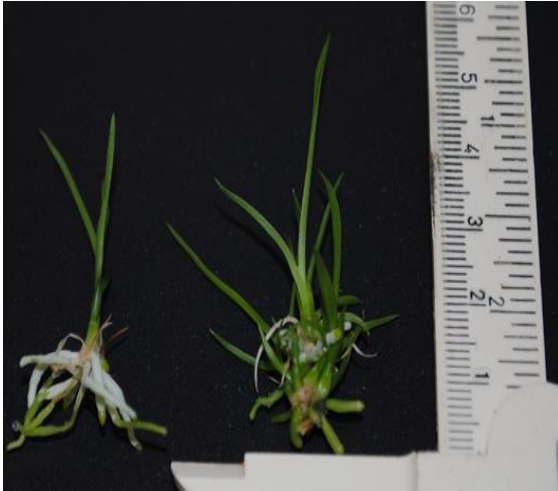


Figura 13 Incremento con respecto al control en el número de hojas de plántulas de *Laelia anceps* a los 60 días en T3 en la concentración 0.001 mg/L.



Figura 14 Porcentajes de incremento con respecto al control en el número de hojas de plántulas de *Laelia anceps* a los 60 días en T2 en la concentración 0.01 mg/L.



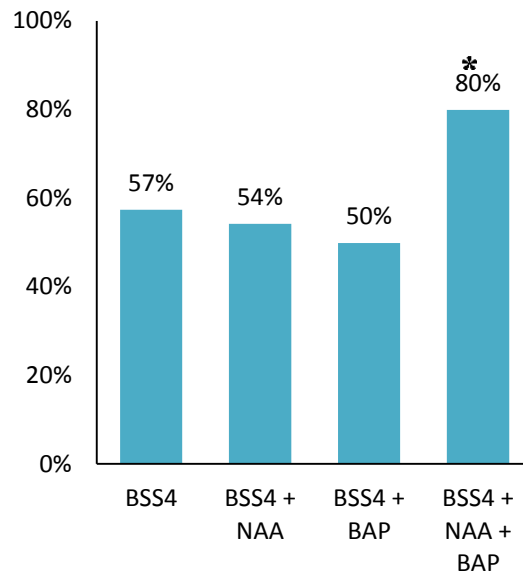
Figura 15 Porcentajes de incremento con respecto al control en el número de hojas de plántulas de *Laelia anceps* a los 60 días en T4 en la concentración 0.01 mg/L.

Para el efecto del análogo BSS4 con BAP (T3) se tuvo un efecto significativo en la concentración 0.001 mg/L aumentando el número de hojas a los 60 días, figura 3 y 3A, al igual que se observó un mejor incremento a la concentración 0.01 mg/L en la combinación con NAA (B) (T2), figura 4 y 4 A), siguiendo casi el mismo comportamiento en el tratamiento de BSS4 con NAA y BAP (T4), figura 4 y 4B) lo que podemos concluir que es mejor emplear solo el análogo con NAA sin la

necesidad de utilizar más promotores de crecimiento para promover un mayor número de hojas.

Para este parámetro también se pudo observar de mejor manera el sinergismo como lo describe Kim et al. 2000, Oviedo, H. I. (2011), Oklešt, J., Rárová, L., & Strnad, M. (2013). Donde los brasinoesteroides con la auxina NAA tienen mejor efecto juntas.

Para el porcentaje de incremento con respecto al control a los 60 días en el número de raíces, datos más destacados fueron los siguientes.



**Gráfica 13 Porcentajes de incremento con respecto al control en el número de raíces de plántulas de *Laelia anceps* a los 60 días en la concentración 0.01 mg/L.**



**Figura 16** Incremento con respecto al control en el número de hojas de plántulas de *Laelia anceps* a los 60 días T4 en la concentración 0.01 mg/L.

Para el incremento en el número de raíces si nos apoyamos de la combinación de BSS4 con NAA y BAP (T4) en la misma concentración 0.01mg/L podemos obtener un número importante de raíces y a la vez de hojas, por lo que se emplean todas las fitohormonas a esta concentración obteniendo resultados favorables en 60 días.

Dada la adaptación de las plántulas en los primeros 30 días no se observaron diferencias importantes. Las mediciones que se realizaron a los 60 días muestran un incremento favorable en la altura de las plántulas.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una actividad promotora del crecimiento causado por el aBSS4 a los 30 y 60 días de evaluación, lo que se demuestra por los incrementos que se observaron respecto al control, principalmente para el peso fresco y el número de hojas.

El efecto del aBSS4 varió dependiendo de la concentración utilizada y de la parte evaluada. En el caso de la parte aérea, su efecto se mostró más claramente en el peso fresco y número de hojas, pero no en la altura de la planta, donde generalmente tuvo un crecimiento menor que el control.

Por el contrario, en las raíces, se observó un mayor efecto en la evaluación a los 60 días con las dos concentraciones más altas (0.01 y 0.1 mg/L).

En la búsqueda de si existe o no un efecto aditivo del aBSS4 cuando se combina con otros reguladores del crecimiento, los resultados indicaron que:

En el T2 no se observan mayores efectos cuando se evalúa a los 30 días pero si para el número de raíces en la concentración 0.001mg/L, sin embargo si se observan mayores incrementos en los parámetros de la parte aérea principalmente, y en la raíz hasta los 60 días de manera continua en la misma concentración ya antes mencionada.

En el T3 se observan mayores incrementos en el peso fresco y número de hojas a los 30 días, efectos a los que se le suma el incremento en la altura y raíces de la planta a los 60 días de evaluación.

En el T4 los efectos más notorios se observan a los 60 días, donde el incremento en el peso fresco a la concentración más alta es significativo, el número de hojas y número de raíces también es significativo a la concentración de 0.01 mg/L.

Destaca el hecho de que a pesar de que la altura de las plántulas se ve incrementada en este tratamiento, los valores no son significativos con respecto al control.

## **XIX. CONCLUSIONES**

El compuesto evaluado en este trabajo posee una actividad promotora en el desarrollo. El aBSS4 mostró tener una mejor respuesta promoviendo un mayor desarrollo en el peso fresco a la concentración más baja 0.001mg/L a los 60 días.

Así mismo se observó un efecto sinérgico notorio con la auxina NAA lo que nos ayuda a proponer futuros cultivos con esta combinación en una concentración de 0.01mg/L para promover el crecimiento de hojas.

Si se emplea el análogo aBSS4 en la combinación con NAA y BAP a la concentración 0.01mg/L podemos obtener un mayor número de hojas y raíces.

Para la propagación de esta orquídea mexicana los mejores resultados se observaron al emplear al análogo BSS4 a la concentración de 0.001mg/L (0.174 $\mu$ M) adicionado en un medio MS para el aumento de la masa en las plántulas.

## XX. REFERENCIAS

Andrade Rosales, M. d. L., M. Rodríguez Acosta, et al. (2013). Efecto de un análogo de brasinoesteroide en la inclinación de la lamina de arroz y en los cultivos de frijol. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla:35-36.

Bechtel, P. (1990). "The laelias of Mexico." American Orchid Society bulletin (USA), 59(12),1229-1234 .

Belkhadir, Y., L. Yang, et al. (2014). "The growth–defense pivot: crisis management in plants mediated by LRR-RK surface receptors." Trends in biochemical sciences **39**(10): 447-456.

Clouse, S. D. (1996). "Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development." The Plant Journal **10**(1): 1-8.

Coenen, C. and T. L. Lomax (1997). "Auxin—cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools." Trends in Plant Science **2**(9): 351-356.

Costales, D., M. C. Nápoles, et al. (2008). "Influencia de un análogo de brasinoesteroide sobre la nodulación de plántulas de soya (*Glycine max* (L) Merrill)." Cultivos Tropicales **29**: 65-69.

Cutler, H. G., T. Yokota, et al. (1991). Brassinosteroids. Chemistry, bioactivity, and applications, American Chemical Society.

Díaz Llera, S. d. C. and G. Fonseca López (1999). "Evaluación genotóxica del brasinoesteroide DI-31 (BIOBRAS-16) mediante el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón." Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas **18**: 27-28.

Fonnesbech, M. (1972). "Growth hormones and propagation of *Cymbidium* in vitro." Physiologia Plantarum **27**(3): 310-316.

García, A., T. Rodríguez, et al. (2005). "Efecto del análogo de brasinoesteroide MH-5 en el crecimiento in vitro del arroz (*Oryza sativa* L.) en condiciones de déficit hídrico." Cultivos Tropicales **26**(1): 89-93.

García, D. M. C. (2006). "Novedades acerca del mecanismo de reconocimiento y transducción de la señal brasinoesteroide." Revista CENIC. Ciencias Biológicas **37**(2): 67-72.

Garciglia, R. S., M. A. C. Rodríguez, et al. (2013). "Uso de brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura." *Revista Biológicas* **10**(1): 18-27.

Gomez Sanchez, D. M., M. Rodriguez Acosta, et al. (2013). Efecto del análogo de Brasinoesteroide en lamina de arroz. Jardín Botánico Universitario, Laboratorio de Síntesis y Modificación de productos naturales., Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Grove, M. D., G. F. Spencer, et al. (1979). "Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen." pp. 216-217.

Guerrero, Y. R., L. R. Ayan, et al. (2013). "Efecto de los brasinoesteroides y un inhibidor de su biosíntesis en plántulas de dos variedades de tomate sometidas a estrés salino." *Cultivos Tropicales* **35**(1): 25-34.

Hágsater, E. and M. A. S. Arenas (1998). "Orchid conservation in Mexico." *Selbyana*: 15-19.

Hall, G. F. (1983). "Pedology and geomorphology." *Developments in Soil Science* **11**: 117-140.

Hayat, S., B. Ali, et al. (2007). "Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *Brassica juncea*." *Environmental and Experimental Botany* **60**(1): 33-41.

Herrera, M. A. F. (2010). Síntesis de derivados esteroidales con actividad biológica: anticancerígenos y promotores de crecimiento vegetal, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla: 272-280.

Hidalgo Peña, N., M. Rodriguez Acosta, et al. (2012). 1. Evaluación de Análogos de Brasinoesteroides mediante el bioensayo del frijol (*Phaseolus vulgaris*). Jardín Botánico Universitario; Facultad de Ciencias Químicas Departamento de Química Orgánica BUAP, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla:50-51

Jordán, M. and J. Casaretto (2006). "Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico." *Fisiología Vegetal*. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

Kagale, S., U. K. Divi, et al. (2007). "Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses." *Planta* **225**(2): 353-364.

Kakimoto, T. (2003). "Perception and signal transduction of cytokinins." *Annual Review of Plant Biology* **54**(1): 605-627.

Kim, S.-K., S. C. Chang, et al. (2000). "Involvement of brassinosteroids in the gravitropic response of primary root of maize." *Plant Physiology* **123**(3): 997-1004.

Lee Espinosa, H. E., A. Laguna Cerda, et al. (2010). "Un protocolo de embriogénesis somática para la regeneración y caracterización in vitro de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*." *Revista fitotecnia mexicana* **33**: 323-332.

Lee, Y.-I. and N. Lee (2003). "Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **39**(5): 475-479.

Ludwig-Müller, J. (2011). "Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants." *Journal of Experimental Botany* **62**(6): 1757-1773.

Malabadi, R. B. and K. Nataraja (2007). "Brassinosteroids Influences in vitro Regeneration Using Shoot Tip Sections of *Cymbidium elegans* Lind." *Asian Journal of Plant Sciences* **6**(2).

Mandava, N. B. (1988). "Plant growth-promoting brassinosteroids." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**(1): 23-52.

McKendrick, S. (2000). "Manual para la Germinación in vitro de Orquídeas." Ceiba Fundación para la Conservación Tropical. Universidad San Francisco de Quito.

Mitchell, J., N. Mandava, et al. (1970). "Brassinins-a new family of plant hormones from rape pollen." *Nature* **225**(5237): 1065-1066.

Mitra, G. (1971). "Studies on seeds, shoot-tips & stem-discs of an orchid grown in aseptic culture." *Indian journal of experimental biology*: 79-85.

Mitra, G., R. Prasad, et al. (1976). "Inorganic salts & differentiation of protocorms in seed callus of an orchid & correlated changes in its free amino acid content." *Indian journal of experimental biology*: 350-351.

Moreno, A., M. R. Acosta, et al. (2009). Efecto de análogos de brasinoesteroides en diferentes variedades de maíz (*Zea mays* L.) criollo Jardín Botánico BUAP. Puebla, Mexico, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla: 60-61

Murashige, T. and F. Skoog (1962). "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures." *Physiologia Plantarum* **15**(3): 473-497.

Murthy, H. and A. Pyati (2001). "Micropropagation of *Aerides maculosum* lindl.(Orchidaceae)." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **37**(2): 223-226.

Núñez, M., L. Mazorra, et al. (2007). "Análogos de brasinoesteroides revierten parcialmente el impacto del estrés salino en el crecimiento inicial de las plántulas de dos genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.)." *Cultivos Tropicales* **28**(2): 95-99.

Ogwen, J. O., X. S. Song, et al. (2008). "Brassinosteroids alleviate heat-induced inhibition of photosynthesis by increasing carboxylation efficiency and enhancing antioxidant systems in *Lycopersicon esculentum*." *Journal of Plant Growth Regulation* **27**(1): 49-57.

Okleštková, J., L. Rárová, et al. (2013). *Brassinosteroids and their Biological Activities. Natural Products*. Springer Berlin Heidelberg: 3851-3871.

Oviedo, H. I. (2011). "Actividad biológica de los brasinoesteroides y sus análogos en las plantas."

Rao, T. A. (1998). "Conservation of wild orchids of Kodagu in the Western Ghats. Agricultural Technologies and Services Pvt. Bangalore, India : 28-69.

Rivera Espinoza, V., M. Rodriguez Acosta, et al. (2013). Efecto de Análogos de Brasinoesteroide en el Bioensayo de la inclinación de la Lamina de Arroz (*Oryza sativa* L.). Jardín Botánico Universitario, Laboratorio de Síntesis y Modificación de productos Naturales, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla: 49.

Saenz, L., I. Cordova, et al. (2005). "Los brasinoesteroides. Una nueva clase de hormonas vegetales." from [http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/index.php?option=com\\_content&task=view&id=47](http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=47).

Sánchez Roldán, M. M. (2009). "Evaluación de medios de cultivo para la reproducción in vitro de *Laelia anceps*." *Colegio de postgraduados. Puebla, pue*:15-21.

Sasse, J., T. Yokota, et al. (1992). *Brassinolide-induced elongation. Progress in plant growth regulation*, Springer: 319-325.

Seeni, S. and P. Latha (1992). "Foliar regeneration of the endangered red vanda, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae)." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **29**(3): 167-172.

Shimura, H. and Y. Koda (2004). "Micropropagation of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* through protocorm-like bodies derived from mature seeds." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **78**(3): 273-276.

Skoog, F., F. Strong, et al. (1965). "Cytokinins." *Science* **148**(3669): 532-533.

Soto-Arenas, M. and F. Halbinger (1997). "Laelias of Mexico." *Orquídea (Méx.)* **15**: 1-160.

Soto Arenas, M. (1993). "Clasificación infraespecífica de *Laelia anceps*." *Orquídea* **13**(1-2): 125-144.

Steffens, G. (1991). US department of agriculture Brassins project: 1970-1980. ACS Symposium series-American Chemical Society.

Suárez, L. (2007). "Efecto que ejercen las aspersiones foliares de una mezcla de oligogalacturónidos (pectimorf) y la formulación a base de un análogo de brasinoesteroides (biobras-16) en dos especies de orquídeas (*Cattleya leuddemanniana* y *Guarianthe skinneri*)." *Cultivos Tropicales* **28**(4): 87-91.

Vergara-Galicia, J., R. Ortiz-Andrade, et al. (2010). "Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic extract from roots of *Laelia anceps* are mediated by calcium-channel antagonism." *Fitoterapia* **81**(5): 350-357.

Yokota, T. (1997). "The structure, biosynthesis and function of brassinosteroids." *Trends in Plant Science* **2**(4): 137-143.

Zullo, M. A. T. and G. Adam (2002). "Brassinosteroid phytohormones: structure, bioactivity and applications." *Brazilian Journal of Plant Physiology* **14**(3): 143-181.

## **XXI. ANEXOS**

### **SOLUCIONES Y DILUCIONES DE LOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO.**

Los brasinoesteroides empleados son muy poco solubles en agua por lo que se utilizó etanol al 96% como co-disolvente.

#### **SOLUCIÓN ESTÁNDAR**

1. Se pesa 1mg de aBSS4 en balanza analítica y posteriormente se colocar en un matraz de 50 ml previamente desinfectado y secado con acetona.
2. Se disuelve el aBSS4 en el matraz agregándose 10 mL de etanol al 96% de pureza.
3. Se calienta agua hasta llegar a  $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y mantener a esta temperatura para todas las soluciones.
4. Aforar a 50 mL con el agua previamente caliente ( $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) el matraz que contiene el aBSS4 disuelto en etanol. Esta es la solución madre de la cual derivaran las concentraciones necesarias siguientes.
5. De la solución madre se realizan diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$  mg/L del análogo del brasinoesteroide BSS4(Herrera 2010) (Oviedo 2011).
6. Para el caso de las hormonas NAA y BAP se pesa 100mg de NAA y BAP en balanza analítica y posteriormente se colocan en un matraz aforado de 50 ml.
7. De la solución madre de cada hormona se tomaran 0.05ml o 5 UI y aforar en un matraz de 50ml.

## PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE AND SKOOG (MS).

Para la elaboración del medio de cultivo MS se partió de soluciones madres ya establecidas en la siguiente tabla. (Murashige and Skoog 1962) **Tabla 8.**

MEDIO MS	mg/l	g/l	mg/l
<b>Macronutrientes</b>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16500	16.5	1650
KNO <sub>3</sub>	19000	19	1900
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3700	3.7	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1700	1.7	170
<b>Fuente de calcio</b>			
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4400	4.4	440
<b>Micronutrientes</b>			
KI	166	0.166	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1240	1.24	6.2
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	4460	4.46	22.3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1720	1.72	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	50	0.05	0.25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	5	0.005	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5	0.005	0.025
<b>Fuentes de hierro</b>			
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5560	5.56	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	7460	7.46	37.3
<b>Vitaminas</b>			
Acido nicotínico	100	0.1	0.5
Piridoxina	100	0.1	0.5
Tiamina-HCl	100	0.1	0.5
Glicina	400	0.4	2
Mioinositol		0.5	

**Tabla No. 13** Medio Murashige and Skoog.

De cada solución madre se toman alícuotas según la tabla a continuación.

<b>ALICUOTAS PARA LA PREPARACION DE 1L DE MEDIO MS</b>	
<b>Macronutrientes</b>	100ml
<b>Fuentes de calcio</b>	100ml
<b>Micronutrientes</b>	5ml
<b>Fuentes de Hierro</b>	5ml
<b>Vitaminas</b>	5ml
<b>Mioinositol</b>	0.1g
<b>Sacarosa</b>	30g
<b>Agar</b>	9g
<b>Carbón activado</b>	0.5g
<b>pH</b>	5.7

**Tabla No.14** Concentraciones stock para la preparación de medio MS