

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Cultivo de embriones

4.1.1 Desinfección y viabilidad

El análisis realizado para la variable de desinfección bacteriana en embriones de piñón, muestra que porcentajes bajos de hipoclorito de sodio (NaClO) (0,3 y 0,4%) combinados con tiempos de inmersión prolongados (5 a 15 horas), favorecen tanto en la descontaminación de los embriones como en la viabilidad de los mismos. Además, una concentración mayor de hipoclorito de sodio, a pesar de presentar altos índices de descontaminación, produce un efecto negativo en la viabilidad de los explantes.

En el trabajo realizado por Nunes (2007), donde la desinfección de las semillas de piñón se llevó a cabo con etanol al 70% por 30 segundos e hipoclorito de sodio al 1% por 15 minutos, no se presenta el porcentaje de contaminación encontrada ni la viabilidad posterior de las mismas, aunque se menciona que obtuvo un 40% de plantas consideradas como normales (con desarrollo vertical del eje embrionario y hojas cotiledonares verdes y separadas); además esta desinfección incluye el uso de etanol, que para fines comerciales en términos de propagación masiva resultaría en costos altos de producción. Otro trabajo similar (López, Peñate, Daquinta, Pina, y Escalona, 2007), en donde se utilizó una concentración de 0,5% de hipoclorito de calcio por 5, 10 y 15 minutos, no se logró obtener resultados alentadores (45% de contaminación), aunque el 70% de semillas germinaron. Cabe resaltar que en este último trabajo no se realizó la remoción del endospermo previo a la siembra *in vitro* de las semillas. Santos y colaboradores (2003) recomiendan también el uso de etanol al 50% por un minuto e hipoclorito de sodio al 1% por 15 minutos, aunque este procedimiento se utilizó en *Jatropha podagrica*, obteniendo un 66% de germinación.

Se estableció que el mejor tratamiento de desinfección bacteriana resultó ser la combinación de 0,2% de hipoclorito de sodio por cinco horas, ya que produce un 20% de contaminación bacteriana y un 95% de viabilidad (embriones germinados y con crecimiento vertical normal) (Tablas 3.2 y 3.12), que fue la variable evaluada más importante en esta fase, debido a que en lo posterior se podrá obtener una mayor cantidad de embriones totalmente desarrollados.

Con respecto a la contaminación fúngica, mediante el análisis estadístico, se pudo determinar que los tratamientos de desinfección no influyen en la descontaminación de este agente. Además, se encontró que el tratamiento con fungicidas previo a la utilización de hipoclorito de sodio, como lo recomiendan Deore & Sudhakar (2008), resulta en una buena descontaminación fúngica, ya que no se obtuvieron porcentajes altos de contaminación con hongos en ninguno de los tratamientos utilizados (2,5%).

En la presente tesis, se obvió el uso de cloruro de mercurio en la desinfección, ya que su uso acarrea problemas de manipulación y desecho debido a su naturaleza tóxica, aunque este agente ha sido utilizado ampliamente en varios estudios de cultivo *in vitro* en piñón (Li M., Li H., Jiang, Pan y Wu, 2007; Ndiaye *et al*, 2006; Deore & Sudhakar, 2008).

En lo que respecta a la prueba de viabilidad realizada mediante la tinción con cloruro de trifetil tetrazolio (TZ), se encontró que los tratamientos de desinfección, y hasta los más agresivos, no afectan en mayor forma la viabilidad de los embriones de acuerdo a las tinciones obtenidas; aunque morfológicamente no se puede establecer el efecto que tiene el hipoclorito de sodio en su posterior desarrollo. Como se observó en los resultados, no se obtuvieron embriones con poca viabilidad de acuerdo a la tinción, aunque de acuerdo a la escala propuesta, sí se obtuvieron embriones de nivel tres (75% teñidos), los cuales son embriones que tienen buenas características de viabilidad según el trabajo de Patil & Dadlani (1993) en semillas de soya; aunque no se puede asegurar que en piñón, embriones de este nivel no sean

afectados por el agente desinfectante, ya que éste es el primer estudio en esta especie.

En la presente investigación se evidenció que la contaminación bacteriana y fúngica afectan la viabilidad y el desarrollo natural del embrión, retrasándolo y en la mayoría de las veces deteniéndolo por completo, como también lo mencionan Argollo y Campos (2007).

4.1.2 Tratamientos pregerminativos

La utilización de tratamientos pregerminativos en semillas y embriones de especies leñosas y semi leñosas es muy importante para su posterior desarrollo, y más aún en cultivo in vitro, ya que de esto dependerá el rompimiento de la dormancia externa e interna en las semillas (Learning Curve, 2007, p. 174 - 176). Además es muy conocida la acción del ácido giberélico como un factor esencial en este proceso (Azcón y Talón, 2000).

Para activar la imbibición en las semillas escarificadas de piñón, se realizó un remojo por 24 horas, proceso recomendado en diversos trabajos (Argollo y Campos, 2007; Deore & Sudhakar, 2008; Feike *et al.*, 2008). Además, Santos y colaboradores (2003) en su trabajo con embriones de *Jatropha podagrica* mencionan que esta especie posee en su semilla la cantidad endógena suficiente de ácido giberélico, siendo innecesaria la adición exógena del mismo. Por esta razón se realizó el remojo de las semillas solo en agua; aunque también se utilizó ácido giberélico (2 mg L^{-1}) como prueba preliminar, obteniendo resultados similares en ambos casos.

Aparte del proceso de imbibición, la exposición del embrión a la luz es esencial en su desarrollo, ya que los embriones desprovistos de su cubierta protectora, y por su misma naturaleza de estructura muy delgada, son muy sensibles a un cambio brusco de medio. Como se pudo observar en los resultados una exposición temprana a la luz no favorece un buen desarrollo, ya que hasta el momento de la siembra los embriones se encontraban en total oscuridad dentro de la semilla. Por otro lado una exposición tardía tampoco

induce un desarrollo normal de los embriones (48 horas luego de la siembra). Por esta razón, el tiempo recomendado para la exposición a la luz luego de la siembra es el de 24 horas, ya que con esto se logra que el 93,33% de los embriones sean viables. Un procedimiento similar fue utilizado por Kalimuthu y colaboradores (2007) en la inducción de embriogénesis somática en embriones de piñón.

4.1.3 Evaluación del desarrollo embrionario

Se establecieron las mejores concentraciones de nutrientes y reguladores de crecimiento, evaluando sus efectos en el desarrollo embrionario de piñón.

4.1.3.1 Evaluación de nutrientes y carbón activado

La evaluación embrionaria se realizó tomando en cuenta distintos factores como germinación y desarrollo inicial de los embriones, desarrollo del sistema radical, y desarrollo apical y foliar.

4.1.3.1.1 Germinación y desarrollo inicial

El buen uso de nutrientes en el medio de cultivo, facilitó el desarrollo embrionario; además de acuerdo a las necesidades y objetivos de una investigación se pueden establecer parámetros y rangos de concentraciones adecuados. En esta evaluación se utilizó azúcar (sacarosa), como fuente de carbono, y agua de coco, como fuente de aminoácidos; nutrientes esenciales que según la bibliografía son los complementos más influyentes en la germinación y desarrollo de semillas (Pierik, 1990; Evans *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2008). Además el uso de carbón activado facilitó la inducción, desarrollo y elongación de raíces debido al oscurecimiento del medio (etiología), lo cual simuló un medio terrestre.

Durante la evaluación del desarrollo embrionario de *Jatropha curcas* se pudo realizar observaciones en cada etapa de crecimiento, así, se verificó que

el eje embrionario (hipocótilo y radícula), es el primero en desarrollarse, luego el embrión empieza a hacer funcionar el mecanismo para volverse fotosintético, hasta volverse completamente verde. En todo este periodo se observó un crecimiento acelerado del eje embrionario y los cotiledones, estos últimos alcanzan un tamaño de 10 a 15 veces mayor a su tamaño original. Estas observaciones se complementan con las realizadas por Nunes y colaboradores (2009) en su estudio de morfología externa de frutos, semillas y plántulas de piñón.

Las variables evaluadas fueron fuente de mucha información en el desarrollo primario de las plantas de piñón a partir de semillas. Donde, el desarrollo del eje embrionario fue evaluado con respecto al tiempo en que se demoró en aparecer el hipocótilo y la radícula; y se encontró que, la interacción entre agua de coco, azúcar y carbón activado que presentó el desarrollo más temprano fue en el tratamiento E4, el mismo que contiene una concentración baja de agua de coco (50 mL L^{-1}) y concentraciones altas de carbón activado y azúcar (2 y 60 g L^{-1}). Cabe resaltar que los demás tratamientos fueron diferentes entre sí, y sólo el tratamiento mencionado resultó ser diferente.

En cuanto al tiempo en que los embriones se volvieron completamente verdes, en el uso del agua de coco, concentraciones altas no favorecieron la obtención de embriones completamente verdes. Además el uso de 30 g L^{-1} de azúcar induce a que los embriones se vuelvan completamente verdes a los 5,73 días. La interacción entre estos dos factores (agua de coco y azúcar), demostró resultados similares; y lo mismo se observó con los resultados en la evaluación de las interacciones entre agua de coco, carbón activado y azúcar, donde la concentración de carbón activado no influyó significativamente en los resultados. Cabe resaltar que el tratamiento adicional mostró ser estadísticamente diferente al obtener embriones completamente verdes en un menor tiempo (4,6 días), lo cual indica que para esta variable no sería necesaria la adición de agua de coco. Este tratamiento podría ser utilizado si el objetivo fuera obtener material vegetal para una transformación bacteriana como lo explican Li y colaboradores (2007) en su trabajo donde introdujeron genes específicos en piñón por medio de la bacteria *Agrobacterium*

tumefaciens. Aunque para esto es necesaria la presencia de callo, la cual se discutirá más adelante.

De acuerdo a los resultados, el uso de concentraciones bajas de agua de coco y azúcar (50 mL L^{-1} y 30 g L^{-1} respectivamente) analizadas separadamente, favorecen el desarrollo de áreas foliares más grandes; una concentración de 150 mL L^{-1} de agua de coco y 60 g L^{-1} no permiten que los cotiledones se desarrollen de una mejor manera. Esto mismo se complementa con la evaluación de la interacción agua de coco * azúcar. Según Rodrigues y colaboradores, valores elevados de sacarosa pueden inhibir la síntesis de clorofila en las especies cultivadas (Citado por Nunes *et al.*, 2008, p. 12).

A pesar de que las concentraciones de carbón activado no resultaron diferentes estadísticamente, la interacción agua de coco * carbón activado, presentó un mayor crecimiento de áreas foliares en tratamientos que incluyeron concentraciones de 50 y 100 mL L^{-1} agua de coco y 1 g L^{-1} de carbón activado. Con respecto a la interacción carbón activado * azúcar se puede verificar que concentraciones altas de estos dos nutrientes producen áreas foliares de menor tamaño.

En el análisis de la interacción de los tres factores, concentraciones menores inducen mayores áreas foliares, y concentraciones altas promueven lo contrario. Aunque el mejor tratamiento resultó ser el E7, que contiene 100 mL L^{-1} de agua de coco, 1 g L^{-1} de carbón activado y 60 g L^{-1} de azúcar, pero se encuentra en el mismo grupo estadístico que los mejores tratamientos mencionados.

Además se observó que el tratamiento control, es decir el que no contiene agua de coco ni carbón activado, promueve áreas foliares más grandes; aparentemente el uso de carbón activado retrasa ligeramente el desarrollo cotiledonar, ya que como se revisará posteriormente, este factor favorece el crecimiento radicular; es decir, que la planta utiliza mayor cantidad de energía en producir raíces que en desarrollar los cotiledones.

De acuerdo a Nunes y colaboradores (2008); los embriones maduros de piñón, extraídos de frutos secos, no necesitan de concentraciones altas de nutrientes como azúcar (sacarosa) y carbón activado, ya que en este estado de maduración, el embrión también aprovecha las reservas nutricionales de los cotiledones. Esto se corrobora con los resultados obtenidos, ya que las mejores respuestas fueron encontradas con concentraciones bajas de los nutrientes citados.

En la longitud del tallo evaluada a los 30 días de la siembra, resultó que la utilización de 30 g L^{-1} de azúcar implica tallos de mayor longitud. Spera encontró resultados similares también con el uso de 30 g L^{-1} de azúcar en embriones de *Jatropha podagrica* (Citado por Nunes *et al.*, 2008, p. 12); aunque estas observaciones difieren con los resultados obtenidos por Nunes y colaboradores (2008) en *Jatropha curcas*, donde diferentes concentraciones de sacarosa fueron evaluadas, y se encontró que el aumento en la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, proporciona un crecimiento lineal en la longitud de la parte aérea de la planta. Además la interacción de este factor con agua de coco indica que una concentración menor de azúcar, sin importar la concentración de agua de coco, favorece el crecimiento de los tallos. Cabe resaltar que el tallo más largo se encontró con una concentración de 150 mL L^{-1} , es decir el efecto contrario de lo que produce en el área foliar cotiledonar, lo cual nos hace pensar, que un embrión con un tallo más largo tendrá áreas foliares más pequeñas, y viceversa; posiblemente esta relación se deba a que la planta utiliza una mayor cantidad de energía en el desarrollo de una de sus estructuras, y deja relegada a la otra, para su posterior desarrollo.

Con respecto a la interacción agua de coco * carbón activado, no se encontró una tendencia muy clara con respecto a las concentraciones, aunque 150 mL L^{-1} de agua de coco y 1 g L^{-1} de carbón activado presentan un tallo de mayor longitud. En relación a la interacción carbón activado * azúcar se observó que tampoco existe una tendencia clara, y el mejor tratamiento resultó contener las concentraciones más bajas de los factores mencionados, obteniendo un tallo de 4,053 centímetros, aunque se obtuvo un resultado estadísticamente igual con concentraciones altas (3,363 centímetros).

En lo que respecta a la interacción de los tres factores, el que mejor resultado mostró fue el tratamiento E9, el mismo que contiene 150 mL L⁻¹ de agua de coco, 1 g L⁻¹ de carbón activado y 30 g L⁻¹ de azúcar, y donde se obtiene tallos de 5,55 cm de longitud en promedio. Este valor es muy superior al encontrado por Nunes y colaboradores (2008), los cuales obtuvieron tallos de 2,65 centímetros en plántulas de embriones germinados a partir de frutos secos, en el mismo tiempo de evaluación (30 días).

4.1.3.1.2 Desarrollo del sistema radical

El desarrollo del sistema radicular se evaluó de acuerdo al tiempo en que empezaron a desarrollarse las raíces; los resultados mostraron que separadamente los factores agua de coco (50 mL L⁻¹) y carbón activado (2 g L⁻¹), obtienen raíces en un tiempo más corto; aunque no se observó una tendencia clara con estos datos.

En lo que respecta al análisis de la interacción agua de coco * azúcar se encontró que concentraciones bajas de agua de coco favorecen el desarrollo temprano de raíces, aunque no se encontró una relación clara con respecto al azúcar; y en lo que se refiere a la interacción carbón activado * azúcar se puede decir que el tratamiento que tardó más en formar raíces contiene una concentración elevada de azúcar (60 g L⁻¹) y 1 g L⁻¹ de carbón activado.

En cuanto a la longitud del sistema radicular, donde se utilizó una escala de uno a cuatro, el uso de carbón activado determinó que la utilización de 1 g L⁻¹ favorece un sistema radicular de mayor longitud. Aunque el uso de 2 g L⁻¹ resulta en la formación de raíces en un tiempo menor, no obstante, estos datos difieren de los encontrados por Nunes y colaboradores (2008), los cuales obtuvieron raíces más largas con una concentración de 2 g L⁻¹.

Por otro lado la interacción agua de coco * azúcar demostró que la utilización de 50 mL L⁻¹ de agua de coco y 60 g L⁻¹ de azúcar producen raíces más largas. Estos resultados están de acuerdo a los observados por Nunes y

colaboradores (2008), quienes obtuvieron un mayor número de raíces con el aumento en la concentración de azúcar en el medio de cultivo, hasta una concentración máxima de 60 g L^{-1} , independientemente del estado de maduración del embrión.

En evaluación de las interacciones entre los tres factores, el tratamiento E9 produce raíces de nivel 3,8; aunque en su composición contiene concentraciones bajas de carbón activado y azúcar, pero concentración alta de agua de coco (150 mL L^{-1}).

Con respecto al tratamiento adicional, debido a la ausencia de carbón activado, se determinó éste que produce raíces mucho más cortas que el resto de tratamientos del arreglo factorial, donde hubo presencia de este aditivo. Esto se complementa con el trabajo realizado por Nunes y colaboradores (2008), quienes determinaron que el uso de carbón activado es muy importante, ya que físicamente, simula una condición de oscuridad, en la que las raíces se desarrollan de mejor manera debido a la reducción de incidencia de luz en la zona de crecimiento activo del sistema radicular.

Si el objetivo de la investigación fuera obtener plantas completas para el traspaso posterior al campo mediante procesos de aclimatación, se elegiría un tratamiento que produzca raíces largas, las que permitirían una mejor adaptación al sustrato terrestre; esto sin importar que se obtengan áreas foliares ligeramente más pequeñas, ya que cuando se habla de aclimatación las hojas obtenidas *in vitro* no aportan en mucho a la resistencia de la planta a su nuevo ambiente porque no poseen estomas funcionales, y son las nuevas hojas las que permiten el desarrollo de la planta (Castillo, 2004).

Los datos mostrados hasta el momento están de acuerdo a los mostrados por Nunes y colaboradores (2008), ya que afirman que el proceso de germinación para los embriones de piñón (de frutos maduros y secos) ocurre en razón de las reservas nutricionales de los cotiledones y de las fuentes nutricionales presentes en el medio de cultivo, actuando independientemente del suministro de sacarosa.

4.1.3.1.3 Desarrollo apical y foliar

Siguiendo con el desarrollo normal de las plántulas de piñón, la siguiente estructura que se diferenció es la yema apical, es decir la separación de las dos hojas cotiledonares que dan cabida al apareamiento del meristemo apical. A partir de este momento no se evidenció el crecimiento de las hojas cotiledonares, sino un desarrollo longitudinal de la nueva planta y de sus raíces.

Los resultados muestran que el apareamiento de la yema apical se da tempranamente con la adición de 50 mL L⁻¹ agua de coco. A una mayor concentración, también es mayor el tiempo que se demora en aparecer esta estructura. Para la interacción agua de coco * azúcar, se pudo observar el apareamiento temprano de la yema apical a los 8,75 días con el tratamiento de 50 mL L⁻¹ de agua de coco y 60 g L⁻¹ de azúcar, aunque concentraciones menores de azúcar también resultaron en un desarrollo temprano de la yema (11,2 a 12,6 días), pero se ubicaron en otro grupo estadístico.

Para el apareamiento de las cuatro primeras hojas no cotiledonares, los resultados muestran que concentraciones bajas de agua de coco (50 mL L⁻¹) inducen el desarrollo de estas hojas, y a medida que se aumenta la concentración, mayor es el tiempo que toma la planta en desarrollar estos órganos. Al hablar del suministro de sacarosa en el medio, el uso de 30 g L⁻¹ azúcar obtuvo respuestas diferentes solamente para la tercera y cuarta hoja, favoreciendo su desarrollo temprano. Además la interacción agua de coco * azúcar demostró que 50 mL L⁻¹ de agua de coco y 30 - 60 g L⁻¹ de azúcar presentan el desarrollo más temprano de las hojas.

Con respecto al carbón activado, hasta el apareamiento de la tercera hoja no se pudo establecer una tendencia específica, no obstante una concentración de 1 g L⁻¹ favoreció el desarrollo temprano de la cuarta hoja (31,32 días). Aunque la interacción de 1 g L⁻¹ de carbón activado y 50 mL L⁻¹ de agua de coco favoreció la obtención de todas las hojas en el menor tiempo.

En general los tratamientos con concentraciones bajas de los suplementos utilizados en este ensayo favorecieron un desarrollo temprano de las semillas de piñón. Los mejores resultados se encontraron con los tratamientos estadísticamente iguales E2, E3 y E5 (obtención de la cuarta hoja de 28,3 a 29,7 días).

4.1.3.2 Evaluación de reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento que se evaluaron fueron BAP, AIB, GA₃, y brasinolida, solos y en combinación. Al igual que en el ensayo anterior, se evaluaron diferentes aspectos que involucran el desarrollo primario de los embriones de piñón.

4.1.3.2.1 Germinación y desarrollo inicial

Se empezó evaluando el desarrollo inicial del eje embrionario, donde se encontró que el uso de AIB en el medio de cultivo promueve un desarrollo temprano de esta estructura, y lo hace de mejor manera en concentraciones bajas (0,1 mg L⁻¹ en 2,3 días). Y la ausencia de este regulador retrasa el desarrollo inicial del eje embrionario (4,9 días).

Con respecto al uso de ácido giberélico se pudo observar que altas concentraciones de este regulador promueven un desarrollo temprano del eje embrionario. El tiempo más corto fue de 2,11 días y se obtuvo con la concentración de 2 mg L⁻¹ de ácido giberélico. En lo que se refiere a la brasinolida utilizada en el medio, se pudo observar que su uso favorece el desarrollo del eje embrionario, y la ausencia de este aditivo retarda su crecimiento. Resultados similares fueron obtenidos por Gregory & Mandava en plántulas jóvenes de frijol, ya que el uso de brasinolida resultó en una mayor elongación del epicótilo (mayor al 100% que el caso control) (Citado por Rossi, 2005, p. 63).

En el estudio de los tratamientos con la combinación de reguladores de crecimiento, se estableció que el tratamiento dos, que contiene

concentraciones bajas de BAP, AIB y GA₃; y una concentración alta de brasinolida indujo en un menor tiempo el desarrollo del eje embrionario. Por otro lado el tratamiento uno, que no contiene BAP y tiene una concentración alta de ácido giberélico, retrasó el desarrollo de esta estructura.

En la obtención de embriones completamente verdes se encontró que concentraciones bajas de AIB favorecen la obtención temprana de embriones con esta característica. Esta misma tendencia se pudo observar con el uso de ácido giberélico. En lo que respecta a la brasinolida utilizada, una concentración de 1 mg L⁻¹ favorece la obtención de embriones verdes a los 4,55 días. Además el análisis de los tratamientos en el DCA mostró que con el tratamiento R6, resultan embriones completamente verdes en un menor tiempo (4,1 días), y con el control (sin reguladores) se obtienen embriones verdes en el tiempo más prolongado.

En la evaluación del área foliar cotiledonar se pudo establecer que el regulador BAP en bajas concentraciones (0,5 mg L⁻¹), favorecen el crecimiento de áreas foliares más grandes (6,63 cm²). Datos que están de acuerdo a los obtenidos por Kalimuthu y colaboradores (2007), al utilizar distintas concentraciones de BAP (0,5 a 2 mg L⁻¹) para inducir embriogénesis somática en explantes cotiledonares de piñón. En lo que se refiere al uso de AIB se pudo notar que la ausencia de este regulador promueve hojas cotiledonares de mayor tamaño. La utilización de 1 mg L⁻¹ de ácido giberélico resultó ser la concentración que presentó un área foliar más grande, aunque la ausencia de este regulador también presentó hojas cotiledonares grandes, clasificadas en el mismo grupo según la prueba de Tukey. Con respecto al uso de brasinolida, la concentración de 1 mg L⁻¹ presentó un área foliar grande de 6,5 cm².

El tratamiento que presentó mejores resultados fue el tratamiento R1, ya que presentó un área foliar de 4,9 cm², este tratamiento no contiene BAP, y posee AIB y brasinolida en bajas concentraciones.

La siguiente variable en evaluar fue la longitud del tallo, donde se obtuvieron los tallos más grandes en ausencia del regulador BAP, sin encontrarse una tendencia clara cuando se utilizó varias concentraciones de

este regulador. En concentraciones bajas de AIB (0 y 0,1 mg L⁻¹) se encontraron los tallos más largos (2,66 y 2,98 cm). Concentraciones altas de ácido giberélico también favorecieron al desarrollo de esta estructura. Como lo afirma Roca y Mroginski (1993), las giberelinas, especialmente el ácido giberélico GA₃, son usadas para la estimulación del crecimiento vegetal, actuando sobre el elongamiento celular. Los resultados mostrados difieren de los encontrados por Santos y colaboradores (2003) en su trabajo con *Jatropha podagrica*, ya que el aumento de GA₃ en el medio, presentó una disminución en la altura de las plantas, este resultado contradictorio puede deberse a diferencias genéticas, ya que se trata de dos especies relacionadas, pero diferentes; además los autores mencionan que *Jatropha podagrica* no necesita de una adición exógena de giberelinas, y probablemente éstas se vuelven tóxicas al sumarse a la cantidad endógena que tiene esta especie. *Jatropha curcas* por su parte si se beneficiaría de una adición exógena de giberelinas.

Además, una concentración baja de brasinolida (0,5 mg L⁻¹) también favoreció tallos de mayor longitud. En la evaluación de esta variable, el mejor tratamiento fue el R2 ya que obtuvo tallos de 3,71 cm de largo, es decir con concentraciones bajas de BAP y AIB, y una concentración alta de brasinolida. Aquí se puede notar el efecto sinérgico que tiene el uso de brasinolida con citoquininas y auxinas como lo afirma Rossi (2005) en su disertación.

4.1.3.2.2 Desarrollo del sistema radical

En lo que respecta al desarrollo del sistema radical, sólo en la ausencia del regulador BAP se pudo encontrar la formación de raíces, la ausencia de AIB también permitió el desarrollo de raíces, aunque una concentración de 0,1 mg L⁻¹ presentó inducción radicular, pero en menor proporción. Los demás tratamientos no indujeron en ninguna manera el sistema radical. Se pudo notar que el uso de concentraciones bajas de brasinolida produce raíces en una mayor cantidad de explantes, a diferencia del uso de concentraciones altas. Como es de pensar, los mejores tratamientos para la inducción del sistema radical fueron los que tienen concentraciones bajas de reguladores de crecimiento, es decir los tratamientos R1 y R2.

En la evaluación de la longitud del sistema radicular, se notó claramente que la ausencia de BAP y AIB en el medio producen raíces más largas; lo mismo sucedió con el uso de brasinolida, por esta razón, los mejores tratamientos para el desarrollo del sistema radical también resultaron ser los tratamientos R1 y R2, los cuales contienen concentraciones bajas de reguladores. Para la utilización de GA₃ no se encontraron grupos distintos según la prueba de Tukey, aunque Santos y colaboradores (2003) en su investigación afirman que el uso de este regulador no favorece la obtención de raíces.

4.1.3.2.3 Desarrollo apical y foliar

En el apareamiento de la yema apical, se demostró que concentraciones bajas de BAP y AIB, inducen su desarrollo en un menor tiempo; cosa contraria se encontró en el análisis del uso de ácido giberélico, donde una concentración alta de este regulador (2 mg L⁻¹) favorece la aparición temprana de la yema apical (8,47 días); estos resultados están de acuerdo a los encontrados por Santos y colaboradores (2003), ya que afirman que el efecto más conocido de las giberelinas *in vitro*, está enfocado en el desarrollo de las parte aéreas de planta.

El uso de brasinolida en el medio de cultivo resultó beneficioso en concentraciones mayores, ya que el desarrollo de la yema ocurre en un menor tiempo. Con respecto a la combinación de reguladores, se pudo constatar que los mejores tratamientos, estadísticamente iguales, fueron el R2 y R5, aunque no se estableció una tendencia clara de acuerdo a las concentraciones de los reguladores utilizados.

Luego de la yema apical, se evaluó el apareamiento de las cuatro primeras hojas no cotiledonares. Una característica importante que se observó, a diferencia del ensayo anterior, donde no se utilizó reguladores de crecimiento, fue el apareamiento de dos hojas en forma simultánea en tratamientos que contenían concentraciones altas de reguladores, y que además tenían la presencia de callo. Por esta razón la obtención de la cuarta

hoja resultó en promedio en un menor tiempo que en los ensayos con agua de coco, azúcar y carbón activado, donde las hojas crecían una a la vez luego de un respectivo tiempo de desarrollo.

De acuerdo a los resultados se observó que concentraciones bajas de BAP ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$) y AIB ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), favorecieron el desarrollo temprano de las cuatro primeras hojas no cotiledonares; además la ausencia de estos reguladores, o concentraciones muy altas produjeron un retraso en su desarrollo. Con respecto al uso de ácido giberélico, se notó que la mejor concentración de este regulador fue 1 mg L^{-1} , ya que indujo el desarrollo de las cuatro primeras hojas de una manera más rápida con respecto a las otras concentraciones utilizadas. El estudio estadístico ubicó las concentraciones de 0, 0,5 y 2 mg L^{-1} , en un grupo estadístico donde se evidenció un retraso en el desarrollo de las hojas.

En lo que se refiere al regulador brasinolida, las concentraciones de 0,5 y 1 mg L^{-1} resultaron ser las mejores en la obtención de la primera hoja no cotiledonar. Para el desarrollo de la segunda hasta la cuarta hoja, la mejor concentración fue de 1 mg L^{-1} .

Con respecto a los tratamientos con combinación de reguladores de crecimiento, se observó que el R3 y R4 fueron los mejores; y los tratamientos dos y siete fueron los que se demoraron más en desarrollar las cuatro primeras hojas en las plántulas de piñón. Los mejores tratamientos mencionados, en general contienen en su composición una concentración de 1 mg L^{-1} de BAP, concentraciones bajas de AIB y contiene 0,5 y 1 mg L^{-1} , de brasinolida; mientras que los tratamientos que no favorecieron al desarrollo de las hojas fueron: el tratamiento R2: concentración baja de BAP y AIB; y tratamiento R7: concentraciones altas de BAP y AIB, y ausencia de brasinolida.

En general, se puede decir que debe existir un correcto equilibrio entre los reguladores de crecimiento, para que la especie vegetal los pueda aprovechar de la mejor manera. También, se estableció que en los tratamientos

donde aparece tempranamente la primera hoja, también se obtendrá la cuarta hoja en un menor tiempo.

4.1.3.2.4 Evaluación de formación callosa

Debido a que en este ensayo se utilizó reguladores de crecimiento, se analizó variables que indican la presencia de formaciones callosas, Lo primero en evaluar fue el grosor del tallo, donde se notó que, mientras mayor es la concentración de BAP, mayor es el contorno de los tallos (de acuerdo a la escala propuesta de uno a tres). Con respecto al uso de AIB, se encontró la misma tendencia; y de acuerdo al uso de ácido giberélico, la tendencia encontrada aparentemente fue inversa; ya que a menores concentraciones, se encontraron tallos más gruesos. Lo mismo sucedió cuando se utilizó brasinólida. Al evaluar los tratamientos con la combinación de reguladores, se obtuvieron tallos más gruesos con concentraciones altas de todos los reguladores, siendo el tratamiento R8 el que presentó los tallos más gruesos (nivel 2,6).

Otra variable evaluada fue la formación de callo, donde se observó que a mayor concentración de BAP utilizada en el medio, los explantes presentaron una mayor formación de callo; la misma tendencia se encontró con el regulador AIB. En lo que respecta al uso de ácido giberélico, concentraciones bajas de este regulador favorecen el crecimiento de callo; lo mismo sucede con el uso de brasinólida. Con estos resultados, se puede afirmar que el uso de ácido giberélico en la obtención de callo puede ser prescindible, estos datos están de acuerdo a los obtenidos por Soomro & Asma (2007) en su trabajo, ya que, no encontraron un buen porcentaje de formación callosa en explantes de piñón, cuando añadieron ácido giberélico en el medio, y los mejores resultados obtuvieron en ausencia de este regulador.

Al igual que la variable anterior, los tratamientos que contienen una mayor concentración de BAP y AIB presentaron los mayores niveles de formación de callo; por lo que se puede deducir que estas dos variables, es decir el grosor del tallo y la formación de callo, están relacionadas entre sí; ya

que al obtener tallos más gruesos hay una mayor probabilidad de que se obtenga una mayor formación de callo. Estos datos están de acuerdo con los obtenidos por Kalimuthu y colaboradores (2007), donde una concentración de 2 mg L⁻¹ de BAP indujo la formación de callo y embriogénesis somática en cotiledones de piñón.

Entonces, se debe aclarar que si el objetivo de la investigación es la obtención de callo, se debe utilizar concentraciones altas de BAP y AIB. Si la inducción es buena, de estos callos formados se puede dar paso a diferentes técnicas de micropropagación *in vitro*, como por ejemplo la inducción de múltiples brotes y organogénesis indirecta como en los trabajos de Deore & Sudhakar (2008) o la inducción de embriogénesis somática (Kalimuthu *et al.*, 2007); este estado del explante también es favorable para la inserción de fragmentos de ADN a través de una infección bacteriana con *Agrobacterium tumefaciens* (Li *et al.*, 2007).

4.2 Micropropagación de yemas apicales adultas de piñón

La micropropagación a partir de yemas apicales de piñón se llevó a cabo a través del análisis de las primeras etapas de cultivo *in vitro* que incluyen las fases de desinfección, inducción y multiplicación de brotes, y que se detallan a continuación.

4.2.1 Desinfección y viabilidad

A partir de la desinfección del material vegetal se logró evaluar la viabilidad resultante en las yemas apicales de piñón, ya que una desinfección muy fuerte, a pesar de que elimine totalmente la contaminación, no facilita la obtención de un alto porcentaje de explantes que se puedan desarrollar en lo posterior.

En la variable de viabilidad analizada, se encontró que la concentración de 1,5% de hipoclorito de sodio produce la mayor cantidad de explantes viables; lo mismo ocurrió cuando se utilizó un tiempo de inmersión de 15 minutos. La mayor cantidad de explantes en estos tratamientos mencionados,

fueron ubicados en el nivel tres de la escala propuesta, es decir un 75% de coloración verde. Con respecto al análisis del adicional (hipoclorito de sodio al 2,5% por 15 minutos) utilizado en el factorial, resultó diferente estadísticamente al resto de tratamientos, ya que presentó niveles muy bajos de viabilidad (nivel 0,8 en una escala de cero a cuatro) debido a la concentración alta de hipoclorito de sodio utilizada. Cabe resaltar que la utilización de ampicilina en la desinfección no presentó diferencia alguna en la viabilidad de los explantes, y su uso puede ser prescindible en esta etapa por su elevado costo.

La descontaminación bacteriana se logró controlar con una concentración de 2% de hipoclorito de sodio (75,83%), y en una menor proporción con la concentración de 1,5% (60%). Estos resultados son sustancialmente más alentadores a los encontrados por Barboza, Sousa, Santana, Lédo y Oliveira (2007), ya que la exposición por 15 minutos a una concentración de 2,5% de hipoclorito resultó en 70% de explantes libres de contaminación, y una concentración al 1%, resultó en un 40% de descontaminación.

En el caso del tiempo de inmersión, se observó que la mejor descontaminación resultó ser el uso de 20 minutos de inmersión (78,33%). El uso de ampicilina no fue un factor que presentó diferencia estadística alguna en la contaminación. En la evaluación de la combinación de los factores mencionados, se puede decir que la concentración alta de 2% de hipoclorito de sodio y un tiempo de inmersión prolongado de 20 minutos, favorecen una buena descontaminación de bacterias (83,33 a 86,67%); aunque concentraciones menores, de 2% por 15 minutos y 1,5% por 20 minutos, también ofrecen buenos resultados (70 y 63,33 y 70% respectivamente). Thepsamran y colaboradores (2006), también utilizan concentraciones bajas de hipoclorito de sodio (0,5 a 0,8%) de 10 a 15 minutos, en la desinfección de explantes de piñón, y usan tween 20 al 0,02% como aditivo en estas soluciones, para potenciar su efecto desinfectante.

En muchos estudios se menciona en la desinfección, el uso de cloruro de mercurio de 0,1 a 0,12% en tiempos que van desde 2 a 25 minutos (Rajore

& Batra, 2005; Sujatha *et al.*, 2005; Datta *et al.*, 2007; Jha *et al.*, 2007; Kalimuthu *et al.*, 2007; Shrivastava & Banerjee, 2008), aunque como se mencionó en la desinfección de semillas de piñón, no se tomó en cuenta este desinfectante por los problemas en la manipulación y desecho, debido a su toxicidad.

Al relacionar los mejores tratamientos de desinfección con la viabilidad, no se obtienen buenos resultados, ya que incluyen desinfecciones agresivas que no producen un alto porcentaje de explantes viables. El mejor tratamiento en lo que respecta a viabilidad, produce un 46,67% de explantes descontaminados; aunque este porcentaje parezca bajo, se tiene la certeza de que los explantes libres de bacterias se desarrollarán en su mayoría, lo contrario sucederá con los explantes que se obtengan de una desinfección fuerte. Como se revisará más adelante, se pueden utilizar diversas estrategias para reducir esta contaminación encontrada sin que se afecte la viabilidad.

En lo que se refiere a la contaminación fúngica encontrada, no se puede establecer una relación clara entre las variables analizadas (%NaClO, tiempo de inmersión y uso de ampicilina); la aparición de esta contaminación tal vez se deba a la manipulación en el momento de la siembra, o por la misma naturaleza del explante, ya que es difícil el acceso de los desinfectantes a la parte más interna de la yema. También es un factor importante la época de recolección del material vegetal, ya que en la etapa de lluvias (cuando se recolectó) es más propensa una contaminación. Este factor puede ser contrarrestado con la manipulación y mantenimiento de estacas en invernadero en condiciones controladas, como se explica en el siguiente subtema.

4.2.2 Fuente de material vegetal

Para obtener una fuente de explantes confiables y con un menor riesgo de contaminación, las estacas extraídas de campo fueron mantenidas en invernadero bajo condiciones controladas y fumigaciones constantes durante dos semanas, como lo recomienda Pierik (1990) y Castillo (2004). Como se menciona en los resultados, el mejor tratamiento de desinfección, elegido para

evaluar el efecto que tiene la fuente del material vegetal, fue el tratamiento C7 (1,5% de NaClO por 15 minutos).

Al evaluar las yemas obtenidas de las estacas en invernadero, no se obtuvieron explantes con 75 y 100% de necrosis; resultados contrarios se obtuvieron con yemas obtenidas de plantas de campo. Además la cantidad de explantes que resultaron 100% verdes después de la desinfección fue mayor que en los obtenidos con muestras introducidas directamente del campo al laboratorio. En lo que se refiere a la contaminación bacteriana, ésta se redujo de un 53,33% a un 16,67%, lo que proporciona un gran respaldo para esta técnica de aclimatación en invernadero previa a la introducción *in vitro*, volviéndola altamente reproducible.

La contaminación fúngica por su parte no mostró diferencia estadística con la utilización de diferentes fuentes de material vegetal, y posiblemente la presencia de esta se deba a la manipulación en la siembra o contaminación cruzada.

4.2.3 Fase de inducción de brotes

Se evaluó en primer lugar las diferentes concentraciones de BAP y AIB en la inducción de brotes; evaluando posteriormente el uso de brasinólida, con los mejores tratamientos obtenidos.

4.2.3.1 Evaluación del uso de BAP y AIB

En esta fase, donde se pretendió proveer al explante de los nutrientes y reguladores de crecimiento necesarios que permitan la organogénesis directa de brotes, se pudo observar que concentraciones bajas de BAP (0,5 y 1 mg L⁻¹) y AIB (0,1 mg L⁻¹) inducen un mayor porcentaje de formación de brotes en menor tiempo (46,67 a 66,67%). El mejor tratamiento resultó ser el que contenía 1 mg L⁻¹ de BAP y 0,1 mg L⁻¹ de AIB. Ndiaye y colaboradores (2006) concuerdan en que la concentración óptima de BAP para la inducción y elongación de brotes es la de 1 mg L⁻¹. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por

Thepsamran y colaboradores (2006), ya que el mejor tratamiento consistió en concentraciones bajas de BAP y AIB (0,5 mg L⁻¹ BAP y 0,01 mg L⁻¹ AIB) obteniendo 5,9 brotes por explante; también señalan que mayores concentraciones de BAP y AIB, disminuyen el número de brotes.

Sujatha y colaboradores (2005) también encontraron que concentraciones bajas de BAP (0,5 y 1 mg L⁻¹) favorecen un mayor número de brotes en yemas de una variedad no tóxica de *Jatropha curcas*; aunque el uso del regulador TDZ también produjo efectos similares, su utilización no se ve favorecida debido a su alto costo. Rajore & Batra (2005) igualmente obtuvieron un mayor porcentaje de respuesta (95%) con la disminución de la concentración de AIB en el medio.

Un resultado aislado obtuvieron Datta y colaboradores (2007), ya que la mejor inducción de brotes resultó de concentraciones altas del regulador BAP (5 y 8 mg L⁻¹), esta diferencia tal vez tiene que ver con la pureza del regulador utilizado, o una variedad específica de *Jatropha curcas* con la que trabajaron.

Por otro lado, en la presente tesis, la mayor formación de callo (44,44 y 31,11%) se favorece al utilizar una concentración alta de BAP (2 y 4 mg L⁻¹ respectivamente); además no se observó relación alguna entre la formación callosa y el uso de distintas concentraciones de AIB. Un resultado similar obtuvieron en su trabajo Rajore & Batra (2007) con una concentración de 5 mg L⁻¹. Otra estrategia para obtener callo manejaron Soomro & Asma (2007), ya que utilizaron el regulador sintético 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (0,5 mg L⁻¹) con muy buenos resultados. Por otro lado, Lu, Wein, Tang, Yan & Chen (2003), encontraron que, un mayor porcentaje de callo se induce si las proporciones entre BAP y AIB se invierten, es decir mayor concentración de auxinas que citoquininas.

Con las observaciones realizadas durante el ensayo, se estableció que en todos los tratamientos con reguladores de crecimiento se produjo la formación de callo en la base de los explantes, a pesar de que en algunos

tratamientos se contaba con bajas concentraciones de los mismos. Estos resultados se corroboran con los obtenidos por Sujatha y colaboradores (2005) y, Thepsmaran y colaboradores (2006).

Fue muy importante el uso de aditivos como sulfato de adenina, glutamina y ácido cítrico, para obtener buenos resultados en esta etapa, ya que, como lo mencionan Rajore & Batra (2005) y Shrivastava & Banerjee (2008), el sulfato de adenina presenta un efecto sinérgico con otras citoquininas, la glutamina previene la caída de hojas en los múltiples brotes obtenidos y el ácido cítrico incrementa la longitud de los brotes en algunas especies vegetales. Por estas razones Datta y colaboradores (2007) y, Ndiaye y colaboradores (2006) también han utilizado estos aditivos en sus trabajos.

4.2.3.2 Evaluación del uso de brasinolida

Se utilizó brasinolida en los tratamientos que presentaron las mejores respuestas de inducción de brotes (tratamientos I10 a I13), obteniendo efectos muy positivos en las variables evaluadas.

Con la adición de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de brasinolida en cada tratamiento, se determinó que 1 mg L^{-1} de BAP y $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB (tratamiento B3) produce 3,5 brotes por explante (yema), también se observó que concentraciones de BAP menores a ésta, reducen el número de brotes que se pueden obtener por yema, ya que el tratamiento con $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP y 0 mg L^{-1} de AIB (tratamiento B1) induce la formación de 1,2 brotes por yema a las tres semanas.

En lo que se refiere a la longitud de los brotes obtenidos, el mejor tratamiento resultó ser el que contenía 1 mg L^{-1} de BAP y $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB (tratamiento B4), con una longitud promedio de 2,87 centímetros; aunque en este tratamiento se obtienen 2,7 brotes por explante. En cambio, el tratamiento estadísticamente diferente B3, produce brotes de 1,46 centímetros de longitud, lo que no es recomendable en términos de micropropagación masiva, ya que se requieren brotes grandes en el menor tiempo para poder separarlos en la

cabina de flujo laminar y así multiplicarlos. Nassar (2004) menciona el efecto positivo que tiene el uso de brasinólida en la elongación de brotes de banano (*Musa spp.* Cv. Grande). Además Mitchel y colaboradores también encontraron el mismo efecto en frijol, donde la brasinólida causó elongación de todas las partes de la plantas e incrementaron la longitud del tallo, la espiga y las raíces, el peso de la vaina y la cantidad de yemas (Citado por Rossi, 2005, p. 56).

La evaluación de la inducción de callo demuestra que el tratamiento que produce la mayor cantidad de brotes (B3), también es donde se forma la mayor cantidad de callo (nivel 2 en la escala de 0 a 3); aunque el tratamiento con brotes más largos también presenta una formación elevada de callo (nivel 1,9), y se encuentra en el mismo grupo estadístico.

Los resultados encontrados en esta etapa de introducción *in vitro* e inducción de brotes en yemas apicales de piñón demuestran que el mejor tratamiento para esta fase es el compuesto por 1 mg L⁻¹ de BAP; 0,5 mg L⁻¹ de AIB y 0,5 mg L⁻¹ de brasinólida (B4), ya que produce un número aceptable de brotes más largos.

Con los resultados mostrados, se prefiere obtener 2,7 brotes de 2,87 centímetros (tratamiento B3), que se desarrollarán plenamente en la siguiente fase, a diferencia de 3,5 brotes de 1,46 cm (tratamiento B4), que no se adaptarían con facilidad en la siguiente etapa de multiplicación *in vitro*.

4.2.4 Fase de multiplicación de brotes

La última etapa de micropropagación *in vitro* evaluada en la presente investigación fue la multiplicación de brotes, donde se trató de obtener múltiples brotes a partir de los inducidos en la etapa anterior, y así aumentar su coeficiente de multiplicación.

Se evaluó el número de brotes inducidos a partir de los diferentes tratamientos colocados en un DCA, donde, concentraciones de 0,5 mg L⁻¹ de BAP, 0,1 mg L⁻¹ de AIB y 1 mg L⁻¹ de brasinólida (tratamiento M7), y 1 mg L⁻¹

de BAP, 0,1 mg L⁻¹ de AIB, 2 mg L⁻¹ de GA₃ y 0,5 mg L⁻¹ de brasinolida (tratamiento M6), fueron los que obtuvieron un mayor coeficiente de multiplicación (4,4 y 4,6 brotes por explante respectivamente). Estos datos corroboran los citados por Kalimuthu y colaboradores (2007), ya que concentraciones altas de auxinas inhiben generalmente la morfogénesis, y la sustitución de estos agentes por una proporción adecuada de auxina - citoquinina es esencial para una rápida multiplicación de brotes.

En lo que se refiere a la obtención de callo, lo que se pretende es obtener la menor cantidad de callo posible; esto se obtuvo con los tratamientos M8, M5 y M6 (nivel 1,3, 1,7 y 2 respectivamente en la escala de 0 a 3), los cuales contienen concentraciones bajas de BAP y AIB, y están agrupados en el mismo grupo estadístico.

Debido a que Green en 1978 descubrió que eliminando el meristemo apical se paraliza el crecimiento vertical de la planta, evita la formación de racimo e inhibe la dominancia apical, se logra estimular el desarrollo de un gran número de yemas laterales. Por medio de este procedimiento la planta va a presentar una mayor producción de retoños en menor tiempo (Citado por Soto, 2007, p. 2). De acuerdo a esto, en la evaluación de la inhibición de la dominancia apical, se encontró que concentraciones bajas de BAP y AIB (tratamientos M5 a M8) inducen un mayor porcentaje de explantes con esta característica. La mayor cantidad de explantes sin dominancia apical se encontró en el tratamiento M6 (90%), el mismo que produjo el mayor número de brotes laterales.

Con estos resultados, se encontró un tratamiento más eficiente que los descritos anteriormente en la bibliografía, ya que los tratamientos M1 y M3 propuestos por Rajore & Batra (2005) produjeron 3,5 y 3,9 brotes respectivamente, y el M8 propuesto por Kalimuthu y colaboradores (2007) produjo 3 brotes; es decir que presentaron índices de multiplicación más bajos, convirtiéndose ésta en una nueva estrategia para la micropropagación *in vitro* de piñón en el Ecuador.

Al relacionar los mejores coeficientes de multiplicación encontrados en la etapa de inducción (2,7 brotes – tratamiento B3) y multiplicación (4,6 brotes – tratamiento M6) evaluados en la presente tesis, se puede obtener un coeficiente total de multiplicación de 12,42; el cual correspondería al número máximo de plantas que se pueden obtener a partir de una yema apical de piñón introducida al cultivo *in vitro*.