

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERA EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**DETERMINACIÓN DE LA TASA DE CONVERSIÓN DE EMBRIONES
SOMÁTICOS DEL CLON PROMISORIO DE PIÑÓN (*Jatropha curcas* L.) CP0
52.**

AUTORA:

GABRIELA ESTEFANIA PAZMIÑO GONZÁLEZ

DIRECTORA:

IVONNE VACA

Quito, Abril del 2015

**DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO
DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Autorizo a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además, declaro que los conceptos, análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Quito, Abril del 2015

Gabriela Estefanía Pazmiño González

C.I: 1717006538

DEDICATORIA

A Dios por derramar bendiciones sobre mí y llenarme de su fuerza para vencer todos los obstáculos desde el principio de mi vida.

A mi madre por su esfuerzo y sacrificio, por brindarme todo el amor, la comprensión, el apoyo incondicional y la confianza en cada momento de mi vida y sobre todo por ser mi amiga “la mejor de todas”, mi ejemplo de lucha por ser mi guerrera.

A mis hermanas mil gracias por formar parte de mi vida, por ser las personas que siempre están conmigo en todo momento, por alegrar mi vida con su presencia y por ser parte de este sueño.

A mi esposo, por su amor y comprensión, por sus palabras de confianza, por brindarme el tiempo necesario para realizarme profesionalmente, por ser el pilar de mi vida, por ser mi fuerza y mis ganas de seguir adelante.

A mi hermoso hijo quien desde su existencia alegró mi vida, para quien ningún sacrificio es suficiente, gracias mi Martincito por ser la motivación más grande para concluir con éxito este proyecto.

A todos los amigos que conocí en este proceso e hicieron inolvidable cada momento:

Mami Geo gracias por su confianza, por estar conmigo siempre brindándome una mano, por ser una verdadera amiga que ha estado en los buenos y malos momentos.

Dianita Iles por tu amistad y consejos recibidos, por tu apoyo incondicional para la culminación de este proyecto, por ser más que una jefa por ser mi amiga.

Y finalmente a mis grandes amigos Angie, Pao, Thaly, Yami, Katic, Bachita, Santi (Chiquito) por su gran amistad, por la ayuda brindada en este sueño.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), especialmente al Departamento Nacional de Biotecnología a través del Dr. Eduardo Morillo, líder del departamento, por su constante apoyo, sus indicaciones y orientaciones indispensables en el desarrollo de este trabajo.

A la Lic. Katherine Orbe por el apoyo, confianza, por sus valiosas sugerencias en el transcurso de mi tesis.

A la Ing. Dianita Iles, por compartir sus conocimientos, por el apoyo y la amistad brindada en el logro de este sueño.

A la Universidad Politécnica Salesiana, especialmente a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, a mi Directora, Ing. Ivonne Vaca, por su amistad, por su tiempo, apoyo incondicional y aportes brindados durante todo el proceso de elaboración de mi Tesis.

INDICE

CAPITULO 1	1
INTRODUCCION	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación.....	2
1.3 Objetivos de la investigación	3
1.4 Hipótesis.....	3
CAPITULO 2	4
MARCO TEORICO	4
2.1Cultivos energéticos	4
2.2 Piñón.....	5
2.3 Importancia de <i>Jatropha curcas</i> L.	9
2.4 Propagación de <i>Jatropha curcas</i> . L.....	10
En este cultivo la propagación se realiza mediante vías convencionales puede propagarse	10
2.5 Biotecnología	10
CAPITULO 3	27
MATERIALES Y METODOS	27

3.1 Localización del estudio.....	27
3.2 Condiciones experimentales de laboratorio	28
3.3 Material vegetal.....	28
3.4 Materiales	29
3.5 Fase de inducción de callos embriogénicos	31
3.6 Fase de Regeneración de callos embriogénicos	35
CAPITULO 4	40
RESULTADOS	40
4.1 Fase de inducción de callos embriogénicos	40
CAPITULO 5	53
DISCUSIÓN	53
CAPITULO 6	56
CONCLUSIONES	56
REFERENCIAS	58

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: Taxonomía de Piñón (<i>Jatropha curcas</i>)	6
Tabla 2. Condiciones del sitio experimental	27
Tabla 3. Características del cuarto de cultivo del Laboratorio de Biotecnología, Cutuglagua, 2014.	28
Tabla 4. Medios de cultivo para la inducción in vitro de callos embriogénicos de <i>J. curcas</i> CP052 con diferentes concentraciones de KIN, BAP, AIA e IBA, Cutuglagua, 2014.	32
Tabla 5. Diseño experimental: Análisis de Varianza (ADEVA) para la etapa de inducción de callogénesis en <i>J. curcas</i> , Cutuglagua, 2014.	35
Tabla 6. Tratamientos para la fase de regeneración de callos embriogénicos de <i>J. curcas</i> CP052, Cutuglagua, 2014.	38
Tabla 7. Prueba no paramétrica Kruskal- Wallis y DMS para la variable crecimiento de callo formado a los 30 y 50	41
Tabla 8. Prueba no paramétrica Kruskal- Wallis para la variable Tipo de callo formado ...	43
Tabla 9. Tabla de contingencia para la variable Tipo de callo formado respecto a los tratamientos de inducción durante el estudio. Estación Experimental Santa Catalina (EESC- INIAP), 2014.	44
Tabla 10. Prueba de chi cuadrado para la variable color de callo formado	45
Tabla 11. Tabla de contingencia para la variable color de callo	45
Tabla 12. Prueba de chi cuadrado para variables consistencia de callo	46
Tabla 13. Tabla de contingencia para la variable consistencia de callo	47
Tabla 14. Tabla de contingencia para la variable formación de callos embriogénicos	47

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Centros de diversidad y distribución mundial de <i>Jatropha curcas</i>	5
Figura 2. Nervadura central de <i>Jatropha curcas</i>	7
Figura 3. A. Semilla con tegumento, B. Semilla sin tegumento.....	9
Figura 4. Micropropagación vegetal.....	12
Figura 5. Etapas de la embriogénesis somática y cigótica	18
Figura 6. Sistemas de inmersión temporal automatizada	24
Figura 7. Biorreactor en estado de reposo (1); comienza a ingresar aire al sistema (2); plantas inmersas en el medio de cultivo (3); el medio de cultivo desciende por gravedad a la recámara inferior (4).....	25
Figura 8. 1. Callo frágil, 2. Callo compacto.	34
Figura 9. A. Primer subcultivo a los 10 días de siembra. B. Segundo subcultivo a los 15 días de siembra.	35
Figura 10. Porcentaje de crecimiento de callo en la etapa de inducción durante el estudio —Determinación de la tasa de conversión de embriones somáticos del clon promisorio de piñón (<i>Jatropha curcas</i> .L) CP 052 en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC- INIAP)	42

LISTADO DE ANEXOS

Anexo 1. Desinfección de material vegetal de piñón (<i>Jatropha curcas</i>).	67
Anexo 2. Introducción de material vegetal de piñón (<i>Jatropha curcas</i>).	67
Anexo 3. Callos embriogénicos de piñón (<i>Jatropha curcas</i>).	68
Anexo 4. Embrión en estado torpedo de <i>Jatropha curcas</i>	68
Anexo 5. Desinfección, armada y preparación de medios de cultivo en RITAS.	69
Anexo 6. Sistemas de inmersión temporal RITAS con callos de <i>Jatropha curcas</i>	69
Anexo 7. Callos organogénicos de <i>Jatropha curcas</i> en sistemas de inmersión temporal RITAS.....	70

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la tasa de conversión de embriones somáticos del clon promisorio de piñón (*Jatropha curcas* L.) CP 052 del INIAP, a través de la formación de callos embriogénicos y regeneración de los mismos, bajo el uso de Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA®). La investigación se realizó en tres fases; la primera llamada fase de inducción, que inició con la desinfección de hojas, durante esta fase se probaron once medios de cultivo con diferentes combinaciones hormonales de BAP, KIN, IBA y AIA. Al culminar esta fase se estableció un protocolo para la inducción indirecta de embriones somáticos, a partir de hojas para la accesión CP052, en el tratamiento J9 compuesto por 11.42µM AIA+146.87µM BAP, ya que este medio dio paso a la formación de callos embriogénicos y organogénicos de gran tamaño y consistencia compacta, así como también de coloración verde-amarillo.

Para la segunda fase de regeneración, se partió de los callos morfogénicos del mejor tratamiento (J9) de la primera fase de inducción y se los colocó en medio semisólido con M&S a la mitad de su concentración, 30 g/l de sacarosa, 0.203 mg/l de IBA, 0.23 mg/l de KIN, 1.84 mg/l de sulfato de adenina y 7g/l de agar. Posteriormente los callos embriogénicos provenientes de la fase anterior, fueron colocados en los RITA®. Se probaron dos frecuencias (12 y 24h), dos tiempos de inmersión (30 y 60s) y dos volúmenes (100 y 200 ml). Al culminar la evaluación, se observó que la respuesta fue mejor en el tratamiento que exponía a los callos embriogénicos a la frecuencia de 12 horas por 30 segundos y 100 ml de medio de cultivo, número promedio de embriones en estado globular fue 1.99, en estado acorazonado 1.24 y brotes organogénicos fue de 3.21.

Finalmente en la fase de conversión de embriones somáticos se procedió a introducir los embriones en los medios de germinación con un total de 6 embriones, sin embargo, no se obtuvo respuesta positiva.

Palabras claves: *Jatropha curcas*, biotecnología, callos, embriogénesis, Sistema RITA®, conversión.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the rate of conversion of somatic embryos of promising clone piñón (*Jatropha curcas* L.) CP 052 INIAP, through the formation of embryogenic callus and regeneration thereof under temporary immersion systems automated (RITA®). The research was conducted in three phases; the first call induction phase began with the disinfection of leaves of adult plants during this phase 11 media culture were tested with different hormone combinations of BAP, kinetin, IBA and IAA. Upon completion of this phase a protocol for indirect induction of somatic embryos was established from leaves for accession CP052, with medium composed 11.42uM AIA + 146.87uM BAP, as the latter gave way to the formation of embryogenic callus and large size organogenic and compact consistency, as well as green-yellow coloring, plus this stage was crucial to choose the best treatments for the next phase, so choosing the J9, J10, J11 treatments.

For the second phase or regeneration, he departed from the morphogenic calluses best (J9) of the first induction phase and they were placed in semi solid medium with half of its concentration, 30 g/l of sugar, 0.203 mg/l of IBA, 0.23 mg/l of KIN, 1.84 mg/l of adenine sulfate and 7g/l of agar. Later embryogenic calli from the preceding stage were placed in containers RITA®. Culture medium was tested with two immersion frequency (every 12 and 24 hours) for 30 and 60 seconds respectively. Upon completion of the evaluation, it was observed that exposure of embryogenic callus frequency of 12 hours per 30 seconds, significantly increases the number of embryos with an average of embryos in globular state (1.99), embryos acorazonado state (1.24) and shoots organogenics (3.21).

Finally in phase conversion of somatic embryos it proceeded to introduce embryos in germination media a total of six embryos, however, no positive response was obtained. In addition to not having sufficiently representative data to apply an experimental design, this was not done.

Keywords: *Jatropha curcas*, biotechnology, callus, embryogenesis, RITA® System, conversion.

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 Formulación del problema

El impacto mundial que ha causado el uso de biocombustibles en los últimos años, los ubica hoy en el centro de la escena política, económica y energética; por la necesidad de buscar alternativas para reemplazar los combustibles fósiles (Quimbayo, 2010, pág. 8). La demanda de aceites para producción de biodiesel va en aumento, abriéndose un nuevo escenario para el estudio y producción de especies oleaginosas, tales como, *Jatropha curcas* Linn, conocida comúnmente como piñón (Peralta, 2010, pág. 3).

La población mundial crece más rápido que el crecimiento de la demanda del combustible líquido. Las Reservas Mundiales tienen tendencia de agotarse en los futuros 35 - 40 años, razón por la cual la producción de energía renovable, ha adquirido importancia mundialmente a partir de la primera crisis petrolera, en la década de los 70s, por razones políticas y actualmente por razones ambientales, debido al calentamiento del planeta ocasionado por el consumo de hidrocarburos en la generación de energía, que produce polución ambiental, tanto térmica como atmosférica y que ocasionan el efecto invernadero (Rengifo, 2010, pág. 1).

Es por esto que desde el 2007, el Gobierno Nacional con participación del Ministerio de Electricidad y Energía Renovable, la Corporación Técnica Alemana y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria han creado políticas de apoyo para la investigación, con el objetivo de incrementar y mejorar la producción de plantas oleaginosas enfocándose principalmente en el cultivo de piñón (Aguilar, 2013, pág. 1).

Sin embargo, la falta de tecnología y la utilización de técnicas tradicionales para propagar el piñón no son suficientes para establecer cultivos masivos, una de estas técnicas es la

propagación por medio de estacas de la cual se obtiene un número reducido de individuos clones, por lo que es un gran problema satisfacer una alta demanda de plantas. Otro tipo de propagación tradicional es la obtención de plantas por vía cigótica a partir de semilla la cual no garantiza transmitir las características exactas de sus progenitores ya que existe combinación del material genético debido a la fecundación.

1.2 Justificación

Las formas tradicionales de propagación de *J. curcas*, vía semilla y en forma vegetativa a través de estacas, son adecuadas; sin embargo, para la producción de plantas con una alta identidad genética y en forma masiva, estos métodos no son los óptimos puesto que las plantas en un porcentaje significativo pueden tener características no deseadas para los productores como un bajo nivel de producción, poca adaptabilidad al clima, falta de nutrientes, inestabilidad de la planta por ausencia de una raíz principal, variabilidad genética en términos de crecimiento, biomasa, rendimiento de semilla y contenido de aceite, entre otros (Aguilar, 2013, pág. 2).

Según Bellotti y Roca (2009, p. 255); la falta de tecnologías para la producción de material de siembra, en cantidad suficiente y en condiciones fitosanitarias óptimas, se ha convertido en un obstáculo para el desarrollo a escala comercial de cultivos de interés, como *J. curcas*. Estas limitaciones representan una oportunidad para la aplicación de la biotecnología, específicamente de las técnicas de cultivo de tejidos o propagación *in vitro*.

Por esta razón es necesario investigar técnicas *in vitro*, tales como la embriogénesis somática para garantizar una producción masiva de plántulas en menor tiempo, manteniendo la identidad genética de los materiales seleccionados. Además, de disminuir costos de producción y la posibilidad de automatizar el proceso productivo con el uso de los Sistemas de Inmersión Temporal mediante (RITAS®) que permiten mejorar el intercambio de gases, aumentando de esta forma los índices de multiplicación, desarrollo y productividad del material propagado.

Es así que, el Departamento Nacional de Biotecnología del INIAP tiene como objetivo continuar con las investigaciones realizadas por Aguilar (2013), determinando la tasa de conversión de embriones somáticos, con la finalidad de obtener plantas clones a gran escala que permitan crear una fuente de producción rentable para el cultivo de piñón

1.3 Objetivos de la investigación

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la tasa de conversión de embriones somáticos del clon promisorio de piñón (*Jatropha curcas* L.) CP0 52.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar la inducción de callos embriogénicos del clon promisorio de *Jatropha curcas* L. CP052.
- Evaluar dos tiempos de inmersión y dos frecuencias para la regeneración de callos embriogénicos del clon promisorio de *Jatropha curcas* L. CP052.
- Evaluar la tasa de conversión de embriones somáticos del clon promisorio de *Jatropha curcas* L. CP052.

1.4 Hipótesis

H_a=existe conversión de embriones somáticos del clon promisorio de *Jatropha curcas* CP052

H_o= No existe conversión de embriones somáticos del clon promisorio de *Jatropha curcas* CP052

CAPITULO 2

MARCO TEORICO

2.1 Cultivos energéticos

Los cultivos energéticos suponen plantas de crecimiento rápido destinadas únicamente a la obtención de energía o como materia prima para la obtención de otras sustancias combustibles (Delgado, 2008, pág. 45).

Estos cultivos energéticos se pueden clasificar según Toscano (2009, pág. 25), por el tipo de suelo donde crecen, por el tipo de producto que se cosecha, etc.

También se pueden clasificar según su aprovechamiento final:

- Cultivos oleaginosos para la producción de aceites transformables en biodiésel.
- Cultivos alcoholígenos para la producción de bioetanol a partir de procesos de fermentación de azúcares.
- Cultivos lignocelulósicos, para la generación de biomasa sólida (IDAE, 2007).

Es así que en los últimos años se han descubierto las bondades de los cultivos energéticos razón por la cual se encuentran en el centro de atención de las investigaciones que se desarrollan a nivel mundial; en el Ecuador a través de instrumentos jurídicos como:

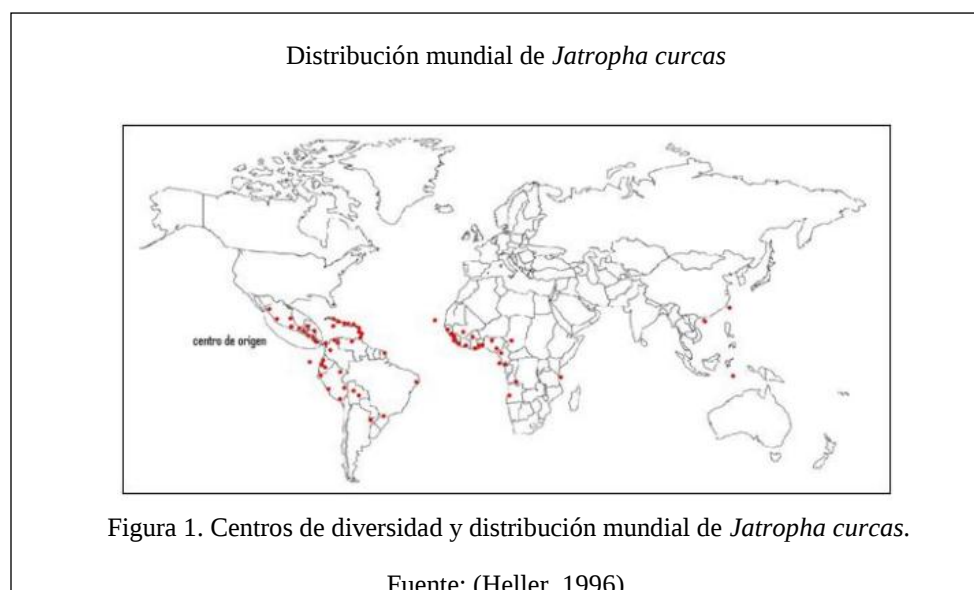
El Decreto Ejecutivo No. 482 el 15 de Diciembre de 2004, ha declarado de interés nacional la producción, comercialización y uso de biocarburantes como componentes de la formulación de combustibles. En nuestro país el Gobierno Nacional junto con el Ministerio de Ambiente ha dado inicio al programa “Cero combustibles fósiles en Galápagos”(PNUD, 2010, pág. 48).

2.2 Piñón

2.2.1 Generalidades

El piñón es una oleaginosa de porte arbustivo, con más de 3500 especies agrupadas en 210 géneros (Alfonso, 2008, pág. 1).

Es originaria de México y Centroamérica, pero crece en la mayoría de los países tropicales. Se cultiva en América Central, Sudamérica, Sureste de Asia, India y África (Figura 1). La palabra *Jatropha* proviene del griego *iatros* que significa médico y *trophè alimento* (Alfonso, 2008, pág. 3).



2.2.2 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de *Jatropha curcas* se presenta en la tabla 1:

Tabla 1:

Taxonomía de Piñón (*Jatropha curcas*)

Reino	Plantae
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Malpighiales
Familia:	Euphorbiaceae
Género:	<i>Jatropha</i>
Especie:	<i>Jatropha curcas</i>
Nombre común	Piñón

Nota: (APGIII, 2009).

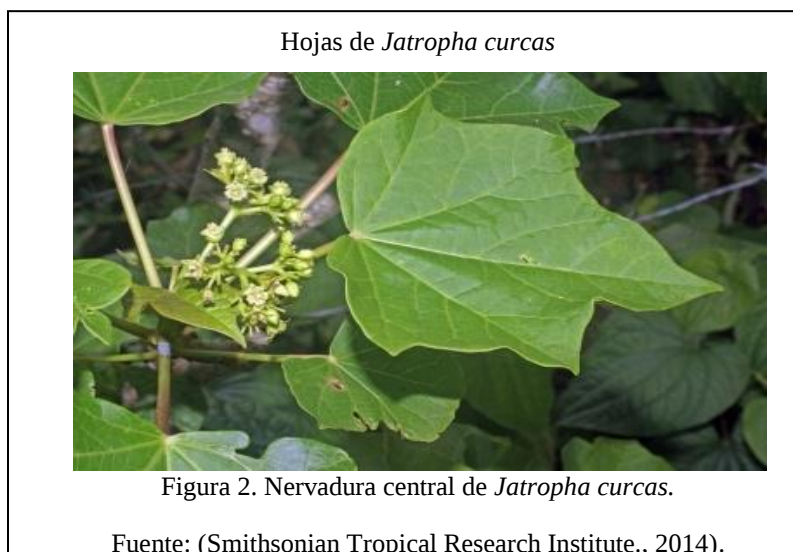
2.2.3 Descripción Morfológica

Tallo

Es un arbusto grande, de crecimiento rápido, cuya altura normal oscila entre rangos de 2-8 m dependiendo de las condiciones climáticas del lugar (Alfonso, 2008, pág. 2). El tronco presenta un fuste ramificado a poca altura y una corteza lisa de madera suave, médula desarrollada poco resistente, de aproximadamente 20cm de diámetro, cuyo color es blanco grisáceo; floema con largos canales que se extienden hasta las raíces, por los cuales circula el látex, jugo lechoso que brota con abundancia de cualquier herida (Martoli, 2008, pág. 5).

Hojas

Tiene hojas de color verde, normalmente con 3 a 5 lóbulos acuminados poco profundas y grandes. Las nervaduras son blanquecinas, resaltadas o salientes en la parte interior de la lámina foliar (Figura 2). El ancho de las hojas es de 9 a 15 cm (Ponciano, Pereira, & Esfrain, 2008, pág. 2).



Flores

La floración es monoica, presentándose los órganos masculino y femenino en la misma planta, las inflorescencias se forman terminalmente en el axial de las hojas en las ramas (Alfonso, 2008, pág. 4). Ambas flores, son pequeñas (6-8 mm), de color verdoso amarillo en el diámetro y pubescente. Cada inflorescencia muestra un racimo aproximadamente 5-10 frutos (Martoli, 2008, pág. 8).

Frutos

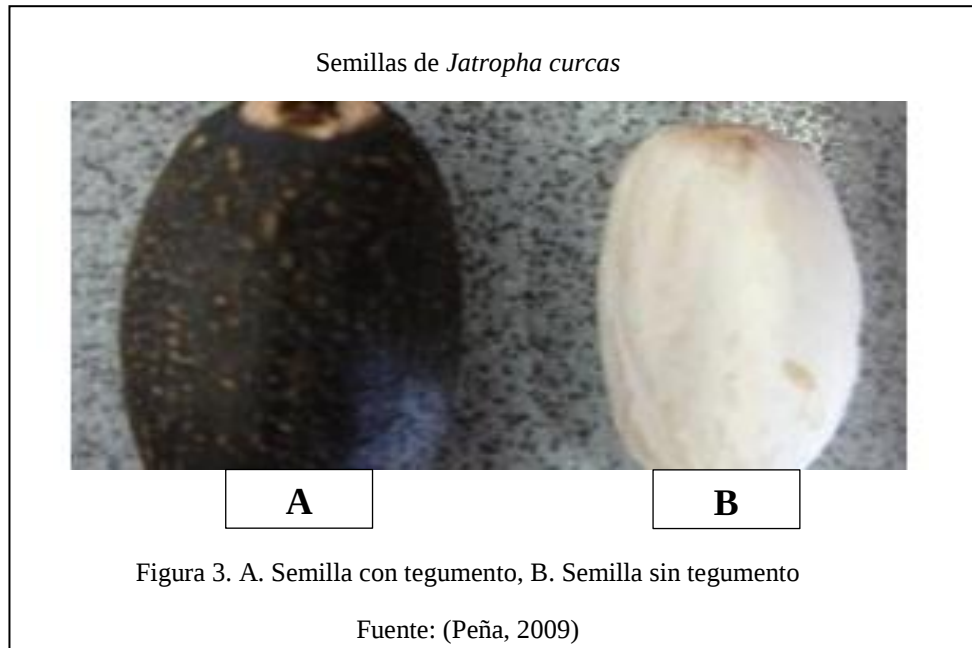
El fruto del piñón es seco, con tres lóculos, liso, coriáceo, capsular, ligeramente corpulento, con el ápice y la base de forma aguda. Entre los carpelos se puede distinguir la presencia de surcos suaves. El endocarpio es leñoso (rígido y duro), con pequeños orificios en los puntos de unión de los carpelos, a través de los cuales pasan cordones fibrosos que se distribuyen por las partes dorsal y ventral de los lóculos. El fruto seco presenta dehiscencia, provocando que los lóculos se abran longitudinalmente exponiendo las semillas (Nunes, Dos, Pasqual, & Teixeira, 2009, pág. 7).

Además, el fruto está constituido por un pericarpio de cáscara dura y leñosa; en un inicio, es de color verde, luego se vuelve amarillo, castaño y negro, de acuerdo al estado de maduración. El fruto tiene una medida de 2,5 a 4 cm de longitud y 1,5 a 3 cm de diámetro (Nunes, 2007, pág. 11).

Semillas

La semilla de piñón es relativamente grande, de tegumento quebradizo, y estructura resinosa. La semillas maduran luego de que la cápsula cambia de color verde a amarillo aproximadamente de dos a cuatro meses luego de la fertilización (Vendiola & Idlao, 2006, pág. 14).

En la parte superior posee una prominencia carnuda, la carúncula, que se encuentra próxima a la micrópila. Cuando la semilla está seca, la carúncula tiene una extremidad cónica con dos lóculos escasamente visibles. Las dimensiones de las semillas cuando están secas son aproximadamente: 1.3 a 1.7 cm de largo y 0.5 a 1.5 cm de ancho (Figura 3)(Nunes, Dos, Pasqual, & Teixeira, 2009, pág. 12).



2.3 Importancia de *Jatropha curcas* L.

J. curcas es una especie perenne multipropósito de rápido crecimiento, con un ciclo productivo comprendido entre 30 – 50 años (Jongschaap, Corre, Bindraban, & Brandenburg, 2007, pág. 21). El cultivo de *J. curcas* es de gran interés para los sectores públicos y privados, en parte, atribuido a su potencial como materia prima para la producción de biodiesel (King, y otros, 2009, pág. 42). La relevancia económica de esta especie para la producción de biodiesel ha promovido la distribución de germoplasma en el mundo entero; sin embargo, la falta de conocimiento sobre la genética de la especie y la ausencia de variedades mejoradas limitan el éxito de la especie como un cultivo energético (Sudhakar, 2011, pág. 21).

Sus usos medicinales y mecanismos de acción han despertado interés, debido a la alta producción de aceite a partir de la semilla que se considera como sustituto potencial del petróleo, que puede usarse como combustible para motores diésel (Jones & Miller, 1996, pág. 54).

Por el efecto tóxico de la semilla puede usarse como insecticida, raticida y contra babosas. La industria farmacéutica emplea las hojas como fuente de Beta-sitoesterol, estigamesterol y campesterol, para la fabricación de medicamentos anticonceptivos, antiinflamatorios e inhibidores de cáncer femenino (Muñoz, Valerin, Alveranga, & Alan, 2010, pág. 55).

2.4 Propagación de *Jatropha curcas*. L

En este cultivo la propagación se realiza mediante vías convencionales puede propagarse por la vía vegetativa y por semillas. En la propagación vegetativa, utilizando estacas se obtiene mayor precocidad de producción y se reproducen con mayor fidelidad las características de la planta madre. Por otro lado, las plantas establecidas a partir de semillas presentan mayor variabilidad genética en relación a la planta madre, son más vigorosas, pero inician la producción más tardíamente (Enciso & Castillo, 2010).

2.5 Biotecnología

La biotecnología se define como toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos. La tendencia mundial actual se orienta hacia el establecimiento de plantaciones forestales comerciales para obtener materia prima más homogénea, barata y reducir la presión sobre el bosque natural (Buitrago, 2008, pág. 7).

Actualmente se utilizan los progresos de la biotecnología agrícola para incrementar la productividad de los cultivos, especialmente mediante la reducción de los costos de producción logrados disminuyendo la necesidad de plaguicidas, sobre todo en las zonas templadas. La aplicación de la biotecnología puede mejorar la calidad de vida, creando cepas de mayor rendimiento, o que pueden crecer en ambientes diversos, lograr una rotación mejor para conservar los recursos naturales o plantas más nutritivas, que se conservan mejor cuando están almacenadas o están siendo transportadas. Se consigue así un abastecimiento continuo de alimentos a bajo costo (Romero, 2008, p. 9)

2.5.1 Cultivo *in vitro*

La propagación de plantas *in vitro* es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica. Permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, embriones y obtener individuos selectos en forma rápida (Figura 4) (Segretin, 2008, pág. 4).

Dentro de las técnicas de cultivo *in vitro* utilizadas para la propagación de tejidos vegetales se mencionan la organogénesis, la embriogénesis somática y fusión de protoplastos (Atares, 2011).

2.5.2 Ventajas de la micropropagación

- Posibilita incrementar rápidamente nuevos materiales.
- Permite controlar las condiciones ambientales.
- Permite estudiar diversos procesos fisiológicos.
- Evita el riesgo de que proliferen agentes patógenos
- Se pueden obtener gran cantidad de individuos en espacios reducidos.
- Permite la obtención de individuos uniformes.
- Facilita el transporte del material (Segretin, 2008, pág. 6).

2.5.3 Organogénesis

La organogénesis consiste en la formación de nuevos órganos (raíces y/o brotes adventicios) en los explantes cultivados *in vitro* (Ruiz, 1999, pág. 53).

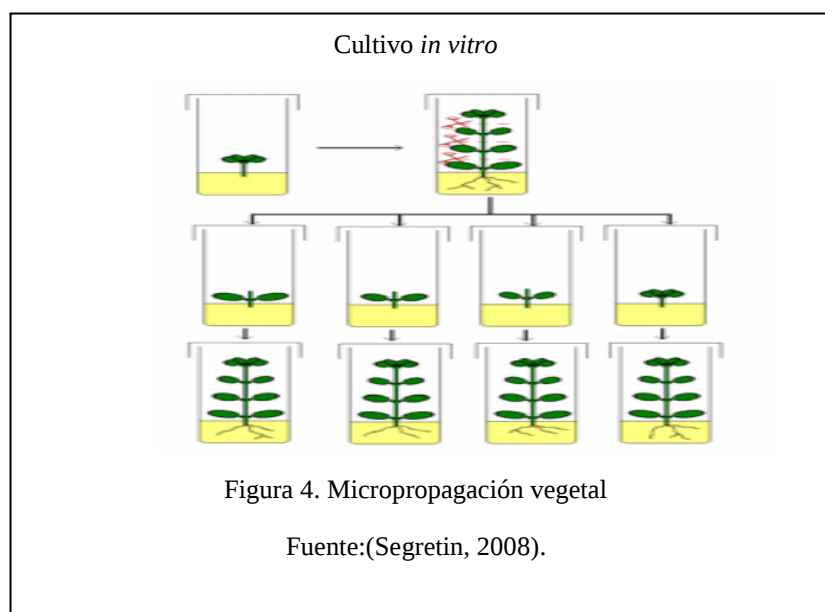
Esta técnica permite la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de este en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el enraizamiento final (Paucar, 2011, pág. 30).

En contraste con la embriogénesis somática, en la vía organogénica para la formación de una planta completa, ya sea por la vía directa o indirecta, se requiere de una secuencia de

medios de cultivo, ya que aquellos medios que favorecen el desarrollo de los brotes inhiben la formación de raíces y viceversa (Pérez, 1998, pág. 18).

En el piñón (*Jatropha curcas* L) existen varios estudios para la multiplicación de plantas mediante ésta técnica, (Mazariegos, 2011) realizó investigaciones de propagación *in vitro* encontrando que la mejor concentración de ANA (auxina) para la inducción de brotes fue de 0.3 mg/l obteniendo una elongación del brote de 2.77 cm de altura y asimismo, determinó que BAP no tiene efecto significativo sobre la longitud de la planta.

Mientras que Peña (2009), en su estudio sobre el establecimiento y evaluación de protocolos de desinfección, introducción y multiplicación *in vitro* de Piñón determinó que el uso de azúcar, agua de coco y carbón activado, en bajas concentraciones resultó eficaz en la obtención de plántulas completas de piñón, asimismo indicó que las altas concentraciones de IBA y BAP produjeron callo y hojas de mayor tamaño. Además, encontró que el uso de concentraciones bajas de GA3 favorece el desarrollo temprano de tallos, yemas y hojas.



Según Prada (2012), en su estudio de regeneración de plantas vía organogénesis y crioconservación de *J. curcas* L. demostró que el mejor medio para la inducción de brotes axilares en explantes de nudo cotiledonar fue el M&S con 0.5 mg/l de BAP que permitió la producción de 2.06 promedio de brotes por explante.

Tipos de organogénesis

Organogénesis directa: es la formación de órganos directamente sobre la superficie de explantes cultivados intactos. El proceso no implica la formación de callo (Paucar, 2011, pág. 15).

Peraza (2008), realizó estudios en organogénesis directa en accesiones de *Jatropha curcas* con M&S, 3% de sacarosa, 0.2 % de Gelrite, en donde del total de 14 tratamientos, 11 diferenciaron brotes en grandes cantidades, mismos que empezaron a aparecer a partir de 28 días posteriores a la siembra.

Organogénesis indirecta: es la formación de órganos en tejidos de callo derivados de explantes (Ruiz, 1999, pág. 45).

Muñoz, Valerin, Alveranga, & Alan (2010) emplearon un medio de cultivo con sales y vitaminas M&S (1962), 3% de sacarosa y reguladores de crecimiento. La adición de estos reguladores en el medio indujo la formación de callo y variación somaclonal. Se inocularon segmentos de hoja en un medio de cultivo que contenía el 50% de las sales de M&S (1962), complementado con las vitaminas, 2mg/L de IBA, y 1% de sacarosa, se colocaron en la oscuridad y se obtuvieron callos friables efectivos para el establecimiento de suspensiones.

Etapas del Cultivo de Tejidos

Etapas 0

Se refiere al mantenimiento de la planta madre, es decir en condiciones sanitarias óptimas, con una nutrición y riego adecuados, para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Espinoza, 2014, pág. 18).

Según Oyuela (2012), los mejores resultados en cultivos de piñón se han obtenido en terrenos con pendientes que evitan la acumulación de aguas lluvia, puesto que es una especie sin necesidad de riego aunque su rendimiento es menor que cuando se aplican riegos periódicos, especialmente durante la época de sequía, es así que el bajo requerimiento de agua para su desarrollo y producción de frutos, semillas/granos es otra de las razones poderosas para que el piñón se torne un cultivo energético de gran valor estratégico.

Etapas I: Fase preparativa

Preparación de medios de cultivo, componentes y material vegetal: Mendieta (2002), indica que el medio de cultivo está compuesto básicamente por: agua, sales minerales, hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas y en algunos casos reguladores de crecimiento. Además, se utilizan elementos que den consistencia al medio que suelen ser agar o gelatina simple.

Etapas 2: Fase de establecimiento: iniciación *in vitro*

Se requiere que los explantes sean transferidos al medio de cultivo de forma aséptica, convenientemente esterilizados, tanto el explante con ayuda de agentes desinfectantes (NaOCl, NaOCa, etc.), como el medio de cultivo mediante esterilización (Sierra de Grado, 2002, pág. 54).

Pierick, (1990) determinó que en *Jatropha curcas* no es aconsejable utilizar en la desinfección etanol al 96%, ya que produce una excesiva deshidratación en el tejido.

Hay una vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad es casi generalizado el empleo de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1 al 3 % contenido en productos de uso doméstico. Con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio (Ca(OCl)_2) del 6 al 12% y el cloruro de mercurio (HgCl_2) del 0,1 al 1,5%, aunque hay que recalcar que este último compuesto es altamente tóxico y que no es fácilmente removible del explante (Roca, 1991, pág. 34),

Etapas 3: Multiplicación

El objetivo principal de esta etapa es incrementar el número de unidades individualizables con las que se pueda repetir el proceso de regeneración por explante. Cuando la finalidad principal es la conservación *in vitro* es casi obligado recurrir a la proliferación a partir de meristemos o yemas ya existentes, ya que con este tipo de explantes es altamente probable que se mantenga la fidelidad genética de la especie en cuestión a lo largo de todo el proceso de micropropagación (Cano, 2013, pág. 15).

Etapas 4: Enraizamiento y Aclimatización

Se produce la formación de raíces adventicias. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (principalmente auxinas) para promover la rizogénesis (Jones & Miller, 1996, pág. 72).

Los sustratos incluyen: medio con agar, medio nutritivo o agua. El enraizamiento *ex vitro* permite que el enraizamiento y aclimatización se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base de las estacas (Vargas, 2003, pág. 7).

2.5.4 Embriogénesis somática

Es la formación de un embrión a partir de una célula o grupo de células no sexuales. Son estructuras bipolares con un eje radial-apical que no poseen conexión vascular con el tejido madre, el cual es capaz de crecer y formar individuos totalmente normales (Muñoz, Valerin, Alveranga, & Alan, 2010, pág. 21).

Según Trigiano (2000), la embriogénesis somática requiere que las células especializadas se encuentren separadas del tejido adyacente y que sea una célula simple. Además, deben estar rodeadas de medio de cultivo que contenga los nutrientes necesarios para el crecimiento del embrión (Freire, 2009, pág. 38).

Existen dos estrategias para inducir una embriogénesis somática: directa o embriogénesis somática de baja frecuencia y la otra, denominada indirecta o embriogénesis somática de alta frecuencia (Gatica, 2002, p. 120). En la primera, no comprende ninguna fase de callo diferenciado, aparecen entre las doce y catorce semanas de cultivo y se desarrollan completamente pasando por los diferentes estadios; mientras que, en la segunda los embriones aparecen a partir de un callo secundario, y aparecen entre las dieciséis y veinte semanas, presenta coeficientes de multiplicación más elevados, pero puede conducir a variaciones genéticas (Pérez, 1998, pág. 45).

2.5.4.1 Fases de la embriogénesis somática.

- **Inducción**

Es el proceso de conversión de células somáticas en células embriogénicas, con la presencia de auxinas en el medio de cultivo (Barreto, 2003, pág. 24).

En el estudio de embriogénesis somática realizado por Jha, Mukherjee, & Mukul (2007), se obtuvieron callos embriogénicos de explantes de hoja de *J. curcas* sobre medio basal M&S suplementado con sólo 9,3 mM KIN. La inducción de embriones somáticos globulares del 58% de los cultivos se logró en medio M&S con diferentes concentraciones de 2.3 hasta 4.6 mM KIN y 0,5 a 4,9 mM IBA; siendo 2,3 mM KIN y 1,0 mM IBA la combinación más efectiva para la inducción de embriones somáticos.

Según Aguilar (2013), el mejor protocolo para la inducción indirecta de embriones somáticos a partir de hojas del clon promisorio de piñón CP052 fue el medio compuesto por 2 mg/l de KIN.

- Proliferación

Es la etapa cuyo objetivo es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (Delgado, 2008, pág. 35).

La proliferación de células embriogénicas se ve afectada por varios factores, algunos de los cuales pueden ser controlados durante el proceso; el factor más fuerte asociado a la proliferación de las células es la presencia de auxina (Pérez, 1998, pág. 49).

- Regeneración

En esta fase las células proembrionarias se diferencian y forman embriones somáticos, para lo cual es necesario que exista una disminución de la concentración de auxinas.

La célula que generará al embrión sufre una serie de divisiones que dará origen al primer estadio de la embriogénesis somática, posteriormente se continúa el desarrollo hasta llegar al estado torpedo (Figura 5) (Barreto, 2003, pág. 34).

Aguilar (2013), en su estudio de regeneración de *J. curcas* probó dos medios de cultivo con dos frecuencias de inmersión en el cual observó que la exposición de los callos embriogénicos a la frecuencia de 4 horas aumenta significativamente el número de embriones.

En el estudio realizado por Chan & Rivera (2009), los callos obtenidos de raíces y hojas de *Jatropha curcas* mostraron embriones globulares casi al mismo tiempo, pero fue mayor el rendimiento en los primeros.

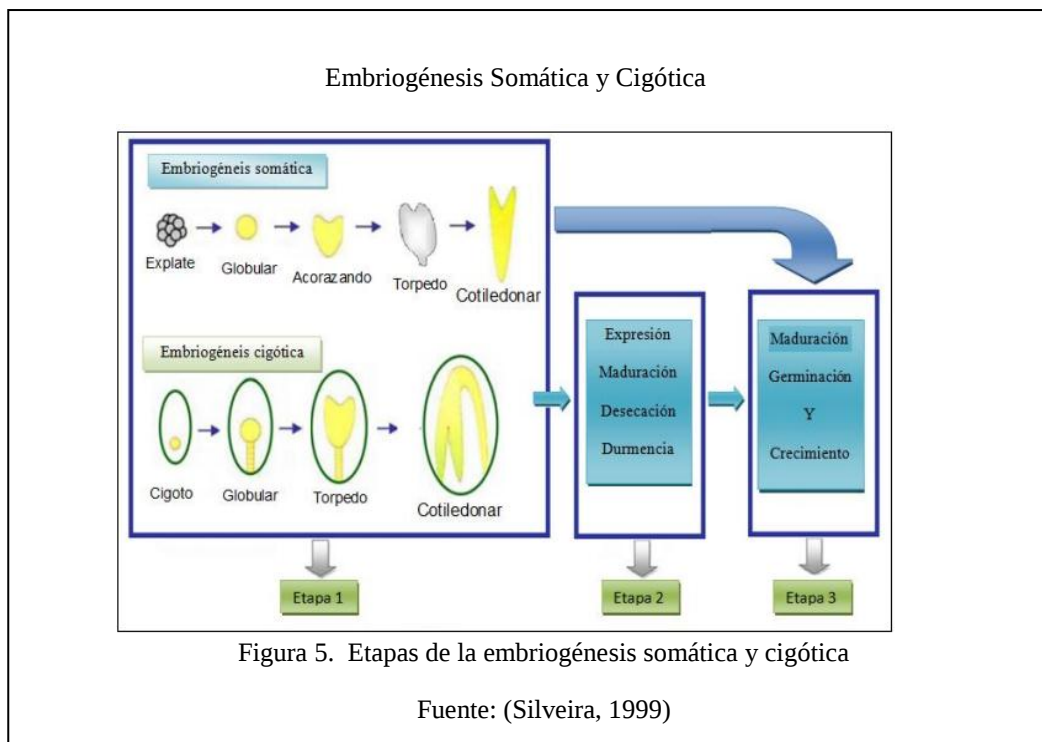
- Germinación y conversión en plantas de embriones somáticos

En la mayoría de los trabajos realizados se hace poca distinción entre los procesos de germinación y conversión (Merkle, 1995, pág. 84). No teniéndose en cuenta que la germinación solo se refiere al desarrollo de la raíz y el brote.

Se sugiere el empleo de tratamientos postmaduración para mejorar la germinación de los embriones somáticos, como por ejemplo bajas temperaturas (Das, Reddy, Upadhyaya, &

Sopory, 2002, pág. 37). También juega un papel importante en la germinación la adición de citoquininas en el medio de cultivo, las cuales contrarrestan el efecto provocado por las auxinas durante la inducción y la proliferación.

El tiempo y el tipo de aplicación de los reguladores del crecimiento, baja concentración de oxígeno y desecación de los embriones maduros, son tratamientos que pueden incrementar la eficiencia en la producción de plantas (Freire M. , 2003, pág. 45)



2.5.4.2 Tipos de Embriogénesis Somática

Existen dos tipos de embriogénesis somática:

- La forma directa implica la existencia de células somáticas predeterminadas a seguir la vía embriogénica y las células del explante primario se desarrollan para formar embriones (ej. nucela de cítricos) (Martínez, 2001, p. 22).
- La forma indirecta implica la necesidad de una inducción para que las células sigan la vía embriogénica, tras pasar por una fase proliferativa (callo) y cambiar su competencia a la expresión de embriogénesis (López & Perán, 2008, p. 32).

Freire (2009) en su investigación estableció un protocolo de inducción para embriones somáticos de piñón *Jatropha curcas* por vía indirecta induciendo la formación de callo embriogénico, en donde observó el efecto de los medios de cultivo sobre la sobrevivencia obteniendo como mejor tratamiento el que poseía 3.8 mg/L de BAP y 2 mg/L de AIA.

2.5.4.3 Origen de los callos y sus tipos

Las células especializadas diferenciadas sufren una dediferenciación que origina la formación de callos que poseen células con características totipotentes (Freire, 2009, p. 40).

Este proceso de dediferenciación es caracterizado por cambios en la actividad metabólica, la disminución de productos de reserva y la rápida división celular lo cual conlleva a una no diferenciación de las células parenquimáticas (Freire, 2009, p. 41).

Al no poseer estructuras organizadas durante el cultivo de callo se crea una masa homogénea, que está formada principalmente por células parenquimáticas tanto esponjosas como empalizadas, donde se va a producir actividad meristemática (Evans, Coleman, & Kearns, 2003, p. 25).

La variación del callo en su aspecto general y en otras características físicas depende del tejido madre, la edad del callo y la condiciones de crecimiento a las que se mantenga. El callo puede variar en su coloración puede ser blanco o verde, puede ser o no embriogénico ya sea de forma espontánea o cuando se encuentra en condiciones adecuadas. Además, se pueden distinguir dos tipos de callos:

- **Callo tipo I** es considerado no friable, generalmente se desarrolla a partir de hoja, genera embriones somáticos y organogénesis.
- **Callo tipo II** es considerado friable, tiene la característica de generar solo embriones somáticos y es el adecuado para el establecimiento de suspensiones celulares (Evans, Coleman, & Kearns, 2003, p. 27).

(Laguna, 2011), realizó una investigación para inducir a callogénesis distintos explantos de *Jatropha curcas*, en donde todos los tratamientos mostraron masas callosas y determinó que el 2.4 D a 107.41 μ M produce en fragmentos foliares una mayor proliferación de callos.

2.5.4.4 Factores que afectan la embriogénesis somática

Genotipo de la planta

Existen ciertas especies cuya respuesta embriogénica es específica del genotipo y altamente heredable (Manzanilla, 2004, pág. 35).

El tipo y estado fisiológico de la planta

La embriogénesis somática ha sido inducida a partir de una gran variedad de explantes de plantas, generalmente de embriones cigóticos, semillas germinadas, embriones inmaduros, óvulos, micro esporas, hojas, estilo, células de raíz (Manzanilla, 2004, pág. 35).

Medio de cultivo

El medio de cultivo constituye un elemento fundamental para el cultivo de células, tejidos, protoplastos, anteras y para lograr el desarrollo de embriones, la organogénesis, la micropropagación, etc.

Existen respuestas diferentes de las plantas a cada medio específico, lo cual pone de manifiesto los requisitos particulares nutricionales y hormonales de una especie vegetal determinada (González, 2003, pág. 19). Los minerales son esenciales para la vida de una planta y cumplen funciones específicas durante su desarrollo (Kyte & Kleyn, 1996, pág. 240).

- Fuentes de carbono

Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos, y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono, la sacarosa en concentraciones de 2% a 5% actúa como una fuente de energía; el azúcar es el que más se utiliza (Roca, 1991, pág. 56).

- Constituyentes minerales

Los medios de cultivo deben contener todos aquellos elementos esenciales para el explante, compuesto generalmente por macro o microelementos. Se deben incluir los macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca, y Mg) que son esenciales de los tejidos vegetales e intervienen en la conservación del equilibrio iónico en las plantas, y los microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe, Cl) que participan en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas (Toro, 2004, p. 143).

- Vitaminas

Las vitaminas son requeridas como catalizadores en varios procesos metabólicos (Toro, 2004, p. 144). Favorecen el crecimiento de células de plantas superiores y la diferenciación de los callos, por lo que pueden llegar a ser un factor limitante. Entre las vitaminas utilizadas para el cultivo *in vitro* están: tiamina, ácido nicotínico, piridoxina y myo-inositol (Yáñez, 2011, p. 95).

- Reguladores de crecimiento

La adquisición de totipotencia es el paso más crítico en la embriogénesis somática, es la aplicación de hormonas endógenas, debido a que el uso de las auxinas a altas concentraciones es necesario para causar la desdiferenciación (Manzanilla, 2004, p. 49).

- Auxinas

El nombre auxina significa en griego “crecer” y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación. Existen varias auxinas naturales, tales como el AIA (ácido indolacético), indol-3-acetonitrilo, etilindol-3-acetato, indol-3-carboxialdehído, indol-3-acetaldehído, indol-3-acetamida, ácido indol-3-carboxílico, entre otras. De éstas el AIA es el compuesto de mayor utilización (KRIKORIAN, 1991, p. 246).

Las auxinas sintéticas que más se utilizan en el establecimiento de los cultivos son: 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-butírico (IBA).

Estas generalmente producen elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) formación de raíces adventicias, proliferación axilar y adventicia (Ruiz, 1999, p. 93).

- Condiciones de cultivo

La temperatura óptima de incubación para cada cultivo *in vitro* puede ser un proceso largo, para la mayoría de especies mantenidas *in vitro* se puede obtener resultados satisfactorios con temperaturas de incubación de un rango de 20 y 28°C (Freire, 2009, p. 49).

2.6 Sistemas de propagación *in vitro*

Los métodos disponibles para la propagación de plantas *in vitro* son, en su mayoría, una extensión de aquellos desarrollados para la propagación vegetativa tradicional (George, 1993, p. 25). Sin embargo, estos presentan una serie de ventajas sobre los métodos tradicionales, como la pequeña superficie necesaria para mantener gran cantidad de plantas,

la obtención de plantas libres de bacterias y hongos, la posibilidad de obtener plantas libres de virus, y la posibilidad de producir plantas durante todo el año.

Adicionalmente, las tasas de propagación son mayores que en los sistemas convencionales, lo que permite obtener una gran cantidad de plantas en corto tiempo (Fundación para la Innovación Agraria, 2009).

La tasa a la cual los cultivos *in vitro* crecen pueden estar influidas por la naturaleza física del medio (George, 1993, p. 26). Según esta característica, existen tres tipos de medios en los que se puede realizar un cultivo *in vitro*: semisólido, líquido y en Sistemas de Inmersión temporal.

- Cultivo en medio semisólido

Son aquellos a los cuales se les ha agregado un agente gelificante en donde el explante se mantiene estático sobre el medio, con sólo uno de sus extremos en contacto por donde se realiza la absorción de nutrientes (Lorenzo, et al., 1998, p. 92).

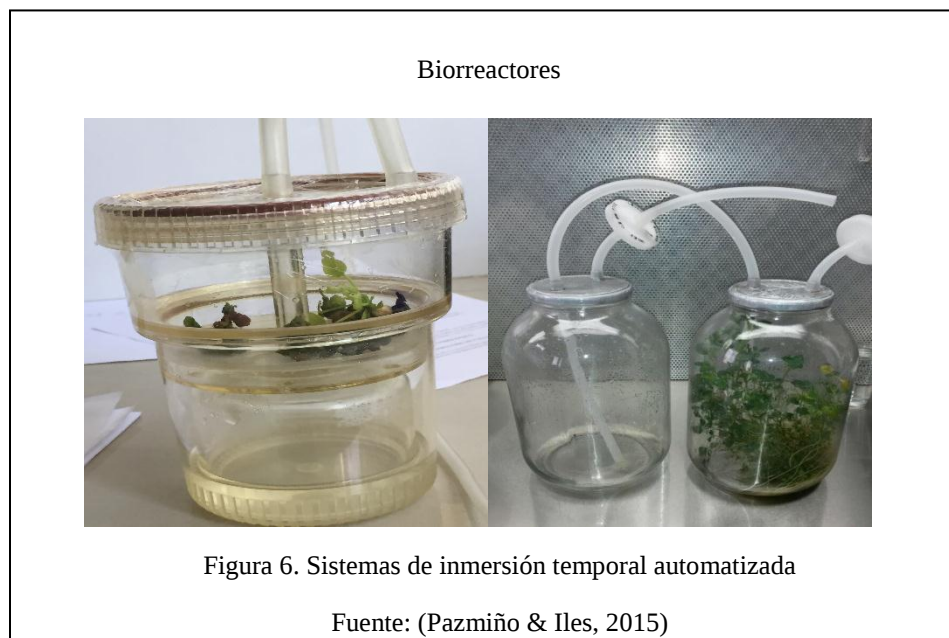
- Cultivo en medio líquido

La utilización de este sistema da como resultado mayores tasas de crecimiento que en medios semisólidos, debido a la mayor superficie de contacto del explante con el medio y a las menores gradientes de difusión entre el medio y el explante, lo que facilita la absorción de nutrientes (George, 1993, p. 28). Sin embargo, la inmersión continua de los tejidos provoca síntomas de stress por oxidación y vitrificación (Damiano, Gentile, La Starza, Frattarelli, & Monticelli, 2003, p. 42).

- Sistema de Inmersión Temporal (SIT)

Son sistemas semi-automatizados en la propagación *in vitro*. Está basado en el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los explantes por un corto período de tiempo y la consecuente renovación de la atmósfera gaseosa, para evitar la hiperhidricidad de los tejidos y la acumulación de gases tóxicos (EcuRed, 2013).

Los problemas que presentan los medios líquidos pueden ser superados por métodos alternativos, como los SIT (Damiano, Gentile, La Starza, Frattarelli, & Monticelli, 2003, p. 43), cuyo principio básico es la inmersión periódica de los explantes en el medio de cultivo, lo que permite el intercambio gaseoso dentro del recipiente (Figura 6).



De acuerdo al Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA, 2011), de la Universidad Veracruzana, los SIT pueden ser de tres tipos: el recipiente de inmersión temporal automatizado (RITA[®]), el biorreactor de inmersión temporal (BIT) y el biorreactor de inmersión por gravedad (BIG), detallados a continuación:

A continuación se describirá a los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizado (RITA[®]), debido a que es el biorreactor que se utilizó en esta investigación.

- Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA[®]):

Dentro de los sistemas de inmersión temporal, se destaca el RITA[®], el cual está compuesto por un solo frasco con dos compartimentos, uno superior en donde se encuentran las plantas y uno inferior donde se deposita el medio de cultivo. Al inyectar aire con una bomba al compartimento inferior el medio de cultivo es impulsado hacia el que contiene las plantas, quedando éstas inmersas en el medio líquido el tiempo que dure la inyección de aire (Etienne, 2002, p. 217) (Figura 7).

Esquema de un biorreactor tipo RITA[®].

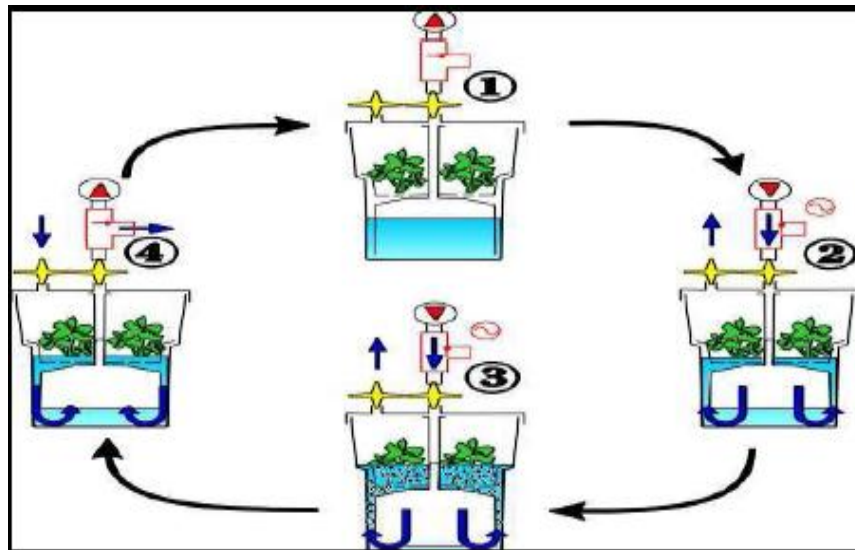


Figura 7. RITA[®]. en estado de reposo (1); comienza a ingresar aire al sistema (2); plantas inmersas en el medio de cultivo (3); el medio de cultivo desciende por gravedad a la recámara inferior (4).

Fuente: (Etienne, 2002, p. 217).

El sistema de inmersión temporal funciona mediante 4 fases que se explican a continuación:

Fase emergida. Esta fase es la de mayor duración.

1. Los explantes están colocados sobre un disco de esponja de poliuretano.

Fase sumergida. La duración de esta fase se define por experimentación pero siempre es muy corta: Puede variar de 1 minuto por día hasta 4 veces 15 minutos por día.

2. Una sobrepresión de aire estéril, aplicada en la parte baja, permite al medio de cultivo subir a la parte alta donde se encuentran los explantes.

3. El aire inyectado permite la oxigenación del medio. El aire de la parte alta se renueva totalmente (Grijalva, 2011, p. 38).

4. Pasado el tiempo de inmersión, la bomba de aire se apaga. Las presiones se equilibran, y el medio vuelve a bajar por gravedad a la parte inferior. Por capilaridad, una fina película de medio se mantiene en contacto sobre los explantes (CIRAD, 2001).

- **Ventajas del Sistema de Inmersión Temporal.**

- a. Disminución del costo de la mano de obra, debido a la facilidad de manipulación de los explantes y del cambio de medio.

- b. Permite una mejor nutrición mineral. Un contacto estrecho entre la superficie de los explantes y el medio durante la fase de inmersión. Por capilaridad, una fina película de medio se mantiene sobre los explantes.

- c. Fuerte disminución de los problemas de asfixia o vitrificación de los tejidos en comparación con una inmersión permanente.

- d. Renovación completa del aire dentro del recipiente durante cada inmersión.

- e. Mejor separación de los tejidos o células bajo el efecto de las burbujas.

- f. Control de los procesos morfológicos debido a la frecuencia (González, 2003, p. 40).

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del estudio

La presente investigación se llevó a cabo en la Estación Experimental Santa Catalina, del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) (Tabla 2).

Tabla 2.

Condiciones del sitio experimental

Provincia	Pichincha
Cantón	Mejía
Parroquia	Cutuglagua
Latitud	00°22'12" S
Longitud	78° 32'20" W
Altitud	3058 msnm
Temperatura promedio anual	12.04°C
Precipitación promedio anual	1400 mm
Humedad relative	79%

Nota:(INAMHI- Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología, 2014).

3.2 Condiciones experimentales de laboratorio

El proyecto se ejecutará en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB), en condiciones controladas (Tabla 3).

Tabla 3.

Características del cuarto de cultivo del Laboratorio de Biotecnología, Cutuglagua, 2014.

Temperatura promedio	25-28 $\pm$ 1°C
Horas Luz	16
Intensidad de Luz	2000 luxes
Humedad relativa	40-60%

NOTA: INIAP, (2010)

3.3 Material vegetal

Para esta investigación se utilizaron plantas de *Jatropha curcas*, las mismas que se encuentran en el invernadero de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, de las cuales se utilizaron 11 plantas del clon promisorio CP052.

Las plantas mantenidas en el invernadero fueron fertilizadas cada 15 días con Stimufol 1 g/l. El control fitosanitario se realizó cada 8 días, con una aplicación de Sulfato de cobre pentahidratado 1 ml/l para prevenir la contaminación.

3.4 Materiales

3.4.1 Materiales de Laboratorio

Tubos de ensayo

Cajas Petri

Frascos de vidrio

Cofia

Probetas

Pipetas

Erlenmeyer

Bisturís

Guantes

Plástico de cocina

Pinzas

Jeringuillas

Agitador

Agua destilada

Moldes de papel

Servilletas

Alcohol

Fósforos

Mascarilla

Piceta

3.4.2 Equipos de Laboratorio

Autoclave

Cámara de flujo laminar

Potenciómetro

Dispensador de medio

Balanza de precisión

Agitadores magnéticos

Destilador de agua

Refrigeradora

Microondas

Sistemas de Inmersión Temporal RITA[®].

3.4.3 Reactivos

Medio Murashige and Skoog (M&S)	Agar
Sulfato de adenina	3-ácido indol butírico (IBA)
Kinetina (KIN)	6-Bencil aminopurina (BAP)
Sacarosa	Ácido indol acético (AIA)
Caseína hidrolizada	Hipoclorito de sodio
Ácido giberélico (AG3)	Tween 20
Povidyn	Jabón líquido
Benomil	Carbón activado
Carbendazim	Alcohol potable

3.4.4 Equipo y Material de Oficina

Cámara de fotos	Marcadores y lapiceros
Computador	Resmas de papel bond
Impresora	

3.4.5 Material de Campo

Tijeras de podar
Regadera
Jarros plásticos

3.5 Fase de inducción de callos embriogénicos

3.5.1 Desinfección del material vegetal

Protocolo Modificado de (Aguilar, 2013).

Después del control fitosanitario se procedió a cortar las hojas jóvenes, ubicadas lo más cerca posible a las yemas apicales.

En el laboratorio se lavaron las hojas con jabón quirúrgico y abundante agua hasta eliminar por completo el jabón. Posteriormente se colocaron los explantes en frascos de vidrio (2 hojas por frasco) con Povidyn. 50mg/100ml Polvinilpirrolidone (PVP), KIOL (5 gotas/100 ml) durante 1 h.

Se realizó una modificación al protocolo de Freire (2009) que consistió en colocar las hojas en un fungicida de amplio espectro llamado Carbendazim al 0.5% y PVP 50mg/100ml durante 20 min.

Luego se colocaron en el fungicida Benomil a una concentración del 0.5% por 20 min. Posteriormente basándose en el protocolo de Freire (2009) y Aguilar (2013) se pasaron los explantes a una solución de antibiótico cloranfenicol a 1 mg/ml más agua estéril por 1 h.

Pasado este tiempo se enjuagaron los explantes con agua destilada y se los trasvasó a un recipiente que contenía hipoclorito de sodio al 1% y 2 gotas de tween 20 por 7 minutos, posterior a esto se realizaron 5 enjuagues con agua destilada estéril (Anexo 1).

3.5.2 Medios de cultivo

Para la inducción de callos embriogénicos se evaluaron 11 medios mismos que contenían M&S, 3% de sacarosa y 0.6% de agar, además de hormonas a diferentes concentraciones como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4.

Medios de cultivo para la inducción in vitro de callos embriogénicos de *J. curcas* CP052 con diferentes concentraciones de KIN, BAP, AIA e IBA, Cutuglagua, 2014.

SÍMBOLO	MEDIOS DE CULTIVO	REFERENCIA
J ₁	9.3μM de Kinetina.	(Jha, Mukherjee, & Mukul, 2007)
J ₂	13.9μM de Kinetina.	
J ₃	23.2μM de Kinetina.	
J ₄	37.2μM de Kinetina.	
J ₅	2.3μM de Kinetina+ 2.2μM de BAP.	
J ₆	4.6μM de Kinetina+ 4.4μM de BAP.	(Chan & Rivera, 2009)
J ₇	11.6μM de Kinetina+ 11.1μM de BAP.	(Jha, Mukherjee, & Mukul, 2007)
J ₈	23.2μM de Kinetina+ 22.2μM de BAP.	
J ₉	11.42μM AIA + 146.87μM BAP.	(Freire, 2009)
J ₁₀	13.3μM de BAP + 17.1μM de AIA.	(Galaz, Ávilez, Maricruz, Chan, & Loyola, 2012)
J ₁₁	2.2μM de BAP+ 0.49μM de IBA.	

Nota: Pazmiño, (2014)

3.5.3 Inducción y multiplicación de callos embriogénicos

Para la inducción de los explantes en los medios de cultivo, se utilizó una cámara de flujo laminar, la misma que se desinfectó con etanol al 70% y radiación UV por un período de 20 minutos. Así mismo el material utilizado para la siembra (pinzas, bisturí) fueron esterilizados en autoclave a 15 Psi por 20 minutos.

Una vez desinfectada la cámara de flujo laminar el material vegetal fue secado en servilletas estériles para eliminar restos de cloro. Luego se cortaron las áreas necrosadas del explante. Una vez retirado el tejido dañado se procedió a cortar las hojas en segmentos de

aproximadamente 0.5 cm² y se las sembró con el envés en contacto con el medio (Anexo 2).

3.5.4 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo conformada por un frasco de vidrio de 10 cm x 5 cm con 20 ml de medio de cultivo, conteniendo tres segmentos de hojas provenientes de la nervadura central de hojas de piñón.

3.5.5 Factores en estudio

Reguladores de crecimiento.

- KIN (Kinetina).
- BAP (Bencil Amino Purina).
- AIA (Ácido Indolacético).
- IBA (Ácido Indolbutírico).

3.5.6 Variables

Las variables evaluadas fueron las siguientes:

- a) **Crecimiento de callo formado:** Se evaluó el desarrollo en volumen de los callos a los 10, 30 y 50 días, según la escala propuesta por Santana (1982) (Anexo 3).
- b) **Tipo de callo formado:** Se evaluó a los 50 días de la inducción, de la siguiente forma.
 - Callo embriogénico: se caracteriza por presentar estructuras celulares separadas del tejido adyacente, las mismas que pueden encontrarse en cuatro estados diferentes: globular, corazón, torpedo (Anexo 4) o cotiledonar.
- c) **Color del callo formado:** El color de los callos formados se visualizó a los 50 días después del inicio de la inducción con ayuda de la tabla de color para tejidos vegetales (Royal Horticultural Society, 2002). Para este tipo de variable cualitativa

se realizó un análisis de frecuencias. Esta variable se midió en función del siguiente rango:

5=amarillo verdoso 4= amarillo 3= verde 2= blanco 1=necrótico 0= sin formación de callo.

- d) **Consistencia del callo:** La consistencia de los callos se caracterizó a los 50 días de inducidos los callos. Se evaluó la consistencia según la escala descrita por (Aguilar, 2013).

2=compacto 1=frágil 0=sin formación.

La consistencia de los callos formados se evaluó con la ayuda de un bisturí que al tocar el callo, determinó si es compacto, es decir, que no se desprende del tejido madre, o si es friable desprendiéndose con facilidad del tejido madre lo cual nos afirmó la presencia de un proembrión (Figura 8).



3.5.6 Diseño Experimental

Para la etapa de inducción de *J. curcas* se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con diez observaciones. Se calculó el coeficiente de variación que se expresó en porcentaje (%). Al encontrarse diferencias estadísticamente significativas en los factores en estudio se realizó pruebas DMS y de Tukey al 5% (Tabla 5).

Tabla 5.

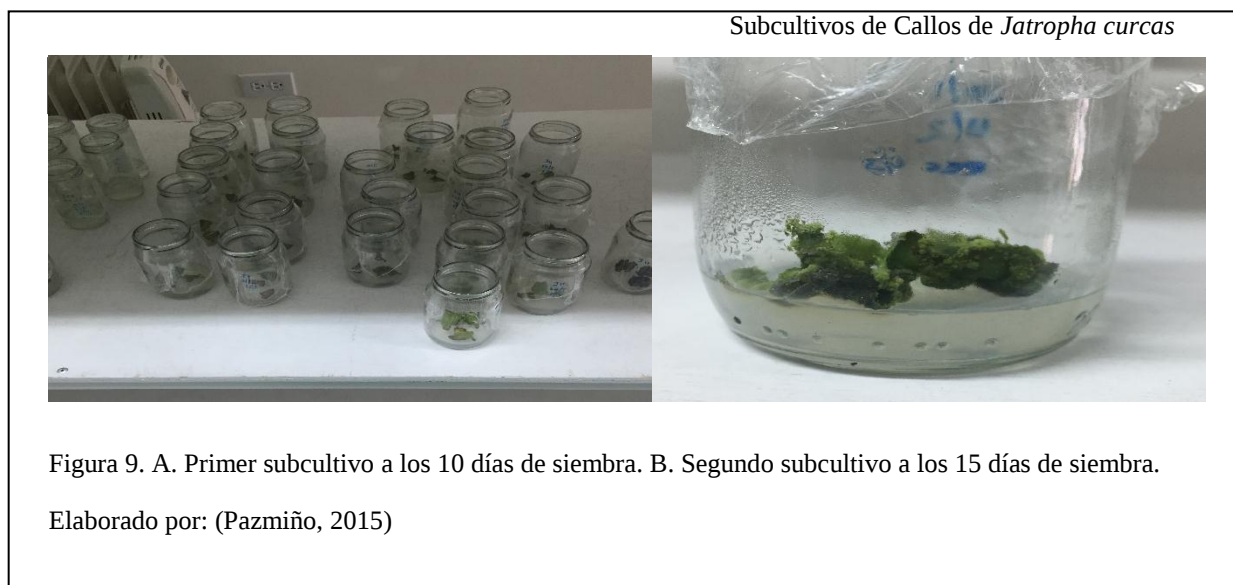
Diseño experimental: Análisis de Varianza (ADEVA) para la etapa de inducción de callogénesis en *J. curcas*, Cutuglagua, 2014.

Fuente de Variación (F. de V.)	G.L.
Total	109
Tratamientos	10
Error Experimental	99

Elaborado por: (Pazmiño, 2015)

3.6 Fase de Regeneración de callos embriogénicos

Antes de traspasar los callos a medio de regeneración cada 10 días se hicieron tres subcultivos de callos en medio semisólido (Figura 9).



Luego de realizados los subcultivos y teniendo la cantidad adecuada de callos morfogénicos se evaluó la regeneración de callos. En esta fase se observó que las células proembrionarias se diferencian y forman embriones somáticos.

3.6.1 Sistema convencional

Para la fase de regeneración por el sistema convencional, se partió de los callos morfogénicos obtenidos del mejor tratamiento de la primera fase de inducción, de los cuales se tomó 6 g de callo morfogénico de 8 semanas de edad y se los pasó a los medios de regeneración que se detallan posteriormente. Se realizaron dos subcultivos (cada 15 días) con los mismos medios.

3.6.1.1 Medio de Cultivo

El medio de cultivo empleado para la etapa de regeneración fue el descrito por Jha, (2007), el cual se basó en un medio base de Murashige y Skoog (1962) a la mitad de su concentración con 0.203 mg/L de IBA, 0.23 mg/L de kinetina, 30g/L de sacarosa, 1.84mg/L de sulfato de adenina y 7g/L de agar como agente gelificante. A todos los medios se ajustó a pH 5.7. Los medios fueron esterilizados en los mismos recipientes durante 20 minutos en autoclave a 121°C y 15 Psi (Anexo 5).

3.6.1.2 Sistemas de Inmersión Temporal Automatizado RITA

Se colocó 6g de callo morfogénico provenientes de los mejores tratamientos de la fase de inducción en recipientes plásticos (RITA®) con 2 volúmenes (100ml y 200ml), para la regeneración de los embriones somáticos (Anexo 6).

El RITA® está dividido en dos compartimentos, en el compartimento superior se colocó el tejido (callos morfogénicos) y en el compartimento inferior el medio de cultivo. Una vez colocados los callos, los RITAS® fueron sellados con plástico de cocina, luego se procedió a conectar las mangueras que proporcionan aire estéril, gracias a los dos filtros hidrófobos de 0.2 µm reutilizables: uno central (entrada de aire) y uno lateral (salida de aire). El filtro central se conectó al sistema de aireación (bomba) a una presión de salida de 0.2 bar para

que impulse el medio de la cámara inferior a la superior durante el período de inmersión. Todo el sistema es controlado por un sistema automático. Para el presente estudio se evaluaron dos frecuencias de inmersión: cada 12 h y 24 h por 30 (s) y 60 (s) por un período de 30 días.

3.6.1.3 Medio de Cultivo

El medio de cultivo empleado fue el mismo que para el sistema convencional; descrito por Jha y colaboradores (2007), sin embargo, en este medio no se empleó ningún agente gelificante; el medio se esterilizó en los recipientes RITA®. Estos recipientes fueron lavados previamente con agua destilada y cloro, luego fueron rociados con alcohol al 70%.

3.6.1.4 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo conformada por un contenedor RITA® con 6g de callo morfogénico en el tiempo, frecuencias y volumen especificados.

3.6.1.5 Factores de estudio

Frecuencia de inmersión (F):

- f_1 = Cada 12 horas
- f_2 = Cada 24 horas

Tiempo de inmersión (T):

- t_1 = Inmersión durante 30 segundos
- t_2 = Inmersión durante 60 segundos

Volumen del medio (V)

- v_1 = 100ml
- v_2 = 200ml (Tabla 5)

El medio de cultivo que se utilizó para esta fase fue el descrito por Jha, (2007), el cual consiste en medio de cultivo M&S 0.5, 30 g/l de sacarosa, 0.203 mg/l de IBA, 0.23 mg/l de Kinetina, 1.84 mg/l de Sulfato de Adenina, pH 5.8 (Tabla 6).

Tabla 6.

Tratamientos para la fase de regeneración de callos embriogénicos de *J. curcas* CP052, Cutuglagua, 2014.

SÍMBOLO	CÓDIGO	TRATAMIENTO	REFERENCIA
I ₁	F ₁ T ₁ V ₁	Cada 12 horas por 30 segundos, con 100ml de medio.	Jha, (2007).
I ₂	F ₁ T ₁ V ₂	Cada 12 horas por 30 segundos, con 200ml de medio.	
I ₃	F ₁ T ₂ V ₁	Cada 12 horas por 60 segundos, con 100ml de medio.	
I ₄	F ₁ T ₂ V ₂	Cada 12 horas por 60 segundos, con 200 ml de medio.	
I ₅	F ₂ T ₁ V ₁	Cada 24 horas por 30 segundos, con 100ml de medio.	
I ₆	F ₂ T ₁ V ₂	Cada 24 horas por 30 segundos, con 200ml de medio.	
I ₇	F ₂ T ₂ V ₁	Cada 24 horas por 60 segundos, con 100ml de medio.	
I ₈	F ₂ T ₂ V ₂	Cada 24 horas por 60 segundos, con 200ml de medio.	

Elaborado por: Pazmiño (2014)

3.7 CONVERSIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

Una vez terminada la etapa de regeneración se introdujeron los embriones somáticos en medios semisólidos para su germinación.

3.7.1 Unidad Experimental

La unidad experimental estuvo conformada por un frasco de vidrio de 10cm x 5cm con 20ml de medio de cultivo.

3.7.2 Factores de estudio

- Medios de cultivo

Para esta fase se utilizaron 2 medios de cultivo descritos en la Tabla 7.

Tabla 7.

Medios de cultivo para la fase de conversión in vitro de embriones somáticos de piñón J. curcas CP052, Cutuglagua, 2014.

SÍMBOLO	MEDIOS DE CULTIVO	REFERENCIA
t ₁	Cultivo de embriones somáticos en estado torpedo en medio M&S (Murashige y Skoog) a la mitad de su concentración más 3% sucrosa, pH 5.7	(Jha, Mukherjee, & Mukul, 2007)
t ₂	Cultivo de embriones somáticos en estado torpedo en medio M&S (Murashige y Skoog) sales y vitaminas, 20g/L de sucrosa, 100mg/L de caseína hidrolizada, 2mg/L de GA ₃ , pH 5.8	(Cai, Fu, & Ji, 2011)

Nota: (Pazmiño & Iles, 2015)

3.7.3 Variables

- Número de embriones somáticos convertidos

CAPITULO 4

RESULTADOS

4.1 Fase de inducción de callos embriogénicos

Durante la fase de inducción y multiplicación de callos embriogénicos se probaron: once medios de cultivo, con segmentos foliares de *J. curcas* CP0 52 dando como resultado 11 tratamientos, a partir de los cuales se evaluaron las siguientes variables:

- Crecimiento del callo formado

Los datos obtenidos para esta variable no poseían una distribución normal por lo que se realizó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis, mismo que se presenta en la Tabla 8.

Al aplicar esta prueba a los 30 y 50 días, se obtuvo un valor $p < 0.0001$, por lo tanto, se rechazó la hipótesis nula al ser $p < \alpha$ (0.05) en todos los casos, concluyendo que los tratamientos de inducción para la variable crecimiento de callo formado presentan diferencias estadísticamente significativas.

Cabe destacar que en los 11 tratamientos se pudo observar formación de masas callosas a partir de los 30 días, es por esta razón que no se realizaron pruebas estadísticas a los 10 días ya que solo se obtuvieron explantes vivos sin formación de callos.

Tabla 8.

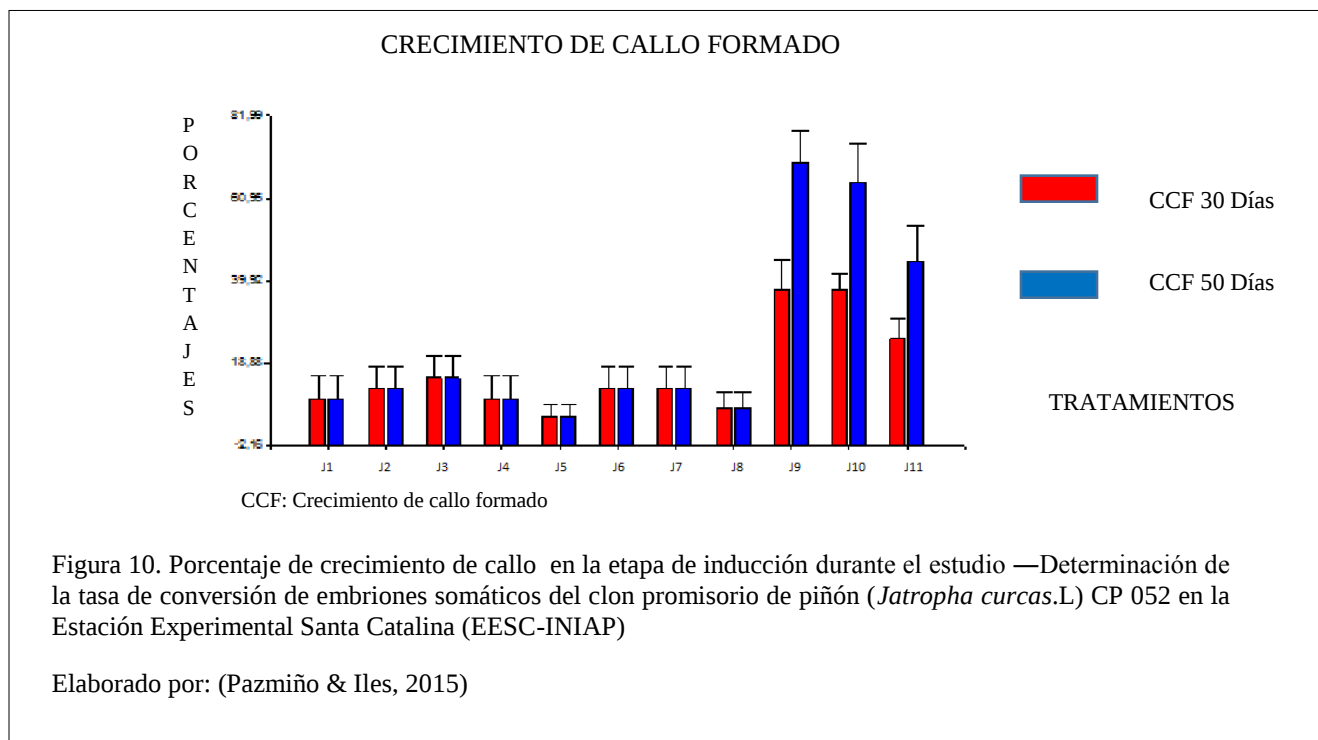
Prueba no paramétrica Kruskal- Wallis y DMS para la variable crecimiento de callo formado a los 30 y 50

VARIABLE: CRECIMIENTO DE CALLO						
MEDIOS	30 DIAS		Rangos	50 DIAS		Rangos
	N	MEDIAS		N	MEDIAS	
J1	10	10	BC	10	10	B
J2	10	12.5	BC	10	12.5	B
J3	10	15	BC	10	15	B
J4	10	10	BC	10	10	B
J5	10	5	C	10	5	B
J6	10	12.5	BC	10	12.5	B
J7	10	12.5	BC	10	12.5	B
J8	10	7.5	C	10	7.5	B
J9	10	37.5	A	10	70	A
J10	10	37.5	A	10	65	A
J11	10	25	AB	10	45	A
H	29.51			48.59		
P	0.0001			0.0001		

Elaborado por: (Pazmiño & Iles, 2015)

En la Tabla 8 para la prueba DMS, indica diferencias estadísticamente significativas a los 30 y 50 días de evaluación. En el primer período de evaluación para todos los tratamientos, se observan cuatro rangos de significación, ubicándose en el primer rango los tratamientos J9 y J10 con 37.5% de crecimiento de callo en ambos casos. A los 50 días de evaluación se observan 2 rangos de significación ubicándose en el primer rango los tratamiento J9 con 70%, J10 con el 65% y J11 con el 45% de crecimiento de callo formado.

En la Figura 10 se muestra la gráfica de porcentajes de la variable de crecimiento de callo formado en donde se puede determinar que los tratamientos que presentan mayor crecimiento tanto a los 30 como 50 días son: J9, J10 y J11.



- Tipo de callo formado

El tipo de callo fue la variable evaluada más importante, ya que permitió identificar los tratamientos que generan embriones y discriminar los que no funcionan, es por esto que se realizó un análisis de datos categorizados mediante tabla de contingencias (Tabla 9) en base a los siguientes rangos:

Callo embriogénico (4), callo embriogénico y organogénico (3), callo organogénico (2), callo no morfogénico (1) y sin formación de callo (0).

La prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 9) permitió determinar y clasificar los grupos que presentaron diferencias estadísticamente significativas, así como los rangos para todos los tratamientos. Durante todo el período de evaluación, se muestran tres grupos bien definidos, en el grupo B, se encontraron los tratamientos J9, J10 y J11.

Tabla 9.

Prueba no paramétrica Kruskal- Wallis para la variable Tipo de callo formado

VARIABLE: TIPO DE CALLO FORMADO (MORFOGENICO)						
MEDIOS	MORFOGENICO			NO MORFOGENICO		
	N	MEDIAS	RANGO	N	MEDIAS	RANGO
J1	10	0	B	10	1	A
J2	10	0	B	10	1	A
J3	10	0	B	10	1	A
J4	10	0	B	10	1	A
J5	10	0	B	10	1	A
J6	10	0	B	10	1	A
J7	10	0	B	10	1	A
J8	10	0	B	10	1	A
J9	10	0,8	A	10	0,2	B
J10	10	0,7	A	10	0,3	B
J11	10	0,5	AB	10	0,5	AB
H	30,22			30,22		
P	<0,0001			<0,0001		

Elaborado por: (Pazmiño, 2015)

En la Tabla 10 se puede observar los porcentajes de tipo de callo formado, el único tratamiento que presenta callos embriogénicos es el J9 con 40%, además presenta el 30% de callo organogénico y 10% de callo mixto. Los tratamientos J10 y J11 presentan 60% y 40% respectivamente de formación de callo organogénico y 10% de callo mixto; mientras que los tratamientos J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8 presentaron callos de tipo de no morfogénico o sin formación de callo.

Tabla 10.

Tabla de contingencia para la variable Tipo de callo formado respecto a los tratamientos de inducción durante el estudio. Estación Experimental Santa Catalina (EESC-INIAP), 2014.

TRATAMIENTOS	EMBRIOGENICO		ORGANOGENICO		MIXTO		NO MORFOGENICO		SIN FORMACION		TOTAL
J1	0	0%	0	0%	0	0%	3	30%	7	70%	10
J2	0	0%	0	0%	0	0%	4	40%	6	60%	10
J3	0	0%	0	0%	0	0%	5	50%	5	50%	10
J4	0	0%	0	0%	0	0%	3	30%	7	70%	10
J5	0	0%	0	0%	0	0%	2	20%	8	80%	10
J6	0	0%	0	0%	0	0%	4	40%	6	60%	10
J7	0	0%	0	0%	0	0%	4	40%	6	60%	10
J8	0	0%	0	0%	0	0%	3	30%	7	70%	10
J9	4	40%	3	30%	1	10%	2	20%	0	0%	10
J10	0	0%	6	60%	1	10%	3	30%	0	0%	10
J11	0	0%	4	40%	1	10%	3	30%	2	20%	10

Elaborado por: (Pazmiño, 2015)

- Color de callo

En el caso de la variable color de callo, de igual forma se analizaron los datos a partir de la prueba no paramétrica Kruskal- Wallis, en base a los siguientes rangos de color:

5= amarillo verdoso, 4=amarillo, 3=verde, 2= blanco, 1= necrótico, 0= sin formación de callo

Para la variable color de callo se realizó la prueba de chi cuadrado en donde se obtuvo un valor de $p < 0.0001$, demostrando así que los datos tienen diferencias estadísticamente significativas (Tabla 11).

Tabla 11.

Prueba de chi cuadrado para la variable color de callo formado

Estadístico	Valor	GL	P
Chi Cuadrado Pearson	100.81	50	<0.0001
Chi Cuadrado MV-G2	100.89	50	<0.0001
Coef. Conting. Cramer	0-39		

Elaborado por: (Pazmiño, 2015)

Además, se realizó una prueba de datos categorizados (Tabla 12) para la variable color de callo formado, se pudo determinar que los tratamientos J9 y J11 presentaron 70% de color amarillo-verde que es la coloración común de los callos embriogénicos, mientras que J10 presenta 50% de callo color verde y 20% de color amarillo-verde, y los demás tratamientos presentan en su mayoría necrosis o simplemente no formaron callo.

Tabla 12.

Tabla de contingencia para la variable color de callo

TRATAMIENTOS	ESCALA DE COLORES						Total
	0	1	2	3	4	5	
J1	70%	20%	10%	0%	0%	0%	100
J2	60%	30%	0%	10%	0%	0%	100
J3	50%	30%	0%	20%	0%	0%	100
J4	70%	20%	0%	10%	0%	0%	100
J5	80%	20%	0%	0%	0%	0%	100
J6	60%	20%	10%	10%	0%	0%	100
J7	60%	40%	0%	0%	0%	0%	100
J8	70%	20%	10%	0%	0%	0%	100
J9	0%	0%	10%	0%	20%	70%	100
J10	0%	20%	10%	50%	0%	20%	100
J11	20%	0%	0%	10%	0%	70%	100

Elaborado por: (Pazmiño, 2015)

- Consistencia de callo

La consistencia del callo es una variable muy empleada para clasificar callos embriogénicos y organogénicos de los no morfogénicos, es por esto que se evaluó en función de tres rangos:

Compacto (2), frágil (1) y sin formación de callo (0).

Para esta variable se realizó la prueba de chi cuadrado en donde se obtuvo un valor de $p < 0.0001$, demostrando así que los datos tienen diferencias estadísticamente significativas (Tabla 13).

Tabla 13.

Prueba de chi cuadrado para variables consistencia de callo

Estadístico	Valor	Gl	P
Chi Cuadrado Pearson	84.22	20	<0,0001
Chi Cuadrado MV-G2	97.84	20	<0,0001
Coef.Conting.Cramer	0,51		

Elaborado por: (Pazmiño, 2015)

En la tabla 14 se puede observar que los tratamientos J9, J10 presentaron 100% de callos compactos, seguidos por J11 con un 80% de callo compacto, mientras tanto los demás tratamientos presentan en su mayoría callo frágil o simplemente no hubo formación de callo.

Tabla 14.

Tabla de contingencia para la variable consistencia de callo

TRATAMIENTOS	CONSISTENCIA CF			Total
	0	1	2	
J1	70%	30%	0%	100
J2	60%	40%	0%	100
J3	50%	30%	20%	100
J4	70%	20%	10%	100
J5	80%	20%	0%	100
J6	60%	30%	10%	100
J7	60%	30%	10%	100
J8	70%	30%	0%	100
J9	0%	0%	100%	100
J10	0%	0%	100%	100
J11	20%	0%	80%	100

Elaborado por: (Pazmiño, 2015)

- Formación de callos embriogénicos

Se evaluó el porcentaje de formación de callos embriogénicos a los 50 días de la inducción, para lo cual se realizó la tabla 15, determinado así que el único tratamiento que formó callos embriogénicos fue el tratamiento J9 el cual presenta 20% de callos embriogénicos a los 30 días y 40% a los 50 días.

Tabla 15.

Tabla de contingencia para la variable formación de callos embriogénicos

DIAS	MEDIOS										
	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11
30	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	20%	0%	0%
50	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	40%	0%	0%

Elaborado por: (Pazmiño, 2015)

4.2 Fase de Regeneración de callos embriogénicos

Para la segunda fase de regeneración de embriones somáticos en sistemas de inmersión temporal RITA, se probaron dos frecuencias de inmersión temporal (12h y 24h), dos tiempos (30s y 60s) y dos volúmenes (100ml y 200ml), dando como resultado un diseño completamente al azar DCA con tres factores en estudio (dos frecuencias, dos tiempos y dos volúmenes). Para el análisis se realizó la transformación de datos con raíz cuadrada más uno a fin de disminuir el coeficiente de variación, posteriormente se realizó un análisis de varianza y Tukey al 5% para cada una de las variables.

Después de 30 días se evaluó y contabilizó el número de embriones en estado globular, acorazonado, torpedo, anormales y brotes organogénicos (Anexo 7), luego se realizó un ADEVA como se presenta en la Tabla 16.

Tabla 16

Resumen del análisis de varianza para el número de embriones en estado globular, acorazonado y brotes organogénicos en el estudio de la Determinación de la tasa de conversión de embriones somáticos del clon promisorio de piñón (*Jatropha curcas* L) CP052.

F de V	(GL)	CUADRADOS MEDIOS		
		Nro. GLOBULARES	Nro. ACORAZONADO	Nro. BROTES
TOTAL	23			
TRATAMIENTOS	7	0,35**	0,04 ^{ns}	1,53**
FRECUENCIA (F)	1	0,19*	0,09 ^{ns}	1,72*
TIEMPO (T)	1	0,37*	0,00 ^{ns}	4,18**
VOLUMEN (V)	1	0,37*	0,09 ^{ns}	0,99*
FxT	1	0,37*	0,00 ^{ns}	3,39*
FxV	1	0,37*	0,09 ^{ns}	0,29 ^{ns}
TxV	1	0,6*	0,00 ^{ns}	0,06 ^{ns}
FxTxV	1	0,19*	0,00 ^{ns}	0,05 ^{ns}
ERROR EXPONENCIAL	16	0,02	0,04	0,12
PROMEDIO		1,2	1,1	1,83
CV		12,88%	19,92%	19,20%

*: significativo **: altamente significativo ns: no existe significancia.

Nota: (Pazmiño, 2015)

Para la variable número de embriones globulares se puede observar que todos los factores y sus interacciones son significativos, mientras que la variable número de embriones en estado acorazonado no presenta ninguna significancia debido a que todos los factores tienen un p-valor mayor a 0,05. Para la variable número de brotes organogénicos se puede observar que el factor tiempo es altamente significativo mientras que las interacciones FxV y TxV no presentan significancia alguna.

Como se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos se realizó Tukey al 5% para las variables en estudio con sus interacciones como se presenta en la Tabla 17.

Tabla 17

Prueba de Tukey al 5% para las variables en el estudio de la Determinación .de la tasa de conversión de embriones somáticos del clon promisorio de piñón (*Jatropha curcas* L) CP052.

FACTORES	CODIGO	Nro. GLOBULAR	PROMEDIOS EMBRIONES ACORAZONADO	Nro. BROTES
FRECUENCIA	F1 (cada 12 h)	1,25±0,04 a	1,12	2,1±0,10 a
	F2 (cada 24 h)	1,07±0,04 b	1,00	1,56±0,10 b
TIEMPO	T1 (30 s)	1,28±0,04 a	1,06	2,25±0,10 a
	T2 (60 s)	1,03±0,04 b	1,06	1,41±0,10 b
VOLUMEN	V1 (100 ml)	1,28±0,04 a	1,12	2,03±0,10 a
	V2 (200 ml)	1,03±0,04 b	1,00	1,63±0,10 b
F x T	F1T1	1,49±0,06 a	1,12	2,89±0,14 a
	F2T1	1,07±0,06 b	1,12	1,60±0,14 b
	F2T2	1,07±0,06 b	1,00	1,52±0,14 b
	F1T2	1,00±0,06 b	1,00	1,30±0,14 b
F x V	F1V1	1,49±0,06 a	1,24	2,41±0,14 a
	F2V1	1,07±0,06 b	1,00	1,79±0,14 b
	F2V2	1,07±0,06 b	1,00	1,66±0,14 b
	F1V2	1,00±0,06 b	1,00	1,47±0,14 b
T x V	T1V1	1,56±0,06 a	1,12	2,50±0,14 a
	T2V2	1,07±0,06 b	1,12	1,99±0,14 a b
	T2V1	1,00±0,06 b	1,00	1,56±0,14 b c
	T1V2	1,00±0,06 b	1,00	1,26±0,14 c
F x T x V	F1T1V1	1,99±0,09 a	1,24	3,21±0,20 a
	F2T1V1	1,14±0,09 b	1,24	2,57±0,20 a b
	F2T2V2	1,14±0,09 b	1,00	1,79±0,20 b c
	F2T1V2	1,00±0,09 b	1,00	1,61±0,20 b c
	F2T2V1	1,00±0,09 b	1,00	1,52±0,20 c
	F1T1V2	1,00±0,09 b	1,00	1,52±0,20 c
	F1T2V1	1,00±0,09 b	1,00	1,41±0,20 c
	F1T2V2	1,00±0,09 b	1,00	1,00±0,20 c

En la tabla 17 se muestra la prueba de Tukey al 5%, para Frecuencias se obtuvieron dos rangos de significación, donde F1 (cada 12 h) fue la mejor frecuencia para las variables embriones en estado globular y brotes organogénicos con un número promedio de 1,25 y 2,1 respectivamente. A su vez F2 (cada 24 h) se ubicó en el segundo rango obteniendo 1,07 embriones en estado globular y 1,56 brotes organogénicos.

Para el factor Tiempo, se generaron dos rangos de significancia, siendo T1 (30 s) el que mejor promedios obtuvo con 1,28 embriones en estado globular y 2,25 brotes organogénico.

Con la prueba de Tukey al 5% para el factor volumen se determinó que V1 (100 ml) fue el mejor presentando promedios de 1,28 embriones en estado globular y 2,03 brotes organogénicos.

La interacción Frecuencia*Tiempo diferenció dos subconjuntos homogéneos siendo la mejor interacción F1*T1 (cada 12h por 30s) con la cual se reportó un promedio de 1,49 embriones en estado globular y 2,89 brotes organogénicos.

En la interacción Frecuencia*Volumen, F1*V1 (cada 12h en 100ml) fue la mejor con promedios de 1,49 embriones en estado globular y 2,41 brotes organogénicos.

La interacción Tiempo*Volumen determinó que T1*V1 (30s en 100ml) presentó mejores resultados obteniendo promedios de 1,56 embriones en estado globular, 1,12 embriones en estado acorazonado y 2,50 brotes organogénicos.

La interacción de los tres factores en estudio Frecuencia * Tiempo * Volumen fue de gran importancia ya que nos ayudó a determinar cual fue el mejor tratamiento, se diferenció tres subconjuntos homogéneos, de los cuales el mejor tratamiento es I1, formado por la frecuencia 12h, en tiempo 30s y volumen 100ml con una media de 1,99 de embriones en estado globular y 3,21 brotes organogénicos. Mientras que el peor tratamiento fue I4 debido a que a los 30 días de evaluación no presento la formación de embriones ni brotes organogénicos.

4.3 Fase de conversión de embriones somáticos

Para la tercera fase de conversión de embriones somáticos se probaron 2 medios de cultivo en donde se introdujeron 6 embriones sin embargo no se obtuvo resultados positivos para la germinación, además como no se disponía de material suficiente para llevar a cabo esta fase no se pudo realizar ninguna prueba estadística.

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

FASE 1: INDUCCION DE CALLOS EMBRIOGENICOS

El medio de cultivo fue determinante al momento de inducir la formación de callos, siendo el medio J9 ($11.42\mu\text{M}$ AIA + $146.87\mu\text{M}$ BAP) (Freire, 2009, p. 90) el que mayor respuesta produjo con un 82.5% de formación de callos. En investigaciones realizadas por Sánchez (2012), demostró que el balance auxina-citoquinina es importante para la formación de callos en altos porcentajes.

En el ensayo de inducción de callos embriogénicos cabe recalcar que los primeros cuatro tratamientos (J1,J2,J3,J4) estaban compuestos por KIN mientras que el resto tenían una combinación de KIN y BAP. Los tratamientos J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7, J8, no originaron ningún tipo de estructura morfogénica, una de las principales causas pudo ser que la combinación auxina-citoquinina (J5, J6,J7,J8) o la ausencia de auxina (J1, J2,J3, J4) no fue la ideal para las accesiones empleadas, ya que según Fernández (2002), existen reguladores de crecimiento endógenos con proteínas receptoras en las plantas, las mismas que varían en genotipo, edad, parte de la planta y etapa fenológica, que a la larga puede afectar a la respuesta embriogénica. La oxidación generada por el uso de BAP afecta a la respuesta final del explante.

El tipo de callo formado determinó que los mejores tratamientos fueron J9, J10 y J11, puesto que presentaron callos de tipo embriogénico, organogénico y mixto, según González (2003), concentraciones de auxinas relativamente altas suprimen el crecimiento organizado y promueven la formación de células tipo meristemáticas, mientras que la relación auxina-citoquinina influye en el balance entre la formación de raíces y brotes. Esta puede variar para las distintas especies vegetales.

Una amplia variedad de colores de callos se observó durante la evaluación de la fase de inducción, de los cuales algunos coinciden con las coloraciones de los callos reportadas por

Jha, Mukherjee, & Mukul (2007). En este caso, la coloración amarillo- verde fue la más común para los callos que se formaron a lo largo de la etapa de inducción, siendo los tratamientos J9 (70%), J10 (20%) y J11 (70%) los que mayor número de callos con esta coloración produjeron. Aguilar (2013) en su investigación menciona que la coloración más común para la obtención de callos a partir de hojas en la etapa de inducción fue amarillo-verde.

Se determinó también que los tratamientos J9, J10 y J11 producen callos de consistencia compacta, 100, 100 y 80%, respectivamente; esta característica es propia de los callos embriogénicos según lo reportado por Jha, Mukherjee, & Mukul (2007) y Freire (2009) en sus respectivas investigaciones.

En la variable consistencia fue evidente que los callos embriogénicos para el caso de piñón, siempre van a ser de consistencia compacta con aspecto nodular, tal como describe Jha, Mukherjee, & Mukul (2007) y Freire (2009), pero similares características se observaron en callos organogénicos, lo que significa que si un callo es frágil es muy probable que no sea morfogénico. Sin embargo, se reportaron callos con característica compacta pero sin ningún tipo de estructuras, esto puede deberse a que un tipo de callo no es exclusivo de un determinado explante o tratamiento o simplemente a un desbalance hormonal

FASE II: REGENERACION DE CALLOS EMBRIOGENICOS

En la presente investigación se observó que existen diferencias significativas en la Frecuencia es así que F1 (cada 12 h), fue la que mayor número de embriones produjo en los estados globular y acorazonado con 1.25 y 1.12 embriones respectivamente, además se obtuvo un promedio de 2.1 brotes organogénicos, estos valores aumentaron a comparación con los resultados obtenidos por Freire (2009), quien sólo reportó un promedio de 6.00 embriones en estado globular. Esto pudo suceder probablemente por los lapsos de tiempo, puesto que intervalos mayores a 8 horas como menciona Aguilar (2013) afectó a la multiplicación de callos, debido que al ser tiempos tan largos no permite un contacto adecuado del medio con los callos, así mismo según Cordero (2012) esto pudo suceder por

un alto estrés hídrico que no fue compensado con la duración de inmersión o con la tolerancia natural de las células o tejidos.

En cuanto al factor Tiempo de inmersión, T1 (30 s) fue el que mejor resultados generó con un número promedio de embriones en estado globular y acorazonado de 1.28 y 1.06 embriones respectivamente, también se obtuvieron 2.25 brotes organogénicos. Cordero (2012) menciona que el efecto del tiempo de inmersión sobre el tejido que se utilice en el RITA puede variar dependiendo de la especie, del tejido y del medio utilizado.

Además durante esta etapa fue posible determinar que el mejor tratamiento fue I1 (12 horas con 30 segundos de inmersión y 100 ml medio) debido a la cantidad de embriones y brotes obtenidos con un promedio de 1.99 embriones en estado globular, 1.24 embriones en estado acorazonado y 3.21 brotes organogénicos. Existieron otros tratamientos en los que también se produjeron embriones y brotes pero en menor cantidad, debido a que las interacciones de frecuencia, tiempo y volumen no fueron las adecuadas para que los embriones proliferen y continúen con su desarrollo.

En la tercera fase de conversión de embriones somáticos se probaron 2 medios de cultivo en donde se introdujeron 6 embriones sin embargo no se obtuvo resultados positivos para la germinación, además como no se disponía de material suficiente para llevar a cabo esta fase no se pudo realizar ninguna prueba estadística.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

- Evaluar dos tiempos de inmersión y dos frecuencias para la regeneración de callos embriogénicos del clon promisorio de *Jatropha curcas* L.CP052.
- Evaluar la tasa de conversión de embriones somáticos del clon promisorio de *Jatropha curcas* L. CP052.
- Se acepta la hipótesis nula la cual señala que no existe conversión de embriones somáticos del clon promisorio de *Jatropha curcas* CP052 a plantas.
- Se estableció un protocolo para la optimización de la inducción indirecta de embriones somáticos de *J. curcas* L, a partir de hojas jóvenes provenientes de la accesión CP052 y el medio de inducción M&S, 30 g/l sacarosa, 11.42uM de AIA, 146.87 uM de BAP, 6 g/l agar.
- En la fase de inducción se obtuvieron callos embriogénicos y organogénicos en los medios de inducción J9 (M&S 5519, 30 g/l sacarosa, 11.42uM de AIA, 146.87 uM de BAP, 6 g/l agar) se obtuvo 40% de callos embriogénico y 30% de callos organogénicos, J10 (M&S 5519, 30 g/l sacarosa, 17.1 uM de AIA, 13.3 uM de BAP, 6 g/l agar) se obtuvo 60% de callos organogénicos y 10% de callos mixtos y J11 (M&S 5519, 30 g/l sacarosa, 2.2 uM de BAP, 0.49 uM de IBA, 6 g/l agar) se obtuvo 40% de callos organogénicos y 10% de callos mixtos.
- La exposición de los callos embriogénicos a una frecuencia de cada 12 horas, en tiempo de inmersión 30 segundos y en 100 ml de medio de cultivo generó la mayor cantidad de embriones y brotes organogénicos con un promedio de 1.99 embriones en estado globular, 1.24 embriones en estado acorazonado y 3.21 brotes organogénicos.

- Al no poseer suficiente cantidad de embriones somáticos en etapas avanzadas, solamente se dispusieron 6 embriones en medios de germinación, sin embargo, ninguno presentó respuesta alguna.

Referencias

- Aguilar, G. (2013). Evaluación de la regeneración de callos embriogénicos de dos accesiones de piñón . *Previa la obtencion de Grado Académico de Ingeniera en Biotecnología*. Pichincha, Ecuador.
- Alfonso, J. (2008). MANUAL PARA EL CULTIVO DE PIÑON (*Jatropha curcas*) EN HONDURAS. La Lima , Honduras.
- Alvard, D., Cote, F., & Teisson, C. (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 253-258.
- APGIII. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 105–121.
- Atares, D. (2011). Comparation of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. . *Plant Cell Tissue Organ Cult.*
- Barreto. (2003). Evaluacion de tres densidades de siembra y dos frecuencias de inmersión en biorreactor tipo RITA sobre calidad morfológica de embriones somáticos de café. . *Tesis sometida a consideración de la Escuela de Postgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservacion del Centro Agronomico Tropical de Investigacion y Enseñanza como requisito para optar el grado de Magister Scientiae*. Turrialba, Costa Rica.
- Bellotti, A., & Roca, W. (2009). La falta de tecnologías para la producción de semilla limpia. México.
- Buitrago, A. (2008). Biotecnología aplicada en especies forestales. Argentina.
- Cai, L., Fu, L., & Ji, L. (2011). Regeneration of *Jatropha curcas* through efficient somatic embryogenesis and suspension culture. . *Landes Bioscience*.

- Cano, M. (2013). Aplicación de la Micropropagación y Criopreservación a la conservación ex situ de especies vegetales de interés. España.
- Chan, T., & Rivera, J. (2009). *Embriogénesis somática de Jatropha curcas; una planta multipropósito con potencial para la producción de biodiesel*. Yucatán, México.
- Chanatásig, C. (2004). Inducción de la embriogénesis somática en clones superiores de cacao (*Theobroma cacao* L.), con resistencia a enfermedades fungosas . *Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, como requisito parcial para optar por el grado de: Magister Scientiae* . Turrialba, Costa Rica.
- CIRAD. (2001). *Sistemas de Inmersión temporal*. Obtenido de <http://www.cirad.fr/produits/rita/es/internet.htm>
- Damiano, C., Gentile, A., La Starza, S., Frattarelli, A., & Monticelli, S. (2003). Automation in micropropagation through temporary immersion techniques. *Acta Horticulturae*, 359-364.
- Das, D., Reddy, M., Upadhyaya, K., & Sopory, S. (2002). An efficient leaf-dise culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports*, 20.
- De La Vega, J. (2008). *Jatropha Curcas.L. Agro-energia*. Mexico.
- Delgado, R. (2008). *La Biomasa como Recurso Energetico*. Salamanca: Aquilafuente.
- Díaz, L., Alarcón, L., Pineda, L., & Trujillo, H. (2010). La biotecnología de la micropropagación, una herramienta de gran utilidad. . *Biotecnología Vegetal*.
- Enciso, C., & Castillo, F. (2010). Propagación vegetativa de *Jatropha curcas* L. por estacas. San Lorenzo , Paraguay.

- Espinoza, A. (2014). PROPAGACIÓN CLONAL IN VITRO DE ANTURIO (*Anthurium andreanum*) ATRAVÉS DE CALLO Ú ORGANOGÉNESIS INDIRECTA. Machala, Ecuador.
- Etienne, H. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation.
- Evans, D., Coleman, J., & Kearns, A. (2003). Plant Cell Culture. *BIOS*, 153-155.
- Felix, J. (2010). Experiencias en el manejo del cultivo de jatropha bajo condiciones de riego y temporal en el norte de Sinaloa. *Fundacion Produce: SINALOA A.C.*, 12.
- Fernández, I. (2002). Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana*). España.
- Freire. (2009). Establecimiento de embriogénesis somática y caracterización histológica embrionaria de piñón (*Jatropha curcas*) a partir de peciolo. *Tesis de ingeniería en Biotecnología*. Pichincha, Ecuador.
- Freire, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, 209.
- Fundación para la innovación agraria. (2009). Biorreactores. Chile.
- Fundación para la Innovación Agraria. (2009). Sistema de Inmersión Temporal. *Resultados y Lecciones*, 7.
- Galaz, R., Áviles, R., Maricruz, C., Chan, J., & Loyola, V. (2012). *Jatropha curcas* una Alternativa para la Obtención de Biodiesel sin Afectar al Sector Alimentario. *Biotecnología*.
- Gatica, A. (2002). Regeneración de plantas de café (*Coffea arabica* cv. Caturra y Catuaí) por embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja. Costa Rica.
- George, E. (1993). *Plant tissue culture techniques*. England: E.F. George.

- González, K. (2003). *Respuesta de tres explantes de vainilla (Vanilla planifolia) a diferentes frecuencias de inmersión temporal*. Catargo-Costa Rica: Tesis. Bach. Ing. Biot.
- Grijalva, G. (2011). RESPUESTA DE EXPLANTES APICALES Y MICROESTACAS DE CRISANTEMO (*Chrysanthemum* sp.) VAR. ANASTASIA A DIFERENTES FRECUENCIAS EN EL SISTEMA BIORREACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL EN LA FLORICOLA FLORISOL – SAN JOSÉ DE MINAS” . *NFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO AGROPECUARIO* . Sangolqui, Pichincha, Ecuador.
- Heller, J. (1996). *Physic nut. Jatropha curcas L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*. Recuperado el 24 de Abril de 2014, de www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversity/publications/pdfs/161.
- IDAE. (2007). Biomasa "Cultivos energeticos". *Energias Renovables*, 5-6.
- INAMHI- Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. (2014). *Condiciones Experimentales*. Obtenido de <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/>
- INBIOTECA. (2011). Sistemas de Inmersión temporal. México.
- Jha, T., Mukherjee, P., & Mukul, M. (2007). Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn. An important biofuel plant. *Plant Biotechnol.*
- Jiménez, E., Pérez, J., de Feria, R., Barbón, R., Capote, A., Chávez, M., . . . Pérez, J. (1999). Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 19-23.
- Jones, N., & Miller, J. (1996). *Jatropha curcas*, a Multipurpose Species for Problematic Sites. *Land Resources Series*, 38.
- Jongschaap, R., Corre, W., Bindraban, P., & Brandenburg, W. (2007). Claim and facts on *Jatropha curcas* L.: Global *Jatropha curcas* evaluation, breeding and propagation programme. Plant Research International. . Netherlands.

- King, A., He, W., Cuevas, J., Freudenberg, M., Ramiarmanana, D., & Graham, L. (2009). Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. *Journal of Experimental Botany*, 2897-2905.
- KRIKORIAN, A. (1991). Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación, en cultivo de tejidos en la agricultura. New York, EE.UU: Roca y Mroginski.
- Kyte, L., & Kleyn, J. (1996). *Plants from test tubes. An introduction to Micropropagation*.
- Laboratorio de cultivos de tejidos - ESPE. (2009). Fotografía de semillas de *Jatropha curcas*. Sangolqui.
- Laguna, V. (2011). Inducción a callogenesis en explantes de *Jatropha curcas*. Colombia.
- López, C., & Perán, R. (2008). *Embriogénesis somática*. Recuperado el 6 de Noviembre de 2014, de <http://www.encuentros.uma.es/encuentros39/embriogenesis.html>
- Lorenzo, J., González, B., Escalona, M., Teisson, C., Espinosa, P., & Borroto, C. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 197-200.
- Manzanilla, M. (2004). Inducción de embriogénesis somática de tejido nuclear de tres variedades de mango (*Mangifera indica*). . *Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias, área: Biotecnología*. Tecoman, México.
- Martínez, R. (2001). Embriogénesis somática a partir de callos de Nim (*Azadirachta indica*). . *Chapingo: Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 107-114.
- Martoli, J. (2008). Cultivos energéticos: *Jatropha curcas*. Medellin, Colombia.
- Mazariegos, C. (2011). EVALUACIÓN DE TRES CONCENTRACIONES DE AUXINAS (ANA) Y CINCO DE CITOCINAS (BAP) EN LA PROPAGACIÓN DE *Jatropha curcas*. Guatemala.
- Mejia, N. (2010). Comportamiento Agronomico de nueve líneas precoces y dos métodos de siembra de (*Jatropha curcas*). Santa Ana, Manabi, Ecuador.

- Mendieta, M. (2002). *Propagación de orquideas. Costa Rica*.
- Merkle, S. (1995). *Morphogenic aspects of somatic embryogenesis*. . Netherlands: Kluwer Academic.
- Muñoz, J., Valerin, K., Alveranga, S., & Alan, E. (2010). Cultivo in vitro de Tempate (Jatropha curcas). *Tecnologia en marcha*, 54-55.
- Nunes, C. (2007). Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão-mansô (Jatropha curcas L.). *Tesis de maestria*. Minas Gerais, Brasil.
- Nunes, C., Dos, S. D., Pasqual, M., & Teixeira, T. (2009). *Morfologia externa de frutos, sementes e plântulas de pinhão-mansô*. Brasilia.
- Oyuela, D. (2012). *Guía técnica-ambiental para el cultivo de la Jatropha curcas (piñón)*. Guatemala.
- Paucar, M. (Diciembre de 2011). ORGANOGÉNESIS DIRECTA in vitro A PARTIR DE EXPLANTES DE HOJAS DE MORA (Rubus glaucus Benth). *INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO*. Salgoqui, Pichincha, Ecuador.
- Pazmiño, G. (2015). Determinación de la tasa de conversión de embriones somáticos del clon promisorio de piñón (Jatropha curcas) CP 052. Mejía, Pichincha, Ecuador.
- Peña, C. J. (2009). Establecimiento y evaluación de protocolos de desinfección, introducción y multiplicación in vitro de piñón (Jatropha curcas) a partir de semillas y yemas apicales obtenidas de plantas adultas con miras a una propagación masiva de plantas. Sangolquí, Pichincha, Ecuador.
- Peralta, M. (2010). Caracterización Bioquímica de las proteínas de la semilla de J. curcas L. . *Tesis Maestro en ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos*. México.
- Peraza, A. (2008). ORGANOGÉNESIS DIRECTA EN ACCESIONES DE Jatropha curcas L. COLECTADAS EN CHIAPAS. Chiapas, México.

- Perez, J. (1998). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Santa Clara: Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Pierick, J. (1990). *Metodos de desinfección de Jatropha curcas* . Honduras.
- PNUD. (2010). *Electrificación de las Islas Galapagos con Energias Renovables ERGAL*. Quito.
- Ponciano, F., Pereira, A., & Esfrain, W. (2008). *Cultivo de pinhao manso (Jatropha curcas)*. Brasilia: Embrapa .
- Posadas, W. (marzo de 2011). Inducción de callos meristemáticos y regeneración de plantas in vitro en el cultivo de piñón. Guatemala.
- Prada, J. (2012). Regeneración de plantas vía organogénesis y crioconservación de Jatropha curcas L. *Tesis de grado*. Turrialba, Costa Rica.
- Quimbayo, A. (2010). *El uso actual del cultivo de la Jatropha curcas L. En sistemas agroforestales y silvopastoriles y su potencial para contribuir al desarrollo social y económico de un cultivo en expansión mundial. Corporación Colombiana de Investigación*. Recuperado el 10 de Mayo de 2014, de <http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Documento/JatrophaContrataciones/MONOGRAFA.pdf>.
- Rengifo, V. (2010). “PROYECTO DE INVERSIÓN PARA LA ELABORACIÓN Y COMERCIALIZACION DE BIODIESEL A PARTIR DE LA PLANTA JATROPHA CURCAS EN EL ECUADOR” . Guayaquil, Ecuador.
- Roca, W. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. . Colombia.
- Romero, G. (2008). *Biotecnología: generalidades, riesgos y beneficios*.
- Ruiz, J. (1999). *Morfogénesis in vitro*. Recuperado el 2014 de Mayo de 24, de http://165.98.8.3/conferencias_2Taller/Morfogenesis_in_vitro.pdf

- Sánchez, J. (2011). Potencial de la organogénesis como estrategia para la masificación in vitro de *Fitzroya cupressoides* en Sudamérica. Costa Rica .
- Sánchez, L. (2012). Multiplicación de callos embriogénicos de arroz (*Oriza sativa*. L) subespecie indica mediante un sistema de cultivo por inmersión temporal (RITA). Costa Rica.
- Segretin, M. (2008). *ARGENBIO*. Recuperado el 8 de Noviembre de 2014, de Los cultivos celulares y sus aplicaciones: <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>
- Sierra de Grado, R. (2002). *El Álamo temblón (Populus tremula L.)*. Madrid: Grupo Mundi-Prensa.
- Silveira, V. (1999). *Embriogêneses somática e sementes sintéticas*. Recuperado el Diciembre de 2014, de <http://www.lfdgv.ufsc.br/Embsomatica.pdf>
- Smithsonian Tropical Research Institute. (2014). Hojas de *Jatropha curcas*. En I. d. Panamá.. Panamá.
- Sudhakar, J. E. (2011). Molecular approaches to improvement of *Jatropha curcas* Linn. As a sustainable energy crop. *Plant Cell Reports*.
- Toro, M. (2004). Establecimiento de protocolos para regeneración in vitro de cerezo dulce (*Prunus avium*) var. lambert. *Tesis.Ingeniero Agrónomo*. Temuco, Chile.
- Toscano, L. (2009). Analisis de los parametros y seleccion de hornos para la combustion de biomasa. *Tesis de grado previa la obtencion del titulo de Ingeniero Mecanico*. Ecuador.
- Trigiano, R. N. (2000). Embriogenesis somática. *Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercices*.
- Vargas, G. (2003). Propagación in vitro de portainjertos de Cerezo. Valparaiso, Chile: Pontificia Universidad Católica de Valparaiso.

Vendiola, E., & Idlao, A. (2006). *Tubang – bakod (Jatropha curcas): The crop of the future*. Recuperado el 10 de Noviembre de 2014, de [http://calabarzon.denr.gov.ph/pdf%20files/list%20of%20techno/Tubang%](http://calabarzon.denr.gov.ph/pdf%20files/list%20of%20techno/Tubang%20crop%20of%20the%20future.pdf)

Yáñez, M. (2011). *Constituyentes minerales en los medios de cultivo*. México.

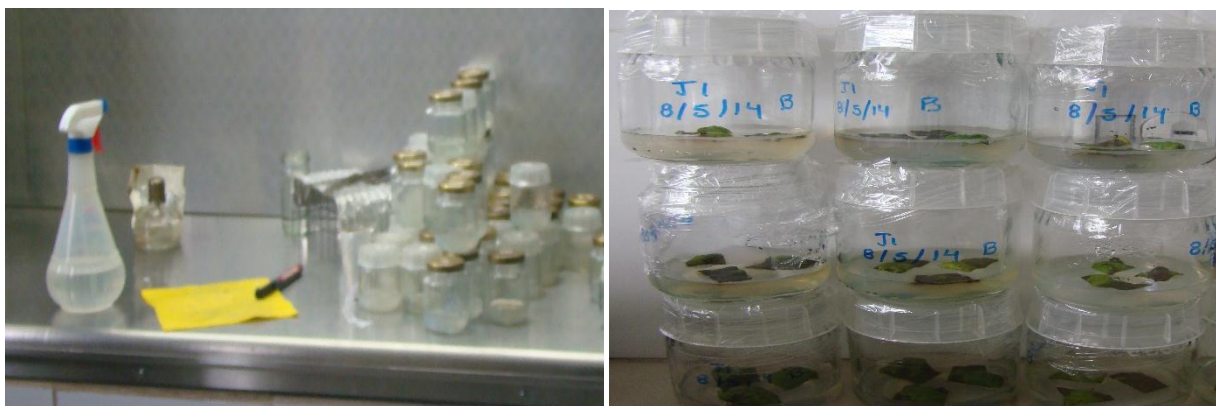
ANEXOS

Anexo 1. Desinfección de material vegetal de piñón (*Jatropha curcas*).



Nota: (Pazmiño & Iles, 2015)

Anexo 2. Introducción de material vegetal de piñón (*Jatropha curcas*).



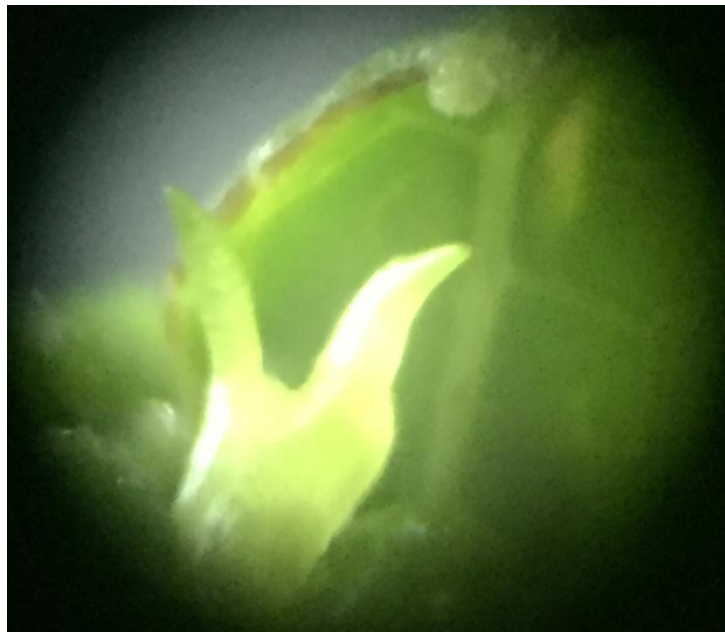
Nota: (Pazmiño & Iles, 2015)

Anexo 3. Callos embriogénicos de piñón (*Jatropha curcas*).



Nota: (Pazmiño & Iles, 2015)

Anexo 4. Embrión en estado cotiledonar de *Jatropha curcas*.



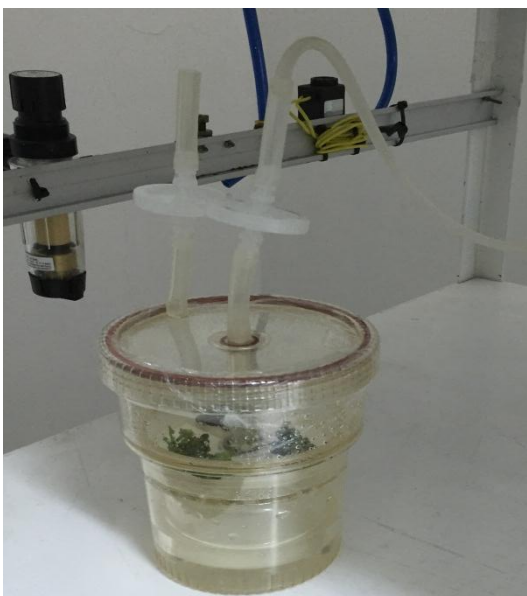
Nota: (Pazmiño & Iles, 2015)

Anexo 5. Desinfección, armada y preparación de medios de cultivo en RITAS.



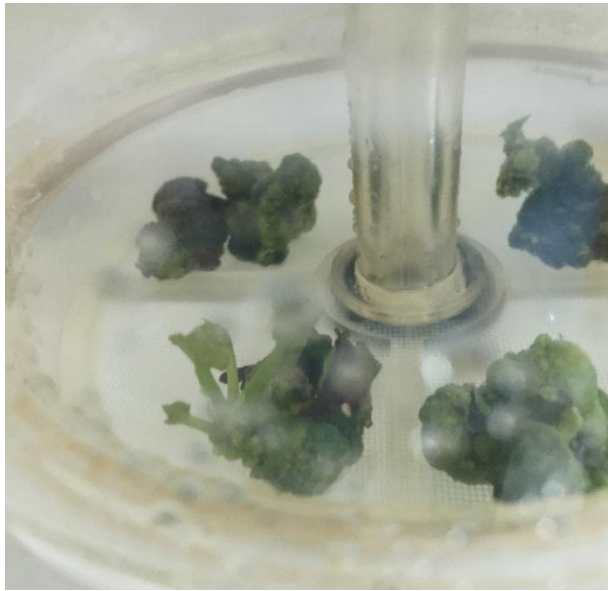
Nota: (Pazmiño & Iles, 2015)

Anexo 6. Sistemas de inmersión temporal RITAS con callos de *Jatropha curcas*.



Nota: (Pazmiño & Iles, 2015)

Anexo 7. Callos organogénicos de *Jatropha curcas* en sistemas de inmersión temporal RITAS.



Nota: (Pazmiño & Iles, 2015)