



**BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Tesis

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

HÉCTOR ROJAS LUNA

**Influencia del análogo de Brasinoesteroide BSS4 en el
desarrollo de plántulas de *Epidendrum ciliare* (Orchidaceae).**

DIRECTORES

DR. MARICELA RODRIGUEZ ACOSTA

DR. JESUS SANDOVAL RAMIREZ

PUEBLA, PUE.

Enero 2015

ÍNDICE GENERAL.

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.	3
2.1. Reguladores de crecimiento.....	3
2.2. Brasinoesteroides.	5
2.3. Localización, biosíntesis y metabolismo de los Brasinoesteroides.....	7
2.4. Análogos de brasinoesteroides.	9
2.5. Cultivo <i>in vitro</i> de plantas.	11
2.6. Medios de cultivo y sus componentes.....	14
2.7. Características de las orquídeas.	15
2.8. Trabajos previos con Brasinoesteroides y sus análogos.	16
3. JUSTIFICACIÓN.	19
4. OBJETIVOS.	20
5. HIPÓTESIS.....	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
6.1. Diagrama de Flujo.....	26
7. RESULTADOS.....	27
7.1. Evaluación a los 30 días.....	28
7.2. Evaluación a los 60 días.....	31
7.3. Determinación de biomasa.	34
8. DISCUSIÓN.....	35

8.1.	Peso fresco.....	36
8.2.	No. De Hojas.	38
8.3.	No. de Raíces.	40
8.4.	Biomasa	42
9.	CONCLUSIONES.....	43
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
11.	APÉNDICE.....	48

RESUMEN

La presente investigación se realizó en el laboratorio del Jardín Botánico Universitario BUAP con el objetivo de mostrar el efecto ejercido en el desarrollo de plántulas de *Epidendrum ciliare (Orchidaceae)*, una planta con potencial ornamental y económico por un análogo de Brasinoesteroide obtenido por vía sintética dentro del grupo de trabajo. Para llevar a cabo este estudio se emplearon 3 diferentes concentraciones del denominado aBSS4 (análogo de brasinoesteroide 4): 1.00, 0.50 y 0.05 mg/L en un medio de cultivo Murashige & Skoog como soporte y control. La concentración 0.50mg/L del aBSS4 demostró tener un efecto positivo en la producción de células de la parte foliar y la captación de humedad del medio de cultivo para aumentar el peso fresco.

1. Introducción.

En la búsqueda de nuevas alternativas que coadyuven al incremento del rendimiento de los cultivos alimenticios y ornamentales, se encuentran productos químicos como los fertilizantes inorgánicos y los reguladores del crecimiento vegetal, estos últimos se utilizan para mejorar la calidad de la cosecha de plantas y junto con la ingeniería genética, representan tecnologías complementarias en la agricultura para aumentar la producción y la optimización del uso de los recursos limitados como el agua y suelos fértiles.

El desarrollo de las plantas requiere cambios metabólicos morfo génicos complejos, los cuales son rigurosamente controlados por fitohormonas que afectan el crecimiento de las mismas, además de que determinan y coordinar las funciones celulares de una manera dependiente de la concentración. Hoy en día se han clasificado varios tipos de hormonas vegetales diferentes: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, estrigolactonas, y ácido jasmónico (Garay-Arroyo, De La Paz Sánchez et al. 2012).

La obtención de hormonas vegetales del medio natural, hace incosteable su uso como promotor del crecimiento ya que se encuentran en pequeñas concentraciones; por tal motivo, a través de la síntesis de nuevos productos a partir de hormonas naturales como la diosgenina, se pueden obtener estructuras similares a las formas activas de los Brasinoesteroides (BRs) las cuales por su naturaleza química tienen importantes efectos reconocidos en diversos cultivos. El componente activo de los BRs, el denominado “Brasinos”, fue descubierto después de un gran esfuerzo coordinado entre varios laboratorios del USDA (United States Department of agriculture), cuando del polen de *Brassica napus*, (**Figura No. 1**) se extrajeron 4 mg de una sustancia pura que fue



Figura No. 1 Inflorescencia de *Brassica napus*.

identificada como una lactona esteroidal la cual fue nombrada Brasinólida (Grove, Spencer et al. 1979) (Steffens 1991).

Hasta ahora el uso de los Brasinoesteroides y sus análogos han sido fundamentales en cultivos de interés alimenticio, lo cual ha aliviado en parte a la crisis alimentaria en el planeta (Garciglia, Rodríguez et al. 2013); sin embargo, debido a su actividad probada se ha comenzado a explorar su uso entre otros cultivos comerciales, entre ellos los de interés ornamental como las Orquídeas las cuales son altamente valoradas en todo el mundo. Estas plantas fueron las primeras en ser reproducidas con técnicas biotecnológicas *in vitro* a partir de la siembra de sus semillas, tanto de manera simbiótica utilizando sus correspondientes micorrizas (Selosse, Boullard et al. 2011) como asimbióticamente con medios de cultivo sintéticos a partir de sales inorgánicas (Knudson 1950), o clonalmente al introducirse la técnica del cultivo de meristemas para la propagación vegetativa (Steward and Mapes 1971).

Como se mencionó, las orquídeas tienen una gran importancia hortícola y comercial, por tal motivo, su producción masiva requiere de infraestructura y conocimiento especializado que desde ya hace algunas décadas se han desarrollado y hasta la fecha se siguen modernizando, tanto en la propagación sexual, a través de semillas (Arditti 1967), como asexual con el cultivo de segmentos vegetativos (Nair 1982). Se considera que el uso de los análogos de brasinoesteroides emula la actividad de la Brasinólida, lo que podría desembocar en el crecimiento de plántulas de *E. ciliare* y por lo tanto reducir el tiempo de cultivo.

2. Antecedentes.

2.1. Reguladores de crecimiento.

Los reguladores de crecimiento actúan en el desarrollo de las plantas, en respuesta a estímulos ambientales externos a través de complejas vías de señalización. Estas vías forman redes de interacción complejas y su actividad depende de su biosíntesis, transporte, conjugación, su acumulación en la vacuola, y su degradación (Garay-Arroyo, De La Paz Sánchez et al. 2012). Así también están vinculados con las respuestas morfogénicas durante la ontogenia de las plantas. Un análisis en conjunto de todas ellas desde su descubrimiento en la década de 1930 hasta la fecha, se resume en los siguientes puntos:

- a) Las fitohormonas se encuentran en todas las plantas terrestres y acuáticas de aguas dulces, hábitats, ciclos y formas de vida, ya sea en plantas geófitas, arbustivas como igualmente en árboles de gran altura y en todas las especies distribuidas en las diferentes familias botánicas.
- b) Son compuestos de estructura química simple a excepción de los brasinoesteroides. Uno de ellos, el etileno, se encuentra en forma de gas.
- c) No generan efectos específicos; es decir, su acción puede derivar en varios efectos diferentes a corto y/o a largo plazo.
- d) A diferencia de la mayoría de las hormonas animales, algunas fitohormonas pueden tener acción en los mismos sitios de su síntesis.
- e) En algunos casos, la presencia y acción conjunta de dos fitohormonas (por ejemplo auxinas, brasinoesteroides y citocininas) puede inducir y fijar un tipo determinado de expresión de acuerdo a las concentraciones relativas entre sí, o de cada una de ellas en un tejido (Takashi, Oka et al. 2003).
- f) Algunas comparten sitios o receptores comunes a nivel de membrana.

Entre las fitohormonas encontramos a las auxinas, las cuales intervienen en la planta con la estimulación de la elongación celular, la dominancia apical, diferenciación vascular, la formación de raíces adventicias y la inhibición de la abscisión. Las Giberelinas, las cuales se encuentran en mayor concentración en meristemas de yemas apicales y raíces, hojas jóvenes y embriones, tienen sus principales efectos en la estimulación de la floración y la elongación de los brotes así como la movilización de reservas de nutrientes en las semillas. Por otro lado las Citocininas que se sintetizan en la raíz y posteriormente se transportan al resto de la planta, ejercen sus efectos en la división celular, revierten la dominancia apical, estimulan la formación de brotes y la germinación, movilizan nutrientes hacia las hojas y retrasan el envejecimiento (Coenen and Lomax 1997).

El Ácido abscísico estimula el cierre de estomas, promueve la formación de la semilla y mantiene su dormancia, favorece el envejecimiento y facilita la adaptación de la planta a diversos tipos de estrés. El etileno es el único de naturaleza gaseosa, sin embargo favorece la maduración de frutos, la epinastia y el envejecimiento foliar, provoca el final de la dormición y la germinación de las semillas, es el responsable de la abscisión (Benková and Hejátko 2009).

Los Brasinoesteroides son moléculas compatibles con el ambiente que se caracterizan por actuar en concentraciones muy bajas y sus análogos sintéticos mimetizan el efecto de los brasinoesteroides naturales (Kauschmann, Jessop et al. 1996).

2.2. Brasinoesteroides.

Los Brasinoesteroides son un grupo de lactonas esteroidales polihidroxiladas de origen vegetal que regulan el crecimiento y el desarrollo (Clouse and Sasse 1998). Son derivados del 5 α -Colestano **Figura No. 2** y para ser considerados BRs naturales deben cumplir con las siguientes características estructurales.

a) El anillo A puede estar trioxigenado o sólo estar oxigenado en el carbono 3.

b) El anillo B presenta un 6-oxo-7-oxolactona o un 6-oxo saturado.

c) Todas las uniones desde el anillo A al D son trans.

d) 22 α , 23 α -dihidroxiado, la mayoría alquilado en el carbono 24, a veces metilado en el carbono 25 y, a veces insaturado entre los carbonos 24 y 28.

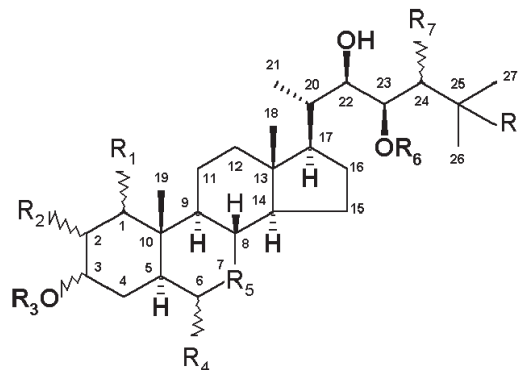


Figura No. 2 Estructura general de los BR.

Después de ser identificada la Brasinólida (el primer BR natural descubierto), se aislaron y caracterizaron otros compuestos que, dependiendo de la estructura molecular tienen diferentes niveles de intensidad en la respuesta que se observa en las plantas (**Figura No 3**).

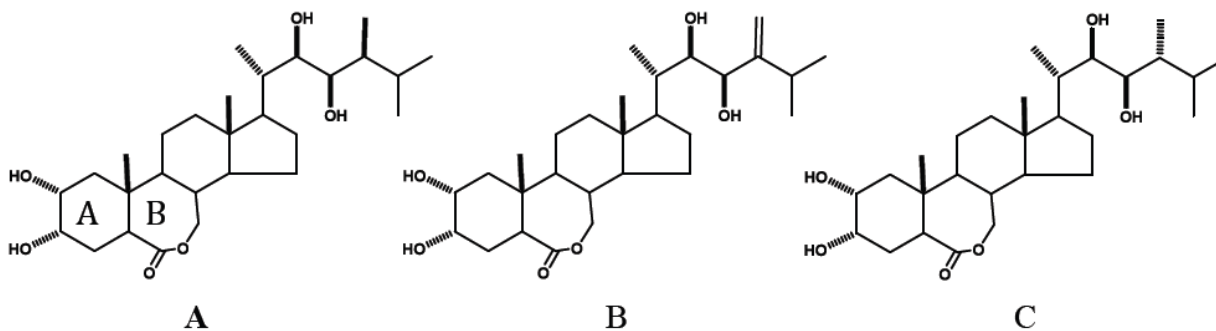


Figura No. 3 Primeros Brasinoesteroides caracterizados. A) Brasinólida, B) Dolicólida, C) Epibrasinólida.

Estos compuestos muestran diferentes grados de actividad estimuladora en la elongación y división celular (Sasse, Yokota et al. 1992). Los grupos funcionales que al parecer son los responsables de la actividad biológica de los BRs, están concentradas en tres fragmentos fundamentales del esqueleto colestánico; estos son los anillos A y B (parte cíclica) y la cadena lateral.

Los BRs también existen conjugados especialmente con azúcares o ácidos grasos y se pueden observar en muchas especies del reino vegetal donde están presentes en casi todas las partes de una planta, aunque las concentraciones más altas se encuentran en los órganos reproductivos (Oklešt, Rárová et al. 2013). La 24-epibrasinólida es el BR natural más utilizado para estudiar los efectos de los BR en plantas, y muchas han sido las formas de aplicación y las concentraciones empleadas. También se han utilizado en experimentos donde se utilizan análogos, que son portadores de modificaciones en su estructura y, por tanto, en su actividad biológica como por ejemplo el Biobras-16 (Guerrero, Ayan et al. 2013).

2.3. Localización, biosíntesis y metabolismo de los Brasiesteroides.

Respecto a la localización intracelular de los BRs, se sabe que los plastidios son de gran importancia para ellos, también se tiene la hipótesis de que el estroma es el sitio de síntesis y que los gránulos de almidón son los almacenes. Estudios recientes han mostrado que en semillas inmaduras existe una gran fuente de BRs, un ejemplo claro son las semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*); así como también se reportó la presencia de Brasinólida y castasterona en polen de flores de naranjo (Garciglia, Rodríguez et al. 2013). La biosíntesis de Brasinólida comienza por la reducción de campesterol a campestanol, que se oxida al 6 α -hydroxycampestanol y éste a 6-oxocampestanol. El tyfasterol se oxida a castasterona y luego a brassinólido. En tabaco y arroz la castasterona se isomeriza a la 3-epicastasterona (Suzuki, Inoue et al. 1995). Esta es una ruta biosintética probable para la brassinólida y se muestra en la **Figura No. 4**. Debido a la conversión inicial de campestanol a 6 α -hydroxycampestanol, esta ruta se denomina "ruta de la oxidación temprana del C-6" (Fujioka and Yokota 2003).

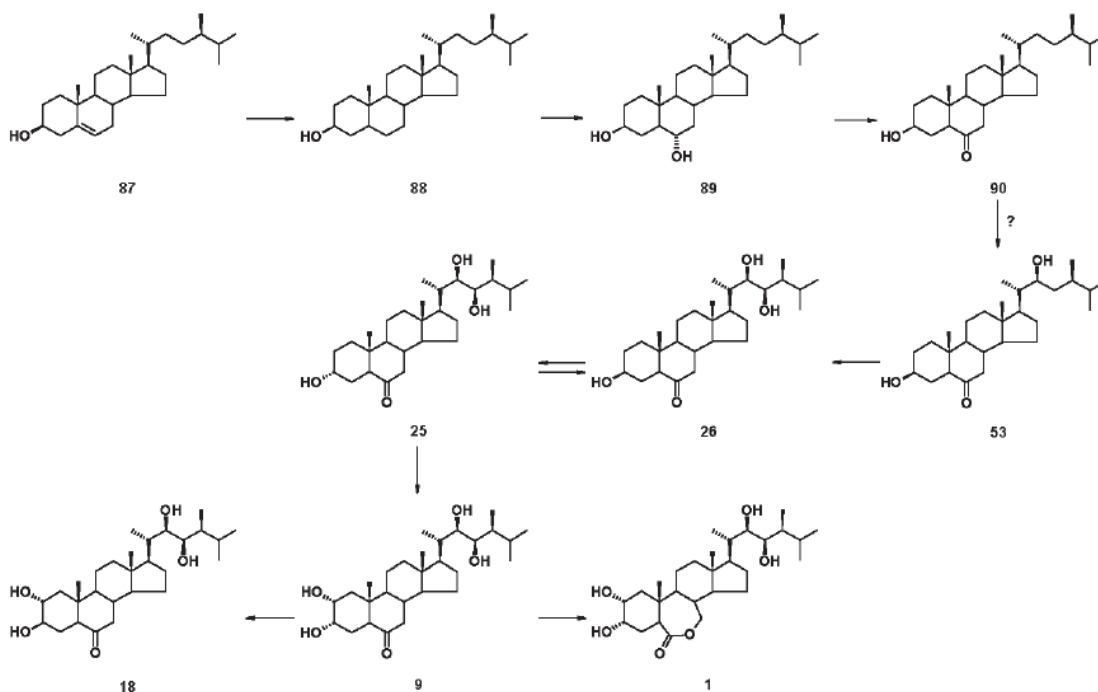


Figura No. 4 Biosíntesis de los BR, ruta de la oxidación temprana del C-6.

Mecanismo de acción

Cuando el receptor BRI 1 detecta a la molécula del BR, esta inactiva a la proteína BIN2 y así mismo el complejo enzimático BZR1/BES1 se acumula en el núcleo, lo que provoca la activación de diferentes genes como los que están involucrados en la modificación de la pared celular y el crecimiento (Zullo and Adam 2002).

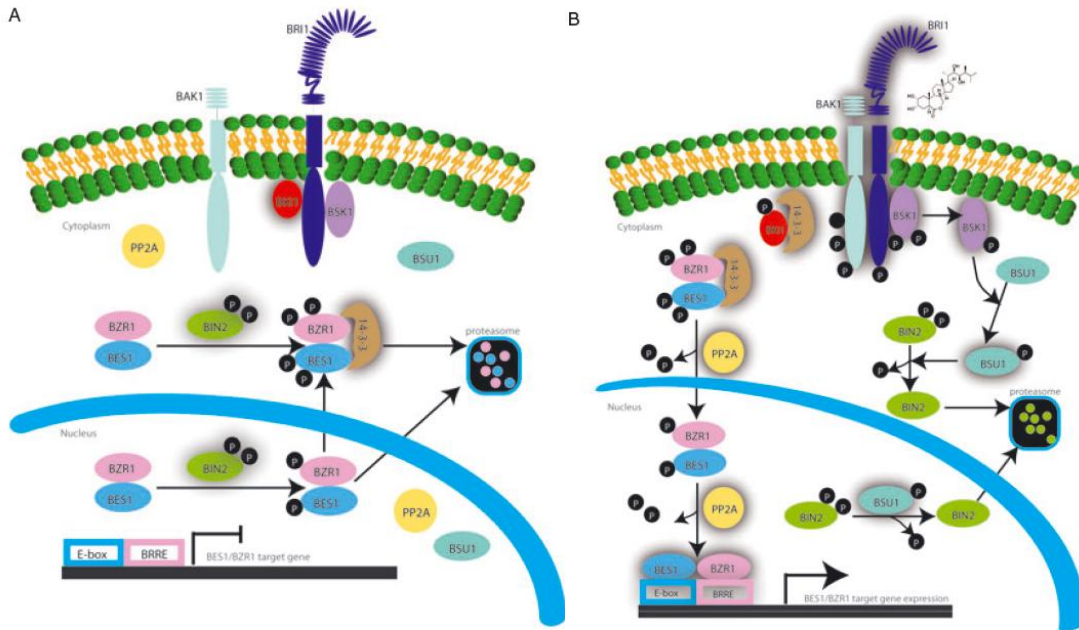


Figura No. 5 Mecanismo de acción de los BR. A) muestra la actividad enzimática en ausencia del BR. B) muestra la cascada de activación que induce el BR)

En presencia de BR **Figura No. 5B**, éste se une a BRI1, que induce la asociación con BAK1 y la disociación de BK11. Por transfosforilación secuencial entre BRI1 y BAK1, BRI1 está totalmente activado y fosforila a BSKS (Suzuki, Inoue et al. 1995). Los BSKS fosforilados se liberan del complejo receptor y se unen a BSU1, presumiblemente para mejorar la actividad BSU1. BSU1 activado inhibe a BIN2 a través de la desfosforilación del residuo de fosfo-tirosina de BIN2, que permite la acumulación de BZR1 no fosforilada y BZR2/BES1 en el núcleo. Activo BZR1 y BZR2 / BES1 se unen al ADN genómico para regular la expresión génica BR-diana, modulando con ello el crecimiento y desarrollo de las plantas (Yokota 1997).

2.4. Análogos de brasinoesteroides.

Efectos fisiológicos.

Los análogos de brasinoesteroides (**aBRs**) son compuestos que muestran alguna similitud estructural con los BRs naturales y/o actividad de la Brasinólida (Zullo and Adam 2002). La diferencia radica en los grupos funcionales que presentan los diferentes análogos y la posición que estos ocupen en la estructura los cuales pueden estar distribuidos en los anillos, o bien en la cadena lateral ya que se sabe que tienen una marcada incidencia en la actividad biológica (Yokota 1997). Su aplicación a diversos cultivos (**tabla No. 1**) ha producido efectos cualitativamente similares al de los compuestos naturales.

Análogo empleado	(mg/L)	Efecto	Referencias
Biobras-16*	0.1	10-25% en el rendimiento de arroz, ajo, cebolla, papa maíz, jitomate, soya	Pozo et al. 1996
Epibrasinólida	0.25	Resistencia a enfermedades (>33 %).	Prusakova y Chizhova 1999
Brasinólida	0.5-1	Mayor rendimiento en arroz (10 %)	Khripach et al. 2000
Biobras-16*	0.4	Incremento en el rendimiento de semillas (68%)	Vargas-Vázquez e Irizar-García 2005
CIDEF-4* al 80 %	0.3	Mayor rendimiento en híbridos fértiles de maíz (2.5 veces más)	Torres-Ruiz et al. 2007

Tabla 1 Estudios realizados en diferentes cultivos con Brasiñoesteroides y sus análogos (Garciglia et al. 2008) .

Los aBR provocan la elongación de coleóptilos y mesocotilos, reorientación de microtúbulos, inclinación del tubo polínico y enrollamiento de hojas para el caso de las monocotiledóneas así como también pueden inducir la formación de crecimiento por división celular y elongación (Brosa 1999). Estudios en fisiología vegetal han demostrado que los aBRs son capaces de influir sobre las propiedades eléctricas de la membrana, su permeabilidad, la estructura, estabilidad y actividad de las enzimas membranales (Tominaga et al. 1994). Con el estudio de plantas mutantes se identificó un gen de señalización para BRs (que funciona también con los aBRs) que se presume codifica una proteína similar a los receptores esteroidales en animales.

Aplicaciones

Los BRs se han aplicado en plantas cultivadas en suelos contaminados, metales, medios salinos y en condiciones con una elevada temperatura, confiriendo resistencia a las plantas. Se han reportado respuestas ante el estrés biótico y abiótico, mayor resistencia de cultivo a las heladas, salinidad, choque térmico y sequías así como una mayor tolerancia a herbicidas y a enfermedades. En Bielorrusia y Rusia se registró la producción de la epibrasinólida desde 1992 y se recomendó para diferentes cultivos como el jitomate, papa, pimienta, pepino y cebada. El cultivo del arroz también se ha visto beneficiado por el uso de los BRs principalmente en países como China y Japón ya que con la aplicación de manera foliar y por riego se obtiene un aumento en la producción que van del 10 al 15% (Khripach, Zhabinskii et al. 2000). También diferentes análogos han sido utilizados como parte de investigaciones a nivel de cultivo *in vitro*. Tal es el caso de la aplicación de 28-epibrasinólida (da Silva 2013)

Obtención

Debido a su actividad biológica eficiente, la brasinólida es la estructura más importante entre los BRs naturales por lo cual, posterior a su descubrimiento como hormona endógena, su síntesis se logró con la secuencia de reacción entre la pregnenolona, el ácido hiodeoxicólico y de una mezcla de esteroides. La homobrasinólida, (que fue sintetizado a partir del estigmasterol), es obtenida del aceite de soya, un producto barato y con una alta disponibilidad (Mori *et al.* 1981). La epibrasinólida, que proviene del ergosterol, es considerada el BR con mayor aplicación comercial ya que su actividad es comparable con la Brasinólida (Li, Nagpal et al. 1996)

2.5. Cultivo *in vitro* de plantas.

La evolución de la tecnología en la agricultura ha hecho posible la introducción de nuevos métodos por los cuales se puedan propagar las plantas de manera masiva. Tal es el caso del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales el cual incluye técnicas que permiten la propagación a través de protoplastos, tejidos, órganos y células de plantas. Todos estos tipos de cultivo tienen en común que se desarrollan en medios nutritivos gelificados o líquidos (McKendrick 2000).

A diferencia de las técnicas tradicionales, el cultivo *in vitro* permite propagar grandes volúmenes de plantas en menor tiempo así como el manejo de las mismas en espacios reducidos. Se observan beneficios como la generación de plantas libres de patógenos; plantas homocigotas, multiplicación de especies en peligro de extinción, estudios de ingeniería genética entre otros (Castillo, 2005).

Entre las aplicaciones del cultivo *in vitro* se encuentran la multiplicación masiva de plantas, especialmente de difícil propagación o en vías de extinción, clonación de individuos de características agronómicas deseables, obtención de plantas libres de enfermedades (microorganismos y virus), producción de semillas sintéticas, conservación de germoplasma, obtención de metabólicos secundarios, producción de híbridos, mejora genética de plantas, germinación de semillas y estudios fisiológicos diversos.

Los factores ambientales a considerar en el cultivo *in vitro* son: la esterilidad (que se alcanza utilizando protocolos de limpieza y desinfección) la temperatura, y la luz. La temperatura óptima para el crecimiento de las Orquídeas se encuentra en 25°C + 1°C. La luz fluorescente se utiliza generalmente con una duración durante el día de 12 a 16 horas, aunque en ocasiones se emplea luz continua (Lee, 1996). Los principales factores no biológicos que afectan el desarrollo del cultivo *in vitro* son la composición del medio de cultivo y el pH.

Micropropagación

Es el conjunto de técnicas y métodos del cultivo de tejidos vegetales para multiplicar plantas de manera eficiente, rápida y en grandes cantidades.

Para la propagación vegetal se establecen las siguientes etapas:

I. Obtención del material biológico.

Es de suma importancia que el material biológico a utilizar se encuentre en una etapa de desarrollo adecuado para establecer el cultivo *in vitro*. Para esto, se deben tener especial cuidado en la salud y nutrición de la planta madre que donará los explantes o semillas en invernadero bajo condiciones controladas. El cumplimiento de estas condiciones debe permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

II. Desinfección de los explantes o semillas.

Después de seleccionada la planta madre, las semillas o los explantes (células meristemáticas, flores, yemas, porciones de hojas, raíces, etc.) son sometidos a un proceso de desinfección para eliminar los contaminantes externos como hongos, bacterias y partículas microscópicas que se encuentran de forma normal en el ambiente.

III. Establecimiento del cultivo *in vitro*.

Después de la desinfección, las semillas o los explantes son colocados en los medios de cultivo estériles proveerán de los nutrientes necesarios para la germinación o regeneración de tejido nuevo bajo condiciones controladas de luz y temperatura en un periodo no mayor a 1 mes dependiendo de cada especie.

IV. Multiplicación de los brotes

Durante esta fase se espera que las semillas o los explantes que sobrevivieron la fase 1 y 2 originen protocormos y posteriormente plántulas. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante resiembras en

recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan bajo condiciones de esterilidad y de esta forma aumentar el número de individuos en cada repique. El número de plántulas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. La micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados.

V. Enraizamiento de las plántulas.

Se procede a seleccionar un medio de cultivo que contenga auxinas, esto para generar la parte radicular de la plántula. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

VI. Aclimatación de las plántulas enraizadas.

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufren cambios de diferente tipo que permiten la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales ya que existen muchas diferencias con las plantas desarrolladas en condiciones *in vitro*.

2.6. Medios de cultivo y sus componentes.

Un medio de cultivo provee de los nutrientes necesarios a los explantes para poder desarrollarse, puede ser sólido (con agente gelificante) o líquido (solución acuosa), y contiene una serie de diferentes compuestos que se describen en la **Tabla No. 2.**

Composición de los medios de cultivo	Características
Agua destilada	Actúa como solvente para realizar la solución compleja, representa el 95% del medio de cultivo.
Fuente de carbono	Sacarosa. Los explantes no son completamente autótrofos y no pueden cubrir sus necesidades nutricionales provenientes de la fotosíntesis en condiciones <i>in vitro</i> .
Sales inorgánicas	Proveen las necesidades de macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I), en una proporción adecuada.
Vitaminas	Vitaminas como la B1, B2 y B12, ácido fólico, ácido nicotínico entre otras para cubrir la necesidad de cofactores enzimáticos.
Reguladores de crecimiento	Se utilizan en diferentes concentraciones según la fase de crecimiento, entre ellas Auxinas, Citocininas, Giberelinas, ácido abscísico, etileno, brasinoesteroides entre otros.
Suplementos orgánicos	Extractos que complementan con nutrientes, puede ser agua de coco, jitomate, plátano, piña, extracto de levadura, caseína hidrolizada etc.
Materiales inertes	Se utilizan para darle soporte al medio de cultivo, agentes gelificantes como el agar agar, gelrite, gelzan, agarosa, papel filtro etc.

Tabla No. 1 Descripción de los componentes de los medios de cultivo para micropropagación vegetal (Segretín, 2007)

El medio de cultivo está conformado por el agente gelificante, macro y micronutrientes para la planta (hidratos de carbono, vitaminas), reguladores de crecimiento que ayudan a obtener una planta o un órgano en particular. Algunos de los elementos mencionados pueden ser reemplazados por mezclas poco definidas en su composición (jugo de tomate, agua de coco, etc.), que pueden dar buenos resultados y generalmente resultan más económicas.

2.7. Características de las orquídeas.

Las orquídeas son una de las más diversas de las familias de plantas con flores, con 800 géneros y 35,000 especies. Son muy apreciadas por sus flores que presentan increíble diversidad de tamaño, forma y color (Singh, Sherpa et al. 2007). Se cultivan como ornamentales y se comercializan en maceta o como flor cortada. Las orquídeas son una industria de millones de dólares en países como Tailandia, Singapur y Malasia entre otros (Chugh, Guha et al. 2009). Según la entrevista realizada a Eric Hágaster por la CONABIO (Eccardi and Becerra 2003), el comercio de las orquídeas implica la formación de híbridos inter-específicos que mejoren la calidad de las plantas para su uso principalmente ornamental, sin embargo se ha hecho en relativamente pocos géneros, *Phalaenopsis*, *Cymbidium* y *Laelia* entre otros, son apoyados por las nuevas tecnologías como el cultivo *in vitro* de meristemos, semilla, y diversos tipos de explantes que hace posible obtener una gran cantidad de individuos bajo las normativas que exige el mercado internacional. La producción de orquídeas a nivel mundial se incrementó hasta un valor de 305 millones de dólares en el año 2014. En el año 2000, el consumo mundial de orquídeas superó los 500 millones de dólares y de acuerdo a Wang (2004) el valor de exportaciones e importaciones correspondió a 150 millones de dólares (USD \$127 millones para flores de corte y USD \$23 millones para Orquídeas en maceta). En México, los principales estados productores de orquídeas son: el Estado de México (53%), Puebla (23%), Sinaloa (11%), Baja California (4%), Guerrero (3%), seguidos por Morelos, Veracruz, Oaxaca, Jalisco, Distrito Federal, Michoacán, Chiapas y Nayarit (Beltrán, 2006), siendo Chiapas, Estado de México, Morelos, Puebla, y Veracruz los estados más importantes en la producción de orquídeas con calidad de exportación. Las especies más comercializadas en México son *Phalaenopsis*, *Cattleya*, *Laelia*, y *Cymbidium* y a la par con estas existe un mercado integrado por coleccionistas de plantas exóticas, los cuales adquieren especies endémicas que son de difícil acceso y cuidados, debido a su peculiaridad a las cuales se les ha clasificado como plantas de alto valor comercial (CONABIO, 2005).

2.8. Trabajos previos con Brasinoesteroides y sus análogos.

El uso de BRs no solo se limita a la aplicación en bioensayos de manera foliar o durante el riego, también se han utilizado en el cultivo *in vitro* de diversos tipos de plantas, entre ellas las orquídeas, tal es el caso del experimento realizado por Natajara en 2008, el cual utiliza células meristemáticas de *Cymbidium bicolor* para su regeneración y transformación de manera *in vitro* utilizando diversas concentraciones de 24-epiBL en medio Mitra basal. Los mejores resultados los obtuvieron a la concentración de 3 μ M de 24-epiBL donde hubo una proliferación del 86% de PLB (protocorms like bodie).

En 2013 Da Silva utilizó protocormos de *Cymbidium elegance*, los cuales fueron tratados con la 24-epibrasinólida y la 28-homobrasniólida integrados en el medio de cultivo “Texeira cymbidium” (mTC) lo que permitió mostrar un efecto positivo en la inducción de embriogénesis somática, además de mitigar los efectos de estrés biótico y abiótico en el paso *ex vitro*.

La tesis “influencia del análogo del Brasinoesteroide aBSS4 en el desarrollo de plántulas de *Laelia anceps*” mostró que el **aBSS4** tiene una importante actividad en los parámetros el aumento de peso fresco y la proliferación de parte aérea de la plántula en un medio Murashige & Skoog adicionado con el análogo a la concentración de 0.001mg/L (Galicia, Rodriguez et al. 2014)

Otro tipo de plantas han sido sometidas a los efectos de los análogos de BRs durante la etapa *in vitro*, tal es el caso de *Capsicum annuum* o chile dulce, el cual fue propagado por medio de organogénesis directa después del crecimiento indiferenciado los protocormos obtenidos fueron trasplantados a un medio de cultivo Murashige & Skoog adicionado con la 24-epi-brasinolida y Zeatina para promover la elongación celular durante el estadio de Plúmula lo que mejoró el tiempo de la etapa *in vitro* a *ex vitro* de una manera significativa (Franck-Duchenne, Wang et al. 1998).

Los aBRs han sido probados en diferentes tipos de plantas como se describe en la **Tabla No. 3**, Los bioensayos citados muestran los efectos que se actúan en similitud con los que realizan otros reguladores.

ENSAYOS	AUTORES
<ul style="list-style-type: none">• PECTIMORF y BIOBRAS-16, en dos especies de orquídeas pertenecientes al género <i>Cattleya</i>.	(Suárez 2007)
<ul style="list-style-type: none">• EBL y un análogo espiroestánico de brasinoesteroide Biobras-16 al igual que un inhibidor de la biosíntesis de los brasinoesteroides Brz2001.	(Guerrero, Ayan et al. 2013)
<ul style="list-style-type: none">• Efecto del análogo de brasinoesteroide aBSS4 en plántulas de <i>Laelia anceps</i>	(Galicía, Acosta et al. 2013)
<ul style="list-style-type: none">• La potencialidad anti estrés del análogo de brasinoesteroide MH-5 en plántulas de arroz expuestas a periodos cortos de estrés hídrico.	(García, Rodríguez et al. 2005)
<ul style="list-style-type: none">• Efectos de análogos de brasinoesteroides en diferentes variedades de Maíz (<i>Zea mays</i>)	(Moreno, Acosta et al. 2009)
<ul style="list-style-type: none">• Evaluación de Análogos de Brasinoesteroides mediante el bioensayo del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	(Peña, Acosta et al. 2012)

Tabla No. 2 Bioensayos realizados con análogos de Brasinoesteroides.

Dentro de nuestro grupo de trabajo se sintetizaron una serie de análogos de Brasinoesteroides los cuales fueron denominados aBSS y que con diversos estudios en diferentes tipos de plantas, principalmente maíz, frijol y jitomate se han estado demostrando los efectos que producen cada uno de ellos.

A continuación se describen los trabajos de investigación realizados en el jardín botánico que permiten conocer los efectos de los aBSS que se han evaluado y que justifican el uso del **aBSS4** en este proyecto.

Trabajos con análogos de brasinoesteroide en el Jardín botánico universitario BUAP

Diversos trabajos han sido realizados con el fin de conocer los efectos de una serie de análogos de brasinoesteroides obtenidos por vía sintética sobre diferentes tipos de cultivos, tal es el caso de la aplicación del aBSS4 en la inclinación de la lámina de arroz y la elongación del epícotilo en los cultivos de frijol donde se obtuvieron los mejores resultados a las concentraciones de 1.00mg/L y 0.10mg/L (Peña, Acosta et al. 2012)

El combate a diferentes tipos de estrés como el hídrico y el salino en hortalizas con la aplicación de los aBSS también ha sido probado y se han observado buenos resultados incluso comparándolos con el efecto producido por la epibrasinólida, un BR comercial (Andrade Rosales, Rodriguez Acosta et al. 2013).

Entre las hortalizas la biomasa es un factor importante a considerar, la aplicación tanto del aBSS1 como el aBSS4 en maíz, ha mostrado tener efectos importantes (hasta el 60% de incremento frente al control) cultivado en invernadero (Moreno, Acosta et al. 2009) (Gomez Sanchez, Rodriguez Acosta et al. 2013).

Los resultados de los trabajos mencionados muestran que los análogos de brasinoesteroides podrían abrir una nueva opción económica en el campo de la micropropagación de orquídeas *in vitro* obteniendo una mejor calidad en mejor tiempo. *Epidendrum ciliare* es una de las especies consideradas de potencial económico en México, siendo necesarios nuevos protocolos que permitan mejorar la calidad de esta planta así como su hibridación y generación de nuevos conocimientos.

3. Justificación.

Una de las formas de favorecer el crecimiento de las plantas es utilizando reguladores del crecimiento vegetal, entre los cuales se encuentran los BRs, que regulan procesos en el crecimiento y desarrollo de las plantas, como la elongación, división celular, senescencia, diferenciación vascular, reproducción, foto-morfogénesis y las respuestas a varios tipos de estrés (Ye, Li et al. 2011). Los BRs, tienen la capacidad de conferir tolerancia a las plantas ante un amplio espectro de condiciones de estrés biótico y abiótico. Nuestro grupo de trabajo, ha evaluado el efecto de una serie de 18 análogos de BRs obtenidos en el laboratorio de síntesis y modificación de productos naturales BUAP, de los cuales, el aBSS4 ha demostrado ejercer un efecto positivo en el crecimiento y en la producción de biomasa de frijol y maíz (Moreno, Rodriguez et al. 2009).

Dentro del grupo de plantas ornamentales las orquídeas son muy demandadas en el mercado, y tienen un precio más alto que muchas plantas ornamentales. El uso de las herramientas biotecnológicas adecuadas con el uso de análogos de brasinoesteroides podría ayudar a reducir los tiempos de su cultivo y por ende a reducir su costo. Por tal motivo, en este trabajo se evalúa el efecto aBSS4 en *Epidendrum ciliare* que es una especie endémica de México, cuya característica principal es tener una floración duradera. De encontrarse un efecto positivo del aBSS4 en el crecimiento de esta planta, representaría un avance en el cultivo comercial de las orquídeas y un beneficio económico.

4. Objetivos.

Generales.

- Evaluar el efecto del aBSS4 sobre el desarrollo de plántulas de *E. ciliare in vitro* en comparación con al obtenido en un medio comercial sin reguladores de crecimiento.

Particulares.

- Evaluar el efecto del aBSS4 en la parte aérea y raíz de las plántulas de *E. ciliare* cultivadas en condiciones *in vitro*.
- Evaluar la influencia del aBSS4 en la biomasa de las plántulas de *E. ciliare*

5. Hipótesis.

- Basados en los resultados obtenidos con el aBSS4 en otros cultivos, se propone que el análogo de Brasinoesteroide (aBSS4) promoverá el crecimiento de las plántulas de *Epidendrum ciliare*.

6. Materiales y métodos

Para la realización de este trabajo se utilizó el siguiente material y método.

I. Material

El análogo de Brasinoesteroide (**aBSS4**) fue proporcionado por el laboratorio de síntesis y modificación de productos naturales de la facultad de ciencias químicas BUAP.

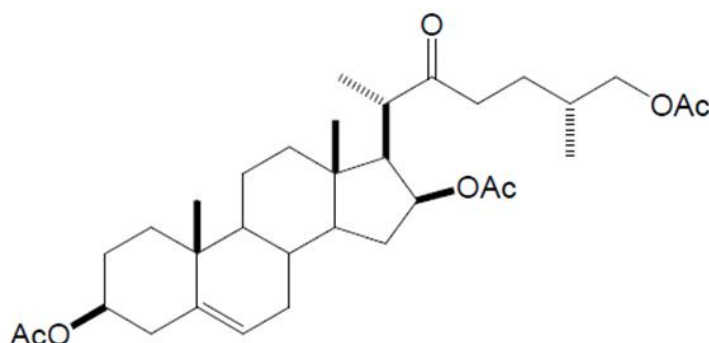


Figura No. 6 Estructura molecular del análogo de Brasinoesteroide aBSS4.

Se trata de un sólido en forma de polvo blanco muy poco soluble en agua con un punto de fusión de 222 – 224°C su fórmula condensada es $C_{33}H_{52}O_8$. Cuenta con un esqueleto de lactona (**Figura No. 6**) que en las posiciones 3, 16 y 26 posee grupos “acetoxi” representados por las abreviaturas AcO y OAc, dos grupos metilo en posición 10 y 13 mientras que en los carbonos 5 y 6 se encuentra un doble enlace (alqueno) cuenta con una cadena lateral con dos metilos en las posiciones 20 y 25 y en el carbono 22 se encuentra una cetona. Es estable bajo almacenamiento en refrigerador en frasco ámbar bien cerrado en una atmósfera de Argón y protegido de la luz.

Las plántulas de ***Epidendrum ciliare*** fueron proporcionadas por el laboratorio del Jardín botánico universitario BUAP (**Figura No. 7**). Se polinizaron por vía cruzada 2 flores de la misma planta de *E. ciliare* en invernadero. Las semillas fueron germinadas en medio MS basal bajo condiciones estériles *in vitro* en Febrero de 2013 y trasplantadas en un medio fresco de iguales características en Enero de 2014.

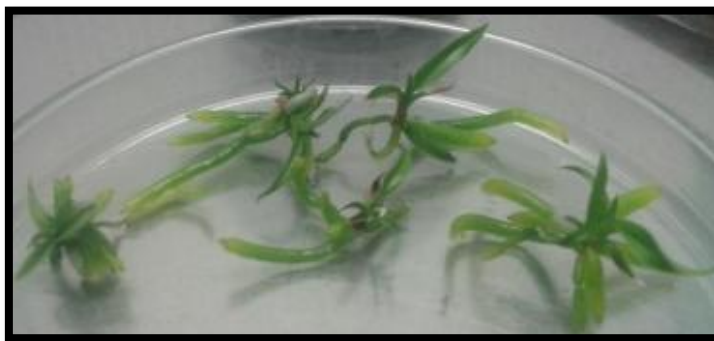


Figura No. 7 Plántulas de *Epidendrum ciliare* cultivadas en el laboratorio del Jardín Botánico Universitario BUAP.

Es una especie de Orquídea de comportamiento epífita del género *Epidendrum* **Figura No. 8**. Es una especie con flores grandes y vistosas, la cual puede reconocerse por el labelo blanco y lobado donde la parte media es larga y delgada y los lóbulos laterales son fuertemente laciniados.

Es una especie común, que se encuentra en los bosques deciduos, de la zona pacífica y central; a una altitud de 500–1350 metros; florece en los meses de abril a diciembre. Desde México, Perú, Bolivia y Brasil, hasta las Antillas se pueden encontrar estas plantas, así mismo también en Nicaragua, Costa Rica y Panamá donde residen en el bosque húmedo bajo de hoja perenne y en los bosques semi-caducifolios de elevaciones de 1200 a 1500 metros. *Epidendrum ciliare* fue descrita por Carlos Linneo y publicado en *Systema Naturae, Editio Decima*.



Figura No. 8 Flor de *Epidendrum ciliare*.

Etimología El nombre del género *Epidendrum* (Epi.): procede de las palabras griegas "ept" = "sobre" y "dendron" = "árbol" refiriéndose a los hábitos de epifitas de las especies.

ciliare: epíteto latino que significa "con flecos".

II. Medio de cultivo.

Murashige & Skoog (1962) (MS) 100%, Tiamina 100mg/L, Inositol 100mg/L, Piridoxina 100mg/L, Glicina 400mg/L, ácido nicotínico 100mg/L, suplementado con 30g/L de sacarosa, como agente gelificante Agar-Agar 9g/L, carbón activado 0.5g/L y diferentes concentraciones de aBSS4 (**Tabla No. 4**). El pH fue ajustado con NaOH 0.5N y/o HCl 0.5N a 5.7 ± 0.1 .

Tratamiento.	ml de sol 1mg/50ml de BSS4	ml de medio de cultivo MS 100%	Volumen total
T1	0.5	199.5	200
T2	5.0	195.0	200
T3	10.0	190.0	200
Control	0.0	200.0	200

Tabla No. 3 Formulación final de los medios de cultivo.

El aBSS4 es poco soluble en agua, por lo que se procedió a realizar una solución stock la cual se preparó disolviendo 1 mg del aBSS4 en 10 ml de etanol al 96% y se aforó a 50 ml con agua destilada a $38 \pm 1^\circ\text{C}$.

El medio de cultivo así preparado se distribuyó en frascos de polipropileno con capacidad de 100 mL a los cuales se les adicionaron 20 mL de medio de cultivo. La esterilización del medio se realizó en una autoclave durante 15 minutos a 15lb/pulg² de presión y 121 °C de temperatura.

III. Condiciones en cámara de crecimiento.

Durante el desarrollo del experimento todas las plántulas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento (**Figura No. 9**) de ambiente controlado con luz blanca fría fluorescente, cuya radiación fotosintéticamente activa es de $50 \mu\text{Mm}^{-2}\text{s}^{-1}$, teniendo un fotoperiodo de 16/8 h y una temperatura promedio de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Se mantuvo en observación para detectar la presencia o ausencia de contaminación y mantener la estabilidad de las condiciones.



Figura No. 9 Cámara de crecimiento.

IV. Selección de plántulas.

Se eligieron las plántulas germinadas en el laboratorio del jardín botánico que fueran individuos sanos los cuales debían cumplir con las siguientes características

1. De 2 a 3 hojas verdaderas de 4 a 6mm de longitud
2. 2 o 3 raíces con 2 a 4mm de longitud que tengan velamen
3. Tamaño total de la plántula entre 7 y 9mm (de punta a punta)

No se consideraron las plántulas que:

1. Se encontraban en fase de protocormo y/o plúmula
2. Se encontraban adheridos a otras plántulas
3. Tuvieran adheridos cuerpos callosos
4. Tuvieran restos de medio de cultivo
5. No tuvieran velamen en sus raíces
6. Estuvieran cloróticas

Para el trasplante, se limpió la campana de flujo laminar con alcohol al 70% y el instrumental fue previamente esterilizado. Posteriormente se puso en marcha la lámpara con la luz ultravioleta incluida en el gabinete por 20 min. Se activó el flujo de corriente estéril y antes de la manipulación experimental se tomaron medidas tanto de asepsia como de seguridad personal consistentes en: lavado de las manos con agua y jabón, uso de bata, cofia y cubre bocas, etanol al 96% y mechero con flama azul para mejorar la zona estéril.

V. Siembra de las plántulas.

Bajo los criterios de selección y en condiciones de asepsia, se sembraron las plántulas en los frascos como se muestra en la **Tabla No. 5**.

Tratamiento	Concentración del aBSS4	Repeticiones	Plántulas por frasco
T1	0.05mg/L	15	5
T2	0.50mg/L	15	5
T3	1.00mg/L	15	5
Control	---	15	5

Tabla No. 4 Tratamientos y concentraciones del aBSS4 en el medio de cultivo.

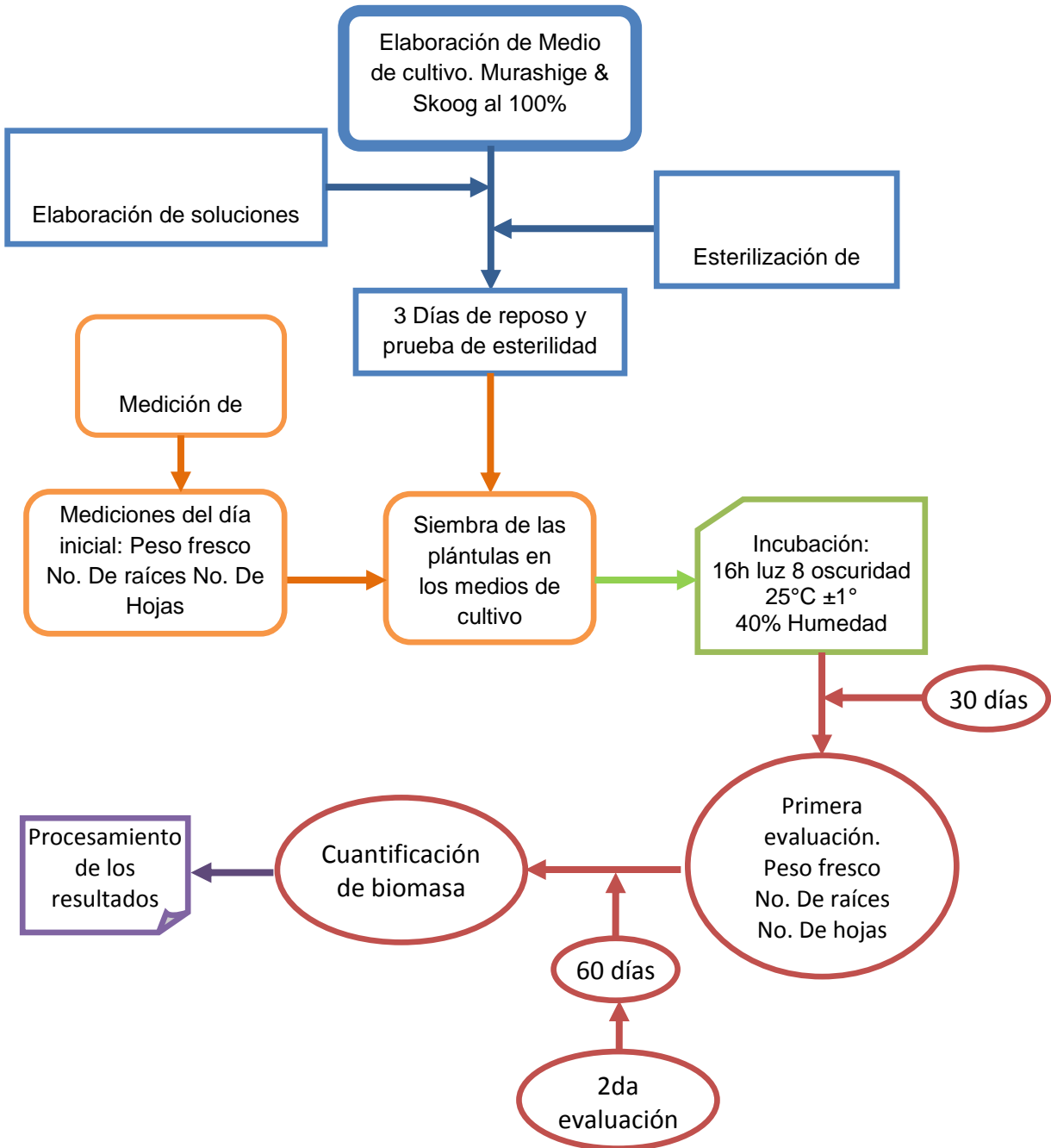
Al tener el medio estéril se sembraron las plántulas en campana de flujo laminar a modo de asegurar que el proceso sea 100% aséptico. Se establecieron los cultivos con un total de 300 plántulas (n=300) en 60 frascos (15 por tratamiento) y después de ser etiquetados, se llevaron a la cámara de incubación.

VI. Colecta de datos a los 30 y 60 días.

A los 30 días de incubación, se tomaron los frascos de los diferentes tratamientos y plántula por plántula se procedió a la toma de los datos en condiciones de esterilidad dentro de la campana de flujo laminar. Los parámetros obtenidos fueron el peso fresco en miligramos (mg), así como el número de hojas y raíces. Las plántulas fueron regresadas al medio de cultivo de origen con las medidas pertinentes para evitar contaminación.

Los datos se registraron en el software *GraphPad Prism*®. El proceso de toma de datos se repitió a los 60 días. Se realizó también la cuantificación de la biomasa donde se tomó una muestra al azar n=5 de cada tratamiento y el control. Se tomaron los pesos frescos y se llevaron a estufa a 80°C durante 24 horas. Después se midió la masa para evaluar los resultados.

6.1. Diagrama de Flujo



7. Resultados.

A continuación se presentan los resultados obtenidos del peso fresco, número de hojas y número de raíces a los 30 y 60 días con respecto al día inicial del experimento, también se muestran la desviación estándar (D.E.) y el porcentaje de incremento obtenido en cada caso. NS representa que estadísticamente no existe diferencia significativa entre cada tratamiento por análisis de varianza de un factor (One-way ANOVA) y en caso contrario se muestran los símbolos *, ** y *** para denotar la magnitud de la significancia con valor $p < 0.05$.

Del total de las plántulas de *E. ciliare* evaluadas, se presentó un mínimo porcentaje de oxidación en hojas. Algunas clases de plantas, particularmente las especies tropicales, contienen una alta concentración de sustancias fenólicas, las cuales son oxidadas cuando las células son heridas o están senescentes, el tejido aislado se torna entonces de color café o negro y se puede mermar la capacidad de crecimiento (George, 1993).

En el medio de cultivo utilizado para el establecimiento de las plántulas se adicionó carbón activado el cual es un compuesto adsorbente de las sustancias polifenólicas para evitar el proceso de oxidación.

7.1. Evaluación a los 30 días.

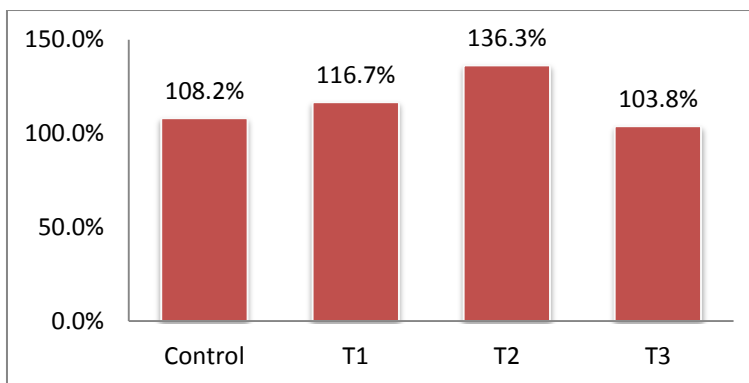
Peso fresco

En la **Tabla No. 6** se muestran los valores de los promedios para el peso fresco del día 30 con respecto al día inicial, así como la desviación estándar y porcentaje de incremento para los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Peso fresco (mg)				ANOVA	% INCREMENTO 1-30 DÍAS
	DIA 1	D. E.	DIA 30	D. E.		
Control	29.92 ± 13.35		57.57 ± 19.19		---	108.2%
T1	24.33 ± 7.66		51.62 ± 19.27		NS	116.7%
T2	24.34 ± 7.64		56.72 ± 56.72		NS	136.3%
T3	28.44 ± 10.20		57.67 ± 25.53		NS	103.8%

Tabla No. 5 Resultados obtenidos a los 30 días. Se indica D.E. y el porcentaje de incremento del peso fresco del día inicial al día 30.

La **Gráfica No. 1** nos permite observar más claramente los porcentajes de incremento a los 30 días de iniciado el experimento.



Gráfica No. 1 Representación gráfica del % de incremento del peso fresco en plántulas de *Epidendrum ciliare* del día inicial al día 30.

Se observa que todos los tratamientos mostraron un porcentaje de incremento cercano al control, a excepción del tratamiento T2 (0.50 mg/L), donde se promovió una temprana respuesta del aBSS4 con un 136.3% de porcentaje de incremento con respecto al día inicial.

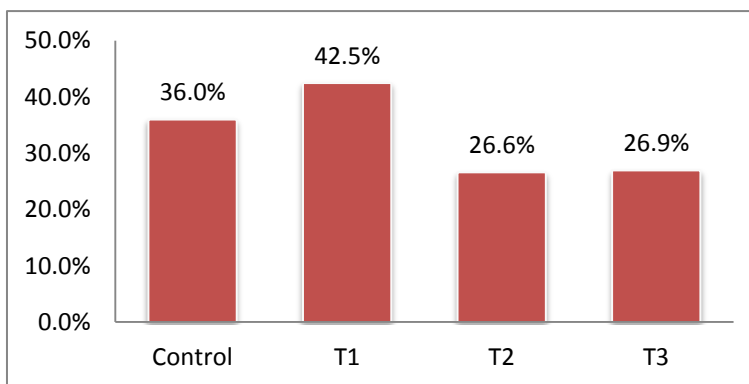
Número de hojas

En la **Tabla No. 7** se muestran los valores de los promedios para el número de hojas en el día inicial y el día 30, la desviación estándar (D.E) así como se muestra el porcentaje de incremento para los diferentes tratamientos.

Tratamiento	No. de hojas				ANOVA	% INCREMENTO 1-30 DÍAS
	DIA 1	D. E.	DIA 30	D. E.		
Control	3.00 ± 0.71		3.92 ± 0.63		---	36.0%
T1	3.18 ± 0.66		4.45 ± 0.87		NS	42.5%
T2	3.00 ± 0.51		3.72 ± 0.76		NS	26.6%
T3	2.95 ± 0.37		3.73 ± 1.04		NS	26.9%

Tabla No. 6 Resultados obtenidos a los 30 días. Se indica D.E. y el porcentaje de incremento del número de hojas del día inicial al día 30.

El control registra un aumento del 36.0% con respecto al día inicial, mientras que el dato más destacado se puede ver en T1 donde hay un valor del 42.5%. Los valores de T2 y T3 fueron menores que el control, con un 26.6% y 26.9% respectivamente (**Gráfica No. 2**).



Gráfica No. 2 Representación gráfica del % de incremento del número de hojas en plántulas de *Epidendrum ciliare* del día inicial al día 30.

Aun cuando se presenta un incremento notorio en T1, las pruebas estadísticas indican que los valores obtenidos para este parámetro a los 30 días no son estadísticamente significativos.

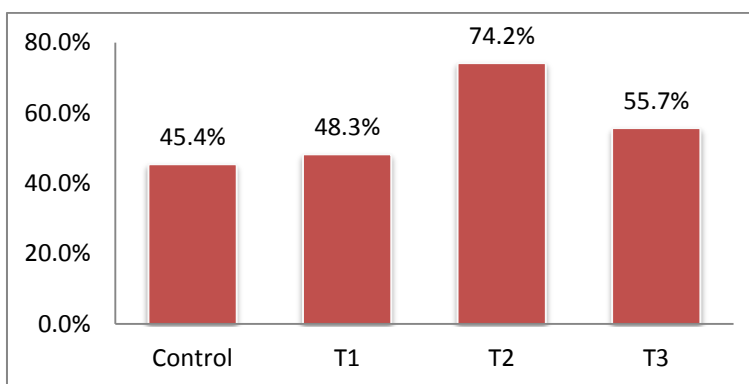
Número de raíces

En la **Tabla No. 8** se muestran los valores de los promedios del número de raíces del día inicial y el día 30 así como la desviación estándar (D.E) y porcentaje de incremento para los diferentes tratamientos.

Tratamiento	No. de raíces				ANOVA	% INCREMENTO 1-30 DÍAS
	DIA 1	D. E.	DIA 30	D. E.		
Control	2.82 ± 0.74		4.11 ± 1.27		---	45.4%
T1	2.89 ± 0.60		4.22 ± 0.77		NS	48.3%
T2	2.55 ± 0.66		4.38 ± 1.24		NS	74.2%
T3	2.70 ± 0.61		4.10 ± 0.83		NS	55.7%

Tabla No. 7 Resultados obtenidos a los 30 días. Se indica D.E. y el porcentaje de incremento del número de raíces del día inicial al día 30.

En el número de raíces el control registró un incremento de 45.4%, en T1 el 48.3% y después T3 con un 55.7%. En T2 se observa un aumento del 74.2% que es mayor a los otros tratamientos incluyendo el control.



Gráfica No. 3 Representación gráfica del % de incremento del número de raíces en plántulas de *Epidendrum ciliare* del día inicial al día 30.

En la **Gráfica No. 3** se puede observar un incremento de T2 frente a los demás tratamientos sin embargo no es estadísticamente significativo a los 30 días de iniciado el experimento.

7.2. Evaluación a los 60 días.

A continuación se describen los resultados de los parámetros evaluados a los 60 días de iniciado el experimento del peso fresco, No. de hojas y No. de raíces.

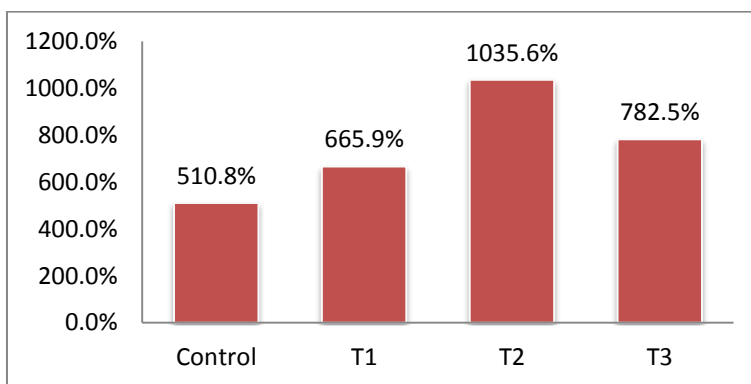
Peso fresco

En la **Tabla No. 9** se representan los valores promedio del peso fresco del día 1 al día 60 del experimento, así como la desviación estándar e incrementos.

Tratamiento	Peso fresco (mg)				ANOVA	% INCREMENTO 1-60 DÍAS
	DIA 1	D. E.	DIA 60	D. E.		
Control	29.92 ± 13.35		149.93 ± 66.55		---	510.8%
T1	24.33 ± 7.66		161.45 ± 67.36		NS	665.9%
T2	24.34 ± 7.64		251.96 ± 109.21		***	1035.6%
T3	28.44 ± 10.20		475.30 ± 123.55		*	782.5%

Tabla No. 8 Resultados obtenidos a los 60 días. Se indica D.E. y el porcentaje de incremento del peso fresco del día inicial al día 60.

El tratamiento que ofrece mejores resultados fue el T2 seguido del T1 frente al control. El incremento de T3 se puede igualar al que tuvo el control a los 60 días como se puede ver en la **Gráfica No. 4**.



Gráfica No. 4 Representación gráfica del % de incremento del peso fresco en plántulas de *Epidendrum ciliare* del día inicial al día 60.

Se muestra que existe una diferencia significativa en T2 y T3 aumentando el peso fresco frente al control lo cual indica un efecto positivo del aBSS4 en dichas concentraciones.

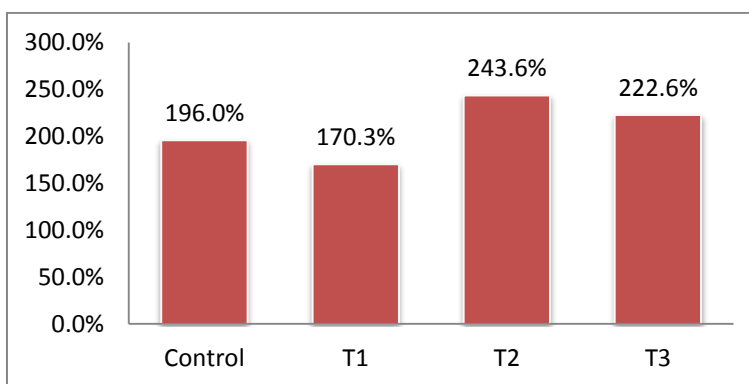
Número de hojas

En la **Tabla No. 10** se muestran los valores de los promedios para el número de hojas del día inicial al día 60 así como la desviación estándar (D.E) y porcentaje de incremento para los diferentes tratamientos.

Tratamiento	No. de hojas				ANOVA	% INCREMENTO 1-60 DÍAS
	DIA 1	D. E.	DIA 60	D. E.		
Control	3.00 ± 0.71		5.77 ± 1.29		---	196.0%
T1	3.18 ± 0.66		5.42 ± 1.41		NS	170.3%
T2	3.00 ± 0.51		7.40 ± 2.16		*	243.6%
T3	2.95 ± 0.37		6.53 ± 1.87		NS	222.6%

Tabla No. 9 Resultados obtenidos a los 60 días. Se indica D.E. y el porcentaje de incremento del número de hojas del día inicial al día 60.

El resultado obtenido en el número de hojas muestra un ligero avance de T3 en comparación al control, T1 tuvo una caída frente al control y T2 tuvo un aumento importante en el número de hojas (**Gráfica No. 5**).



Gráfica No. 5 Resultados obtenidos a los 60 días. Se indica D.E. y el porcentaje de incremento del número de raíces del día inicial al día 60.

Cabe mencionar que en el caso de T1 y T3 hubo bajas debido a la presentación de necrosis y eventualmente la muerte lo que afectó los promedios, sin embargo la prueba de ANOVA indica una diferencia significativa en T2 frente al control.

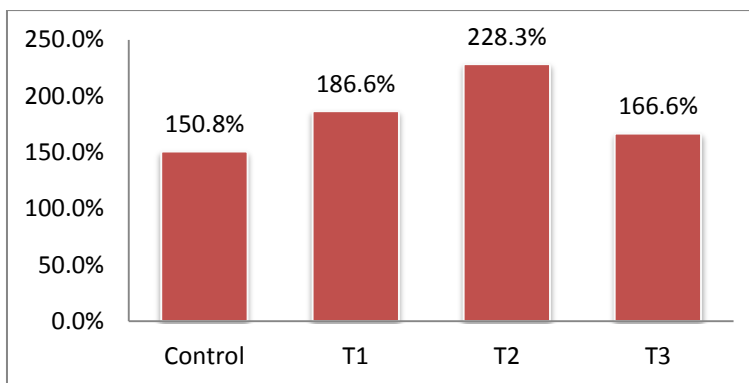
Número de raíces.

En la **tabla No. 11** se muestran los valores de los promedios para el número de raíces del día inicial al día 60, así como la desviación estándar (D.E) y porcentaje de incremento para los diferentes tratamientos.

Tratamiento	No. de raíces				ANOVA	% INCREMENTO 1-60 DÍAS
	DIA 1	D. E.	DIA 60	D. E.		
Control	2.82 ± 0.74		4.28 ± 1.38		---	150.8%
T1	2.89 ± 0.60		5.38 ± 1.28		**	186.6%
T2	2.55 ± 0.66		5.88 ± 1.84		***	228.3%
T3	2.70 ± 0.61		4.59 ± 1.65		NS	166.6%

Tabla No. 10 Incrementos del día 0 al día 60 en el número de raíces. Se muestran los promedios y las desviaciones estándar de los tratamientos y el control.

En la **Gráfica No. 6** se puede observar un porcentaje de incremento de T1 (186.6%) y T2 (228.3%) con respecto al día inicial, siendo en T3 (0.05mg/L) donde se obtuvieron los menores resultados en incrementos porcentuales y sin embargo supera al control por un mínimo margen.



Gráfica No. 6 Representación gráfica del % de incremento del número de raíces en plántulas de *Epidendrum ciliare* del día inicial al día 60.

Las pruebas estadísticas indican que tanto T1 como T2 tienen diferencias significativas frente al control, lo que muestra un posible efecto del aBSS4 en el medio de cultivo.

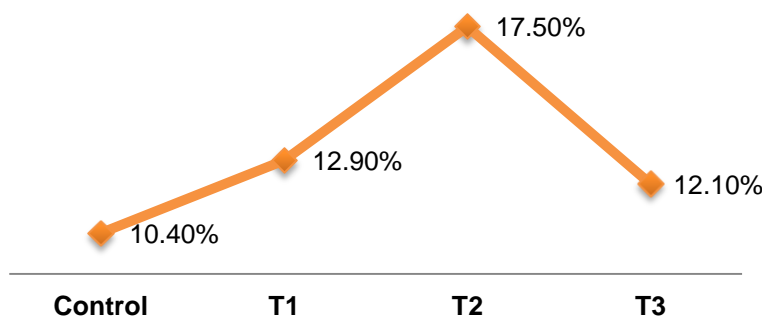
7.3. Determinación de biomasa.

En la **Tabla No. 12** se muestran el resumen de los resultados en la determinación de biomasa de los diferentes tratamientos y el control.

Tratamientos	Media de las plántulas (mg)	Media del peso seco (mg)	% BIOMASA
Control	199.6	20.7	10.4%
T1	212.6	27.3	12.9%
T2	202.0	35.3	17.5%
T3	228.8	27.7	12.1%

Tabla No. 11 Parámetros evaluados donde n=5 por tratamiento y control. Resultados obtenidos en la determinación de biomasa en plántulas de *Epidendrum ciliare* después de 60 días.

Los promedios obtenidos de los resultados muestran un 17.5% de incremento en biomasa de T2 a los 60 días.



Gráfica No. 7 Porcentajes de incremento de la biomasa a los 60 días de plántulas de *E. ciliare*

Los tratamientos T1 y T3 muestran valores de 12.9% y 12.1% respectivamente, mientras que el control registra un 10.4%, menor que en los tratamientos con diferentes concentraciones de aBSS4 (**Gráfica No. 7**).

8. Discusión.

El análogo de Brasinoesteroide utilizado en este trabajo, demostró tener un efecto en el desarrollo de plántulas de *E. ciliare* en la etapa *in vitro*. De acuerdo a las fuentes consultadas, los BRs tienen un mejor efecto a concentraciones más bajas. En la **Figura No. 10** se hace una comparación del tamaño (cm) de plántulas seleccionadas al azar de los tres diferentes tratamientos de los parámetros evaluados.

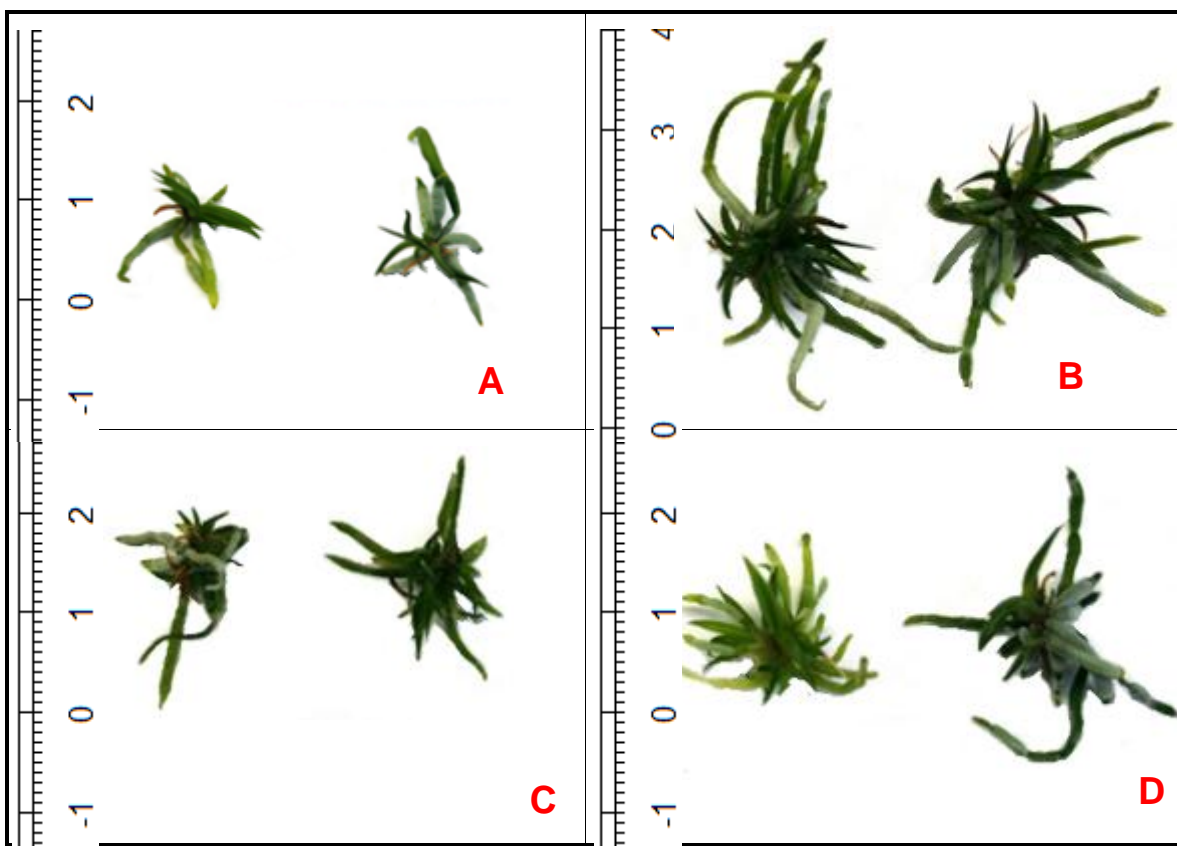


Figura No. 10 Plántulas de *Epidendrum ciliare* cultivadas en los diferentes tratamientos pasados 60 días después de iniciado el experimento. Se muestran los resultados más relevantes A) Control. Presenta un crecimiento típico en medio de cultivo Murashige & Skoog sin reguladores de crecimiento. B) Peso fresco en T2. La concentración de 0.50mg/L de aBSS4 presenta las plántulas más grandes registradas en todo el experimento. C) No. de hojas en T2. El tamaño de las plántulas y su peso son relevantes de manera significativa, este tratamiento también presentó una proliferación importante en el número de hojas D) No. de raíces en T2. Este tratamiento muestra una proliferación moderada de la parte radicular de la planta en comparación al resultado obtenido en el control.

8.1. Peso fresco.

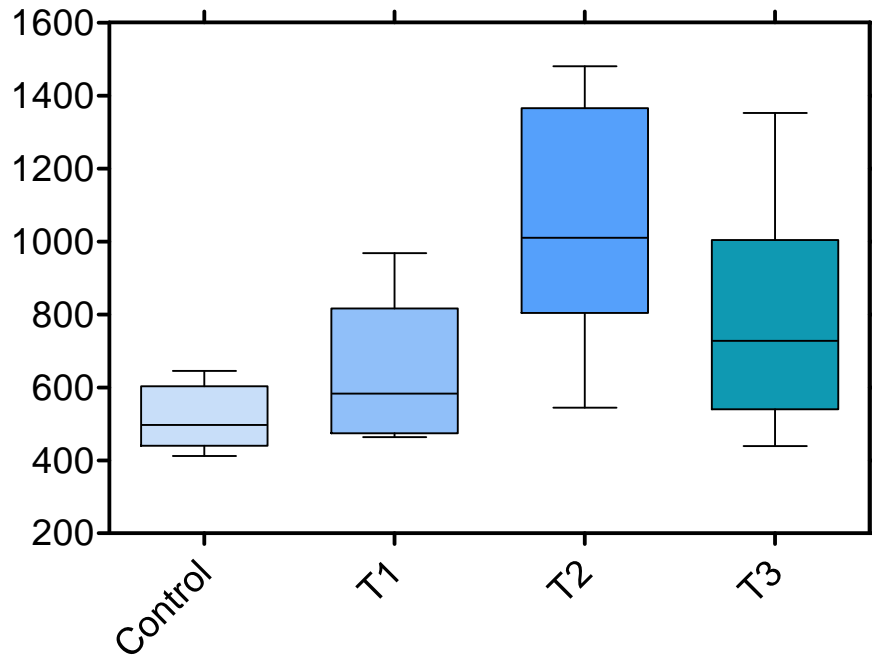
El análisis de varianza de los datos del peso fresco de plántulas de *E. ciliare* mostró diferencias significativas entre los tratamientos (concentraciones de aBSS4 en el medio de cultivo) a un nivel de significancia $p < 0.05$ (**Tabla No. 13**).

El tratamiento que presentó un mejor porcentaje de incremento en el peso fresco a los 60 días fue T2 (0.50mg/L de aBSS4) en comparación con T1 y T3 (0.05 y 1.00mg/L de aBSS4 respectivamente).

Comparación múltiple de Tukey	Diferencia de promedios.	Valor de q	P < 0.05	Resumen
CONTROL vs T1	-155.1	2.181	No	ns
CONTROL vs T2	-524.7	7.832	SI	***
CONTROL vs T3	-271.7	3.907	SI	*

Tabla No. 12 Valores obtenidos de ANOVA para Peso fresco a los 60 días.

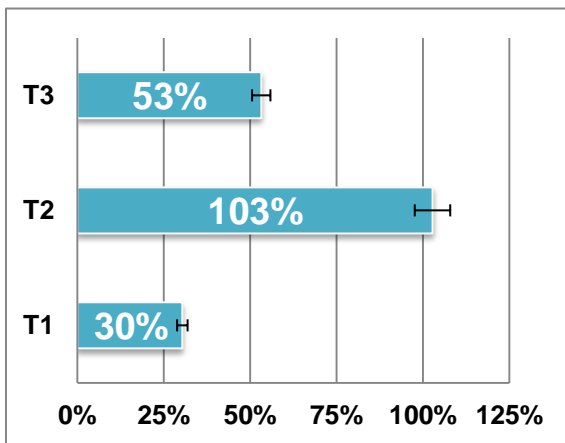
El valor promedio más alto y con diferencia estadística significativa fue T2 con 1035% ($p=0.009$) con respecto al día inicial, mientras que el control fue de 510.8%.



Gráfica No. 8 Porcentaje de incremento en peso fresco de plántulas de *E. ciliare* a los 60 días de iniciado el experimento para el control, T1, T2 y T3.

En la **Gráfica No. 8** se reportan los datos máximos, mínimos y la distribución de los datos en porcentaje obtenidos a los 60 días de los tratamientos y el control.

Los resultados obtenidos por Nuñez y Mazorra (2007) quienes aplicaron Biobrass-16 para incrementar de manera significativa (78% con respecto al control) el peso fresco en plántulas de arroz a la concentración 0.50mg/L son similares a los obtenidos en este trabajo siendo esta misma concentración la más efectiva para ambos bioensayos.



Gráfica No. 9 Porcentaje de incremento con respecto al control del peso fresco a los 60 días.

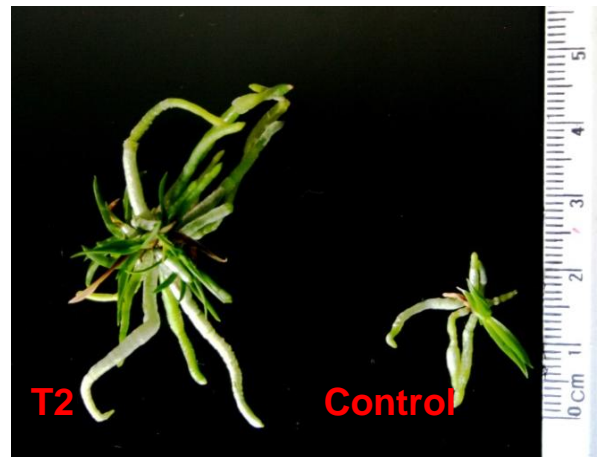


Figura No. 11 Comparativa entre una muestra de T2 y el control en el peso fresco.

En la **Figura No. 11** podemos observar una mejor proliferación tanto de la parte radicular como de parte aérea de las plántulas de *Epidendrum ciliare*, esto sugiere un mayor incremento del aBSS4 en la formación de nuevas células tanto en la parte aérea como radicular (Garciglia, Rodríguez et al. 2013) a la concentración utilizada en T2 con un incremento con respecto al control de 103% como se muestra en la **Gráfica No. 9**.

8.2. No. De Hojas.

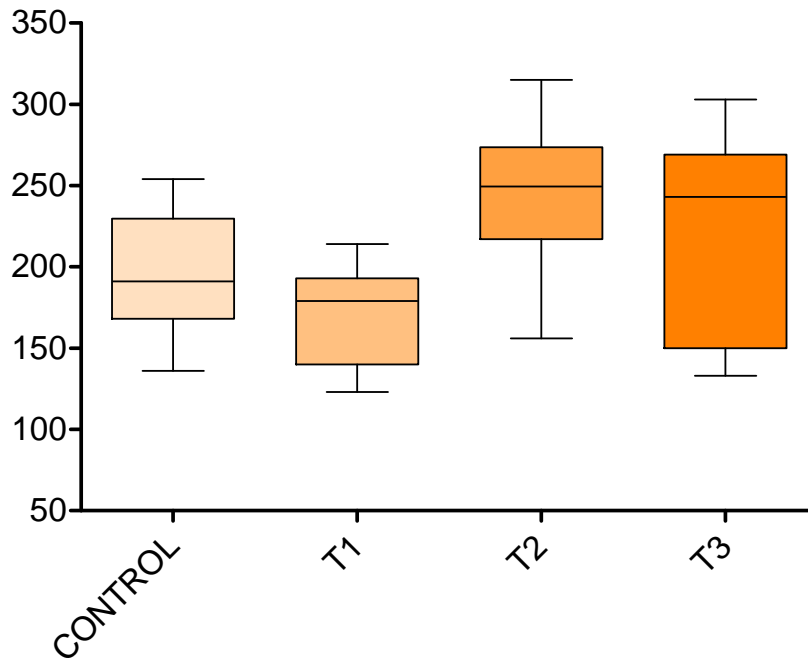
El análisis de varianza de los datos del número de hojas en plántulas de *E. ciliare* mostró diferencias significativas entre los tratamientos (diferentes concentraciones de aBSS4 en el medio de cultivo) a un nivel de significancia $p < 0.05$.

El tratamiento que presentó un mejor porcentaje de incremento en el número de hojas a los 60 días fue T2 (0.5mg/L de aBSS4) en comparación con T1 y T3 (0.05 y 1.0mg/L de aBSS4 respectivamente).

Comparación múltiple de Tukey	Diferencia de promedios.	Valor de q	P < 0.05	Resumen
CONTROL vs T1	25.73	1.962	No	ns
CONTROL vs T2	-47.57	3.850	Si	*
CONTROL vs T3	-26.64	2.032	No	ns

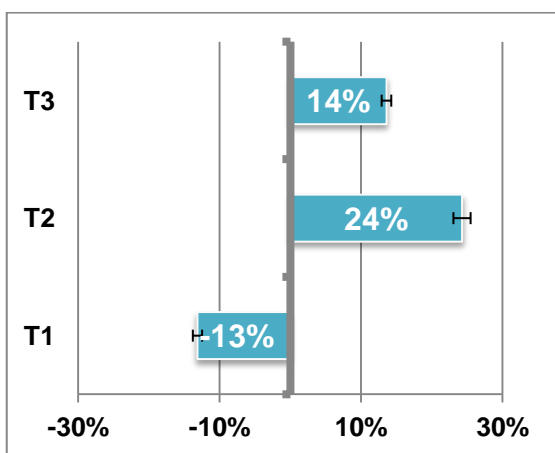
Tabla No. 13 Valores obtenidos de ANOVA para No. de hojas a los 60 días.

El valor promedio más alto y con diferencia estadística significativa fue T2 (**Tabla No. 14**) con 243.6% ($p=0.0012$) con respecto al día inicial, mientras que el control fue de 196.0%.



Gráfica No. 10 Porcentaje de incremento en el número de hojas de plántulas de *E. ciliare* a los 60 días de iniciado el experimento para el control, T1, T2 y T3.

En la **Figura No. 12**, se puede observar que hubo una proliferación en el número de hojas de *E. ciliare*; este resultado reforzó los datos obtenidos en el peso fresco para la misma concentración (0.5mg/L), cabe mencionar que, la multiplicación de los brotes foliares no significó un aumento en el tamaño de los mismos (**Gráfica No. 11**) pero el número de hojas se incrementó considerablemente en T2 (24%) con respecto al control. Por otro lado las plántulas de T1 (-13%) y T3 (14%) presentaron mermas, ya que el cálculo de porcentaje se vio afectado por la pérdida de plántulas.



Gráfica No. 11 Porcentaje de incremento en el número de hojas con respecto al control del No. de hojas a los 60 días.

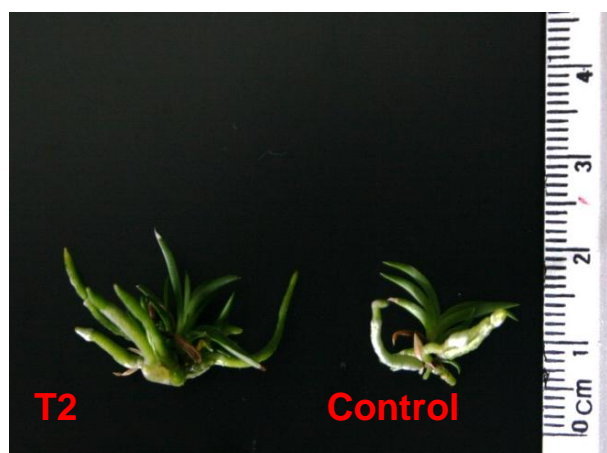


Figura No. 12 Comparativa entre una muestra de T2 y el control en el número de hojas.

Bioensayos realizados en Arroz (Núñez, Mazorra et al. 2007), demuestran que a esta concentración (T2) existen efectos positivos en la parte aérea y en el desarrollo de las plántulas tratadas tal como se pudo observar en este experimento. La proliferación de hojas es de suma importancia para la obtención de energía debido a que es ahí donde se encuentran los estomas, unidades fundamentales de las plantas de obtención de nutrientes, agua y captación de luz (Díaz, Borsani et al. 2006)

8.3. No. de Raíces.

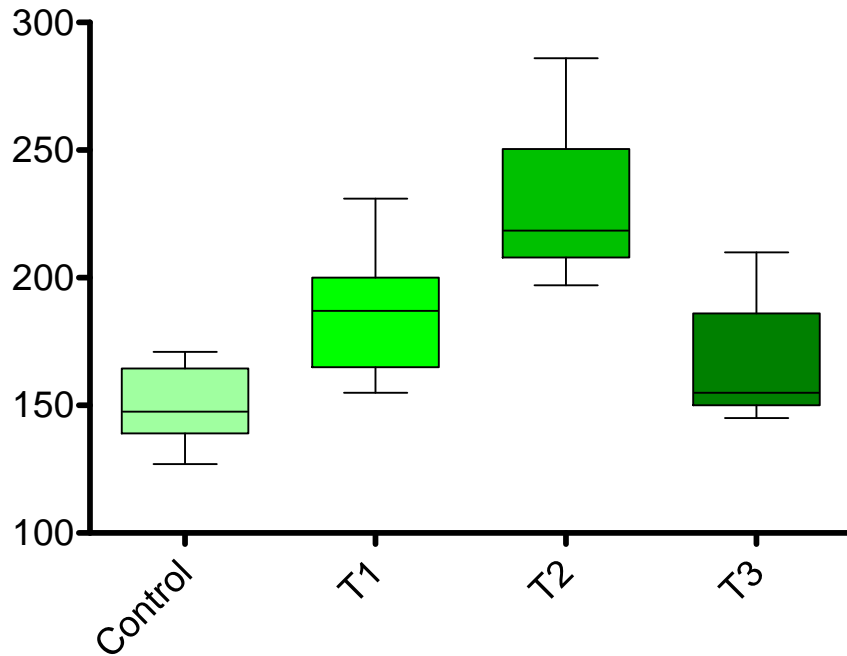
El análisis de varianza de los datos del número de raíces en plántulas de *E. ciliare* mostró diferencias significativas entre los tratamientos (diferentes concentraciones de aBSS4 en el medio de cultivo) a un nivel de significancia $p < 0.05$.

Los tratamientos que presentaron un mejor porcentaje de incremento en el número de hojas a los 60 días fueron T1 (0.05mg/L) y T2 (0.5mg/L de aBSS4) en comparación con T3 (1.0mg/L de aBSS4) (**Tabla No 15**).

Comparación múltiple de Tukey	Diferencia de promedios.	Valor de q	P < 0.05	Resumen
Control vs T1	-35.89	5.196	SI	**
Control vs T2	-77.54	11.91	SI	***
Control vs T3	-15.89	2.300	No	ns

Tabla No. 14 Valores obtenidos de ANOVA para No. de raíces a los 60 días.

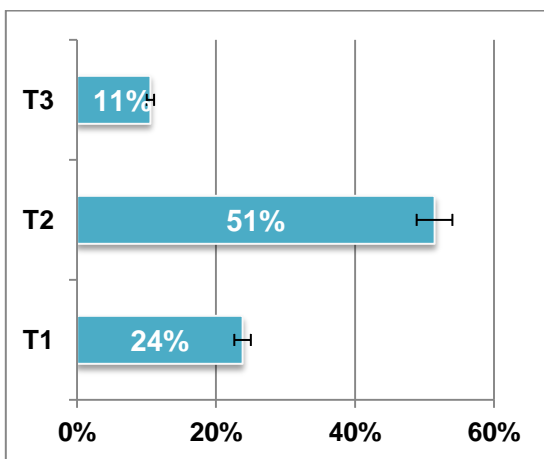
Los valores promedio más altos y con diferencia estadística significativa fueron T1 y T2 con 186.6% y 228.3% respectivamente ($p=0.0001$) con respecto al día inicial, mientras que el control fue de 166.6%.



Gráfica No. 12 Porcentaje de incremento en el número de raíces de plántulas de *E. ciliare* a los 60 días de iniciado el experimento para el control, T1, T2 y T3.

En la **Gráfica No. 12** se reportan los datos máximos, mínimos y la distribución de los datos en porcentaje obtenidos a los 60 días de los tratamientos y el control para el número de raíces.

T1 muestra un incremento en el número de raíces del 18% con respecto al control en plántulas de *E. ciliare*. Al igual que en el bioensayo realizado en dos especies de orquídeas (Suárez 2007), a la concentración 0.05mg/L se obtuvieron incrementos tanto en el número de pseudo-bulbos como en el número de raíces además de que favoreció la coloración de las plantas.



Gráfica No. 13 Porcentaje de incremento con respecto al control del No. de raíces a los 60 días.



Figura No. 13 Comparativa entre una muestra de T2 y el control en el número de raíces.

Para la concentración representada en T2 Suárez también indica que se obtiene un mayor número de raíces tanto de manera *in vitro* como *ex vitro*. En este caso T2 aumentó un 51% con respecto al control, lo que se puede verificar con la **Figura No. 13** donde se muestran dos individuos en comparación de T2 con el control, se nota un claro aumento en el número de raíces con la concentración de 0.5mg/L de aBSS4.

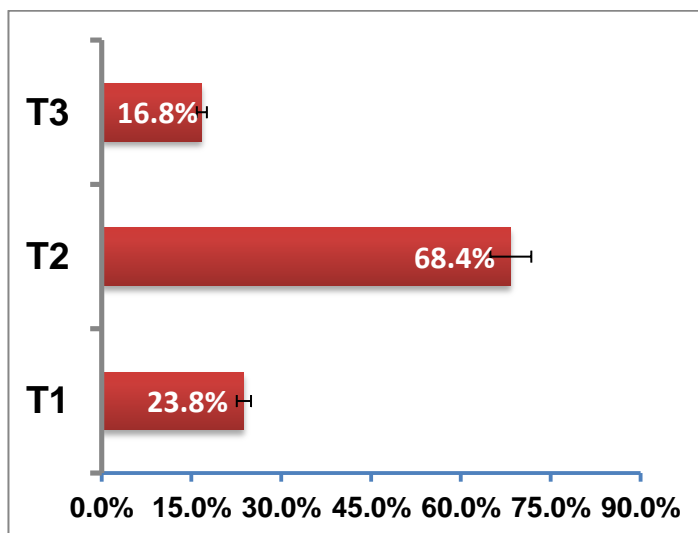
8.4. Biomasa

Los valores de biomasa obtenidos de las plántulas de *Epidendrum ciliare* se encuentran en porcentajes con respecto al control en la Tabla No 16.

Tratamientos	% biomasa
T1	23.8%
T2	68.4%
T3	16.8%

Tabla No. 15 Porcentajes de biomasa obtenidos de plántulas de *Epidendrum ciliare* de los tratamientos con aBSS4 respecto al control.

Gráfica No. 14 Porcentajes de obtención de biomasa con respecto al control de plántulas de *Epidendrum ciliare* a los 60 días de iniciado el experimento



En la **Gráfica No. 14** se puede observar la generación de biomasa en T2, lo cual se atribuye al efecto positivo ejercido por el aBSS4 como se ha reportado en investigaciones anteriores del equipo de trabajo (Andrade Rosales, Rodriguez Acosta et al. 2013).

El aBSS4 muestra una importante actividad en la elongación y proliferación de células, tal como lo reporta Galicia (2014) en plántulas de *L. anceps* y se estipula que puede actuar de manera independiente o interactuando en diferentes sistemas con otros reguladores de crecimiento vegetal a diferentes concentraciones.

9. Conclusiones.

- El aBSS4 que fue utilizado en este trabajo tiene efectos positivos en desarrollo de plántulas de *Epidendrum ciliare*.
- Durante la etapa de adaptación (30 días) los datos más destacados se obtuvieron en el peso fresco y el número de raíces, sin embargo, estos no reportan diferencia significativa en este periodo de tiempo.
- El T2 (0.50mg/L) permitió observar mejores resultados en el peso fresco lo que hace que la planta se fortalezca en condiciones *in vitro* para las siguientes etapas de maduración.
- El Número de hojas registradas en T2 (0.50mg/L) a los 60 días es mayor que en las otras concentraciones. Lo que incrementa las posibilidades de supervivencia a factores externos cuando pase a la etapa ex vitro.
- El T2 (0.50mg/L) Promueve la formación de nuevas raíces en comparación al medio de cultivo sin reguladores de crecimiento.
- La ganancia de biomasa se vio reflejada en T2 (0.50 mg/L) donde se observaron las mejores respuestas de las plántulas tratadas a esta concentración.

10. Referencias bibliográficas

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. JBU, Facultad de ciencias químicas, BUAP.

Arditti, J. (1967). "Factors affecting the germination of orchid seeds." *The Botanical Review* 33(1): 1-97.

Benková, E. and J. Hejác̃ko (2009). "Hormone interactions at the root apical meristem." *Plant Molecular Biology* 69(4): 383-396.

Brosa, C. (1999). "Biological effects of brassinosteroids." *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 34(5): 339-358.

Clouse, S. D. and J. M. Sasse (1998). "Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development." *Annual Review of Plant Biology* 49(1): 427-451.

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.

Chugh, S., S. Guha, et al. (2009). "Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants." *Scientia Horticulturae* 122(4): 507-520.

da Silva, J. A. T. (2013). "Brassinosteroids (24-epibrassinolide and 28-homobrassinolide) inhibit protocorm-like body development in hybrid *Cymbidium* (Orchidaceae)."

Diaz, p., O. Borsani, et al. (2006) *Metabolismo del Nitrogeno en plantas.*

Eccardi, F. and R. Becerra (2003). *Las Orquídeas en las CITES.* Biodiversitas, CONABIO. 43: 12-15.

Franck-Duchenne, M., Y. Wang, et al. (1998). "In vitro stem elongation of sweet pepper in media containing 24-epi-brassinolide." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53(2): 79-84.

Fujioka, S. and T. Yokota (2003). "Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids." *Annual Review of Plant Biology* 54(1): 137-164.

Galicia, M. L., M. Rodríguez, et al. (2014). Influencia del análogo del Brasinoesteroide aBSS4 en el desarrollo de plántulas de *Laelia anceps*, BUAP: 60.

Garay-Arroyo, A., M. De La Paz Sánchez, et al. (2012). "Hormone symphony during root growth and development." *Developmental Dynamics* 241(12): 1867-1885.

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.

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

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.

Kauschmann, A., A. Jessop, et al. (1996). "Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development." *The Plant Journal* 9(5): 701-713.

Khripach, V., V. Zhabinskii, et al. (2000). "Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century." *Annals of Botany* 86(3): 441-447.

Knudson, L. (1950). "Germination of seeds of *Vanilla*." *American Journal of Botany*: 241-247.

Li, J., P. Nagpal, et al. (1996). "A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*." *Science* 272(5260): 398-401.

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

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.

Moreno, A., M. Rodriguez, et al. (2009). Efecto del análogo de Brasinoesteroide en diferentes variedades de Maíz (*Zea mays* L.) criollo. Jardín botánico BUAP. Puebla México, Benemerita universidad autónoma de Puebla.

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.

Nair, R. (1982). Seed germination and tissue culture studies in orchids.

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.

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

Peña, N. H., M. R. 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. Licenciatura.

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

Selosse, M.-A., B. Boullard, et al. (2011). "Noël Bernard (1874–1911): orchids to symbiosis in a dozen years, one century ago." *Symbiosis* 54(2): 61-68.

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

Steward, F. and M. O. Mapes (1971). "Morphogenesis in aseptic cell cultures of *Cymbidium*." *Botanical Gazette*: 65-70.

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.

Suzuki, H., T. Inoue, et al. (1995). "Conversion of 24-methylcholesterol to 6-oxo-24-methylcholestanol, a putative intermediate of the biosynthesis of brassinosteroids, in cultured cells of *Catharanthus roseus*." *Phytochemistry* 40(5): 1391-1397.

Takashi, A., Oka, et al. (2003). "Cytokinin signal transduction in plant cells." *Journal of plant research* 116(3): 221-231.

Ye, H., L. Li, et al. (2011). "Recent Advances in the Regulation of Brassinosteroid Signaling and Biosynthesis Pathways." *Journal of Integrative Plant Biology* 53(6): 455-468.

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.

11. Apéndice.

Soluciones y diluciones de los promotores de crecimiento.

Los brasinoesteroides empleados son 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 colocan 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 calentada ($38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) 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 para obtener las concentraciones de 1mg/L, 0.5mg/L y 0.05mg/L del aBSS4.

Preparación de medio de cultivo Murashige and Skoog (MS).

El medio de cultivo de elección fue el MS (Murashige and Skoog 1962) A continuación se muestra la tabla y las cantidades necesarias para hacer los stocks y el medio de cultivo.

MEDIO MS	mg/L	g/L	mg/L
Macronutrientes			
NH ₄ NO ₃	16500	16.5	1650
KNO ₃	19000	19	1900
MgSO ₄ .7H ₂ O	3700	3.7	370
KH ₂ PO ₄	1700	1.7	170
Fuente de calcio			
CaCl ₂ .2H ₂ O	4400	4.4	440
Micronutrientes			
KI	166	0.166	0.83
H ₃ BO ₃	1240	1.24	6.2
MnSO ₄ .H ₂ O	4460	4.46	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1720	1.72	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	50	0.05	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	5	0.005	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	5	0.005	0.025
Fuentes de hierro			
FeSO ₄ .7H ₂ O	5560	5.56	27.8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	7460	7.46	37.3
Vitaminas			
Tabla N° 16 Formulación del medio de cultivo Murashige & Skoog (1962)			
Piridoxina	100	0.1	0.5
Tiamina-HCl	100	0.1	0.5
Glicina	400	0.4	2
Mio-inositol		0.5	

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

ALICUOTAS PARA LA PREPARACION DE 1L DE MEDIO MS

Macronutrientes	100ml
Fuentes de calcio	100ml
Micronutrientes	5ml
Fuentes de Hierro	5ml
Vitaminas	5ml
Mioinositol	0.1g
Sacarosa	30g
Agar	9g
Carbón activado	0.5g
pH	5.7

Tabla No. 17 Cantidades necesarias para elaborar el medio MS

Equipo.

Equipo	Marca	Modelo
Campana de flujo laminar	Vichi	CFL 101
Autoclave vertical	Scorpion scientific	D3x60
Potenciómetro de pH	Hanna instruments	HI2221
Parrilla de calentamiento	Civeq	Termo agitador JB-3
Balanza analítica	Velab	LA 204

Tabla No. 18 Equipos utilizados para la realización del trabajo de investigación.

