

ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE PIÑÓN (*Jatropha curcas* L.) PROPAGADAS IN VITRO.

Delgado, H.¹ - Vásquez, J.² – Mas, R.³

Laboratorio de Biotecnología Vegetal – Estación Experimental Agraria “El Porvenir” – Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA

RESÚMEN

Con el propósito de desarrollar una metodología de aclimatación de plántulas de piñón (*Jatropha curcas* L.) cultivadas in vitro a partir de embriones cigóticos, se estudiaron 3 concentraciones (1, 2 y 3 ppm) de dos inductores de crecimiento (AIB y ANA) y 3 niveles de conductividad eléctrica de una solución de fertilizante foliar (1.6, 2.2 y 2.8 mmhos) en plántulas de piñón propagadas in vitro de 28 días en un ambiente de incubación con una intensidad luminosa de 10.76- 2734 lux, temperatura 17.9-25.17°C, humedad relativa de 30.2- 41.7%, y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, con 30 días de pre aclimatación en un ambiente de 21.71 -36.57 °C de temperatura, 38.1- 99.8% de humedad relativa y 10.76- 1862 lux de intensidad luminosa, utilizando un diseño de bloques con arreglo factorial. El porcentaje de supervivencia estuvo influenciado por las interacciones AB (A2B y A1B), las cuales tienen igual efecto con un porcentaje de 97.62 y 96.67%, la interacción BA(B2A, B1A y B3A) tienen igual efecto con un porcentaje de 98.01, 97.65 y 95.58%. La altura de planta está influenciada por la interacción A*B (A1B1 y A2B1), influyendo de igual manera en la altura de plántulas, con una altura promedio de 5.31 y 5.08 cm. La interacción B*A (B1A, B3A y B2A), tienen igual efecto en la altura de plántulas, con un promedio de 5.32, 5.19 y 5.09 cm. El diámetro de tallo está determinada por los inductores de crecimiento (A), las cuales tienen igual efecto con un promedio 0.82704 y 0.76111 cm. El área foliar está influenciada por la interacción (ABC); los inductores de crecimiento ANA (A1) y AIB (A2) no difieren significancia entre ellos, con un área foliar promedio de 22.27 y 21.56 cm². Las concentraciones B2 (2ppm) y B3 (3ppm) no difieren significancia entre ellos, con un área foliar de 22.54 y 22.33 cm², teniendo efectos superiores a la concentración de B1 (1ppm), con un área foliar promedio de 20.88 cm². La conductividad eléctrica de 2.8 mmhos con un área foliar de 23.68 cm² es superior a las conductividades eléctricas del fertilizante foliar de 2.2 y 1.6 mmhos, con un área foliar de 21.44 y 20.62 cm² respectivamente. Longitud de pedúnculo de hojas está influenciada por la interacción ABC, los inductores de crecimiento ANA (A1) y AIB (A2), con una longitud de pedúnculo de 6.39 y 6.34 cm, no difieren significancia entre ellos. Las concentraciones B3 (3ppm) y B2 (2ppm) no difieren significancia entre ellos, con una longitud de pedúnculo promedio de 6.53 y 6.40 cm, teniendo efectos superiores a la concentración de B1 (1ppm), con una longitud de pedúnculo de 6.17 cm. La conductividad eléctrica C3 (2.8 mmhos) con una longitud de pedúnculo de 6.86 cm tiene un efecto superior a las conductividades eléctricas C2 (2.2 mmhos) y C1 (1.6 mmhos), con una longitud de pedúnculo de 6.33 y 5.91 cm. La biomasa fresca de las plántulas está influenciada por la interacción ABC, Los inductores de crecimiento AIB (A2) y ANA (A1), con un peso promedio de biomasa fresca de 5 y 4.8 g no difieren significancia entre ellos. La concentración B1 (1ppm), con un peso de biomasa fresca de 5.10 g es superior a las concentraciones B3 (3ppm) y B2 (2ppm), con un peso promedio en biomasa fresca de 4.84 y 4.77 g. Las conductividades eléctricas C3 (2.8 mmhos), C2 (2.2 mmhos) y C1 (1.6 mmhos), con un peso promedio en biomasa fresca de 5.08, 4.83 y 4.80 g, no difieren significancia entre ellos. La materia seca está influenciada por la interacción ABC. Los inductores de crecimiento A2 (AIB) y A1 (ANA), nos muestra que el A2 (AIB), con un peso promedio de materia seca de 0.69 g, es superior al inductor A1 (ANA), con un peso promedio de materia seca de 0.61 g. La concentración B1 (1ppm), con un peso promedio en materia seca de 0.69 g, es superior a las concentraciones B2 (2ppm) y B3 (3ppm), con un peso promedio en materia seca de 0.64 y 0.63 g respectivamente. La conductividad eléctrica C3 (2.8 mmhos), con un peso promedio en materia seca de 0.70 g; es superior a las conductividades eléctrica C2 (2.2 mmhos) y C1 (1.6 mmhos); con un peso promedio en materia seca de 0.63 y 0.63 g respectivamente. La longitud de raíces está influenciada por la interacción ABC. Los inductores de crecimiento A1 (ANA) y A2 (AIB), con una longitud promedio en raíces de 7.26 y 7.13

cm, no difieren significancia entre ellos. Las concentraciones B2 (2ppm), B3 (3ppm) y B1 (1ppm), con una longitud promedio en raíces de 7.40, 7.14 y 7.05 cm, no difieren significancia entre ellos. Las conductividades eléctricas de la solución fertilizante C3 (2.8 mmhos), C1 (1.6 mmhos) y C2 (2.2 mmhos), con una longitud promedio de raíces de 7.25 ,7.19 y 7.14 cm; no difieren significancia entre ellos.

¹ Ingeniero Agrónomo – Responsable del Laboratorio de Biotecnología Vegetal. E.E.A. “El Porvenir” - INIA.

² Ingeniero Agrónomo – Técnico del Laboratorio de Biotecnología Vegetal. E.E.A “El Porvenir” - INIA.

³ Ingeniero Agrónomo – Responsable de Aclimatación de Biotecnología Vegetal. E.E.A “El Porvenir” - INIA.

INTRODUCCIÓN

Jatropha curcas L., es un miembro de la familia Euphorbiaceae, es considerada como una fuente potencial productora de biocombustibles y recursos energéticos en todo el mundo. Esta planta tiene una polinización cruzada o alógama, que origina gran variabilidad genética, cuando es propagada por semillas, por lo que la forma mantener las características genéticas es por la propagación vegetativa, esta técnica implica el uso de gran cantidad de material vegetal para su propagación. Es por esto que la propagación In Vitro de plántulas, es una importante herramienta del mejoramiento genético, por lo que a través de esta herramienta biotecnológica nos permitirá la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo; así como el manejo de las mismas en espacios reducidos, la obtención de plantas libres de patógenos; la clonación de plantas homocigotas, en la multiplicación de plantas en peligro de extinción, facilita estudios de ingeniería genética. Una de las fases que comprende la propagación In Vitro es la aclimatación de las plántulas. Esta es la última fase e imprescindible en la propagación In Vitro. En la aclimatación se busca la adaptación de las plántulas a las condiciones medio ambientales, con un alto porcentaje de supervivencia (mortalidad mínima) y un rápido crecimiento. En esta fase se proporcionan factores como nutrientes, humedad, temperatura e iluminación en forma gradual y controlada, para luego ser transferidas a condiciones de cultivo en vivero.

En la actualidad no se disponen de metodologías para la aclimatación a gran escala de plántulas de Piñon blanco (*Jatropha curcas* L.), propagadas In Vitro. Por esta razón con este trabajo se logró generar un protocolo de aclimatación de plántulas de piñon propagadas in vitro, garantizando así el éxito para la propagación clonal de plantas a gran escala comercial.

MÉTODOS

PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL EN LA FASE IN VITRO

El material vegetal que se usó como fuente de explante fueron embriones cigóticos, las semillas fueron provenientes del sector Totorillaico de la accesión Totorillaico, los frutos recolectados fueron maduros, pintones y secos, las cuales fueron descapsuladas para la obtención de las semillas, para ser secados bajo sombra y almacenados por un tiempo de una semana; la obtención de las almendras se realizó a través del escarificado manual. La desinfección se realizó con hipoclorito de sodio al 1% por un tiempo de 20 minutos, se realizó cuatro enjuagadas con agua destilada esteril, la hidratación fue por un tiempo de 18 horas; la siembra de los embriones se realizó en un medio de cultivo M&S a media concentración en la cámara de flujo laminar y el tiempo de incubación fue de 28 días.

PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL EN LA FASE EX VITRO

Transcurrido los 28 días de incubación, se inició a la etapa de pre aclimatación que fue por un tiempo de 30 días en un ambiente de 21.71 -36.57°C de temperatura, 38.1- 99.8% de humedad relativa y 10.76- 1862 lux de intensidad. La etapa de aclimatación es de 2 meses, tiempo en la cual la planta está adaptada al medio ambiente natural.

PROTOCOLO DE ACLIMATACIÓN DE PLANTULAS DE PIÑÓN *Jatropha curcas* L. PROPAGADAS IN VITRO

PREPARACIÓN DEL SUSTRATO

El sustrato utilizado fue una proporción 3:1 (3 partes de tierra negra de una textura franco-arenoso y 1 parte de arena de río), zarandeado y esterilizado en una olla autoclave a 121°C y 15 libras de presión, por un tiempo de 20 minutos.

BANDEJAS ACLIMATADORAS

Se utilizaron bandejas de color negras de 9x6, con 54 pulg, el lavado se realizó con detergente y agua de caño, la desinfección se realizó con hipoclorito de sodio al 1%, el tecnopor fue puesto en la base de cada pulg, posteriormente se procedió al llenado de las bandejas con el sustrato y finalmente se elaboraron los hoyos.

PREPARACIÓN DE LOS INDUCTORES DE CRECIMIENTO

Los inductores utilizados son dos auxinas AIB y ANA a una concentración de 1,2 y 3ppm

PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL PARA LA ETAPA DE ACLIMATACIÓN

La extracción de las plántulas se debe realizar teniendo cuidado de no causar daños mecánicos de los tallos, hojas y raíces pues a partir de ello aparecen las raíces de aclimatación totalmente funcionales, las plantas a aclimatar debe ser plantas con tallo endurecido, buena masa radicular y debe tener la parte apical de la planta activo, el cortado del 90% del área foliar de cada hoja individual se realizó con la finalidad de disminuir la deshidratación de las plantas, se realizó el desinfectado con carbendazin a una dosis de 1ml/l y tiempo de la aplicación de inductores de crecimiento a las plantas es de 20 minutos en contacto con ellas.

REPIQUE DE LAS PLÁNTULAS

Se realizó en forma manual, cubriendo la parte radicular de las plántulas con el sustrato y para adherir las raíces con el sustrato y evitar la formación de cámaras de aire se realizó un riego en forma manual.

PRERACIÓN DE LA SOLUCIÓN FERTILIZANTE FOLIAR

Se utilizó como base el fertilizante foliar balanceado 20-20-20, a partir de ella se preparó las soluciones de 1.6, 2.2 y 2.8mmhos utilizando el conductímetro.

APLICACIÓN DE LA SOLUCIÓN FERTILIZANTE FOLIAR

Se realizó desde el momento del repique, las posteriores aplicaciones se realizó semanalmente.

CÁMARA HÚMEDA

Se utilizó con la finalidad de mantener el ambiente a una alta humedad relativa, y evita la deshidratación de las plántulas.

RIEGO

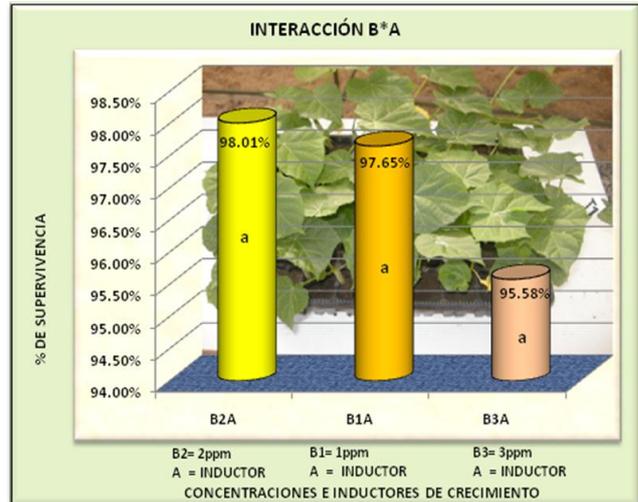
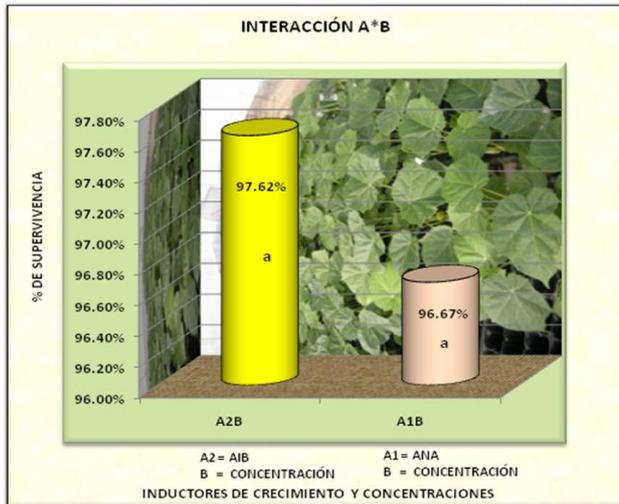
Se realizó teniendo en cuenta la capacidad de campo del sustrato.

CONTROL FITOSANITARIO

Se realizó de acuerdo a la incidencia de plagas y enfermedades.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

EFECTO DE LOS FACTORES EN ESTUDIO DEL PORCENTAJE DE SUPERVIVENCIA GRÁFICO N°01



La prueba múltiple de DUNCAN al 0.01% de probabilidad para la interacción A*B del gráfico N° 01 muestra que no existen diferencias estadísticas entre las interacciones de los dos inductores de crecimiento por el factor concentración (A2B y A1B), con un porcentaje de supervivencia de 97.62% y 96.67%. Esto nos dice que los dos inductores de crecimiento influyen de igual forma en el porcentaje de supervivencia de plántulas de piñón *Jatropha curcas* L propagadas in vitro en la etapa de aclimatación.

La prueba múltiple de Duncan al 0.01% de probabilidad para la interacción B*A del gráfico N° 02 muestra que no existen diferencias estadísticas entre las interacciones concentraciones e inductores de crecimiento (B2A, B1A y B3A); con un porcentaje de supervivencia de 98.01%, 97.65% y 95.58%. Esto nos dice que las tres concentraciones (1ppm, 2ppm y 3ppm), para los dos inductores de crecimiento actúan de igual forma en el porcentaje de supervivencia de plántulas de piñón *Jatropha curcas* L, propagadas in vitro en la etapa de aclimatación, debido a que el porcentaje de supervivencia de las plántulas de piñón *Jatropha curcas* L., está influenciado directamente por la etapa de pre aclimatación, en donde se busca endurecer el tallo, ejercitar los estomas, aumentar la cantidad de cloroplastos y masa radicular, lo cual es corroborado por **Fila et al (1998)**, quienes señalan que la aclimatación puede ser mejorada modificando el microambiente durante el desarrollo In Vitro (pre aclimatación), por ejemplo reduciendo la humedad relativa que causa un endurecimiento de la planta, mejorando los resultados durante el trasplante. También aumentando las intensidades de luz, para producir el establecimiento autotrófico In Vitro. Ejercitar los estomas juega un papel muy importante en regular la transpiración de la planta de piñón *Jatropha curcas* L. confirmado por **Sánchez-Díaz y Aguirreolea (2000)**, quienes señalan que los estomas proporcionan a las plantas un mecanismo fundamental para adaptarse a un ambiente continuamente cambiante, permitiendo el intercambio físico activo entre las partes aéreas de la planta y la atmósfera. El papel fundamental de los estomas es la regulación de la pérdida de agua (transpiración) y la absorción de CO₂ (asimilación fotosintética del carbono), lo cual es corroborado por **Santa María et al (1993) citado por Pospisilova et al (1999)**, quienes reportan la gran importancia que tiene la estructura, morfología y funcionalidad del aparato estomatal durante la aclimatización de las plantas producidas in vitro. En fase de aclimatación a las plantas se debe proporcionar una alta humedad a través de cámaras húmedas. **Wetzstein et al. (2002) citado por Nieto (2008)**, menciona que mantener una alta humedad en los primeros días de la transferencia ex vitro es un factor crítico para la sobrevivencia de las vitro plantas utilizando sistemas que proporcionen alta humedad relativa y que permitan su reducción gradual hasta el final del proceso. **Ziv (1995) citado por Nieto (2008)**, manifiesta que durante las primeras dos semanas posteriores al trasplante, es necesario controlar adecuadamente los factores ambientales y se requiere simular las condiciones del

ambiente in vitro, hasta tanto que las plantas se adapten. Sin embargo en el presente estudio la etapa de crítica de aclimatación se redujo a 1 semana, considerando como factor elemental la pre aclimatación como etapa previa a la aclimatación.

Se considera que una plántula de *Jatropha curcas* L., esta aclimatada cuando se observa la aparición de nuevas hojas, nuevas raíces, incremento de diámetro de tallo y siendo capaces de generar sus propios alimentos convirtiéndose de planta heterótrofa a autótrofa en un tiempo de 8 semanas considerando la pre aclimatación, mantenidas a un 70% de sombra. Sin embargo **Riquelme et al (1991) citado por Nieto (2008)**, mencionan que las vitro plantas son generalmente aclimatadas durante 4 semanas a 90% de sombra. Los resultados obtenidos en el presente estudio contradicen lo citado por **NIETO (2008)**, debido a que cuatro semanas no es lo suficiente para lograr esa respuesta fisiológica que permita la supervivencia de las vitro plantas en la etapa de aclimatación.

La masa radicular es uno de los factores importantes en el porcentaje de supervivencia en la etapa de aclimatación de plántulas de piñon *Jatropha curcas* L. corroborado por **Mohammed y Videver (1990)**, quienes mencionan que la presencia de raíces en plantas leñosas garantiza alta supervivencia en la aclimatización.

EFFECTO DE LOS FACTORES EN ESTUDIO EN LA ALTURA DE PLANTA

GRÁFICO N°03

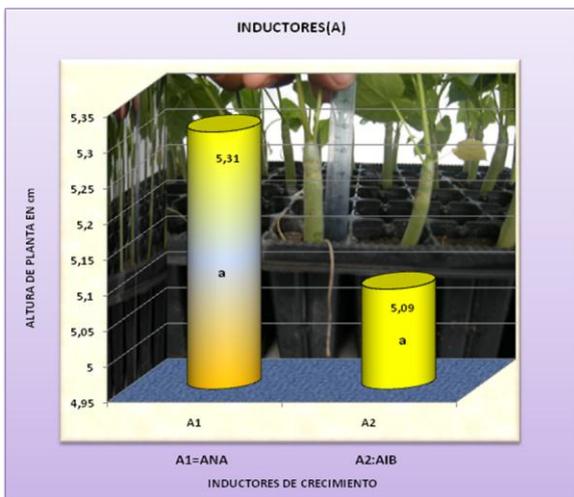


GRÁFICO N°04

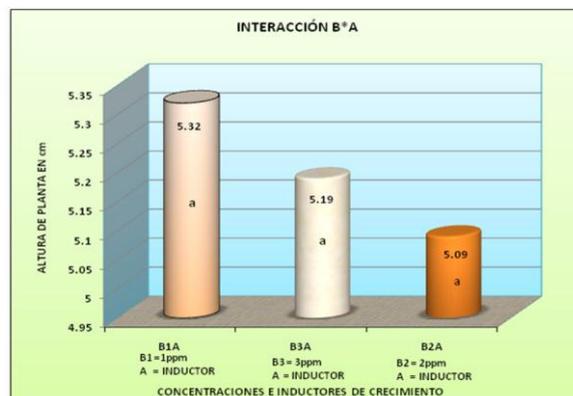
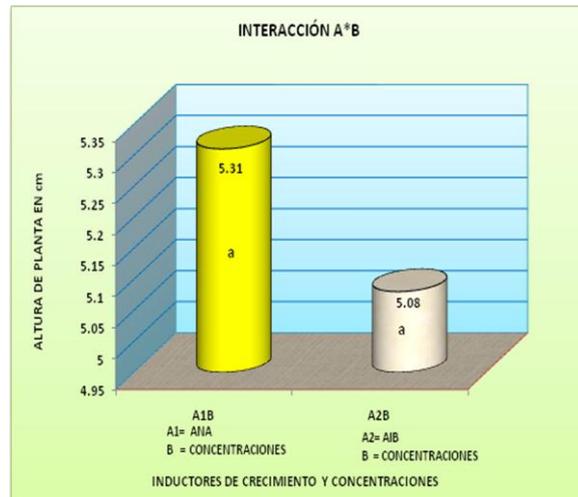


GRÁFICO N°05

La prueba múltiple de Duncan al 0.01% de probabilidad para los inductores de crecimiento (A1 y A2), del gráfico N° 03 muestra que no hay diferencia estadística entre los dos inductores de crecimiento (A1=ANA y A2= AIB), con un promedio de altura de planta de 5.31 y 5.09 cm. Esto permite afirmar que los dos inductores de crecimiento actúan de igual manera en la altura de plantas en la etapa de aclimatación.

Interacción (A*B) del gráfico N° 04 muestra que las interacciones A1B y A2B, tienen igual efecto en la altura de planta con un promedio de altura de planta de 5.31 y 5.08 cm, no habiendo diferencia significativa entre ellos.

Interacción (B*A) del gráfico N° 05 muestra que las interacciones B1A, B3A y B2A, tienen igual efecto en la altura planta, no habiendo diferencia estadística entre ellos. Con un promedio de altura de planta de 5.32, 5.19 y 5.09 cm respectivamente. Esto nos indica que los inductores de crecimiento y las concentraciones establecidas de (1, 2 y 3 ppm), tienen igual efecto en la altura de planta.

EFFECTO DE LOS FACTORES EN ESTUDIO EN EL DIÁMETRO DE TALLO

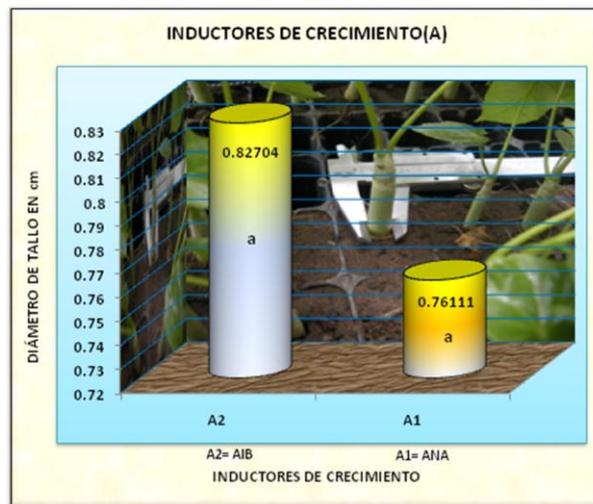


GRÁFICO N°06

La prueba múltiple de Duncan al 0.01% de probabilidad para los inductores de crecimiento del gráfico N° 06 muestra que no existen diferencias estadísticas entre los dos inductores de crecimiento; el ácido indol-3-butírico (A2) y el ácido naftalenacético (A1), con un diámetro promedio de tallo de 0.82704 y 0.76111 cm respectivamente. Esto nos indica que los dos inductores de crecimiento tanto AIB y ANA, tienen igual efecto en diámetro de tallo con las tres concentraciones en estudio como son: 1,2 y 3 ppm respectivamente. El diámetro de tallo está influenciado por el nivel nutricional de la planta, que es el órgano de reserva, tal como lo menciona **Gutiérrez (2002)**, que los tallos representan a la vez un importante consumidor de recursos minerales para sustentar la producción de tejidos vasculares y accesorios, la actividad del cambium y el crecimiento expansivo en especies perennes, y el almacenamiento de reservas.

El tallo es un importante órgano de reserva (particularmente en especies perennes) de agua, minerales y compuestos orgánicos, movilizables durante períodos de estrés (déficit hídrico, defoliación, podas). **Gutiérrez (2002)**.

EFFECTO DE LOS FACTORES EN ESTUDIO EN EL ÁREA FOLIAR

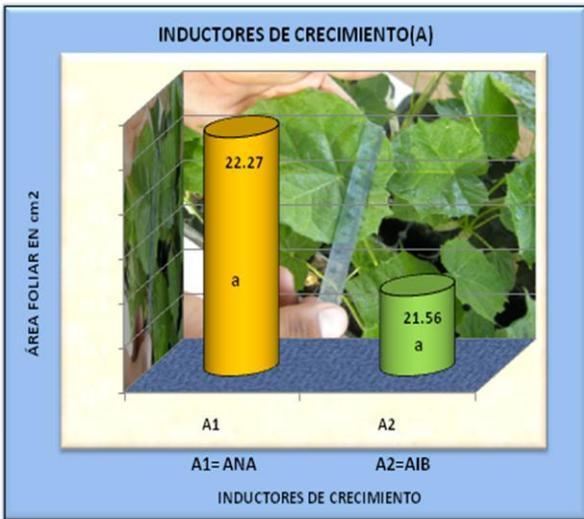


GRÁFICO N°07

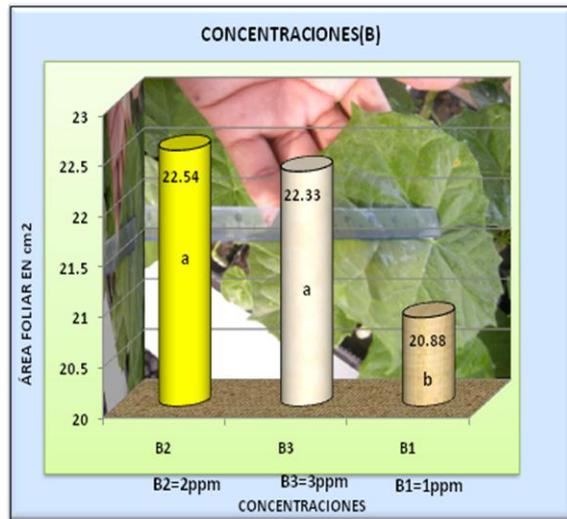


GRÁFICO N°08

GRÁFICO N°09

GRÁFICO N°10

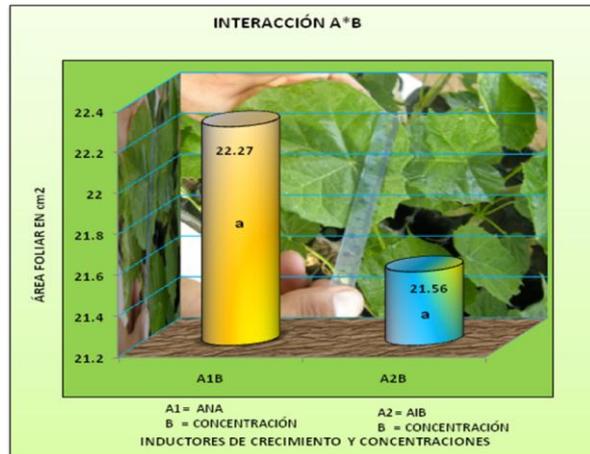
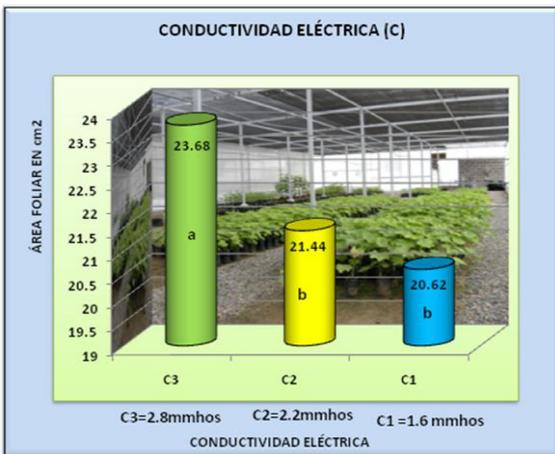


GRÁFICO N°11

GRÁFICO N°12

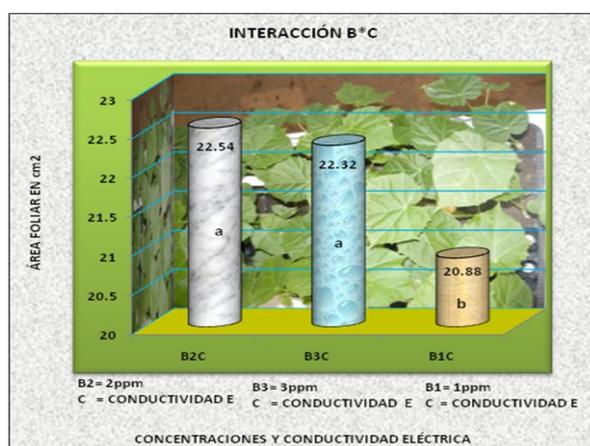
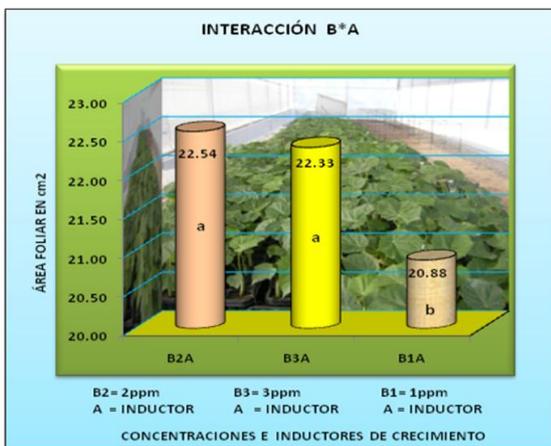


GRÁFICO Nº13

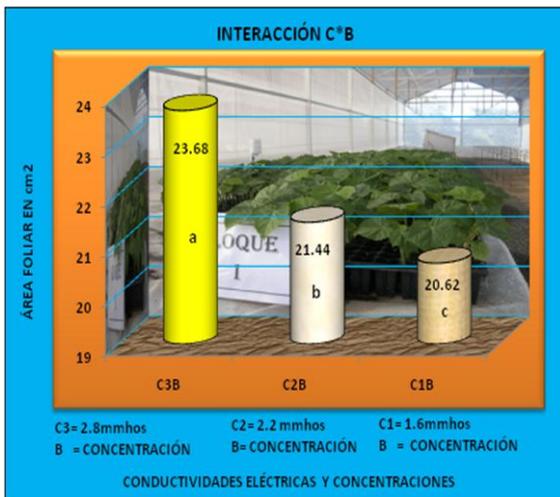


GRÁFICO Nº14

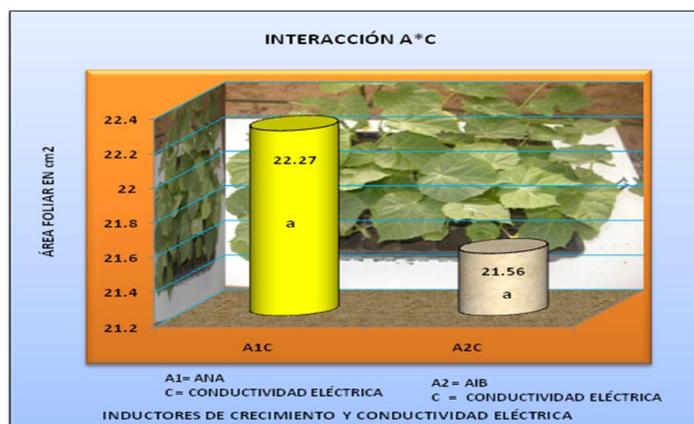
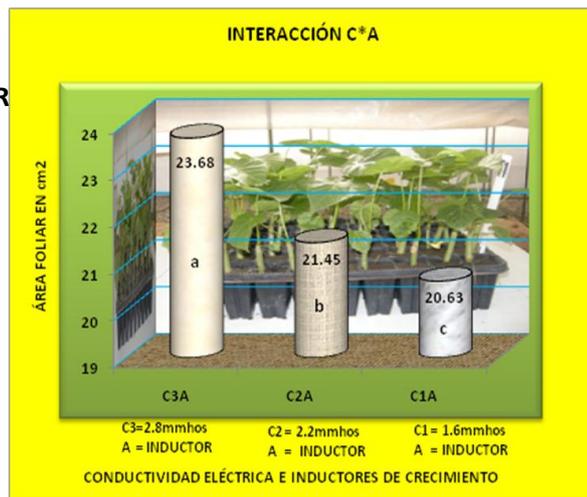


GRÁFICO Nº15

La prueba múltiple de Duncan al 0.01% de probabilidad para los inductores de crecimiento del gráfico Nº 07, muestra que los dos inductores de crecimiento tanto A1 (ANA) y A2 (AIB), con un promedio de área foliar de 22.27 y 21.56 cm², no muestran significancia estadística entre ellos, Esto quiere decir que los dos inductores de crecimiento tienen igual efecto en el tamaño de área foliar. La prueba múltiple de Duncan al 0.01% de probabilidad para las concentraciones de los inductores de crecimiento del gráfico Nº 08, muestra que las dos concentraciones B2 (2ppm) y B3 (3ppm), con un promedio de área foliar de 22.54 y 22.33 cm², son superiores a la concentración de B1 (1ppm), con un área foliar de 20.88 cm²; no habiendo diferencia significativa entre ellos. La concentración de B1 (1ppm), con un área foliar de 20.88 cm² es inferior a las dos concentraciones (B2 y B3) respectivamente. La prueba múltiple de Duncan al 0.01% de probabilidad para las conductividades eléctricas del gráfico Nº 09, muestra que la conductividad eléctrica de la solución fertilizante foliar a 2.8 mmhos (C3), con un área foliar de 23.68 cm², es superior a las conductividades 2.2 mmhos y 1.6 mmhos (C2 y C1). Las conductividades 2.2 mmhos y 1.6 mmhos (C2 y C1), con un promedio de área de 21.44 y 20.62cm², muestran que no hay diferencia estadística entre ellos siendo inferior a la conductividad de 2.8mmhos (C3).

La prueba múltiple de Duncan al 0.01% de probabilidad para la interacción (A*B) del gráfico Nº 10 muestra que la interacción A1B y A2B, tienen igual efecto en el área foliar, con un promedio de 22.27 y 21.56 cm², no habiendo diferencia estadística entre ellos. La prueba múltiple de Duncan para la interacción (B*A) del gráfico Nº 11 muestra que las interacciones B2A y B3A, tienen igual efecto en el área foliar, con un promedio de 22.54 y 22.33 cm²; no habiendo diferencia estadística entre ello, siendo superiores a la interacción B1A, con un promedio de área foliar de 20.88 cm². La prueba múltiple de Duncan al 0.01% para

la interacción (B*C) del gráfico N° 12 muestran que las interacciones B2C y B3C, tienen igual efecto en el área foliar, con un promedio de 22.54 y 22.32 cm²; no habiendo diferencia estadística entre ellos, siendo superiores a la interacción B1C, con un promedio de área foliar de 20.88cm². La prueba múltiple de Duncan para la interacción (C*B) del gráfico N° 13 muestra que la interacción C3B, con un promedio de área foliar de 23.68cm², es superior a las interacciones C2B y C1B, con un promedio de área foliar de 21.44 y 20.62 cm² respectivamente. La interacción C2B con un promedio de área foliar de 21.44 cm² es inferior que la interacción C3B y superior a la interacción C1B. La interacción C1B con un promedio de área foliar de 20.62 cm² es inferior a las interacciones C3B y C2B. La prueba múltiple de Duncan para la interacción (A*C) del gráfico N° 14 muestran que el efecto de las interacciones A1C y A2C, son iguales con un promedio de área foliar de 22.27cm² y 21.56 cm², no habiendo diferencia estadística entre ellos.

La prueba múltiple de Duncan para la interacción (C*A) del gráfico N° 15 muestra que la interacción C3A, con un promedio de área foliar de 23.68 cm², es superior a las interacciones C2A y C1A, con un promedio de área foliar de 21.45 y 20.63 cm² respectivamente. La interacción C2A con un promedio de área foliar de 21.45 cm² es inferior que la interacción C3A y superior a la interacción C1A.

La interacción C1A con un promedio de área foliar de 20.63 cm² es inferior a las interacciones C3A y C2A respectivamente. El área foliar de las plántulas de piñon (*Jatropha curcas* L.), está influenciado por los inductores de crecimiento (A1 y A2); no habiendo diferencia estadística, las concentraciones de inductores de crecimiento de 2 y 3 ppm (B2 y B3) y una conductividad eléctrica de la solución fertilizante de 2.8 mmhos (C3). La aplicación de una solución fertilizante foliar, además de ayudar a la nutrición de la plántula, ayuda a prevenir la deshidratación .corroborado por **Lane (1979) citado en Ruiz (2003)**, quien asegura que la aplicación foliar de nutrientes además de proporcionar nutrientes a las plantas ayuda a prevenir la deshidratación.

Las hojas y sus partes (peciolos, láminas, fluidos) representan la inversión de los recursos nutricionales de las plantas en procesos fisiológicos directamente ligados a las tasas de intercambio gaseoso (asimilación fotosintética del CO₂, transpiración) **Gutiérrez (2002)**.

EFECTO DE LOS FACTORES EN ESTUDIO EN LA LONGITUD DE PEDÚNCULO

La prueba múltiple de Duncan al 0.01% de probabilidad para las concentraciones (B), del gráfico N° 16, muestran que las concentraciones B3 (3 ppm) y B2 (2 ppm) con una longitud promedio de pedúnculo de 6.53 y 6.40 cm, son superiores a la concentración B1 (1 ppm), con una longitud promedio de 6.17 cm; no habiendo diferencia estadística entre ellos. La prueba múltiple de Duncan al 0.01% de probabilidad para las conductividades eléctricas (C), del gráfico N° 17 muestra que la conductividad eléctrica de 2.8 mmhos (C3), con un promedio de longitud de pedúnculo de 6.86 cm es superior a la conductividades eléctricas de 2.2mmhos (C2) y 1.6mmhos (C1), con una longitud promedio de pedúnculo de 6.33 y 5.91 cm.

La conductividad eléctrica de 2.2mmhos (C2) tiene un efecto inferior a la conductividad de 2.8 mmhos (C3) y es superior a la conductividad eléctrica de 1.6 mmhos (C1). La prueba múltiple de Duncan al 0.01% de probabilidad para la interacción (A*B) del gráfico N° 18 muestran que la interacción A1B y A2B, tienen igual efecto en la longitud de pedúnculo, con un promedio de 6.39 y 6.34 cm respectivamente, no habiendo diferencia estadística entre ellos. La prueba múltiple de Duncan al 0.01% de probabilidad para la interacción (B*A) del gráfico N° 19 muestra que las interacciones B3A y B2A, tienen igual efecto en la longitud de pedúnculo, con un promedio de 6.53 y 6.40 cm; no habiendo diferencia significativa entre ello, siendo superiores a la interacción B1A, con un promedio de longitud de pedúnculo de 6.17cm. La prueba múltiple de Duncan al 0.01% para la interacción (B*C) del gráfico N° 20 muestra que la interacción B3 C, con una longitud promedio de pedúnculo de 6.53 cm, es superior a las interacciones B2C y B1C, con una longitud promedio de 6.40 y 6.17 cm. La interacción B2C, con una longitud promedio de pedúnculo de 6.40cm, es inferior a la interacción B3C y superior a la interacción B1C. La interacción B1C, con una longitud promedio de pedúnculo de 6.17 cm es inferior a las interacciones B3C y B2C respectivamente. La prueba múltiple de Duncan al 0.01% para la interacción (C*B) del gráfico N° 21 muestra que la interacción C3B, con una longitud promedio de pedúnculo de 6.87 cm, es superior a las interacciones C2B y C1B, con longitudes promedios de 6.33 y 5.91 cm.

La interacción C2B, con una longitud promedio de pedúnculo de 6.33 cm, es inferior a la interacción C3B y superior a la interacción C1B. La interacción C1 B, con una longitud promedio de pedúnculo de 5.91 cm es

inferior a las interacciones C3B y C2B respectivamente. La prueba múltiple de Duncan para la interacción (A*C) del gráfico N° 22 muestran que el efecto de las interacciones A1C y A2C, son iguales estadísticamente, con una longitud promedio de pedúnculo de 6.39 cm y 6.34 cm, no habiendo diferencia estadística entre ellos.

La prueba múltiple de Duncan al 0.01%, para la interacción (C*A) del gráfico N° 23 muestra que la interacción C3A, con una longitud promedio de pedúnculo de 6.86 cm, es superior a las interacciones C2A y C1A, con una longitud promedio de pedúnculo de 6.33 y 5.91 cm respectivamente. La interacción C2A con una longitud promedio de pedúnculo de 6.33 cm es inferior que la interacción C3A y superior a la interacción C1A.

La interacción C1A con una longitud promedio de pedúnculo de 5.91 cm es inferior a las interacciones C3A y C2A. El análisis de Duncan para la longitud de pedúnculo nos dice que la longitud del pedúnculo está influenciado por los inductores de crecimiento (ácido naftalenacético (ANA) y ácido Indol butírico (AIB), a concentraciones de 2ppm (B2) y 3 ppm (B3), y una conductividad eléctrica de fertilizante foliar de 2.8 mmhos (C3); esto nos dice que los inductores de crecimiento(A1 y A2) a concentraciones 2 ppm y 3 ppm tienen la capacidad de promotores de enraizamiento, haciendo que las plántulas de piñon *Jatropha curcas* L. tengan un buen enraizamiento para la absorción de nutrientes del suelo (sustrato) y la solución fertilizante foliar a una conductividad eléctrica de 2.8 mmhos tiene los nutrientes ideales para el desarrollo óptimo de la longitud de pedúnculo, coincidiendo con **Gutiérrez (2002)**, quien manifiesta que la longitud del pedúnculo se utiliza para diagnosticar el estado nutricional de las plántulas.

CONCLUSIONES

Para la aclimatación de plántulas de piñon (*Jatropha curcas* L.), propagadas in vitro a través de embriones cigóticos, se debe utilizar como inductor de crecimiento el ácido Indol butírico (AIB) a una concentración de 1 ppm y una solución de fertilizante foliar balanceado (20-20-20) a una conductividad eléctrica de 2.8mmhos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI-AHMAD,M; HUGHES,H.G;SAFAD.F 1998.Studies on stomatal function epicuticular wax and stem-root transition region of polyethylene gly col-treated and non treated in vitro grape plantlets. In Vitro cellular and Developmental Biology-Plant.34:1.7.
- AMANCIO, S., REBORDAO, J. P. and CHAVES, M. M. 1999. Improvement of acclimatization of micropropagated grapevine: Photosynthetic competence and carbon allocation. Plant Cell Tissue and Organ Culture 58Pág 31-37.
- BEALE, M.H Y ESPONSEL, V.M 1993. Future Directions in Plant Hormone Research. J Plant Growth Regul. Pag.12, 227, 235.
- BLAZICH, F.A 1988.chemicals and formulations used to promote adventitious rooting. In Adventitious Root Formation in Cuttings (Eds.Davis,T.D;Haissig,N.).Portland, Oregon.Dioscorides Press, pp 132-149.
- BOUTHERIN, D. y BRON, G. 1994. Multiplicación de plantas hortícolas. Zaragoza, Acribia. Pág 225.
- BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L.J. 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. Journal of American Society for Horticultural Science, v.196, Pág.515-518.
- DAMI,I,HUGHES ,H ,G 1995 Leaf anatomy and water loss of in vitro PEG-treated "Valiant" grape . Plant Cell Tissue and Organ Culture 42: 197-184.
- DAMI ,I HUGHES,H.G 1997.Effects of PEG-induced water stress on in vitro hardening of "Valiant" grape ,plant Cell Tissue and Organ Culture 42:179-184.
- DAVIES, W.J. eds. Physiology, growth and development of plants in culture.Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. Pág 204-214.
- DEBERGH, P., ZIMMERMAN, R. eds. Micropropagation technology and application. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. Pág 447-469.
- DELGADO, G Y ROJAS, C.1999. Cultivo De Tejidos Vegetales I, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo Lambayeque – Perú Pág. 32, 84.
- DONNELLY, D and VIDAVER, W. 1984. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109 (2): 172-176.
- DONNELLY, D; W. VIDAVER Y K. LEE. 1995. The anatomy of tissue culture red.Raspberry prior to and after transfer to soil. Plant Cell Tissue andOrgan Culture. 4:43-50.

- FIGUEROA, N. 2003. Preaclimatación In Vitro de plantas de violeta africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) y su efecto sobre la aclimatación. Taller de Licenciatura. Ing. Agr. Quillota, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. Pág 64.
- FILA, G., GHASHGHAE, J., HOARAU, J. and CORNIC, G. 1998. Photosynthesis, leaf conductance and water relations of In Vitro cultured grapevine rootstock in relation to acclimatisation. *Physiologia Plantarum* 102 (3): Pág 411-418.
- FRANKE, W. 1986. The basis of foliar absorption of fertilizers with special regard to the mechanism. pp. 17-25. In: A. Alexander (ed.). Foliar fertilization. Proceedings of the First International Symposium of Foliar Fertilization by Schering Agrochemical Division. Berlin. 1985.
- FREGONI, M. 1986. Some aspects of epigeal nutrition of grapevines. pp. 205-211. In: A. Alexander (ed.). Foliar fertilization. Proceedings of the First International Symposium of Foliar Fertilization by Schering Agrochemical Division. Berlin. 1985.
- GARCÍA H., E. DEL R. Y C.B. PEÑA V. 1995. La pared celular, componente fundamental de las células vegetales. UACH. Primera Edición. México, D.F.
- GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P.D. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Eversley. G.B. Exegetics. Pág 709.
- GIRGEBV. 1994. LABORATORIO DE GENÉTICA-UNIDAD DE CULTIVO DE TEJIDOS. "Resumen del primer curso nacional de Propagación In Vitro de especies ornamentales". Perú.
- GRANADA, C. 1990. Fundamentos Teórico – Práctico de Cultivo de Tejidos Vegetales. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación. Roma Pág 85 – 87.
- GRIBAUDO, I., NOVELLO, V. and RESTAGNO, M. 2001. Improved control of water loss from micropropagated grapevines (*Vitis vinifera* cv. Nebbiolo). *Vitis* 40 (3): Pág 137-140.
- GROUT, B. and ASTON, M. 1977. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Hort. Res.* 17: Pág 1-7.
- GROUT, B.W.W. 1978. Wax development on leaf surface of *Brassica oleracea* var. Currawong regenerated from meristem culture. *Plant Sci Lett* 5: Pág 401-405.
- GUTIÉRREZ M (2002). Estación Experimental Fabio Baudrit M, Universidad de Costa Rica.
marcogs@racsa.co.cr
- HARTMANN, H. y KESTER, E. 1995. Propagación de plantas. Principios y Prácticas. 4a. ed. México. D.F. Continental. Pág 760.
- HOLDRIDGE, L. R. 1978. Ecología Basada en zonas de vida. IICA. San José – Costa Rica. 216 p.
- HOYOS, V. Y N. PALMA. 1995. Diccionario de floricultura. Ball Publishing. Illinois. Estados Unidos. 414 p.
- HURTADO, M.; y MERINO, A. 1994. "Plants Tissue Culture". México. Pág 67.
- INFANTE, R., MAGNANINI, E. and RIGHETTI, B. 1989. The role of light and CO₂ in optimising the conditions for shoot proliferation of *Actinidia deliciosa*.
- JAMISON, J.A. RENFROE, M.H. 1998. Micropropagación of Betula nana (Ashe) Fernald, In vitro cell. *Development Biology Plant*. 34:147-151. *In Vitro. Physiol. Plantarum*. 77: Pág 191-195.
- JYUNG, W.H. Y S.H. WITWER. 1964. Foliar absorption-an active uptake process. *Amer. J. Bot.* 51: Pág 437-444.
- KADLECEK, P., TICHÁ, I., HASEL, D., CAPKOVÁ, V. and SCHAFFER, C. 2001. Importance of In Vitro pretreatment for ex vitro acclimatization and growth. *Plant Science* 161: Pág 695-701.
- KOVACS, G. 1986. The importance of environmental, plant and spray characteristics for any foliar nutrition programme to be successful. In: A. Alexander (ed.) Pág 26-43.
- KOZAI, T. 1991. Micropropagation under photo autotrophic conditions p 467- 469 In *Micropropagation. Technology and application*, DEBERG, P.C; ZIN MERMANN, R.H (eds) KLUWER.
- LANE, W. D. 1979. Regeneration of perar plants from shoot meristem-tips. *Plant Sci. Lett.* 16, Pág 337-342.
- LEECE, D.R. 1976. Composition and ultrastructure of leaf cuticles from fruit trees, relative to differential foliar absorption. *Austral. J. Plant Physiol.* 3: 833-847.
- LEWANDOWSKI, V. T. 1991. Rooting and acclimatization of micropropagated grapes. *HortScience* 26: Pág 586-589.
- LORRIE MORTIMER cultivado en seis sustratos universidad centroccidental "lisandro alvarado" cabudare.
- LUYA U. 1999. Micropropagación In Vitro y aclimatación de Marigold (*Tagetes erecta*). Tesis para optar el título de Biólogo, Universidad Agraria La Molina. Lima, Perú.
- MALAVOLTA, E. 1986. Foliar fertilization in Brazil.- Present and perspectives. Pág . 170-192. In: A. Alexander (ed.). Foliar fertilization. Proceedings of the First International Symposium of Foliar Fertilization by Schering Agrochemical.
- MEJIA, A. 1994. Propagación comercial de 312 especies de plantas por Cultivo In Vitro. Agro biotecnología: Fundamentos y aplicaciones. La Molina - Lima. Perú. pag 79.
- MOGOLLÓN, N. 2003. Estudios morfoanatómicos y fisiológicos en la aclimatación de plantas in vitro de *Dieffenbachia maculata* Schott 'Sublime'. Tesis Doctoral Universidad Central de Venezuela. Facultad d Agronomía. Maracay-Venezuela. Pp.142.

- MOHAMMED, G.H. & VIDAVER, W.E. 1990. The influence of acclimatization treatment and plant morphology on early greenhouse-performance of tissue-cultured Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco). *Plant Tiss. Cult.*, 21:Pág 111-117.
- MURPHY, K., SANTAMARÍA, J., DAVIES, W. and LUMSDEN, P. 1998. Ventilation of cultured vessels: I. Increased growth In Vitro and survival ex vitro *Delphinium*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73 (6): Pág 725- 729.
- NIETO CARLOS (2008) aclimatización y desarrollo en vivero de *dendrobium*.
- NOÉ, N BONINI, I 1996, Leaf Anatomy of High-bush Blueberry Grown in vitro and during Acclimatización to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum* 38:19-25.
- PEÑALVER, D; F. JIMÉNEZ Y M. DITA. 1998. Acclimatización. In: J. Pérez (ed) *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Instituto de biotecnología de las plantas. Ediciones GEO. Santa clara, Cuba. Pp: 193-205.
- PIERIK. R.L.M 1990. Cultivo In Vitro de las Plantas Superiores. Ediciones Mundi - Prensa. Madrid - España. Pág 295-326.
- PINEDO, F. 2000. "Propagación y conservación In Vitro de la Uña de Gato (*Uncaria spp.*)". INIA-Experimental San Roque. Lima – Perú. 25p.
- PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE. 2003. Composición gaseosa y aire puro, (on line). www.puc.cl/sw_educ/contam/atm/atm06.htm.
- POOLE, R. Y C. CONOVER. 1983. Establishment and Growth of In vitro-cultured *Dieffenbachia*. *HortScience* 18(2): 185-187.
- POSPISILOVA ,J,EATSKY,J SESTAK,Z 1997 Photosynthesis in plants cultivated in vitro p 525-540 – In Pessarac II Handbook of photosynthesis .Marcel Dekker (ed). New York Bessel- Hong Kong.
- POSPISILOVÁ ,J,WILHELMOVÁ ,N SYNKOVÁ, H, EATSKY,J KREBS,D TICHA,I , HANAIEKOVÁ ,B,SNOPEK,J 1998 acclimation of tobacco plantlets to ex vitro condiciones as affected by application of abscisic acid Photosynthesis in plants cultivated in vitro p, 525-540, In Pessarac II Handbook of Photosynthesis.Marcel Dekker (ed).New York-Bessel-Hong Kong. *Journal of experimental Botany* 49 863-869.
- POSPISILOVÁ,J,TICHA,I,KADLEEEK,P,HAISEL,D,PLZAKOVA,S 1999 Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum* 42(4):481-497.
- PREECE J.E. & SUTTER E.G. 1991. Acclimatization of micropropagated plant to the greenhouse and field. En: Debergh, P.C. & Zimmerman, R.H *Micropropagation thecnology and application* (Ed) Dordrech Kluwer Academic Press : Pág 71-93.
- QUINTERO et al (2003) Enraizamiento in vitro de *Dioscoreas sp.* In vitro rooting of *Dioscoreas sp.* *REVISTA COLOMBIANA DE BIOTECNOLOGÍA VOL V No.2* pag 51 – 56.
- REED, D.W. Y H.B. TUKEY, JR. 1978. Effect of pH on foliar absorption of phosphorus compounds by *chrysanthemum*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 103: Pág 337-340.
- RAVINDRA, M. and THOMAS, P. 1995. Sachet technique an efficient method for the acclimatization of micropropagated grapes (*Vitis vinifera L.*). *Current Science* 68 (5): Pág 546-548.
- RIQUELME, C.; Y E. GUIÑAZÚ Y R. TIZIO. 1991. Preacondicionamiento y aclimatización, en condiciones de invernáculo, de plántulas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid. *PHYTON* 52(1): 73-82.
- RITCHIE, G., SHORT, K. and DAVEY, M. 1991. In Vitro acclimatization of *chrysanthemum* and sugar beet plantlets by treatment with paclobutrazol and exposure to reduced humidity. *Journal of experimental botany* 42 (245): Pág 1557-1563.
- ROCA W. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicación. CIAT, Colombia.
- ROMANO, A., NORONHA, C., and MARTINS-LOUCAO, M. A. 1992. Influence of growth regulators on shoot proliferation in *Quercus suber*. *Annals of botany.* 70(6): Pág 531-536.
- RUIZ, A. 2003. Micropropagación y Determinación cromosómica del genero *Croton* Productoras de látex. Tesis para optar el Título de Magister Scientiae . Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima Perú. Pág 64.
- SÁNCHEZ-DIAZ y AGUIRREOLEA. 2000. Movimientos estomáticos y transpiración. En: *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid, Mc Graw-Hill Interamericana. Pág 522.
- SANTAMARÍA, J., MURPHY, K., LEIFERT, C. and LUMSDEN, P. 2000. Ventilation of cultured vessels: I. Increased water movement rather than reduced concentrations of ethylene and CO₂ is responsible for improved growth and development of *Delphinium* In Vitro. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 75 (3): Pág 320-327.
- SANTAMARÍA, J.M; DAVIES, W.J., ATKINSON, C.J 1993 Stomata of micropropagated *Delphinium* plants respond to ABA, CO₂ light and water potential, but fail to close fully *Journal of Experimental Botany* 44(258):99-107.
- SCHOTT. Trabajo presentado para optar a la categoría de Titular en el escalafón del Personal Docente y de Investigación. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Pag. 23-28.
- SEON, J.; Y CUI; T. KOZAI Y K. PAK. 2000. Influence of in vitro growth glutinosa plantlets during acclimatization period. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 61: 135-142.
- SEVERINO, SILVA & NAPOLEÃO 2007 a Simple Method For Measurement of *Jatropha curcas* Leaf Area.

- SLAVTCHEVA, T. and DIMITROVA, V. 2000. Gas exchange with In Vitro cultivated grapevine plants during acclimatization period. *Acta Horticulturae* 526: Pág 357- 363.
- SOTOLONGO R. 2000. Micropropagación de *Psidium salutare* (HBK) Berg. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Forestales. Pinar del Río, Cuba.
- SUTTER, E. and LANGHANS, R. 1979. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. *Can. J. Bot.* 60: Pág 2896-2092.
- SWIETLIK, D. Y M. FAUST. 1984. Foliar nutrition of fruit crops. pp. 287-355. In: J Janik (ed.). *Horticultural reviews*. Vol. 6. AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut. USA.
- TEXEIRA J.B, LEMOS J.I. & COELHO M.C. 1995. Micropropagacao de especies lenhosas da mata atlántica. En: Congreso Brasileiro de Fisiología Vegetal. 5. (Ed) Lauras Anais.
- THOMAS, P. 1998. Humid incubation period and plantlet age influence acclimatization and establishment of micropropagated grapes. *In Vitro cell.* 34: Pág 52-56.
- TICHA, J.; RADOCHOVÁ B, KADLECEK P 1999 stomatal morphology during acclimatization of tobacco plantlets to ex vitro conditions. *Biologia Planarum* 42(3); 469-474.
- TORRES, J. 2006. Bionotas El cultivo Comercial de las Orquídeas. Mimeografiado de 28 páginas.
- TRUJILLO, I.; E. DE GARCIA Y J. BERROTERAN. 1999. Evaluación de plantas de banano obtenidas in vitro. *Anales de Botánica Agrícola* 6: 29-35.
- VAN HUYLENBROECK, J.M. and DEBERGH, P.C. 1996. Impact of sugar concentration In Vitro on photosynthesis and carbon metabolism during ex vitro acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. *Physiol. Plant.* 96: Pág 298-304.
- VALERÍN A. (2005) Características de las plántulas producidas in vitro y su aclimatación, COSTARRICA.
- VASQUEZ J. (2004) Aclimatación de plántulas de *Epidendrum schomburgkii* propagadas in vitro, UNSM-T, Perú Pág 57
- VÉGVARI, G. 2001. Morphological changes of In Vitro apple plants during acclimatization. *Acta Horticulturae* 616: Pág 515-519.
- WARDLE, K., DOBBS, E. and SHORT, K. 1983. In Vitro acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108 (3): Pág 386– 389.
- WETZSTEIN, H; E. RICHARDSON; Y. HE. 2002. Alterations in anatomy and ultrastructure of pecan leaves treated with propiconazole during shoot expansion. *J Amer. Soc. Hort. Sci* 127 (1): 8-12.
- Ziv, M. 1995. in vitro Aclimatación. En: Aitken Cristie. J., Kosai, T. y LilaSmith, M (eds). *Automatización and environmental control in plant tissue culture*, Netherlands Klumer Publiher. pp. 493-516.
- ZOBAYED, S., ARMSTRONG, J. and ARMSTRONG, W. 2001. Leaf anatomy of In Vitro tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. *Plant Science* 161 (3): Pág 537-548.