

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or historical figure, seated on a throne. The figure is surrounded by various symbols, including a crown, a cross, and a lion. The text around the border of the seal reads "UNIVERSITAS CAROLINA ACADÉMICA COACTEMALENSIS INTER CÆTERA REBUS CONSPICUA".

EVALUACIÓN DE TRES CONCENTRACIONES DE AUXINAS (ANA) Y CINCO DE
CITOCINAS (BAP) EN LA PROPAGACIÓN *in vitro* DEL PIÑÓN (*Jatropha curcas* L.).
CULTIVAR CABO VERDE

CÉSAR AUGUSTO MAZARIEGOS

GUATEMALA, MAYO DE 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

EVALUACIÓN DE TRES CONCENTRACIONES DE AUXINAS (ANA) Y CINCO DE
CITOCINAS (BAP) EN LA PROPAGACIÓN *in vitro* DEL PIÑON (*Jatropha curcas* L.).

CULTIVAR CABO VERDE

TESIS:

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA
DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

CESAR AUGSTO MAZARIEGOS

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

RECURSOS NATURALES RENOVABLES

EN EL GRADO DE LICENCIADO

GUATEMALA, MAYO DE 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RECTOR MAGNÍFICO

LIC. CARLOS ESTUARDO GÁLVEZ BARRIOS

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Ing. Agr. MSc. Francisco Javier Vásquez Vásquez
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. MSc. Marino Barrientos Garaá
VOCAL TERCERO	Ing. Agr. MSc. Oscar René Leiva Ruano
VOCAL CUARTO	P. Forestal Axel Esaú Cuma
VOCAL QUINTO	P. Contador Carlos Alberto Monterroso Gonzáles
SECRETARIO	Ing. Agr. MSc. Edwin Enrique Cano Morales

GUATEMALA MAYO 2011

Guatemala, mayo 2011

Honorable Junta Directiva

Honorable Tribunal Examinador

Facultad de Agronomía

Universidad de San Carlos de Guatemala

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

EVALUACION DE TRES CONCENTRACIONES DE AUXINAS (ANA) Y CINCO DE
CITOCINAS (BAP) EN LA PROPAGACION *in vitro* DEL PIÑON (*Jatropha curcas* L.).
CULTIVAR CABO VERDE

Presentado como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en Recursos Naturales Renovables, en el grado académico de Licenciado.

Esperando que la presente investigación llene los requisitos para su aprobación, sin otro particular me suscribo de ustedes, como su atento y seguro servidor.

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Cesar Augusto Mazariegos

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS

Con agradecimiento infinito, sin su voluntad y su misericordia no sería posible este triunfo.

MIS PADRES

PATROCINIO MAZARIEGOS LOPEZ (Q.E.P.D)

ESPERANZA HERRERA DE MAZARIEGOS (Q.E.P.D)

Que están vivos en mi mente y mi corazón, sin la presencia de ellos en mi vida este momento no sería posible.

A MIS TIOS

JESUS MAZARIEGOS HERRERA

ELOISA MAZARIEGOS HERRERA.

Por ser unos Padres por su apoyo incondicional, esfuerzos, sacrificios y paciencia que me dieron para salir adelante. Mi más grande admiración y gratitud.

A MIS HERMANO

JUANCARLOS MAZARIEGOS, JOSÉ ALFONSO MAZARIEGOS, ALLAN MAZARIEGOS,

En especial a BENNY MAZARIEGOS

Por demostrarme su apoyo incondicional que siempre a mostrado hacia mi persona.

A MI NANA

AUDELINA Por verme como parte de su familia, brindándome el amor y cariño de una abuela.

A

ANGELA NOEMI MEOÑO

Por el amor y apoyo que me a brindado incondicional mente

A MIS AMIGOS

Por la amistad in condicional, ayudándome a alcanzar este sueño. Sabrina, Mayrita, Mogollon, Sandra, Raúl, Roni, Byron, Ricardo, Juan Carlos, José, Ruddy, Pedro, Obdulio, Manolo, Oscar, y a todos los que de una forma directa o indirecta han incidido para este logro.

TESIS QUE DEDICO A

GUATEMALA; Querida tierra hermosa en la cual naci con sus
maravillas interminables

SAN ANTONIO HUISTA Mi pueblo querido, corazón de los Huistas

UNIVERSIDAD DE SAN Por cobijarme y enseñarme que el san carlista se
CARLOS DE GUATEMALA: debe a su pueblo

FACULTAD DE AGRONOMIA: Gracias por enseñarme el camino y por poner a
seres humanos maravillosos en mi camino

COLEGIO MIXTO SAN FRANCISCO DE ASIS

AGRADECIMIENTOS

- MI FAMILIA:** Por el apoyo incondicional en mi vida estudiantil por brindarme el amor, la paciencia ya que son un ejemplo a seguir.
- MIS ASESORES:** Ing. Agr. Francisco Vásquez Ing. Agr. Julio Berduo por ayudarme en la realización de este documento Ing. Agr. Eduardo Pretzanzin, Ing. Agr. Walter Tello Por el apoyo incondicional, Ing. Agr. Domingo Amador (Q.E.P.D.), quien confió en mí para la realización de esta investigación.
- MI SUPERVISOR** Ing. Agr. Fredy Hernández Ola por la guía brindada en el
- DE EPS:** transcurso de mi EPS.
- MIS PROFESORES:** Ing. Agr. Carlos Godínez, Ing. Agr Francisco Fajardo Lic. Pedro Cabrera, Ing. Agr. kelder Ortiz Ing. Agr. Makmilan Cruz.

LISTADO DE ABREVIATURAS

BAP Bencilaminopurina

GA3 Acido giberèlico

ANA Acido naftalacetico

MS Murashige y Skoog

gr/l Gramos por litro

mm Milímetro

cm Centímetros

mg/l Miligramo por litro

ppm Partes por millón

ÍNDICE	PAGINA
1 INTRODUCCIÓN	1
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
4 MARCO TEÓRICO	5
4.1 MARCO CONCEPTUAL	5
4.1.1 Generalidades del piñón (<i>Jatropha curcas</i> L.)	5
4.1.2 Aspectos botánicos.....	5
4.1.2.1 Clasificación botánica	5
4.1.3 Descripción botánica del piñón (<i>Jatropha curcas</i> L.)	6
4.1.4 Características del piñón (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	7
4.1.4.1 Inflorescencia	8
4.1.4.2 Biología de la floración	8
4.1.4.3 Condiciones climáticas y edáficas del cultivo del piñón (<i>Jatropha curcas</i> L.)	8
4.1.4.4 Plagas y enfermedades	9
4.1.4.5 Diversidad genética.....	10
4.1.5 Micropropagación en piñón (<i>Jatropha curcas</i> . L).....	10
4.1.6 Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	10
4.1.6.1 Explante	11
4.1.6.2 Medio de cultivo	11
A. Fuentes carbono	12
B. Nutrientes minerales.....	13
C. Vitaminas.....	13
D. Agentes gelificantes	13
E. Reguladores de crecimiento	13
F. El pH en el medio de cultivo	18
4.1.6.3 Características del ambiente físico del cuarto de incubación.....	19
A. La temperatura	19
B. Control del fotoperíodo	20
C. La luz.....	21

4.2	MARCO REFERENCIAL	21
4.2.1	Localización.....	21
5	OBJETIVOS.....	22
5.1	Objetivo general.....	22
5.2	Objetivos específicos.....	22
6	HIPOTESIS.....	23
7	METODOLOGÍA.....	24
7.1	Materiales	24
7.2	Equipos.....	24
7.3	Material experimental	24
7.4	Principales procedimientos de la fase de cultivo <i>in vitro</i>	25
7.4.1	Desinfección y siembra de explantes	25
7.4.1.1	Material vegetal	25
7.4.1.2	Desinfección	25
7.4.1.3	Fase de siembra de explante para inducción de brotes	25
A.	Desinfección	25
B.	Siembra de primordios foliares de piñón.....	26
7.5	Fase de inducción de brotes y callos.....	26
7.6	Fase de enraizamiento de brotes	28
7.7	Incubación de cultivos	28
7.8	Unidad experimental.....	28
7.9	Diseño experimental y distribución de las unidades experimentales	29
7.10	Variables de respuesta	29
7.11	Análisis de datos.....	30
8	RESULTADOS	31
8.1	Masa de callos meristemáticos.....	31
8.2	Longitud de brotes en centímetros	34
8.3	Número de hojas por explante.....	36
9	CONCLUSIONES	40
5.	RECOMENDACIONES.....	40
10	Bibliografías	41
11	Anexos	43

11.1	Preparación de las soluciones patrón	43
11.1.1	Solución madre de micronutrientes	44
11.1.2	Solución madre de hierro a 200X	45
11.1.3	Solución madre de vitaminas a 1000X	45
11.1.4	Solución madre de myoinositol a 1000X	45
11.1.5	Preparación de los medios de cultivo	45

ÍNDICE DE CUADROS	PAGINA
Cuadro 1 Clasificación Taxonómica.....	5
Cuadro 2 Patógenos potenciales En El Cultivo. De <i>J. curcas</i> Heller (1996).....	9
Cuadro 3 concentraciones de auxinas y citocininas	27
Cuadro 4 Tratamientos de concentraciones ANA (AUXINA), BAP (citocinina)	27
Cuadro 5 Tratamientos de concentraciones de ácido indolbutírico IBA: 0.0, 0.3, 0.5 en mg por litro	28
Cuadro 6 Resumen De Peso En Gramos De Callos Meristemáticos.....	31
Cuadro 7 Prueba de las diferencias de Tukey en los diferentes tratamientos evaluados con base En el peso de las callosidades en g.	31
Cuadro 8 Prueba 1 diferencias de Tukey del peso de los callos meristemáticos.....	32
Cuadro 9 Resumen De Longitud De Brotes En Centímetros	34
Cuadro 10 Prueba de diferencias de Tukey en los diferentes tratamientos evaluados con base en la longitud de brotes en centímetros.....	34
Cuadro 11 Prueba 2 diferencias de Tukey en base al crecimiento.	35
Cuadro 12 Resumen de <i>Número</i> de Hojas por Explante	37
Cuadro 13 Prueba de diferencias de Tukey de los diferentes Tratamientos en base número de hojas por explante.....	37
Cuadro 14 Prueba de diferencias de Tukey en Base Al Número de hojas	38
Cuadro 15A Componentes De Micronutrientes Del Medio Nutritivo Murashige Y Skoog A Concentración 10 X.	43
Cuadro 16A Componentes De Micronutrientes Del Medio Nutritivo Murashige Y Skoog.....	44
Cuadro 17A Componentes Del Medio Basal MS	47

ÍNDICE DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1 Unidad Experimental	29
Figura 2 Peso de callos meristemáticos en gramos	33
Figura 3 Longitud de Brotes en cm.	36
Figura 4 Número De Hojas Por Explante	39
Figura 5A Tratamientos del experimento realizado.	48
Figura 6A Masas callosas de los tratamientos.	48
Figura 7A Masa callosa del mejor tratamiento (T11).....	49
Figura 8A Brote con hojas del mejor tratamiento (T6).....	49

EVALUACION DE TRES CONCENTRACIONES DE AUXINAS (ANA) Y CINCO DE
CITOCINAS (BAP) EN LA PROPAGACION *in vitro* DEL PIÑÓN (*Jatropha curcas* L.).
CULTIVAR CABO VERDE

THREE AUXINAS AND FIVE CYTOKINES CONCENTRATIONS TEST IN THE *in vitro*
SPREAD OF PIÑÓN (*Jatrophacurcas* L.).FROM GREEN CAPE

Resumen

El piñón (*Jatropha curcas* L) es un cultivo multipropósito en la actualidad se utiliza como cercas vivas, en plantaciones para la obtención de su aceites que sirven como base para la elaboración de Biodiesel obteniendo un gran valor económico en nuestro país, y en el resto del mundo hoy se cataloga como un importante producto no tradicional.

La presente investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, la investigación consistió en la propagación *in vitro* de piñón (*Jatropha curcas* L). Cultivar cabo verde, encontrando que la mejor concentración de ANA (AUXINA) para la inducción de brotes que fue de 0.3 (mg. por Litro) obteniendo una elongación del brote de 2.77cm, de altura, Se determinó que BAP no tiene efecto significativo sobre la longitud de la planta mientras que las concentraciones que no formaron brotes formaron masas callosas los cuales están conformados por una combinación de ANA (AUXINA) BAP (CITOCINA) (mg por Litro) 0.5-0.0, 0.5-5.0 obteniendo pesos 11.07 y 10.10 gs, respectivamente.

Para la longitud de brotes (en centímetros) la combinación de reguladores del crecimiento más eficiente es el tratamiento T6 con la combinación de 0.3 mg/l de ANA y 0.00 mg/l de BAP, el cual mostró la mayor longitud del brote con 2.77 cm.

Para la formación de callos meristemáticos la combinación de reguladores del crecimiento la cual obtuvo buenos resultados es la que proporciona el tratamiento T11 con una combinación de ANA (AUXINA) y BAP (CITOCINA) de 0.5-0.0 mg/l, además pudiéndose utilizar los tratamientos T13, T9, T14, que lograron la mayor masa de callosidad registrada después del tratamiento T11.

Para obtener resultados satisfactorios en la fase de enraizamiento de brotes se sugiere evaluar dosis más altas de ácido indolbutírico, así como de otras auxinas. También se

sugiere, evaluar otras alternativas para la inducción de raíces, como concentraciones de medio de cultivo, ya que ningún tratamiento logró tener un efecto positivo en la formación de las mismas.

1 INTRODUCCIÓN

El piñón (*Jatropha curcas L*) es un cultivo multipropósito debido a que puede sembrarse en áreas con limitantes físicas, también puede asociarse en cultivos como el maíz (*Zea maíz*) y convertirse en un ingreso adicional para las familias rurales, como cerca viva ayuda a evitar la erosión, seutiliza también como insecticida orgánico. Además, debido a sus características, representa una alternativa para el problema energético.

Es por ello que es importante contar con una metodología óptima para la producción a gran escala de esta planta.

El presente estudio evaluó el efecto de tres concentraciones de auxinas (ANA) y cinco dosis de citocinina (BAP) en meristemos apicales de piñón (*Jatropha curcas L*). Cultivar cabo verde, obteniéndose resultados preliminares satisfactorios. Con la información generada en esta evaluación se está dando inicio a un proceso de desarrollo de una tecnología para la propagación del piñón cultivar cabo verde para que en un futuro no muy lejano se pueda contar con una metodología óptima para su producción a gran escala. En la formación de callos meristemáticos se logró obtener la mejor respuesta con la siguiente combinación de reguladores de crecimiento 0.5 mg/l de ANA y 0.0 mg/l de BAP, en cuanto a la variable longitud de brotes la combinación de reguladores que presentó la mejor respuesta fue de 0.3 mg/l de ANA y 0.0 mg/l de BAP, en la propagación *in vitro* de piñón (*Jatropha curcas L*). Cultivar cabo verde.

En tal sentido dentro del proceso de la domesticación del piñón (*Jatropha curcas L.*), en el aspecto primario que se refiere a la propagación, no se cuenta con información científica acerca del piñón cabo verde (*Jatropha curcas L.*) en la propagación por medio de métodos especializados como los biotecnológicos, por lo que estos métodos pueden ser de gran utilidad para lograr mantener la identidad genética de las plantas piñón cabo verde (*Jatropha curcas L.*) que se desea propagar, conociendo desde el momento de su obtención su procedencia, hasta la garantía de su inocuidad.

Además, se garantiza una producción masiva de plántulas en un tiempo menor para su establecimiento en el campo definitivo, garantizando así un alto porcentaje de producción.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Guatemala se conocen solo las formas tradicionales de propagación del piñón, vía semilla y en forma vegetativa como son los esquejes, estos métodos son adecuados para la propagación, sin embargo para la producción de plantas con una alta identidad genética y en forma masiva estos métodos no son los adecuados aunque la tasa de germinación sea alta las plantas en un porcentaje significativo pueden salir con características no deseadas para los productores las cuales podrían ser un bajo nivel de producción, poca adaptabilidad al clima etc. Por esta razón es necesario conocer otras técnicas de propagación con la que se pueda propagar masivamente con las características genéticas deseadas como lo es el cultivo in vitro siendo esta también una técnica asexual se puede llegar a producir plantas con características deseadas en mayores proporciones.

En tal sentido dentro del proceso de la domesticación de el piñón (*Jatropha curcas L.*), no se cuenta con información científica acerca de el piñón cabo verde (*Jatropha curcas L.*), propagación por medio de métodos especializados como los biotecnológicos, estos métodos pueden ser de gran utilidad para lograr mantener la identidad genética de las plantas piñón cabo verde (*Jatropha curcas L.*) que uno desea propagar pudiendo conocer desde el momento de su obtención su procedencia, garantizando un material sano para el establecimiento de futuras plantaciones.

Con estas técnicas de propagación se pretende garantizar una producción masiva de plántulas en menor tiempo para su establecimiento en el campo definitivo garantizando un alto porcentaje de producción, manteniendo la identidad genética de los materiales seleccionados obteniendo una ventaja en cuanto a las características que se desean de la planta.

3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Es de suma importancia desarrollar una investigación con el objetivo de explorar métodos eficientes en la propagación vegetativa de cultivares seleccionados, manteniendo su identidad genética y obteniendo plántulas con una alta calidad genética ya que se conoce la procedencia y calidad fitosanitaria como la adaptabilidad al lugar, una de las técnicas que mayor resultado a tenido a nivel mundial (cuba, India, España etc.), es la de cultivo in Vitro, siendo esta una herramienta adecuada para dicho fin ya que se han obtenido muy buenos resultados en otros países.

El presente estudio consistirá en la evaluación de dos medios de cultivo y cinco niveles de concentraciones en la propagación in vitro piñón (*Jatropha curcas L.*) cultivar cabo verde la cual constituirá una herramienta adecuada en la multiplicación de cultivares seleccionados de piñón (*Jatropha curcas L.*) cultivar cabo verde, contribuyendo de esta manera a la alta propagación del cultivo y el desarrollo rural del país.

Ya que la multiplicación eficiente de piñón (*Jatropha curcas L.*) cultivar cabo verde, propiciara la generación de la tecnología adecuada para el cultivo de piñón (*Jatropha curcas L.*) cultivar cabo verde, en grandes proporciones con una alta producción de plántulas.

La información a obtener en el presente estudio servirá para contribuir a la propagación técnica y científica de piñón (*Jatropha Curcas L.*) cultivar cabo verde. Y el implemento a gran escala de plantaciones de piñón (*Jatropha Curcas L.*), con cultivares seleccionados.

4 MARCO TEÓRICO

4.1 MARCO CONCEPTUAL

4.1.1 Generalidades del piñón (*Jatropha curcas* L.)

Jatropha: del griego iatrós = médico, y trophé = alimento Jatrophacurcas.com. (2006).

Este arbusto, es originario de América Central pero que en la actualidad está extendido a varios continentes BioDiesenúmeropain.com. (2007). como lo viene siendo el cultivar cabo verde originario de una isla con ese mismo nombre ubicada en el océano atlántico. Crece en la mayoría de los países tropicales, se le cultiva en América Central, Sudamérica, Sureste de Asia, India y África Torres, C. (2007).

4.1.2 Aspectos botánicos

4.1.2.1 Clasificación botánica

Cuadro 1 Clasificación Taxonómica

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
SubClase:	Rosidae
Orden:	Euphorbiales
Familia:	Euphorbiaceae
Género:	<i>Jatropha</i>
Especie:	<i>Jatropha curcas</i> L.

Fuente: Willians, T; Standley, P; Carpenter, J. (1984).

4.1.3 Descripción botánica del piñón (*Jatropha curcas* L.)

Matorrales Húmedos o secos en las planicies y laderas, más abundante en asociación de arbustos o árboles generalmente establecidos y mantenidos para formar una cerca o barrera, va de los 0 a los 1.500 metros. más común en las elevaciones bajas, de Petén; Alta Verapaz, El Progreso; Izabal, Zacapa, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla; Sacatepéquez, Suchitepéquez, Retalhuleu, San Marcos, Huehuetenango; probablemente en la mayoría de los demás departamentos. México, Reino Unido Honduras a El Salvador y Panamá, Indias Occidentales, América del Sur; a veces naturalizada en los trópicos del Viejo Mundo Willians, T; Standley, P; Carpenter, J. (1984).

Es un arbusto o árbol pequeño, a veces 8 metros por lo generalmenor, la corteza es pálida y suave, las hojas pecioladas largas, pecíolos largos, hojas redondeadas, ovadas a grandes rasgos, la mayoría de 7-16 cm. de largo y sobre el mismo ancho, abiertamente cordadas en la base o, a veces truncada, superficialmente lobuladas o angulosas, no dentadas, palmeadas de nervios desde la base, casi glabras pero más o menos pilosas por debajo de los nervios, por lo menos cerca de la base de la hoja; pequeñas cimas, denso, pedúnculo largo, muchas flores, las brácteas lanceoladas o lineales; sépalos ovado-elípticos, de 4 mm. pétalos largos, glabros; blanquecino, oblongo-obovadas, casi libre, densamente pilosas en el interior, la flor estaminada ,la flor pistilada casi igualando los sépalos; estambres 8, los filamentos libres exteriores, las interiores connados, ovario glabro; cápsula de 2.5-4 cm. de largo, 2-3-unicelulares, elipsoidales, semillas de unos 2 cm. longitud y 1 cm. amplio, pálido, oblongoelipsoide, con líneas visibles negras. Willians, T; Standley, P; Carpenter, J. (1984).

Nombres mayas de Yucatán "xcacalche" y "sicilte".

Esta es una de las plantas más conocidas y más comunes de las tierras bajas de América Central, donde se siembra en abundancia para los setos y postes vivos para cerco, principalmente porque ningún animal la consume. El arbusto puede no ser nativo de Guatemala, ya que se encuentra principalmente en las coberturas, pero si no, sin duda lo ha sido en cultivo durante mucho tiempo. En México se ha utilizado de largo como la planta huésped para determinados insectos escala lac-productores conocidos por el nombre AXI o Axin, y es muy probable que el mismo uso pueda tener el arbusto en

Guatemala. La laca que se produce es muy estimada como barniz para el acabado de las guitarras y otros artículos de la madera Willians, T; Standley, P; Carpenter, J. (1984).

En Guatemala una infusión de las hojas se utiliza comúnmente por algunos de los indios en la fijación de los tintes de algodón y tal vez otros textiles Willians, T; Standley, P; Carpenter, J. (1984).

La savia lechosa se aplica comúnmente a las heridas o llagas, para acelerar la curación, y se coloca en las cavidades de los dientes para aliviar dolor de muelas. En Cobán las hojas se calientan y se aplican a los pechos de las mujeres en la creencia de que esto aumenta el flujo de leche Willians, T; Standley, P; Carpenter, J. (1984).

Cuando las semillas se presiona con ello se obtienen una gran cantidad de aceite se utiliza localmente para la fabricación de jabón y para la iluminación. Este aceite, o la semilla entera, tiene propiedades purgantes drásticas, y si las semillas se comen los resultados a veces son peligrosas o incluso mortales, al menos en el caso de los niños Willians, T; Standley, P; Carpenter, J. (1984).

El arbusto pierde las hojas durante los meses de sequía. Willians, T; Standley, P; Carpenter, J. (1984).

4.1.4 Características del piñón (*Jatropha curcas* L.)

La vida productiva del piñón 30 a 40 años, tallo erguido y ramas gruesas, madera del árbol, ligera (poca densidad), fruto oval 40 mm. Longitud aprox. Son cápsulas drupáceas y ovoides, al inicio son carnosas pero dehiscentes cuando son secas, cápsulas inicialmente verde pero volviéndose a café oscuro o negro en el futuro las semillas están maduras cuando el fruto cambia de color del verde al amarillo cada fruto contiene 2 a 3 semillas, color negro su longitud es de 11 a 30 mm. Semillas anchura 7 a 11 mm. 1000 semillas frescas = 0.750 a 1.0 Kg. aprox. 2000 semillas secas = 0.750 a 1.0 Kg. aprox. Aceite en semillas 30 a 40%, posee cinco raíces en semillas germinadas, Una raíz central y 4 laterales en semilla germinada, en sequía e invierno su desarrollo queda latente, no soporta frío ni heladas prolongadas, 80% del aceite es insaturado, aceites principales: oleico (El ácido oleico es un ácido graso monoinsaturado de la serie omega 9 típico de los aceites vegetales como el aceite de oliva, del aguacate, etc.) Y linoleico (El ácido

linoleico(del griego λινων (linon) lino, cuya semilla es la linaza y ελαια (elaia) aceite de oliva o simplemente aceite). Vega Lozano, JA De la. (2009).

4.1.4.1 Inflorescencia

Las inflorescencias se forman axialmente de las hojas en las ramas. Ambas flores, masculinas y femeninas, son pequeñas (6-8 mm), verdoso-amarillo en el diámetro y pubescente. Cada inflorescencia rinde un manojo de aproximadamente 10 frutos ovoides o más Toral, OC; Iglesias, JM; Montes de Oca, S; Sotolongo, JA; García, S; Torsti, M. (2008).

4.1.4.2 Biología de la floración

La floración en la planta *Jatropha* puede presentarse entre el 1° y 2° años en condiciones muy favorables, pero normalmente toma más tiempo (3 años). La producción de semilla se estabiliza a partir del 4° ó 5° años. Al parecer la formación de flores está relacionada con el periodo de lluvias. Puede florear nuevamente después de producir frutos cuando las condiciones permanecen favorables por otros 90 días, pero después de esta 2ª floración, la planta no florea nuevamente, sino que se desarrolla vegetativamente Toral, OC; Iglesias, JM; Montes de Oca, S; Sotolongo, JA; García, S; Torsti, M. (2008).

4.1.4.3 Condiciones climáticas y edáficas del cultivo del piñón (*Jatropha curcas* L.)

El cultivo del piñónno requiere un tipo de suelo especial. Se desarrolla normalmente en suelos áridos y semiáridos-Responde bien a suelos con pH no neutros. Piñón (*Jatropha curcas* L.) crece casi en cualquier parte, incluso en las tierras cascajosas, arenosas y salinas, puede crecer en la tierra pedregosa más pobre, inclusive puede crecer en las hendeduras de piedras. Climáticamente, el piñón (*Jatropha curcas* L.) se encuentra en los trópicos y subtrópicos, resiste normalmente el calor aunque también soporta bajas temperaturas y puede resistir hasta una escarcha ligera la mejor condición es con altitud de 600 a 800 mts. Su requerimiento de agua es sumamente bajo y puede soportar períodos largos de sequía.

Habita en campos abiertos, como en parcelas nuevas es susceptible a inundaciones Torres, C. (2007).

4.1.4.4 Plagas y enfermedades

Las plagas y enfermedades en la planta *Jatropha* en estado silvestre, no son problema.

Sin embargo, en condiciones extensivas de monocultivo, las plagas y enfermedades pueden ser problema en el cultivo. Heller (1996) en su trabajo sobre *J. curcas* «promoviendo el uso y conservación de cultivos rechazados y subutilizados», publica una lista con los nombres científicos y síntomas de varias plagas y enfermedades que afectan el cultivo del piñón. Toral, OC; Iglesias, JM; Montes de Oca, S; Sotolongo, JA; García, S; Torsti, M. (2008).

Cuadro 2 Patógenos potenciales En El Cultivo. De *J. curcas* Heller (1996).

Nombre	Síntomas/Daños	Fuente
<i>(Phytophthora spp.)</i>	Pudrición de raíz	Séller 1992
<i>(Pythium spp.)</i>	Pudrición de raíz	Séller 1992
<i>(Fusarium spp.)</i>	Pudrición de raíz	Séller 1992
<i>(Helminthosporium tetrámera)</i>	Manchas en hojas	Singh 1983
<i>(Pestalotiopsis paragarinsis)</i>	Manchas en hojas	Singh 1983
<i>(Pestalotiopsis versicolor)</i>	Manchas en hojas	Phillips 1975
<i>(Cercospora sp.)</i>	Manchas en hojas	Kar& Das 1987
<i>(Julus sp.)</i>	Pérdida de plántulas	Séller 1992
<i>(Oedaleus senegalensis)</i>	Hojas en plántulas	Séller 1992
<i>(Lepidoptera larvae)</i>	Galerías en hojas	Séller 1992
<i>(Pinnaspis strachani)</i>	Manchas negras en ramas	Van Harten
<i>(Ferrisia virgata)</i>	Manchas negras en ramas	Van Harten

<i>(Calidea dregei)</i>	Succionan frutos	Van Harten
<i>(Nezaraviridula)</i>	Succionan frutos	Van Harten
<i>(Spodoptera litura)</i>	Larva se alimenta de hojas	Meshram&Joshi

Fuente: Jorge De la Vega *Agro-Energía*

4.1.4.5 Diversidad genética

Biocombustibles de Guatemala S.A. Está por finalizar el estudio de la genética de la planta piñón (*Jatropha curcas*. L). Se tiene un Banco de Germoplasma en el cual utiliza un descriptor para conocer la diversidad morfológica del germoplasma. En coordinación con Investigadores, se desarrollará el análisis molecular. Desarrollo de la investigación sobre nutrición de la planta, la fitopatología y el proceso de maduración. Uno de los objetivos es la producción de sub-productos para lo cual esta adecuando tecnologías en la creación de los procesos de producción. *Jatrophacurcas.com*. 2006.

4.1.5 Micropropagación en piñón (*Jatropha curcas*. L)

Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba. En investigaciones realizadas con plantas de la variedad africana de piñón lograron obtener resultados positivos, obteniendo un alto porcentaje de germinación como una buena formación de masas callosas sin embargo no obtuvieron brotes en dichos tratamientos. López Hernández, D; PeñateAlvariño, L; DaquintaGradaille, M; Pina Morgado, P; Escalona Morgado, M. (2008).

4.1.6 Cultivo de tejidos *in vitro*

Cuando se habla del cultivo de plantas, generalmente nos referimos a cultivarlas en macetas, arriates o cultivarlas en el campo. En 1904 Hanning desarrolló un nuevo método de cultivo de plantas al que se llamó cultivo de embriones. Aisló *in vitro* embriones inmaduros de algunos miembros de la familia Crucíferas, obteniendo plántulas viables.

El cultivo *in vitro* se define como el cultivo en un medio nutritivo, en condiciones controladas, de plantas, semillas, órganos, explantos, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores. Estas técnicas se caracterizan:

- Ocurren a micro-escala ya que se lleva a cabo en un espacio reducido.
- Se optimizan las condiciones ambientales, en lo que se refiere a factores físicos (T°, luz, humedad Relativa), nutricionales y hormonales.
- Se excluyen todos los microorganismos (hongos, bacterias y virus), así como también las plagas de las plantas superiores (insectos y nematodos). Generalmente no se reproduce el patrón normal de desarrollo de una planta, resultando que un tejido aislado puede dar origen a un callo o puede desarrollarse de otras formas poco usuales (por ejemplo, formación de órganos, embriogénesis somática). La capacidad de cultivar protoplastos o células individuales permite manipulaciones que antes era imposibles. El nombre de cultivo *in vitro* (que generalmente quiere decir en vidrio), se utilizó porque, al menos inicialmente, se usaron recipientes de vidrio para el cultivo Jardín Botánico de Córdoba.com. (2009).

4.1.6.1 Explante

El término explante se describe un fragmento cortado de un tejido o de un órgano utilizado para iniciar un cultivo. Como explante puede ser utilizado casi cualquier órgano o tejido, pero para la micropropagación es más conveniente partir de una yema o ápice meristemático que garantice la estabilidad genética de sus células Taracena Zamora, E. (2004).

4.1.6.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes. Usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos, y vitaminas y aminoácidos. Denominado Medio Basal y puede ser suplantado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias varias. Taracena Zamora, E. (2004).

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta: sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir ni *in vitro* ni *in vivo*. También se debe añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) no son completamente autotróficas cuando se desarrollan en estas condiciones Taracena Zamora, E. (2004).

Los requerimientos nutritivos para un crecimiento *in vitro* óptimo varían con la especie, e incluso son específicos de acuerdo a la parte de la planta que se esté cultivando y a la respuesta que se desea obtener Taracena Zamora, E. (2004).

El medio MS, o de Murashige y Skoog (1962), es un medio de crecimiento que se utiliza en el cultivo de tejidos vegetales. MS fue inventado por los científicos Toshio Murashige y SkoogFolke K. durante la búsqueda de Murashige para un regulador de crecimiento. Es el medio más utilizado en los experimentos de cultivo de tejidos vegetales en laboratorio. Taracena Zamora, E. (2004).

La composición del medio cultivo es un factor determinante el cultivo de tejidos *in vitro*. Los compuestos esenciales son clasificados en:

- A. Fuentes de Carbono
- B. Nutrientes minerales
- C. Vitaminas
- D. Agentes gelificantes (en el caso de medios semisólidos)
- E. Sustancias reguladoras del crecimiento

A. Fuentes carbono

Muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos. La sacarosa (2%-5%) es el azúcar más utilizado como fuente de carbono.

Los niveles altos de sacarosa parecen tener un efecto comparable al producido por el ácido abscísico. Las concentraciones altas de esta sustancia estimulan la formación de los callos embriogénicos (Lu et al., 1982) y reduce la frecuencia de anomalías de desarrollo tales como la formación de los callos embriogénicos y reduce la frecuencia de anomalías de desarrollo tales como la formación de embriones secundarios, la fasciación y la formación de pilocotiledones; también inhiben la germinación precoz. Villalobos, VM. (1990).

B. Nutrientes minerales

Cualitativamente los medios de cultivo aportan los mismos elementos (macro y micronutrientes) que se consideran esenciales para el crecimiento de las plantas. En los medios de desarrollo (MS, B5, N6) se destacan las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio.

Los medios de cultivo contienen fosforó, calcio, magnesio y azufre. La adición de hierro conjuntamente con un agente quelante (Na_2EDTA) lo hace disponible en un amplio rango de pH. Villalobos, VM. (1990).

C. Vitaminas

Son requeridas en pequeñas cantidades actuando catabólicamente en el metabolismo, la que posee mayor importancia es la tiamina en concentraciones de 0.1 a 0.3 mg/L. Las vitaminas tienen un papel importante dentro del sistema enzimático actuando como coenzimas en los diferentes procesos fisiológicos de la planta. Solamente la tiamina es considerada como esencial, mientras que otras como el ácido nicotínico y la piridoxina, son agregadas para estimular procesos específicos; sin embargo se incluyen a manera de prevención. Villalobos, VM. (1990).

D. Agentes gelificantes

En los medios semisólidos comúnmente se adicionan agar (0.6%-1.0%)- se debe considerar la pureza del agar, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variada; la marca comercial y las concentraciones del agar utilizado pueden alterar las respuestas in vitro de los cultivos. Villalobos, VM. (1990).

E. Reguladores de crecimiento

En algunos casos se obtiene en los cultivos in vitro las respuestas deseadas mediante el empleo de medios basales sin reguladores de crecimiento. Sin embargo. En la mayoría de los casos se hace necesario agregar al medio sustancias reguladoras del crecimiento, generalmente del tipo auxina o citocininas. Lo más importante es la proporción y cantidad de las mismas. Villalobos, VM. (1990).

a Auxinas

Las auxinas contribuyen a la elongación celular. Tienen como función biológica la expansión de las células del tallo y coleóptilos, a través de promover el ensanchamiento de las paredes celulares en la división celular; así mismo, fomentan el desarrollo de callos, e inducen la formación de raíces a partir de este. Se utilizan también para el enraizamiento de varias especies vegetales Cochram, WG; Cox, GM. (1987).

La auxina se sintetiza principalmente en los ápices de tallos y raíces, de donde migra a la zona de elongación y otras zonas donde ejercerá su acción Amador, D. (1999).

Las auxinas son ampliamente utilizadas en trabajos de micropropagación y son incorporadas al medio nutritivo para promover el crecimiento de callo, suspensiones celulares u órganos y para regular la morfogénesis, conjuntamente con las citocininas. La respuesta del explante a la adición de auxinas a utilizar y la concentración requerida dependerá de:

- El tipo de crecimiento o desarrollo requerido.
- La capacidad de los tejidos cultivados para sintetizar auxina en forma natural.
- La interacción (si hay) entre las auxinas sintéticas aplicada y las hormonas endógenas naturales Amador, D. (1999).

i. Modo de acción de las auxinas y respuesta fisiológica en la planta

Las auxinas actúan promoviendo el crecimiento y en morfogénesis:

i.1 Promoviendo el crecimiento

Induciendo la secreción de iones H^+ a través de la pared celular. El enlace de la auxina conduce al rompimiento y acidificación de la pared, incrementando su tamaño. Por un efecto sobre el metabolismo del ARN (y por tanto la síntesis de proteína), posiblemente por inducción de la transcripción de moléculas de ARN mensajero específico (ARNm). Los ARNm codifican proteínas que son requeridas para mantener (sostener) el crecimiento Amador, D. (1999).

ii.1 Morfogénesis

Las auxinas aplicadas son capaces de borrar la fisiología programada genéticamente de tejidos de plantas completas, que fuera previamente determinada en su estado diferenciado Amador, D. (1999).

Las respuestas fisiológicas que las auxinas provocan en las plantas se pueden resumir en forma general como sigue:

- Afectan una expansión celular como ya fue explicado, a través del aumento de la plasticidad de la pared celular. Este efecto de estimular la expansión celular se traduce en un estímulo al crecimiento, en escala macroscópica.
- La síntesis de ARN es el estímulo de la división celular que ocurre en algunas situaciones después de la aplicación de auxina exógena, contribuye al estímulo del crecimiento.
- La formación de raíces en esquejes de distintos tipos.
- Dominancia apical; una auxina producida en el meristemo apical impone un estado de dominancia en las yemas axilares localizadas abajo del meristemo apical, inhibiendo su crecimiento. Si el meristemo apical es removido, las yemas axilares son liberadas de la dominancia y comienzan a crecer.
- Otros efectos más específicos son la inducción floración Amador, D. (1999).

ii. Auxinas comúnmente utilizadas

Las auxinas más comúnmente utilizadas son el 2,4-D; Ácido 3-indolbutírico (IBA); Ácido α -naftalenacético (ANA). Junto con las citocininas, el 2,4-D es utilizado para la inducción de callo y cultivos en suspensión, siendo reemplazado por ANA e IBA cuando es requerida la morfogénesis. ANA e IBA son auxinas favoritas para el cultivo de tejidos vegetales. Otras auxinas utilizadas con menos frecuencia son:

- 4- CPA: ácido 4-clorofenoxiacético
- MCPA: ácido 2- metil –4-clorofenoxiacético

- 2,4,5,-T: ácido 2,2,5-triclorofenoxiacético
- Dicamba: ácido 3,6-dicloroanísico
- Picloram: ácido 4 –amino,3,5,6-tricloropicolínico Amador, D. (1999).

iii. Efectos de las auxinas en el cultivo de tejidos vegetales

- Inducción de la formación de callo
- Inhibición de formación de clorofila
- Morfogénesis: formación de raíz y brote
- Embriogénesis somática: altos niveles de auxina 2,4-D
- Cultivo de órganos; una auxina es casi invariablemente requerida para promover el crecimiento inicial de explantes de meristemo y puntas de brotes Amador, D. (1999).

iv. Estabilidad de las auxinas en los medios de cultivo

IAA e IBA son termolábiles y son descompuestos durante la esterilización en autoclave, pero el IAA no es estable en el medio de cultivo aun si es esterilizado por ultrafiltración Amador, D. (1999).

v. Ruta de biosíntesis del ácido indolacético

El IAA es formado del aminoácido L-triptofano y los niveles endógenos de las auxinas se incrementan rápidamente en tejidos incubados en un medio de cultivo conteniendo este aminoácido. L-tripófano puede también actuar como una auxina en algunas plantas, en estos casos puede estimular el crecimiento o inducir morfogénesis (crecimiento de callo de híbridos de *Nicotiana glauca* X *N. Langsdorfii* y la formación de callos embriogénicos en algunos cultivares de arroz) Amador, D. (1999).

b Citocininas

Promueven la división celular y organización de callos. Las más utilizadas son: benciladenina (BA), cinetina y zeatina, en concentración de 0.03 – 30 mg/l. La BA es la citocinina de empleo más generalizada. La cinetina estimula la formación de brotes y de yemas adventicias Villalobos A, VM. (1990).

La función biológica de las citocininas es estimular principalmente la división celular o citocinesis Villancinda Maldonado, RW. (1990), menciona que en cultivos *in vitro*, las citocininas han permitido grandes progresos, especialmente, en micropropagación, por su función de proliferación celular mediante la división celular y la diferenciación de los explantes. Las citocininas más utilizadas son la bencilaminopurina (BAP), siendo ésta más utilizada que la cinetina (KIN) y la 6-4-hidroxi-e-meilbut-tran-2-erilamino-purina (ZEA).

i. Biosíntesis, lugar de síntesis y transporte de las citocininas

Las citocininas parecen ser sintetizadas por la incorporación de una cadena lateral, generalmente con cinco carbonos en la posición N₆ de la base nitrogenada adenina. Esta base nitrogenada tiene la estructura idéntica a la adenina que ocurre en los ácidos nucleicos. Los diferentes tipos de citocininas difieren entre sí por la modificación de las cadenas laterales Amador, D. (1999).

Las citocininas naturales son encontradas en todas las plantas superiores, en las algas y en los hongos y en ciertas bacterias como moléculas libres Amador, D. (1999).

El meristemo apical de la raíz es el principal lugar de síntesis de citocininas en plantas. Las citocininas son transportadas por el xilema y el floema Amador, D. (1999).

ii. Mecanismos de acción de las citocininas

Las hormonas, de una manera general probablemente se integran con receptores que se encuentran en la superficie de la membrana celular o en el citoplasma. Recientemente fue identificada una proteína que actúa como receptor para una citocinina a la cual fue denominada Cytokininbinding Factor (CBF1). Se sugiere que este receptor sea una proteína del ribosoma y que este complejo citocinina receptor regula la síntesis de proteínas.

Existen indicativos de que las citocininas aumentan la concentración de calcio en el citoplasma, promoviendo su absorción del medio externo. El calcio a través de la unión con la proteína calmodulina. La calmodulina es inactiva como regulador, pero el complejo Calmodulina –Calcio puede activar un gran número de enzimas. Las citocininas parecen estimular la síntesis de proteínas específicas del cloroplasto, estabilizando ciertos mRNAs específicos que tienen su degradación difícil Amador, D. (1999).

iii. Efecto de las citocininas en cultivo de tejidos vegetales

- Estimulación de la división celular
- Formación de brotes adventicios
- Promueven la formación de callos embriogénicos
- Uso en cultivo de Brotes
- Proliferación de brotes adventicios
- Formación de yemas adventicias de brote
- Inhibición de formación de raíz Amador, D. (1999).

F. El pH en el medio de cultivo

Cuando se prepara un medio de cultivo, después de añadir todos sus componentes, se procede a ajustar el pH final al valor deseado, añadiendo NaOH 0.1 N o HCl 0.1N al medio. Una vez ajustado el pH se procede a esterilizar el medio. El pH final del medio de cultivo es un factor importante por diversas razones Taracena Zamora, E. (2004).

- Valores bajos, inferiores a 3.5 impiden la solidificación de los agentes gelificantes añadidos a los medios sólidos
- Si la evolución del pH del medio lo hace bajar por debajo de 3.5 se puede producir su licuación.
- El valor del pH puede afectar a la solubilidad de algunos componentes del medio de cultivo

- El valor del pH puede afectar a la absorción de determinados nutrientes por parte del explante (p.e. la absorción de iones NO₃-aumenta con la acidez del medio)
- El valor del pH del medio puede afectar al pH del citoplasma y como consecuencia a la actividad de muchas enzimas

Por todas estas razones conviene optimizar el pH del medio para cada caso en concreto. En general, no obstante, en la mayoría de situaciones se trabaja a pH entre 5.2 y 5.8. BioDiesenúmeropain.com. (2007).

Una vez ajustado el pH del medio, este sufrirá una ligera acidificación durante el proceso de esterilización en autoclave, para, después, evolucionar nuevamente durante el curso del cultivo, el pH se estabiliza de nuevo en aproximadamente en cuatro días por lo que es pertinente esperar este tiempo para poder sembrar Taracena Zamora, E. (2004).

4.1.6.3 Características del ambiente físico del cuarto de incubación

A. La temperatura

La temperatura a la que está expuesto el explante cultivado in vitro afecta a la mayoría de procesos fisiológicos y por consiguiente es un factor fundamental a controlar. En general, cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo Taracena Zamora, E. (2004).

Este intervalo puede variar en función del genotipo, del órgano del que se ha obtenido el explante, de la época del año, de la edad de la planta madre, del fotoperiodo, etc. Una complicación adicional se produce por el hecho de que puede existir interacción entre la temperatura óptima de crecimiento y otros factores como la luz, la composición del medio (p.e: en algunos casos se ha comprobado que se obtiene mayor rendimiento haciendo fluctuar la temperatura según el fotoperiodo) Taracena Zamora, E. (2004).

Determinar la temperatura óptima de crecimiento para cada cultivo in vitro puede ser un proceso muy laborioso que, además, exige gran cantidad de cámaras de cultivo reguladas de forma diferente. Afortunadamente, y para la mayoría de situaciones, se pueden obtener resultados satisfactorios con temperaturas de incubación que oscilan entre los 20 y 28 °C. Taracena Zamora, E. (2004).

El control de la temperatura no es solamente importante porque puede afectar al crecimiento del cultivo sino también porque puede ser un factor que induzca determinados procesos fisiológicos. Así, temperaturas bajas (del orden de 4-5°C) permiten superar los periodos de dormancia de algunas plantas leñosas y la conservación prolongada de determinados cultivos *in vitro*; mientras que una temperatura constante de 20° C induce la formación de raíces. Taracena Zamora, E. (2004).

La temperatura de la cámara de cultivo viene afectada por: la temperatura ambiente de la sala donde se sitúe y el calor generado por las fuentes de luz de que dispone. El control de la temperatura a la que se desarrolla el cultivo *in vitro* se efectúa mediante un sistema de refrigeración-calefacción controlado a través de un termostato. El sistema de refrigeración-calefacción debe estar correctamente dimensionado a fin de conseguir que la temperatura de la zona de cultivo se mantenga dentro de los límites deseados Taracena Zamora, E. (2004).

Para poder caracterizar adecuadamente el funcionamiento respecto de la temperatura de una cámara de cultivo conviene conocer:

La homogeneidad de temperatura: es decir la variación de la temperatura en diferentes zonas de la cámara. Se puede aumentar la homogeneidad haciendo circular el aire dentro de la cámara mediante un sistema de ventilación

La estabilidad de la temperatura: es decir, una medida de la variación de la temperatura de la cámara de cultivo a lo largo del tiempo Todas las cámaras disponen de un termostato que permite regular la temperatura a la que está la cámara en cada momento. Taracena Zamora, E. (2004).

B. Control del fotoperíodo

Además de la radiación luminosa recibida por el cultivo, otro factor a controlar es el número de horas de luz diarias que recibe el cultivo (fotoperíodo). La regulación del fotoperíodo se consigue mediante un programador (analógico o digital) conectado al circuito de iluminación. El programador del foto periodo puede estar relacionado con el programador de temperaturas, de forma que se puedan programar diferentes

temperaturas según sea la fase del fotoperiodo en la que se halle el cultivo Taracena Zamora, E. (2004).

C. La luz

Los diferentes tipos de radiación electromagnética se pueden clasificar según sea su longitud de onda, así podemos obtener un espectro electromagnético formado por las diferentes longitudes de onda de la radiación electromagnética, que van desde los 10-16 m hasta los 104m. De todas estas longitudes de onda sólo las comprendidas entre 380 y 775 nm pueden ser percibidas por el ojo humano: ese conjunto de radiaciones es el que denominamos luz en el lenguaje coloquial Taracena Zamora, E. (2004).

Para propósitos generales se usa en el establecimiento de cultivos tejidos una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes y lámparas incandescentes que brinden entre 1000 y 4000 lux de iluminación. Mansilla Méndez, JR. 2007.

4.2 MARCO REFERENCIAL

4.2.1 Localización

La investigación se realizará en el laboratorio de Cultivo De Tejidos Vegetales, en la Facultad De Agronomía T8, Universidad de San Carlos de Guatemala, Campus Central de la Ciudad Universitaria zona 12.

El laboratorio se encuentra equipado con las condiciones controladas de luz, temperatura, humedad y los requerimientos adecuados

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Evaluar tres concentraciones de auxinas (ANA) y cinco de citocininas (BAP) en la propagación *in vitro* de piñón (*Jatropha curcas L*). Cultivar cabo verde.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de (ANA y BAP) que produce mayor crecimiento de brotes inducidos de piñón (*Jatropha curcas L*). Cultivar cabo verde *in vitro*.
- Determinar que concentración que induce mayor número de hojas en el brote de piñón (*Jatropha curcas L*). Cultivar cabo verde. .
- Determinar la concentración de (ANA y BAP), produce la mayor cantidad de masas callosas de piñón (*Jatropha curcas L*). Cultivar cabo verde.
- Determinar la concentración que induce el mayor número de raíces en el brote de piñón (*Jatropha curcas L*). Cultivar cabo verde.

6 HIPOTESIS

- Al menos una combinación de (ANA y BAP) induce regeneración de plántulas de piñón (*Jatropha curcas L*). Cultivar cabo verde, partiendo del cultivo de meristemos apicales.
- Al menos una combinación de (ANA y BAP) genera hojas diferenciadas en piñón (*Jatropha curcas L*). Cultivar cabo verde, partiendo del cultivo de meristemos.
- Al menos una combinación de ANA y BAP induce regeneración de masas callosas en piñón (*Jatropha curcas L*). Cultivar cabo verde, partiendo del cultivo de meristemos.
- Al menos una concentración de IBA induce a la formación de raíces en brotes de piñón (*Jatropha curcas L*). Cultivar cabo verde, partiendo del cultivo de meristemos.

7 METODOLOGÍA

7.1 Materiales

- Agua destilada
- Algodón
- Beackers
- Bisturí
- Erlenmeyer
- Espátulas
- Etanol 95% y 70%,
- Frascos de plástico
- Hipoclorito de sodio
- Magentas
- Mecheros
- Micropipeta 100 – 1000 ul
- Pipetas de 1, 5, 10 y 25 ml
- Placas petri
- Plástico "foodwrap"
- Probetas

7.2 Equipos

- Agitador magnético
- Autoclave
- Balanza analítica
- Cámara de flujo laminar
- Cámara fotográfica
- Destilador
- Estereoscopio
- Microondas
- pH-metro
- Termómetro de máxima y mínima
- Timer (Regulador de fotoperíodo)

7.3 Material experimental

La semilla de piñón (*Jatropha curcas* L.) Cultivar Cabo Verde utilizada en la investigación fue aportada por el Ing. Domingo Amador de una parcela experimental del municipio de Camotán, departamento Chiquimula cuyas coordenadas son: N 14° 48'43,7" y W 89° 20'49.7"

La edad de las plantas madres utilizadas en el experimento fue de un mes, encontrándose éstas libres de patógenos y de cualquier otro foco de contaminación que podría haber afectado el desarrollo de dicho experimento.

7.4 Principales procedimientos de la fase de cultivo *in vitro*

7.4.1 Desinfección y siembra de explantes

7.4.1.1 Material vegetal

El material que se utilizó para la micropropagación fueron ápices de brotes provenientes de meristemas apicales con 1 ó 2 primordios de hoja de aproximadamente 1 cm de longitud los cuales se obtuvieron de despuntar plantas germinadas con un mes de anterioridad.

7.4.1.2 Desinfección

Los primordios foliares se lavaron utilizando una batería de desinfección consistente en agua estéril, jabón anti-bacterial y etanol al 70%. Se secaron con papel toalla estéril y se colocaron en una solución desinfectante de fungicidas - bactericidas para contrarrestar la contaminación del material vegetal por hongos y bacterias. Se preservaron en frío por 24 horas en una refrigeradora a 4° centígrados.

7.4.1.3 Fase de siembra de explante para inducción de brotes

Desinfectados los primordios foliares de piñón (*Jatropha curcas* L.) Cultivar Cabo Verde se sembraron en los medios con los tratamientos a evaluar para la inducción de brotes. La siembra del explante se realizó en la cámara de flujo laminar previamente estéril. Realizando los siguientes procedimientos:

A. Desinfección

- Se prepararon diferentes soluciones para la desinfección de los los primordios foliares de piñón (*Jatropha curcas* L.) Cultivar Cabo.
 - 500ml de agua destilada estéril.
 - 500ml de alcohol etílico al 70%.
 - 500ml de hipoclorito de sodio al 1%.
 - 1000ml de agua destilada estéril.

- En un beacker con 500ml de agua destilada estéril se sumergieron los primordios foliares de piñón por 3 minutos.
- En un beacker con los 500ml de alcohol etílico al 70% se sumergieron los primordios foliares de piñón por 1 minuto.
- En un beacker con los 500ml con la solución de hipoclorito de sodio al 1% se sumergieron los primordios foliares de piñón por 1 minuto.
- En un beacker con 350ml de agua destilada estéril se realizaron tres lavados a los primordios foliares de piñón para retirar los residuos de la solución de hipoclorito de sodio.
- Se colocaron los primordios foliares de piñón en papel toalla estéril para retirar los residuos de agua.
- Secos los primordios foliares de piñón se trasladaron a cajas petri de vidrio estéril.

B. Siembra de primordios foliares de piñón

- Previamente se esterilizaron pinzas.
- Se tomaron los primordios foliares de piñón.
- Se procedió a la siembra de los primordios foliares de piñón en los frascos con el medio de inducción a evaluar (15ml/frasco).
- Cada frasco con medio de inducción se sembró un primordio foliar de piñón, se tapó el frasco con papel aluminio y se colocó papel parafilm alrededor de frasco para evitar contaminaciones.
- Al finalizar la siembra los frascos se trasladaron al cuarto de incubación.

A continuación se describen los tratamientos de los medios de inducción de brotes en los primordios foliares de piñón:

7.5 Fase de inducción de brotes y callos

Se evaluaron cinco concentraciones de auxinas (ANA) y tres de citocininas (BAP) en la propagación in vitro de piñón (*Jatropha curcas* L). Cultivar cabo verde. Por lo que fueron un total de quince tratamientos con los siguientes niveles de ácido naftalenacético ANA (auxina), niveles de bencilaminopurina BAP (citocinina) como se observa en el cuadro 3

Cuadro 3 concentraciones de auxinas y citocininas

Concentraciones de ácido naftalenacético ANA (auxina) mg por litro	Concentraciones bencilaminopurina BAP (citocinina) mg por litro
0.0	0.0
3.0	0.3
5.0	0.3
7.0	0.5
10.0	

Con las diferentes concentraciones de ácido naftalenacético ANA (auxina) y las concentraciones de bencilaminopurina BAP (citocinina), se conformaron los tratamientos evaluados en esta fase, como se observa en el cuadro 4.

Cuadro 4 Tratamientos de concentraciones ANA (AUXINA), BAP (citocinina)

Tratamiento	ANA (AUXINA) (mg por Litro)	BAP (CITOCINA) (mg por litro)
T1 Testigo	0.0	0.0
T2	0.0	3.0
T3	0.0	5.0
T4	0.0	7.0
T5	0.0	10.0
T6	0.3	0.0
T7	0.3	3.0
T8	0.3	5.0
T9	0.3	7.0
T10	0.3	10.0
T11	0.5	0.0
T12	0.5	3.0
T13	0.5	5.0
T14	0.5	7.0
T15	0.5	10.0

7.6 Fase de enraizamiento de brotes

- Material vegetal: brotes inducidos en la fase de siembra de explantes para inducción de brotes
- Medio de cultivo de inducción de raíces: sales de Murashige y Skoog (1962)
- Concentraciones de ácido indolbutírico IBA: 0.0, 0.3, 0.5 (mg/l) se presenta en el Cuadro 5.

Cuadro 5 Tratamientos de concentraciones de ácido indolbutírico IBA: 0.0, 0.3, 0.5 en mg por litro

Tratamiento	MS %	IBA (mg por litro)
T1 Testigo	100	0.0
T2	50	0.0
T3	100	0.3
T4	50	0.3
T5	100	0.5
T6	50	0.5

7.7 Incubación de cultivos

Después de haber realizado la siembra de todos los Explantes en la fase de inducción de brotes y enraizamiento, en sus respectivas unidades experimentales, éstas se trasladaron al cuarto de incubación, en condiciones propicias para el desarrollo de los mismos. El cuarto de incubación contó con una fuente de luz proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca de 1000 a 3000 lux de intensidad, con un fotoperíodo programado de 16 horas luz.

7.8 Unidad experimental

Un frasco de vidrio con conteniendo 15ml. de medio, brotes provenientes de meristemos apicales con 1 o 2 primordios de hoja de aproximadamente 1 cm de longitud.



Figura 1 Unidad Experimental

7.9 Diseño experimental y distribución de las unidades experimentales

El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar con 15 tratamientos y 10 repeticiones. Modelo estadístico asociado a este diseño y respuesta y concentración que se presenta a continuación (4):

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij} \quad \begin{cases} i = 1, 2, 3, \dots, t. \\ j = 1, 2, 3, \dots, r. \end{cases}$$

Donde:

- Y_{ij} = Variable respuesta medida en la ij-esima unidad experimental.
- μ = Media general.
- T_i = Efecto del i-esima combinación de auxinas y citocinas.
- E_{ij} = Error experimental asociado a la ij-esima unidad experimental.

7.10 Variables de respuesta

Todas las variables de respuesta para la fase de inducción de brotes y callos se a los 35 días después de la siembra de los explantes, realizando una sola lectura.

Las variables fueron:

- **Longitud de planta:** se midió en centímetros (cm) con una regla milimetrada tomándose como punto de partida la base hasta el ápice de la planta.
- **Número de hojas por planta-brote:** se contaron las hojas de los brotes en cada unidad experimental de todos tratamientos.

- **Masa de los callos meristemáticos:** a los 35 días de establecido el experimento, se pesaron todos los callo formados, para determinar su masa en gramos, lo cual se realizó en una balanza analítica.

En cuanto la variable de respuesta inducción de raíces de *J. curcas in vitro* se tomaron brotes provenientes de la fase anterior y se tomaron lecturas a los 35 días de transferidos los explantes al medio de inducción de raíces.

- **Inducción de raíces:** se pretendía medir el número y longitud de las raíces formadas, pero no se produjo formación de raíces en ninguno de los tratamientos.

7.11 Análisis de datos

Para las variables de respuesta, las cuales tuvieron una distribución de frecuencia normal, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA). A las variables que resultaron con diferencias estadísticas significativas al 5%, se les hizo una prueba de Tukey.

8 RESULTADOS

8.1 Masa de callos meristemáticos

Se tomaron como callos los abultamientos generados alrededor de los ápices de brotes provenientes de los meristemos apicales con 1-2 primordios de hoja de aproximadamente 1 cm de longitud sembrados en los diferentes medios de cultivo. Finalizados los 35 días se observó la aparición de masas de tejido vegetal que rodeaban a los explantes previamente sembrados al punto de cubrirlos en su totalidad. El análisis de varianza realizado a la variable masa de callos meristemáticos sí mostró diferencia estadística significativa. Cuadro 7

Cuadro 6 Resumen De Peso En Gramos De Callos Meristemáticos

MASA EN GRAMOS DE CALLOS MERISTEMATICOS															
Repetición	Trat 1	Trat 2	Trat 3	Trat 4	Trat 5	Trat 6	Trat 7	Trat 8	Trat 9	Trat 10	Trat 11	Trat 12	Trat 13	Trat 14	Trat 15
1	3.45	4.12	0	0.71	1.53	1.91	8.44	7.54	8.94	7.15	11.31	2.79	8.75	9.1	8
2	3.92	0	3.43	1.26	0	1.52	10	4.47	8.1	7.73	11.21	2.14	12.91	7.9	9.2
3	3.41	2.67	4.85	0.49	2.26	2.38	8.33	9.17	9.35	8.97	9.92	2.45	10.79	9.36	7.1
4	4.37	5.63	2.78	0.71	2.29	2.56	7.71	5.24	9.68	9.68	14.45	2.65	11.45	8.77	8.25
5	0	2.84	0.44	1.18	0	2.05	8.2	7.84	9.3	10.15	12.15	3.13	10.1	8.67	5
6	4.18	3.54	0.4	0.81	2.16	1.49	8.08	6.93	12.81	6.11	9.23	2.95	9.55	8	6.95
7	3.96	2.76	3.9	0	2.62	3.2	7.98	10.78	9.5	7.99	9.24	2.19	7.15	8.38	9.55
Promedio	3.33	3.08	2.26	0.74	1.55	2.16	8.39	7.42	9.67	8.25	11.07	2.61	10.10	8.60	7.72

Cuadro 7 Prueba de las diferencias de Tukey en los diferentes tratamientos evaluados con base En el peso de las callosidades en g.

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor	Significancia
Tratamiento	1269.16	14	90.65	45.20	<0.0001	**
Error	180.51	90	2.01			
Total	1449.67	104				

**diferencias altamente significativas (<0.0001)

Con el objeto de determinar cuál o cuáles son los tratamientos que reportaron una callosidad de mayores dimensiones, se realizó una prueba de medias de Tukey. Como resultado se identificaron los tratamientos T11, T13, T9, T14, con la misma letra quienes reportan un peso de 11.07 a 8.39 g. el testigo, ocupó el noveno lugar en la prueba de Tukey el cual reportó 3.33 g. de peso, encabezando los tratamientos que no obtuvieron resultados en la formación de masas callosas. Cuadro 8.

Cuadro 8 Prueba 1 diferencias de Tukey del peso de los callos meristemáticos

TRATAMIENTO	MEDIAS	N	*
ANA (AUXINA) BAP (CITOCINA) (mg/L)	Gm.		
T11. 0.5-0.0	11.07	7	A
T13. 0.5-5.0	10.10	7	A
T9. 0.3-7.0	9.67	7	A
T14. 0.5-7.0	8.60	7	A
T7. 0.3-3.0	8.39	7	B
T10. 0.3-10.0	8.25	7	B
T15. 0.5-10.0	7.72	7	B
T8. 0.3-5.0	7.42	7	C
T1. 0.0-0.0	3.33	7	D Testigo
T2. 0.0-3.0	3.08	7	D
T12. 0.5- 3.0	2.61	7	D
T3. 0.0- 5.0	2.26	7	D

T6.	0.3- 0.0	2.16	7	D
T5.	0.0- 10.0	1.55	7	D
T4.	0.0-7.0	0.74	7	D

*Letras distintas indican diferencias significativas (<0.0001)

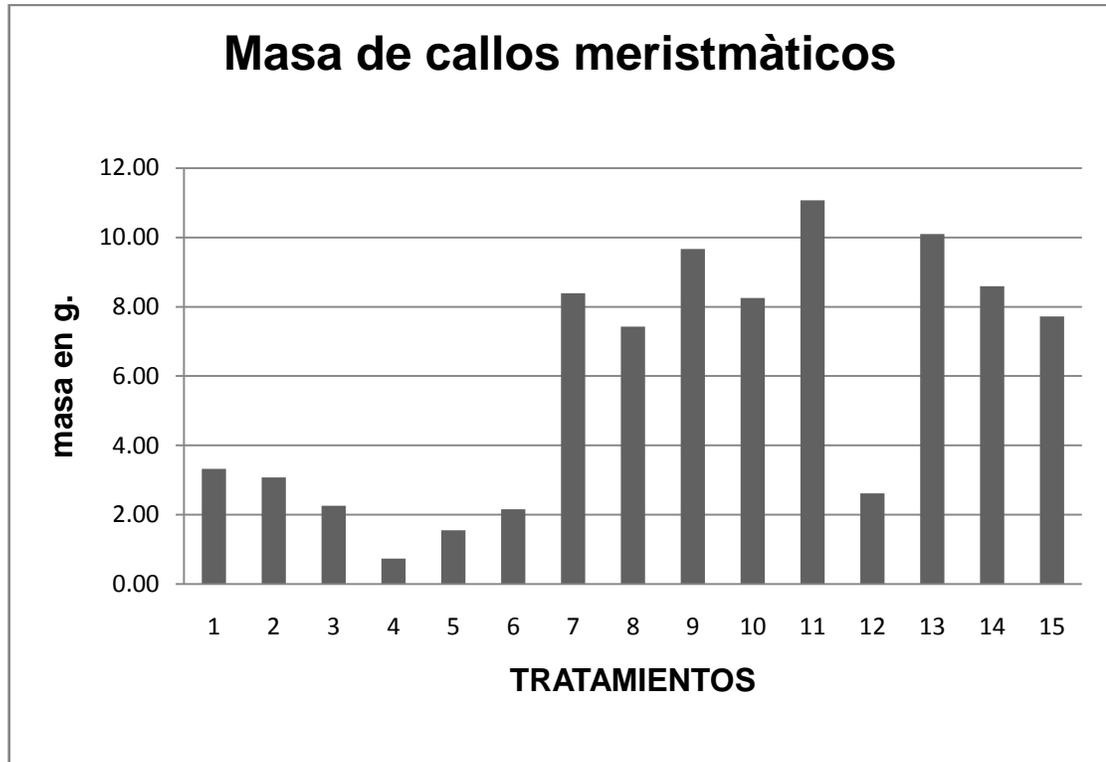


Figura 2 Peso de callos meristemáticos en gramos

Se observa en la figura 2 a los 35 días después de la siembra, el mejor resultado, que lo presentó el tratamiento 11.

Según los resultados obtenidos se afirma que no se necesita de citocinina para provocar la formación de callo en meristemos apicales de piñón (*Jatropha curcas L.*). Cultivar cabo verde.

8.2 Longitud de brotes en centímetros

La longitud promedio en centímetros que ganaron los ápices de brotes provenientes de meristemas apicales con 1-2 primordios de hoja de aproximadamente 1 cm de longitud de piñón (*Jatropha curcas* L). Cultivar cabo verde en cada tratamiento sembrado en los diferentes medios de cultivo. Finalizados los 35 días se observó la elongación en algunas de las unidades experimentales observando crecimiento en el primordio dejando clara una división celular específica. El análisis de varianza realizada a la variable longitud de brotes sí mostró diferencia estadísticamente significativa. Cuadro 10.

Cuadro 9 Resumen De Longitud De Brotes En Centímetros

LONGITUD DE BROTES EN CENTIMETROS															
Repetición	Trat 1	Trat 2	Trat 3	Trat 4	Trat 5	Trat 6	Trat 7	Trat 8	Trat 9	Trat 10	Trat 11	Trat 12	Trat 13	Trat 14	Trat 15
1	2.3	2	0	0	0	3	3	0.5	0.3	0.2	1.4	0.8	1	0.2	0.2
2	1.4	0	0.2	0	0	1.8	0.5	0.5	0	0.3	0.7	2.5	2	0.1	0
3	1.8	0.6	0.3	0	0	2.3	0.4	0.5	0.5	0.3	1.1	0.9	1.3	0.5	0
4	2.5	1.7	0.4	0	0	3.4	0.5	0.3	0.3	0.3	0.9	1	1	0.5	0
5	0	1	0	0	0	3.6	0.3	0.5	0.2	0.3	1.2	2	0.8	0.4	0.3
6	2	1.4	0	0	0	3.2	0.6	0	0.4	0.3	1.8	2.2	1	0.1	0.4
7	2.4	0.9	0.9	0	0	2.1	0.5	0	0.3	0.3	0.6	2.6	0.6	0.5	0.3
Promedio	1.77	1.09	0.26	0.00	0.00	2.77	0.83	0.33	0.29	0.29	1.10	1.71	1.10	0.33	0.17

Cuadro 10 Prueba de diferencias de Tukey en los diferentes tratamientos evaluados con base en la longitud de brotes en centímetros

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor	Significancia
Tratamiento	62.10	14	4.44	17.14	<0.0001	**
Error	123.30	90	0.26			
Total	85.40	104				

**diferencias altamente significativas (<0.0001)

Con el objetivo de determinar cuál o cuáles fueron los tratamientos que reportaron un mayor crecimiento, se realizó una prueba de medias de Tukey. Como resultado se

determinó que el tratamiento T6, reportó una diferencia significativa (como podemos observar es el único que presenta letra A) con respecto al resto de tratamientos. Los tratamientos que no mostraron respuesta fueron T4 y T5 (identificados con la letra D), no presentando ningún crecimiento. Cuadro 11.

Cuadro 11 Prueba 2 diferencias de Tukey en base al crecimiento.

TRATAMIENTO	MEDIAS	N	*
ANA (AUXINA)	cm.		
BAP (CITOCINA)			
(mg por Litro)			
T6. 0.3- 0.0	2.77	7	A
T1. 0.0-0.0	1.77	7	B Testigo
T12. 0.5- 3.0	1.71	7	B
T11. 0.5-0.0	1.10	7	B
T13. 0.5-5.0	1.10	7	B
T2. 0.0-3.0	1.09	7	B
T7. 0.3-3.0	0.83	7	B
T14. 0.5-7.0	0.33	7	C
T8. 0.3-5.0	0.33	7	C
T10. 0.3-10.0	0.29	7	C
T9. 0.3-7.0	0.29	7	C
T3. 0.0- 5.0	0.26	7	C
T15. 0.5-10.0	0.17	7	C
T5. 0.0 - 10.0	0.00	7	D
T4. 0.0-7.0	0.00	7	D

*Letras distintas indican diferencias significativas (<0.0001)

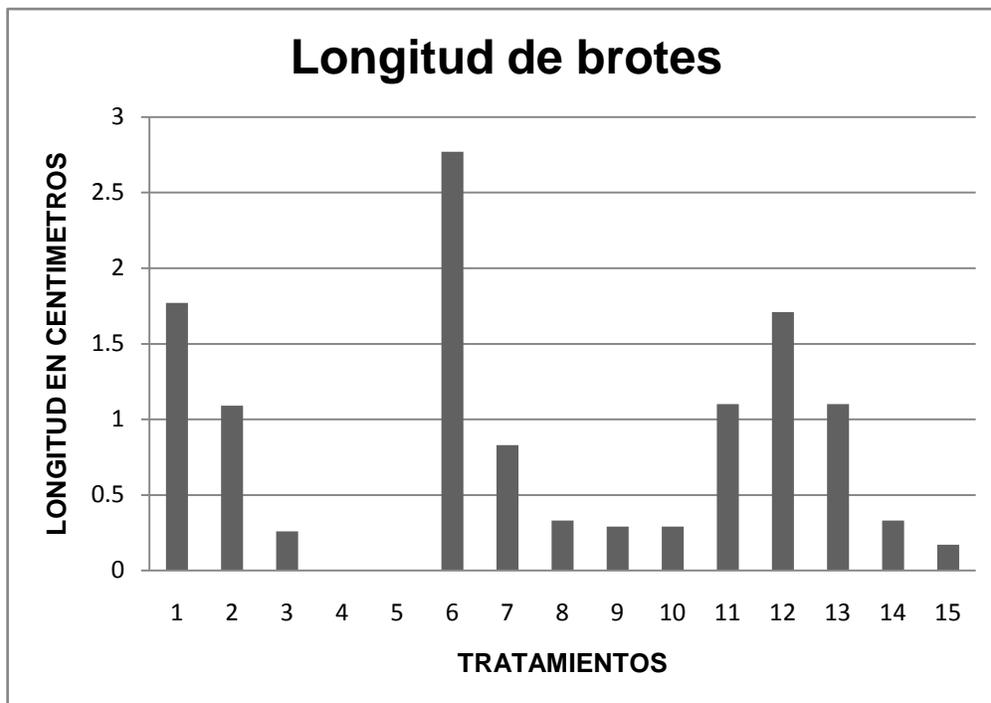


Figura 3 Longitud de Brotes en cm.

Se observa en la figura 3 a los 35 días después de la siembra, el mejor resultado lo presentó el tratamiento número seis, ANA (AUXINA), mg/L 0.3 y BAP (CITOCINA), mg/L, 0.0, se obtuvo un mejor resultado en comparación del resto de tratamientos en la formación de tallos y desarrollo del mismo alcanzando una media de 2.77 cm. Demostrando que al emplear solo ANA (AUXINA), no es necesario el uso de BAP (CITOCINA), para la formación de brotes en piñón (*Jatropha curcas* L.) cultivar cabo verde.

8.3 Número de hojas por explante

La cantidad de hojas fue contada independiente por explante para obtener la media por tratamiento de piñón (*Jatropha curcas* L). Cultivar cabo verde en cada tratamiento sembrado, en los diferentes medios de cultivo, finalizados los 35 días se pudo apreciar la cantidad de hojas en algunas de las unidades experimentales observando crecimiento en cada unidad experimental. El análisis de varianza realizado a la variable número de hojas por explante de cada uno de los tratamientos sí mostró diferencia estadísticamente significativa. Cuadro 13.

Cuadro 12 Resumen de *Número de Hojas por Explante*

NUMERO DE HOJAS POR EXPLANTE															
Repetición	Trat 1	Trat 2	Trat 3	Trat 4	Trat 5	Trat 6	Trat 7	Trat 8	Trat 9	Trat 10	Trat 11	Trat 12	Trat 13	Trat 14	Trat 15
1	3	3	0	0	0	5	1	1	1	0	2	2	2	0	1
2	2	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	4	3	0	0
3	3	1	2	0	0	2	0	1	0	1	1	2	3	3	0
4	4	2	0	0	0	6	2	1	1	1	1	2	2	2	1
5	0	1	0	0	0	5	0	1	0	0	3	4	2	2	1
6	1	2	0	0	0	5	2	0	1	1	3	5	3	0	0
7	5	0	1	0	0	4	2	2	1	1	1	6	1	2	0
Promedio	2.57	1.29	0.57	0	0	4	1.14	1	0.57	0.57	1.71	3.57	2.29	1.29	0

Cuadro 13 Prueba de diferencias de Tukey de los diferentes Tratamientos en base número de hojas por explante

F.V.	SC	GL	CM	F	p-valor	Significancia
Tratamiento	1269.16	14	90.65	45.20	<0.0001	**
Error	180.51	90	2.01			
Total	1449.67	104				

**diferencias altamente significativas (<0.0001)

Con el objetivo de determinar cuál o cuáles son los tratamientos reportaron un número mayor de hojas, se realizó una prueba de medias de Tukey. Como resultado se identificaron los tratamientos T6, T12, T13, T1, con la misma letra quienes reportan un número de hojas de 2.57 a 4 hojas. Los tratamientos T4 y T5, no presentaron hojas observándose. Cuadro 14.

Cuadro 14 Prueba de diferencias de Tukey en Base Al Número de hojas

TRATAMIENTO	MEDIAS	N	*
ANA (AUXINA) BAP (CITOCINA) (mg por Litro)	Número de hojas		
T6. 0.3- 0.0	4	7	A
T12. 0.5- 3.0	3.57	7	A
T13. 0.5-5.0	2.29	7	A
T1. 0.0-0.0	2.57	7	A Testigo
T11. 0.5-0.0	1.71	7	A
T2. 0.0-3.0	1.29	7	B
T14. 0.5-7.0	1.29	7	B
T7. 0.3-3.0	1.14	7	B
T8. 0.3-5.0	1.00	7	B
T10. 0.3-10.0	0.57	7	C
T9. 0.3-7.0	0.57	7	C
T3. 0.0- 5.0	0.26	7	C
T15. 0.5-10.0	0.30	7	D
T4. 0.0-7.0	0.00	7	E
T5. 0.0 - 10.0	0.00	7	E

*Letras distintas indican diferencias significativas (<0.0001)

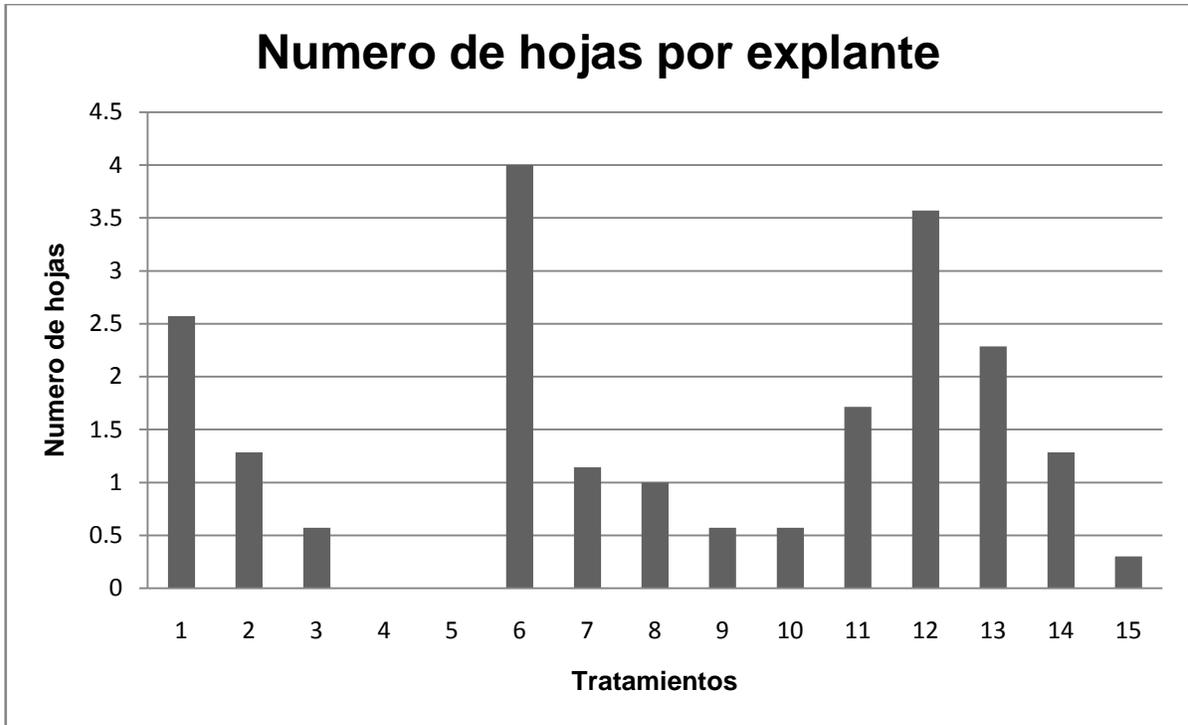


Figura 4 Número De Hojas Por Explante

A los 35 días (después) de la siembra del cultivo *in vitro*, la concentración de ANA, mg/L 0.3 y BAP, mg/L, 0.0, propiciaron el mayor número de hoja por planta con 4 hojas., Este fue el tratamiento seis, que se obtuvo en las unidades experimentales de hojas de piñón cultivar cabo verde (*Jatropha curcas* L).

9 CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las que se realizó la investigación se concluye:

1. Para la formación de callos meristemáticos la combinación de reguladores del crecimiento la cual obtuvo buenos resultados es la que proporciona el tratamiento T11 con una combinación de ANA (AUXINA) y BAP (CITOCINA) de 0.5-0.0 mg/l, además pudiéndose utilizar los tratamientos T13, T9, T14, que lograron la mayor masa de callosidad registrada después del tratamiento T11.
2. Para la longitud de brotes (en centímetros) la combinación de reguladores del crecimiento más eficiente es el tratamiento T6 con la combinación de 0.3 mg/l de ANA y 0.00 mg/l de BAP, el cual mostró la mayor longitud del brote con 2.77 cm.
3. Para la variable número de hojas por explante, el tratamiento que presentó el mejor resultado fue el T6 con la combinación 0.3 mg/l de ANA y 0.00 mg/l de BAP, con un mayor número de hojas por explante.
4. En la primera y segunda fase de los experimentos realizados, la de enraizamiento, no se obtuvo ningún dato, En cuanto a la variable enraizamiento no se observó la formación de raíces tanto en la fase I como en la de inducción de raíces (fase II). Se menciona la fase I ya que se evaluaron diferentes dosis de ANA con lo cual era probable que se indujera la formación de raíces en los explantes. La ausencia de raíces en la fase de enraizamiento fue probablemente porque los niveles de ácido indolbutírico IBA: 0.0, 0.3, 0.5 fueron bajos para inducir raíces ya que el tallo de la planta es leñoso y se necesitaban dosis más altas.

5. RECOMENDACIONES

Para obtener resultados satisfactorios en la fase de enraizamiento de brotes se sugiere evaluar dosis más altas de ácido indolbutírico, así como de otras auxinas. También se sugiere, evaluar otras alternativas para la inducción de raíces, como concentraciones de medio de cultivo, ya que ningún tratamiento logró tener un efecto positivo en la formación de las mismas.

10 Bibliografías

1. Amador, D. 1999. Reguladores del crecimiento utilizados en cultivo de tejidos vegetales: términos y conceptos fundamentales. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 12 p.
2. BioDiesenúmeropain.com. 2007. Conclusiones de la II Conferencia *Jatropha curcas*: *Jatropha curcas*, cultivo energético y social (en línea). España. Consultado 16 feb 2009. Disponible en <http://www.biodiesenúmeropain.com/2008/05/26/conclusiones-de-la-ii-conferencia-jatropha-curcas-jatropha-curcas-cultivo-energetico-y-social/>
3. _____. 2009. Centro de debate y marketeplace de biocombustibles mayo 2007 (en línea). US. Consultado 12 feb 2009. Disponible en <http://www.biodiesenúmeropain.com/2007/05/07/propiedades-de-la-jatropha-curcas/>
4. Cochram, WG; Cox, GM. 1987. Diseños experimentales. México, Trillas. p. 120-132.
5. Honty, G. 2008. Agrocombustibles y sustentabilidad en américa latina (en línea). In Congreso Regional de Ingeniería Química (4, 2008, Uruguay). Consultado 20 nov 2009. Disponible en <http://web.archive.org/web/20100801163346/http://www.agrocombustibles.org/conceptos/HontyAgrocombSustPonencia08.pdf>
6. Jardín Botánico de Córdoba.com. 2009. Técnicas de cultivo *in vitro* (en línea). España. Consultado 5 feb 2009. Disponible en http://www.jardinbotanicodecordoba.com/inves_cons_cult_invi.php
7. Jatrofacurcas.com. 2006. *Jatropha*: del griego iatrós = médico, y trophé = alimento (en línea). Argentina. Consultado 22 feb 2009. Disponible en http://www.engormix.com/jatropha_griego_iatros_=_s_articulos_920_AGR.htm
8. López Hernández, D; PeñateAlvariño, L; DaquintaGradaille, M; Pina Morgado, P; Escalona Morgado, M. 2008. Cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas*, L.(Euphorbiaceae): resultados preliminares y estrategias futuras (en línea). Cuba, Universidad de Oriente. Consultado 27 feb 2009. Disponible en <http://www.cubasolar.cu/biblioteca/Ecosolar/Ecosolar21/HTML/articulo03.htm>
9. Martínez Herrera, J. 1997. El piñon (*Jatropha curcas* L.) una planta nativa de México con potencial alimentario y agroindustrial (en línea). HIPATIA, Revista de Divulgación Científico Tecnológica del Estado de Morelos, México no. 34.

Consultado 20 feb 2009. Disponible en
<http://hypatia.morelos.gob.mx/No12/pinon.html>

10. Rosales Castillo, JM. 2005. Micro propagación de calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*(Cav.) Lellinger) con tres tipos de explantes en diferentes medios de cultivo in vitro. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 66 p.
11. Taracena Zamora, E. 2004. Evaluación del efecto de dos medios basales con cinco combinaciones de auxinas y citocininas para la inducción de brotes *in vitro* enraizamiento de brotes, de malanga (*Colocasia esculenta*) Schott. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. p. 28-30.
12. Toral, OC; Iglesias, JM; Montes de Oca, S; Sotolongo, JA; García, S; Torsti, M. 2008. (*Jatropha curcas* L.) una especie arbórea con potencial energético en Cuba (en línea). Cuba. Consultado 23 feb 2009. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v31n3/pyf01308.pdf>
13. Torres, C. 2007. *Jatropha curcas* - Desarrollo fisiológico y técnico (en línea). Chile, Biocombustibles y Calentamiento Global. Consultado 17 feb 2009. Disponible en <http://biocombustibles.blogspot.com/2007/05/jatropha-y-curcas-desarrollo-fisiologico.html>
14. Vega Lozano, JA De la. 2009. *Jatropha curcas* L (em línea). México, Agro-Energía. Consultado 3 feb 2009. Disponible en <http://www.3wmexico.com/images/JatrophaResumen.pdf>
15. Villalobos A, VM. 1990. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetal. Roma, Italia, FAO. p. 3-41. (Cuadernillo 105).
16. Villancinda Maldonado, RW. 1990. Respuesta de la especie tres puntas (*Neurotonalobata* L.) a la propagación in vitro. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. p. 93.
17. Weaber, RJ. 1987. Reguladores de crecimiento de las plantas en la agricultura. México, Trillas. 622 p.
18. Willians, T; Standley, P; Carpenter, J. 1984. Flora of Guatemala. Chicago, US, Chicago Natural Museum, Fieldiana Botany, v. 24, 13 pts.

11 Anexos

11.1 Preparación de las soluciones patrón

A continuación se describe la forma en que se realizó la preparación de las soluciones patrón para el medio Murashige y Skoog.

Se prepararon 500 ml de esta solución, para lo cual se utilizó un beacker de 1 litro, en el que se agregaron los componentes que se describen en el cuadro 15.

Cuadro 15A Componentes De Micronutrientes Del Medio Nutritivo MurashigeY Skoog Concentración 10 X.

Sustancia	Peso (grs.)
NH ₄ NO ₃	8.25
KNO ₃	9.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.85
KH ₂ PO ₄	0.85

Se pesaron los componentes vertiéndolos en un beacker de 250 ml con agua desmineralizada estéril, se agito hasta observar que todas las sustancias se disolvieron, el contenido se traslado a una probeta de 1000 ml continuación se aforara con agua desmineralizada estéril hasta llegar al volumen deseado, seguidamente se volvió a agitar la solución y se guardo en frascos esterilizados identificados y tapados adecuadamente, estos se guardaron hasta su uso en una refrigeradora a una temperatura de 4 °C. De igual forma se preparó una solución patrón a 10 X de macronutrientes consistentes en CaCl₂ · 2H₂O para lo cual deben ser 500 ml.

11.1.1 Solución madre de micronutrientes

Se prepararon dos soluciones por aparte de 100 ml cada una, a las que se les nombró micro A y micro B, para ello se agregó 50 ml de agua desmineralizada estéril en un beacker de 250 ml luego de pesados se agregaron los componentes que se describen en el cuadro 16.

Pesados los componentes se añadieron al beacker conteniendo 50 ml de agua desmineralizada estéril esta se mantuvo en constante agitación con el agitador magnético hasta observar que todas las sustancias se disolvieron el contenido se trasladó a una probeta de 100 ml, luego se aforó con agua desmineralizada estéril, seguidamente se volvió a agitar la solución y se guardó en frascos esterilizados, identificados y tapados adecuadamente, se colocó un forro de papel aluminio, y así se guardó hasta su uso en una refrigeradora a una temperatura de 4 °C.

Por aparte se preparó otra solución de micro nutriente de KI a 1000 X, para ello se utilizó 100 ml en la que se agregó 0.083 gramos del compuesto mencionado.

Cuadro 16A Componentes De Micronutrientes Del Medio Nutritivo Murashige Y Skoog.

.Sustancia	Peso (grs.)
	MICRO A a1000X
MnSO ₄ · 4H ₂ O	2.23
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.86
H ₃ BO ₃	0.62
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.025
	MICRO B a 5000X
CoCl ₂ · 2H ₂ O	0.0125
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0125

11.1.2 Solución madre de hierro a 200X

Se preparó una solución de 250 ml de la siguiente forma:

- a. En un beacker se colocó 100 ml de agua desmineralizada estéril
- b. Seguidamente el beacker se colocó en la estufa
- c. Se agregó al agua caliente 1.865 grs de $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot\text{H}_2\text{O}$.
- d. Disuelto lo anterior se agregó 1.3925 grs de $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Disueltos los elementos, la solución se aforó en una probeta al volumen deseado, se volvió a agitar y luego se trasladó la solución a su envase, colocándole su respectiva etiqueta, además se le colocó forro de papel aluminio, se tapó debidamente y se guardó en una refrigeradora a 4°C.

11.1.3 Solución madre de vitaminas a 1000X

Se preparó una solución de 50 ml para lo cual en un beacker de 100 ml se colocó 25 ml de agua desmineralizada estéril en constante agitación, se pesó 0.02 grs. de tiamina y se agregó al beacker, después de disuelto el compuesto se aforó en una probeta de 50 ml según el volumen deseado, la solución se trasladó a un envase de vidrio y se guardó en una refrigeradora a 4°C.

11.1.4 Solución madre de myoinositol a 1000X

Se preparó una solución de 100 ml para lo cual en un beacker de 100 ml se colocó 25 ml de agua desmineralizada estéril en constante agitación, se pesó 10 gramos de myoinositol y se agregó al beacker, después de haber disuelto el compuesto se aforó en una probeta de 100 ml según el volumen deseado, la solución se trasladó a un envase de vidrio y se guardó en una refrigeradora a 4°C.

11.1.5 Preparación de los medios de cultivo

Se preparó la cantidad de medio basal según conveniencia, para lo cual se siguió la siguiente metodología. En un beacker se agregó agua desmineralizada estéril, se introdujo al recipiente una barra magnética colocada sobre un agitador magnético, el cual se mantuvo en constante agitación, luego se agregaron los componentes del medio Murashige y Skoog (cuadro 6) según cantidad deseada, el orden es el siguiente.

- Macro nutriente; NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.
- Micronutrientes A; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KI
- Micronutrientes B; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- Hierros, Na_2EDTA , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Vitaminas; tiamina
- Myoinositol
- Reguladores de crecimiento según las dosis evaluada, de bencil amino purina (BAP) 3.0 mg/L, 5.0 mg/L, 7.0 mg/L 10.0 mg/L y ácido naftalenacético ANA (auxina) 0.3 mg/L, 0.5 mg/L, a excepción del tratamiento testigo al cual no se le aplicó reguladores.
- Sucrosa 30 g/l
- Se aforó la solución.
- Se midió el pH a 5.7 para ello se utilizó según el caso una solución de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio 0.1 N.
- Se agregó agar (7.0 gr/L).
- Se calentó en horno microondas hasta disolver el agar.
- La solución se agregó en las unidades experimentales consistiendo en frascos de vidrio de 100 ml de capacidad (10 ml de medio por frasco).
- Cada frasco se rotuló según tratamiento.
- Todas las unidades experimentales se esterilizaron en autoclave durante 25 minutos a una presión de 1.05 kg/cm cuadrado y a una temperatura de 120 °C.
- Las unidades experimentales se colocaron en el cuarto de incubación hasta su utilización.

Cuadro 17A Componentes Del Medio Basal MS

#	NOMBRE DEL COMPUESTO	FORMULA	MS 100% mg/l
I	MACRONUTRIENTES		
1	nitrate de amonio	NH ₄ NO ₃	1650
2	nitrate de potasio	KNO ₃	1900
3	sulfato de magnesioheptahidratado	MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
4	dihidrogenofosfato de potasio	KH ₂ PO ₄	170
II	MICRONUTRIENTES "A"		
1	acidoborico	H ₃ BO ₃	6.2
2	sulfato de manganesiomonohidratado	MNSO ₄ .H ₂ O	22.3
3	sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
4	molibdato de sodiodihidratado	Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O	0.25
III	MICRONUTRIENTES "B"		
1	sulfato de cobrepentahidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
2	cloruro de cobaltohexahidratado	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
IV	IODURO DE POTASIO		
1	ioduro de potasio	KI	0.83
V	CLORURO DE CALCIO		
	cloruro de calciodihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
VI	Myo-INOSITOL		
1	Myo- inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	100
VII	SOLUCION DE HIERRO		
1	crisales de sal disodiodihidratada	Na ₂ EDTA	37.3
2	sulfato de hierroheptahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.8
VIII	VITAMINAS		
1	acidonicotnico	C ₆ H ₅ NO ₂	0.5
2	pyridoxolhydrochloride	C ₈ H ₁₂ CINO ₃	0.5
3	tiaminamonoclohidricaHCl	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ OS.H ₂ O	0.1
4	glicina	H ₂ NCH ₂ COOH	2
VII	SUCROSA 3%		30000
VIII	AGAR 0.7%		7000

Nota: para el caso de esta investigación se modificaron el contenido de vitaminas del medio basal MS agregando únicamente Tiamina (0.4mg/l).



Figura 5A Tratamientos del experimento realizado.



Figura 6A Masas callosas de los tratamientos.

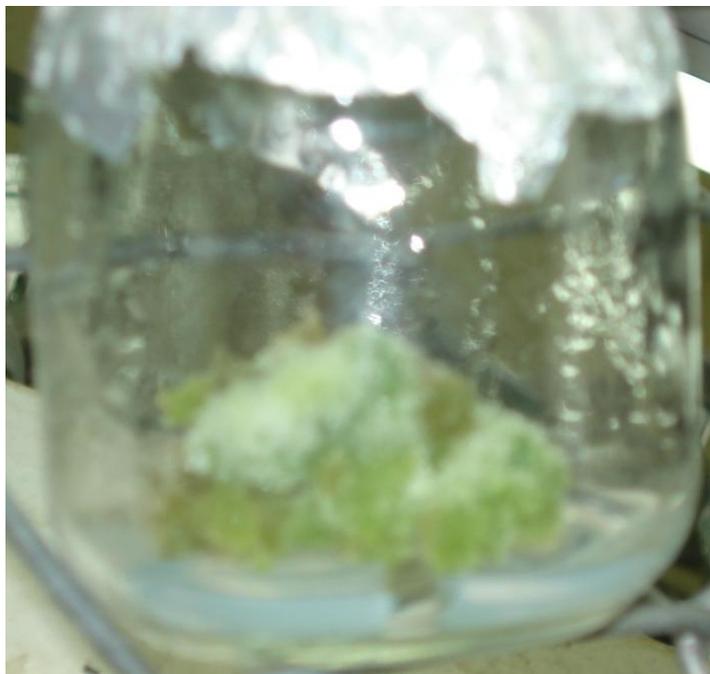


Figura 7A Masa callosa del mejor tratamiento (T11).

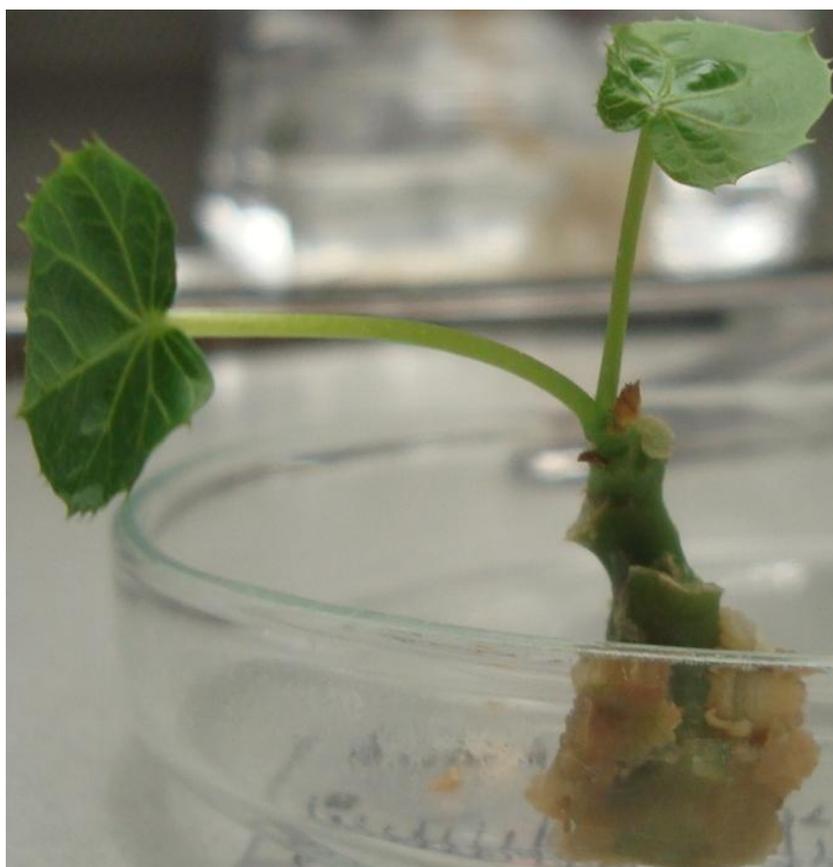


Figura 8A Brote con hojas del mejor tratamiento (T6).