

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Ubicación geográfica de la investigación

La investigación referente al cultivo *in vitro*, tanto para embriones como para yemas apicales, se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE), ubicado en la parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, a 0° 18,81 S; 78° 26,64 O; y altitud: 2516 msnm.

2.2 Cultivo de embriones

2.2.1 Selección y colecta de semillas de piñón

Se utilizaron semillas de frutos secos (embriones en fase cotiledonar), ya que según Nunes y colaboradores (2008), tienen un mejor desarrollo *in vitro* en lo que refiere al número de hojas, número de raíces y longitud de tallo, con respecto a semillas de frutos inmaduros (cotiledones en fase torpedo).

Las semillas de piñón fueron suministradas por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Pichilingue, con sede en Portoviejo – Manabí. Según investigadores de esta estación, se conoce que tienen un porcentaje de germinación en campo del 85% y dos meses de almacenamiento desde su colecta.

La selección de las semillas adquiridas fue realizada tomando en cuenta aquellas que presentaron las dimensiones dentro del rango de una semilla normal, es decir, de 1,4 a 1,7 centímetros de largo, y de 1,2 a 1,5 centímetros de ancho. Además las semillas seleccionadas debieron presentar las siguientes características externas: coloración negra y brillante, cáscara poco rugosa, sana y sin perforaciones. Internamente las semillas tenían que ser blancas, no amarillentas o cafés y sin orificios ni presencia de arrugas. En

la figura 2.1 se muestran las semillas seleccionadas comparadas con las que se descartaron.

Cabe resaltar que las semillas fueron conservadas, previo al proceso de germinación, en el refrigerador a 10 °C, de acuerdo al trabajo expuesto por Argollo y Campos (2007), donde recomiendan el almacenamiento de las semillas por dos meses (luego de la cosecha) en una cámara fría para aumentar la viabilidad de las semillas.



Figura 2.1 Selección de semillas de piñón. A. Semilla sana con tegumento seleccionada, B. Semilla sana sin tegumento seleccionada, C y D. Semillas sin tegumento no seleccionadas. (Laboratorio de Cultivo de tejidos – ESPE, Sangolquí – Ecuador, 2009).

2.2.2 Fase de imbibición

Previo a los tratamientos de desinfección, se llevó a cabo el proceso pregerminativo de imbibición; ésta es la condición previa para que se inicie la germinación, y consiste de cambios morfofisiológicos como: hidratación de la semilla, movilización del ácido giberélico, liberación de enzimas preformadas, promoción de la capacidad de síntesis de proteínas y ARN, aumento del tamaño de la semilla, entre otros (Azcón y Talón, 2000).

Ndiaye y colaboradores (2006) encontraron que el mayor porcentaje de germinación *in vitro* de piñón se produjo en semillas que fueron escarificadas (retiro de la cubierta o tegumento de la semilla) manualmente, una germinación casi nula fue encontrada en semillas sembradas con su cubierta o escarificadas en ácido sulfúrico. Por esta razón se utilizó la escarificación de las semillas, de manera que éstas fueron cuidadosamente

desprovistas del tegumento que las recubre, con la ayuda de unas tijeras; se procuró no causar ningún daño al endospermo ni producir la directa exposición del embrión al ambiente. Luego se dejaron las semillas sin tegumento en remojo con agua estéril por 24 horas a temperatura ambiente y en oscuridad como lo recomienda Deore & Sudhakar (2008) y; Feike, Mueller & Claupein (2008).

2.2.3 Fase de desinfección

El tratamiento de desinfección general fue el siguiente: lavado de las semillas sin tegumento en una solución de fungicidas de principio activo carbendazim (0,5%) y sulfato de cobre pentahidratado (0,24%) por una hora y media; enjuague con agua estéril. Luego un lavado con hipoclorito de sodio (NaClO) en distintas concentraciones y tiempos de inmersión. Después de realizada la desinfección, se realizó la extracción del embrión dentro de la cabina de flujo laminar horizontal, esterilizada previamente con luz ultravioleta por 20 minutos. Aquí se partió cuidadosamente la semilla longitudinalmente en la mitad, con ayuda de pinzas y bisturí en una superficie de vidrio estéril. Luego se realizaron tres lavados consecutivos del embrión en agua destilada estéril, y se sembró en el medio de cultivo. En la tabla 2.1 se detallan los tratamientos de desinfección utilizados en el DCA.

Tabla 2.1 Diferentes tratamientos de desinfección aplicados a semillas de piñón antes de la extracción del embrión.

Tratamiento	Concentración de NaClO (%)	Tiempo de inmersión en NaClO
D1	2,5	10 minutos
D2	2,5	15 minutos
D3	2	10 minutos
D4	2	15 minutos
D5	0,2	5 horas
D6	0,3	5 horas
D7	0,4	5 horas
D8	0,2	10 horas
D9	0,3	10 horas
D10	0,4	10 horas
D11	0,2	15 horas
D12	0,3	15 horas
D13	0,4	15 horas

Repeticiones: 20

Unidad experimental: Embrión sembrados en frasco de vidrio con 30 mL de medio de cultivo MS.

Variables evaluadas:

Contaminación bacteriana: la presencia de colonias bacterianas en el medio de cultivo se evaluó con uno (1), y la no contaminación con cero (0).

Contaminación fúngica: la presencia de contaminación por hongos en el medio de cultivo se evaluó con uno (1), y la no contaminación con (0).

Viabilidad del embrión: la respuesta positiva del embrión, se valoró con uno (1), es decir, embriones totalmente verdes y con presencia de desarrollo vertical del eje embrionario, como manifiesta Nunes (2007) y, Argollo y Campos (2007) en sus trabajos. La respuesta negativa se valoró con cero (0). En la figura 2.2 se muestran embriones viables con respecto a los que se consideraron como no viables en el presente estudio.

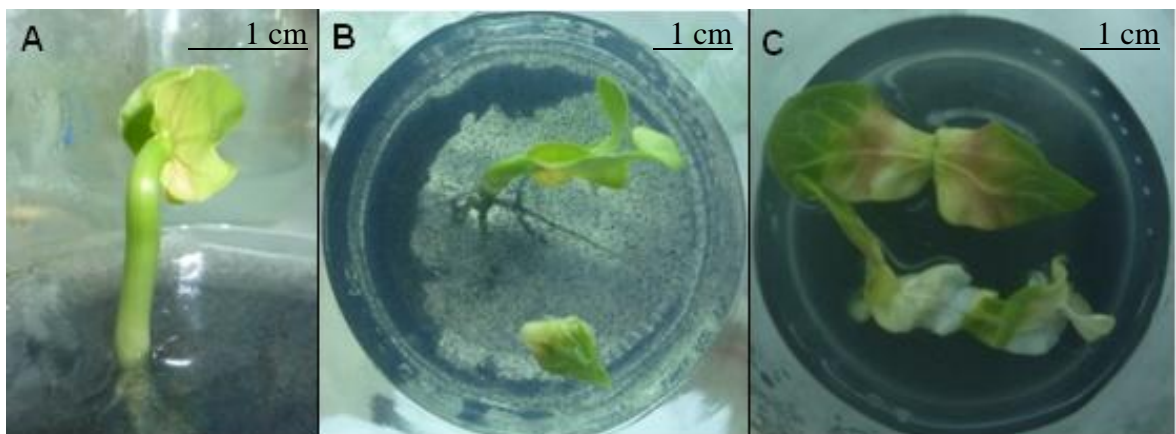


Figura 2.2 Observación de la viabilidad del embrión a los 7 días de la siembra. A. Embrión viable, completamente verde, B. Embrión viable con raicillas formadas, y C. Embriones no viables por coloración parcial de hojas cotiledonares y ausencia de raicillas.

Evaluación: una semana después de la siembra.

Análisis estadístico: Se empleará un análisis chi cuadrado y un análisis descriptivo de porcentajes para las variables dicotómicas.

La siembra de los embriones se la realizó en frascos con 30 mL de medio nutritivo con sales minerales y vitaminas propuestas por Murashigue y Skoog (MS) (Anexo A), suplementado con 30 g L⁻¹ de azúcar, 5.8 g L⁻¹ de agar, sin reguladores de crecimiento y ajustado a pH 5.7. Las condiciones ambientales de cultivo fueron: 25 ± 1 °C de temperatura, 60 ± 2 % de humedad, intensidad lumínica de 2100 – 2400 lux y un fotoperiodo de 14 horas.

2.2.4 Prueba de viabilidad mediante tinción con TZ

Se realizó la prueba de viabilidad de tinción con tetrazolio para determinar el porcentaje de germinación de las semillas de prueba, antes y después de una desinfección vigorosa. La solución de tetrazolio se preparó como aconsejan Patil & Dadlani (1993):

Solución A: se disolvió 9,078 gramos de fosfato diácido de potasio (KH₂PO₄) en agua destilada y se aforó a 1000 mL.

Solución B: se disolvió 11,876 gramos de fosfato diácido de sodio dihidratado (Na₂HPO₄·2H₂O) en agua destilada y se aforó a 1000 mL.

Se mezcló 400 mL de la solución A con 600 mL de la solución B, obteniéndose al final un litro de solución. Se disolvió 8 gramos de la sal cloruro de 2,3,5 - trifenil tetrazolio para obtener una concentración del 0,8% y de pH 7,0. La solución fue reducida debido a que los embriones obtenidos de la semilla de piñón son muy delgados y frágiles, ya que se recomienda el uso de concentraciones menores al 1%.

La tinción de los embriones se la realizó luego del proceso de imbibición, ya que en este estado, se encuentra el tejido embrionario totalmente hidratado, ha iniciado el proceso germinativo y es más fácil su manipulación. Se extrajo cuidadosamente los embriones partiendo la semilla

longitudinalmente en la mitad con la ayuda de pinzas y bisturí; la tinción se realizó antes y después de un proceso de desinfección fuerte, para observar los daños que pueden afectar su viabilidad posterior.

Las condiciones de tinción fueron: inmersión total de los embriones remojados en agua por 24 horas, en la solución de tetrazolio (0,8%) durante una hora, en oscuridad y a 30 °C de temperatura.

Repeticiones: 40 repeticiones en cada tinción, antes y después de la desinfección.

Unidad experimental: embrión sometido a tinción.

Variable evaluada:

Viabilidad del embrión: se evaluó la coloración que tomaron los embriones en una escala de calificación de cero a cinco (Tabla 2.2), asignando el valor de cero (0) a los embriones no teñidos y cinco (5) a los embriones totalmente teñidos de un color rojo intenso.

Tabla 2.2 Escala de viabilidad establecida para la tinción con TZ de embriones de piñón.

Viabilidad del embrión	Parámetro
0	Embrión incoloro
1	25% color rojo
2	50% color rojo
3	75% color rojo
4	100% color rojo
5	Color rojo intenso

Evaluación: inmediata luego de la tinción

Análisis estadístico: Se realizará un ADEVA con los datos obtenidos para la comparación entre tratamientos.

2.2.5 Tratamientos pregerminativos

Los embriones extraídos de las semillas de piñón fueron expuestos a un DCA con tres tratamientos pregerminativos luego de su desinfección y siembra en medio de cultivo MS, adicionado 30 g L⁻¹ de azúcar y ajustado a pH 5,8. Esto se realizó para mejorar el proceso germinativo. Los tres tratamientos incluyeron una exposición, de los embriones en el medio de cultivo, en oscuridad por diferente periodo de tiempo (Tabla 2.3), 25 ± 1 °C de temperatura, 60 ± 2 % de humedad, para luego pasar a un fotoperiodo de 14 horas e intensidad lumínica de 2100 a 2400 lux.

Tabla 2.3 Tratamientos pregerminativos utilizados en el cultivo de embriones de piñón.

Tratamiento	Tiempo en oscuridad (h)
P1	0
P2	24
P3	48

Repeticiones: 30

Unidad experimental: un embrión sembrado en cada frasco de cultivo

Variable evaluada:

Viabilidad del embrión: la respuesta positiva del embrión, se valoró con uno (1), es decir, embriones totalmente verdes y con presencia de desarrollo vertical del eje embrionario, como manifiesta Nunes (2007) y, Argollo y Campos (2007) en sus trabajos. La respuesta negativa se valoró con cero (0) (Figura 2.2)

Evaluación: una semana después de la siembra

Análisis estadístico: Se empleará un análisis chi cuadrado y un análisis descriptivo de porcentajes para las variables dicotómicas.

2.2.6 Evaluación del desarrollo embrionario

2.2.6.1 Nutrientes y carbón activado

Para la evaluación del desarrollo embrionario, se utilizaron los embriones extraídos de la semilla de piñón y se sembraron en medio de cultivo MS, con pH ajustado a 5,7; agar en concentración de 5,8 g L⁻¹, y se aplicó un diseño factorial para la adición de agua de coco (50, 100 y 150 mL L⁻¹), azúcar (30 y 60 g L⁻¹) y carbón activado (1 y 2 g L⁻¹) más un control con 30 g L⁻¹ de azúcar y sin la adición de agua de coco y carbón activado. El diseño factorial empleado fue 3X2X2+1, dando un total de 13 tratamientos que se detallan en la tabla 2.4.

Tabla 2.4 Tratamientos aplicados para la evaluación del desarrollo embrionario de piñón.

Tratamiento	Agua de coco (mL L ⁻¹)	Carbón activado (g L ⁻¹)	Azúcar (g L ⁻¹)
E1	50	1	30
E2	50	2	30
E3	50	1	60
E4	50	2	60
E5	100	1	30
E6	100	2	30
E7	100	1	60
E8	100	2	60
E9	150	1	30
E10	150	2	30
E11	150	1	60
E12	150	2	60
E13 (control)	0	0	30

Repeticiones: 10

Unidad experimental: un embrión sembrado en cada frasco de cultivo

Variables evaluadas:

a) Germinación y desarrollo inicial de los embriones

Desarrollo del eje embrionario: se anotó el día exacto en que se empezó a desarrollar el eje embrionario, el cual involucra hipocótilo y radícula (Figura 2.3).



Figura 2.3 Inicio del desarrollo del eje embrionario donde se observa el crecimiento del hipocótilo a los dos días de la siembra.

Embrión completamente fotosintético: se estableció el día en que el embrión se coloreó completamente de verde debido a la actividad fotosintética de los cloroplastos totalmente funcionales (Figura 2.4).



Figura 2.4 Embrión de piñón completamente verde debido a la actividad fotosintética al quinto día de la siembra.

Área foliar cotiledonar: área de una hoja cotiledonar medida a los 30 días de la siembra con la ayuda de un micrómetro para medir el largo y ancho de la hoja, y estimando su superficie (en centímetros cuadrados) mediante la fórmula de la

elipse, ya que ésta es la forma que toman las hojas cotiledonares (Figura 2.5), la fórmula aplicada fue: $\pi \cdot a \cdot b$ (a = largo/2 y b = ancho/2)

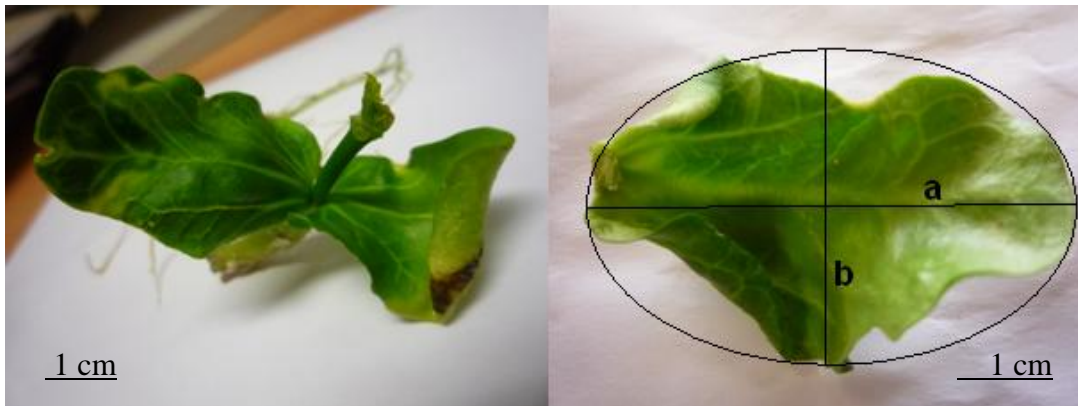


Figura 2.5 Forma elíptica de las hojas cotiledonares de piñón, donde “a” es la mitad del valor del largo de la hoja y “b” es la mitad del ancho.

Longitud del tallo: se midió la longitud del tallo de la plántula (en centímetros), desde la base, que está en contacto con el medio, hasta la bifurcación de las hojas cotiledonares (yema apical), a los 30 días de la siembra con la ayuda de un micrómetro (Figura 2.6).

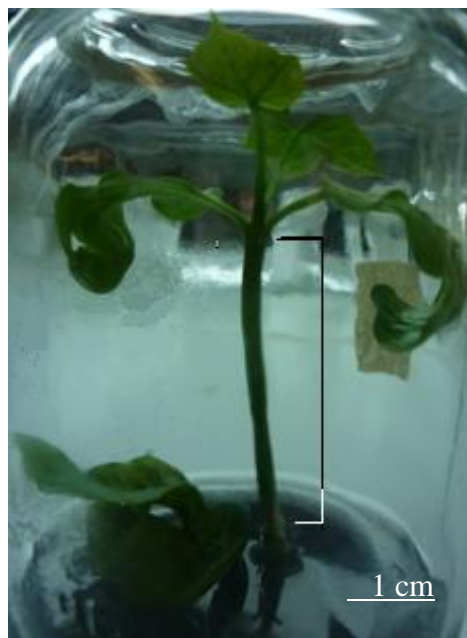


Figura 2.6 Medición de la longitud del tallo de un embrión desarrollado a los 30 días de la siembra.

b) Desarrollo del sistema radical

Aparición del sistema radical: se estableció el día en que se empezó a desarrollar el sistema radical del embrión germinado, es decir, el aparecimiento de la raíz central y las cuatro raíces periféricas (Figura 2.7).

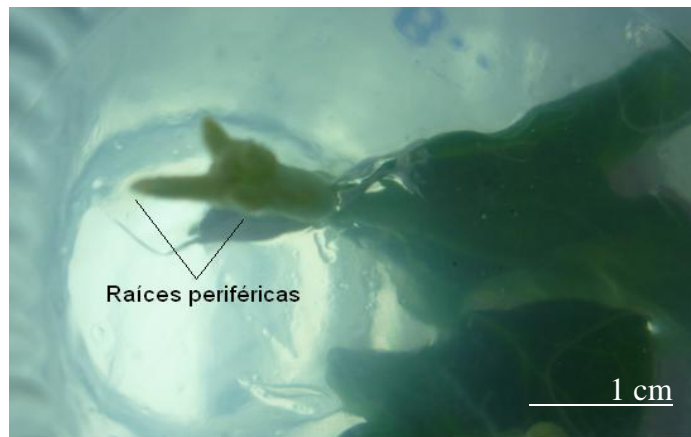


Figura 2.7 Desarrollo del sistema radical en un embrión de piñón a los nueve días de la siembra.

Longitud del sistema radical: se evaluó la longitud del sistema radical de las plántulas a los 30 días de la siembra, estableciendo una escala de valores de cero a cuatro (Tabla 2.5 y figura 2.8), ya que es muy difícil la medición de las raíces, debido a que tienden a crecer y enrollarse en la base del frasco de cultivo. El valor de cero (0) significa un desarrollo nulo y el valor de cuatro (4) significa un desarrollo muy abundante.

Tabla 2.5 Escala establecida para evaluar la longitud del sistema radical.

Sistema radical	Parámetro
0	Ausencia de raíces
1	Raíces cortas
2	Raíces medianas
3	Raíces largas
4	Raíces muy largas

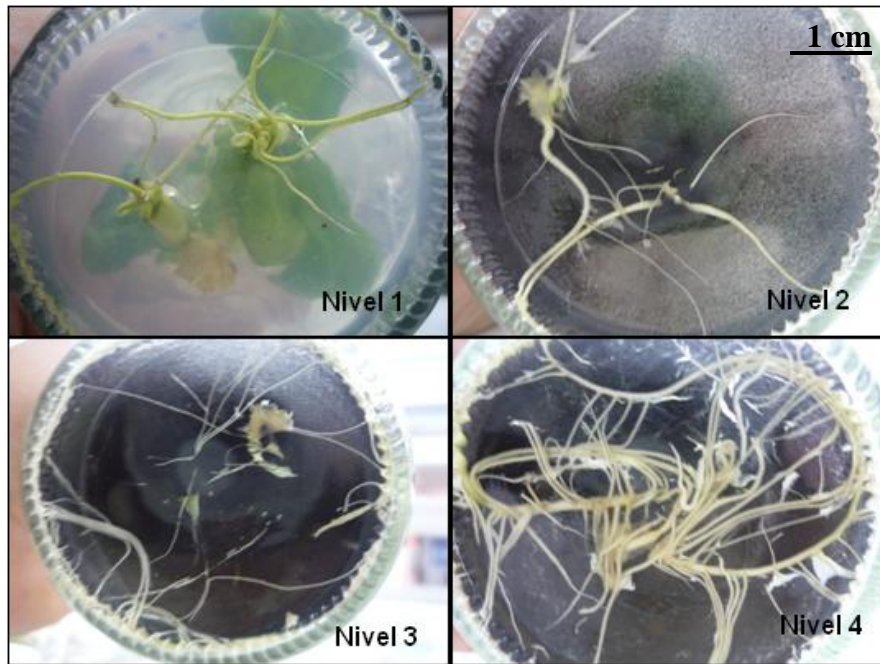


Figura 2.8 Diferentes niveles de enraizamiento en los embriones de piñón. La ausencia de raíces está referida al nivel cero.

c) Desarrollo apical y foliar

Aparecimiento de yema apical: se observó el día exacto en que aparece la yema apical en la bifurcación existente entre las dos hojas cotiledonares (Figura 2.9).

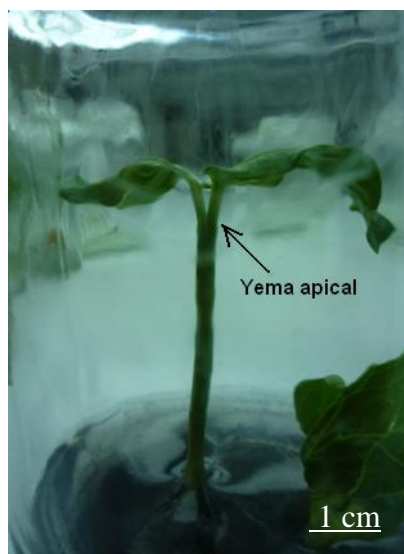


Figura 2.9 Diferenciación de la yema apical en un embrión de piñón en el día 12 después de la siembra.

Aparecimiento de la primera hoja no cotiledonar: se observó el día exacto en que aparece la primera hoja no cotiledonar a partir del desarrollo de la yema apical (Figura 2.10A).

Aparecimiento de la segunda hoja no cotiledonar: se observó el día exacto en que aparece la segunda hoja no cotiledonar a partir del desarrollo de la yema apical (Figura 2.10B).

Aparecimiento de la tercera hoja no cotiledonar: se observó el día exacto en que aparece la tercera hoja no cotiledonar a partir del desarrollo de la yema apical (Figura 2.10C).

Aparecimiento de la cuarta hoja no cotiledonar: se observó el día exacto en que aparece la cuarta hoja no cotiledonar a partir del desarrollo de la yema apical (Figura 2.10D).

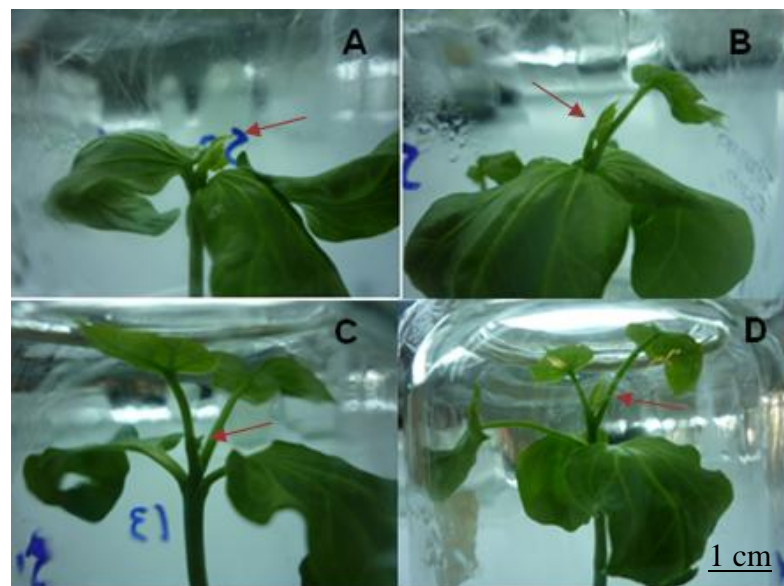


Figura 2.10 Aparecimiento de las primeras hojas no cotiledonares en embriones de piñón.

A. primera hoja (18 días), B. segunda hoja (22 días), C. tercera hoja (26 días), y
D. cuarta hoja (30 días).

Evaluación: diaria, los primeros 30 días después de la siembra

Análisis estadístico: Se empleará un análisis chi cuadrado en las variables dicotómicas, más un análisis de porcentajes; y un ADEVA de los datos del diseño factorial con la comparación entre tratamientos mediante la prueba de Tukey al 5%.

2.2.6.2 Reguladores de crecimiento

Además se realizó otro experimento para evaluar los efectos de reguladores de crecimiento en el desarrollo de los embriones. Se estableció un DCA con ocho tratamientos que incluyeron el medio basal MS, con 5,8 g L⁻¹ de agar, pH ajustado a 5,7 y varias concentraciones de los reguladores de crecimiento: BAP (bencilaminopurina), AIB (ácido indol butírico), GA₃ (ácido giberélico) y brasinolida, más un control sin reguladores de crecimiento. En total los tratamientos utilizados fueron nueve y se detallan en la tabla 2.6.

Tabla 2.6 Tratamientos aplicados para la evaluación de reguladores de crecimiento en el desarrollo embrionario de piñón.

Tratamiento	BAP (mg L ⁻¹)	AIB (mg L ⁻¹)	GA ₃ (mg L ⁻¹)	Brasinolida (mg L ⁻¹)
R1	0	0,1	2	0,5
R2	0,5	0,1	1	1
R3	1	0,1	2	0,5
R4	1	0,5	0	1
R5	2	0,5	0	0
R6	2	0,5	0,5	0
R7	2	1	0	0
R8	2	1	0,5	0
R9 (control)	0	0	0	0

Repeticiones: 10

Unidad experimental: un embrión sembrado en cada frasco de cultivo

Variables evaluadas: Las variables evaluadas fueron: desarrollo del eje embrionario, embrión completamente fotosintético, área foliar cotiledonar, longitud del tallo, desarrollo del sistema radical, longitud del sistema radical,

aparecimiento de yema apical, aparecimiento de la primera, segunda, tercera y cuarta hoja no cotiledonar; además se adicionaron las siguientes variables.

a) Evaluación de formación callosa

Grosor del tallo: se estableció una escala del uno al tres (Tabla 2.7 y figura 2.11), asignando el valor de uno (1) a un tallo delgado, y el valor de tres (3), un tallo muy robusto. La variable fue evaluada a los 30 días de la siembra.

Tabla 2.7 Escala establecida para evaluar el grosor del tallo de las plántulas de piñón.

Grosor del tallo	Parámetro
1	Tallo delgado
2	Tallo robusto
3	Tallo muy robusto

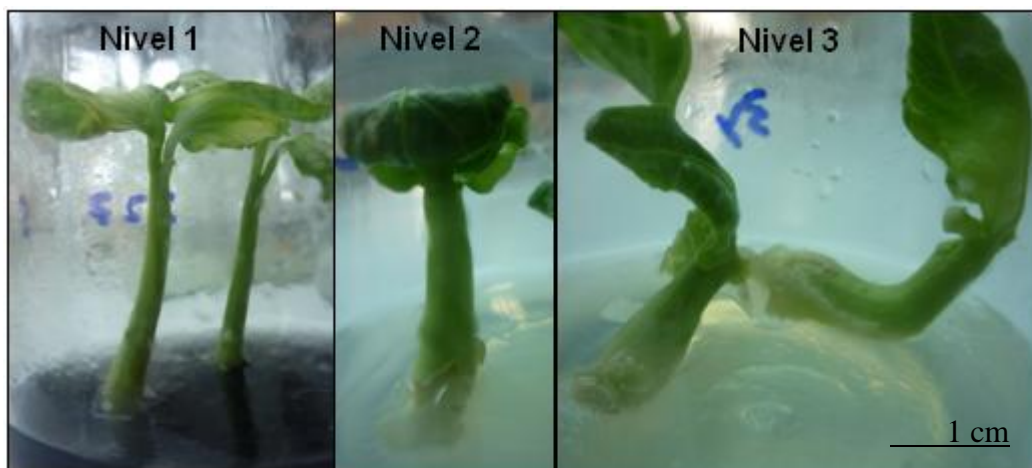


Figura 2.11 Niveles de grosor de tallo evaluados en embriones desarrollados de piñón a los 30 días de la siembra

Formación de callo: debido a que la citoquinina BAP en concentración moderada, induce la formación de callo en el tejido vegetal de *Jatropha curcas* (Soomro & Asma, 2007), se decidió evaluar la variable de formación de callo, donde se estableció una escala de cero a tres (Tabla 2.8 y figura 2.12), donde el valor de “0” significa la ausencia de callo, y el valor de “3” significa la formación abundante de callo. La variable fue evaluada a los 30 días de la siembra.

Tabla 2.8 Escala establecida para evaluar la formación de callo en las plántulas de piñón.

Formación de callo	Parámetro
0	Ausencia de callo
1	Callo pequeño
2	Callo mediano
3	Callo abundante

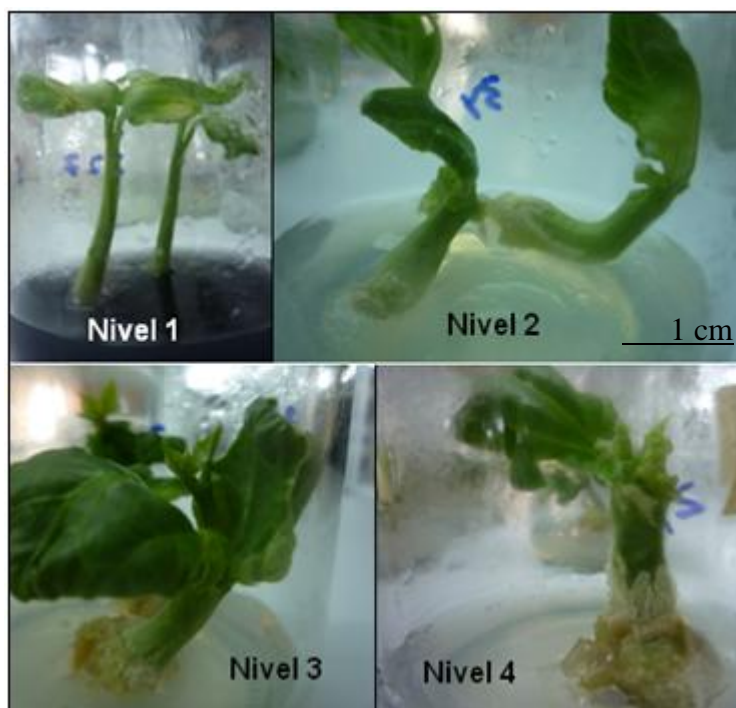


Figura 2.12 Niveles de formación de callo evaluados en embriones desarrollados de piñón.

Análisis estadístico: Se empleará un análisis chi cuadrado en las variables dicotómicas, más un análisis de porcentajes; y un ADEVA de los datos del diseño factorial con la comparación entre tratamientos mediante la prueba de Tukey al 5%.

La siembra de los embriones se la realizó en frascos con 30 mL de medio nutritivo, se dejó en oscuridad por 24 horas y luego se mantuvo a las condiciones ambientales de 25 ± 1 °C de temperatura, 60 ± 2 % de humedad, intensidad lumínica de 2100 – 2400 lux y un fotoperiodo de 14 horas.

2.3 Micropropagación de yemas apicales adultas de piñón

2.3.1 Selección y colecta del material vegetal

La etapa de recolección de yemas apicales y estacas de plantas adultas de piñón se inició con la selección in situ del material vegetal; se eligieron los especímenes que presentaron las mejores características fenotípicas como son: mayor número de renuevo de yemas, plantas libres de hongos o algún tipo de enfermedad, vigorosas, con follaje perenne y denso, como lo recomienda Pierik (1990).

La recolección se realizó en la provincia de Manabí, sector de El Carmen, en la vía a Pedernales (Figura 2.13), en haciendas que utilizan el piñón como cerca viva. Las coordenadas geográficas de recolección se muestran en la tabla 2.9. Adicionalmente, con la ayuda del Ingeniero Vicente Anzules, docente de la ESPE – IASA II, se identificó la especie recolectada como *Jatropha curcas*, gracias a que se están cultivando diferentes variedades de esta planta en un proyecto institucional de la ESPE.



Figura 2.13 Cerca viva de piñón en la vía El Carmen – Pedernales, provincia de Manabí – Ecuador, 2009.

Tabla 2.9 Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo en la vía El Carmen – Pedernales, provincia de Manabí y en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas – Ecuador, 2009.

Punto de muestreo	Latitud	Longitud	Altitud (m)
Hacienda "La Molestina" - IASA II	00°26,281 S	79°19,236 O	272
Punto 1 Vía El Carmen - Pedernales	00°11,385 S	79°30,435 O	229
Punto 2 Vía El Carmen - Pedernales	00°09,741 S	79°33,502 O	197
Punto 3 Vía El Carmen - Pedernales	00°09,612 S	79°33,555 O	187

Para la recolección de yemas, se cortaron aproximadamente 60 explantes por muestreo de donde se extrajeron la yemas apicales con una longitud de cinco a seis centímetros (Datta *et al.*, 2007); a las cuales se les realizó un lavado inicial con agua estéril, como una desinfección preliminar.

Para la recolección de estacas, se cortaron ramas de 40 a 50 centímetros de longitud, las mismas que debían ser verdes, juveniles y con brotes axilares.

Se conoce que los explantes pueden presentar una respuesta diferente al mismo tratamiento debido a la edad específica y condición fisiológica de cada planta donadora, por esta razón la colecta se lo hace de la forma más uniforme posible (Datta *et al.*, 2007).

2.3.2 Fase de desinfección

Los tratamientos de desinfección se aplicaron en un diseño experimental planteado para las yemas apicales colectadas de plantas adultas de campo; debido a que el número yemas que se pueden obtener es mucho mayor y se lo puede realizar en un menor tiempo.

Luego de estandarizar el protocolo de desinfección, se escogió el tratamiento que dio los mejores resultados, es decir, menor porcentaje de contaminación y mayor número de explantes viables. Este tratamiento se volvió a evaluar pero con yemas obtenidas de estacas mantenidas en invernadero.

En los siguientes subtemas se amplía el procedimiento seguido en la evaluación de los métodos de desinfección.

2.3.2.1 Desinfección de yemas a partir de plantas de campo

El primer paso para realizar la desinfección del material vegetal fue el de recortar las yemas apicales hasta un tamaño de tres a cuatro centímetros (Figura 2.14), evitando el contacto manual con la ayuda de pinzas y bisturí sobre papel toalla. Luego se procedió a lavar el material con una corriente fuerte de agua durante 30 segundos para quitar las impurezas superficiales y retirar el látex excedente que se produce después del corte.

A continuación se sumergieron los explantes en una solución de detergente comercial al 2% durante 15 minutos en agitación; seguidamente se los sumergió en una solución de Tween 20 al 0,2% también en agitación por 15 minutos. Luego se realizó un lavado con dos fungicidas consecutivamente, el uno de principio activo carbendazim en concentración de 0.5% durante 35 minutos, y luego el de principio activo sulfato de cobre pentahidratado en concentración de 0.24% durante 35 minutos, con leve agitación en ambos casos (Figura 2.15).



Figura 2.14 Recorte de los explantes recolectados para obtener yemas apicales listas para el proceso de desinfección (Laboratorio de Cultivo de Tejidos, ESPE – Sangolquí, 2009).



Figura 2.15 Diferentes pasos en el proceso de desinfección de yemas apicales de piñón. A. Lavado en detergente comercial al 2%, B. Lavado en Tween 20 al 0.2%, C. Lavado en carbendazim al 0.5%, y D. Lavado en sulfato de cobre al 0.24%.

A partir de este momento se trabajó en una cabina de flujo laminar horizontal, esterilizada previamente con luz ultravioleta por 20 minutos. Se realizó un lavado de las yemas con agua destilada estéril durante 5 minutos. Después se sumergieron los explantes en una solución de etanol al 70% durante 5 minutos y se realizó un lavado con agua destilada estéril.

Como siguiente paso se realizó una desinfección con hipoclorito de sodio, planteando un diseño experimental factorial con diferentes concentraciones (1,5 a 2,5 %) y tiempos de inmersión (15 y 20 minutos). En las soluciones de hipoclorito de sodio se adicionó tween 20 al 0,02% para potenciar su efecto, como recomienda Thepsamran, Thepsitar y Thongpukdee (2006). Luego se realizó un lavado con agua destilada estéril por 5 minutos y se procedió al corte de las partes del explante afectadas por la desinfección anterior. Se realizó un segundo lavado en agua destilada estéril de los explantes y se sembraron uno en cada frasco con 30 mL de medio de cultivo. El siguiente factor del arreglo experimental fue la ausencia o presencia de un lavado sin enjuague en una solución de ampicilina (2 mg L^{-1}) previo a la siembra. Todos los tratamientos de desinfección se establecieron en un factorial 2X2X2 más un adicional que incluyó una concentración fuerte de hipoclorito de sodio. Todos los tratamientos se muestran en la tabla 2.10.

Tabla 2.10 Diferentes tratamientos aplicados para la desinfección de yemas apicales de piñón colectadas de plantas de campo.

Tratamientos	Hipoclorito de sodio (%)	Tiempo de inmersión (min)	Lavado Ampicilina (2 mg L ⁻¹)
C1	2	20	NO
C2	2	20	SI
C3	2	15	NO
C4	2	15	SI
C5	1,5	20	NO
C6	1,5	20	SI
C7	1,5	15	NO
C8	1,5	15	SI
C9 adicional	2,5	15	NO

El medio nutritivo utilizado para la siembra de los explantes desinfectados fue el medio MS (Anexo A), suplementado con 30 g L⁻¹ de azúcar, 5,8 g L⁻¹ de agar, ajustado a pH 5,7 y sin reguladores de crecimiento.

Repeticiones: 30

Unidad experimental: yema apical de piñón sembrada en frasco de vidrio con 30 mL de medio de cultivo.

Variables evaluadas:

Contaminación bacteriana: la presencia de colonias bacterianas en el medio de cultivo se evaluó con uno (1) y la no contaminación con cero (0).

Contaminación fúngica: la presencia de contaminación por hongos en el medio de cultivo se evaluó con uno (1) y la no contaminación con cero (0).

Viabilidad de la yema: se estableció una escala de cero a cuatro (Tabla 2.11 y figura 2.16), para valorar la respuesta positiva de la yema. Se valoró con cuatro (4) una coloración normal verde y crecimiento inicial de la yema; y el valor de cero (0) se asignó a la presencia de necrosis total del material vegetal.

Tabla 2.11 Escala establecida para evaluar la viabilidad de las yemas de piñón luego de la desinfección.

Viabilidad de la yema	Parámetro
0	Necrosis total
1	25% de coloración verde
2	50% de coloración verde
3	75% de coloración verde
4	100% de coloración verde

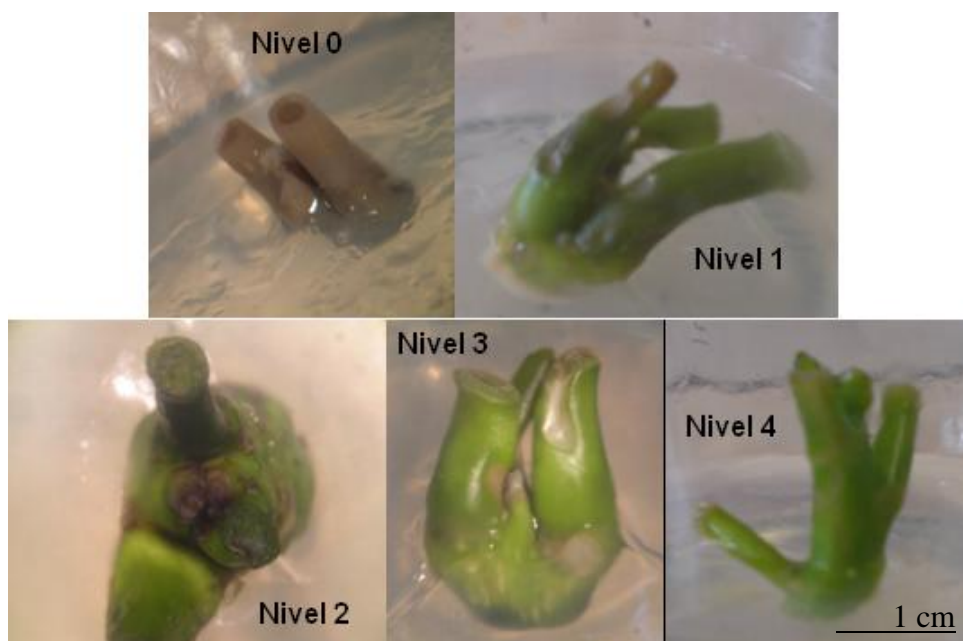


Figura 2.16 Diferentes niveles de viabilidad evaluados en yemas de piñón a las dos semanas de la siembra.

Evaluación: dos semanas después de la siembra

Análisis estadístico: Se empleará un análisis chi cuadrado y un análisis descriptivo de porcentajes para las variables dicotómicas además se realizará un análisis de varianza (ADEVA) para las variables evaluadas.

2.3.2.2 Desinfección de yemas a partir de estacas en invernadero

Las estacas cortadas de plantas adultas de piñón fueron aclimatadas en el invernadero del laboratorio de Cultivo de Tejidos de la carrera de ingeniería en Biotecnología de la ESPE, ubicado en Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, de coordenadas 0° 18,81 S; 78° 26,64 O;

altitud: 2516 msnm (Figura 2.17). Se realizaron riegos periódicos, aplicaciones foliares con una solución de brasinólida (1 mg L^{-1}) y fumigaciones con dos fungicidas, el uno de principio activo carbendazim al 0,5% el otro de principio activo sulfato de cobre pentahidratado al 0,24% durante dos semanas.

Cuando se obtuvo el brote de yemas de aproximadamente cuatro centímetros de longitud se procedió al corte y desinfección aplicando el tratamiento que mostró los mejores resultados en el ensayo anterior.

Las variables evaluadas fueron las mismas que en el experimento anterior y se realizaron 30 repeticiones para este procedimiento. Se compararon ambos resultados mediante un ADEVA donde se estableció el mejor método de introducción y establecimiento *in vitro* del material vegetal.

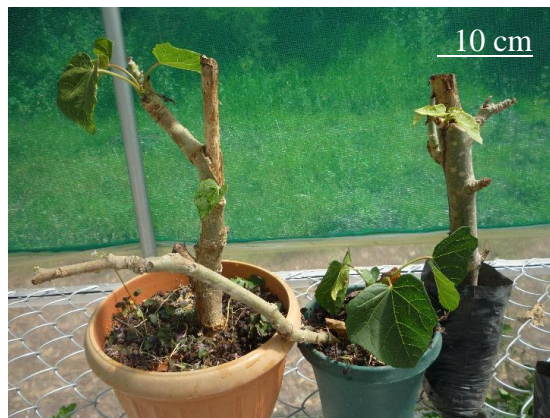


Figura 2.17 Estacas de piñón aclimatadas en invernadero (ESPE – Sangolquí, 2009).

2.3.3 Fase de inducción de brotes

2.3.3.1 Evaluación del uso de BAP y AIB

Luego de la estandarización del método de desinfección se procedió a evaluar el mejor medio nutritivo para el desarrollo de los brotes apicales. El medio de cultivo utilizado fue el medio MS, suplementado con 30 g L^{-1} de azúcar, $6,3 \text{ g L}^{-1}$ de agar y pH ajustado a 5,7.

Shrivastava y Banerjee (2008) en su trabajo sobre la multiplicación *in vitro* de piñón, demostraron que el uso de aditivos, mejora el desarrollo de las

yemas y obtuvieron un incremento a 10 brotes por explante y una longitud de 12 centímetros, comparado con los medios que no se trataron con aditivos (6,5 brotes y 7,5 cm. de longitud). Por este motivo se suplementó a todos los tratamientos, sulfato de adenina (25 mg L⁻¹), L – glutamina (50 mg L⁻¹) y ácido cítrico (25 mg L⁻¹).

Se planteó un diseño experimental para determinar el balance adecuado en el medio, entre citoquininas y auxinas. Se utilizó bencilaminopurina (BAP) (0,5 – 4 mg L⁻¹) como citoquinina y ácido indol butírico (AIB) (0 – 0,5 mg L⁻¹) como auxina, ya que han presentado los mejores resultados en la micropropagación de piñón con respecto a otra citoquininas y auxinas evaluadas (Rajore & Batra, 2005; Datta *et al*, 2007; Shrivastava & Banerjee, 2008). En total, los tratamientos empleados en el DCA fueron 13 y se utilizó un control sin reguladores de crecimiento (Tabla 2.12).

Las condiciones ambientales de cultivo fueron: 25 ± 1 °C de temperatura, 60 ± 2 % de humedad, intensidad lumínica de 2100 – 2400 lux y un fotoperiodo de 14 horas.

Tabla 2.12 Diferentes tratamientos utilizados en la inducción y desarrollo de brotes a partir de yemas apicales de piñón.

Tratamientos	BAP (mg L ⁻¹)	AIB (mg L ⁻¹)
I1	4	0
I2	4	0,5
I3	4	1
I4	3	0
I5	3	0,1
I6	3	1
I7	2	0
I8	2	0,1
I9	2	1
I10	1	0,1
I11	1	0,5
I12	0,5	0
I13	0,5	0,1
I14 (control)	0	0

Repeticiones: 15

Unidad experimental: una yema apical sembrada en un frasco de vidrio con 30 mL de medio de cultivo

Variables evaluadas:

Inducción de brote: se evaluó el desarrollo de la yema apical, asignando el valor de uno (1) a la yema que presentó el crecimiento de brote; y el valor de cero (0) a la ausencia de crecimiento del brote (Figura 2.18).

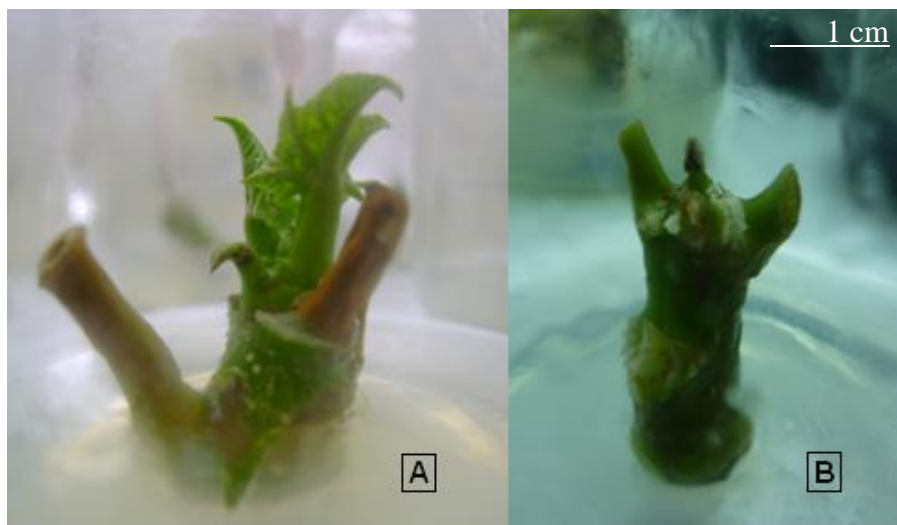


Figura 2.18 Inducción de brote en yemas de piñón a las tres semanas de la siembra.

A. Presencia de brote; B. Ausencia de brote.

Inducción de callo: debido a que la citoquinina BAP en concentración moderada, induce la formación de callo en el tejido vegetal de *Jatropha curcas* (Soomro & Asma, 2007), se decidió evaluar la variable de formación de callo, se valoró con uno (1) la formación callosa y con cero (0) la ausencia de callo (Figura 2.19).

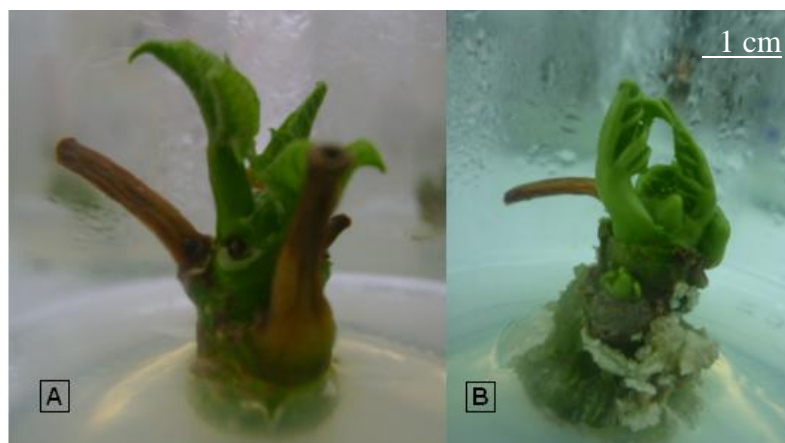


Figura 2.19 Inducción de brotes en yemas de piñón a las tres semanas de la siembra.

A. Ausencia de callo; B. Presencia de callo.

Evaluación: tres semanas después de la siembra

Análisis estadístico: se empleará un análisis descriptivo de porcentajes y pruebas de chi cuadrado para las variables dicotómicas.

2.3.3.2 Evaluación del uso de brasinolida en la inducción de brotes

Luego de la determinación del medio nutritivo con el balance ideal de citoquininas y auxinas para la inducción de brotes, se realizó un segundo ensayo experimental adicionando brasinolida ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) como regulador de crecimiento, con el objetivo de obtener brotes en menor tiempo y de mayor longitud. Se conoce que la brasinolida actúa de forma sinérgica con las citoquininas auxinas, potenciando su asimilación por parte de la planta (Rossi, 2005).

Los tratamientos se plantearon en un diseño experimental que incluye cuatro de los mejores tratamientos encontrados para la inducción de brotes en el ensayo anterior y se resumen en la tabla 2.13.

Tabla 2.13 Evaluación del uso de brasinolida en los tratamientos para la inducción de brotes en yemas de piñón.

Tratamiento	BAP mg L ⁻¹	AIB mg L ⁻¹	Brasinolida mg L ⁻¹
B1	0,5	0	0,5
B2	0,5	0,1	0,5
B3	1	0,1	0,5
B4	1	0,5	0,5

Repeticiones: 10

Unidad experimental: una yema apical sembrada en un frasco de vidrio con 30 mL de medio de cultivo

Variables evaluadas:

Número de brotes: se contabilizó el número de brotes inducidos en el explante sembrado (iguales o mayores a 0,5 cm), tomando en cuenta que brote es el conjunto de dos o más hojas que crecen a partir de una estructura meristemática.

Longitud del brote: se midió la longitud del brote inducido en el meristemo apical del explante sembrado con la ayuda de un micrómetro. La medición se la hizo en este brote puesto que es el que mayor longitud va a tener.

Formación de callo: se evaluó la formación de callo en los explantes sembrados. Se estableció un escala de cero a tres (Figura 2.20 y tabla 2.14), asignando el valor de cero (0) a la ausencia de callo, y el valor de tres (3) a una formación abundante de callo.

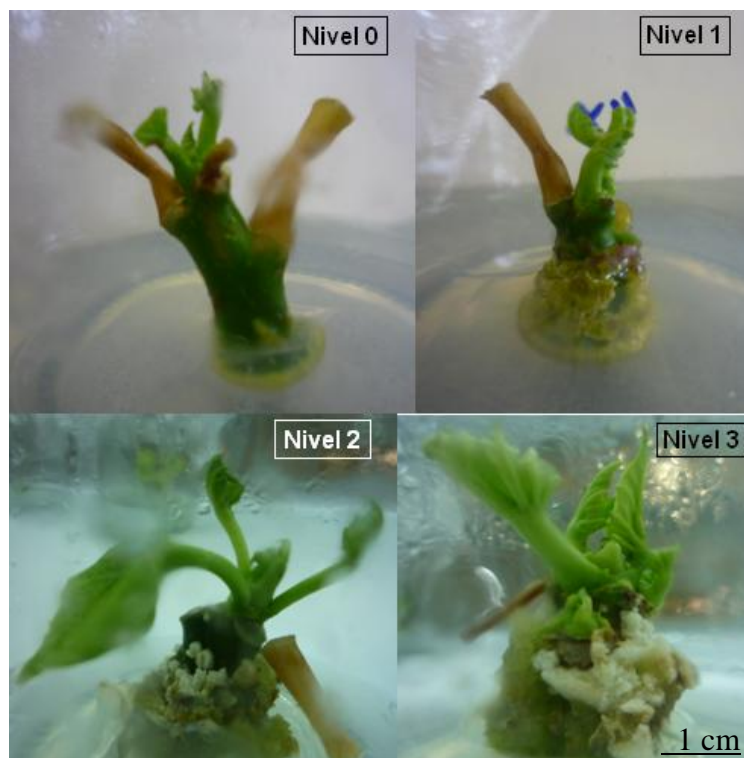


Figura 2.20 Diferentes niveles de callo evaluados en tratamientos de inducción de brotes con el uso de brasinolida.

Tabla 2.14 Escala establecida para evaluar la formación de callo en yemas de piñón.

Formación de callo	Parámetro
0	Ausencia de callo
1	Callo pequeño
2	Callo mediano
3	Callo abundante

Evaluación: tres semanas después de la siembra

Análisis estadístico: se empleará un ADEVA con los datos del diseño experimental (DCA) y la comparación entre tratamientos mediante la prueba de Tukey al 5%.

2.3.4 Fase de multiplicación de brotes

Los brotes obtenidos a partir de la fase de inducción, que presentaron una longitud mínima de 2 centímetros, fueron trasplantados a nuevos medios de cultivo, para evaluar la inducción de múltiples brotes.

Se planteó un diseño experimental en un DCA con la utilización de ocho tratamientos que incluyen la adición de reguladores de crecimiento en concentraciones ya evaluadas en otras investigaciones (Tratamientos M1, M3 y M8) (Rajore y Batra, 2005; Kalimuthu, Paulsamy, Senthilkumar & Sathya, 2007), para compararlas con nuevos tratamientos propuestos y evaluar su efectividad (Tabla 2.15).

Como recomiendan Datta y colaboradores (2007), se redujo la concentración de sulfato de adenina de 25 a 20 mg L⁻¹, L-glutamina de 50 a 15 mg L⁻¹ y la concentración de ácido cítrico fue la misma utilizada anteriormente, de 25 mg L⁻¹.

Tabla 2.15 Tratamientos evaluados para la multiplicación de brotes en yemas inducidas de piñón.

Tratamiento	BAP (mg L ⁻¹)	AIB (mg L ⁻¹)	GA ₃ (mg L ⁻¹)	Kinetina (mg L ⁻¹)	Brasinolida (mg L ⁻¹)
M1	2	0,5	0	0	0
M2	2	0,5	0,5	0	0
M3	2	1	0	0	0
M4	2	1	0,5	0	0
M5	1	0,5	0	0	1
M6	1	0,1	2	0	0,5
M7	0,5	0,1	0	0	1
M8	1	0,25	0,25	0,5	0

Un aspecto importante en la fase de multiplicación de brotes es la dominancia apical que presentan los explantes, es decir su capacidad de crecer longitudinalmente. Al inhibir esta característica se está fomentando al desarrollo de brotes adventicios (Soto, 2007). Por esta razón también se evaluó esta variable, que se evidencia cuando el brote que se encuentra en la parte superior del explante empieza a necrosarse y sus hojas se debilitan y caen mientras el resto de brotes adventicios adquieren mayor longitud y vigor.

Repeticiones: 10

Unidad experimental: un brote obtenido de la fase de inducción, separado de su explante inicial y sembrado en un frasco de vidrio con 30 mL de medio de cultivo

Variables evaluadas:

Número de brotes: se contabilizó el número de brotes inducidos en el explante sembrado (iguales o mayores a 0,5 cm).

Formación de callo: se evaluó la formación de callo en los explantes sembrados. Se estableció un escala de cero a tres (Tabla 2.14), asignando el valor de cero (0) la ausencia de callo, y el valor de tres (3) a una formación abundante de callo.

Rompimiento de dominancia apical: se evaluó el rompimiento de dominancia apical presente en los explantes. Se asignó el valor de uno (1) cuando el brote apical presentó necrosis, y el valor de cero (0) cuando el brote apical creció normalmente.

Evaluación: tres semanas después de la siembra

Análisis estadístico: Se empleará un análisis chi cuadrado y un análisis descriptivo de porcentajes para las variables dicotómicas y un ADEVA con los datos del diseño experimental (DCA) para la comparación entre tratamientos mediante la prueba de Tukey al 5%.

Programa estadístico

Se empleará el programa estadístico SPSS 15.0 para el análisis de todos los datos.