

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

1. En la presente tesis se logró establecer un protocolo que permite el cultivo *in vitro* de embriones de *Jatropha curcas*. En las etapas de desinfección e introducción *in vitro* de semillas de piñón se deben utilizar concentraciones bajas de hipoclorito de sodio (0,2 – 0,3%) por tiempos prolongados (5 horas por lo menos), ya que así se consigue la eliminación casi total de agentes bacterianos, y se asegura un gran porcentaje de embriones totalmente viables.
2. Son muy importantes los tratamientos previos que se dan a las semillas de *Jatropha curcas*, ya que de éstos dependerá su posterior desarrollo. El uso de lavados con fungicidas y bactericidas de amplio espectro, logró controlar cualquier contaminación presente o adquirida en las semillas debida a los procesos de cosecha, recolección y almacenamiento.
3. Otro paso muy importante resultó ser el remojo en agua por 24 horas previo a la desinfección, ya que así se pudo acelerar el proceso para el rompimiento de la dormancia en las semillas. Hay que resaltar que, la utilización de una prueba de viabilidad antes de cualquier ensayo es muy importante para tener una idea del porcentaje de germinación que tendrán los embriones *in vitro*. Sólo con la realización de esta prueba se pudo dilucidar que las semillas estaban aptas para el cultivo *in vitro*, y que además el proceso de desinfección no iba a afectar de mayor forma la viabilidad.
4. El cuidado de los embriones en los primeros días luego de la siembra es esencial, debido a la consistencia delgada de los cotiledones. De acuerdo a la investigación realizada, los embriones necesitan 24 horas en oscuridad para acostumbrarse al cambio de medio.
5. Al hablar del uso de azúcar, agua de coco y carbón activado en el medio de cultivo, se estableció que en las concentraciones adecuadas, se pueden

obtener las características deseadas en los embriones de acuerdo a las necesidades existentes. Es decir, si se requiere hojas cotiledonares de mayor tamaño con el objetivo de tomar estos explantes e inducir brotes o estructuras callosas en otro medio; lo óptimo sería la utilización de 30 g L^{-1} de azúcar, 50 mL L^{-1} agua de coco, y en lo posible prescindir del uso de carbón activado. En cambio, si el objetivo es obtener plantas completas, con raíces y tallos largos, se puede utilizar una concentración de 1 g L^{-1} carbón activado, 30 g L^{-1} de agua de coco, y 150 mL L^{-1} de agua de coco.

6. Se llegó a la conclusión de que no se necesita concentraciones altas de azúcar en el cultivo de embriones de frutos secos, ya que en este estado las semillas tienen reservas nutricionales suficientes para poder desarrollarse normalmente, además el uso de una concentración mayor a 30 g L^{-1} de azúcar produce embriones con un desarrollo anormal, observándose un engrosamiento del eje embrionario y curvatura del tallo.
7. Además el uso de carbón activado produce un sistema radical más largo a medida que se aumenta su concentración, aunque se también se afecta la altura de las plantas con una concentración muy elevada; por esta razón la concentración óptima es de 1 g L^{-1} .
8. La concentración de 50 mL L^{-1} de agua de coco resultó ser la óptima en la obtención de un mayor número de hojas no cotiledonares en las plántulas de piñón y en un menor tiempo.
9. Se estableció que el uso reguladores de crecimiento afectan el desarrollo normal en embriones de piñón, ya que el uso de BAP en concentraciones altas favorece la obtención de callo en menor tiempo, además no permite que la planta crezca longitudinalmente, se obtienen hojas cotiledonares de mayor tamaño e inhibe la producción de raíces. Con respecto al AIB, se concluye que su uso favorece la obtención de raíces, aunque como se mencionó en el ensayo sin reguladores, la adición de carbón activado es suficiente para el desarrollo de estas estructuras en embriones.

10. El uso de ácido giberélico y brasinolida en el medio de cultivo permiten un mejor desarrollo de las estructuras aéreas de la planta, como son el tallo, yema apical y hojas.
11. En general el uso de reguladores de crecimiento no permite el desarrollo normal de los embriones de piñón, ya que de acuerdo a su concentración afectan en la inducción de callo, engrosamiento anormal del tallo, inhibición de raíces, entre otros efectos.
12. Otro protocolo que se estableció en esta tesis fue la multiplicación *in vitro* de yemas apicales de plantas adultas de piñón, a partir de las etapas de desinfección, inducción y multiplicación de brotes.
13. El uso de hipoclorito de sodio al 1,5% por 15 minutos, favorece una desinfección adecuada y mayor porcentaje de viabilidad en las yemas introducidas al cultivo *in vitro*. Además el uso de ampicilina en la desinfección es prescindible, ya que no disminuye significativamente el riesgo de contaminación y tiene un costo elevado.
14. Un lavado con fungicidas, previo a la desinfección, reduce el riesgo de contaminación por hongos, aunque el uso de hipoclorito de sodio no presentó diferencia alguna en sus distintos tratamientos.
15. El manejo adecuado de estacas en invernadero significó un aumento considerable de viabilidad y desinfección de las yemas introducidas, a diferencia de las extraídas directamente de campo. La contaminación se redujo de 53,33% a 16,67%, y la obtención de explantes totalmente viables se aumento de 33,33% a 66,67%, utilizando la misma técnica de desinfección en ambos casos.
16. La inducción de brotes se logró establecer con concentraciones bajas de BAP (0,5 y 1 mg L⁻¹) y AIB (0, 0,1 y 0,5 mg L⁻¹). Además el uso de brasinolida potenció la obtención de brotes, hasta un número de 2,7 brotes viables.

17. La formación de callo se presentó en la mayoría de los explantes, debido a la presencia de los reguladores de crecimiento. Se evidenció que con el aumento de BAP y AIB en el medio de cultivo, también se aumenta la formación callosa.
18. Con respecto a la etapa de multiplicación de brotes, con una concentración reducida de BAP y AIB se obtuvo una multiplicación exitosa de brotes de piñón. También la presencia de ácido giberélico y brasinolida fueron factores importantes en esta etapa debido a su efecto en el desarrollo de peciolo y hojas.
19. Se evidenció que la inhibición de la dominancia apical se produce en explantes que tienen un mayor número de brotes laterales.
20. Se obtuvo un coeficiente de multiplicación total de 12,42, a partir de las etapas de inducción y multiplicación de brotes en yemas de piñón, lo cual es un resultado muy alentador para la propagación masiva de plantas clones de *Jatropha curcas*.
21. Con la presente tesis se establece un método reproducible para la micropropagación de piñón en el Ecuador, y sirve como pauta para la implementación de un sistema de propagación a gran escala.
22. Se comprobó la veracidad de la hipótesis planteada, que afirma que la estandarización del protocolo de desinfección y germinación de semillas de piñón, y de los métodos de desinfección, inducción y multiplicación de brotes a partir de yemas apicales adultas, tienen éxito en las etapas iniciales de la micropropagación de plantas de *Jatropha curcas* mediante cultivo *in vitro*.