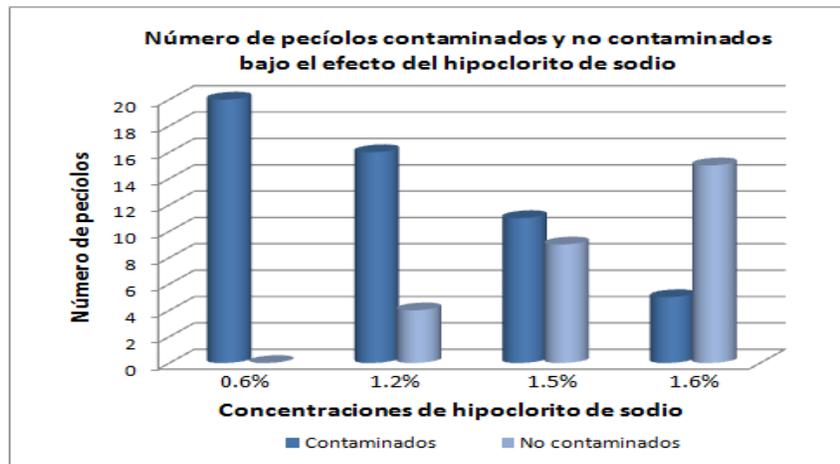


CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Fase de establecimiento

3.1.1 Desinfección del material vegetal

En esta etapa se evaluó el efecto de los tratamientos de desinfección sobre el pecíolo de las hojas de piñón. Los tratamientos consistieron en probar cuatro concentraciones de hipoclorito de sodio 0.6, 1.2, 1.5 y 1.6% combinadas con dos tiempos de inmersión de 10 y 15 min. En los primeros análisis se evaluó el efecto de las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio sobre la contaminación, como se puede ver en la Figura 3.1. Se pudo observar que la concentración de 1.6% de hipoclorito de sodio presentó el número más bajo de pecíolos contaminados.



Concentraciones NaClO (%)	Contaminado	No Contaminado
0.6	20	0
1.2	16	4
1.5	11	9
1.6	5	15

Figura 3.1 Número de pecíolos contaminados y no contaminados de piñón *Jatropha curcas* bajo el efecto de las concentraciones de hipoclorito de sodio 0.6, 1.2, 1.5 y 1.6% en la etapa de desinfección a las dos semanas de la siembra.

A continuación se evaluó la contaminación fúngica en los pecíolos combinando los dos tiempos de inmersión de 10 y 15 min con las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio empleadas anteriormente (0.6, 1.2, 1.5 y 1.6%). En la Figura 3.2 se observa que la contaminación más baja fue la del tratamiento que presentaba una concentración de hipoclorito de sodio de 1.6% y un tiempo de inmersión de 15 min. Lo que indica que mientras mayor concentración de hipoclorito de sodio y tiempo de inmersión existe menor porcentaje de contaminación.

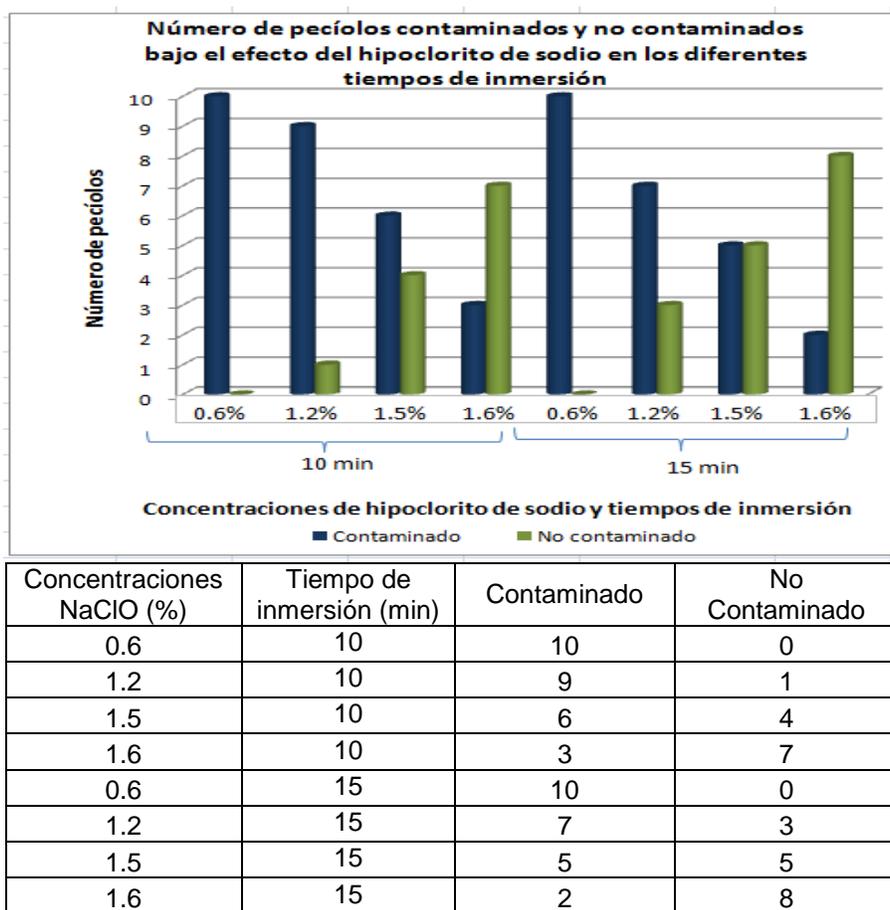


Figura 3.2 Número de pecíolos contaminados y no contaminados de piñón *Jatropha curcas* bajo el efecto de las concentraciones de hipoclorito de sodio 0.6, 1.2, 1.5 y 1.6% y los tiempos de inmersión de 10 y 15 min en la etapa de desinfección a las dos semanas de la siembra.

Con los resultados anteriormente obtenidos se identificó que el mejor tratamiento era la concentración de hipoclorito de sodio del 1.6% y el tiempo de inmersión de 15 min, pero después de 10 días de la siembra se observó que el tejido moría o necrosaba a causa del hipoclorito de sodio, por lo cual se analizó la variable sobrevivencia. En la Figura 3.3 se presenta las concentraciones de hipoclorito de sodio 0.6, 1.2, 1.5 y 1.6% como efecto a la sobrevivencia de pecíolo de piñón. Además, se puede observar que las concentraciones de 0.6 y 1.2% de hipoclorito de sodio presentan un alto número de muerte de los pecíolos debido a la contaminación fúngica.

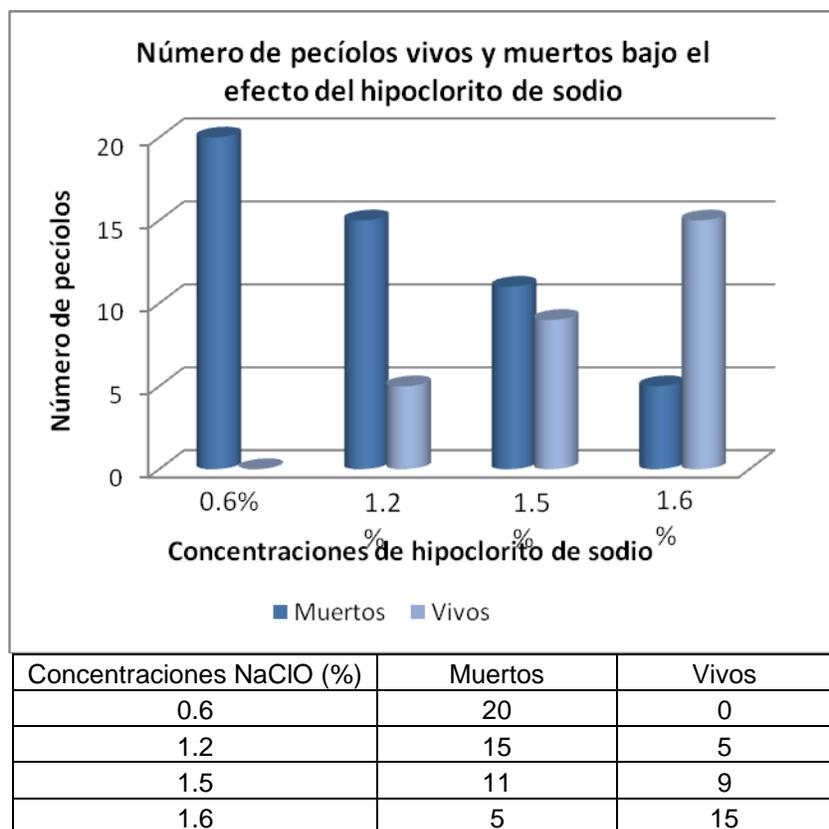


Figura 3.3 Número de pecíolos vivos y muertos de piñón *Jatropha curcas* bajo el efecto de las concentraciones de hipoclorito de sodio 0.6, 1.2, 1.5 y 1.6% en la etapa de desinfección a los 10 días de la siembra.

En el siguiente análisis se presenta la sobrevivencia de los pecíolos frente a las concentraciones de hipoclorito de sodio 0.6, 1.2, 1.5 y 1.6% combinado con los dos tiempos de inmersión de 10 y 15 min. En la Figura 3.4 podemos observar el número de pecíolos de piñón vivos y muertos en los diferentes tratamientos, además podemos ver que el tratamiento que presenta una concentración de hipoclorito de sodio de 1.6% y un tiempo de inmersión de 10 min es el que nos proporciona el número más alto de pecíolos vivos.

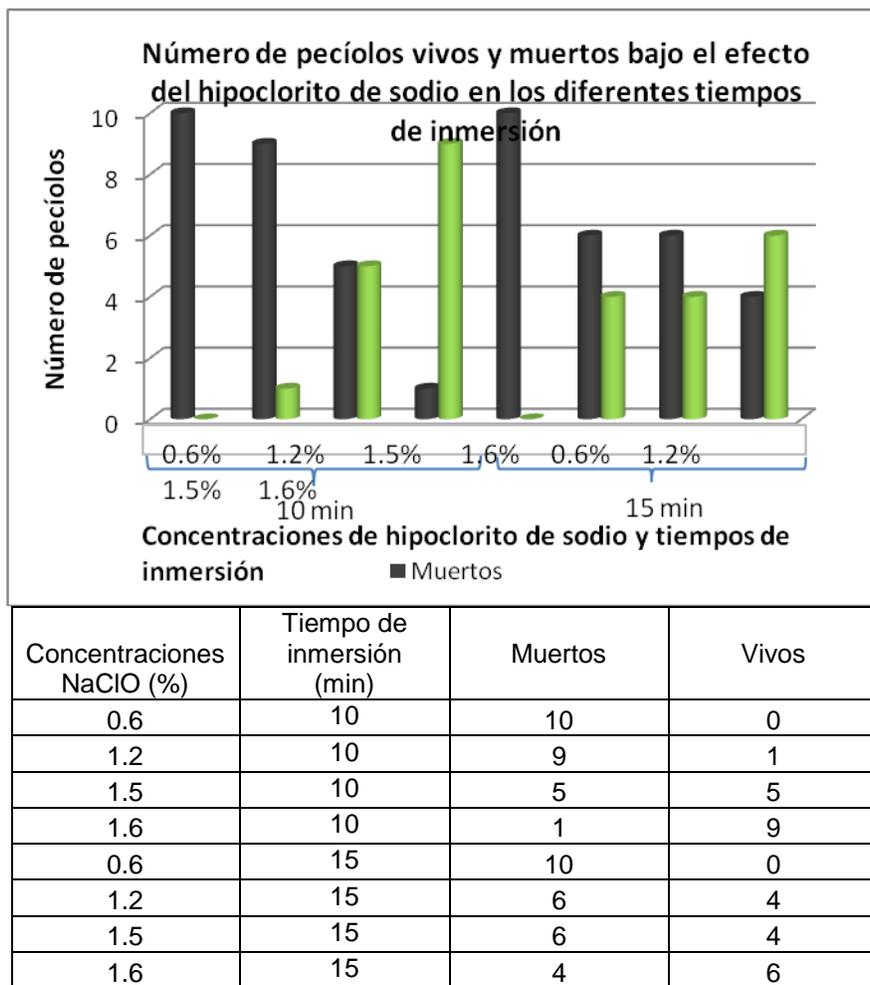


Figura 3.4 Número de pecíolos vivos y muertos de piñón *Jatropha curcas* bajo el efecto de las concentraciones de hipoclorito de sodio 0.6, 1.2, 1.5 y 1.6% y los tiempos de inmersión de 10 y 15 min en la etapa de desinfección a los 10 días de la siembra.

Se puede observar en la Figura 3.5 los porcentajes de pérdida total de pecíolos obtenidos en la etapa de desinfección. Además, se observa en el tratamiento que poseía una concentración de 1.6% de hipoclorito de sodio y 10 min de tiempo de inmersión es el que nos proporciona el porcentaje más bajo de pérdida total de pecíolo.

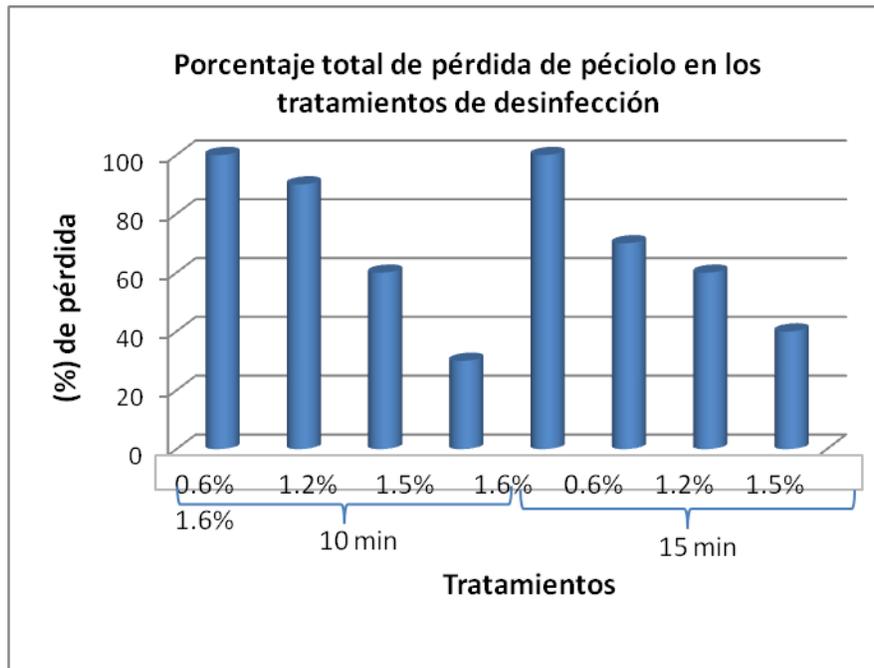


Figura 3.5 Porcentajes de pérdida total de pecíolos de piñón *Jatropha curcas* en la etapa de desinfección a las dos semanas de la siembra.

Para analizar la significancia entre tratamientos de desinfección se realizó una prueba binomial, ya que se trabajó con variables dicotómicas (contaminado, no contaminado y vivo, muerto), las cuales son cualitativas y necesitan de un análisis no paramétrico. Al realizar la prueba binomial con un nivel de confianza del 95% para analizar las variables contaminación fúngica y sobrevivencia de pecíolo de piñón, sobre el efecto de los tratamientos de desinfección, se obtuvo un valor de significancia de 0.009 para la variable contaminación fúngica y un valor de 0.0002 para la variable sobrevivencia de pecíolo (Tabla 3.1). Lo que quiere decir que por lo menos un

tratamiento de desinfección va actuar de diferente manera tanto en la contaminación como en la sobrevivencia.

Tabla 3.1 Análisis de la prueba binomial para las variables contaminación fúngica y sobrevivencia de pecíolo de piñón *Jatropha curcas* bajo el efecto de los tratamientos de desinfección.

Variable	Categoría	N	Proporción observada	Significancia
Contaminación fúngica	Contaminado	52	0.65	0.009
	No contaminado	28	0.35	
	Total	80	1	
Sobrevivencia de pecíolo	Muerto	57	0.71	0.0002
	Vivo	23	0.28	
	Total	80	1	

En la tabla 3.2 se presenta un análisis de subconjuntos homogéneos realizado con Waller-Duncan al 95% de confianza para establecer subconjuntos entre tratamientos de desinfección respecto a la contaminación fúngica de pecíolo. Se observa que se formaron 4 subconjuntos. Agrupando en el subconjunto 1 a los tratamientos que presentaron mayor número de pecíolo contaminados, en el subconjunto 2 el tratamiento 1.5%:15min, en el subconjunto 3 al tratamiento 1.6%:10min y en el subconjunto 4 al tratamiento 1.6%:15min, los dos últimos tratamientos fueron los que menos número de pecíolos contaminados presentaron. Además se realizó una comparación múltiple de las concentraciones de hipoclorito de sodio usadas para evaluar contaminación fúngica mediante DHS Tukey como se observa en el Anexo D y también se hizo las mismas comparaciones múltiples para los tratamientos de desinfección evaluando la variable contaminación fúngica como se presenta en el Anexo E.

Tabla 3.2 Subconjuntos homogéneos para los tratamientos de desinfección evaluando la variable contaminación fúngica mediante Waller-Duncan a las 2 semanas de la siembra.

Tratamientos Tiempo (min): Cloro (%)	Subconjunto			
	1	2	3	4
10:0.6	0			
15:0.6	0			
10:1.20	0.1	0.1		
15:1.20	0.3	0.3	0.3	
10:1.50	0.4	0.4	0.4	0.4
15:1.50		0.5	0.5	0.5
10:1.6			0.7	0.7
15:1.6				0.8

Al obtener una alta significancia entre tratamientos de desinfección respecto a la sobrevivencia de pecíolo se observó que se formaron 3 subconjuntos de homogeneidad con Waller-Duncan al 95% de confianza (Tabla 3.3). Se agrupó en el subconjunto 1 a los tratamientos que mayor número de pecíolos muertos presentaron debido a la contaminación y concentración de hipoclorito de sodio y en el subconjunto 2 y 3 se agrupó al tratamiento 10 min: 1.50% y 10 min: 1.6% respectivamente como los mejores tratamientos debido a que se obtuvo un número bajo de muerte de pecíolos. Para este análisis también se procedió a realizar una comparación múltiple de tratamientos de desinfección de la variable sobrevivencia de pecíolos con DHS Tukey como se presenta en el Anexo F.

Tabla 3.3 Subconjuntos homogéneos para los tratamientos de desinfección evaluando la variable sobrevivencia de pecíolo de piñón mediante Waller-Duncan a los 10 días de la siembra.

Tratamientos Tiempo (min):Cloro (%)	Subconjunto		
	1	2	3
10:0.6	0		
15:0.6	0		
10:1.20	0.1	0.1	
15:1.6	0.2	0.2	
15:1.20	0.4	0.4	0.4
15:1.50	0.4	0.4	0.4
10:1.50		0.5	0.5
10:1.6			0.7

Como ya se mencionó se observó que existía relación entre la concentración de hipoclorito de sodio y la contaminación fúngica y la sobrevivencia de pecíolo lo cual se confirma realizando la correlación Pearson (Tabla 3.4). En este análisis se obtuvieron valores altos de correlación, 0.6 para la contaminación fúngica de pecíolo y 0.4 para la sobrevivencia de pecíolo lo que indica que existe correlación de las variables respecto a las concentraciones de hipoclorito de sodio usadas en los tratamientos de desinfección.

Tabla 3.4 Correlación de Pearson entre la concentración de hipoclorito de sodio y contaminación fúngica; concentración de hipoclorito de sodio y sobrevivencia de pecíolo de piñón *Jatropha curcas*.

Variable		Concentración de hipoclorito de sodio
Contaminación fúngica	Correlación de Pearson	0.6
Sobrevivencia de pecíolo	Correlación de Pearson	0.4

3.1.2 Inducción y multiplicación de callos embriogénicos

Vale destacar que previo al diseño experimental propuesto se realizaron varios ensayos con otros tipos de bioreguladores para la inducción de callo embriogénico, probando así la auxina 2,4-D la cual produjo una buena cantidad de masa de callo como se muestra en el Anexo B, pero con un tiempo mucho más prolongado de crecimiento a comparación de un callo fotosintéticos.

En la fase de inducción a callo embriogénico se probó 3 concentraciones de bencilaminopurina (BAP) 1.5, 3 y 3.8 mg.L⁻¹ combinadas con 2 concentraciones de ácido indol acético (AIA) 1 y 2 mg.L⁻¹, obteniendo así 6 tratamientos. Además se realizó un control sin biorreguladores de crecimiento. En este análisis se cuantificó el área de callo embriogénico formado a partir del pecíolo y se realizaron mediciones del área de callo formada a los 18, 27 y 41 días. En la Figura 3.6 se muestra el desarrollo del callo embriogénico en centímetros cuadrados (cm²). En el día 18 se puede observar que no existe una diferencia entre tratamientos presentando tamaños iguales de área. En el día 27 se observa una diferencia más clara entre los tratamientos de inducción y multiplicación de callo embriogénico, teniendo mayor área de callo en el tratamiento que posee 1.5 mg.L⁻¹ de BAP y 2 mg.L⁻¹ de AIA. En el día 41 después de la siembra se puede ver que el mejor tratamiento de inducción y multiplicación de callo embriogénico es el que tiene 3.8 mg.L⁻¹ de BAP y 2 mg.L⁻¹ de AIA seguido del tratamiento que posee 1.5 mg.L⁻¹ de BAP y 2 mg.L⁻¹ de AIA.

En los diferentes tratamientos se observó el desarrollo de callos tipo I y II indistintamente como se presenta en el Anexo C.

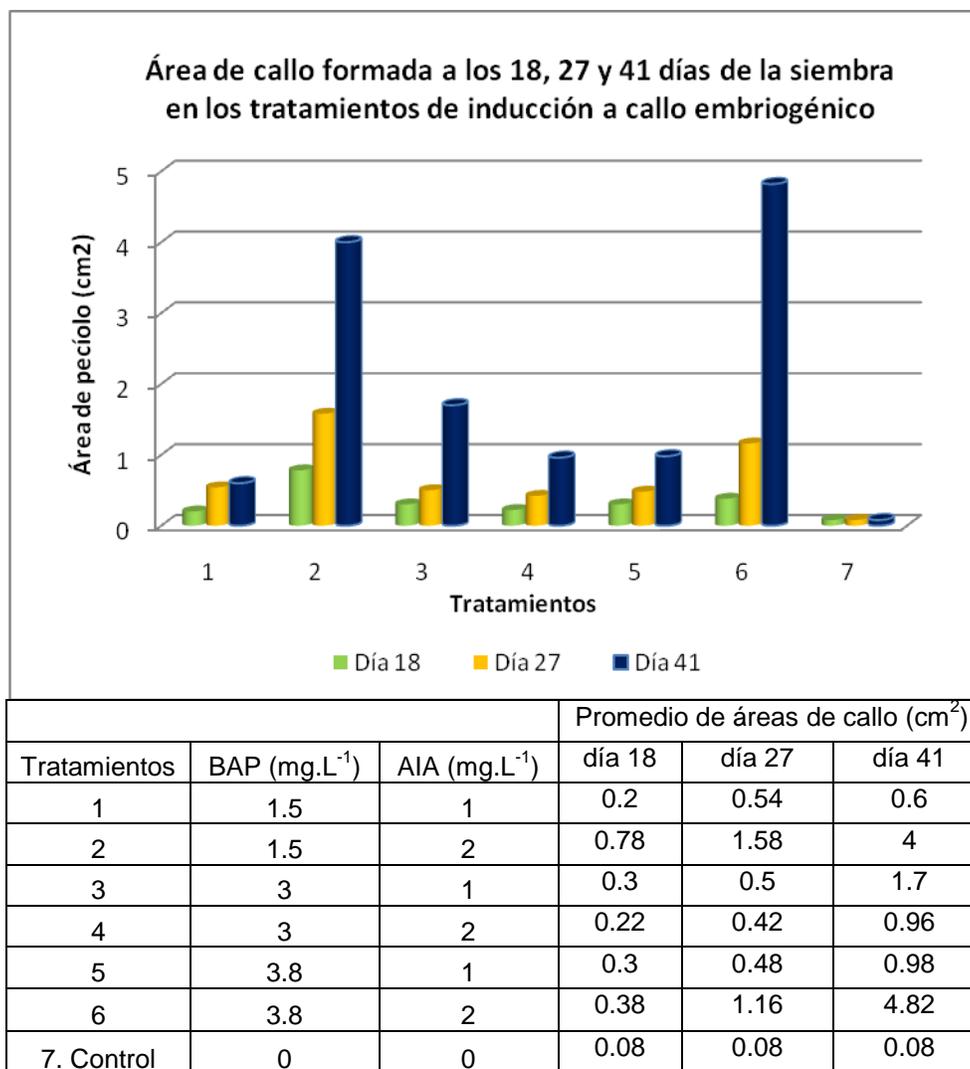


Figura 3.6 Área de callo formada a partir de pecíolo de piñón *Jatropha curcas* en los 6 tratamientos y el control de inducción a callo embriogénico en los días 18, 27 y 41 después de la siembra.

Con los resultados de las áreas obtenidas a lo largo de los 41 días se realizó curvas de crecimiento de los callos embriogénicos de los seis tratamientos y el control, para establecer el mejor tratamiento en la multiplicación de callo embriogénico lo cual se puede apreciar en la Figura 3.7. En esta figura se observa que el tratamientos 2 (1.5

mg.L⁻¹ de BAP y 2 mg.L⁻¹ de AIA) y el tratamiento 6 (3.8 mg.L⁻¹ de BAP y 2 mg.L⁻¹ de AIA) son los que presentan más masa de callo o área de callo formada.

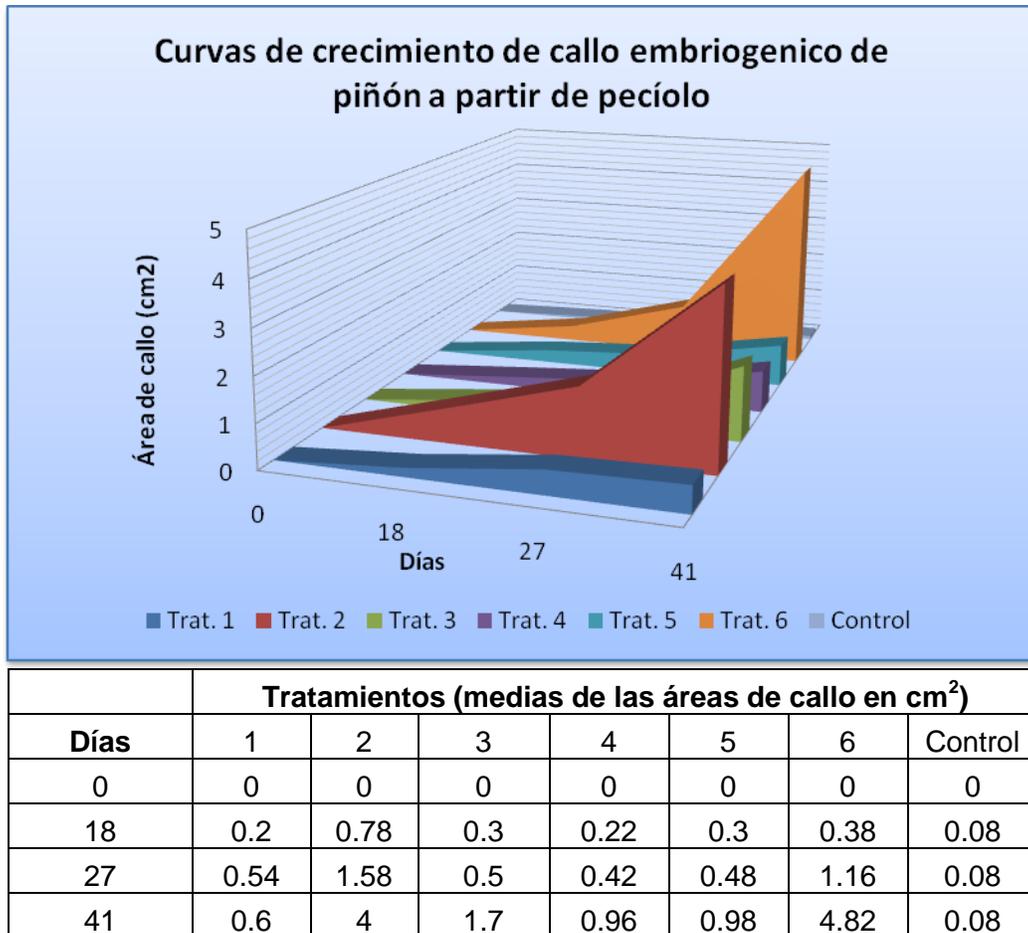


Figura 3.7 Curvas de crecimiento de callo embriogénico a partir de pecíolo de piñón *Jatropha curcas* a lo largo de 41 días después de la siembra en los diferentes tratamientos y el control de inducción a callo embriogénico.

Se analizó estadísticamente la inducción de callo embriogénico y la multiplicación realizando un análisis de variancia para los 3 días (18, 27 y 41) para los diferentes tratamientos de inducción y multiplicación de callo embriogénico. En la tabla 3.5 se observa que se obtuvo una alta significancia para los tratamiento BAP x AIA lo

que indica que por lo menos un tratamiento se comportó de diferente manera que el resto, formando callo embriogénico. En las concentraciones de AIA se observó que también se presentaba una alta significancia lo cual nos dice que este biorregulador esta relacionado con la formación de callo. En el análisis de las concentraciones de BAP para la inducción y multiplicación se obtuvo un valor no significativo para los días 18 y 41 lo que indica que se obtuvo diferencias entre tratamientos y para el día 27 poco significativo lo cual nos sugiere que las diferentes concentraciones de BAP usadas no causaron una significancia en la inducción de callo. En las interacciones de BAP x AIA x control en el día 18 se observó poca significancia, en el día 27 ninguna significancia y en el día 41 se obtuvo una alta significancia lo cual nos indica que según pasan los días los tratamientos van adquiriendo diferencia respecto al control en referencia a la formación de callo embriogénico.

Tabla 3.5 Análisis de varianza para la variable inducción y multiplicación de callo embriogénico a partir de pecíolo de piñón *Jatropha curcas* para los diferentes tratamientos de inducción y multiplicación de callo.

Fuentes de variación	GL	Evaluación de la inducción y multiplicación de callo a partir de pecíolo a los 18, 27 y 41 días		
		18	27	41
TOTAL	34			
BAP x AIA	5	14.968 ^{**}	14.34 ^{**}	19.892 ^{**}
AIA	1	6.818 ^{**}	11.694 ^{**}	15.475 ^{**}
BAP	2	2.993 ^{ns}	4.257 [*]	1.962 ^{ns}
BAPxAIAx Control	1	7.3 [*]	1.52 ^{ns}	21.7 ^{**}
Control	1	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.01 ^{ns}
ERROR	24	0.016	0.080	0.801
Área (cm²)		0.36	0.78	2.18
CV (%)		35.13	36.26	41.05

*: significante

** : altamente significante

ns: no existe significancia

En la tabla 3.6 se presenta un análisis de subconjuntos homogéneos realizado con Waller-Duncan al 95% de confianza, para las áreas obtenidas en los días 18, 27 y 41. En todos los días se observa que se formaron dos subconjuntos homogéneos. En el día 18 tenemos al tratamiento 1.5 mg.L^{-1} de BAP y 2 mg.L^{-1} de AIA ubicado en el subconjunto homogéneo 2 debido a que era el único que a ese tiempo comenzó a diferenciarse de los demás tratamientos en tener mayor área de callo formada. Al día 27 se observó que el tratamiento 1.5 mg.L^{-1} de BAP y 2 mg.L^{-1} de AIA era el que mayor área de callo embriogénico presentaba seguido del tratamiento 3.8 mg.L^{-1} de BAP y 2 mg.L^{-1} de AIA los cuales se los agrupó en el subconjunto 2. Finalmente a los 41 días de la siembra se mantuvieron los subconjuntos formados pero se observó que el mejor tratamiento para inducción y multiplicación de callo embriogénico fue el tratamiento que poseía 3.8 mg.L^{-1} de BAP y 2 mg.L^{-1} de AIA. Además se realizó un análisis de comparación múltiple de los tratamientos de inducción y multiplicación de callo de la variable área de callo embriogénico con DHS Tukey como se presenta en el Anexo G.

Tabla 3.6 Subconjuntos homogéneos para los tratamientos de inducción a callo embriogénico evaluando la variable área de callo formada mediante Waller-Duncan a los 18, 27 y 41 días de la siembra.

Tratamientos BAP*AIA	Subconjuntos homogéneos	
Área de callo día 18	1	2
0 mg .L ⁻¹ *0 mg.L ⁻¹	0	
1.5 mg .L ⁻¹ *1 mg.L ⁻¹	0.2	
3 mg.L ⁻¹ *2 mg.L ⁻¹	0.22	
3.8 mg.L ⁻¹ *1 mg.L ⁻¹	0.28	
3 mg.L ⁻¹ *1 mg.L ⁻¹	0.3	
3.8 mg.L ⁻¹ *2 mg.L ⁻¹	0.38	
1.5 mg.L ⁻¹ *2 mg.L ⁻¹		0.78
Área de callo día 27	1	2
0 mg .L ⁻¹ *0 mg.L ⁻¹	0	
3 mg.L ⁻¹ *2 mg.L ⁻¹	0.42	
3.8 mg.L ⁻¹ *1 mg.L ⁻¹	0.48	
3 mg.L ⁻¹ *1 mg.L ⁻¹	0.5	
1.5 mg.L ⁻¹ *1 mg.L ⁻¹	0.54	
3.8 mg.L ⁻¹ *2 mg.L ⁻¹		1.16
1.5 mg.L ⁻¹ *2 mg.L ⁻¹		1.58
Área de callo día 41	1	2
0 mg .L ⁻¹ *0 mg.L ⁻¹	0	
1.5 mg.L ⁻¹ *1 mg.L ⁻¹	0.6	
3 mg.L ⁻¹ *2 mg.L ⁻¹	0.96	
3.8 mg.L ⁻¹ *1 mg.L ⁻¹	0.98	
3 mg.L ⁻¹ *1 mg.L ⁻¹	1.7	
1.5 mg.L ⁻¹ *2 mg.L ⁻¹		4
3.8 mg.L ⁻¹ *2 mg.L ⁻¹		4.82

En esta etapa de inducción y multiplicación de callo embriogénico también se evaluó el efecto de los tratamientos a la sobrevivencia del pecíolo de piñón, ya que los reguladores de crecimiento en concentraciones inadecuadas pueden ocasionar necrosis del tejido en este caso de los pecíolos. En la Figura 3.8 se muestra el número de pecíolos vivos y muertos bajo el efecto de los tratamientos de inducción y

multiplicación de callo embriogénico. Además se observó en el control el mayor número de pecíolos muertos seguido del 1.5 mg.L⁻¹ de BAP y 1 mg.L⁻¹ de AIA con un 50% de pérdida de pecíolos. En el resto de tratamientos se observó un comportamiento semejante.

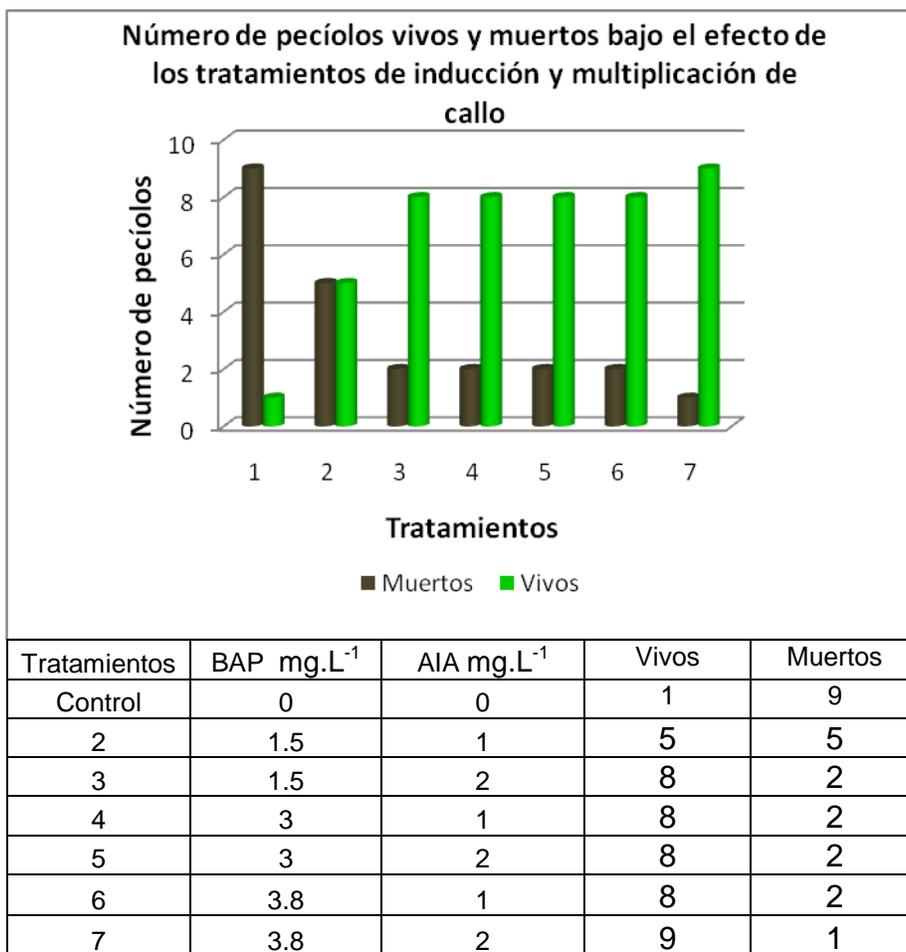


Figura 3.8 Número de de pecíolos de piñón *Jatropha curcas* vivos y muertos bajo el efecto de los tratamientos de inducción y multiplicación de callo embriogénico a los 41 días de la siembra.

Para analizar la significancia entre tratamientos de inducción y multiplicación de callo embriogénico analizando la variable sobrevivencia de pecíolo se realizó una prueba binomial, ya que se trabajó con variables dicotómicas de vivo y muerto. Se

obtuvo una significancia de 0.006 lo cual nos indica que si existe diferencia entre tratamientos a la sobrevivencia del pecíolo (Tabla 3.7).

Tabla 3.7 Análisis de la prueba binomial para la variable sobrevivencia de pecíolo de piñón *Jatropha curcas* bajo el efecto de los tratamientos de inducción y multiplicación de callo embriogénico a los 41 días de la siembra.

Variable	Categoría	N	Proporción observada	Significancia
Sobrevivencia de pecíolo al medio	Vivo	47	0.67	0.006
	Muerto	23	0.33	
	Total	70	1	

En la tabla 3.8 se presenta un análisis de subconjuntos homogéneos realizado con Waller-Duncan al 95% de confianza, para la sobrevivencia de los pecíolos a los tratamientos de inducción y multiplicación de callo embriogénico. Se observó que se formaron dos subconjuntos ya que el control y el tratamiento que poseía 1.5 mg.L^{-1} de BAP y 1 mg.L^{-1} de AIA fueron los que presentaron mayor número de pecíolos muertos, los cuales se agruparon en el subconjunto 1 y los otros tratamientos que se comportaron de igual manera teniendo pocos pecíolos muertos, se agruparon en el subconjunto 2. También se realizó un análisis de comparación múltiple de tratamientos de la variable sobrevivencia con DHS Tukey como se presenta en el Anexo H

Tabla 3.8 Subconjuntos homogéneos para los tratamientos de inducción a callo embriogénico evaluando la variable sobrevivencia mediante Waller-Duncan a los 41 días de la siembra.

Tratamientos BAP*AIA	Subconjuntos homogéneos	
	1	2
0 mg .L ⁻¹ *0 mg.L ⁻¹	0.1	
1.5 mg .L ⁻¹ *1 mg.L ⁻¹	0.5	
1.5 mg.L ⁻¹ *2 mg.L ⁻¹		0.8
3 mg.L ⁻¹ *1 mg.L ⁻¹		0.8
3 mg.L ⁻¹ *2 mg.L ⁻¹		0.8
3.8 mg.L ⁻¹ *1 mg.L ⁻¹		0.8
3.8 mg.L ⁻¹ *2 mg.L ⁻¹		0.9

Al correlacionar el efecto del BAP y AIA sobre la sobrevivencia de pecíolo de piñón se obtuvo un valor bajo de correlación de -0.15 lo cual sugiere que las concentraciones utilizadas de BAP y AIA en los diferentes tratamientos de inducción y multiplicación de callo embriogénico no tienen un efecto marcado en la necrosis o muerte de los pecíolos.

Tabla 3.9 Correlación de Pearson entre la sobrevivencia de pecíolo de piñón *Jatropha curcas* con los tratamientos de inducción y multiplicación de callo embriogénico.

Variable	Efecto del BAP y AIA
Sobrevivencia de pecíolo al medio Correlación de Pearson	-0.15

En la Figura 3.9 se presenta porcentajes de área obtenida y de sobrevivencia de pecíolo a los tratamientos de inducción y multiplicación de callo embriogénico. Se observó que los tratamientos 2 (1.5 mg.L⁻¹de BAP y 2 mg.L⁻¹de AIA) y el tratamiento 6 (3.8 mg.L⁻¹ de BAP y 2 mg.L⁻¹de AIA) son los que mayor pecíolos vivos tuvieron además de presentar una mayor área de callo formada hasta los 41 días de la siembra.

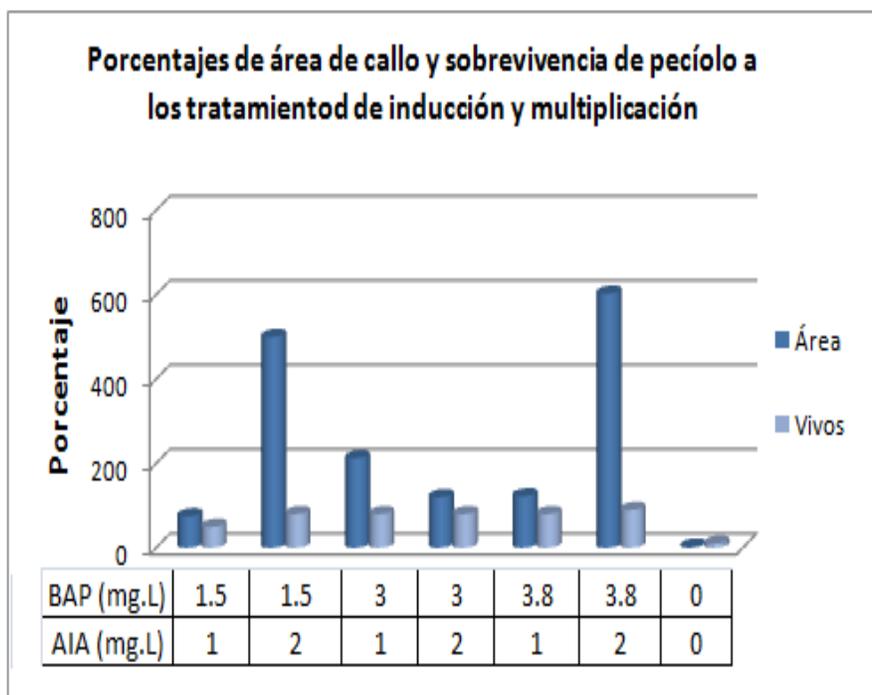


Figura 3.9 Porcentajes de área de callo embriogénico formada y sobrevivencia de peciolo de piñón *Jatropha curcas* a los diferentes tratamientos de inducción y multiplicación de callo embriogénico.

En la Figura 3.10 se muestra fotos de los callos embriogénicos de los tratamientos 2 (1.5 mg.L⁻¹ de BAP y 2 mg.L⁻¹ de AIA), el tratamiento 6 (3.8 mg.L⁻¹ de BAP y 2 mg.L⁻¹ de AIA) y del control en un medio base de Murashige y Skoog (1962). Donde se puede observar el desarrollo de la masa embrionaria y la muerte de peciolos en el control.

1.5 mg/L de BAP y 2	3.8 mg/L de BAP y	Control
---------------------	-------------------	---------

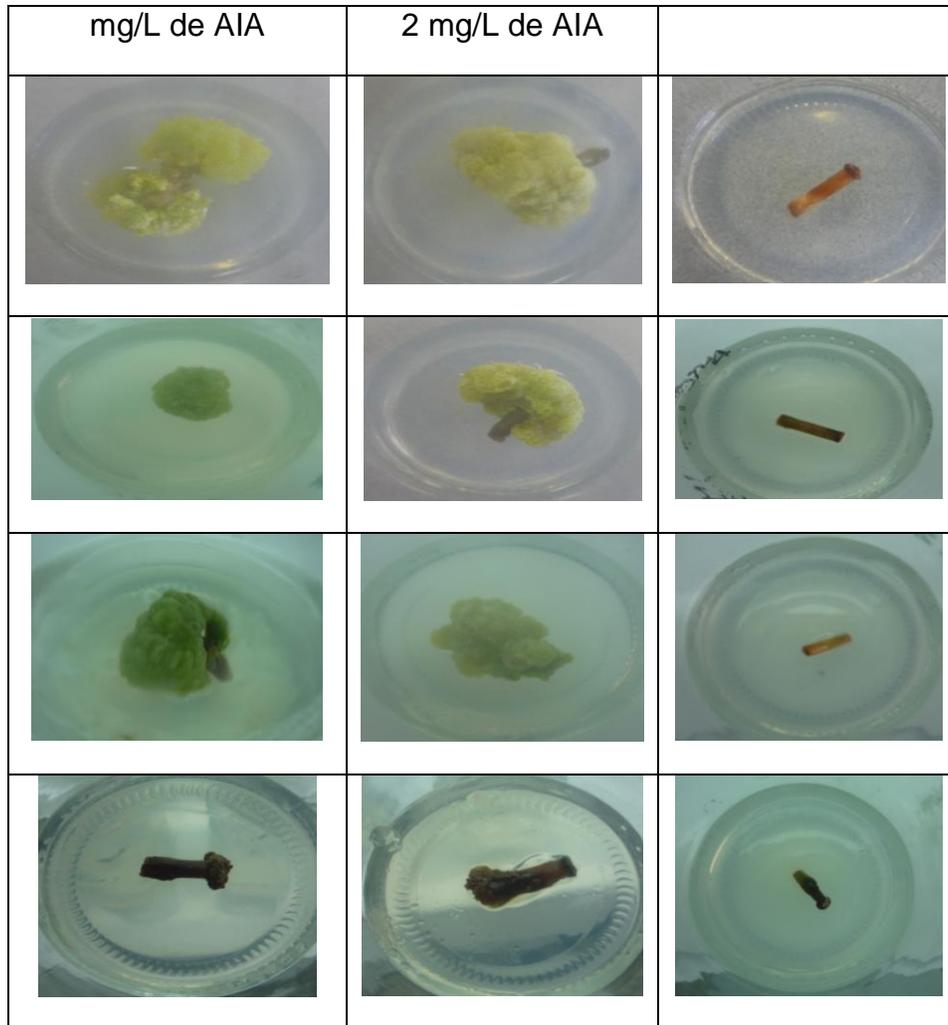


Figura 3.10 Fotografías de callo embriogénicos obtenidos a partir de pecíolo de piñón *Jatropha curcas* de los tratamientos 2 (1.5 mg.L⁻¹ de BAP y 2 mg.L⁻¹ de AIA), el tratamiento 6 (3.8 mg.L⁻¹ de BAP y 2 mg.L⁻¹ de AIA) y el control a los 50 días de la siembra

3.1.3 Maduración de los embriones somáticos

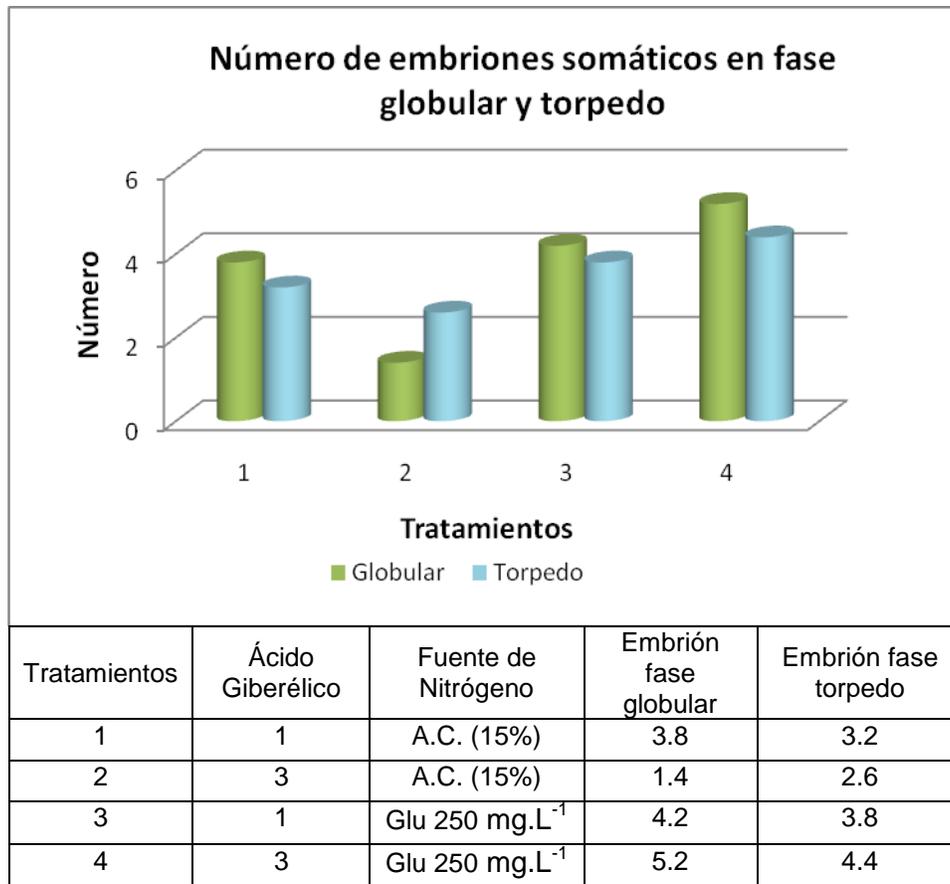
En la fase de maduración embrionaria se procedió a cambiar de medio de cultivo a los callos embriogénicos que se obtuvieron en la fase de inducción y proliferación, aproximadamente a los 41 días de la siembra cuando el tejido desdiferenciado (callo)

comenzaba a diferenciarse como se puede ver en la Figura 3.11. Para los tratamientos de maduración embrionaria se probaron 2 fuentes de nitrógeno orgánico agua de coco al 15% y 250 mg.L⁻¹ de glutamina combinados con 2 diferentes concentraciones de ácido giberélico 1 y 3 mg.L⁻¹.



Figura 3.11 Callo de piñón con tejido proembriónico a los 50 días de la siembra en medio de maduración embrionaria.

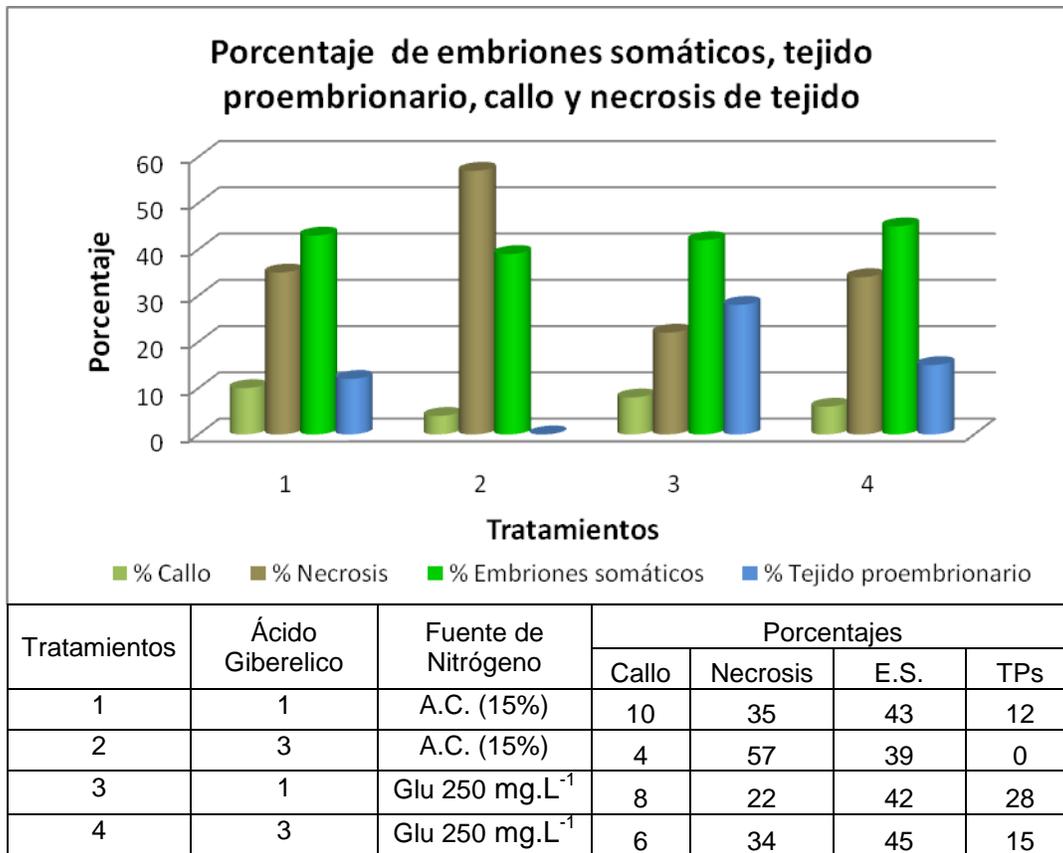
Para identificar el mejor o los mejores tratamientos en lo que se refiere a la maduración o crecimiento óptimo de los embriones somáticos se identificó las estructuras características del crecimiento embrionario en las diferentes fases de desarrollo las cuales fueron globular y torpedo, en la Figura 3.12 se muestra el número de estructuras embrionarias en estas fases presentes en las masas de callo.



A.C: Agua de coco al 15% de concentración, Glu: glutamina

Figura 3.12 Medias estimadas del número de embriones somáticos en fase globular y torpedo en los diferentes tratamientos de maduración obtenidos a partir de pecíolo de piñón *Jatropha curcas* a la octava semana..

Para establecer el mejor tratamiento de maduración embrionaria también se evaluó el porcentaje de embriones desarrollados en las diferentes fases, necrosis del tejido, tejido proembriogénico y callo formado, debido a que se observó que en algunos tratamientos seguía la formación de callo. En la Figura 3.13 se muestra los porcentajes de callo que continuaban formándose en los medios de maduración después del cambio de medio, comportamiento del tejido a los medios de cultivo (necrosis), embriones somáticos en las diferentes etapas de desarrollo y finalmente el porcentaje de tejido proembriionario que presentaban estructuras preglobulares.



A.C: Agua de coco al 15% de concentración, Glu: glutamina, E.S.: Embriones somáticos, TPs: Tejido proembrionario.

Figura 3.13 Porcentajes de callo, tejido necrosado, embriones somáticos y tejido proembriogénico que se produjo en los diferentes tratamientos de maduración embrionaria a partir de pecíolo de piñón *Jatropha curcas* a la octava semana.

Los porcentajes más bajos de necrosis de tejido se obtuvieron en los tratamientos 3 y 4 los cuales poseían 250 mg.L⁻¹ de glutamina como fuente de nitrógeno orgánico. Al observar las otras variables se muestra que no poseen una diferencia marcada es decir mantiene una similitud en el desarrollo de las diferentes estructuras embrionarias.

En la Figura 3.14 se muestra fotografías de cultivos de los cuatro tratamientos de maduración embrionaria en los cuales se puede observar necrosis de tejido, tejido proembriogénico y diferentes fases de desarrollo de los embriones somáticos.

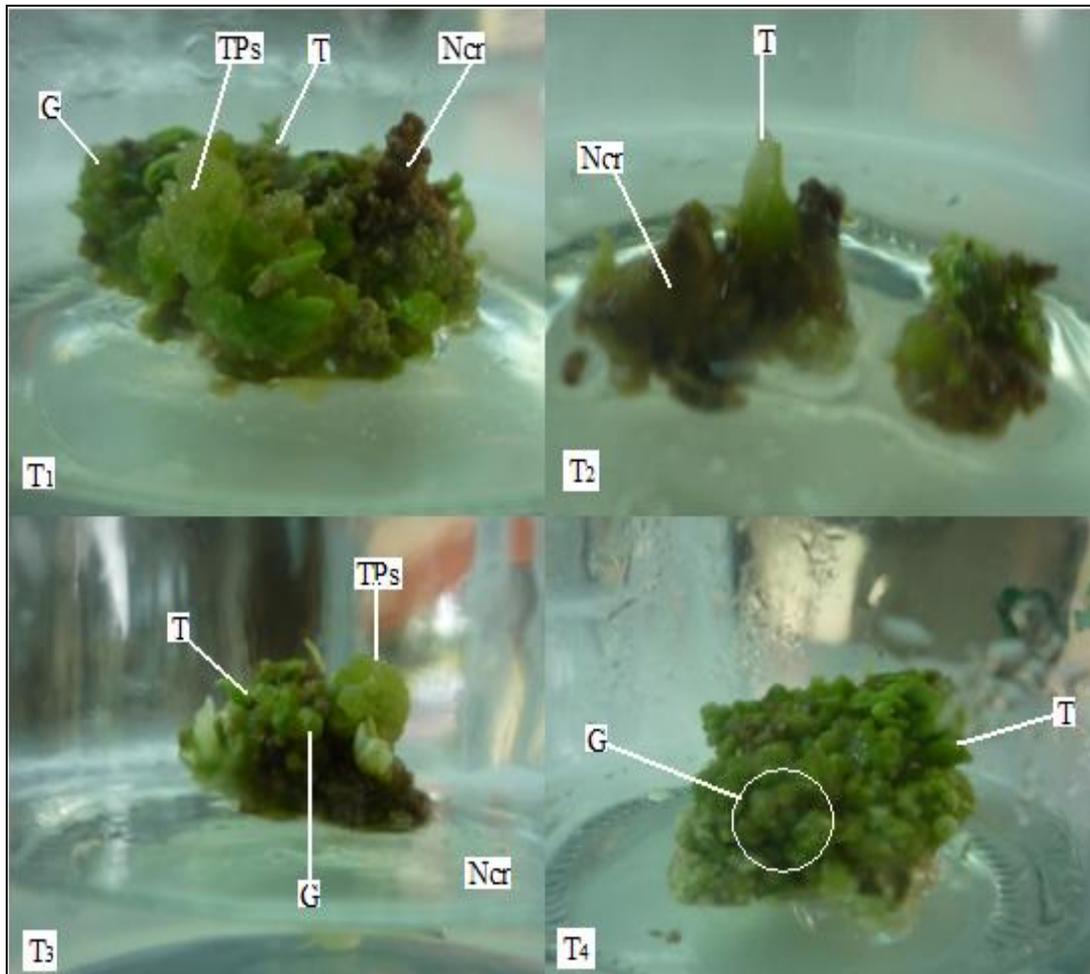


Figura 3.14 Fotografías de callos en los diferentes tratamientos de maduración embrionaria, (Ncr) tejido necrosado, (TPs) tejido proembriogénico y estructuras embrionarias (G) globular y (T) torpedo.

En la Figura 3.15 se muestran las diferentes estructuras embrionarias y organogénicas diferenciándose de una masa de callo obtenida a partir de pecíolo de

piñón aproximadamente a los 50 días de la siembra en un medio de maduración de embriones somáticos.

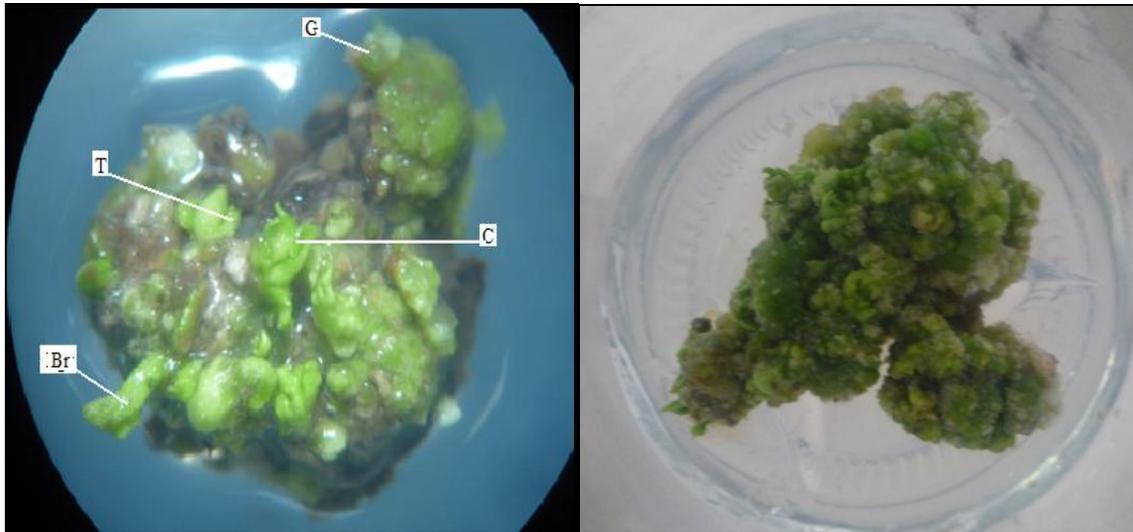


Figura 3.15 Formación de embriones somáticos en diferentes fases a partir de callo después de 8 semanas de la siembra, observación al estereomicroscopio a 3X. Estructuras embrionarias (G) globular, (T) torpedo, (C) cotiledonar y (Br) brote.

En la Figura 3.16 se presenta las etapas de la embriogénesis somática individualizadas o extraídas del tejido madre observadas al estereomicroscopio aproximadamente a dos meses de la siembra.

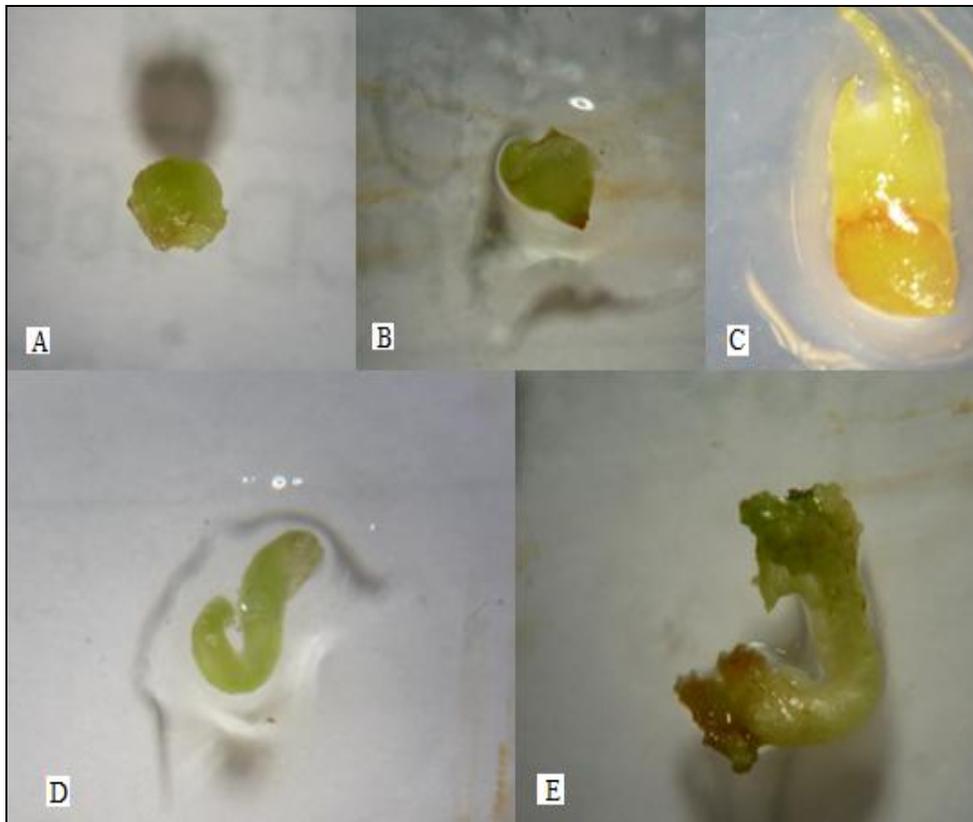


Figura 3.16 Fases de la embriogénesis somática de piñón *Jatropha curcas*. A) Fase globular, B) fase acorazonado, C) fase torpedo, D) fase cotiledonar y E) embrión maduro.

En la Figura 3.17 se muestran embriones somáticos germinados donde se diferencia claramente las hojas cotiledonares además de observar un brote de origen organogénico. En la base de la masa de callo se puede ver el crecimiento de una plántula de origen somático diferenciándose claramente las hojas cotiledonares.

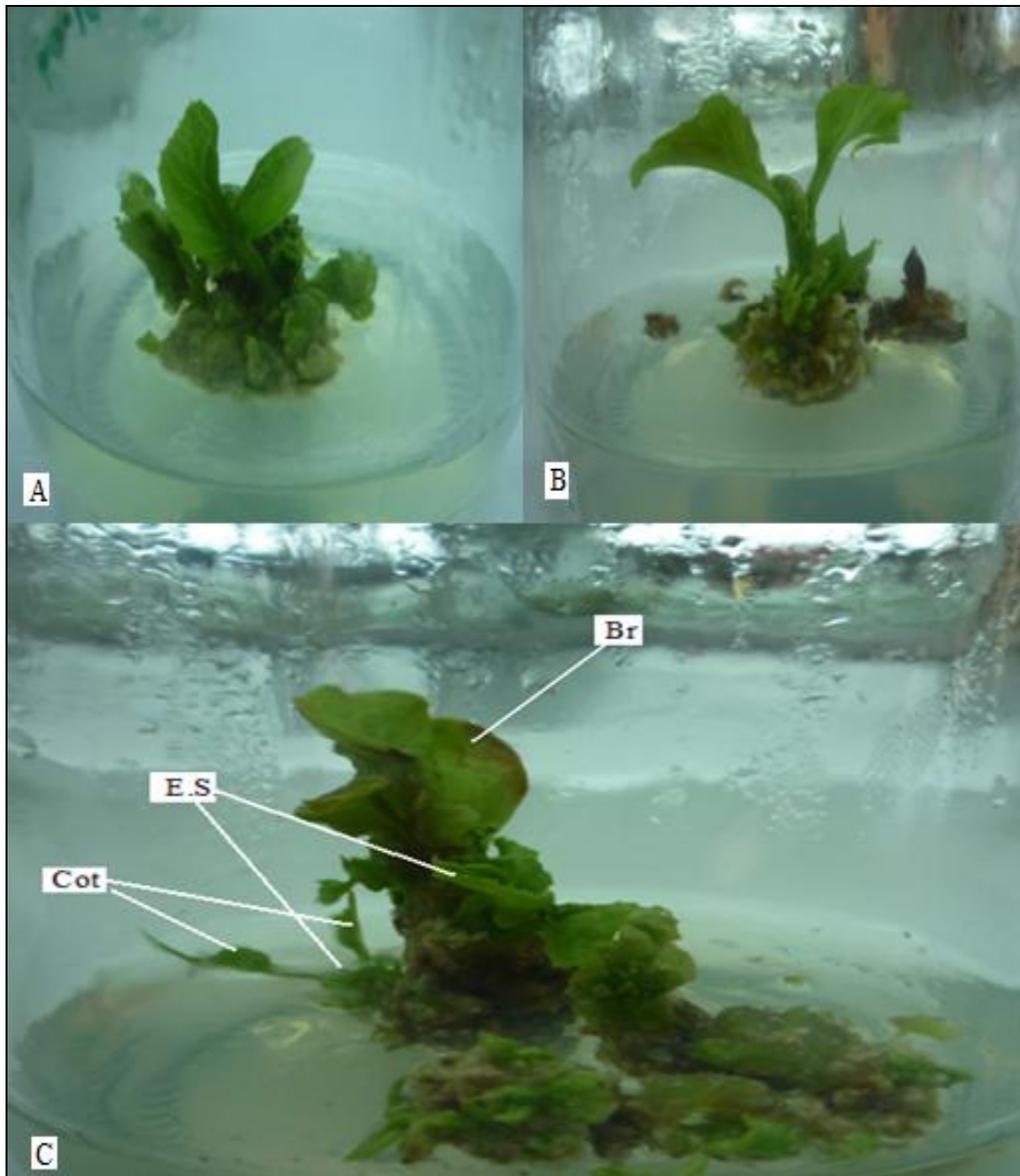


Figura 3.17 A y B) Embrión somático germinado a partir de la masa de callo a las 11 semanas de la siembra en el tratamiento 3 de maduración embrionaria, C) brote de origen organogénico (Br) y embriones somáticos (E.S.) con hojas cotiledonares (Cot) a las 11 semanas de la siembra en medio de maduración embrionaria.

3.2 Análisis histológico de las estructuras embrionarias

Después de siete semanas de la siembra del pecíolo y el desarrollo del callo embriogénico se observó la presencia de brotes en diferentes estados de desarrollo. Se observó además brotes con una forma muy similar a la de un embriode. Paralelamente se encontró brotes con una forma semejante a la de una plántula, sin que se observara la presencia de cotiledones. Al manipular las estructuras se observó que los embriones se desprendían fácilmente del tejido madre, mientras que los brotes presentaban una conexión vascular con el tejido y no se lo podía desprender con facilidad. Lo cual hizo suponer que se estaba presentando embriogénesis somática y organogénesis en el mismo tejido al mismo tiempo.

En la Figura 3.18 se observa tejido parenquimático donde se puede observar un grupo de células meristemáticas que pueden desarrollarse en embriogénesis u organogénesis.

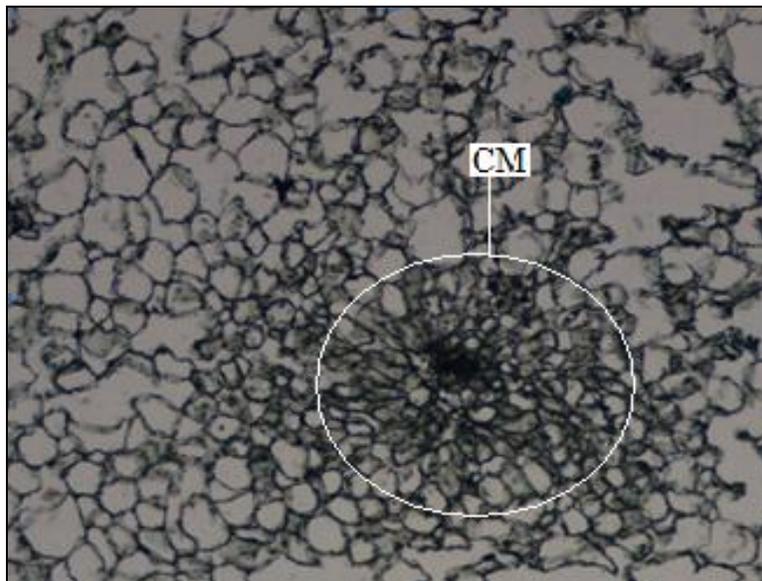


Figura 3.18 Grupo de células meristemáticas obtenidas a partir de callo embriogénico 10X.

En la Figura 3.19 se puede diferenciar células embrionarias en el tejido parenquimático, se observa estructuras con una forma regular las cuales pueden ser células resultantes de la formación del suspensor, las mismas que poseen la capacidad de originar eventos morfogénéticos.

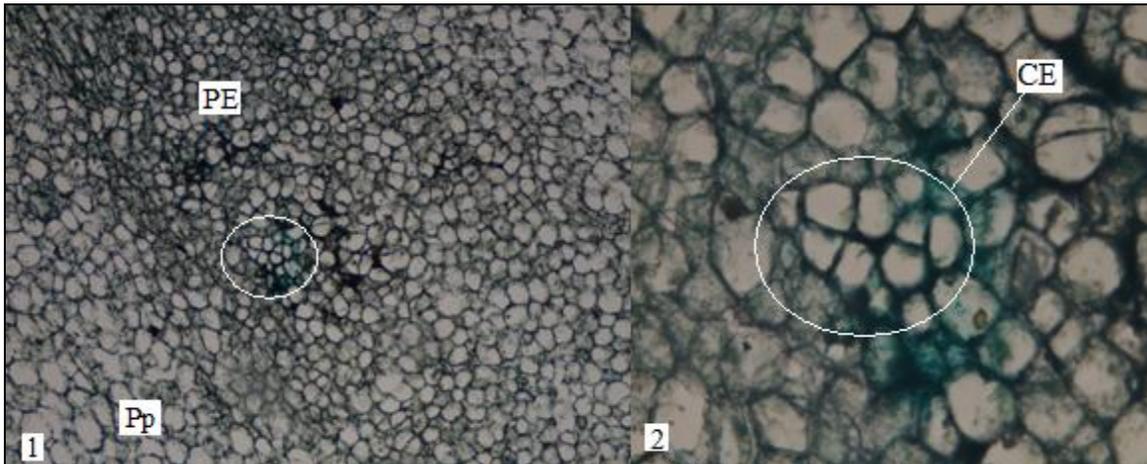


Figura 3.19 1) Tejido paranquimatico, parénquima esponjoso (PE), parenquima empalizado (Pp), 40X. 2) Células embrionarias (CE) 100X.

En la Figura 3.20 se observa embriones somáticos en una fase globular, donde se puede identificar células epidérmicas que envuelven a las estructuras.

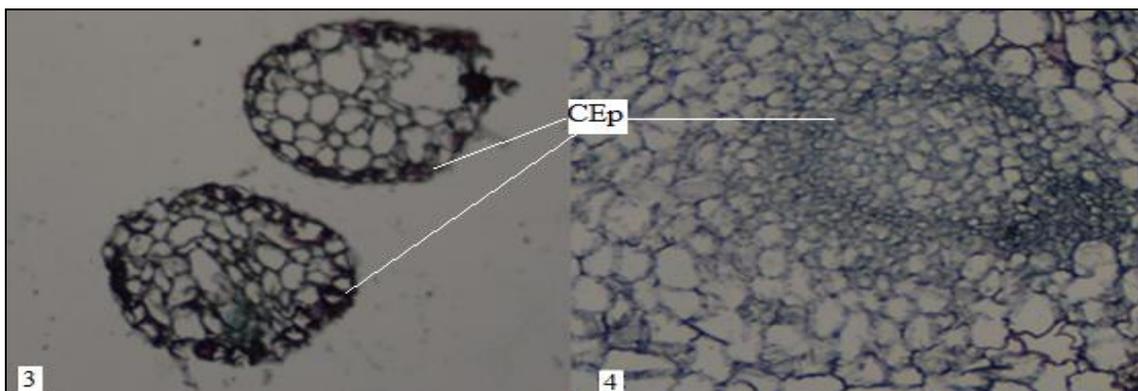


Figura 3.20 3) Embriones en fase globular separados del tejido madre 10X, 4) Embrión en fase globular unido al tejido madre, células epidérmicas (CEp) 10X.

Una vez que se ha formado la estructura globular ya sea de origen unicelular o multicelular, esta estructura comienza adoptar una forma acorazonada como se puede observar en la Figura 3.21, donde se van diferenciando los polos apical y radical.

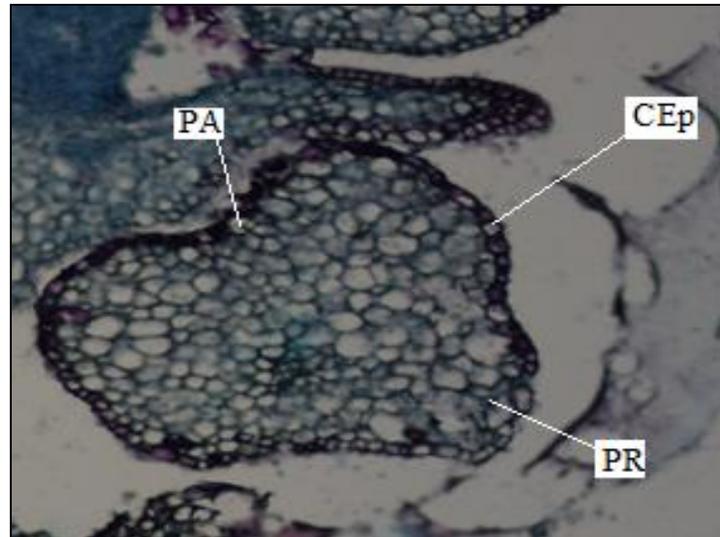


Figura 3.21 Embrión en fase globular, polo apical (PA), polo radical (PR), células epidérmicas (CEp) 10X.

Después de la fase acorazonada el embrión se desarrolla a una fase de torpedo donde los polos meristemáticos se van a diferenciar más claramente e incluso se comienzan a distinguir los cotiledones. En esta etapa se observa más claramente las bandas procambiales del embrión, las cuales no tienen ningún nexo con el tejido vascular del explante como se observa en la Figura 3.22.

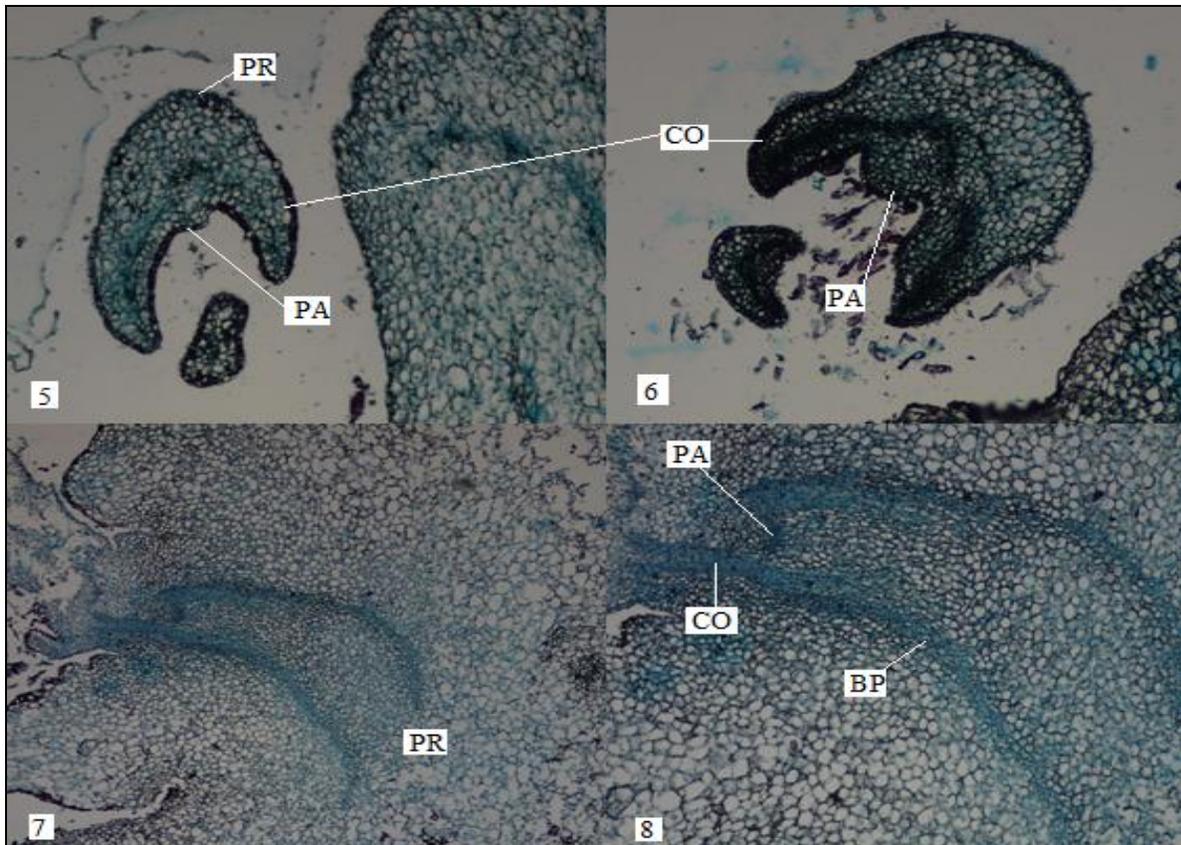


Figura 3.22 5,6) Embriones en un estado temprano de torpedo desprendidos del tejido madre mostrando el meristema apical (PA), el polo radical (PR) y los cotiledones (CO) 10X. 7) Embrión somático en fase torpedo 4X. 8) Acercamiento de la figura 7 mostrando meristema apical y radical, cotiledón, además de las bandas procambiales 10X.

Por último ocurre la fase cotiledonar donde se puede diferenciar claramente las hojas cotiledonales, el meristema apical y radical lo cual se presenta en la Figura 3.23. En esta etapa la zona meristemática apical se distingue fácilmente de las hojas cotiledonales.

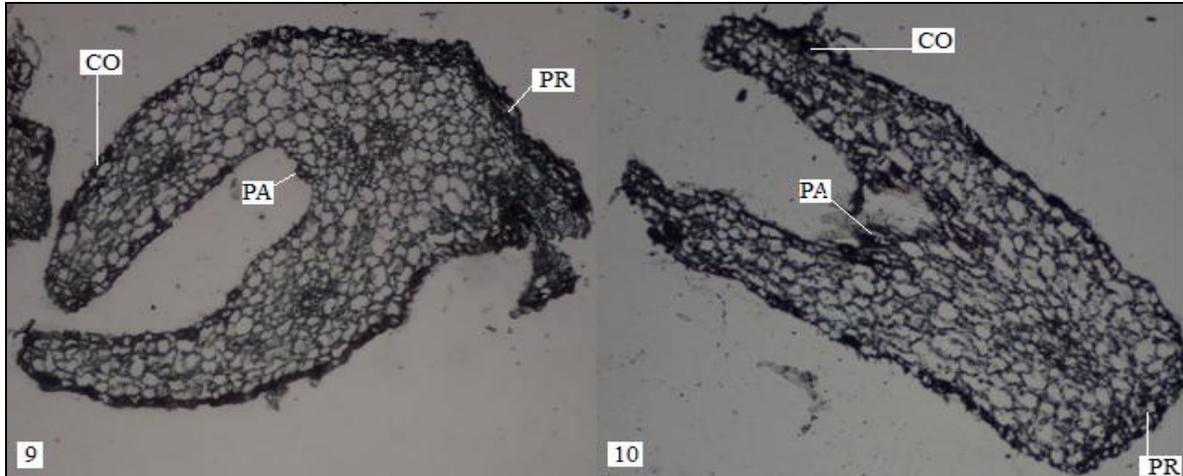


Figura 3.23 9,10) Embriones somáticos en fase cotiledonar mostrando el meristema apical (PA), el polo radical (PR) y los cotiledones (CO) 4X.

En la Figura 3.24 se muestra un embrión somático en fase cotiledonar madura donde se puede diferenciar muy claramente sus diferentes partes.

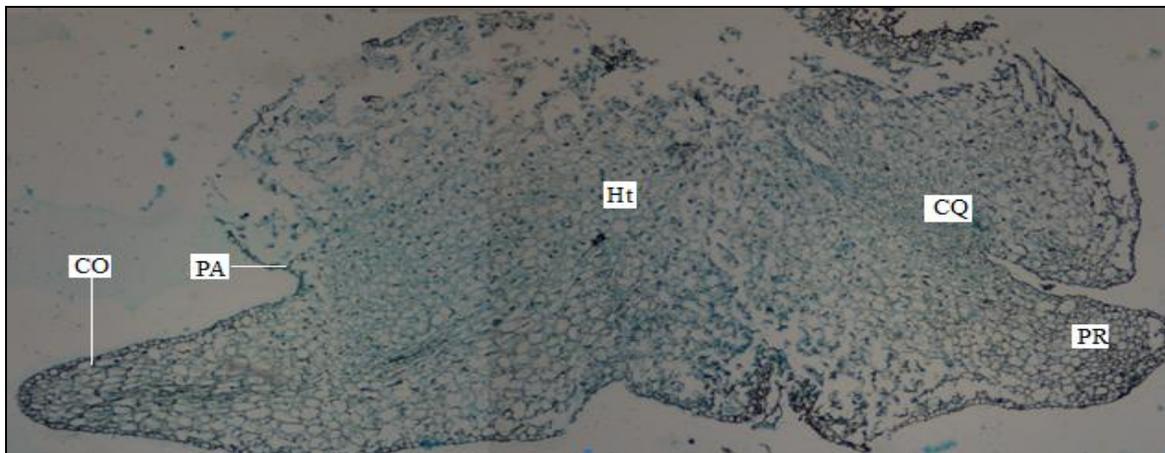


Figura 3.24 Embrión somático en fase cotiledonar madura mostrando cotiledones (CO), polo apical (PA), hipocotilo (Ht), centro quiescente (CQ) y polo radicular (PR) 4X.

En la Figura 3.25 se observa la presencia de brotes de origen organogénico que se desarrollaron simultáneamente con la embriogénesis somática y se observa que estos brotes presentan una conexión vascular con el tejido madre.

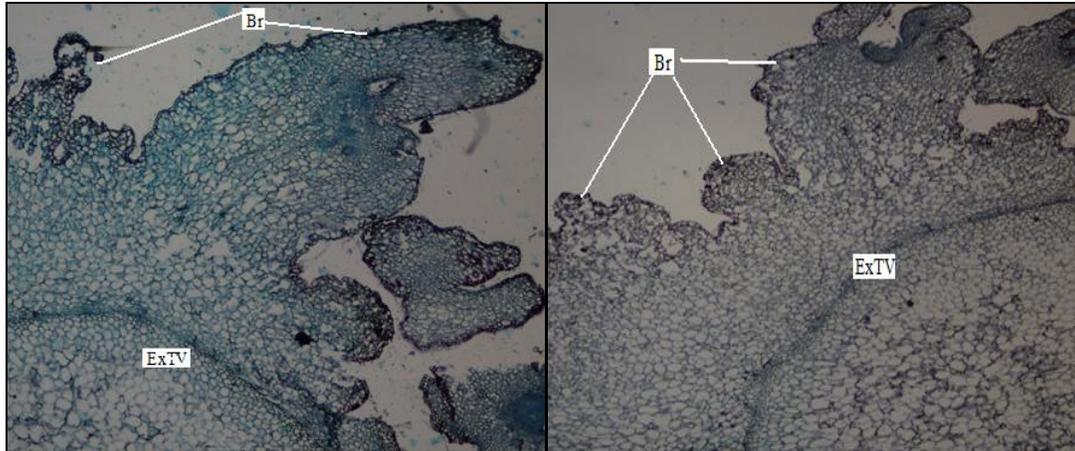


Figura 3.25 Brotes organogénicos, nótese la conexión directa entre su tejido vascular y el del explante, (Br) brotes, (ExTV) tejido vascular del explante.