

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS



INDUCCIÓN DE CALLOS MERISTEMÁTICOS Y REGENERACIÓN DE PLANTAS
IN VITRO EN EL CULTIVO DEL PIÑÓN (*Jatropha curcas* L.)

SABRINA WALESKA POSADAS VILLEDA

Guatemala, marzo 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS

INDUCCIÓN DE CALLOS MERISTEMÁTICOS Y REGENERACIÓN DE PLANTAS
IN VITRO EN EL CULTIVO DEL PIÑÓN (*Jatropha curcas* L.)

TESIS:

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

POR

SABRINA WALESKA POSADAS VILLEDA

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERA AGRONOMA

EN

RECURSOS NATURALES RENOVABLES

EN EL GRADO DE LICENCIADA

GUATEMALA, MARZO DE 2011

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RECTOR

LIC. CARLOS ESTUARDO GÁLVEZ BARRIOS

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

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

GUATEMALA MARZO 2011

Guatemala, marzo de 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 graduación titulado:

**INDUCCIÓN DE CALLOS MERISTEMÁTICOS Y REGENERACIÓN DE PLANTAS
IN VITRO EN EL CULTIVO DEL PIÑÓN (*Jatropha curcas* L.)**

Como requisito previo a optar al título de Ingeniera Agrónoma en Recursos Naturales Renovables, en el grado académico de Licenciada.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme,
Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Sabrina Waleska Posadas Villeda

ACTO QUE DEDICO A:

- DIOS:** Por haberme regalado el don de la vida y acompañarme en cada paso de mi existencia.
- VIRGEN MARÍA:** Por ser mi guía e iluminarme en cada momento que le he necesitado.
- MIS PADRES:** David Octavio y Aura Marina, por ser mi mejor ejemplo de honradez y dedicación, los pilares fundamentales en mi vida y apoyarme incondicionalmente, en especial a mi madre por demostrarme cuan grande es el amor por un hijo y el valor que tiene toda mujer.
- MIS HERMANOS:** Dania, Alex y Sucely, por apoyarme durante toda mi carrera, en especial a Sucely por demostrarme ese apoyo de hermanas incondicional que existe entre ambas y ser muchas veces esa persona que me dio valor cuando lo necesite.
- MIS ABUELITAS:** Esperanza Ruano (Q.E.P.D.) y Juana Sandoval (Q.E.P.D.), por ser hoy dos ángeles que Dios me ha puesto en el cielo para guiarme, en especial a mi abuelita Juana Sandoval, por ser la mujer mas maravillosa que he conocido, por enseñarme que siempre se sale adelante y nunca se debe de mirar atrás y que siempre con una sonrisa todo saldrá mejor.
- MIS TIOS y TIAS:** Por el apoyo que cada uno de ellos me brindó durante toda mi carrera, en especial a Paty, por ser más que una tía una amiga incondicional.
- MIS PRIMOS:** Kimberly, Boris, Edgardo y Juan Diego, por ser otros hermanos que Dios me regalo.
- MIS AMIGOS DE ESTA FACULTAD:** Por enseñarme que dentro de esta facultad no se conocen nuevos amigos sino que se crea una nueva familia con la se contará de por vida, con quienes guardaré muchos recuerdos de convivencia y compañerismo durante nuestras recordadas giras estudiantiles, muchas gracias compañeros los admiro desde el fondo de mi corazón a cada uno de ustedes Nancy, Mayra, Ursula, Axel, Luis, Ricardo, Mogollon, Sandra, Cesar, Valeska, Claudia, Edwin, Ruben, Glenda, Juan Carlos, Henry.

MIS AMIGOS DE

DIVERSIFICADO: Por demostrarme con hechos el significado de una verdadera amistad, la cual continúa a través de los años sin importar que tan lejos o cerca estemos siempre están allí cuando se les necesita mil gracias Alejandra, Sandra Bulux, Candy, Luis Rene, Claudia Roldàn y Ana Maria Perez.

FAMILIA

TECUM ALVAREZ Por el apoyo recibido en especial a mi novio Sergio Tecum, por ser esa persona que me ha demostrado durante estos años el significado de amistad y amor sincero, por estar allí siempre apoyándome y ser esa persona especial que hace que se ilumine mi día, lo amo con todo el corazón.

FAMILIA

ROSALES ALVAREZ: Por hacerme sentir parte especial en su familia y brindarme siempre cariño y apoyo durante estos años.

MANUEL GOMEZ: Por ser un ejemplo de hombre desinteresado y con el espíritu de ayudar al prójimo.

MIS CATEDRATICOS: Por enseñarme cada uno de ustedes, cosas esenciales para lograr desempeñarme de una mejor manera como Ingeniera Agrónoma.

TESIS QUE DEDICO A

GUATEMALA;

País amado en el que crecí, por el cual lucharé cada día para que siga siendo el país de la ETERNA PRIMAVERA.

UNIVERSIDAD DE SAN
CARLOS DE GUATEMALA:

Por ser la mi casa durante todos estos años y a la cual representare con orgullo y honestidad a donde quiera que vaya.

FACULTAD DE AGRONOMIA:

Por ser parte de mi vida de ahora en adelante y por ser el lugar en donde se forjan los mejores Ingenieros Agrónomos de este país consientes y dedicados en cada una nuestras tareas.

INSTITUTO ROMULO GALLEGOS
FREIRE;

Institución en la cual se forman hombres y mujeres de bien, con metas y sueños alcanzables, por el bien de nuestro país.

INSTITUTO ENRIQUE GOMEZ
CARRILLO:

Por ser el lugar en donde se guardan bellos recuerdos de mi adolescencia y amistades que perdurarán para toda la vida.

AGRADECIMIENTOS

- MIS ASESORES: Ing. Agr. Eduardo Pretzanzin, Ing. Agr. Makmilan Cruz, por ayudarme en la realización de esta investigación, en especial al Ing. Agr. Domingo Amador (Q.E.P.D.), el cual creyó en mi y me brindó su apoyo para iniciar esta investigación, he aquí los frutos de su entusiasmo.
- MI SUPERVISOR DE EPS: Doctor David Monterroso, por ayudarme en la realización de mis prácticas profesionales en esta facultad.
- Ing. Mario Cabrera: Por ser una persona amigable confiable, con deseo de ayudar al estudiante siempre y por el apoyo brindado durante el EPS.
- Ing. Efrain Medina Por los consejos recibidos durante el transcurso del EPS y en mis evaluaciones.

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 GENERAL

1.	Introducción.....	1
2.	Definición del problema	2
3.	Justificación de la investigación	3
4.	Marco Teórico	4
4.1.	Marco Conceptual	4
4.1.1.	Descripción botánica de <i>Jatropha curcas</i> L.	4
4.1.2.	Origen	5
4.1.3.	Morfología	5
4.1.4.	Tallo	5
4.1.5.	Raíces	5
4.1.6.	Hojas	6
4.1.7.	Flores	6
4.1.8.	Frutos	7
4.1.9.	Semilla	7
4.1.10.	Ciclo vegetativo	8
4.1.11.	Propagación de <i>Jatropha curcas</i> L.	8
4.1.12.	Hábitat.....	9
4.1.13.	Distribución geográfica.....	9
4.1.14.	Variedades	10
4.1.15.	Componentes químicos	10
4.1.16.	Planta tóxica	10
4.1.17.	Usos de la especie <i>Jatropha curcas</i> L.	11
4.1.18.	Producción	14
4.1.19.	Técnica de cultivos vegetales	15
4.1.20.	Aspectos químicos.....	15
4.1.20.1.	Medio de cultivo	15
4.1.20.2.	Explante	16
4.1.20.3.	pH	16
4.1.21.	Ambiente físico	17
4.1.21.1.	La temperatura	17
4.1.21.2.	Control del fotoperíodo	18
4.1.21.3.	La luz	18
4.1.22.	Origen	19
4.1.23.	Tipos de cultivos vegetales <i>in vitro</i>	19
4.1.24.	Propagación de material vegetal por cultivo de tejidos	20
4.1.25.	Reguladores de crecimiento.....	21

4.1.25.1.	Hormona	21
4.1.25.2.	Auxinas:	22
4.1.25.3.	Efectos fisiológicos de las auxinas en medio de cultivo	22
4.1.25.4.	Tipos de auxinas:	22
4.1.25.5.	Giberelinas.....	24
4.1.25.6.	Efectos de la giberelinas.....	24
4.1.25.7.	Citocininas.....	26
4.1.25.8.	Efectos: de las citoquininas	26
4.1.26.	El Medio Ms o Murashige Y Skoog (1962).....	27
4.1.27.	Estudios de cultivo de tejidos realizados en <i>Jatropha curcas</i> L.	28
4.1.27.1.	Estudio realizado en Cuba por <i>centro de bioplantas</i>	28
4.1.27.2.	Proyecto realizado en Camotán, Chiquimula.....	29
4.1.27.3.	FAUSAC y agricultores investigan cultivo de piñón para generar biodiésel.....	30
4.1.27.4.	Otras instituciones apoyan programa local de biodiésel	30
4.1.27.5.	Embriogénesis somática de <i>Jatropha curcas</i> una planta multiuso	31
4.1.27.6.	Organogénesis indirecta	32
4.2.	Marco referencial	33
4.2.1.	Descripción del material vegetal.....	34
5.	Objetivos	35
4.3.	Objetivo General	35
4.4.	Objetivos Específicos	35
6.	Hipótesis	36
7.	Metodología	37
4.5.	Fase de Investigación	37
4.6.	Fase de Campo	37
4.6.1.	Origen y colecta de material vegetal de <i>Jatropha Curcas</i>	37
4.7.	Fase de Laboratorio	37
4.7.1.	Materiales y Métodos.....	37
4.7.2.	Procedimiento para la preparación de soluciones madres	38
7.1.1.1.	Preparación de solución de micronutrientes “B” de las sales MS.....	39
7.1.1.2.	Preparación de la solución de Yoduro de potasio “KI” a 1000X	40
7.1.1.3.	Preparación de 500 ml. de la solución de Cloruro de calcio a 10X.....	40
7.1.1.4.	Preparación de 100 ml. De la solución de hierro a 100X	40
7.1.1.5.	Preparación de vitaminas a 1000X.....	41
7.1.1.6.	Preparación de 100 ml. De la solución de myo inositol a 1000X	41
7.1.1.7.	Preparación de 100 ml. De vitaminas a una concentración de 1000X.....	41
7.1.1.8.	Preparación de los reguladores de crecimiento a utilizar en la investigación.....	42
4.7.3.	Preparación de 1 litro de medio MS (Murashige y Skoog):	42
4.7.4.	Siembra de la primera fase de la investigación.....	43

7.1.1.9.	Multiplicación de callos meristemáticos de <i>Jatropha curcas</i> L.....	43
4.7.5.	Toma de datos variables respuesta:.....	44
4.7.6.	Variables Respuestas en el diseño experimental.....	44
4.7.7.	Preparación de medios para la segunda fase de la investigación	45
7.1.1.10.	Regeneración de plántulas a partir de los callos multiplicados	45
7.1.1.11.	Segunda fase	45
4.7.8.	Diseño experimental: Completamente al azar	46
4.7.9.	Unidad experimental	46
4.7.10.	Análisis de la información	46
4.7.11.	Presentación de Resultados	46
8.	Resultados y discusión de resultados	47
4.8.	Resultados de Primera Fase	47
4.8.1.	Análisis estadístico para la variable ancho del explante en centímetros.....	50
4.8.2.	Análisis estadístico para la variable largo del explante en centímetros.	52
4.8.3.	Análisis estadístico para la variable peso en gramos de los explantes.....	53
4.9.	Resultados segunda fase	55
4.9.1.	Análisis estadístico para la variable ancho en centímetros de los explantes	58
4.9.2.	Análisis de la varianza para la segunda fase de la investigación variable ancho.....	60
4.9.3.	Análisis de la varianza segunda fase de investigación variable peso en gramos.....	61
4.9.4.	Análisis estadístico para la variable ancho en centímetros de los explantes	68
4.9.5.	Análisis estadístico para la variable largo en centímetros de los explantes.....	69
4.9.6.	Análisis estadístico para la variable peso en gramos de los explantes.....	70
9.	Conclusiones.....	73
10.	Recomendaciones.....	74
11.	Bibliografía	75
12.	Anexos.....	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Jatropha curcas</i> L.	4
Cuadro 2. Componentes principales de los medios de cultivo.	16
Cuadro 3. Composición general de las sales de Murashige y Skoog	28
Cuadro 4. Embriogénesis somática de <i>J. curcas</i> L. a partir de callos obtenidos de raíces y hojas de plántulas <i>in vitro</i> .31	
Cuadro 5. Brotes por accesión a los 70 días posteriores a la siembra.	33
Cuadro 6. Componentes de macro nutrientes del medio MS a (10X).	38
Cuadro 7. Componentes de la solución de micronutrientes "A" a 1000X.	39
Cuadro 8. Componentes de micronutrientes "B" del medio Murashige y Skoog (1962)	39
Cuadro 9. Compuestos químicos para la solución de hierro a 100X	40
Cuadro 10. Compuestos químicos para la solución de vitaminas a 1000x.	41
Cuadro 11. Compuestos para la solución de vitaminas	41
Cuadro 12. Componentes químicos para la elaboración de 1 L. medio MS.	42
Cuadro 13. Tratamientos realizados en la primera fase de la investigación con MS al 100%	43
Cuadro 14. Tratamientos a realizar para la segunda fase de la investigación.	45
Cuadro 15. Resultados obtenidos en la primera fase para las variables cualitativas.	47
Cuadro 16. Resultados obtenidos en la primera fase de las variables cuantitativas.	50
Cuadro 17. Análisis de la varianza para la primera fase de la investigación, variable ancho.	50
Cuadro 18. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable ancho.	50
Cuadro 19. Prueba de Tuckey, con un error de 0.1478 y gl. 48 con alfa de 0.05.	51
Cuadro 20. Análisis de la varianza para la primera fase para la variable largo en centímetros.	52
Cuadro 21. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable largo.	52
Cuadro 22. Prueba de Tuckey, con un error de 0.4390 y gl. 48 con alfa de 0.05.	52
Cuadro 23. Análisis de la varianza para la primera fase para la variable peso en gramos.	53
Cuadro 24. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable peso en gramos.	53
Cuadro 25. Prueba de Tuckey, con un error de 1.9320 y gl. 48 con alfa de 0.05.	53
Cuadro 26. Resultados obtenidos en la segunda fase de las variables cualitativas.	55
Cuadro 27. Resultados obtenidos en la segunda fase para las variables cuantitativas.	57
Cuadro 28. Análisis de la varianza para la segunda fase de la investigación variable largo.	58
Cuadro 29. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable largo en centímetros.	58
Cuadro 30. Prueba de Tuckey, con un error de 1.7605, y gl. 54 con un alfa de 0.05.	59
Cuadro 31. Análisis de la varianza para la segunda fase de la investigación variable ancho.	60
Cuadro 32. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable ancho en centímetros.	60
Cuadro 33. Prueba de Tuckey, con un error de 1.53 y gl. De 54 con un alfa de 0.05.	60
Cuadro 34. Análisis de la varianza para la segunda fase de la variable peso en gramos.	61
Cuadro 35. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable peso en gramos.	61
Cuadro 36. Prueba de Tuckey, con un error de 4.17 y gl de 54 con un alfa de 0.05-	61
Cuadro 37. Tratamientos utilizados para desarrollar este ensayo.	63

Cuadro 38. Resultados obtenidos de los tratamientos adicionales a esta investigación.	64
Cuadro 39. Resultados cuantitativos del primer ensayo de los tratamientos adicionales.	65
Cuadro 40. Ultimo tratamiento realizado durante esta fase de investigación.	66
Cuadro 41. Tratamiento No. 8 adicional, combinación de BAP y ANA.	66
Cuadro 42. Análisis de la varianza para la segunda fase de investigación variable ancho.	68
Cuadro 43. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable ancho en centímetros.	68
Cuadro 44. Prueba de Tuckey, con un error de 0.9848 y gl. 86, con un alfa de 0.05.	68
Cuadro 45. Análisis de la varianza para la segunda fase de investigación variable largo.	69
Cuadro 46. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable largo en centímetros.	69
Cuadro 47. Prueba de Tuckey, con un error de 1.2027 y gl. 86, con un alfa de 0.05.	70
Cuadro 48. Análisis de la varianza para la segunda fase de la variable peso en gramos.	70
Cuadro 49. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable peso en gramos.	71
Cuadro 50. Prueba de Tuckey, con un error de 1.2027 y gl. 86, con un alfa de 0.05.	71
Cuadro 51A. Resultados del primer tratamiento de la primera fase.	77
Cuadro 52A. Resultados obtenidos en el tratamiento 2 de la primera fase.	79
Cuadro 53A. Resultados obtenidos en el tratamiento 3 en la primera fase.	81
Cuadro 54A. Resultados obtenidos del tratamiento 4 de la primera fase de investigación.	83
Cuadro 55A. Resultados obtenidos en el tratamiento 5 de la primera fase de investigación.	85
Cuadro 56A. Resultados del tratamiento 6 durante la primera fase de la investigación.	87
Cuadro 57A. Resultados obtenidos del tratamiento 1 en la segunda fase de la investigación.	89
Cuadro 58A. Resultados obtenidos del tratamiento 2 de la segunda fase de investigación.	91
Cuadro 59A. Resultados del tratamiento 3 en la segunda fase de la investigación.	93
Cuadro 60A. Resultados del tratamiento .4 de la segunda fase de la investigación.	95
Cuadro 61A. Resultados, tratamiento 5 de la segunda fase de la investigación.	97
Cuadro 62A. Resultado del tratamiento 6 de la segunda fase de la investigación.	99
Cuadro 63A. Tratamiento únicamente con MS al 100%.	101
Cuadro 64A. Tratamiento 2 conteniendo MS al 50%.	102
Cuadro 65A. Tratamiento No. 3 adicional.	104
Cuadro 66A. Resultados del tratamiento 4 adicional.	105
Cuadro 67A. Tratamiento 5 adicional con combinaciones de cinetina y acido giberélico.	107
Cuadro 68A. Resultados obtenidos en el tratamiento No. 6 adicional.	109
Cuadro 69A. Resultados obtenidos del tratamiento 7 adicional.	110
Cuadro 70A. Tratamiento 8 adicional, combinación de BAP y ANA.	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frutos, hojas y flores de <i>Jatropha curcas</i>	4
Figura 2. Árbol de <i>Jatropha curcas</i> L.....	5
Figura 3. Raíz de <i>Jatropha curcas</i> L.....	6
Figura 4. Hoja de <i>Jatropha curcas</i> L.....	6
Figura 5. Flores de <i>Jatropha curcas</i> L.....	7
Figura 6. Etapas de desarrollo del fruto de <i>Jatropha curcas</i> L.	7
Figura 7. Semilla de <i>Jatropha curcas</i> L.	8
Figura 8. Tipos de cultivos <i>in vitro</i>	19
Figura 9. Relación de las hormonas con diferentes órganos de la planta.....	21
Figura 10. Forma de actuar de las auxinas dentro de la planta.....	22
Figura 11. Efectos de la auxina en la dominancia apical.....	23
Figura 12. Fases del enraizamiento.	24
Figura 13. Germinación de una semilla de cebada.	25
Figura 14. Porcentaje de formación de callo a partir de varios explantes de <i>Jatropha curcas</i> L.....	28
Figura 15. Porcentaje de formación de callos, expuestos a diferentes concentraciones de BA.	29
Figura 16. Diferenciación de callos en sus diferentes fases obtenidos a partir de raíces.....	32
Figura 17. Escala de colores codificados en base a la tabla de Munssell.....	47
Figura 18. Coloración presentada en los explantes durante la primera fase.....	48
Figura 19. (A,B,C) Diferentes coloraciones presentadas en los explantes de la primera fase.....	48
Figura 20. Estado fitosanitario de los explantes durante la primera fase.....	49
Figura 21. Explante infectado por la bacteria dentro del medio de cultivo.	49
Figura 22. Media de la variable ancho en cms. de los explantes primera fase.	51
Figura 23. Media del largo de los explantes en la primera fase de la investigación.	52
Figura 24. Media de la variable peso en gramos de los explantes en la primera fase.....	54
Figura 25. Porcentaje de la coloración presentada en los explantes, segunda fase.	56
Figura 26. En ambas figuras (A,B,C,) se muestran las diferentes coloraciones presentadas.....	56
Figura 27. Estado fitosanitario de los explantes en la segunda fase de investigación.	57
Figura 28. Se muestra los posibles brotes regenerados a partir de callos meristemáticos.....	58
Figura 29. Media de la variable largo en centímetros de los explantes segunda fase.....	59
Figura 30. Media de la variable ancho en centímetros de los explantes segunda fase.....	60
Figura 31. Media de la variable peso en gramos de los explantes segunda fase.	62
Figura 32. Coloración presentada para el primer ensayo de los tratamientos adicionales.	64
Figura 33. Estado fitosanitario generado en el primer ensayo de los tratamientos adicionales.....	65
Figura 34. Se muestra el desarrollo de los explantes sometidos a este tratamiento.	66
Figura 35. Coloración de los explantes sembrados el tratamiento No. 8 adicional.....	67
Figura 36. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en este tratamiento.....	67

Figura 37. Media de la variable ancho en centímetros de los explantes.....	69
Figura 38. Medias de la variable largo en centímetros para la segunda fase.	70
Figura 39. Media de la variable peso en gramos para la segunda fase.....	71
Figura 40A. (A,B,C) Se muestran el poco desarrollo obtenido del tratamiento 1.	77
Figura 41A. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en el tratamiento 1.	78
Figura 42A. Resultados obtenidos de la coloración en los explantes tratamiento 1.	78
Figura 43A. (A, C) El desarrollo mayor de los explantes, y (B) la contaminación por bacteria.	79
Figura 44A. Estado fitosanitario de los explantes del tratamiento 2.....	80
Figura 45A. Distribución en porcentajes de la coloración presentada en el tratamiento 2.....	80
Figura 46A. (A,B,C,) Respuesta de los explantes al tratamiento 3 de la primera fase.	81
Figura 47A. Coloración que lo explantes sometidos al tratamiento 3 presentaron.	82
Figura 48A. El 100 % de los explantes tienen un excelente estado fitosanitario.....	82
Figura 49A. (B) Coloración presentada en los explantes. (A,C) desarrollo de los explantes.	83
Figura 50A. El 100% de los explantes estuvieron libres de bacterias y hongos.....	84
Figura 51A. Porcentaje de la coloración presentada en los explantes del tratamiento 4.....	84
Figura 52A. (A,B) El desarrollo de los explantes. (C) Coloración blanca del explante.....	85
Figura 53A. Estado fitosanitario en el tratamiento 5 de la primera fase de investigación.	86
Figura 54A. El 100% de los explantes presentó la coloración verde oscuro.	86
Figura 55A. (A,B,C) Estado de desarrollo de los explantes sembrados.....	87
Figura 56A. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en el tratamiento 6.	88
Figura 57A. Coloración que presentan los explantes en el tratamiento 6.	88
Figura 58A. (A,B) Se muestra el desarrollo del callo meristemático en dicho tratamiento.....	89
Figura 59A. Coloración que presentaron los explantes sembrados en dicho tratamiento.	90
Figura 60A. Estado fitosanitario de los explantes en el tratamiento 1 de la segunda fase.	90
Figura 61A. (A,B) Tamaño y color de algunos de los explantes en este tratamiento.	91
Figura 62A. Coloración presentada en los explantes. en el tratamiento 2 de la segunda fase.	92
Figura 63A. Estado fitosanitario en el tratamiento 2 de la segunda fase de investigación.....	92
Figura 64A. Desarrollo de los explantes sembrados en dicho medio de cultivo.....	93
Figura 65A. Coloración de los explantes sometidos al tratamiento 3 de la segunda fase.	94
Figura 66A. Estado fitosanitario de los explantes del tratamiento 3 segunda fase.....	94
Figura 67A. Desarrollo de los explantes en dicho tratamiento.....	95
Figura 68A. Coloración de los explantes del tratamiento 4 de la segunda fase.	96
Figura 69A. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en este tratamiento.....	96
Figura 70A. (A,B) embrioides generados en la parte derecha. (C) el desarrollo del explante.	97
Figura 71A. Coloración de explantes evaluados en Trat. 5 de la segunda fase.....	98
Figura 72A. Estado fitosanitario de los explantes sometidos al tratamiento 5 segunda fase.....	98
Figura 73A. (A,B) Desarrollo y coloración de los explantes en dicho tratamiento.	99
Figura 74A. Coloración de los explantes sometidos al tratamiento .6 de la segunda fase.	100
Figura 75A. Estado fitosanitario de los explantes en el tratamiento 6.....	100

Figura 76A. (A) Desarrollo de explantes a este tratamiento, (B) sembrando explantes.	101
Figura 77A. Coloración de los explantes en el tratamiento adicional.	101
Figura 78A. Estado fitosanitario de los explantes en este tratamiento.	102
Figura 79A. Tamaño de uno de los explantes sometidos a este tratamiento.	102
Figura 80A. Coloración de los explantes sembrados en el tratamiento No. 2 adicional.	103
Figura 81A. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en el tratamiento 2 de cinetina.	103
Figura 82A. Desarrollo del explante sometido a dicho tratamiento.	104
Figura 83A. Coloración de los explantes sometidos a este tratamiento.	104
Figura 84A. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en el tratamiento 3 adicional.	105
Figura 85A. Desarrollo del explante sometido al tratamiento 4 adicional.	105
Figura 86A. Coloración de los explantes sembrados en el tratamiento 4 adicional.	106
Figura 87A. Estado fitosanitario presentado en los explantes sembrados en el Trat. 4 adicional.	106
Figura 88A. Desarrollo del explante en el tratamiento 5 adicional.	107
Figura 89A. Coloración de los explantes sometidos al tratamiento 5 adicional.	108
Figura 90A. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en el tratamiento 5 adicional.	108
Figura 91A. Desarrollo obtenido en el explante, sometido al tratamiento 6 adicional.	109
Figura 92A. Coloración de los explantes sometidos al tratamiento. 6 adicional.	109
Figura 93. Estado fitosanitario de los explantes sometidos al tratamiento 6 adicional.	110
Figura 94A. Desarrollo del explante sometido al tratamiento 7 adicional.	110
Figura 95A. Coloración de los explantes sometidos al tratamiento 7 adicional.	111
Figura 96A. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en el medio 7 adicional.	111
Figura 97A. Se muestra el desarrollo de los explantes sometidos a este tratamiento.	112
Figura 98A. Coloración de los explantes sembrados el tratamiento 8 adicional.	113
Figura 99A. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en este tratamiento.	113

**INDUCCIÓN DE CALLOS MERISTEMÁTICOS Y REGENERACIÓN DE PLANTAS
IN VITRO EN EL CULTIVO DEL PIÑÓN (*Jatropha curcas* L.)**

**INDUCTION OF CORNS MERISTEMÁTICOS AND REGENERATION OF PLANTS
IN VITRO IN THE CULTURE OF THE *Jatropha curcas* L.**

RESUMEN

La presente investigación se destinó a dar a conocer las posibilidades que se tienen en la reproducción *in vitro* de la especie *Jatropha curcas* L., ya que esta planta que entre sus múltiples usos esta la generación de biodiesel, utilizando como materia prima el aceite proveniente de las semillas.

Es por ello que para lograr satisfacer la demanda de esta especie vegetal que poco a poco está desarrollándose a gran escala y asegurar el fácil suministro de este material de importancia económica, se generó la necesidad de establecer la técnica de multiplicación masiva, como lo es la técnica de cultivo de tejidos, ya que permite que en poco tiempo se logre la multiplicación a gran escala de diversas especies vegetales, con alta calidad fitosanitaria y genética, seleccionando para ello únicamente los mejores materiales para su clonación.

Esta investigación pretendió generar información básica que permitiera, lograr en futuras ocasiones, realizar proyectos de propagación *in vitro* de *Jatropha curcas* L. var. Huehuetenango, con un enfoque comercial, tomando en cuenta que los problemas anteriormente expuestos impiden la propagación masiva de esta especie oleaginosa, a partir de callos meristemáticos de esta especie vegetal.

Dichos problemas se pueden superar por medio de la experimentación de nuevas técnicas de propagación, una de estas metodologías es el cultivo de tejidos *in vitro*. Esta técnica, consiste en extraer una parte de tejido vivo y cultivarlo en un medio de composición química definida, mediante condiciones ambientales controladas, esto implica también que cada una de las plántulas que se producen, puedan crecer y ser fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta original de la que se derivan, así como generar un material con alta calidad fitosanitaria.

La primera fase de esta investigación consistió en la multiplicación de callos meristemáticos de dicha especie vegetal, los cuales ya estaban dentro del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de esta facultad, dichos explantes fueron generados a partir de frutos inmaduros de esta especie, recolectados en Cuilco, municipio de Huehuetenango por el Ing. Agr. Domingo Amador (Q.E.P.D.), tomando en cuenta los resultados obtenidos de la primera fase de la investigación y respaldados por los resultados obtenidos en el análisis estadísticos, los explantes que por sus condiciones tanto cualitativas (estado fitosanitario y coloración) como cuantitativas (peso en gramos, largo y ancho en centímetros) dieron mejores resultados fueron los sometidos al tratamiento No. 6 el cual contenía 3mg/l de benzilaminopurina combinado con 1 mg/l de ácido naftalenacético en un medio de sales MS al 100%.

Posteriormente estos callos fueron trasladados a un medio que diera como resultado la regeneración de plántulas a partir de estos explantes, realizándose varios ensayos para ello, en diferentes medios de cultivos lográndose únicamente que los callos se mantuvieran mejor preservados y siguieran desarrollándose en cuanto a sus dimensiones de peso en gramos largo y ancho en centímetros, así como un excelente estado fitosanitario.

Altas concentraciones de reguladores de crecimiento (auxinas) promueven la formación de callos meristemáticos, aunque esto no garantiza que se generen brotes posteriormente, en la segunda fase de esta investigación únicamente se logró la generación de embrioides, que son tejidos que no logran desarrollarse posteriormente en una plántula.

Se recomienda realizar una colecta y posterior germinación de semillas, de esta variedad Cuilco, Huehuetenango, con el objetivo de realizar un ensayo de regeneración de plántulas a partir de callos meristemáticos generados de las secciones foliares o de raíz de dicha especie vegetal, ya que se han tenido respuesta positivas en otros genotipos así también sembrar embriones, lo cual aumentaría las posibilidades que se diera un resultado positivo en cuanto a regeneración in vitro de esta especie en particular.

1. Introducción

El género *Jatropha*, pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, este género tiene más de 3,500 especies, la planta es nativa de la mayor parte de América Latina, el sur oeste de Asia, India y África, su nombre se deriva de: *iatros* que significa médico y *trophè* que significa alimento.

Jatropha curcas L., es una planta perenne, cuyo ciclo productivo se extiende de 45-50 años, puede encontrarse en la mayoría de climas, desde los muy cálidos hasta lugares muy fríos, donde la producción es baja, es resistente a heladas no muy severas, en cuanto a su propagación, ésta se puede propagar por semilla, estaca e *in vitro*.

La presente investigación se destinó a dar a conocer las posibilidades que se tiene en la reproducción *in vitro* de la especie *Jatropha curcas* L., ya que esta planta entre sus múltiples usos esta la generación de biodiesel, utilizando como materia prima el aceite proveniente de las semillas.

Es por ello que para lograr satisfacer la demanda de esta especie vegetal que poco a poco está desarrollándose a gran escala y asegurar el fácil suministro de este material de importancia económica, se generó la necesidad de establecer la técnica de multiplicación masiva, como lo es la técnica de cultivo de tejidos. Ello permite que en poco tiempo se logre la multiplicación a gran escala de diversas especies vegetales, con alta calidad fitosanitaria y genética, seleccionando para ello únicamente los mejores materiales para su clonación.

En base a las características propias de la especie y la necesidad que se tiene de contar con plántulas que conserven su identidad genética y un buen estado fitosanitario, se procedió a evaluar la respuesta de *Jatropha curcas* L. var. Huehuetenango, por medio de la técnica de cultivo de tejidos. Para ello se utilizaron diferentes combinaciones de ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP), para la multiplicación de callos meristématicos en un medio de sales de Murashine y Skoog al 100%. Posteriormente se seleccionaron los tratamientos que presentaron mejores resultados y estos fueron utilizados en la fase de regeneración de plántulas de esta especie, se combinaron en medios de sales de Murashine y Skoog a una concentración del 100% y 50% respectivamente. En la segunda fase de la investigación se generaron únicamente posibles brotes, los cuales no lograron desarrollarse.

Al no tener resultados positivos con dichos tratamientos se procedió a evaluar 8 tratamientos más, 7 de ellos con medio MS a 50% y 100% combinado con giberelinas y cinetina a diversas concentraciones sin resultados favorables y por último se evaluó un tratamiento con dosis más altas de bencilaminopurina y de ácido naftalenacético, con estos tratamientos únicamente se logro tener desarrollo del callo en cuanto a sus dimensiones y peso sin que en ninguno de los casos se lograra contar con brotes bien diferenciados. Es por ello que recomienda que se utilicen explantes que no excedan el tiempo de 6 meses sembrados en el medio de cultivo, así también que este no haya sido cambiado de medio más de 5 veces, debido a que esto muchas veces disminuye las probabilidades a una respuesta positiva de los mismos y por último se recomienda realizar más experimentos tomando en cuenta diversas combinaciones de ácido giberélico y cinética, para la preservación de explantes. Por lo tanto para esta especie inducción de callos meristématicos y regeneración de plántulas *in vitro* por medio esta técnica.

2. Definición del problema

Al hablar en la actualidad de la especie *Jatropha Curcas* L. ésta se relaciona con el tema de biodiesel, debido a que es la materia prima para la generación de biocombustible. En países desarrollados como China e India y una parte del continente europeo, se han estado realizando proyectos encaminados a lograr sustituir de manera gradual el uso de los derivados del petróleo como es el diesel y la gasolina.

Esta especie está limitada a la propagación vegetativa natural y suele ser propagada por semillas y por estacas, dando lugar a una alta variabilidad genética en términos de crecimiento, biomasa, rendimiento de semilla y contenido de aceite. Otro problema identificado es la baja viabilidad y la naturaleza recalcitrante de las semillas oleaginosas limitando así también la reproducción de la semilla e impidiendo a su vez su producción masiva.

La poca investigación generada a nivel de cultivo de tejidos, hace que la multiplicación de dicha especie vegetal esté limitada a la propagación vegetativa lo que ocasiona que los problemas anteriormente descritos, hayan aumentado con las siembras a gran escala que se están desarrollando a nivel internacional, lo que ocasiona pérdidas económicas al no poder generar una adecuada producción de aceite por temporada.

En nuestro país actualmente se está comenzando a trabajar con esta especie vegetal, por medio de la propagación a través de la semilla, en lugares como Camotán, Chiquimula, pero uno de los problemas identificados es la presencia de manchas en las hojas y escarabajos, los cuales hacen necesaria la aplicación periódica de insecticidas y fungicidas, aumentando así los costos de producción de dicho cultivo. Es por ello que al utilizar este método de propagación no se puede garantizar la producción exacta de aceite, con la que se contará al finalizar la cosecha.

3. Justificación de la investigación

En nuestro país, según el estudio realizado por el CONCYT, denominado “**Caracterización Molecular de Variedades de *Jatropha curcas* L. en Guatemala con Fines de Mejoramiento**”, se determinó que una de las variedades que más contenido de aceite presentaba en sus semillas era la variedad Huehuetenango, es por ello que se hizo necesario, realizar un experimento tomando en cuenta esta cualidad, además de ser una planta endémica que se hace necesario explotar y observar el nivel de respuesta hacia otras técnicas de propagación en cuanto a rapidez y crecimiento. (Azurdía C., R. Asturias, E. Barillas & L. Montes. 2008)

Esta investigación pretende generar información básica que permita, lograr en futuras ocasiones, realizar proyectos de propagación *in vitro* de *Jatropha curcas* L. var. Huehuetenango, con un enfoque comercial, tomando en cuenta que los problemas anteriormente expuestos impiden la propagación masiva de esta especie oleaginosa, a partir de callos meristemáticos de esta especie vegetal.

Dichos problemas se pueden superar por medio de la experimentación de nuevas técnicas de propagación, una de estas metodologías es el cultivo de tejidos *in vitro*. Esta técnica, consiste en extraer una parte de tejido vivo y cultivarlo en un medio de composición química definida, mediante condiciones ambientales controladas, esto implica también que cada una de las plántulas que se producen, puedan crecer y ser fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta original de la que se derivan, así como generar un material con alta calidad fitosanitaria.

4. Marco Teórico

4.1. Marco Conceptual

4.1.1. Descripción botánica de *Jatropha curcas* L.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Jatropha curcas* L.

REINO	Plantae
SUB REINO	Trancheobionta
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
SUB CLASE	Rosidae
ORDEN	Euphorbiales
FAMILIA	Euphorbiaceae
GENERO	Jatropha
ESPECIE	<i>curcas</i> L.
NOMBRES COMUNES:	Coquito, Capate, Tempate, Piñón, Piñoncito, Piñol, Piñón Botija, Higos del duende, Barbasco, Piñones purgativos, Higo de infierno, Purga de fraile, Tua tua, nuez del physic, pinhao manso.

Fuente: Manual para el cultivo de Piñón en Honduras.

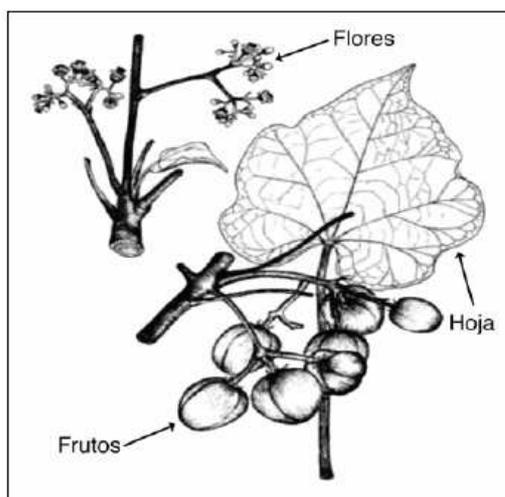


Figura 1. Frutos, hojas y flores de *Jatropha curcas*

4.1.2. Origen

Es una oleaginosa de porte arbustivo, con más de 3500 especies agrupadas en 210 géneros. Es originaria de México y Centroamérica, pero crece en la mayoría de los países tropicales. Se le cultiva en América Central, Sudamérica, Sureste de Asia, India y África. La palabra *Jatropha* proviene del griego *iatros* que significa médico y *trophè* alimento (Alfonso, J. 2008).

4.1.3. Morfología

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

4.1.4. Tallo

No existe uniformidad en el crecimiento de los tallos. El tronco o fuste es dividido desde la base, en ramas largas, con numerosas cicatrices producidas por la caída de las hojas en la estación seca, las cuales surgen luego de las primeras lluvias (Alfonso, J. 2008).

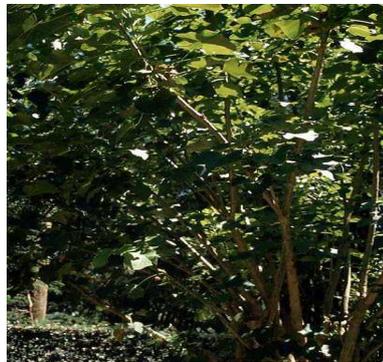


Figura 2. Árbol de *Jatropha curcas* L.

4.1.5. Raíces

La planta de piñón posee raíces cortas y poco ramificadas, normalmente cuando las plántulas proceden de semilla se forman 5 raíces, 1 central y 4 periféricas (Alfonso, J. 2008).



Figura 3. Raíz de *Jatropha curcas* L.

4.1.6. Hojas

Las hojas del piñón son verdes, amplias y brillantes, largas y alternas, en forma de palmas pecioladas, la mayoría de 7-16 cm. de largo y de alrededor del mismo ancho, con nervaduras blanquecinas y salientes en el envés. Se forman con 5-7 lóbulos acuminados, pocos profundos y grandes, con pecíolos largos de 10-15 cms. El piñón es un árbol de hojas caducas (caducifolio) (Alfonso, J. 2008).



Figura 4. Hoja de *Jatropha curcas* L.

4.1.7. Flores

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

Dos variedades de *Jatropha* fueron plantadas en Honduras en el año 2006, tanto la variedad India Salvadoreña como la variedad Cabo Verde, presentaron floración tres meses después del trasplante y 90 días después estaban listas para cosecharse. Al siguiente año y los posteriores durante el verano, la planta pierde su follaje y solamente da flor estimulada por la humedad. Las plantaciones que no tienen riego solamente producen 1 vez al año (Alfonso, J. 2008).



Figura 5. Flores de *Jatropha curcas* L.

4.1.8. Frutos

Son cápsulas drupáceas y ovoides con un diámetro de 1.5-3 cm. Al inicio son carnosas, pero dehiscentes cuando se secan. Para el desarrollo del fruto se necesitan 90 días desde la floración hasta que madura la fruta (Alfonso, J. 2008).

El fruto está dividido en 3 partes con una semilla en cada cavidad, formado por un pericarpio o cáscara dura y leñosa, indehiscente (que no se abre para que salga la semilla), hasta llegada la madurez, inicialmente es de color verde, pasando a amarillo, luego a café y por fin a negro, cuando alcanza el estado de maduración (Alfonso, J. 2008).



Figura 6. Etapas de desarrollo del fruto de *Jatropha curcas* L.

4.1.9. Semilla

Es relativamente grande, cuando está seca mide de 1.5 a 2 cm. De largo y de 1 – 1.3 cm. de diámetro. Debajo de la envoltura de la semilla o tegumento, existe una película blanca cubriendo la almendra; el albumen abundante, blanco, oleaginoso, conteniendo el embrión provisto de dos largos cotiledones achatados. La semilla de piñón, pesa entre 0.551 a 0.797 gramos. Puede tener, dependiendo de la variedad y de los tratamientos culturales, en proporción de 33.7% a 45% de cáscara y de 55% a 66% de almendra (Alfonso, J. 2008).

En esas semillas, según la literatura, se concentran aproximadamente de 7.2% de agua, 37.5% de aceite y 55.3% de azúcar, almidón, albuminoides y materiales minerales, siendo 4.8% cenizas y 4.2% nitrógeno. Posee un alto contenido de proteína (25%-30%) y grasa (55% - 60%) (Alfonso, J. 2008).



Figura 7. Semilla de *Jatropha curcas* L.

4.1.10. Ciclo vegetativo

Es una planta perenne, cuyo ciclo productivo se extiende de 45 a 50 años. Es de crecimiento rápido y con una altura normal de 3 a 5 mts. En condiciones especiales llega hasta 8 mts. El grosor del tronco es de 20 cm. con crecimiento desde la base en distintas ramas (Alfonso, J. 2008).

4.1.11. Propagación de *Jatropha curcas* L.

La *Jatropha curcas* L. se multiplica por distintos métodos como lo son:

- ✚ a - vía generativa (por semillas)
- ✚ b - por vía vegetativa (estaca)
- ✚ c - in-vitro (reproducción de porta injertos por micro propagación)

Los países productores sólo usan 2 métodos de propagación, por semilla y por estaca. En estos últimos años se está estudiando el comportamiento y desarrollo del cultivo in vitro en distintos países (Torres, C. 2008).

a) Propagación por medio de "vía generativa por semillas": La semilla o pepita es la estructura mediante la cual se realiza la propagación de las plantas, que por ello se llaman espermatófitas plantas con semilla (Torres, C. 2008).

Es importante la selección de semillas de árboles matrices previamente seleccionados por sus cualidades (de optima productividad y libre de plagas y enfermedades). Con el fin de no dañar las semillas, se sugiere en origen, la separación manual de las mismas de la capsula donde se encuentran (Torres, C.2008).

Debe existir un grado del 100% de pureza, libre de otros materiales como: semillas rotas, ramitas, hojas, insectos, semillas de otras especies y cualquier otro elemento extraño. Para que la germinación pueda ocurrir son necesarios algunos factores externos, como un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aeróbica y una temperatura adecuada para los distintos procesos metabólicos (Torres, C. 2008).

4.1.12. Hábitat

La *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 hendiduras de piedras (Muñoz, M., Jimenez E. 2007).

Climáticamente, la *Jatropha curcas* L. se encuentra en los trópicos y subtropicos. Resiste normalmente el calor aunque también soporta bajas temperaturas y puede resistir hasta una escarcha ligera. Su requerimiento de agua es sumamente bajo y puede soportar períodos largos de sequedad. Habita en campos abiertos, como en parcelas nuevas. Es susceptible a inundaciones (M. Muñoz, E. Jiménez, 2007).

Además la *Jatropha* puede vivir en sitios con alto grado de sequía, y es repelente natural de parásitos, viviendo hasta 40 o más años cada planta (Torres, C., 2007).

Ecológicamente se adapta al trópico muy seco con precipitaciones de 250 mm hasta subtropico húmedo con precipitaciones de más de 1,500 mm. Las plantas de piñón pueden encontrarse entre los 5 y los 1500 msnm. El mejor desarrollo es alcanzado en terrenos ubicados entre los 600 a 800 msnm. La humedad relativa por las noches debe ser preferiblemente baja (Alfonso, J. 2008).

4.1.13. Distribución geográfica

La distribución de la especie se localiza en la República Mexicana en los estados de Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Morelos, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, Sonora, Sinaloa, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Herrera, J. 2004).

Se cree que es nativa de América del Sur y África, luego se extendió a otros continentes del mundo por los portugueses colonos. Los árabes han estado utilizando esta planta con fines medicinales. Hoy en día se encuentra en casi todas las zonas tropicales y sub-regiones tropicales del mundo y conocido por casi 200 nombres diferentes, lo que indica su importancia y diversas posibilidades de su uso (Mejía. J. 2004).

En la India *Jatropha curcas* L. se encuentra en casi todos los estados y, en general, crecido como un cerco vivo crece en condición semi-salvajes en las proximidades de las aldeas y para la protección de los campos agrícolas contra los daños por el ganado y cabras (Mejía. J. 2004).

El secreto que hace a la *Jatropha* resistente a todo es su veneno (Luna, M. 2006). Aquí en nuestro país se puede ver distribuido en el oriente, en los municipios de Chiquimula y Zacapa, así como en el norte específicamente en Baja Verapaz.

4.1.14. Variedades

La variedad más conocida es la denominada “Cabo Verde” desarrollada en el occidente del continente Africano en la isla de Cabo Verde. Entre las características de esta variedad están, que la planta es de porte medio a bajo, que produce muchos tallos y tiene cosecha desde el primer año (Alfonso, J. 2008).

En Honduras en el 2006 se comenzó con un proyecto de biocombustibles en el año 2006, la única variedad disponible era traída de la India, la cual era sembrada en El Salvador (Alfonso, J. 2008).

En nuestro país según el proyecto denominado “Caracterización Molecular de las Variedades de *Jatropha curcas* L. en Guatemala con Fines de Mejoramiento”, hay por lo menos 52 variedades diferentes de esta especie vegetal, de ellas la identificada con el número 51 proveniente de Cuilco, Huehuetenango, generó mejores resultados en cuanto a mejor producción en mejor tiempo de producción (Azurdia C., R. Asturias, E. Barillas & L. Montes. 2008).

4.1.15. Componentes químicos

El género *Jatropha* contiene: alcaloides, sapogeninas, taninos, esteroides, toxoalbúminas, compuestos cianogénicos. Además, contiene aceites fijos, ácidos grasos (palmítico, oleico, linoleico, esteárico) (Muñoz, M., Jimenez, E., 2007).

4.1.16. Planta tóxica

La planta es tan venenosa, que Becker cita que la misma, ni siquiera tiene que preocuparse de protegerse de los depredadores, debido a su fábrica de aceite natural (Becker, K. 2004).

Esta planta ha sido considerada tóxica pues se ha encontrado en la semilla la presencia de alcaloides conocidos como ésteres de forbol, que provocan el efecto purgante y algunos otros síntomas. Solamente en México, se han encontrado variedades no tóxicas, las cuales son consumidas después de tostar y en la preparación de platillos tradicionales por los pobladores de la región de Papantla en Veracruz, Pueblillo en Veracruz y Huitzilán en Puebla (Becker, K. 2004).

Los ácidos grasos mayoritarios en el aceite son el ácido oleico y linoleico con valores superiores al 40% cada uno. Los factores no nutritivos y/o tóxicos identificados en la harina desgrasada de *Jatropha curcas* L., fueron, los inhibidores de tripsina, lectinas, fitatos, saponinas y ésteres de forbol. Es importante resaltar que en las semillas y el aceite de las muestras de Castillo de Teayo, Pueblillo y Yautepec no presentaron a los ésteres de forbol, considerándose por ello como “no tóxicas” y sólo la semilla proveniente de Coatzacoalcos es tóxica (Becker, K. 2004).

4.1.17. Usos de la especie *Jatropha curcas* L.

Protección suelo

Gracias a ella, el suelo erosionado vuelve a ser fértil. "En África se comprobó que el viento y el agua, junto con partículas de la *Jatropha*, crean capas de preciados sedimentos de hasta 0,7 centímetros por año. Con el paso del tiempo, los suelos erosionados se convierten en aptos para el cultivo (Luna, M. 2006).

Extensiones de tierra hasta ahora inservibles podrían ser cultivadas, creando puestos de trabajo y beneficios a países con pocos recursos. Mientras, la *Jatropha* protege el suelo de la erosión y libra al cielo de parte de los gases contaminantes (Luna, M. 2006).

Para combatir la deficiencia de fósforo en su caso utiliza la simbiosis de la raíz con hongos (Micorriza). Las hojas arrojadas en los meses de invierno forman un mantillo alrededor de la planta base y la materia orgánica a partir de allí aumenta la población de lombrices en torno a la zona radicular de las plantas, un justo indicador de la mejora de la micro fauna y la fertilidad del suelo (Mejía. J. 2004).

El mantillo orgánico alrededor de la base de la planta formado por la hojarasca también reduce considerablemente la pérdida de agua debido a la evaporación superficial debido a ello es que esta planta es bien adaptados a condiciones áridas (Mejía. J. 2004).

Recuperación de sitios baldíos

Puede ser introducido con éxito en la desindustrialización, como un primer paso hacia su rehabilitación. Debido a la naturaleza resistente de esta especie y el hecho de que se puede propagar fácilmente por esquejes o rama de la siembra directa, se hace una elección ideal para el buen estado ecológico y la rehabilitación económica de los baldíos en la zona tropical y sub-regiones tropicales del mundo (Mejía. J. 2004).

En India se tiene alrededor de 75 millones de hectáreas de baldíos, en donde es necesario el restablecimiento de la vegetación. *Jatropha curcas* L. es un comodín cada vez más resistente de plantas adaptadas a las duras condiciones del suelo y el clima. Además, puede ser propagada a partir de semillas, así como cortes en sus ramas, esta especie es una de las más adecuadas para la forestación en sitios con mucho estrés y poco presupuesto económico (Mejía. J. 2004).

Reforestación agrícola

Es una especie de uso potencial en áreas deforestadas, constituyendo una excelente alternativa en suelos marginales, ociosos y agotados, con una vida útil de 30- 50 años (Alfonso, J. 2008).

En los trópicos se cultiva ampliamente como cercas vivas, puesto que ni las hojas, ni los tallos, ni los frutos son consumidos por el ganado. Crece sin necesidad de protección y puede usarse como seto para proteger los cultivos (Alfonso, J. 2008).

Ampliamente usada como sombra y ornato en parques y jardines. En México y Guatemala se ha usado durante largo tiempo como planta hospedera de un insecto que produce una laca muy apreciada, que se utiliza como barniz para pulir guitarras y otros artículos de madera (Alfonso, J. 2008).

En Madagascar la planta se usa como tutor para soporte de vainilla. En Cabo Verde y Bolivia se ha plantado en zonas áridas en altas densidades para control de la erosión del suelo (Alfonso, J. 2008).

Comestible

Las semillas son purgantes, pero tostadas pierden parcialmente esa propiedad y suelen comerlas en algunas regiones de México. Solamente en México, se han encontrado variedades con muy bajo contenido de toxinas, las cuales son consumidas después de tostar y en la preparación de platillos tradicionales por los pobladores de la región de Papantla en Veracruz, Othón P. Blanco en Querétaro (Alfonso, J. 2008).

La torta que resulta de la extracción de aceite, si proviene de variedades tóxicas solamente se puede usar para fabricar abonos, extraído los alcaloides o si la torta procede de semillas comestibles, la torta puede ser utilizada en alimentación animal (Alfonso, J. 2008).

Medicinal

Se aplica localmente para tratamiento de algodoncillo, fuego labial y mal de boca, se le atribuyen propiedades abortivas. Las hojas maceradas en aceite de resino se utilizan en medicina casera para apresurar la supuración de los granos infectados (Alfonso, J. 2008).

El jugo que emana del tronco (la savia) se emplea como hemostático y para contener hemorragias en heridas no graves, por su propiedad de coagular la sangre de inmediato. El látex tiene propiedades antibióticas contra algunas bacterias, además de efectos coagulantes y se aplica directamente en heridas y cortes como antiséptico, y para salpullidos, quemaduras e infecciones de la piel (Alfonso, J. 2008).

Industrial

También se usa para preparar barnices después de ser quemado con óxidos de hierro, o como un excelente sustituto para aceites industriales. En Europa se usa en el hilado de lana y manufacturas textiles. Se usa junto con cenizas de quemar plátano para hacer un duro jabón casero (Alfonso, J. 2008).

El jugo de la hoja tiñe las telas de un color negro indeleble. La corteza tiene un 37% de taninos que dan un colorante azul oscuro. El látex también tiene un 10% de taninos y se puede usar como tinta (Alfonso, J. 2008).

En la actualidad, *Jatropha curcas L.* es el petróleo importado para satisfacer la demanda de la industria cosmética. En China, un barniz que es preparado por el aceite hirviendo con óxido de hierro, en Inglaterra y el aceite se utiliza para hilar la lana. Los aldeanos utilizar el petróleo como una fuente luminosa como se quema sin humo que emite el petróleo es también un lubricante, aceite hidráulico y para la toma de vela como aceite de ricino (Mejía. J. 2004).

Las proteínas en la torta de aceite de *Jatropha* se podrían utilizar como materia prima para hacer plásticos y fibras sintéticas (Mejía. J. 2004).

Combustible

El aceite de la semilla es una fuente de energía renovable no convencional, de bajo costo y amigable con el ambiente, además de ser un sustituto para diesel, keroseno y otros combustibles. El aceite se usó en motores en África durante la segunda guerra mundial (Alfonso, J. 2008).

Quema sin producir humo y ha sido empleado para la iluminación de algunas calles cerca de Río de Janeiro. La cáscara del fruto y las semillas puede usarse como combustible. Las semillas secas, cubiertas de aceite de palma se usan como antorchas, que se mantienen encendidas incluso con fuerte viento (Alfonso, J. 2008).

El aceite de *Jatropha* es un medio a seguro, rentable y fuente renovable de energía no convencional y un prometedor sustituto para diesel, queroseno y otros aceites combustibles (Mejía. J. 2004).

El combustible está todavía en fase de desarrollo. Pero el carburante de aceite de *Jatropha* que hasta ahora se ha producido se ajusta a las cualidades que un combustible ha de tener para hacer funcionar a los motores de diesel modernos (Luna, M. 2006).

Doméstico

El aceite de las semillas se utiliza para iluminación y como lubricante y para hacer jabones y pinturas así como, tiene un muy alto valor de saponificación y se utiliza ampliamente en la India y otros países para hacer jabón (Mejía. J. 2004).

Captura de carbono

La captura de carbono en plantaciones de *Jatropha*, así como en otros tipos de plantaciones, ocurre únicamente durante el desarrollo de las plantas hasta llegar su estado de madurez (Alfonso, J. 2008).

Es en troncos y ramas donde el carbono queda almacenado. La cantidad de carbono (CO₂) que el árbol captura, consiste sólo en el pequeño incremento anual que se presenta en la madera del árbol multiplicado por la biomasa del árbol que contiene carbono (Alfonso, J. 2008).

Entre 40% y 50% de la biomasa de un árbol (madera: materia seca) es carbono. Es necesario conservar los árboles para evitar que el carbono (CO₂) contenido en ellos se emita a la atmósfera (Alfonso, J. 2008).

Cercas vivas

Jatropha curcas L. puede mantenerse como una cobertura y se cultiva como cercas alrededor de los campos agrícolas. Se puede cortar a cualquier altura deseada y como refugios de los cultivos agrícolas vientos o cortinas rompe vientos. Se utiliza como plantas de cobertura para las necesidades de muros (Mejía. J. 2004).

Como leña

Además, el cultivo de *Jatropha*, como la agro-silvicultura una empresa puede generar millones de puestos de trabajo en zonas rurales de la India, la práctica de la agricultura de secano de subsistencia (Mejía. J. 2004).

Alta densidad de las plantaciones de la especie puede ser una manera ideal de secuestrar al máximo la energía solar durante un breve período de gestación como *Jatropha curcas* L. es de crecimiento rápido y pueden ser cultivadas con éxito en todos los tipos de estéril e improductivo baldíos. También que no compiten con los cultivos alimentarios de la superficie terrestre, por el contrario, los ricos abonos orgánicos obtenidos a partir de *Jatropha* enriquecer los suelos para aumentar la producción de alimentos (Mejía. J. 2004).

Como abono orgánico

El uso de aceite de *Jatropha curcas* L. como fertilizante orgánico puede reducir la dependencia de los fertilizantes químicos y también bajo tierra la contaminación del agua que le hace no apto para beber (Mejía. J. 2004).

Biofertilizantes

Las ramas y hojas de *Jatropha curcas* L. se utilizan como abono verde de los árboles de coco. Torta de aceite de *Jatropha* puede sustituir los fertilizantes químicos si se hacen disponibles en la cantidad necesaria (Mejía. J. 2004).

Jatropha curcas puede desempeñar un papel importante en el cumplimiento de nuestras necesidades de fertilizantes y aumentar la producción agrícola sin el uso de productos químicos contaminantes. Torta de aceite de *Jatropha* como un fertilizante orgánico es superior al estiércol de vaca-estiércol y está en gran demanda por los agricultores (Mejía. J. 2004).

4.1.18. Producción

La planta empieza a producir de manera rentable desde el primer año, su rendimiento se incrementa anualmente durante los primeros 5 años y a partir de ahí se estabiliza. El rendimiento por hectárea es de 5 toneladas de semilla, de las cuales 2 ton. son de aceite y 1 ton. es de pasta residual, rica en proteína (60%) (Herrera, J. 2004).

El objetivo del Biodiesel ha hecho que en India se hayan plantado varios millones de hectáreas, en Indonesia, en un proyecto de la petrolera BP se han plantado 100.000 hectáreas, en América Central y Brasil varias plantaciones están dando su fruto y ahora en Argentina se ha comenzado a desarrollar este plantío alternativo para obtención de "combustibles verdes" (Torres, C., 2008)

Una buena razón para el desarrollo de *Jatropha curcas* L. como fuente de energía es que no compiten con los cultivos alimentarios de la tierra y los recursos hídricos debido a su notable capacidad de adaptación a los marginales y las tierras degradadas y la facilidad de cultivo. La adaptación de *Jatropha* a condiciones áridas, es una importante planta comercial, capaz de crecer la producción de aceite de semillas de alto valor energético (Mejía. J. 2004).

4.1.19. Técnica de cultivos vegetales

El término cultivo *in vitro* es un término muy genérico que se refiere más bien a la metodología usada que al propio objetivo de ese método. En sentido estricto, *in vitro* quiere decir "dentro de vidrio", es decir, el cultivo de plantas o de alguna de sus partes (pero también de células y tejidos animales) dentro de recipientes de vidrio en condiciones de ambiente controlado (Medina, M. 2005).

Existen otros términos cuyo significado se solapa parcialmente con el significado de cultivo *in vitro*:

- Cultivo de tejidos vegetales: se refiere al cultivo *in vitro* de partes de la planta (tejidos o frecuentemente órganos).
- Micropropagación: se usa para referirse a la utilización de las técnicas de cultivo *in vitro* aplicadas a la propagación vegetativa de plantas.

4.1.20. Aspectos químicos

4.1.20.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo es la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua. Usualmente incluye sales inorgánicas, carbohidratos y vitaminas y aminoácidos. A menudo se denomina Medio Basal y puede ser suplantado con algún regulador de crecimiento y ocasionalmente con otras sustancias varias (Medina, M. 2005).

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 (Medina, M. 2005).

Cuadro 2. Componentes principales de los medios de cultivo.

Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos vegetales		
Agua		
Sustancias orgánicas	Macro	Micro
	elementos	
Azúcares	N	Fe
Aminoácidos	P	Zn
Auxinas	K	B
Citoquininas	Ca	Mn
Giberelinas	Mg	Cu
Acido abscísico	S	Ni
		Co
		Al
		Mo
		I
Mezclas de sustancias poco definidas:		
Extracto	de	levadura
Leche	de	coco
Extractos		vegetales
Hidrolizados	de	caseína
Peptona y triptona		

Fuente: Tomada de Medina, M. 2005.

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. Debido a estas necesidades específicas se han desarrollado muchas formulaciones diferentes para los medios de cultivo (Medina, M. 2005).

El medio MS, o de Murashige y Skoog (1962), es muy usado, particularmente si el objetivo es regenerar plantas; existen numerosas variaciones comerciales de este medio. El medio B5 o de Gamborg et al. (1968), o sus varios derivados, ha sido de un gran valor en el cultivo de células y protoplastos, y también es utilizado eficazmente en regeneración de plantas. La diferencia principal entre los medios MS y B5 es la menor concentración de nitratos en B5. El medio WPM (1980) de baja concentración de sales está especialmente indicado para especies leñosas (Medina, M. 2005).

4.1.20.2. Explante

Con el término explanto se describe un fragmento cortado de un tejido o de un órgano utilizado para iniciar un cultivo. Como explanto 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 (Medina, M. 2005).

4.1.20.3. pH

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:

- ▣ 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 explanto.
- ▣ El valor del pH del medio puede afectar al pH del citoplasma y como consecuencia a la actividad de muchos 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. (Medina, M. 2005).

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, de forma que habitualmente se irá acidificando progresivamente como resultado de la absorción diferencial de algunos componentes del medio de cultivo, así como de la excreción de exudados por parte del explanto (Medina, M. 2005).

El control del pH inicial del medio y de su dinámica durante el cultivo tiene una gran importancia en el desarrollo de cualquier proyecto de cultivo *in vitro*. A pesar de su importancia, en muchos experimentos este control se limita a fijar su valor inicial sin reparar en los posibles efectos de su dinámica (Medina, M. 2005).

4.1.21. Ambiente físico

4.1.21.1. La temperatura

La temperatura a la que está expuesto el explanto 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 (Medina, M. 2005).

Este intervalo puede variar en función del genotipo, del órgano del que se ha obtenido el explanto, de la época del año, de la edad de la planta madre, del fotoperíodo, 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 fotoperíodo) (Medina, M. 2005).

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 (Medina, M. 2005).

El control de la temperatura no es solamente importante porque pueda 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 dormición de algunas leñosas y la conservación prolongada de determinados cultivos *in vitro*; mientras que una temperatura constante de 20°C induce la formación de raíces en la mayoría de coníferas (Medina, M. 2005).

4.1.21.2. 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 fotoperíodo en la que se halle el cultivo (Medina, M. 2005).

4.1.21.3. La luz

La luz es uno de los factores principales que determinan el desarrollo de los organismos autótrofos, en ello radica la importancia de controlar el factor luz en los cultivos *in vitro*. Los aspectos relacionados con la luz que son importantes en los cultivos *in vitro* son:

A. La cantidad de luz: La irradiación:

Se asume que las necesidades de luz de los cultivos *in vitro* son inferiores a las de la planta *in vivo*, dado que el medio de cultivo contiene cantidades importantes de sacarosa, los cultivos *in vitro* se comportan sólo parcialmente de forma autotrófica. Además, una irradiación excesiva produciría un aumento notable de la temperatura dentro del recipiente de cultivo debido al efecto invernadero (Medina, M. 2005).

B. Alternancia de los ciclos de luz:

El fotoperíodo: Algunos fenómenos propios del desarrollo de las plantas (germinación, floración, tuberización,...) pueden ser activados por el número de horas diarias de luz que recibe la planta. De forma análoga, el número de horas de luz que recibe el explanto cultivado *in vitro* puede afectar a su desarrollo. En general, el mejor fotoperíodo *in vivo* será también el mejor fotoperíodo *in vitro* (Medina, M. 2005).

4.1.22. Origen

El cultivo de tejido vegetal fue desarrollado a partir de la investigación de botánicos y fisiólogos vegetales desde 1950. Actualmente se ha convertido en una herramienta internacional importante en la selección, cruzamiento, control de enfermedades y producción en masa de cultivos de cosecha e involucra diferentes plantas en agricultura, horticultura, forestales y frutales (Morgan, W. 2006).

Desde estas dos fuentes provino la tecnología por la cual las plantas u órganos de plantas se pueden multiplicar en gran número, o su crecimiento individual controlado, haciendo crecer pequeños trozos de tejido vegetal sobre una receta precisa de nutrientes en un recipiente estéril (Morgan, W. 2006).

A su escala mayor, como ocurre en la industria de la micropropagación, el cultivo de tejido se ha convertido en un proceso de manufactura que puede producir material vegetal libre o saneado de patógenos, de alta calidad, que puede atravesar fronteras internacionales (Morgan, W. 2006).

Sobre un enfoque más técnico, esta metodología ha provisto a la industria de cruzamiento, de las metodologías apropiadas para generar, almacenar o manipular germoplasma de valor o genéticamente inestable sobre su camino a través del proceso de cruzamiento, donde el vehículo eventual para la propagación será la semilla (Morgan, W. 2006).

La técnica consiste en tomar una sección de tejido vegetal (explanto) y desinfectarlo superficialmente de todo microorganismo, mediante la inmersión total en una solución de hipoclorito de calcio o sodio y colocarlas en un recipiente de vidrio que contiene un medio nutritivo gelificado estéril. Este medio de cultivo contiene: vitaminas, aminoácidos y azúcares, complementando con fito-hormonas necesarias para dirigir la formación de las plántulas (Montes, M. 2007).

4.1.23. Tipos de cultivos vegetales *in vitro*

El siguiente esquema resume los principales tipos de cultivo *in vitro*.

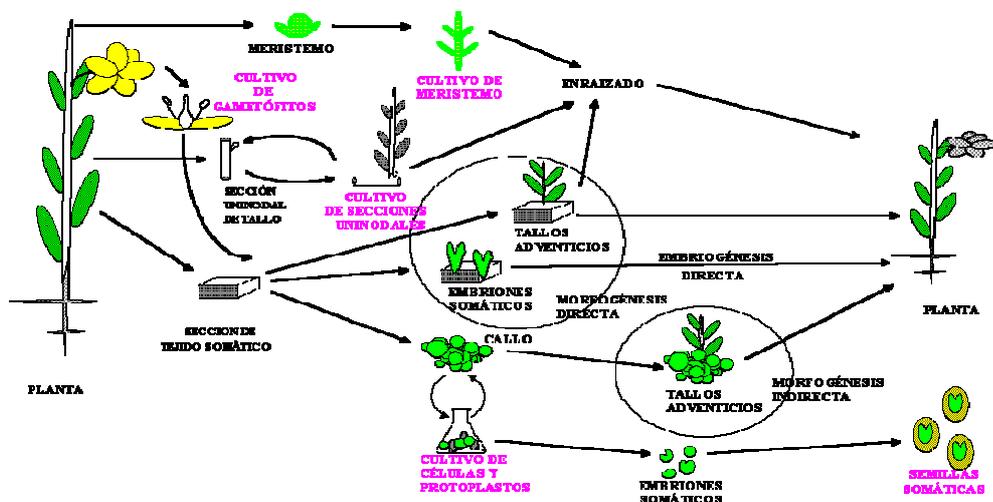


Figura 8. Tipos de cultivos *in vitro*.

El material vegetal con el que se inicia un cultivo *in vitro* puede ser cualquier célula, tejido u órgano de la planta. Se puede partir de fragmentos de tallo, raíz, hoja, meristemos, embriones, es decir de tejidos somáticos, pero también se puede iniciar a partir de células o tejidos no somáticos: anteras, polen, microesporas, óvulos, etc. Según sea el explanto utilizado se hablará de cultivo de secciones nodales, cultivo de hoja, de meristemo, de polen, de embriones, etc, (Medina, M. 2005).

En otros casos se puede pretender la regeneración de la planta completa (morfogénesis) mediante la formación de raíces (rizogénesis) y/o de tallos. La morfogénesis se produce a partir del explanto inicial mediante la formación de raíces y/o tallos en posición normal o en posición no normal (adventicias/os). Si la morfogénesis se produce después de la formación de un callo, entonces se habla de morfogénesis indirecta, mientras que si se produce directamente del explanto sin que este pase por una fase de callo, entonces se habla de morfogénesis directa (Medina, M. 2005).

4.1.24. Propagación de material vegetal por cultivo de tejidos

En los años 60s se reconoció lo que el cultivo de tejido podía ofrecer a la horticultura y la agricultura y esto proveyó un estímulo para la evolución de la tecnología. Particularmente los beneficios aparecían en aquellas especies de cosecha donde existían algunos problemas de propagación. Por ejemplo, donde la producción de semillas es limitada, o las semillas no originan plantas veraces al tipo, o la propagación por medio de bulbos, tubérculos o esquejes es muy baja (Morgan, W. 2006).

Además, donde hay una necesidad por un reemplazo rápido o anual con material sano nuevo en una escala confiable de tiempo. Hoy día, hay muchas especies donde el cultivo de tejidos se ha vuelto un método regular y establecido de propagación, por ej. para la papa, dátiles, banana, un amplio rango de cultivos para flor cortada y numerosas plantas ornamentales de maceta (Morgan, W. 2006).

El mayor beneficio del cultivo de tejido en la propagación de plantas es el dramático acortamiento del tiempo de producción. Por ejemplo, la papa se puede multiplicar convencionalmente por medio de tubérculos crecidos a campo en aproximadamente un factor de 10 por año, pero en cultivo de tejido puede hacerlo por un factor de 5 por mes, lo cual equivale a 1/4 de billón por año (Morgan, W. 2006).

Si estos embriones se trasladan a otros medios, desde los callos y que estos medios que están diseñados para permitir que el embrión germine, entonces desarrollará una estructura de planta completa, esto es una plántula, un talluelo enraizado que no difiere mayormente de la obtenida desde semilla. Como las plantas obtenidas por caulogénesis axilar o adventicia, estas plántulas también pueden aclimatarse para transformarse en una planta viable con capacidad de fotosíntesis (Morgan, W. 2006).

4.1.25. Reguladores de crecimiento

4.1.25.1. Hormona

Fitorregulador que tiene acción en un lugar de la planta y que por si solo puede determinar fenómenos de crecimiento y desarrollo. Son compuestos orgánicos no nutrientes que actúan a muy bajas concentraciones (mg/l) y pueden acelerar, retardar o inhibir determinado proceso fisiológico (Orozco, E. 2009).

Las hormonas median la comunicación intercelular en las plantas, para ello las células poseen receptores, que son proteínas específicas. El complejo hormona-receptor es la forma activa de una hormona (Criba, Edu, 2004).

Las hormonas denominan fitohormonas y se producen en las células y no forman glándulas. Controlan el crecimiento y desarrollo del vegetal. Existen hormonas que: activan los procesos de crecimiento, floración, yemas apicales, crecimiento celular en los meristemos, formación de raíces en los esquejes (auxinas); que hacen germinar las semillas e inducen a la formación de flores y frutos (giberelinas); que retardan la caída de la hoja y el envejecimiento e inducen a la diferenciación celular y formación de nuevos tejidos (citoquininas); que provocan el cierre de los estomas cuando hay sequía o inhibe el crecimiento del vegetal en momentos de crisis, produciendo una especie de letargo (ácido abscísico) y, por último que facilitan la maduración de los frutos y la degradación de clorofila, haciendo caer las hojas (etileno) (Orozco, E. 2009).

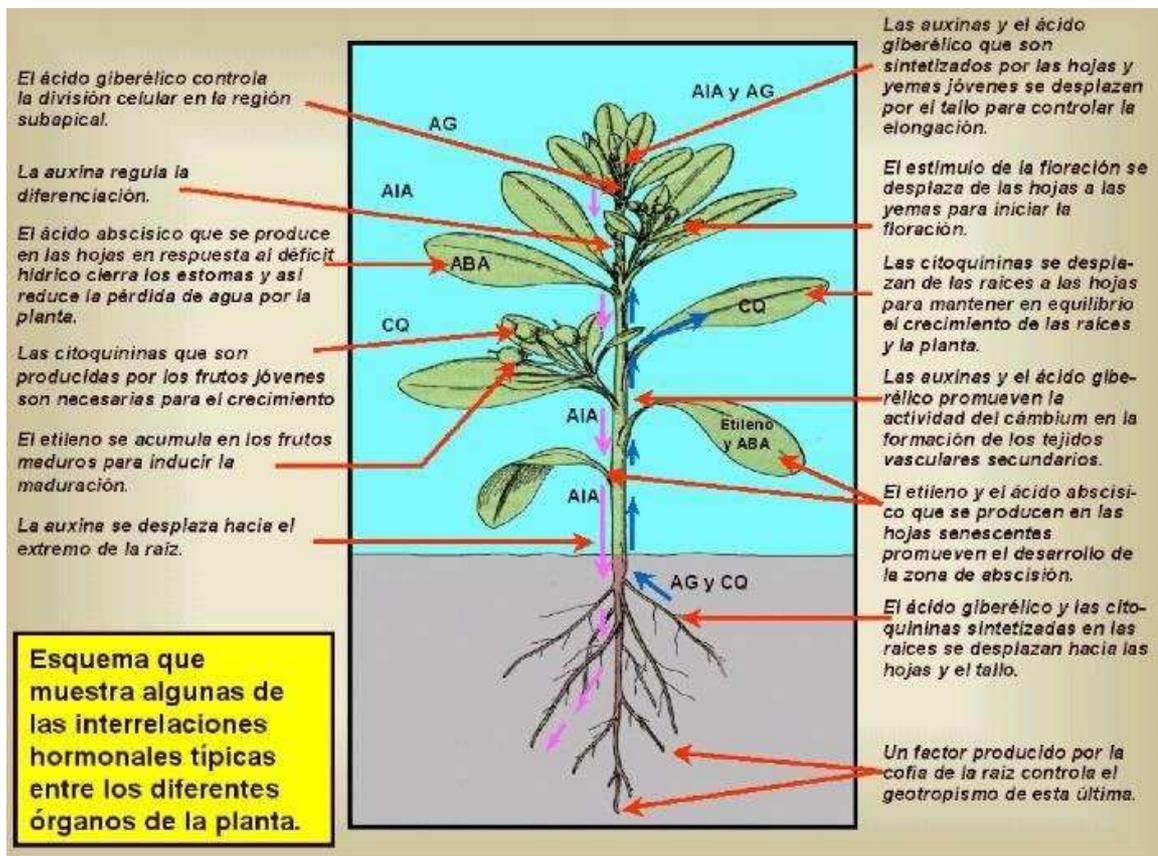


Figura 9. Relación de las hormonas con diferentes órganos de la planta.

4.1.25.2. Auxinas:

Fitohormonas que favorecen la elongación de la célula a través de procesos de relajación de la pared (Orozco, E. 2009).

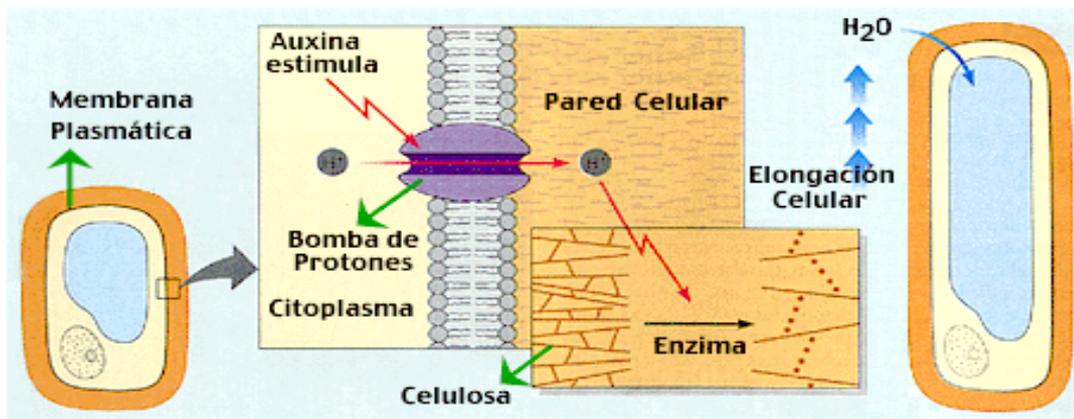


Figura 10. Forma de actuar de las auxinas dentro de la planta.

4.1.25.3. Efectos fisiológicos de las auxinas en medio de cultivo

El desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos fue posible gracias a la acción de las auxinas sobre la división celular. Así, un trozo de zanahoria colocado en un medio de cultivo sin auxinas sufre unas cuantas divisiones y se muere, pero si se añade AIA a una concentración de $10^{-6}M$ se dividen las células de forma rápida y puede durar muchos años. En otros casos, es necesaria la presencia de otras hormonas para garantizar una división celular continuada. Sin embargo, conviene llamar aquí la atención sobre los cultivos de tejidos adaptados; son aquellos cultivos que, tras varias transferencias en un medio con auxinas, se hacen frágiles y semitransparentes a la vez que son capaces de sintetizar su propia auxina (Salisbury, F., Ross, C. 1994).

Efecto de la auxina sobre las células vegetales es importante para controlar los tropismos, estos se materializan en inclinaciones, giros o curvaturas del tallo. Se cree que la luz destruye la auxina del tallo y provoca así un desequilibrio, de manera que la concentración de la hormona es mayor en la cara no iluminada. Al recibir más auxina, las células de este lado más oscuro se alargan más que las del soleado y hacen que la planta se incline hacia la luz (Castilla, Y. 2006).

4.1.25.4. Tipos de auxinas:

Acido indolacético (AIA), Acido Naftilacético (ANA) Acido Indolbutírico (AIB) 2,4-D, 2,4,5-T Las auxinas están implicadas en el control de diversas funciones en las plantas, como por ejemplo:

Dominancia apical

Si la concentración de auxina excede ciertos niveles, el desarrollo de las yemas puede quedar inhibido. Si se elimina el ápice de una planta, se elimina así la fuente productora de auxinas, y desaparece la dominancia apical, la cual puede ser reimpuesta por aplicación exógena de la hormona (Orozco, E. 2009).

En este fenómeno la auxina producida por la yema terminal o apical difunde hacia la base del tallo promoviendo el alargamiento de las células de éste e inhibiendo, como dijimos, el desarrollo de las yemas axilares de las hojas (que permanecen en estado de latencia) (Orozco, E. 2009).

Efectos de la auxina sobre la dominancia apical. En A, la yema inferior no es inhibida por estar alejada de la yema apical. En B, eliminando la yema apical desarrollan las axilares. En C, eliminando la yema apical pero suministrando auxina exógena, las yemas axilares no desarrollan, al igual que en A.

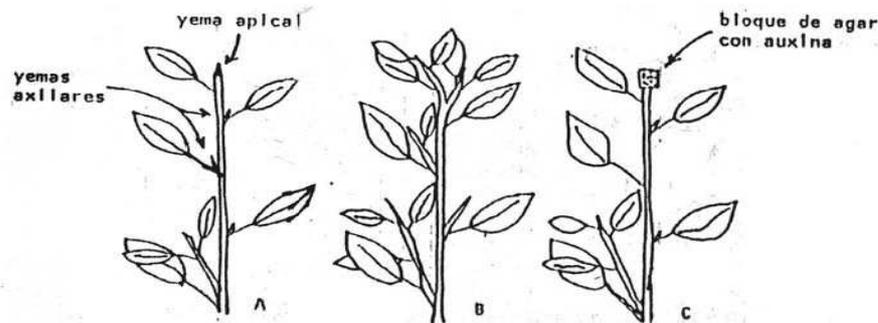


Figura 11. Efectos de la auxina en la dominancia apical.

Enraizamiento

El transporte de las auxinas en los tallos es de tipo polar, es decir, desde el ápice hacia la base morfológica. En un tallo cortado, las auxinas se acumulan en la base. Resulta interesante también el hecho de que en muchas especies se forman raíces en los tallos cortados (hecho ampliamente utilizado por los horticultores) (Criba, Edu, 2004).

A pesar de que las auxinas estimulan la formación de los primordios radiculares, luego inhiben su elongación por lo cual es necesario eliminarlas una vez producida la primera etapa para permitir un desarrollo radicular activo. No se conoce exactamente cómo actúan las auxinas en la formación de raíces (Criba, Edu, 2004).

Pueden intervenir factores distintos, como los vinculados con la nutrición (en los tejidos caulinares son muy importantes los hidratos de carbono y las sustancias nitrogenadas) (Criba, Edu, 2004).

Esta sería la razón por la cual el enraizamiento de estacas tratadas con auxinas se ve facilitado por la presencia de hojas, que aportan estos factores nutritivos, además de ser fuentes de auxinas. Desde el punto de vista fisiológico, el proceso de enraizamiento es el resultado de la presencia o ausencia de un conjunto de factores determinantes (hormonas e inhibidores) y de cofactores de variada naturaleza química (vitaminas, aminoácidos, purinas, sales minerales, etc.), que actúan en una determinada relación de concentración (Criba, Edu, 2004).



Figura 12. Fases del enraizamiento.

Desde el punto de vista de la planta de la que se extraen las estacas, se debe tener en cuenta:

- iv edad y crecimiento de las ramas que se toman para estaca (herbácea, semileñosa, leñosa)
- iv estado de desarrollo de la planta madre (en floración muestran la menor capacidad de enraizamiento)
- iv su ubicación en la rama (topófisis)
- iv presencia de yemas u hojas
- iv estado de nutrición de la planta madre
- iv longitud del día en el momento de obtención de las estacas (fotoperíodo).

4.1.25.5. Giberelinas

Su existencia se conoce desde 1926, pero la investigación activa acerca de estos compuestos recién comenzó en la década del '50. Son compuestos muy estables y de rápida distribución por el floema (Criba, Edu, 2004).

Existen en angiospermas, gimnospermas, musgos, helechos, algas y hongos. En angiospermas se encuentran en semillas inmaduras, ápices de raíces y tallos, y hojas jóvenes. Actualmente existen al menos 50 giberelinas descubiertas y no hay dudas de su condición de hormonas (es decir, son de origen endógeno) (Criba, Edu, 2004).

4.1.25.6. Efectos de la giberelinas

iv Germinación de semillas:

Tienen un rol importante en la germinación de semillas de cereal como cebada. La secuencia de eventos es que se produce la imbibición, lo que induce al embrión a liberar giberelinas (Criba, Edu, 2004).

Las giberelinas inducen la transcripción de genes de enzimas hidrolíticas en la capa de aleurona de las semillas (una capa especializada del endosperma de 2 a 4 células de espesor, ubicada justo por debajo del tegumento). Muchas semillas que usualmente germinan luego de ser expuestas a frío o luz (tabaco, lechuga o avenas) pueden estimular su germinación si son tratadas con giberelinas ya que esta hormona suplantaría este requerimiento.

En este caso, la giberelina actúa estimulando la elongación celular en el embrión para colaborar en la ruptura del tegumento (Criba, Edu, 2004).

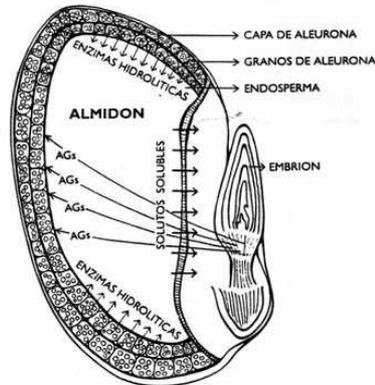


Figura 13. Germinación de una semilla de cebada.

🔵 Elongación de plantas:

Las giberelinas llamaron la atención fundamentalmente por su habilidad para estimular una drástica elongación en ciertas plantas. Este efecto es notable en mutantes enanos de maíz, y variedades enanas de porotos, arvejas y otras plantas (Criba, Edu, 2004).

La elongación inducida por estos compuestos difiere de la elongación producida por las auxinas en que: controla la elongación de los entrenudos, induce tanto la división como la elongación celular, y esta elongación no se relaciona con procesos de acidificación de la pared celular (Criba, Edu, 2004).

🔵 Juvenilidad:

Muchas plantas son morfológicamente diferentes en sus estados juveniles y maduros. Por ejemplo: el *Eucalyptus globulus* tiene diferencias en la forma y disposición de sus hojas. Yemas que darían ramas con hojas de su estadio maduro, si son tratadas con giberelinas, darán origen a ramas de su estadio juvenil (Criba, Edu, 2004).

🔵 Floración:

Durante el primer año de crecimiento, las plantas bianuales tienen entrenudos cortos, lo que llamamos estadio de roseta. Luego de las bajas temperaturas del invierno, los entrenudos de estas plantas se elongan rápidamente y la planta forma sus flores durante el segundo año de crecimiento. La aplicación de giberelinas en estado de roseta, también induce este efecto, lo que sugeriría que el frío sería el promotor de la síntesis de giberelinas en el segundo año (Criba, Edu, 2004).

Formación de frutos:

El uso comercial más importante de la giberelina tiene que ver con su capacidad de aumentar el tamaño de uvas sin semillas. Las uvas aumentan su tamaño en 3 veces y los racimos son menos apretados, lo que los hace menos susceptibles a infecciones por hongos. Es importante también en:

- a) el mejoramiento de la fructificación en tomates, durazno, berenjena, pimientos, higos, manzanas y rosas luego del tratamiento con esta hormona.
- b) la producción de frutos sin fecundación (partenocarpia) en tomate.
- c) *Otros efectos de las giberelinas en otras plantas son:*
- d) influyen en la sexualidad, aumentando el porcentaje de flores masculinas.
- e) inhiben o retardan la tuberización en la papa y otras tuberosas, estimulando el crecimiento del sistema estolonífero.

4.1.25.7. Citocininas

Son sustancias capaces de estimular la citocinesis en las plantas. La primera sustancia que promovía esta división celular fue identificada en 1955 como 6-furfuril amino purina (previamente denominada cinetina (Criba, Edu, 2004).

No se conoce bien la acción fundamental de la citocinina, pero se supone que se adhiere al RNA de transferencia y, cuando esto sucede en determinados sitios, provoca el funcionamiento de ciertos codones, controlando así la síntesis de proteínas o enzimas (Criba, Edu, 2004).

También se ha postulado su efecto sobre la síntesis del DNA. Se ha comprobado que induce la actividad de amilasas y proteasas y la síntesis de tiamina y de la auxina (Criba, Edu, 2004).

La cinetina es la citocinina sintética más conocida, así como la benciladenina (bencil-amino purina). Está presente en angiospermas, gimnospermas, musgos y helechos. En angiospermas se encuentra en raíces y a menudo en semillas, frutos y hojas jóvenes. Se mueven en todas las direcciones por el xilema, el floema y las células parenquimáticas (Criba, Edu, 2004).

4.1.25.8. Efectos: de las citoquininas

Procesos de senescencia y rejuvenecimiento:

Si se colocan gotas de citocinina en hojas amarillentas, las zonas tratadas se vuelven más verdes y los procesos de degradación disminuyen en su velocidad (Criba, Edu, 2004).

Acompañando este rejuvenecimiento, ocurre un transporte de aminoácidos y otros nutrientes hacia las partes tratadas desde las no tratadas de la hoja. Estos compuestos suelen ser usados para prolongar la aceptabilidad por parte del mercado de flores cortadas. Sin embargo, estaría prohibido su uso en vegetales comestibles por sospecharse que su consumo sea carcinógeno (Criba, Edu, 2004).

División celular:

Estimulan la división celular cuando se encuentran en presencia de auxinas. Efectos sobre los cotiledones:

La aplicación exógena de citocininas en plántulas promueve la división celular y expansión de cotiledones. La expansión es resultado de un aumento en la plasticidad celular inducida por las citocininas pero no interviene en procesos de acidificación (Criba, Edu, 2004).

También aumentan la cantidad de azúcares, especialmente de glucosa y fructosa, en células del cotiledón, lo que reduciría el potencial osmótico en estas células, favoreciendo la entrada de agua y así ayudando a su expansión (Criba, Edu, 2004).

Organogénesis:

Células cultivadas en laboratorio, crecen únicamente si tienen citocininas y auxinas en el medio de cultivo. Una tasa alta citocinina/auxina favorece la formación de tallos, mientras que tasas bajas favorecen la formación de raíces (Criba, Edu, 2004).

Interacciones con la luz:

Las citocininas causan dos efectos similares a las respuestas causadas por la luz. Las hojas de plántulas etioladas (que crecieron en ausencia de luz) de dicotiledóneas presentan crecimiento reducido, pero este crecimiento puede ser estimulado por estas sustancias. Por otra parte, ciertas semillas requieren luz para germinar, pero este requerimiento disminuye en presencia de cantidades apropiadas de citocininas (Criba, Edu, 2004).

4.1.26. El Medio Ms o Murashige Y Skoog (1962)

El medio MS, o de Murashige y Skoog (1962), es muy usado, particularmente si el objetivo es regenerar plantas; existen numerosas variaciones comerciales de este medio. El medio B5 o de Gamborg et al. (1968), o sus varios derivados, ha sido de un gran valor en el cultivo de células y protoplastos, y también es utilizado eficazmente en regeneración de plantas. La diferencia principal entre los medios MS y B5 es la menor concentración de nitratos en B5. El medio WPM (1980) de baja concentración de sales está especialmente indicado para especies leñosas (Medina, M. 2005).

Cuadro 3. Composición general de las sales de Murashige y Skoog

COMPONENTES	CONCENTRACION	Cantidad Agreg. Ml.
Macronutrientes	10X	100
Micronutrientes "A"	1000X	1
Micronutrientes "B"	5000X	0.2
Solucion de KI	1000X	1
Cloruro de Calcio	10X	100
Hierro	100X	10
Myo- Inositol	100X	10
Vitaminas	1000X	1
Sucrosa	3%	30 gramos
Agar	0.70%	7 gramos

Fuente: Elaboración propia basada en datos recabados dentro del laboratorio.

4.1.27. Estudios de cultivo de tejidos realizados en *Jatropha curcas L.*

4.1.27.1. Estudio realizado en Cuba por *centro de bioplasmas*

Universidad de Ciego de Ávila, Cuba Evaluación del tipo de explante y la concentración de 6-benciladenina (BA) en la formación de callos de dos variedades de *Jatropha curcas L.*

La formación de callos en la variedad cubana tuvo un comportamiento dependiente del tipo de explante y de la concentración de BA. El pecíolo logró 100% de formación de callos a 0,5 y 1,5 mg/L. La respuesta de las hojas fue baja (36-50%) y las inflorescencias no respondieron a ninguna de las concentraciones de BA que se ensayaron (López D, Peñate L. (2007).

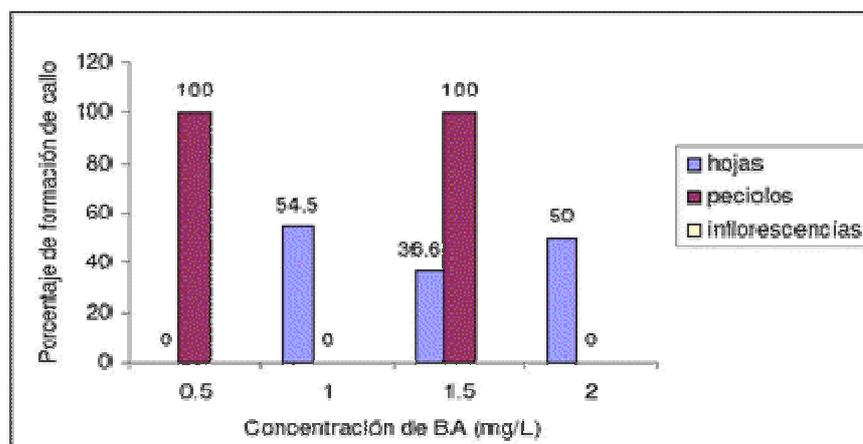


Figura 14. Porcentaje de formación de callo a partir de varios explantes de *Jatropha curcas L.*

La morfología del callo que se obtuvo fue friable y de color blanquecino, y se formó a partir de la zona de corte tanto para las hojas como para los pecíolos (López D, Peñate L. (2007)

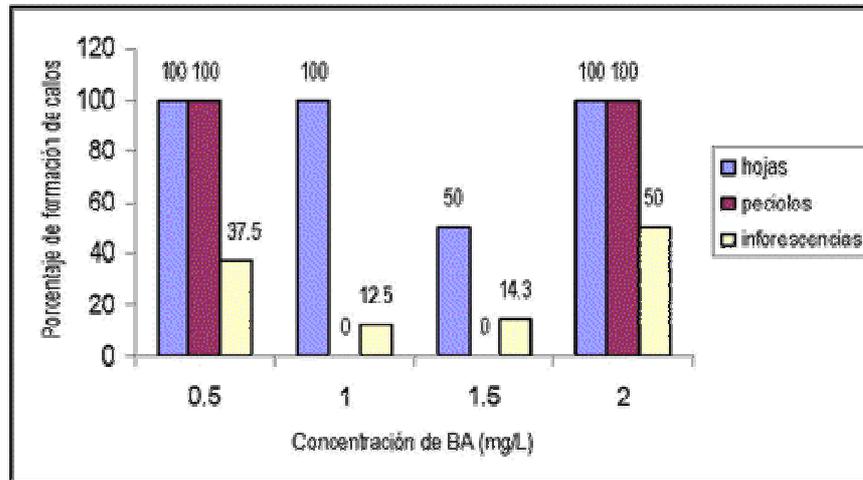


Figura 15. Porcentaje de formación de callos, expuestos a diferentes concentraciones de BA.

En la variedad africana fue mayor el nivel de respuesta a la formación de callos por los tres explantes que se utilizaron. El 50% de las inflorescencias formaron callos a la máxima concentración de BA (2 mg/L); a esa concentración el ciento por ciento de los pecíolos y las hojas también formaron callos. Sorprendentemente, los pecíolos no respondieron a la concentración de 1 y 1,5 mg/L de BA. Las hojas lograron 100% de formación de callos en todas las concentraciones, con excepción de la concentración de 1,5 mg/L (López D, Peñate L. (2007).

4.1.27.2. Proyecto realizado en Camotán, Chiquimula

Evaluación de la respuesta agronómica del piñón (*Jatropha curcas* L.) como cultivo asociado en condiciones de suelos marginales y su contribución a la recuperación de suelos y al mejoramiento del ambiente en Camotán Chiquimula

En la actualidad se está desarrollando este proyecto en la aldea El Brasil, en el municipio de Camotán del departamento de Chiquimula, el mismo se esta desarrollando por profesionales de sta facultad como lo son el Ing. Domingo Amador (QEPD), Ing Amilcar Sánchez y el Ing Marco Romilio Estrada Muy

El cual consiste en cuatros fases principales, la primera será la evaluación de modelos asociados (intercropping) del piñón con otros cultivos estos serán sorgo, loroco. Frijol caupí y maíz criollo, principalmente por ser importantes en la dieta de los pobladores de la región.

La segunda fase será la cuantificación de biomasa y tasa de fijación de CO₂ para lograr establecer la eficiencia de la planta en la fijación de carbono con fines de sostenibilidad ambiental en esta región. Así también se realizará una evaluación de la recuperación de la fertilidad del suelo vinculado a la incorporación de materia orgánica por la cobertura vegetal de *Jatropha curcas* L. y el uso de los subproductos de la semilla de piñón en la alimentación de peces, para contribuir a la seguridad alimentaria de los beneficiarios.

4.1.27.3. FAUSAC y agricultores investigan cultivo de piñón para generar biodiésel

En nueva Concepción, Escuintla, en coordinación con docentes y epesistas de la Facultad de Agronomía de la USAC, están realizando un estudio en el cultivo del piñón (*Jatropha curcas* L.) con fines bioenergéticos y que contribuyan a la prosperidad de la población rural (Boletín AGRO, 2009).

La investigación se lleva a cabo con el apoyo financiero del Programa Universidad Empresa para el Desarrollo Sostenible (PUEDES), integrado por el Consejo Superior Universitario (CSUCA), la cooperación técnica alemana y la universidad Kassel de Alemania (Boletín AGRO, 2009).

El proyecto busca desarrollar una experiencia de vinculación Universidad-Sector Productivo, que permita a la FAUSAC, integrar procesos de aprendizaje, investigación que contribuyan al desarrollo rural (Boletín AGRO, 2009).

En la actualidad se investiga la siembra de asocio de maíz-piñón identificación de plagas y enfermedades del cultivo, identificación del periodo crítico de interferencia de malezas, evaluación de distanciamiento de siembra y de niveles de fertilización en diferentes tipos de suelos. Además de capacitar en el campo a 30 productores y estudiantes de la FAUSAC sobre el cultivo del piñón con criterios de sostenibilidad (Boletín AGRO, 2009).

4.1.27.4. Otras instituciones apoyan programa local de biodiésel

Un programa de biodiésel que utiliza como materia prima la *jatropha* o piñón, en Cuyotenango, Suchitepéquez, es un buen ejemplo de beneficios para comunidades rurales, refiere un estudio de la FAO. Se trata de la iniciativa Biodiésel para el Desarrollo Rural, que se inició en el 2008 y cultiva piñón en 170 hectáreas propiedad de 150 familias (Godoy, E. 2009).

El área de cultivos en Cuyotenango podría llegar a 560 hectáreas, y los beneficiarios, a 963. El programa involucra también ocho aldeas de Chiquimula, con 193 familias, quienes sembrarían el vegetal para trasladarlo a la planta en Cuyotenango. El ingreso por hectárea de *jatropha* puede sumar US\$1 mil 265 al año, 930 de aceite, más 620 de fertilizantes, menos 285 en costos. Biodiésel para el Desarrollo Rural produciría unos mil 900 litros de este combustible por hectárea. Un terreno de 200 hectáreas rendiría 380 mil litros de aceite al año. (Godoy, E. 2009).

4.1.27.5. Embriogénesis somática de *Jatropha curcas* una planta multiuso

El piñón *Jatropha curcas* L. es un arbusto oleaginoso que se adapta a suelos pobres y marginales, inicia su producción al primer año y rinde hasta 8 t ha⁻¹ de semilla, con 37% de aceite, equivalente a más de 2 mil L ha⁻¹ de combustible. La propagación por métodos convencionales es poco eficiente. La embriogénesis somática ha sido reportada para algunas especies de la familia *Euphorbiaceae* (Chang, T., Ortega, J. 2009).

El objetivo del presente trabajo fue regenerar plantas de *J. curcas* L. vía embriogénesis somática.

La metodología utilizada fue la siguiente:

Se germinaron *in vitro* plántulas de las que se sembraron explantes de hojas, segmentos de tallo y raíces en MS + 3% de sacarosa + 0.2% de Gelrite y combinaciones de KIN (4.6 y 11.6 M) y BA (4.4 y 11.1 M) (2). Un mes después los callos se transfirieron al medio MS + 3.5 M KIN + 4.9 M AIB + 3% de sacarosa + 0.2% de Gelrite. Los medios fueron ajustados a pH 5.7 y las condiciones de incubación fueron 25°C y fotoperiodo (16/8 h luz/oscuridad) (Chang, T., Ortega, J. 2009).

Resultados y discusión. Los callos obtenidos de raíces y hojas mostraron embriones globulares casi al mismo tiempo, pero fue mayor el rendimiento en los primeros (Cuadro 4).

Cuadro 4. Embriogénesis somática de *J. curcas* L. a partir de callos obtenidos de raíces y hojas de plántulas *in vitro*.

Explante	Días a la aparición	Callos con embriones (%)	Embriones callo ⁻¹
Raíces	6	93	5
Hojas	8	43	2

Fuente: Elaborado por Chan. T.

En comparación a lo reportado (2) se obtuvo mayor respuesta en los callos provenientes de raíces y ligeramente inferior en los de hoja, sin embargo, los embriones somáticos diferenciados aún son escasos en comparación a otros modelos. Además la tasa de conversión a planta no es relevante en ningún caso (Chang, T., Ortega, J.2009).

Una vez iniciada la diferenciación de embriones somáticos en los callos embriogénicos, fue posible observar los estadios de desarrollo descritos en la literatura: globular, corazón, torpedo y cotiledonario (Chang, T., Ortega, J.2009).



Figura 16. Diferenciación de callos en sus diferentes fases obtenidos a partir de raíces.

Conclusiones: A) Callo. B y C) Callo con embriones somáticos en estadio globular. D y E) Embriones somáticos. F) Plántula. La embriogénesis somática es una alternativa viable para la propagación masiva de plantas de *Jatropha curcas* L. Existe una respuesta diferencial según el tejido utilizado como explante. Se precisa mejorar sustancialmente la tasa de conversión a planta (Chang, T., Ortega, J.2009).

4.1.27.6. Organogénesis indirecta

A partir de explantes foliares de *Jatropha curcas* L. de Chiapas

Introducción. El piñón *Jatropha curcas* L. es una euforbiácea oleaginosa originaria de Mesoamérica que crece en climas tropicales y subtropicales y sus semillas producen 35 a 40% de aceite utilizable como combustible (1-2). Se reporta regeneración *in vitro* de varias especies de *Jatropha*, pero los resultados no han sido consistentes probablemente debido al efecto del genotipo. Se evaluó el efecto de genotipo en la regeneración de plantas vía organogénesis indirecta de once accesiones de *Jatropha curcas* L., colectadas en Chiapas (López, E., Ortega, J. Rivera, C. 2009).

Metodología. Después de seleccionar y desinfectar semillas de 26 accesiones, se extrajeron y sembraron *in vitro* los embriones. Se cortaron explantes foliares de 1 cm² y sembraron en el medio MS + 8.9 M BA + 4.9 M AIB + 3% sacarosa + 0.2% Gelrite para calogénesis. Callos de un mes se transfirieron al MS + 8.9 M BA + 2.5 M AIB + 3% sacarosa + 0.2% Gelrite para la inducción de brotes. La rizogénesis se indujo con MS + 5 M ANA + 3% sacarosa + 0.2% Gelrite. (López, E., Ortega, J. Rivera, C. 2009).

Resultados y discusión. Germinaron 22 de las accesiones sembradas y la mitad produjo callo, sin embargo sólo cinco diferenciaron brotes, en diferentes cantidades (Cuadro 1). Sujatha *et al.* (3), reportan 80-90% de regeneración de brotes con el mismo medio en menos tiempo (14-28 días), utilizando segmentos foliares y manejando sólo un genotipo. Lo anterior corrobora lo reportado en la literatura en el sentido de que puede existir un diferencial de respuesta al cultivo *in vitro*, dependiendo del genotipo del material vegetal utilizado (López, E., Ortega, J. Rivera, C. 2009).

Cuadro 5. Brotes por accesión a los 70 días posteriores a la siembra.

CLIMA	ACCESIÓN	BROTOS
Cálido subhúmedo A(C)w ₂ (w)	8	9
15	18	
Templado subhúmedo Aw ₂ (w)	9	36
16	9	
Cálido subhúmedo con lluvias en verano A(w ₀)	10	27

Fuente: Elaborado por Lopez. E.

Conclusiones. La organogénesis indirecta es un proceso viable para la micropropagación de *Jatropha curcas* L. sin embargo, los protocolos publicados no son igual de eficientes para todos los genotipos por lo que se precisa evaluarlos (López, E., Ortega, J. Rivera, C. 2009).

4.2. Marco referencial

La ciudad de Guatemala cuenta con un clima templado y una temperatura máxima de 33 °C y 22 °C mínima y está localizada a una altura de 1562.00 metros sobre el nivel del mar.

Esta investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala. El laboratorio está ubicado en el salón C-16, tercer nivel del edificio T-8 en la ciudad universitaria, zona 12 de esta ciudad capital. El cual está equipado con las condiciones adecuadas para realizar investigación, las cuales son 12 horas diarias de luz, una temperatura de entre 24°C y 27°C, así como una humedad relativa de 30%.

4.2.1. Descripción del material vegetal

La planta *Jatropha* no es un árbol milagroso para producción de Biodiesel. Sin embargo, el cultivo sustentable de esta planta, sin interferir con la producción de alimentos, puede ser opción viable en proyectos de energías renovables porque ofrece ventajas adicionales sobre otros cultivos (Orozco, E. 2009).

La variedad de Huehuetenango, fue investigada inicialmente en el proyecto denominado “Caracterización Molecular de las Variedades de *Jatropha curcas* L. en Guatemala con Fines de Mejoramiento” y fue allí donde dio como resultado que era el mejor material genético no solo por su más alta producción sino porque dicha producción se alcanzó en menor tiempo (316 días), en el estudio identificado como Guatemala 51 procedente de Cuilco, Huehuetenango. Por lo tanto, este material viene a constituirse en un material elite a tomarse en cuenta en programas de mejoramiento así como en el establecimiento de plantaciones comerciales.

La propagación se realiza mediante semillas y/o esquejes (estacas) en invernadero. Las semillas para siembra deben ser obtenidas de plantas que mostraron altas producciones (Orozco, E. 2009).

El almacenamiento de las semillas no deberá exceder de 10 a 15 meses, supervisando la calidad en las semillas durante este tiempo, considerando su contenido de aceite. La germinación en las semillas tiene una duración de 15 días, y puede comenzar incluso a partir del tercero al quinto días. El porcentaje de germinación oscila entre 60 y 90% (Orozco, E. 2009).

Las plántulas se desarrollan durante 3 meses en invernadero, y se trasplantan al campo cuando tienen una altura entre 40 y 50 centímetros (Orozco, E. 2009).

5. Objetivos

4.3. Objetivo General

Establecer un protocolo para la propagación *in vitro* vegetativa de cultivares seleccionados de piñón (*Jatropha curcas* L.) variedad Huehuetenango con calidad fitosanitaria.

4.4. Objetivos Específicos

- 5.1.1. Establecer la combinación de auxinas y citocininas más eficientes en la multiplicación de callos meristémicos de *Jatropha curcas* L. variedad Huehuetenango.
- 5.1.2. Establecer el tratamiento más eficiente para la regeneración de plántulas de *Jatropha curcas* L. variedad Huehuetenango a partir de callos meristémicos.

6. Hipótesis

- 6.1. El medio MS (Murashige Skoog 1,962) y alguna de las combinaciones de dos reguladores de crecimiento auxinas-citocininas ANA (Acido Naftalenacético) y BAP (Bencil aminopurina) permitirán incrementar significativamente el crecimiento en los callos meristématicos de *Jatropha curcas* L. Variedad Huehuetenango.
- 6.2. Que alguna de las combinaciones de citoquinina BAP (Bencilaminopurina) y el medio MS (Murashine y Skoog 1962, producirán brotes, en los callos meristemáticos generados en la primera fase de la investigación.

7. Metodología

4.5. Fase de Investigación

Se realizó por medio de la investigación de diferentes fuentes bibliográficas como:

- ▣ Investigaciones recientes referentes al tema de cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas* var. L.
- ▣ Investigaciones realizadas por medio del internet sobre cultivo de tejidos y la propagación de dicha especie vegetal.
- ▣ Entrevistas realizadas a personas expertas en el tema, como lo es Ing. Domingo Amador (Q.E.P.D.), Ing. Mak Milan Cruz, Ing. Amilcar Sanchez, Ing. Eduardo Pretzancin.

4.6. Fase de Campo

4.6.1. Origen y colecta de material vegetal de *Jatropha Curcas*.

El material a utilizado en la primera fase de la investigación consistió de frutos inmaduros los cuales proceden del departamento de Huehuetenango y fueron recolectados en el año 2008, posteriormente se colocaron en un medio de cultivo de para la inducción de callos meristemáticos, quedando ya establecidos en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, luego estos fueron sembrados en un medio MS al 100%, hasta que en mayo del año 2009, se inició este trabajo de investigación con la multiplicación de este material para contar con suficientes accesiones para desarrollar la segunda fase de la investigación que es la regeneración de plántulas por medio de estos callos multiplicados en la primera fase.

4.7. Fase de Laboratorio

4.7.1. Materiales y Métodos

- ▣ Material de vidrio y de plástico
 - ✓ Pipetas de 1, 5, 10 y 25 ml
 - ✓ Micropipeta 100 – 1000 ul
 - ✓ Beakers
 - ✓ Erlenmeyer
 - ✓ Mecheros
 - ✓ Placas petri
 - ✓ Probetas
 - ✓ Papel aluminio

Equipos

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

Otros Materiales

- ✓ Bisturí
- ✓ Hipoclorito de sodio
- ✓ Espátulas
- ✓ Agua destilada
- ✓ Alcohol al 95% y 70%
- ✓ Algodón

4.7.2. Procedimiento para la preparación de soluciones madres

Se realizaron conforme se describe la metodología para las sales minerales Murashige y Skoog (1962). Según el siguiente procedimiento:

-  **Solución madre de macronutrientes del medio MS:** se prepararon 500 ml. De esta solución, para lo cual se utilizó un beaker de 1 litro, en el que se agregaron los componentes siguientes:

Cuadro 6. Componentes de macro nutrientes del medio MS a (10X).

Nombre del Compuesto	Fórmulas	Peso (gramos)
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	8.25
Nitrato de potasio	KNO_3	9.50
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.85
Fosfato Diácido De Potasio	KH_2PO_4	0.85

Fuente: Elaboración propia basada en datos proporcionados dentro del Lab. Cultivo de tejidos.

- Luego se agregaron a un beaker todos los elementos conteniendo 250 ml. de agua desmineralizada estéril, se agitó dicha solución hasta observar que todos los elementos se disolvieran.
- Se traspasó a una probeta de 1000 ml., se aforó con agua desmineralizada estéril hasta llegar a 500 ml., se volvió a agitar para mezclar todos los elementos se almacenó en un frasco de vidrio transparente previamente identificado con la fecha de elaboración su concentración para luego almacenarlos a 4°C.
- Posteriormente se preparó de la misma manera 100 ml. de una solución de micronutrientes “A” a una concentración de 1000X.

Cuadro 7. Componentes de la solución de micronutrientes “A” a 1000X.

Nombre del Compuesto	Fórmula	Gramos
		agregados para 100 ml.
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0.62
Sulfato de manganeso monohidratado	MnSO ₄ .H ₂ O	2.23
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.86
Molibdato de sodio dihidratado	Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	0.025

Fuente: Elaboración propia basada en datos proporcionados dentro del Lab. Cultivo de tejidos.

7.1.1.1. Preparación de solución de micronutrientes “B” de las sales MS

- Se preparó 100 ml. de la solución a una concentración de 5000X. Para ello se pesaron los siguientes elementos químicos:

Cuadro 8. Componentes de micronutrientes “B” del medio Murashige y Skoog (1962)

Nombre del Compuesto	Fórmula	Gramos
		agregados para 100 ml.
sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.125
cloruro de cobalto hexahidratado	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.125

Fuente: Elaboración propia basada en datos proporcionados dentro del Lab. Cultivo de tejidos.

- Se agregó a un beaker 50 ml. de agua desmineralizada estéril, y se agregaron cada uno de los componentes descritos en el cuadro 6.
- Este contenido se trasladó a una probeta de 100 ml., luego se aforó con agua desmineralizada estéril hasta llegar al volumen deseado, para luego trasladar el contenido a un frasco previamente esterilizado e identificado, con el nombre, concentración, y fecha de elaboración. Se almacenaron en la refrigeradora a 4°C.

7.1.1.2. Preparación de la solución de Yoduro de potasio “KI” a 1000X

Para ello se añadió a un beaker 0.083 gramos del compuesto mencionado para 100 ml. y se aforó con agua desmineralizada.

7.1.1.3. Preparación de 500 ml. de la solución de Cloruro de calcio a 10X

- iv Se agregó a un beaker conteniendo 250 ml. de agua desmineralizada estéril, 2.2 gramos de cloruro de calcio, se dejó agitar hasta que se disolviera el reactivo.
- iv Se traspasó el contenido a una probeta para aforar a 500 ml. Posteriormente se trasladó a un frasco de vidrio transparente, estéril, identificado con la concentración, fecha de elaboración y nombre del compuesto

7.1.1.4. Preparación de 100 ml. De la solución de hierro a 100X

Se pesaron los siguientes compuestos químicos:

Cuadro 9. Compuestos químicos para la solución de hierro a 100X

Nombre del Compuesto	Fórmula	Gramos
		agregados para 100 ml.
Cristales de sal disodio dihidratada	Na ₂ EDTA	0.373
Sulfato de hierro heptahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.278

Fuente: Elaboración propia basada en datos proporcionados dentro del Lab. Cultivo de tejidos.

- iv En un beaker se colocaron 50 ml. de agua desmineralizada estéril, se agregaron los compuestos descritos en el cuadro No.7, se agitó hasta disolver completamente ambos elementos, para luego traspasar a una probeta y aforar a 100 ml.
- iv Por último se traspasó a un frasco oscuro, previamente identificado con nombre, concentración y fecha de elaboración de la solución.

7.1.1.5. Preparación de vitaminas a 1000X

Cuadro 10. Compuestos químicos para la solución de vitaminas a 1000x.

Nombre del Compuesto	Fòrmula	Gramos
		agregados para 100 ml.
Acido nicotínico	$C_6H_5NO_2$	0.05
Piridoxol hidrócloridrico	$C_8H_{12}ClNO_3$	0.05
Tiamina monoclorhidrica	$C_{12}H_{18}Cl_2SO_4 \cdot H_2O$	0.01
Glicina	H_2NCH_2COOH	0.20

Fuente: Elaboración propia basada en datos proporcionados dentro del Lab. Cultivo de tejidos.

7.1.1.6. Preparación de 100 ml. De la solución de myo inositol a 1000X

- En un beaker de 100 ml. se colocó 50 ml. de agua desmineralizada estéril, luego se pesó 1 gr. del compuesto, se agitó constantemente, para luego traspasar esta solución a una probeta donde se aforó a 100 ml.
- Por último se traslado a un frasco estéril, con su identificación y se almaceno a 4°C.

7.1.1.7. Preparación de 100 ml. De vitaminas a una concentración de 1000X

- Para ello se agregarán los siguientes compuestos químicos:

Cuadro 11. Compuestos para la solución de vitaminas

Nombre del Compuesto	Fòrmula	Gramos
		agregados para 100 ml.
Acido nicotínico	$C_6H_5NO_2$	0.05
Piridixol hidrócloride	$C_8H_{12}ClNO_3$	0.05
Tiamina monoclorhidrica glicina	$C_{12}H_{18}Cl_2NSO_4 \cdot H_2O$	0.01
Glicina	H_2NCH_2COOH	0.2

Fuente: Elaboración propia basada en datos proporcionados dentro del Lab. Cultivo de tejidos.

- En un beaker se agregó 50 ml. De agua desmineralizada estéril y se agregaron los elementos descritos en el cuadro No. 9 y se aforo a 100 ml. se identificó y se almacenó a 4°C.

7.1.1.8. Preparación de los reguladores de crecimiento a utilizar en la investigación.

Los reguladores de crecimiento a utilizar son: BAP (bencilaminopurina), y ácido naftalenacético (ANA). El BAP se disolverá con hidróxido de sodio 1N. Antes de su utilización.

4.7.3. Preparación de 1 litro de medio MS (Murashige y Skoog):

En un beaker se agregó 200 ml. de agua desmineralizada y se introdujo un agitador magnético, posteriormente se agregaron los siguientes compuestos.

Cuadro 12. Componentes químicos para la elaboración de 1 L. medio MS.

COMPONENTES	CONCENTRACION	CANTIDAD AGREGADA
		en ml.
Macronutrientes	10X	100
Micronutrientes "A"	1000X	1
Micronutrientes "B"	5000X	0.2
Solucion de KI	1000X	1
Cloruro de Calcio	10X	100
Hierro	100X	10
Myo - Inositol	100X	10
Vitaminas	1000X	1
Sucrosa	3%	30 gramos
Agar	0.70%	7 gramos

Fuente: Elaboración propia basada en datos proporcionados dentro del Lab. Cultivo de tejidos.

Se procedió a disolver todos los elementos uniformemente del medio MS, para luego agregar los reguladores de crecimiento según lo requerido para cada uno de los tratamientos a evaluar, siendo los siguientes:

Cuadro 13. Tratamientos realizados en la primera fase de la investigación con MS al 100%

Tratamiento	ANA (mg por Litro)	BAP (mg por litro)
T1	0.1	0.0
T2	0.5	0.0
T3	1.0	0.0
T4	0.1	3.0
T5	0.5	3.0
T6	1.0	3.0

Fuente: Elaboración propia basada en datos proporcionados dentro del Lab. Cultivo de tejidos.

- iv Luego se determinó el pH que estaba entre 5.75 y 5.80, en los diferentes tratamientos, para estandarizar el pH en el medio de cultivo se utilizó soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio a 0.1N.
- iv Se procedió a disolver el agar contenido en el medio de cultivo con el uso del horno microondas, esto con la finalidad de facilitar el llenado de los recipientes de vidrio que constituirán las unidades experimentales.
- iv Posteriormente se llenaron las unidades experimentales que consistieron en recipientes de vidrios a los cuales se les agregó 15 ml. de medio a cada unidad experimental.
- iv Cada uno de los frascos se identificó según el tratamiento y el número de repeticiones de cada tratamiento, así como la fecha de elaboración del medio. En esta etapa se consideraron 6 repeticiones para cada uno de los tratamientos.
- iv Luego se introdujeron cada uno de los frascos en la autoclave durante 25 minutos a una presión de 1.05 kg/cm² a una temperatura de 120 grados Celsius.
- iv Por último estos frascos se sacaron de la autoclave y se colocaron en el cuarto de incubación hasta su utilización.

4.7.4. Siembra de la primera fase de la investigación

7.1.1.9. Multiplicación de callos meristemáticos de *Jatropha curcas* L.

- iv Se introdujo a la cámara de flujo laminar, 1 paquete de pinzas y cajas de petrí, previamente esterilizadas, así como se un mechero con alcohol al 95% y un tubo de ensayo para la esterilización posterior de las pinzas
- iv Se esterilizó la cámara de flujo laminar, con alcohol al 70%, se espero 30 minutos para comenzar con la siembra del material.

- iv Transcurrido este lapso de tiempo, se procedió a introducir todos los frascos que contenían los callos meristemáticos que se iban a multiplicar en la primera fase de la investigación así también los que contenían los medios de cultivos a evaluar en esta fase.
- iv De cada uno de los frascos se procedió a dividir el callo meristemático, en 6 partes de aproximadamente 2 cms. de largo y 3 cms. de ancho.
- iv Todas las unidades experimentales se trasladaron a la sala de incubación y luego de 53 días se tomaron los datos respectivos.

4.7.5. Toma de datos variables respuesta:

Estas se tomaron a los 53 días de sembrados, los callos meristemáticos para su multiplicación de la siguiente manera:

- iv Se midió el largo y ancho en centímetros, de cada callo meristemático sembrado, para ello se procedió a extraer cada explante del frasco para lo cual se utilizó una regla graduada.
- iv Se evaluó el color que presentaba cada explante en base a un código definido por la tabla de Munsell para tener un código y verificar esta variable.
- iv Peso en gramos de los callos meristemáticos multiplicados en la primera fase de la investigación, utilizando para ello una balanza electrónica para tener mayor precisión.
- iv La calidad fitosanitaria que los callos meristemáticos presentaban, para ello se procedió a revisar el frasco antes de abrirlo, para evitar infecciones que pudieran afectar a otros frascos.
- iv Posteriormente los callos meristemáticos se dividieron en 5 o 6 partes como se detalló anteriormente, para luego trasladarlos a otro medio de cultivo de la fase 2.

4.7.6. Variables Respuestas en el diseño experimental

- iv Presencia de callos meristemáticos a los 67 días de introducirlos en el medio de cultivo.
- iv Numero de explantes que no respondieron, a los tratamientos luego de los 67 días de introducirlos en el medio de cultivo.
- iv Características cualitativas de los callos meristemáticos multiplicados en la primera fase de la investigación, su color, su tamaño, así como su estado fitosanitario, presencia o ausencia de hongos y/o bacterias etc.

4.7.7. Preparación de medios para la segunda fase de la investigación

7.1.1.10. Regeneración de plántulas a partir de los callos multiplicados

Se procedió a realizar los medios de cultivos conteniendo MS (Murashine y Skoog) a diferentes concentraciones siendo estas 100% y 50% se combinaron con diferentes concentraciones de BAP (bencilaminopurina), según los tratamientos descritos a continuación:

Cuadro 14. Tratamientos a realizar para la segunda fase de la investigación.

Tratamiento	MS %	BAP (mg por litro)
T1	100	0.1
T2	50	0.1
T3	100	0.5
T4	50	0.5
T5	100	1.0
T6	50	1.0

Fuente: Elaboración propia

7.1.1.11. Segunda fase

Siembra de los explantes para la regeneración de plántulas por medio de callos meristemáticos multiplicados en la primera fase.

Se procedió a tomar datos de todos los tratamientos realizados durante la primera fase de la investigación como lo es largo, ancho, color sanidad y peso en gramos.

Posteriormente se identifico cual de los 6 tratamientos fue el que mejor resultado dio, en cuanto a las variables respuestas mencionadas antes. Para luego trasladarlos a los diversos tratamientos de la segunda fase que es la regeneración de plántulas a partir de estos callos meristemáticos.

Los demás explantes fueron trasladados a un medio conteniendo el mejor tratamiento de la primera fase, para lograr así preservar el material vegetal. Todas las unidades experimentales se trasladaron al área de incubación, durante 50 días, para la toma de datos respectiva de la segunda fase de la investigación.

A. Variables respuesta:

- Número de plántulas regeneradas luego de 50 días de sembrados los callos meristemáticos en los tratamientos a evaluar en esta fase.
- Largo en centímetros de cada una de las plántulas regeneradas

- ▣ Estado fitosanitario de cada uno de las plántulas regeneradas
- ▣ Presencia de hojas de cada una de las plántulas regeneradas en esta segunda fase.

4.7.8. Diseño experimental: Completamente al azar

Modelo estadístico.

$$Y_{ij} = U + T_i + E_{ij}$$

$$i = 1, 2, t$$

$$j = 1, 2, r$$

Donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta de la ij-ésima unidad experimental

U = Efecto de la media general

T_i = Efecto de los tratamientos utilizados sobre los callos meristemáticos generados en la primera fase de investigación.

E_{ij} = Error experimental

4.7.9. Unidad experimental

Como unidad experimental en la primera fase se utilizaron frascos de compota conteniendo 25 ml. de medio de cultivo, cada frasco contenía un segmento de 2 cms. de largo y 3 cms. de ancho de callos meristemático.

En la segunda fase se procedió a disectar con las mismas dimensiones (2 cms. de largo y 3 cms. de ancho) los explantes (callos meristemáticos) que tuvieron una respuesta mayor en cuanto a crecimiento (Tratamiento No. 6).

4.7.10. Análisis de la información

Este se realizó utilizando para todos los resultados obtenidos durante ambas fases de la investigación, el programa INFOSTAT, con el cual también se procedió a realizar la prueba de Tuckey con un nivel de confianza del 95% y un error experimental del 5%.

4.7.11. Presentación de Resultados

Con los resultados obtenidos se elaboraron cuadros y figuras para una mejor ilustración de los resultados y se generaron diagramas para un mejor entendimiento.

8. Resultados y discusión de resultados

La primera fase del experimento que consistía en la multiplicación de los callos meristémicos de la especie *Jatropha curcas* L. variedad Huehuetenango, fue realizada el 13 de mayo de 2009, 67 días después se procedió a la toma de datos el 19 y 20 de julio del año 2009.

En cuanto al color se tomo de una escala ascendente de 1 a 4, donde 1 hace referencia al color blanco identificado con el código 10 YR 7/2, 2 a coloración blanco amarillento identificado con el código 5Y 5/4, 3 verde amarillento con el código 5Y 6/5 y el 4 verde oscuro con el código 5Y 6/4, según < se muestra en la siguiente figura 17.



Figura 17. Escala de colores codificados en base a la tabla de Munsell

4.8. Resultados de Primera Fase

Cuadro 15. Resultados obtenidos en la primera fase para las variables cualitativas.

TRATAMIENTOS	MEDIO MS %	ANA (mg/L.)	BAP (mg/L.)	COLOR (% explantes)					ESTADO FITOSANITARIO (%)		MUERTOS (%)
				1 (10 YR 7/2)	2 (5 Y 5/4)	3 (5 Y 6/5)	4 (5Y 6/4)	5 (6Y 6/1)	SANO	INFECTADO	
T1	100%	0.1	0.0		13	62		25	89	0	11
T2		0.5	0.0	11		33	56		89	11	
T3		1.0	0.0	50		12	38		100		
T4		0.1	3.0	11		89			100		
T5		0.5	3.0				89	11	100		
T6		1.0	3.0				100		100		

Fuente: Elaboración propia basada en datos recabados durante la investigación.

En el cuadro 15, se muestra los resultados para las variables cualitativas que son el color, estado fitosanitario y la sobrevivencia de los explantes, estas variables están representadas en porcentaje, debido a que en los anexos de este documento se presentan los cuadros de manera detallada, presentándose en cuadros la totalidad de la cantidad de explantes que se evaluaron y cuál fue la respuesta de los mismos en cuanto a estas variables.

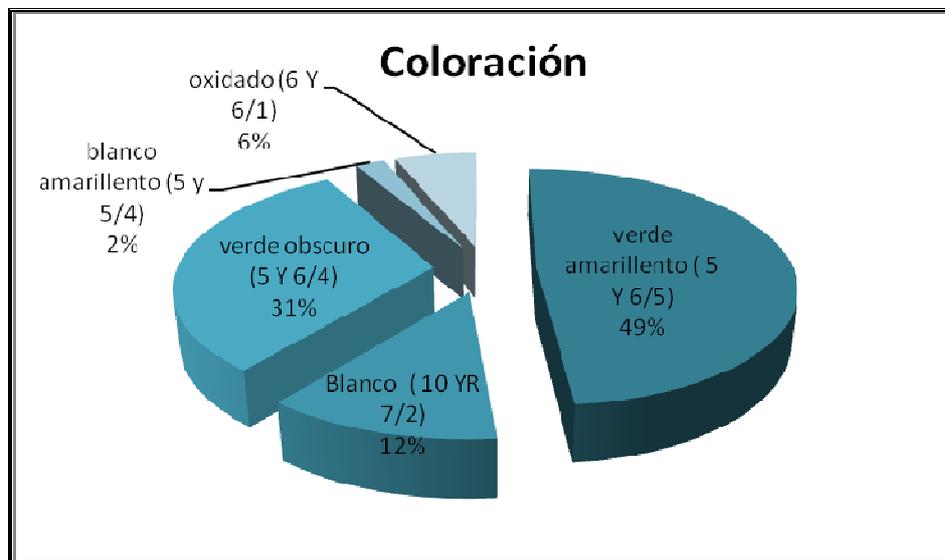


Figura 18. Coloración presentada en los explantes durante la primera fase.

Durante esta primera fase de la investigación se observó que del total de las unidades experimentales (600 explantes), el 49% presentó una coloración verde amarillenta (código 5Y 6/5) el 31% una coloración verde oscuro (código 5Y 6/4) el 12% presentó una coloración blanco amarillenta (código 5Y 5/4) y únicamente el 2% presentó coloración blanca (código 6Y 6/1), asiendo una comparación entre los tratamientos el número de explantes que presentó una coloración verde amarillenta en mayor cantidad fue el tratamiento No.6 así también fue el que mejor resultados desarrolló en cuanto a las demás variables cuantitativas. En sobrevivencia únicamente el 11% de los explantes murió esto originado por una oxidación de los explantes posiblemente por el tiempo que estuvieron dentro del medio de cultivo.



Figura 19. (A,B,C) Diferentes coloraciones presentadas en los explantes de la primera fase.

En la figura 19, se muestran algunas de las coloraciones que presentaron los explantes al ser sometidos a los diversos tratamientos de esta primera fase de la investigación. En la figura 18 (A) se muestra la coloración blanca identificada por el código 10 YR 7/2, en la figura 18 (B) se muestra la coloración verde amarillenta con el código 5Y 6/5, por último en la figura 18 (C) se muestra la coloración 5 identificada con el código 6Y 6/1.

Es importante resaltar que estos códigos fueron tomados de la tabla de Munsell debido a que se necesitaba tener alguna descripción más técnica a la hora de la presentación de estos colores.

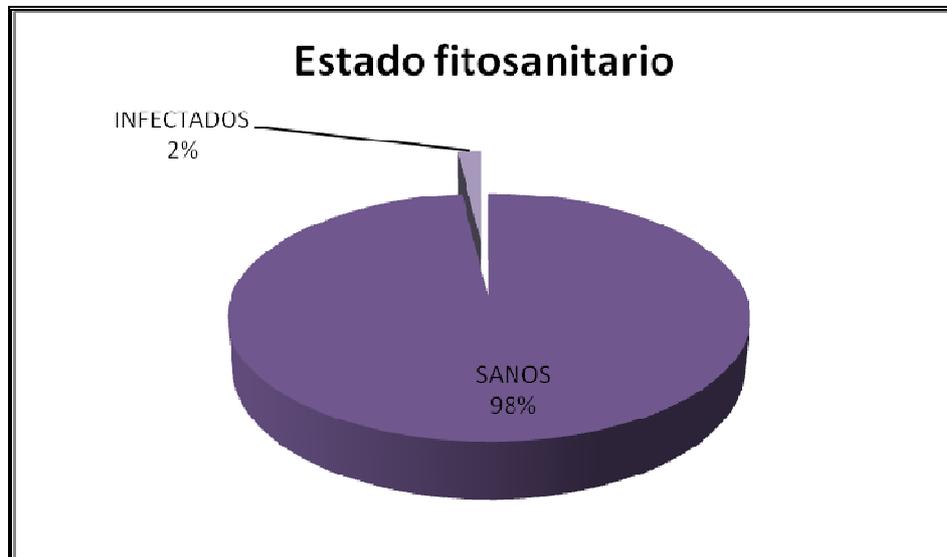


Figura 20. Estado fitosanitario de los explantes durante la primera fase.

En cuanto al estado fitosanitario se presentó el 98% de los explantes sanos, debido a que las siembras de dichas unidades experimentales (explantes), se realizaron con las normas de asepsia adecuadas para lograr evitar la mínima contaminación esto se refleja en la baja contaminación con únicamente el 2% de los explantes infectados.

La presencia de una bacteria se evidenciaba con el color blanco lechoso en el explante y posteriormente esta se diseminaba en todo el medio de cultivo.



Figura 21. Explante infectado por la bacteria dentro del medio de cultivo.

Cuadro 16. Resultados obtenidos en la primera fase de las variables cuantitativas.

TRATAMIENTOS	MEDIO MS %	ANA (mg/l)	BAP (mg/l)	TAMAÑO Cms.		PESO Grs.
				LARGO	ANCHO	
T1	100%	0.1	0.0	0.81	0.20	0.18
T2		0.5	0.0	1.48	0.76	1.05
T3		1.0	0.0	1.32	0.8	1.08
T4		0.1	3.0	1.67	1.02	1.807
T5		0.5	3.0	1.79	1.1	2.295
T6		1.0	3.0	2.51	1.85	3.523

Fuente: Elaboración propia, basada en datos recabados durante la investigación.

Durante esta primera fase el objetivo primordial fue la multiplicación de los callos meristemáticos establecidos anteriormente dentro del laboratorio para ello se utilizaron los tratamientos descritos en el cuadro 16.

Como se muestra en el cuadro 16, el tratamiento que presentó un mejor desarrollo en cuanto a las variables, tamaño en centímetros y peso en gramos, fue el tratamiento No. 6. Esto debido a que este tratamiento contenía una mayor concentración de ambos reguladores de crecimiento, contribuyendo a que se diera una mayor división celular. Según Orozco C., esta respuesta es originada debido a que el regulador de crecimiento BAP (Benzilaminopurina) es una citoquinina y esta hormona promueve la organogénesis dentro del explante y la auxina presente en el medio con la hormona ANA (ácido naftalenacético) promueve a su vez la división celular de los explantes. Ocasionalmente que a mayor concentración de ambos reguladores se diera una mejor respuesta de los explantes sometidos a este tratamiento, como se puede ver en los resultados a mayor concentración de los reguladores utilizados en el medio, mayor fue la respuesta en cuanto a desarrollo tamaño y peso del explante.

Para corroborar el mejor tratamiento de esta fase se realizó un análisis de varianza y prueba de medias Tukey para obtener un resultado más exacto que muestre el mejor tratamiento en cuanto a la multiplicación de los callos meristemáticos de esta especie.

4.8.1. Análisis estadístico para la variable ancho del explante en centímetros

Cuadro 17. Análisis de la varianza para la primera fase de la investigación, variable ancho.

VARIABLE (ANCHO)	N	R ²	R ² Aj	CV
CENTIMETROS	54	0.60	0.56	39.70

Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT.

Cuadro 18. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable ancho.

F.V	SC	Gl.	CM	F	P-valor
MODELO	10.68	5	2.14	14.45	<0.0001
TRATAMIENTOS	10.68	5	2.14	14.45	<0.0001
ERROR	7.10	48	0.15		
TOTAL	17.78	53			

Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT.

De acuerdo al análisis de varianza cuadro 17, se observa que si existe una diferencia significativa entre los tratamientos al 0.05% y para establecer que tratamientos fueron estadísticamente iguales o diferentes entre si fue necesario utilizar el comparador de medias de Tukey al 0.05% de significancia como se muestra en el cuadro 18.

Cuadro 19. Prueba de Tuckey, con un error de 0.1478 y gl. 48 con alfa de 0.05

TRATAMIENTOS	MEDIAS	N			
6	1.86	9	A		
5	1.02	9		B	
4	0.98	9		B	
3	0.80	9		B	C
2	0.76	9		B	C
1	0.40	9			C

Letras distintas indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

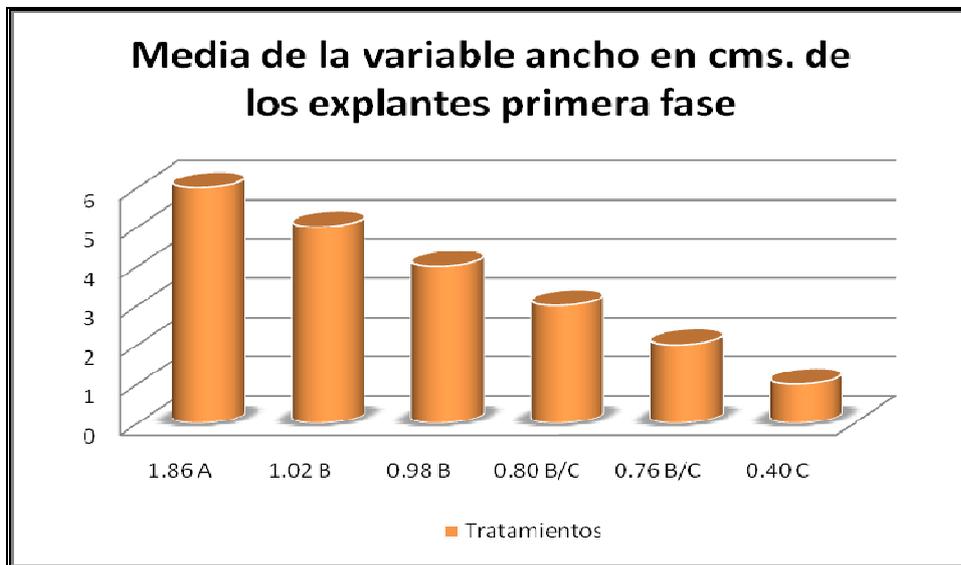


Figura 22. Media de la variable ancho en cms. de los explantes primera fase.

Se observa en la prueba de comparación de medias Tukey con un nivel de confianza del 95%, para la variable ancho del explante el tratamiento que mejores resultados generó fue el tratamiento No. 6 (Medio MS al 100% combinado con 1 mg/L de ANA y 3 mg/L de BAP) identificado en el cuadro 19 y en la figura 22 con la **letra A**, con una media de 1.86 centímetros de ancho. Los tratamientos que también presentaron una respuesta positiva pero en menor cantidad fueron los tratamientos 5 (MS al 100% combinado con 0.5 mg/L de ANA y 3 mg/L BAP) y 4 (MS al 100% combinado con 0.1 mg/L de ANA y 3 mg/L de BAP) identificados con la **letra B**, con una media de 1.02 y 0.98 centímetros respectivamente, en ambos tratamientos (4 y 5) no existe diferencia significativa entre ambos tratamientos, por lo cual al utilizar cualquiera de estos tratamientos se tendría una respuesta similar en crecimiento del ancho de los explantes.

4.8.2. Análisis estadístico para la variable largo del explante en centímetros.

Cuadro 20. Análisis de la varianza para la primera fase para la variable largo en centímetros.

VARIABLE	N	R ²	R ² Aj	CV
CENTIMETROS	54	0.32	0.25	44.39

Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT.

Cuadro 21. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable largo.

F.V	SC	Gl.	CM	F	P-valor
MODELO	10.09	5	2.02	4.60	<0.0017
TRATAMIENTOS	10.09	5	2.02	4.60	<0.0017
ERROR	21.07	48	0.44		
TOTAL	31.16	53			

Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT.

De acuerdo al análisis de varianza para la variable largo del explante cuadro 20, se observa que si existe una diferencia significativa entre los tratamientos al 0.05% y para establecer que tratamientos fueron estadísticamente iguales o diferentes entre si fue necesario utilizar el comparador de medias de Tukey al 0.05% de significancia como se muestra en el cuadro 21.

Cuadro 22. Prueba de Tuckey, con un error de 0.4390 y gl. 48 con alfa de 0.05.

TRATAMIENTOS	MEDIAS	N			
6	2.17	9	A		
4	1.68	9	A		
5	1.59	9	A	B	
2	1.48	9	A	B	
3	1.32	9	A	B	
1	0.72	9			B

Letras distintas indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

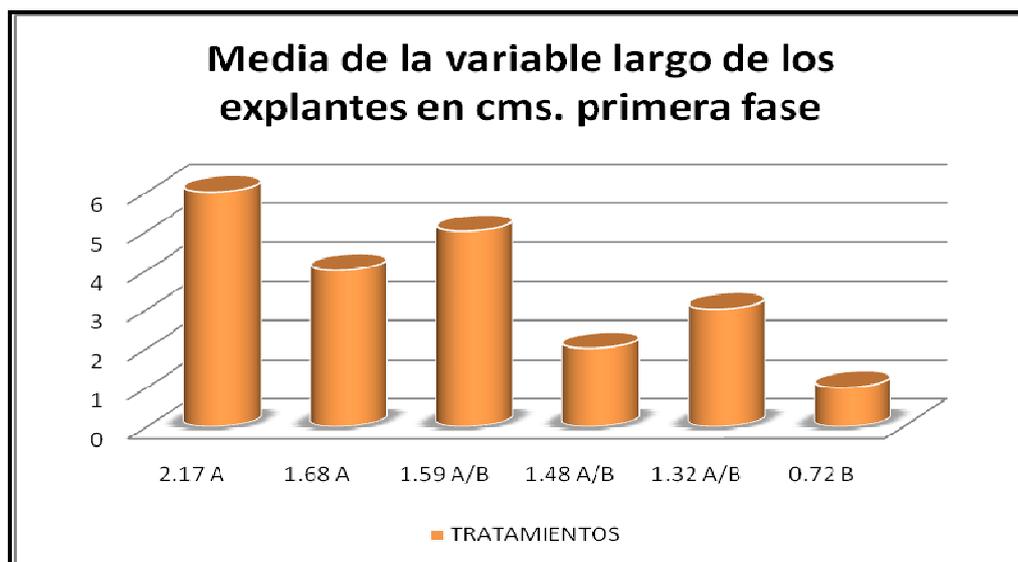


Figura 23. Media del largo de los explantes en la primera fase de la investigación.

Se observó en la prueba de comparación de medias Tukey con un nivel de confianza del 95%, que para la variable largo en centímetros del explante los tratamiento que mejores resultados generaron fueron los tratamientos No. 6 (Medio MS al 100% combinado con 1 mg/L de ANA y 3 mg/L de BAP) y el tratamiento No. 4 (MS al 100% combinado con 0.1 mg/L de ANA y 3 mg/L de BAP) identificado en el cuadro 20 y en la figura 22., con la **letra A**, con una media de 2.17 y 1.68 centímetros de largo, los tratamientos que también presentaron una respuesta positiva pero en menor cantidad fueron los tratamientos 5 (MS al 100% combinado con 0.5 mg/ de ANA y 3 mg/l BAP) el tratamiento 2 (MS al 100% combinado con 0.5 mg/l de ANA) Y el tratamiento 3 (MS al 100% y 0.10 mg/l de ANA) identificados con la **letras A/B**, con una media de 1.59, 1.48 y 0.98 centímetros de largo respectivamente, en ambos tratamientos no existe diferencia significativa, por lo cual al utilizar cualquiera de estos tratamientos se tendría una respuesta similar en crecimiento del largo de los explantes.

4.8.3. Análisis estadístico para la variable peso en gramos de los explantes.

Cuadro 23. Análisis de la varianza para la primera fase para la variable peso en gramos.

VARIABLE	N	R ²	R ² Aj	CV
GRAMOS	54	0.40	0.33	87.61

Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT.

Cuadro 24. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable peso en gramos

F.V	SC	Gl.	CM	F	P-valor
MODELO	60.96	5	12.19	6.31	<0.0001
TRATAMIENTOS	60.96	5	12.19	6.31	<0.0001
ERROR	92.74	48	1.93		
TOTAL	153.70	53			

Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT.

De acuerdo al análisis de varianza cuadro 23, se observa que si existe una diferencia significativa entre los tratamientos al 0.05% y para establecer que tratamientos fueron estadísticamente iguales o diferentes entre si fue necesario utilizar el comparador de medias de Tukey al 0.05% de significancia como se muestra en el cuadro 24.

Cuadro 25. Prueba de Tuckey, con un error de 1.9320 y gl. 48 con alfa de 0.05.

TRATAMIENTOS	MEDIAS	N		
6	3.52	9	A	
5	2.04	9	A	B
4	1.81	9	A	B
3	1.08	9		B
2	0.92	9		B
1	0.15	9		B

Letras distintas indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

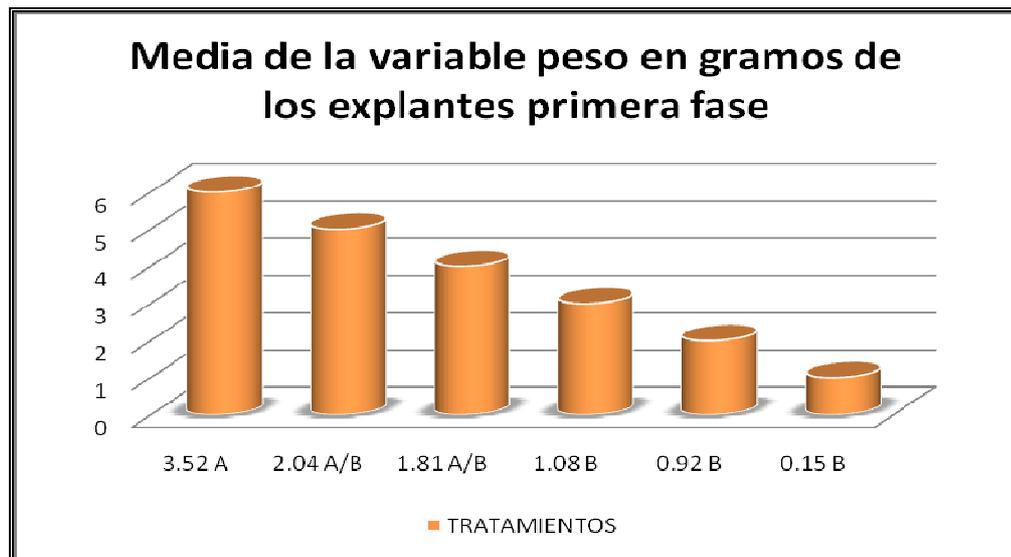


Figura 24. Media de la variable peso en gramos de los explantes en la primera fase.

Según la prueba comparación de medias Tukey con un nivel de confianza del 95%, que para la variable peso en gramos del explante el mejor tratamiento fue el No. 6 identificado con la **letra A** (Medio MS al 100% combinado con 1 mg/L de ANA y 3 mg/L de BAP) el cual contenía como se dijo anteriormente las mayores concentraciones de los reguladores de crecimiento evaluados. Los demás tratamientos que presentaron también una respuesta positiva en cuanto al peso del explante identificados con las **letras A/B**, estos fueron los tratamientos 5 MS al 100% combinado con 0.5 mg/L de ANA y 3 mg/L BAP), el tratamiento No. 4 (MS al 100% combinado con 0.1 mg/L de ANA y 3 mg/L de BAP) con una media en cuanto al peso en gramos de los explantes de 2.04 y 1.81 gramos respectivamente, entre ambos tratamientos no existe diferencia significativa, por lo cual al utilizar cualquiera de estos tratamientos se tendría una respuesta similar en cuanto al peso promedio de los mismos.

Discusión de resultados

Como se pudo observar tomando en cuenta los resultados obtenidos de la primera fase de la investigación que fue la multiplicación de los callos meristemáticos, y respaldados por los resultados obtenidos en el análisis estadísticos, los explantes que por sus condiciones tanto cualitativas como cuantitativas dieron mejores resultados fueron los sometidos al tratamiento No. 6 este fue multiplicado y trasladado a un medio que diera como resultado la regeneración de plántulas a partir de estos explantes.

Dicha respuesta se dio en el tratamiento en donde se tenían las mayores concentraciones de los reguladores de crecimiento, por ello es que al utilizar mayores concentraciones de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, las diferentes concentraciones de los mismos generaron que se diera el desarrollo del callo, iniciando con la fase de división celular y posteriormente se diera la diferenciación de las células aumentando así las células de tipo vascular y con ello las dimensiones del mismo. Harmann y Kester 1997.

Estos callos presentaron la característica citada por otros autores (Ovando. 2003) de desprenderse pequeños segmentos del mismo, debido a que presentan un crecimiento desorganizado y cuyas células no están bien adheridas entre si, por lo que muchas veces se les da la característica de friables, pueden disgregarse, es decir, presentan friabilidad

Los factores que más pueden afectar la formación del callo son el tipo de explante, ya que hay una mejor proliferación de células cuando este proviene de un tejido joven al tener un mayor potencial para la división celular como para la regeneración de plantas, y el otro factor es el medio de cultivo y sus condiciones tanto físicas como químicas (Palma, 1995).

En cuanto a la coloración presentada existen diversas coloraciones que se pueden presentar, dependiendo del grado de desarrollo que tenga el callo así también de la especie y parte de la planta que dio origen al mismo, sin que este asegure o no un resultado positivo en la regeneración de las plántulas, en la literatura citan que la coloración de este tejido varía, pueden existir callos que carecen de pigmentos, mientras que otros pueden ser de distintos tonos de verdes, amarillo, café o rojo citado Gonzalez, K. 2003.

4.9. Resultados segunda fase

Los resultados finales de esta fase fueron tomados aproximadamente 50 días después de sembrados los explantes en los medios de cultivos.

Cuadro 26. Resultados obtenidos en la segunda fase de las variables cualitativas.

TRATAMIENTOS	MEDIO	BAP (mg/l)	COLOR (% explantes)					ESTADO FITOSANITARIO (%)		MUERTOS (%)
			1 (10 YR 7/2)	2 (5 Y 5/4)	3 (5 Y (6/5)	4 (5Y 6/4)	5 (6Y 6/1)	SANO	INFECTADO	
T1	100	0.1		22	56		22	100	0	0
T2	50	0.1	11		67		22	80	10	10
T3	100	0.5	10		40		50	80		20
T4	50	0.5			80		20	100		
T5	100	1.0		20	60		20	100		
T6	50	1.0			78		22	90		10

Fuente: Elaboración propia, basada en datos recabados durante la investigación.

En el cuadro 26, se muestran los resultados para las variables cualitativas que color, estado fitosanitario y la sobrevivencia de los explantes, en la segunda fase de la investigación, estas variables están representadas en porcentaje, debido a que en los anexos de este documento se presentan los cuadros de manera detallada, la cantidad de explantes que se evaluaron y cuál fue la respuesta de los mismos en cuanto a cada tratamiento y variables.

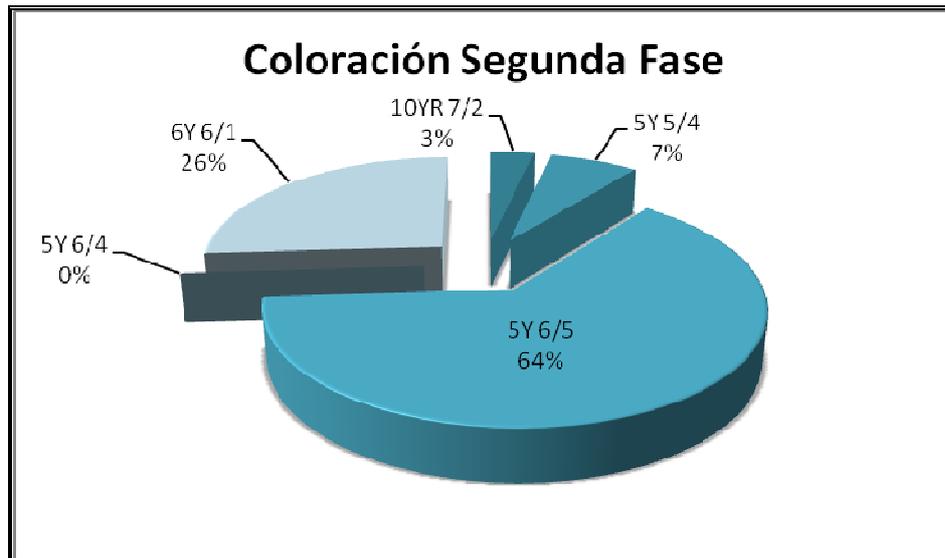


Figura 25. Porcentaje de la coloración presentada en los explantes, segunda fase.

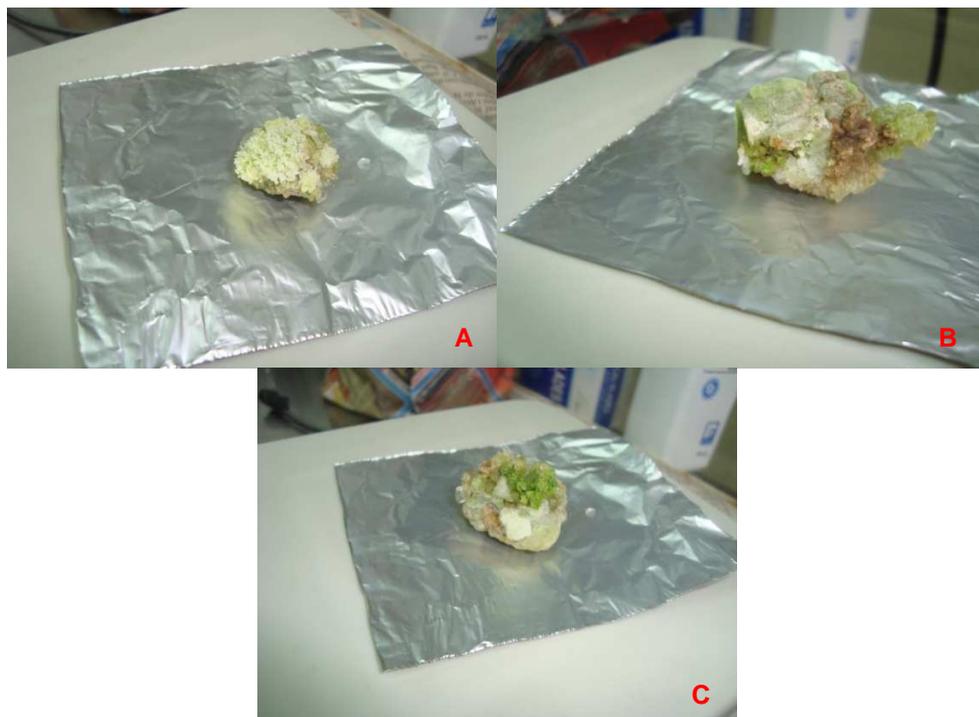


Figura 26. En ambas figuras (A,B,C,) se muestran las diferentes coloraciones presentadas.

En la figura 24 la coloración presentada por los explantes sometidos a los diversos tratamientos de la segunda fase de esta investigación, fue una coloración verde amarillenta 64% (5Y 6/5), un 26% presentó oxidación (6 Y 6/1), color blanco un 3% (10 YR 7/2) y con una coloración blanco amarillenta el 7% del total de los explantes, algunas de ellas se muestran en la figura 25, en donde se muestran la mayoría de las coloraciones presentadas durante esta fase y en cuanto a al estado fitosanitario de los explantes, el 98% de los explantes estaban libres de hongos u bacterias, únicamente el 2% del total de los explantes presentó infección por bacteria (ver figura 26).

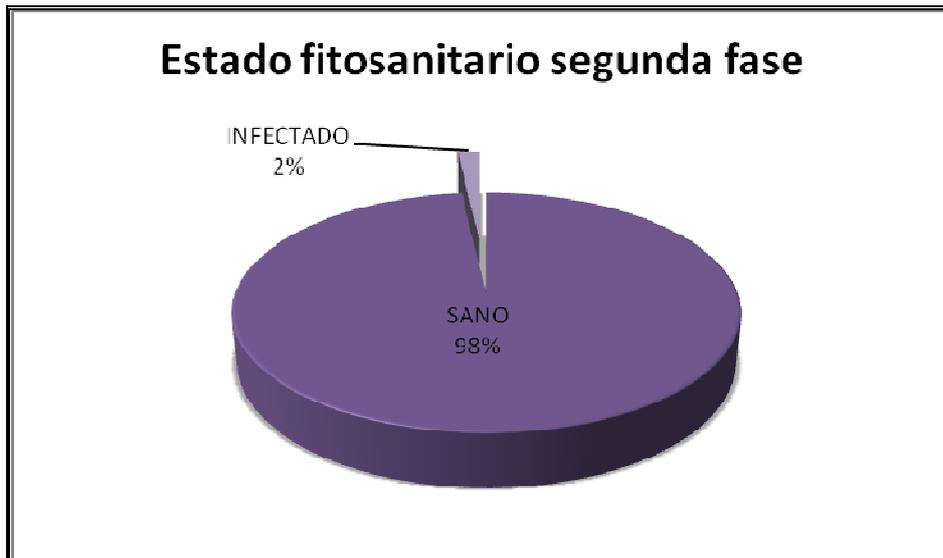


Figura 27. Estado fitosanitario de los explantes en la segunda fase de investigación.

Cuadro 27. Resultados obtenidos en la segunda fase para las variables cuantitativas.

TRATAMIENTOS	MEDIO	BAP (mg/l)	TAMAÑO Cms.		PESO Grs.
			LARGO	ANCHO	
T1	100	0.1	1.77	1.41	1.738
T2	50	0.1	2.18	1.88	3.57
T3	100	0.5	1.15	0.93	1.62
T4	50	0.5	2.66	2.38	4.24
T5	100	1.0	4.74	4.37	6.69
T6	50	1.0	3.08	2.72	4.42

Fuente: Elaboración propia basada en datos recabados durante la investigación.

El objetivo primordial de esta fase consistió en la regeneración de plántulas a partir de callos meristemáticos, pero en ninguno de los tratamientos evaluados se logró una respuesta positiva debido a que los callos meristemáticos únicamente crecieron en cuanto al tamaño y el peso, únicamente los tratamientos 3 y 5 de esta fase presentaron posibles brotes, pero no se logró su completo desarrollo. De ellos en el tratamiento 3 únicamente un explante presentó 1 posible brote y el tratamiento 5 presentó 3 explantes.



Figura 28. Se muestra los posibles brotes regenerados a partir de callos meristemáticos.

Se menciona en la literatura que para que se dé la regeneración de una plántula a partir de callos es necesario que pase por diferentes estadios donde se va dando la diferenciación celular, para posteriormente formar los posibles brotes que son llamados embrioides, los cuales en muchos casos pueden o no dar origen posteriormente a plantas (Hartmann Y Kester, 1997).

En nuestro caso no fue posible que esto se generara ya que luego de 1 mes en el medio de cultivo MS al 100%, esos no mostraron respuesta alguna.

4.9.1. Análisis estadístico para la variable ancho en centímetros de los explantes

Cuadro 28. Análisis de la varianza para la segunda fase de la investigación variable largo.

VARIABLE	N	R ²	R ² Aj	CV
CENTIMETROS	60	0.41	0.36	56.74

Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT.

Cuadro 29. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable largo en centímetros.

F.V	SC	Gl.	CM	F	P-valor
MODELO	66.44	5	13.29	7.55	<0.0001
TRATAMIENTOS	66.44	5	13.29	7.55	<0.0001
ERROR	95.07	54	1.76		
TOTAL	161.51	59			

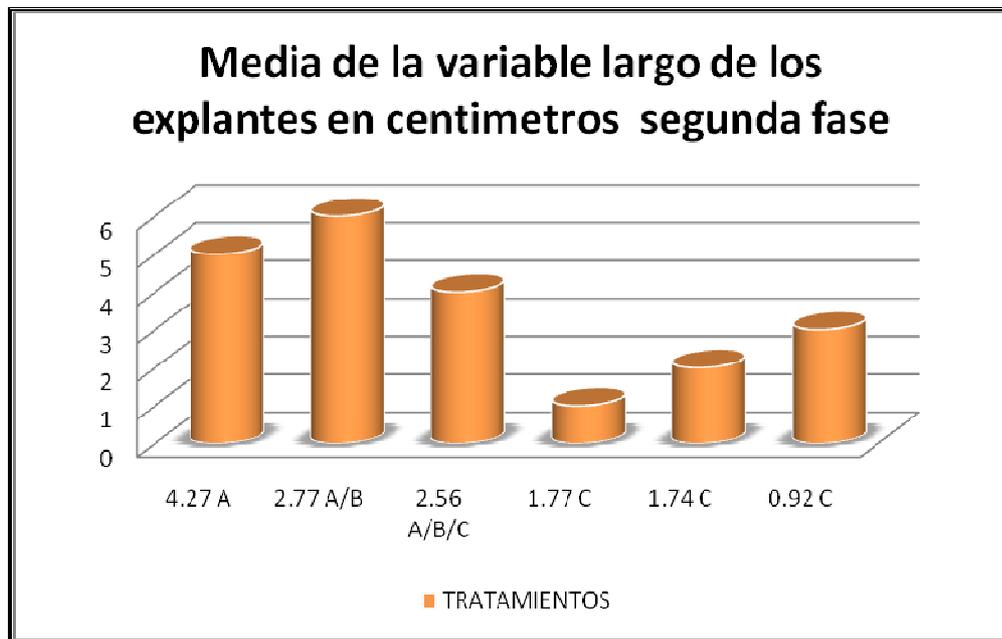
Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT.

De acuerdo al análisis de varianza para la variable largo del explante cuadro 28, se observa que si existe una diferencia significativa entre los tratamientos al 0.05% y para establecer que tratamientos fueron estadísticamente iguales o diferentes entre si, fue necesario utilizar el comparador de medias de Tukey al 0.05% de significancia como se muestra en el cuadro 29.

Cuadro 30. Prueba de Tuckey, con un error de 1.7605, y gl. 54 con un alfa de 0.05.

TRATAMIENTOS	MEDIAS	N			
5	4.27	10	A		
6	2.77	10	A	B	
4	2.56	10	A	B	C
1	1.77	10		B	C
2	1.74	10		B	C
3	0.92	10			C

Letras distintas indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

**Figura 29.** Media de la variable largo en centímetros de los explantes segunda fase.

Por medio de la prueba de comparación de medias Tukey con un nivel de confianza del 95%, se determinó que para la variable largo en centímetros del explante los tratamientos que mejores resultados generaron fueron los tratamientos 5 (Medio MS al 100% combinado con 1 mg/L de BAP) y el tratamiento 6 (MS al 50% combinado con 1 mg/L de BAP) identificado en la figura 28, con la letra A, con una media de 4.17 y 2.77 centímetros de largo, los demás tratamientos se podría decir que no presentaron diferencia significativa entre ellos, estos son los identificados con la letras C estos fueron los tratamientos del 1 al 3 respectivamente, por lo cual al utilizar cualquiera de estos tratamientos se tendría una respuesta similar en crecimiento del largo de los explantes pero en mejor cantidad de centímetros que los tratamientos identificados con las letras A y B.

4.9.2. Análisis de la varianza para la segunda fase de la investigación variable ancho.

Cuadro 31. Análisis de la varianza para la segunda fase de la investigación variable ancho.

VARIABLE	N	R ²	R ² Aj	CV
CENTIMETROS	60	0.43	0.38	59.72

Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT.

Cuadro 32. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable ancho en centímetros.

F.V	SC	Gl.	CM	F	P-valor
MODELO	62.31	5	12.46	8.17	<0.0001
TRATAMIENTOS	62.31	5	12.46	8.17	<0.0001
ERROR	82.36	54	1.53		
TOTAL	144.66	59			

Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT.

De acuerdo al análisis de varianza para la variable largo del explante cuadro 31, se observa que si existe una diferencia significativa entre los tratamientos al 0.05% y para establecer que tratamientos fueron estadísticamente iguales o diferentes entre si fue necesario utilizar el comparador de medias de Tukey al 0.05% de significancia como se muestra en el cuadro 32.

Cuadro 33. Prueba de Tuckey, con un error de 1.53 y gl. De 54 con un alfa de 0.05.

TRATAMIENTOS	MEDIAS	N			
6	3.93	10	A		
5	2.45	10	A	B	
4	2.38	10	A	B	C
2	1.50	10		B	C
1	1.41	10		B	C
3	0.74	10			C

Letras distintas indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

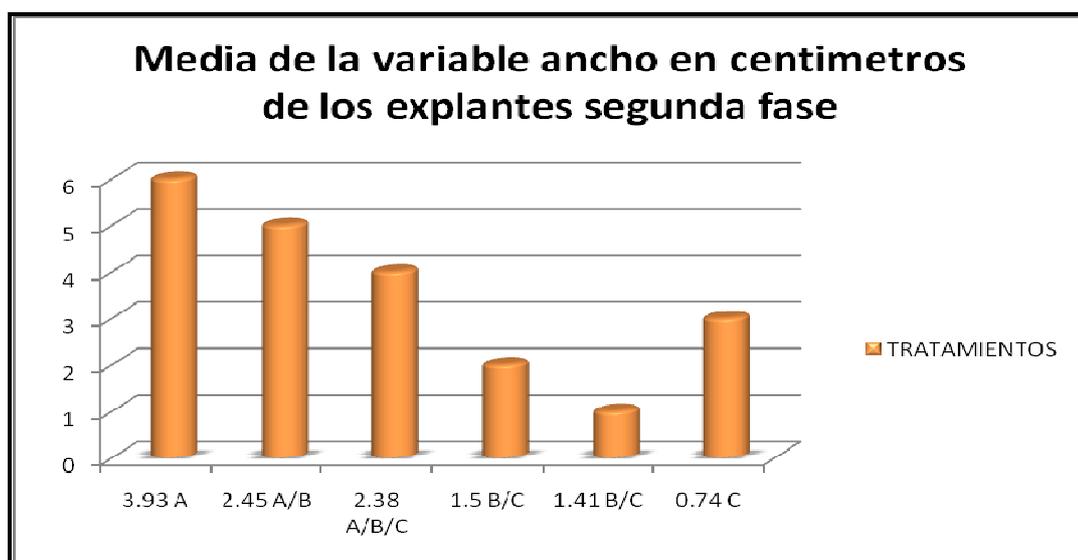


Figura 30. Media de la variable ancho en centímetros de los explantes segunda fase

Por medio de la prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de 95% de confianza se determinó que en cuanto a la variable ancho en centímetros de los explantes, el mejor tratamiento lo constituyó el 6 (50% MS y 1 mg/L de BAP) con una media de 3.93 centímetros de ancho e identificado con la letra A, en cuanto a los demás tratamientos solo existe una diferencia significativa entre el tratamiento 5 identificado con las letras A/B, debido a que tiene una media de 2.45 centímetros, y este es el que tiene una mayor concentración tanto en el medio MS como en el regulador de crecimiento utilizado.

4.9.3. Análisis de la varianza segunda fase de investigación variable peso en gramos.

Cuadro 34. Análisis de la varianza para la segunda fase de la variable peso en gramos.

VARIABLE	N	R ²	R ² Aj	CV
GRAMOS	60	0.39	0.34	59.90

Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT.

Cuadro 35. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable peso en gramos.

F.V	SC	Gl.	CM	F	P-valor
MODELO	145.78	5	29.16	6.99	<0.0001
TRATAMIENTOS	145.78	5	29.16	6.99	<0.0001
ERROR	225.40	54	4.17		
TOTAL	371.18	59			

Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT.

De acuerdo al análisis de varianza para la variable peso en gramos de los explantes en el cuadro 34, se observa que si existe una diferencia significativa entre los tratamientos al 0.05% y para establecer que tratamientos fueron estadísticamente iguales o diferentes entre si fue necesario utilizar el comparador de medias de Tukey al 0.05% de significancia como se muestra en el cuadro 35.

Cuadro 36. Prueba de Tuckey, con un error de 4.17 y gl de 54 con un alfa de 0.05-

TRATAMIENTOS	MEDIAS	N			
5	6.02	10	A		
4	4.24	10	A	B	
6	3.98	10	A	B	C
2	3.02	10		B	C
1	1.74	10		B	C
3	1.46	10			C

Letras distintas indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$)

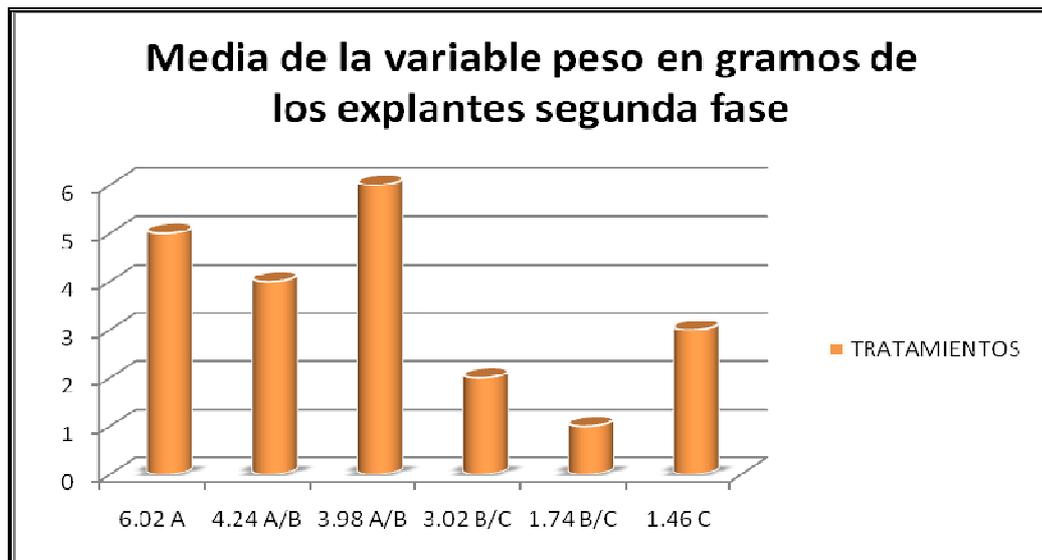


Figura 31. Media de la variable peso en gramos de los explantes segunda fase.

Como se puede observar en esta variable el peso mayor está en el tratamiento No. 5 (MS al 100% y 1 mg/l de BAP), por el resultado este es el que tiene una diferencia significativa en comparación con los demás tratamientos, en comparación con los demás tratamientos los cuales tienen poca diferencia entre ambos por los cuales sería difícil obtener una respuesta como la del tratamiento 6 identificada con la letra A.

Discusión de resultados

Una respuesta similar la obtuvieron expertos en Chiapas, México al realizar una investigación a partir de explantes foliares en dicha investigación se evaluaron 22 accesiones foliares de esta misma especie de las cuales únicamente la mitad formó callos y de estas únicamente 5 lograron diferenciar brotes, atribuyéndose esto a que existirá diferente respuesta dependiendo del genotipo del material utilizado (Peraza, A., Ortega, J., Rivera C. 2009).

Es muy importante también tomar en cuenta que las respuestas tanto cualitativas como cuantitativas del crecimiento del callo en cultivo de tejidos, implican un sinergismo entre el origen del tejido usado para inducción, la composición del medio y las condiciones físicas que prevalecen durante ésta etapa (Raggio, M., Moro-Raggio, N., 2004).

Aunque en países como la India se han logrado tener resultados positivos por medio de este método, es importante lograr obtener resultados con especies endémicas de cada región, tomando en cuenta que según Peraza, A., y Ortega, J., la organogénesis indirecta es un proceso viable para la micropropagación de *Jatropha curcas* L. sin embargo, los protocolos publicados no son igual de eficientes para todos los genotipos por lo que se precisa evaluarlos.

En cuanto a las dosis utilizadas en los tratamientos se tomaron en cuenta debido a que según la literatura altos niveles de citocininas pueden promover la proliferación de brotes y mientras que altas concentraciones de auxinas promueven la formación de callos, es por ello que en nuestros tratamientos las concentración mayor era del regulador bencilaminopurina para lograr realizar nuestro objetivo.

En cuanto a realizar esta regeneración de plántulas a partir de callos se vuelve algo difícil debido también a que uno de los mayores problemas de la biotecnología es lograr que la actividad se vuelva organizada, para que se produzcan los órganos vegetales.

En cuanto a estos tratamientos como se dijo anteriormente en ninguno de ellos se logró desarrollar plántulas concretas únicamente embrioides, los cuales en muchos casos pueden o no dar origen posteriormente a plantas (Hartmann Y Kester, 1997).

Debido a esto se tomo la decisión de realizar tratamientos alternativos, dichos tratamientos fueron recomendados por el Ing. Makmilan Cruz, quien por su experiencia seleccionó la combinación de de sales de MS así como los reguladores de crecimiento ácido giberélico y cinetina.

El ácido giberélico en cultivo de tejidos controla la diferenciación celular así como ayuda en el alargamiento de los mismos en cuanto a la cinetina ayuda en la proliferación celular, que en nuestro caso podría ayudar a dar resultados positivos para la investigación.

8.1. Resultados de los tratamientos alternativos

En este primer ensayo se realizó la combinación del ácido giberélico y la cinetina y para tratamiento se realizaron 4 repeticiones siendo los siguientes:

Cuadro 37. Tratamientos utilizados para desarrollar este ensayo.

Tratamiento	MS %	GA3 (mg por Litro)	CINETINA (mg por litro)
T1	100	0	0.0
T2	50	0	0.0
T3	50	1	0.5
T4	50	0.5	0.25
T5	25	0	0
T6	25	1.0	0.5
T7	25	0.5	0.25

Fuente: Elaboración propia, basado en los tratamientos realizados.

Cuadro 38. Resultados obtenidos de los tratamientos adicionales a esta investigación.

TRATAMIENTOS	MEDIO MS %	GA 3 (mg/l)	CINETINA (mg/l)	COLOR (% explantes)					ESTADO FITOSANITARIO (%)	
				1 (10 YR 7/2)	2 (5 Y 5/4)	3 (5 Y 6/5)	4 (5Y 6/4)	5 (6Y 6/1)	SANO	INFECTADO
T1 ADI	100	0	0.0	-	-	100	-	-	100	-
T2 ADI		0	0.0	-	33	34	33	-	75	25
T3 ADI		1	0.5	-	-	100	-	-	100	-
T4 ADI		0.5	0.25	-	-	100	-	-	100	-
T5 ADI		0	0	-	50	50	-	-	100	-
T6 ADI		1.0	0.5	-	-	75	25	-	100	-
T7 ADI		0.5	0.25	-	-	100	-	-	100	-

Fuente: Elaboración propia, basada en datos recabados durante la investigación.

En cuanto a estos tratamientos también se presentan en porcentaje igual que en las anteriores fases de la investigación, las tablas más detalladas se presentan en los anexos de este documento. La terminación **ADI**, se agrego para hacer una diferencia de los tratamientos anteriores, esta significa adicional ya que estos se adicionaron al documento para lograr obtener resultados positivos.

La coloración varió debido a que se noto que la mayoría de los explantes generó un color verde amarillento y es importante resaltar que en estos medios de cultivo no hubo oxidación.

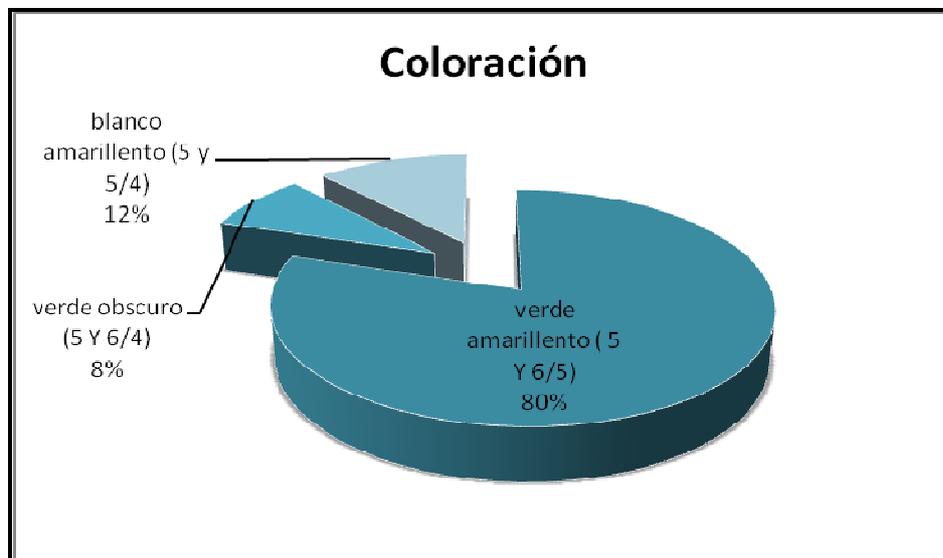
**Figura 32.** Coloración presentada para el primer ensayo de los tratamientos adicionales.



Figura 33. Estado fitosanitario generado en el primer ensayo de los tratamientos adicionales.

Cuadro 39. Resultados cuantitativos del primer ensayo de los tratamientos adicionales.

TRATAMIENTOS	MEDIO	GA 3 (mg/L)	CINETINA (mg/L)	TAMAÑO Cms.		PESO Grs.
				LARGO	ANCHO	
T1 ADI	100	0	0.0	1.46	1.14	0.59
T2 ADI		0	0.0	0.97	0.61	0.51
T3 ADI		1	0.5	1.19	1.57	1.27
T4 ADI		0.5	0.25	1.41	1.45	1.02
T5 ADI		0	0	1.27	0.94	0.76
T6 ADI		1.0	0.5	3.30	3.01	5.28
T7 ADI		0.5	0.25	2.76	2.70	4.73

Elaboración propia, basada en datos recabados durante la investigación.

Discusión de resultados

Como se puede observar al igual que en los resultados anteriores únicamente se desarrollo el callo en cuanto a tamaño y peso, debido a que tanto las giberelinas como la cinetina ayudaron a que se diera la elongación celular de los explantes, como se puede ver el tratamiento 6 presentó un mayor desarrollo debido a que se utilizaron concentraciones mayores de los reguladores, ayudando de tal manera a generar estos resultados.

Únicamente se pudo notar que los callos se mantuvieron mejor preservados ya que presentaron una coloración verde amarillenta y verde oscura lo cual los podría ser aptos para que hubieran desarrollado un brote.

Posteriormente al ver que no se lograron tampoco resultados positivos con estos tratamientos, se procedió a realizar un último tratamiento evaluando aquí concentraciones mayores tanto de citocininas como de auxinas, ya que según la revisión bibliográfica ha dado resultados positivos en cuanto a la regeneración de plántulas pero a partir de yemas dicho tratamiento se detalla a continuación:

Cuadro 40. Ultimo tratamiento realizado durante esta fase de investigación.

TRATAMIENTO	MEDIO Y CONCENTRACION	Regulador de Crecimiento	CONCENTRACION (mg/L) Regulador de crecimiento
8 Adi	MS (100%)	BAP	2
		ANA	0.5

Fuente: Elaboración propia basados en datos recabados durante la investigación.

Cuadro 41. Tratamiento No. 8 adicional, combinación de BAP y ANA.

TRATAMIENTO No. 8 CON BAP Y ANA					
No. Repetición	TAMAÑO		COLOR	PESO Grs.	ESTADO
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO
1	4.1	3.0	3	14.51	sano
2	5.7	3.5	3	11.25	sano
3	3.8	2.3	3	9.11	sano
4	3.3	2.5	3	9.75	sano
Promedios	4.22	2.83		11.15	

Fuente: Elaboración propia basados en datos recabados durante la investigación.



Figura 34. Se muestra el desarrollo de los explantes sometidos a este tratamiento.



Figura 35. Coloración de los explantes sembrados el tratamiento No. 8 adicional.



Figura 36. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en este tratamiento.

Estos explantes respondieron en mayor tamaño que el resto de los demás tratamientos realizados durante toda la investigación, teniendo un peso promedio de 11.16 gramos y unas dimensiones de 4.22 cms. de largo y 2.83 cms de ancho, como se muestra en el cuadro 39 y en la figura 33. Así como todos los explantes presentaron una coloración verde amarillenta y su estado fitosanitario fue sano ya que no se detectó presencia de hongos o bacterias en los explantes ver figuras 34.

Se presenta el análisis estadístico realizando comparaciones entre los tratamientos evaluados en la segunda fase de esta investigación y los tratamientos complementarios, esto con el fin de observar cual fue el mejor tratamiento entre los mismos.

4.9.4. Análisis estadístico para la variable ancho en centímetros de los explantes

En los siguientes cuadros (cuadros 41 al 58) se realiza una comparación entre los tratamientos de la segunda fase y los tratamientos adicionales, ya que los 14 tratamientos realizados eran con el propósito de realizar la regeneración de las plántulas a partir de los callos que se multiplicaron en la primera fase de la investigación. Es importante resaltar que en dicho cuadro existen tratamientos identificados como 1ADI, eso quiere decir que es el tratamiento No.1 adicional, los demás tratamientos que únicamente tienen numeración (1, 2 etc.) son los 6 tratamientos originales de la investigación.

Cuadro 42. Análisis de la varianza para la segunda fase de investigación variable ancho.

VARIABLE	N	R ²	R ² Aj	CV
CENTIMETROS	101	0.53	0.45	51.97

Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT.

Cuadro 43. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable ancho en centímetros.

F.V	SC	Gl.	CM	F	P-valor
MODELO	94.07	14	6.72	6.82	<0.0001
TRATAMIENTOS	94.07	14	6.72	6.82	<0.0001
ERROR	84.69	86	0.98		
TOTAL	178.76	100			

Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT

Cuadro 44. Prueba de Tuckey, con un error de 0.9848 y gl. 86, con un alfa de 0.05.

TRATAMIENTOS	MEDIAS	N					
5	3.93	10	A				
6 ADI	3.10	4	A	B			
8 ADI	2.83	4	A	B	C		
7 ADI	2.70	4	A	B	C	D	
6	2.45	10	A	B	C	D	E
4	2.38	10	A	B	C	D	E
3 ADI	1.57	4		B	C	D	E
2	1.50	10		B	C	D	E
4 ADI	1.45	4		B	C	D	E
1	1.41	10		B	C	D	E
1 ADI	1.15	4		B	C	D	E
5 ADI	0.94	4			C	D	E
3	0.74	10				D	E
2 ADI	0.46	4					E

Letras distintas indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

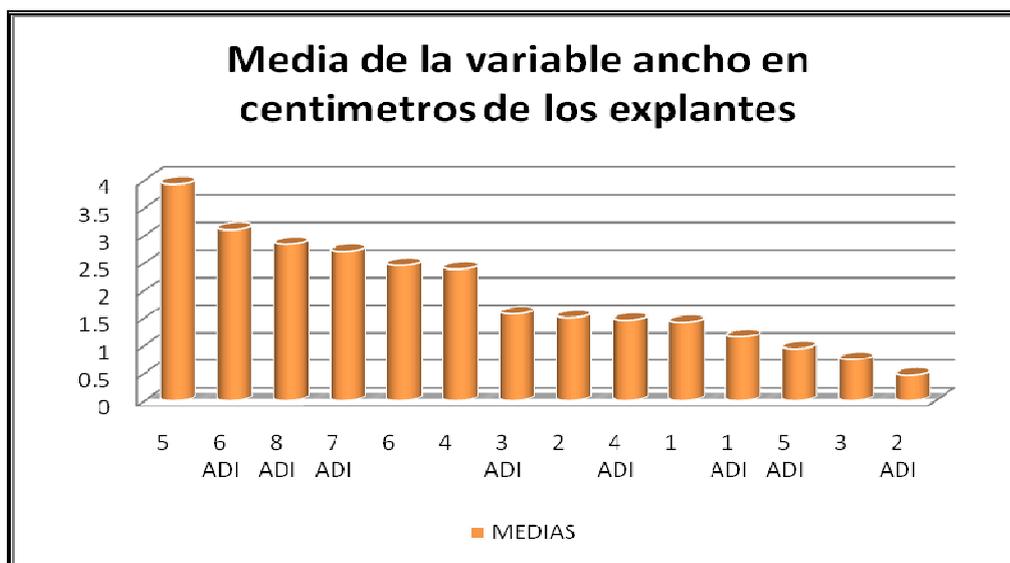


Figura 37. Media de la variable ancho en centímetros de los explantes.

Se indica que el mejor tratamiento para esta variable fue el tratamiento 5 debido a que fue el que obtuvo un ancho de 3.93 centímetros seguido por el tratamiento 6 adicional con 3.1^o centímetros de largo en ambos tratamientos se tienen concentraciones altas de reguladores de crecimiento.

4.9.5. Análisis estadístico para la variable largo en centímetros de los explantes

Cuadro 45. Análisis de la varianza para la segunda fase de investigación variable largo.

VARIABLE	N	R ²	R ² Aj	CV
CENTIMETROS	101	0.52	0.44	49.52

Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT.

De acuerdo al análisis de varianza para la variable peso en gramos de los explantes en el cuadro 45, se observa que si existe una diferencia significativa entre los tratamientos al 0.05% y para establecer que tratamientos fueron estadísticamente iguales o diferentes entre si fue necesario utilizar el comparador de medias de Tukey con una significancia del 95% y un error de 5% como se muestra en el cuadro 46.

Cuadro 46. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable largo en centímetros

F.V	SC	Gl.	CM	F	P-valor
MODELO	111.40	14	7.96	6.62	<0.0001
TRATAMIENTOS	111.40	14	7.96	6.62	<0.0001
ERROR	103.44	86	1.20		
TOTAL	214.83	100			

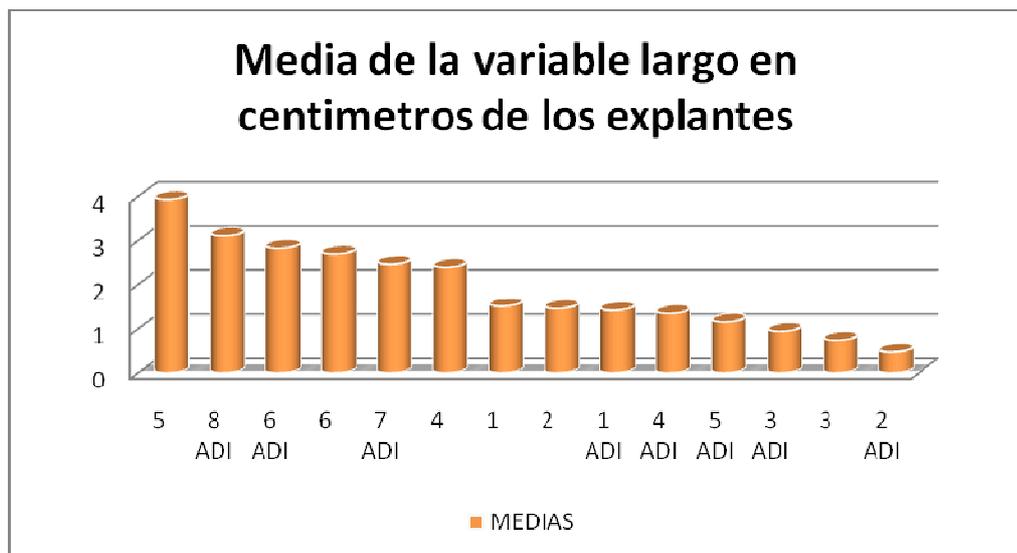
Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT.

Cuadro 47. Prueba de Tuckey, con un error de 1.2027 y gl. 86, con un alfa de 0.05.

TRATAMIENTOS	MEDIAS	N					
5	3.93	10	A				
8 ADI	3.10	4	A	B			
6 ADI	2.83	4	A	B	C		
6	2.70	4	A	B	C	D	
7 ADI	2.45	10	A	B	C	D	E
4	2.38	10	A	B	C	D	E
1	1.50	10		B	C	D	E
2	1.45	4		B	C	D	E
1 ADI	1.41	10		B	C	D	E
4 ADI	1.34	9		B	C	D	E
5 ADI	1.15	4		B	C	D	E
3 ADI	0.94	4			C	D	E
3	0.74	10				D	E
2 ADI	0.46	4					E

Letras distintas indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

Según se puede observar en el cuadro 45, el mejor tratamiento fue el tratamiento 5 debido a que se tuvo un mejor desarrollo seguido del tratamiento 8 ADI, el cual contiene una alta concentración tanto de citocinina y auxina, al igual que el tratamiento 6 ADI generó resultados positivos en cuanto al desarrollo del callo.

**Figura 38.** Medias de la variable largo en centímetros para la segunda fase.

4.9.6. Análisis estadístico para la variable peso en gramos de los explantes.

Cuadro 48. Análisis de la varianza para la segunda fase de la variable peso en gramos.

VARIABLE	N	R ²	R ² Aj	CV
CENTIMETROS	101	0.69	0.63	52.67

Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT.

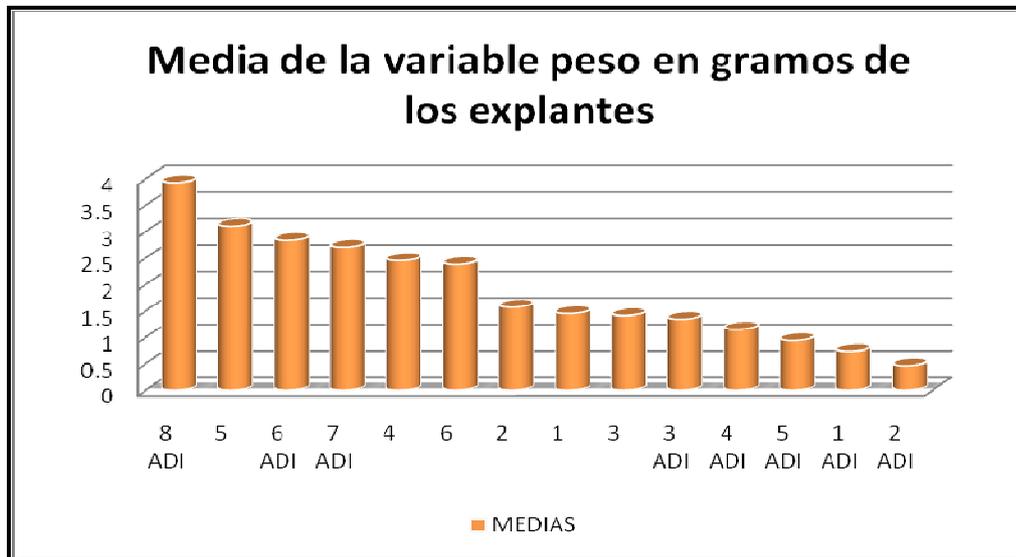
Cuadro 49. Análisis de la varianza (SC TIPO III), para la variable peso en gramos.

F.V	SC	Gl.	CM	F	P-valor
MODELO	549.20	14	39.23	13.42	<0.0001
TRATAMIENTOS	549.20	14	39.23	13.42	<0.0001
ERROR	251.41	86	2.92		
TOTAL	800.61	100			

Fuente: Datos elaborados por programa INFOSTAT

Cuadro 50. Prueba de Tuckey, con un error de 1.2027 y gl. 86, con un alfa de 0.05.

TRATAMIENTOS	MEDIAS	N						
8 ADI	3.93	10	A					
5	3.10	4	A	B				
6 ADI	2.83	4	A	B	C			
7 ADI	2.70	4	A	B	C	D		
4	2.45	10	A	B	C	D	E	
6	2.38	10	A	B	C	D	E	
2	1.57	4		B	C	D	E	
9 ADI	1.50	10		B	C	D	E	
1	1.45	4		B	C	D	E	
3	1.41	10		B	C	D	E	
3 ADI	1.34	9		B	C	D	E	
4 ADI	1.15	4		B	C	D	E	
5 ADI	0.94	4			C	D	E	
1 ADI	0.74	10				D	E	
2 ADI	0.46	4					E	

Letras distintas indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).**Figura 39.** Media de la variable peso en gramos para la segunda fase.

En cuanto al peso del callo indudablemente de todos los tratamientos evaluados el mejor tratamiento fue el tratamiento 8 ADI, en el cual se trabajó con concentraciones altas de los reguladores bencilaminopurina y ácido naftalenacético.

Discusión de resultados

Como se observa ninguno de los tratamientos dio el resultado esperado, únicamente se logró tener un mayor desarrollo del callo en cuanto a las variables largo y ancho en centímetros y peso de los callos meristemáticos, notándose esto en el tratamiento donde se utilizó una mayor concentraciones de benzilaminopurina con una concentración de 3 mg/L. lo que implica una mayor acción de parte de las citoquinina ya que se utilizan en bajas concentraciones para estimular la proliferación de tejidos y en concentraciones más elevadas para desencadenar la neoformación de yemas sobre callos según Margara, 1988 y las auxinas a bajas concentraciones ayudan en la división celular.

Es por ello que en el tratamiento donde se utilizo estas concentraciones fue el que mayor tamaño produjo incluso que los de la primera fase de la investigación esto podría deberse también a que existe siempre un remanente de reguladores de crecimiento que se quedan adheridos al explante y que siguen funcionando dentro del mismo luego de un tiempo.

9. Conclusiones

- 9.1. Se acepta la hipótesis planteada en cuanto a que el medio de Murashine y Skoog y una de las combinaciones de dos reguladores de crecimiento auxinas-citocininas permitieran incrementar significativamente el crecimiento de los callos meristemáticos de *Jatropha curcas* L. var. Huehuetenango, ya que en base a los resultados obtenidos en esta investigación el mejor tratamiento para la multiplicación de estos callos fue de 3mg/l de benzilaminopurina combinado con 1 mg/l de ácido naftalenacético en un medio de sales MS al 100%.
- 9.2. Se rechaza la hipótesis planteada en cuanto a que algunas de las combinaciones de citoquinina (BAP) y el medio de sales de Murashine y Skoog, utilizadas en esta investigación, producirían brotes en los callos meristemáticos generados en la primera fase de la investigación, debido a que ninguno de los tratamientos regeneró plántulas, únicamente se lograron regenerar embrioides.
- 9.3. Altas concentraciones de reguladores de crecimiento (auxinas) promueven la formación de callos meristemáticos y la generación de embrioides en un callo meristemático no garantiza que estos se logren desarrollar posteriormente en un brote bien diferenciado.

10. Recomendaciones

- ▣ Se recomienda realizar una colecta y posterior germinación de semillas, de esta variedad Cuilco, Huehuetenango, en bandejas de tubetes utilizando como sustrato tierra, pitmost y arena, con el objetivo de contar con material fresco, para realizar un ensayo de regeneración de plántulas a partir de callos meristemáticos generados de las secciones foliares o de raíz de dicha especie vegetal, ya que se han tenido respuesta positiva en otros genotipos, así como lograr garantizar la conservación de dicha especie vegetal, por medio de un banco de germoplasma.
- ▣ Se recomienda que al tener estos callos meristemáticos, se vuelva a experimentar con los mejores tratamientos evaluados en la presente investigación, así también evaluar el tratamiento .8 de los tratamientos adicionales, los cuales contienen mayores concentraciones de reguladores de crecimiento, para evaluar cual de los dos genera mejores resultados en esta variedad.
- ▣ Al utilizar un callo meristemático para investigación que no exceda de 6 meses como máximo, el tiempo en que el explante haya sido sembrado, así también que no haya sido cambiado de medio un máximo de 5 veces, ya que los materiales tienden a deteriorarse disminuyendo así la probabilidad de contar con resultados favorables en las investigaciones a realizar.
- ▣ Se recomienda también someter callos meristemáticos de esta especie vegetal, a ensayos con combinaciones de ácido giberélico y cinética, para observar la respuesta del mismo a estas combinaciones y confirmar así, si se preserva mejor el material vegetal.
- ▣ Se recomienda utilizar para las investigaciones material hojas jóvenes, debido a que en otros estudios se han tenido mayores respuestas en materiales con esta condición.
- ▣ Para próximas investigaciones se recomienda ampliar las variables a evaluar, tales como semillas, embriones, hojas y vástagos estos últimos colocarlos en cajas con arena y de estos materiales se pueden sacar explantes para la continuación de ensayos dentro del laboratorio de tejidos vegetales.

11. Bibliografía

1. Ahuja, M. 1985. *In vitro* techniques in clonal propagation of forest tree species. In Schafer-Menuhr, A (ed.). *In vitro* techniques. Dordrecht, The Netherlands, Martinus Nijhoff Publishers. P. 41-48.
2. Alfonso Martoli, JA. 2008. Manual para el cultivo de piñón (*Jatropha curcas*) en Honduras (en línea). Honduras. Consultado 10 ene 2009. Disponible en <http://www.gotaverde.org/userfiles/file/D17c%20Manual%20Cultivo%20Jatropha.pdf>
3. Amador, D. 2009. FAUSAC y agricultores investigan cultivo de piñón para generar biodiesel. Guatemala, USAC, Facultad de Agromomía, Boletín AGRO no. 1:página 56.
4. Azurdia, C; Asturias, R; Barillas, E; Montes, L. 2008. Caracterización molecular de las variedades de *Jatropha curcas* Guatemala con fines de mejoramiento: informe final proyecto AGROCYT 12-2005. Guatemala, CONCYT / MAGA / OCTAGON / AGEXPORT. 46 p.
5. Castilla Valdez, Y. 2006. Aplicación de citoquininas y auxinas (en línea). Argentina. Consultado 22 mar 2009. Disponible en <http://foroarchive.infojardin.com/orquidea/t-18608.html>
6. Chan Sánchez, TJ; Ortega Roja, JA; Rivera Loarca, CF. 2009. Organogénesis directa en accesiones de *Jatropha curcas* L. colectadas en Chiapas (en línea). In Congreso nacional de biotecnología y bioingeniería (2009, MX). Acapulco, Guerrero, México. Consultado 25 jun 2010. Disponible en http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_II/CII-18.pdf
7. Consejo Indio de Investigación Forestal y Educación, IN. 2004. *Jatropha curcas* (en línea). Dehradun, India, Instituto de Investigación Forestal. 11 p. Consultado 8 ene 2009. Disponible en <http://jatrophacolombia.webcindario.com/Jatrophacurcas.htm>
8. Criba.edu. 2004. Reguladores de crecimiento (en línea). Argentina. Consultado 10 ene 2009. Disponible en <http://www.criba.edu.ar/agronomia/carreras/otras/materias/555/archivos/hormonas-fotosintesis-crecimiento-nutricion.pdf>
9. Godoy, E. 2009. Apoyan a programa local de biodiesel. Prensa Libre, Guatemala, Guatemala, abril 27:1.
10. Gomez Culajay, JH. 2006. Producción de plántulas de izote pony (*Beaucarnea recurvata* Rose) utilizando embriones inmaduros como explante. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 52 p.
1. Gonzáles Luna, K. 2003. Respuesta de tres explantes de vainilla (*Vanilla planifolia*) a diferentes frecuencias de inmersión temporal Bach en ingeniería biotecnología. Cartago, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 67 p.
2. Greenfultech,US. 2007. Planta *Jatropha* (en línea). US. Consultado 10 ene 2009. Disponible en http://www.greenfueltech.net/jatropha_plantation.htm
3. Herrera Martínez, JM. 2004. El piñón (*Jatropha curcas*) una planta nativa de México con un potencial alimentario y agroindustrial (en línea). México. Consultado 7 ene 2009. Disponible en <http://hypatia.morelos.gob.mx/No12/pinon.html>.
4. *Jatropha curcas* plantations.com. 2008. *Jatropha curcas* plantations (en línea). Australia. Consultado 15 ene 2009. Disponible en <http://www.jatrophacurcasplantations.com/>
5. Lopéz Erosa, S; Ortega Rojas, J. 2009. Organogénesis indirecta a partir de explantes foliares de *Jatropha curcas* L. de Chiapas (en línea). In Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería (2009, México). Organogénesis indirecta a partir de explantes foliares de *Jatropha curcas* L. de Chiapas, Mexico. Acapulco, Guerrero, México, SIPAL (Simposio Nacional de Alcoholes y Levaduras). Consultado 25 jun 2010. Disponible en http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_II/CII-16.pdf

6. López Hernández, D; Peñate Alvariño, L. 2007. Cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas*, L. (Euphorbiaceae): resultados preliminares y estrategias futuras (en línea). Cuba. Consultado 14 ene 2009. Disponible en <http://www.cubasolar.cu/biblioteca/Ecosolar/Ecosolar21/HTML/articulo03.htm>
7. Luna Bolívar, M. 2006. Le llaman "la planta mágica" y es una de las mejores fuentes de combustible natural (en línea). Uruguay. Consultado 7 ene 2009. Disponible en <http://www.biodiesel-uruguay.com/articulos/jatropha-curcas.php>
8. Mansilla Méndez, JR. 2007. Propagación *in vivo* e *in vitro* de especies del genero *Tillandsia* (bromeliaceae) en el vivero Clavela del Aire,S.A., aldea Sajcavilla, San Juan Sacatepequez, Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 77 p.
9. Medina, M. 2005. Organismos vegetales: fundamentos de la organografía vegetal (en línea). España. Consultado 15 ene 2009. Disponible en http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/FMBvirtual/Micropropa/Micvegetal.htm
10. Montes, M. 2007. Historia del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales (en línea). El Salvador. Consultado 31 enero 2010. Disponible en <http://www.catolica.edu.sv/inicio.php?name=Unidad&id=5>
11. Morgan, WM. 2006. Cultivo de tejido vegetal (en línea). Argentina. 4 p. Consultado 14 ene 2009. Disponible en <http://www.criba.edu.ar/agronomia/carreras/ia/archivos/Materias/563/Apuntes/CultivoTejidosMorgan.pdf>
12. Orozco, E. 2009, Introducción a los reguladores de crecimiento. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 16 p.
13. Orozco, E. 2009. Fisiología y reguladores de crecimiento. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 14 p.
14. Ovando Medina, I. 2006. Manual de cultivo de tejidos vegetales para ingenieros biotecnólogos. Argentina. 12 p.
15. Peraza Abán, AN; Ortega Rojas, JA; Rivera Loarca, CF. 2009. Organogénesis directa en accesiones de *Jatropha curcas* L. colectadas en Chiapas (en línea). In Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería (2009, México). Organogénesis directa en accesiones de *Jatropha curcas* L. colectadas en Chiapas. Acapulco, Guerrero, México, SIPAL (Simposio Nacional de Alcoholes y Levaduras). Consultado 25 jun 2010. Disponible en http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_II/CII-17.pdf
16. Raggio, M; Moro-Raggio, N. 2004. Producción de callos e inducción de plantas de *Digitaria eriantha* avanzada INTA *in vitro*. Argentina. 4 p. Disponible en http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S185156572004000100012&lng=es&nrm=iso&tlng=es
17. Salisbury, F; Ross, C. 1994. Fisiología vegetal (en línea). México, Iberoamericana. 759 p. Consultado 22 mar 2009. Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos10/auxinas/auxinas.shtml?relacionados>
18. Torres, C. 2008. Cultivos energéticos (en línea). Argentina. Consultado 7 ene 2009. Disponible en http://www.jatropha-curcasweb.com.ar/ver_notas.php?id=18&PHPSESSID=96f7f17a8a7b177728c4a98b89bff822
19. Torres, CA. 2007. *Jatropha curcas* cultivo energético (en línea). Argentina. Consultado 15 ene 2009. Disponible en <http://jatrophaargentina.blogspot.com>

12. Anexos

Cuadro 51A. Resultados del primer tratamiento de la primera fase.

TRATAMIENTO NO. 1 PRIMERA FASE					
No. REPETICIÓN	TAMAÑO Cms.		COLOR	PESO Grs.	ESTADO
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO
1	0.6	0.4	2	0.14	Sano
2	0.4	0.2	5	0.05	Sano
3	1	0.6	5	0.08	Sano
4	1.4	0.7	3	0.25	Sano
5	0.8	0.5	3	0.18	Sano
6	1.2	0.5	3	0.27	Sano
7	0.5	0.4	3	0.33	Sano
8	-----	-----	-----	-----	Muerto
9	0.6	0.3	3	0.04	Sano

Fuente: Elaboración propia, basados en datos recabados durante la investigación.

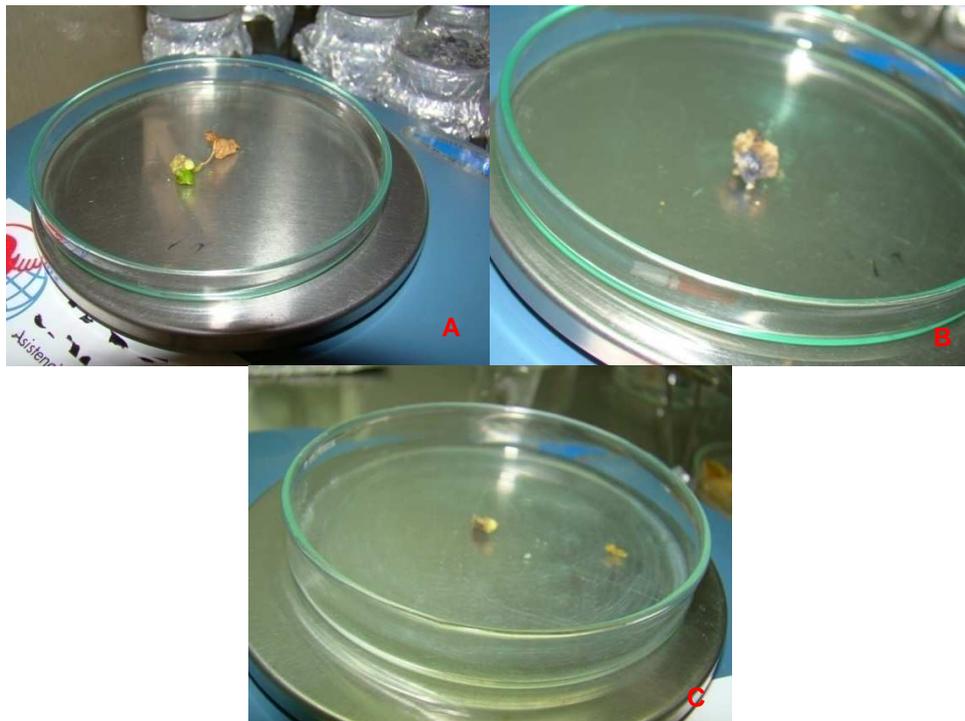


Figura 40A. (A,B,C) Se muestran el poco desarrollo obtenido del tratamiento 1.



Figura 41A. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en el tratamiento 1.

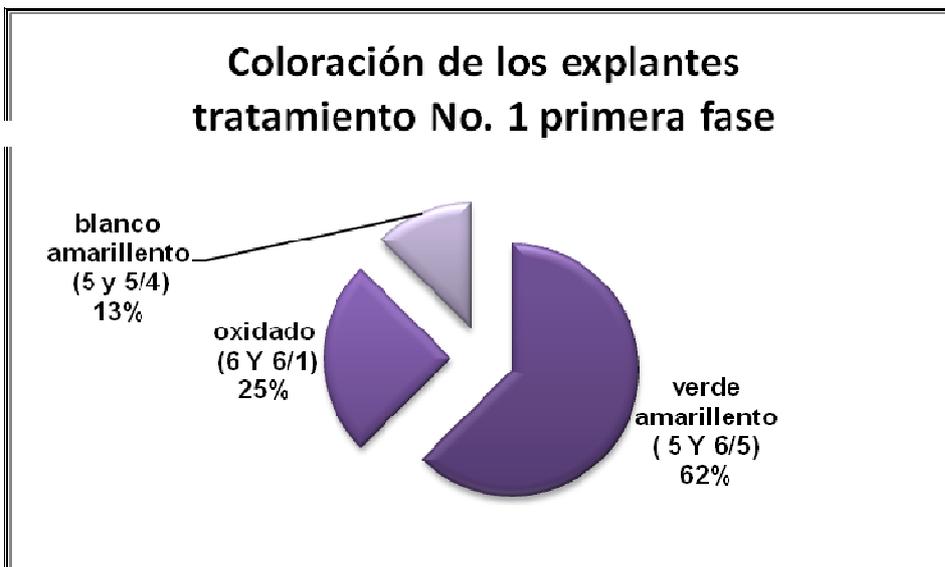


Figura 42A. Resultados obtenidos de la coloración en los explantes tratamiento 1.

Cuadro 52A. Resultados obtenidos en el tratamiento 2 de la primera fase.

TRATAMIENTO NO. 2 PRIMERA FASE					
No. REPETICIÓN	TAMAÑO Cms.		COLOR	PESO Grs.	ESTADO
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO
1	1.1	0.6	3	0.1	sano
2	2	0.8	4	1.71	sano
3	1.9	1	4	1.52	sano
4	1.2	0.5	3	0.37	sano
5	1.7	1	4	0.93	sano
6	1.1	0.7	4	0.44	sano
7	2	1.2	4	2.83	sano
8	1	0.6	3	0.51	sano
9	1.3	0.4	1	NO	BACTERIA
PROMEDIO	1.48	0.76	-----	1.05125	

Fuente: Elaboración propia basados en datos obtenidos en la investigación.

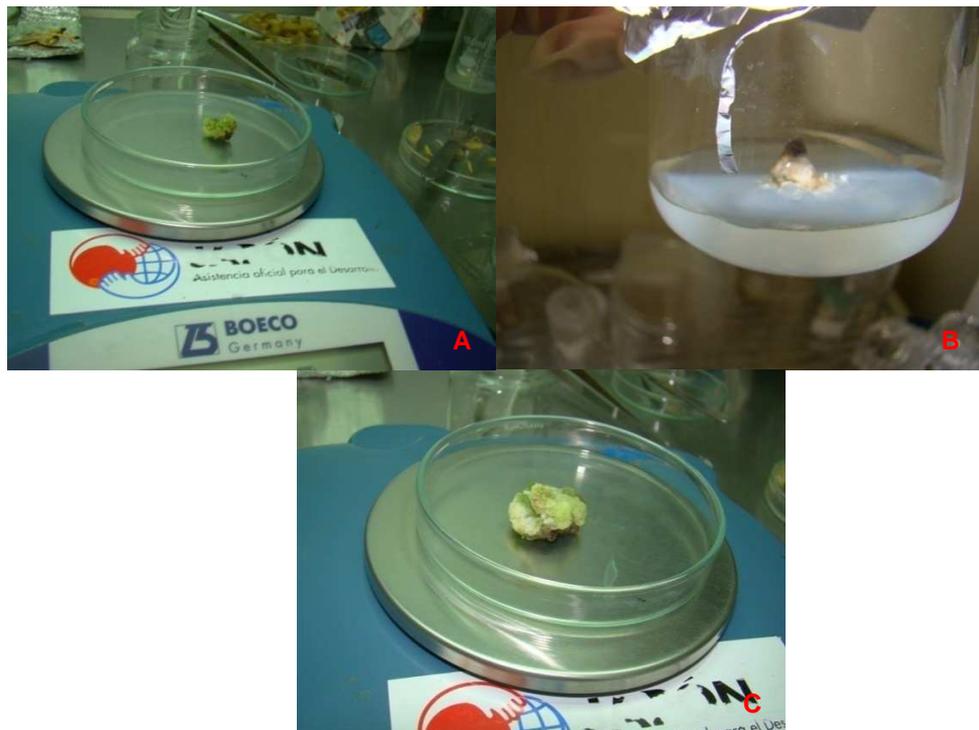


Figura 43A. (A, C) El desarrollo mayor de los explantes, y (B) la contaminación por bacteria.



Figura 44A. Estado fitosanitario de los explantes del tratamiento 2.

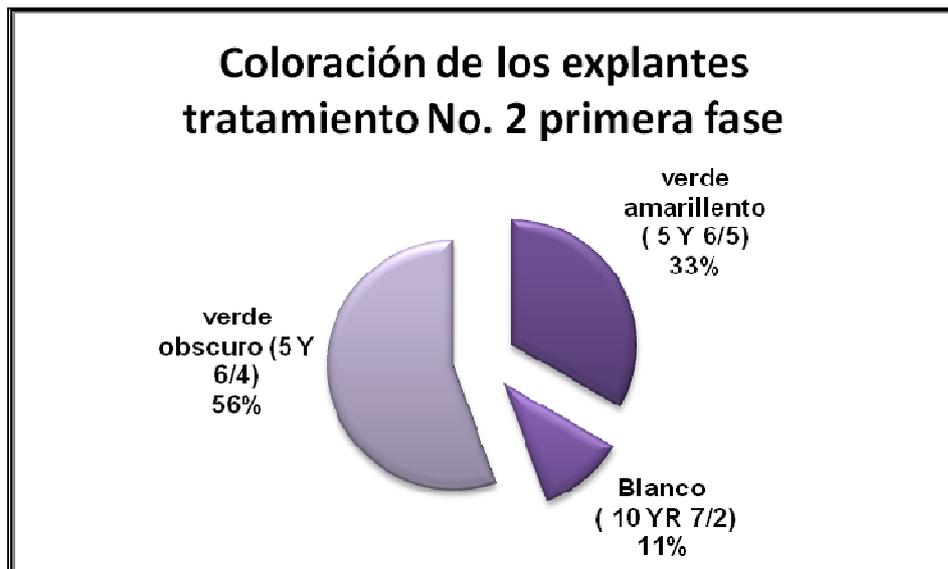


Figura 45A. Distribución en porcentajes de la coloración presentada en el tratamiento 2.

Cuadro 53A. Resultados obtenidos en el tratamiento 3 en la primera fase.

TRATAMIENTO NO. 3 PRIMERA FASE					
No. REPETICIÓN	TAMAÑO Cms.		COLOR	PESO Grs.	ESTADO
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO
1	1	0.8	1	0.26	Sano
2	0.9	0.5	1	0.19	Sano
3	1.8	1	4	1.75	Sano
4	1.4	0.4	1	0.35	Sano
5	1	0.6	2	0.6	Sano
6	2.4	1.4	4	3.06	Sano
7	1.1	0.8	4	2.5	Sano
8	1.3	0.9	3	0.73	Sano
9	1	0.8	1	0.24	Sano
PROMEDIO	1.32	0.8	-----	1.0755	-----

Fuente: Elaboración propia, basada en datos obtenidos durante la investigación.

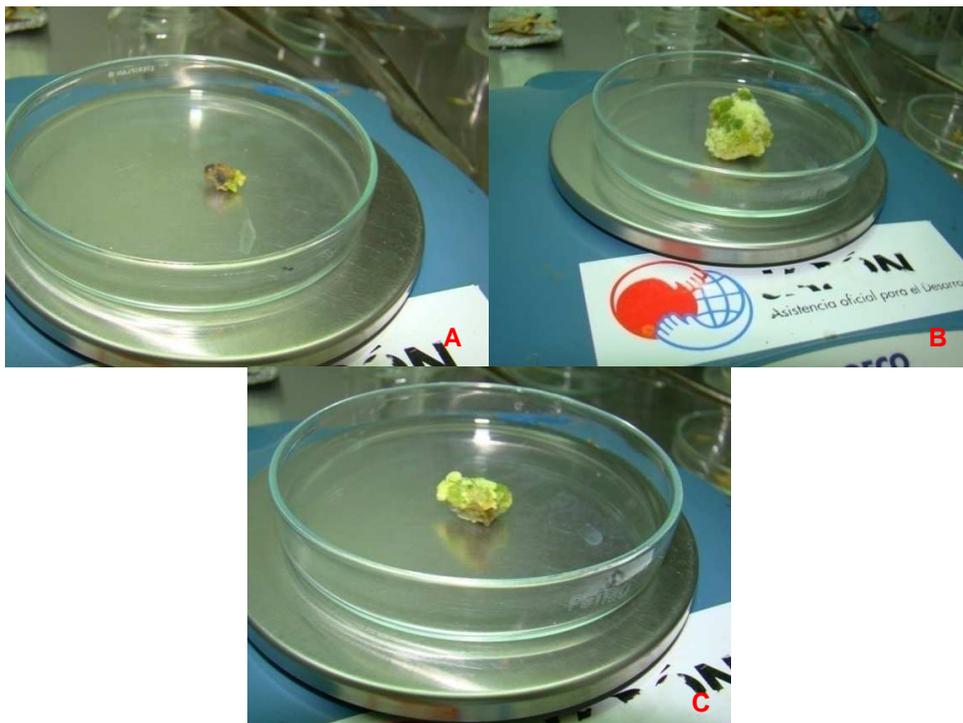


Figura 46A. (A,B,C,) Respuesta de los explantes al tratamiento 3 de la primera fase.

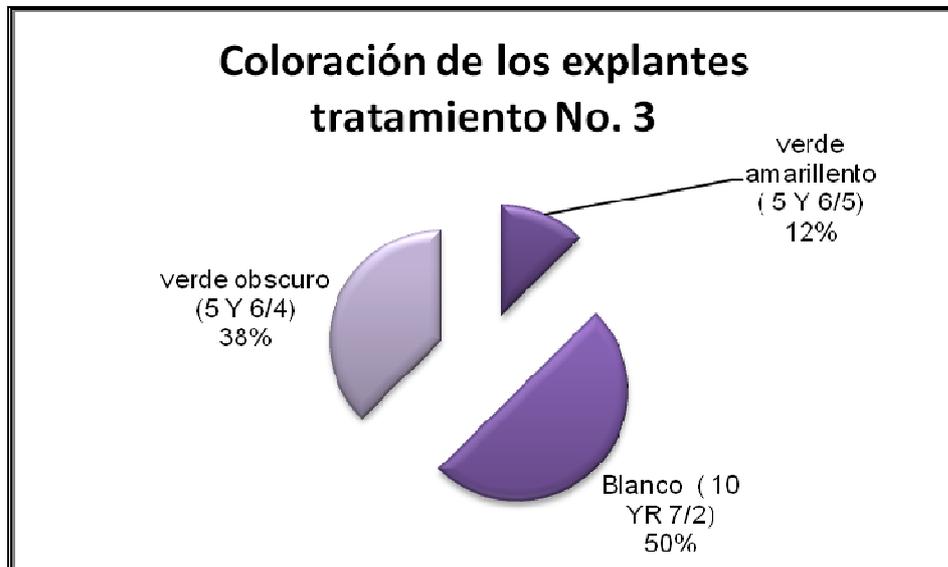


Figura 47A. Coloración que lo explantes sometidos al tratamiento 3 presentaron.



Figura 48A. El 100 % de los explantes tienen un excelente estado fitosanitario.

Cuadro 54A Resultados obtenidos del tratamiento 4 de la primera fase de investigación.

TRATAMIENTO NO. 4 PRIMERA FASE					
No. REPETICIÓN	TAMAÑO Cms.		COLOR	PESO Grs.	ESTADO
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO
1	1.3	0.3	1	0.55	sano
2	1.5	1	4	1.6	sano
3	1.6	1.3	4	2.15	sano
4	2	1.3	4	1.76	sano
5	1.5	1.5	4	2.41	sano
6	1.5	1.3	4	1.21	sano
7	2	0.9	4	2.7	sano
8	2.3	0.5	4	2.47	sano
9	1.4	1.1	4	1.42	sano
PROMEDIO	1.67	1.02		1.807	

Fuente: Elaboración propia basada en datos obtenidos durante la investigación.

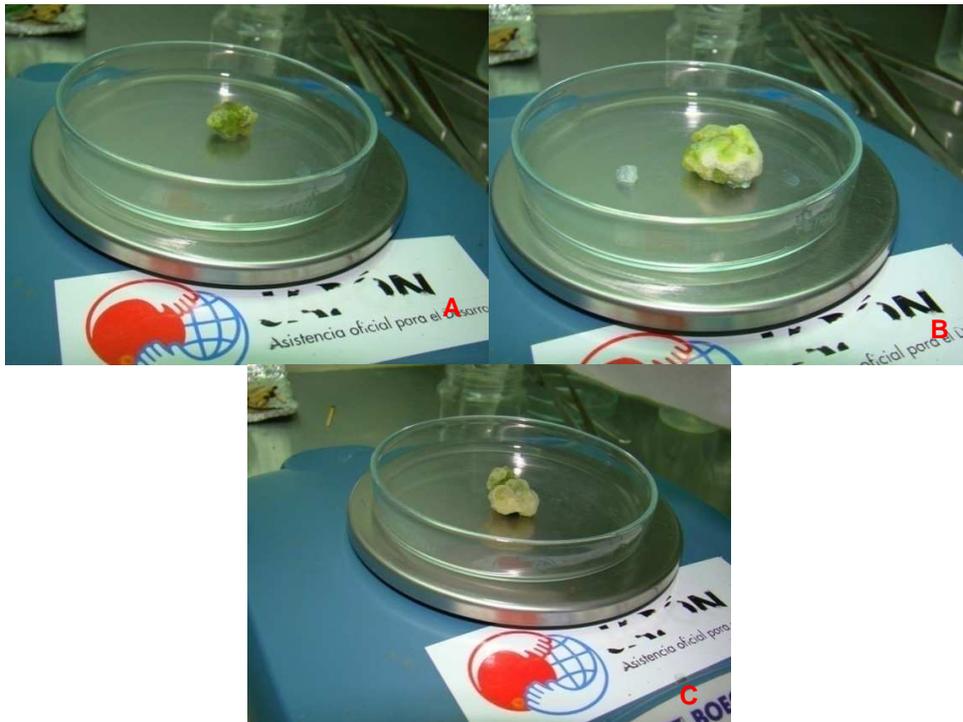


Figura 49A. (B) Coloración presentada en los explantes. (A,C) desarrollo de los explantes.



Figura 50A. El 100% de los explantes estuvieron libres de bacterias y hongos.

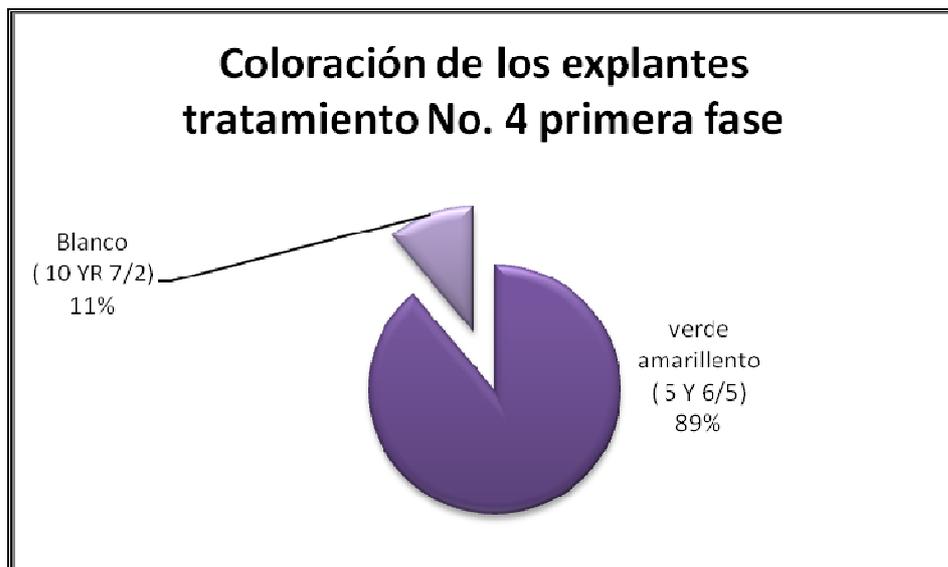


Figura 51A. Porcentaje de la coloración presentada en los explantes del tratamiento 4.

Cuadro 55A. Resultados obtenidos en el tratamiento 5 de la primera fase de investigación.

TRATAMIENTO NO. 5 PRIMERA FASE						
No. REPETICIÓN	TAMAÑO Cms.		COLOR	PESO Grs.	ESTADO	OBSERVACIONES
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO	
1	1.5	0.5	4	0.54	sano	-----
2	2.3	1.5	4	2.64	sano	-----
3	2.4	1	4	1.34	sano	-----
4	1.4	0.6	4	1.18	sano	-----
5	1.4	1.2	4	0.55	sano	-----
6	0.5	1	4	0.59	sano	-----
7	3.2	2	4	9.13	sano	-----
8	1.6	1	4	2.39	sano	-----
9	0	0	5	NO	-----	muerto
PROMEDIO	1.79	1.1		2.295	-----	-----

Fuente: Elaboración propia basados en datos obtenidos durante la investigación.

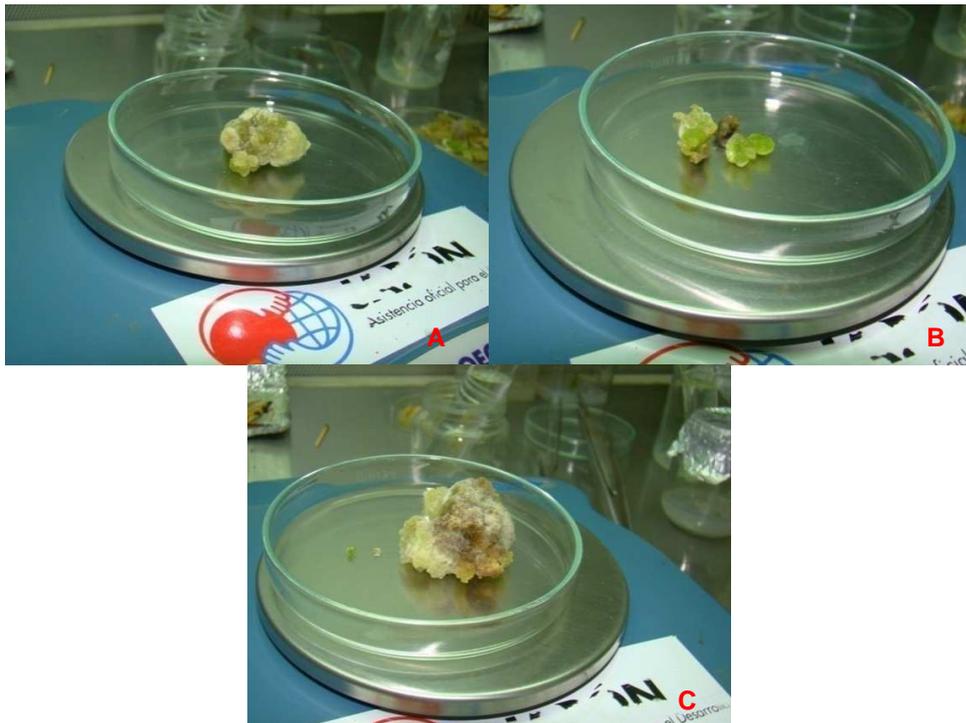
**Figura 52A.** (A,B) El desarrollo de los explantes. (C) Coloración blanca del explante.



Figura 53A. Estado fitosanitario en el tratamiento 5 de la primera fase de investigación.

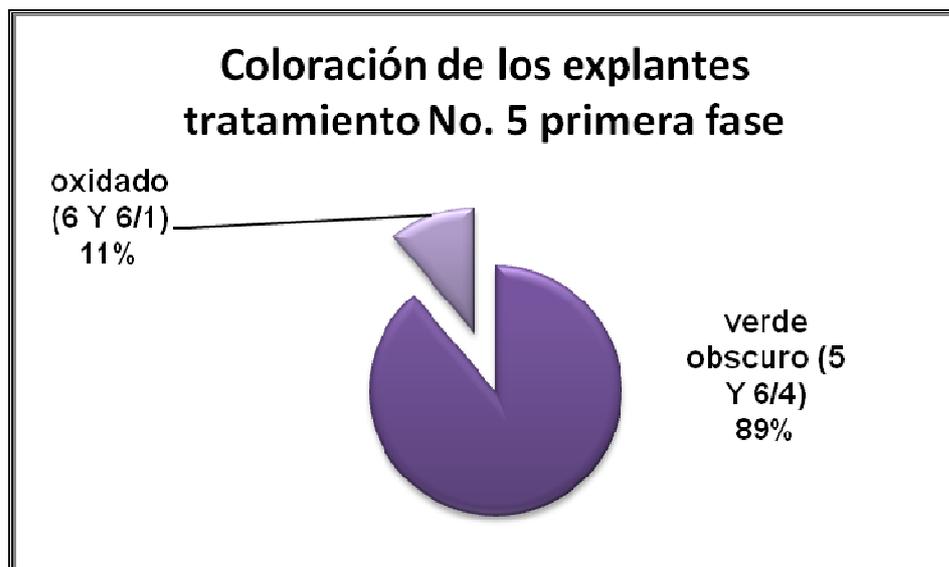


Figura 54A. El 100% de los explantes presentó la coloración verde oscuro.

Cuadro 56A. Resultados del tratamiento 6 durante la primera fase de la investigación.

TRATAMIENTO NO. 6 PRIMERA FASE					
No. REPETICIÓN	TAMAÑO Cms.		COLOR	PESO Grs.	ESTADO
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO
1	2.2	2	3	2.59	sano
2	2.3	2.1	3	3.41	sano
3	1.9	1.5	3	2.44	sano
4	1.9	1.9	3	2.85	sano
5	1.9	1,1	3	2.38	sano
6	2.8	2.6	3	3.63	sano
7	3	2	3	4.1	sano
8	3.5	1.5	3	4.92	sano
9	3.1	2	3	5.39	sano
PROMEDIO	2.51	1.85		3.523	

Fuente: Elaboración propia basada en datos obtenidos durante la investigación.

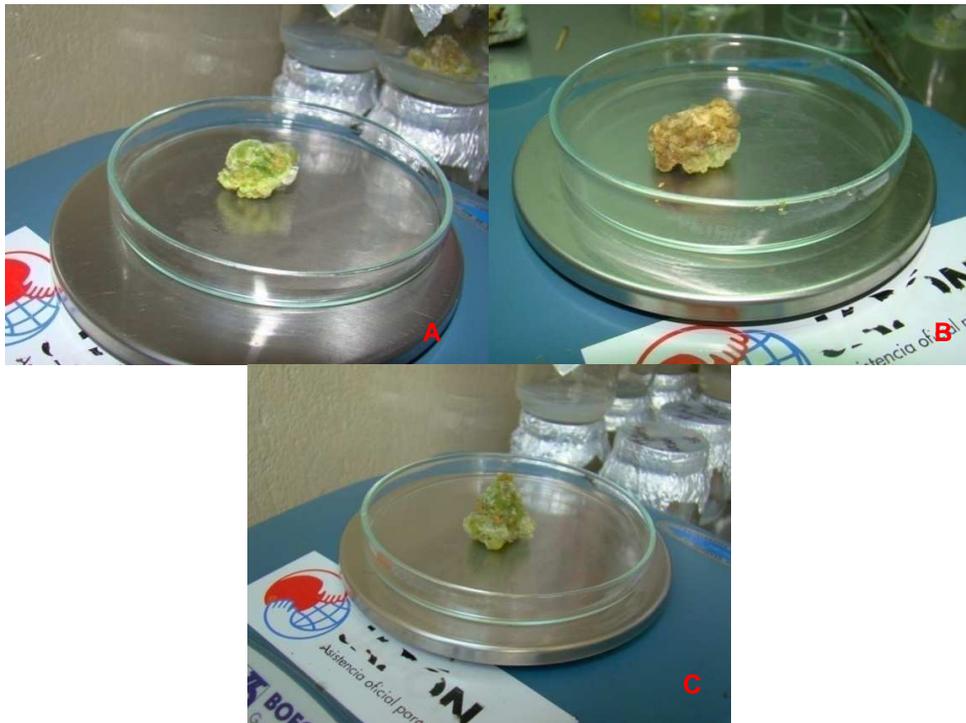


Figura 55A. (A,B,C) Estado de desarrollo de los explantes sembrados.



Figura 56A. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en el tratamiento 6.



Figura 57A. Coloración que presentan los explantes en el tratamiento 6.

Cuadro 57A. Resultados obtenidos del tratamiento 1 en la segunda fase de la investigación.

TRATAMIENTO NO. 1 SEGUNDA FASE						
No. Repetición	TAMAÑO		COLOR	PESO Grs.	ESTADO	OBSERVACIONES
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO	
1	2.6	1.8	3	2.4	sano	
2	1.3	1.1	3	1.54	sano	
3	2.5	2.2	3	2.21	sano	
4	0.65	1	2	0.89	sano	
5	2.1	1.6	2	1.65	sano	
6	1.3	0.96	3	1.2	sano	
7	2.3	1.78	3	1.98	sano	
8	1.9	1.5	5	1.9	sano	oxidación
9	0.65	0.54	5	1.75	sano	oxidación
10	2.4	1.6	3	1.86	sano	
PROMEDIO	1.77	1.41		1.738		

**Figura 58A.** (A,B) Se muestra el desarrollo del callo meristemático en dicho tratamiento.

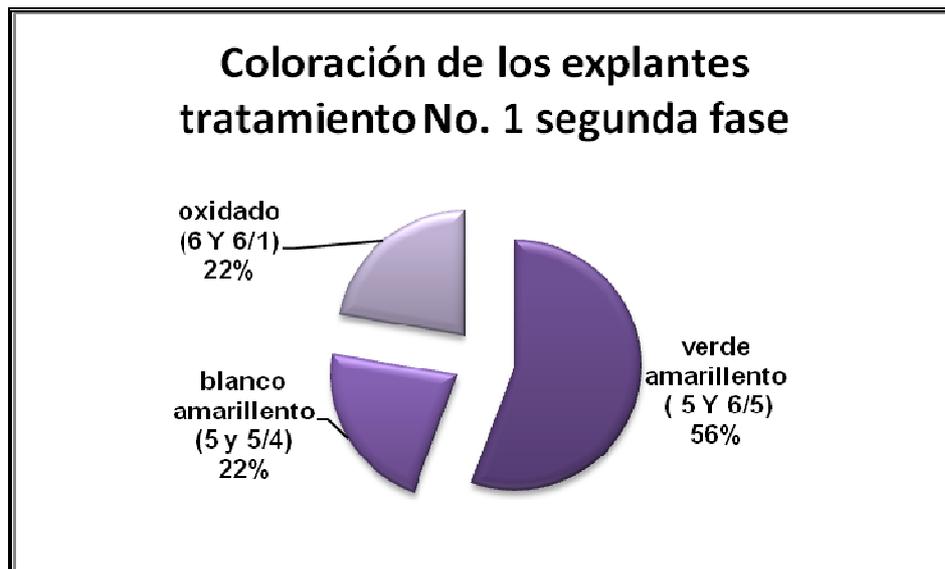


Figura 59A. Coloración que presentaron los explantes sembrados en dicho tratamiento.



Figura 60A. Estado fitosanitario de los explantes en el tratamiento 1 de la segunda fase.

Cuadro 58A. Resultados obtenidos del tratamiento 2 de la segunda fase de investigación.

TRATAMIENTO NO. 2 SEGUNDA FASE						
No. Repetición	Tamaño		COLOR	PESO Grs.	ESTADO	OBSERVACIONES
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO	
1	0	0	1	0	bacteria	-----
2	3.1	2.54	3	7.3	sano	-----
3	2.31	2.12	3	3.6	sano	-----
4	1.54	1.43	3	2.34	sano	-----
5	1	0.82	5	1.7	sano	-----
6	1.92	1.63	3	2.6	sano	-----
7	3.34	3.12	3	6.8	sano	-----
8	1.76	1.21	5	2.2	sano	-----
9	2.45	2.13	3	3.7	sano	-----
10	-----	-----	-----	-----	-----	Muerto
PROMEDIO	2.18	1.88		3.57	-----	-----

Fuente: Elaboración propia basada en datos obtenidos en la investigación.



Figura 61A. (A,B) Tamaño y color de algunos de los explantes en este tratamiento.

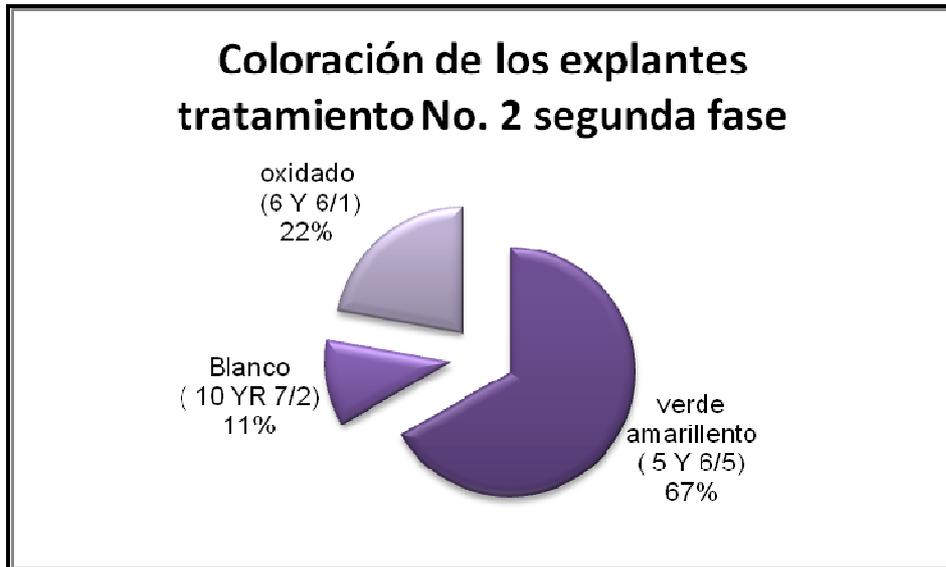


Figura 62A. Coloración presentada en los explantes. en el tratamiento 2 de la segunda fase.

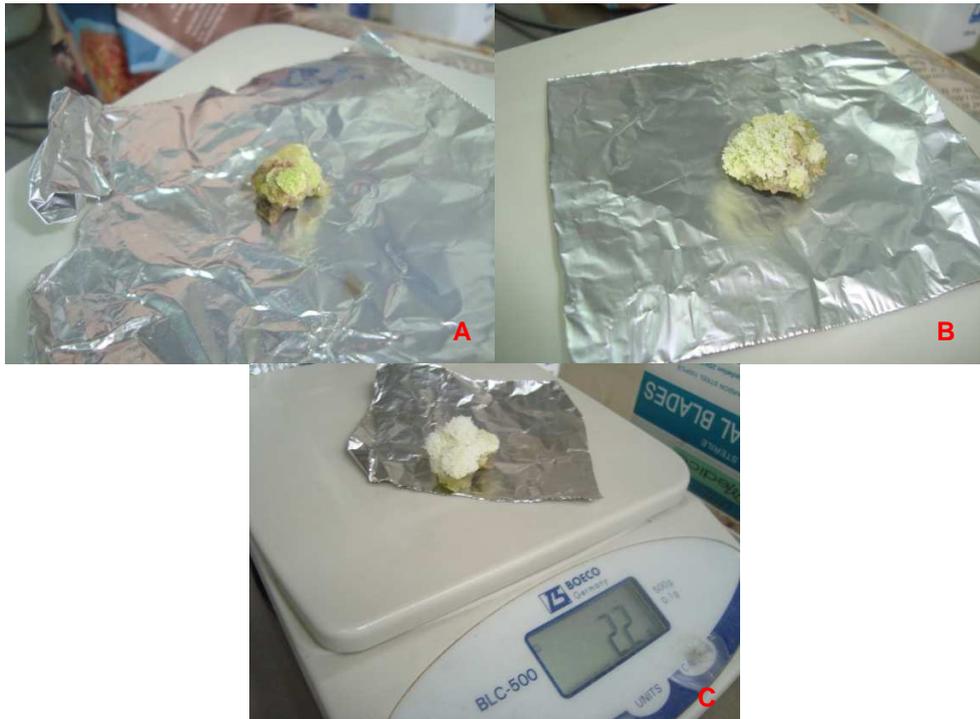


Figura 63A. Estado fitosanitario en el tratamiento 2 de la segunda fase de investigación.

Cuadro 59A. Resultados del tratamiento 3 en la segunda fase de la investigación.

TRATAMIENTO NO. 3 SEGUNDA FASE						
No. Repetición	Tamaño		COLOR	PESO Grs.	ESTADO	OBSERVACIONES
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO	
1	0.6	0.3	5	1	sano	-----
2	0.4	0.3	5	0.9	sano	-----
3	-----	-----	-----	-----	-----	Muerto
4	0.5	0.4	3	0.8	sano	-----
5	1.67	1.43	3	2.2	sano	-----
6	1.65	1.32	3	2.2	sano	-----
7	0.54	0.43	5	1.6	sano	-----
8	0.45	0.39	5	0.9	sano	-----
9	3.4	2.85	3	4.5	sano	Posible brote
10	-----	-----	1	0.5	-----	Muerto
PROMEDIO	1.15	0.93	-----	1.62	-----	-----

Fuente: Elaboración propia, basada en datos obtenidos durante la investigación.

**Figura 64A.** Desarrollo de los explantes sembrados en dicho medio de cultivo.

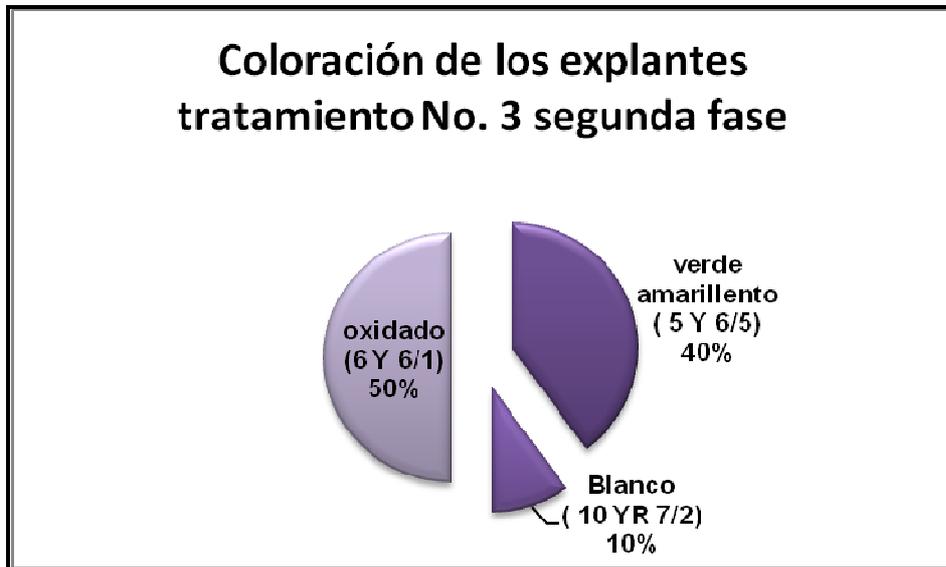


Figura 65A. Coloración de los explantes sometidos al tratamiento 3 de la segunda fase.



Figura 66A. Estado fitosanitario de los explantes del tratamiento 3 segunda fase.

Cuadro 60A. Resultados del tratamiento .4 de la segunda fase de la investigación.

TRATAMIENTO NO. 4 SEGUNDA FASE						
No. Repeticiones	Tamaño		COLOR	PESO Grs.	ESTADO	OBSERVACIONES
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO	
1	3.25	2.8	3	5.5	sano	-----
2	3.67	3.56	3	5	sano	-----
3	3.26	2.87	3	5.8	sano	-----
4	0.7	0.54	5	1	sano	Oxidación
5	2.6	2.1	3	3.4	sano	-----
6	4.32	4.21	3	8.5	sano	-----
7	0.67	0.45	5	1	sano	oxidación
8	3.16	2.65	3	5.1	sano	-----
9	1.7	1.65	3	2.9	sano	-----
10	3.25	2.95	3	4.2	sano	-----
PROMEDIO	2.66	2.38	-----	4.24	-----	-----

Fuente: Elaboración propia, basados en datos recabados durante la investigación.

**Figura 67A.** Desarrollo de los explantes en dicho tratamiento.

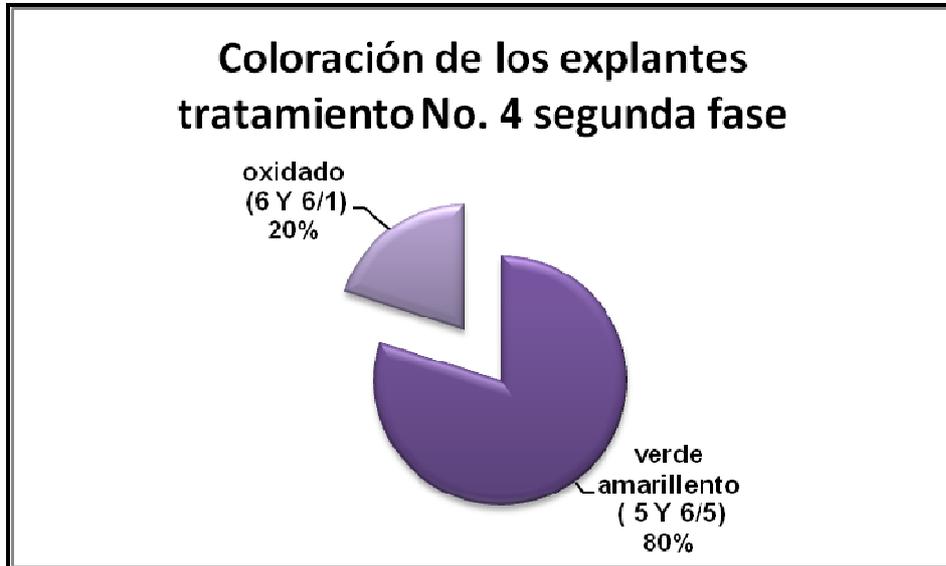


Figura 68A. Coloración de los explantes del tratamiento 4 de la segunda fase.



Figura 69A. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en este tratamiento.

Cuadro 61A. Resultados, tratamiento 5 de la segunda fase de la investigación.

TRATAMIENTO NO. 5 SEGUNDA FASE						
No. Repetición	TAMAÑO		COLOR	PESO Grs.	ESTADO	OBSERVACIONES
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO	
1	3.75	3.56	3	4.6	sano	posible brote
2	3.45	3.21	2	6.2	sano	poco oxidado
3	5.43	4.85	3	7.1	sano	posible brote
4	5.34	5.12	3	8.1	sano	poco oxidado
5	5.4	4.7	3	6.8	sano	posible brote
6	-----	-----	-----	-----	-----	muerto
7	5.67	5.12	5	8	sano	oxidado
8	6.45	6.1	3	9.5	sano	
9	5.43	5.12	3	7.11	sano	
10	1.75	1.54	5	2.8	sano	oxidado
PROMEDIO	4.74	4.37		6.69		

Fuente: Elaboración propia, basado en datos recopilados en la investigación.



Figura 70A. (A,B) embrioides generados en la parte derecha. (C) el desarrollo del explante.

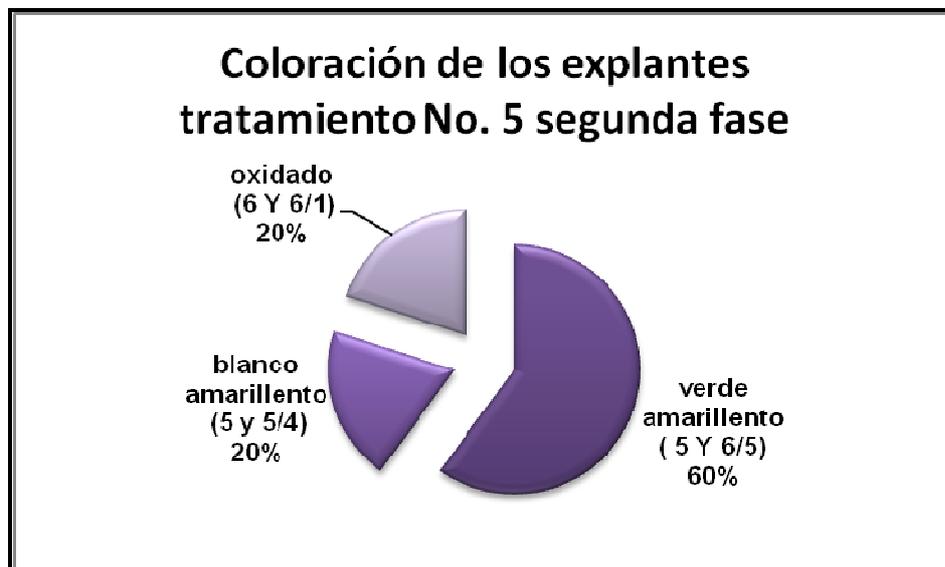


Figura 71A. Coloración de explantes evaluados en Trat. 5 de la segunda fase.



Figura 72A. Estado fitosanitario de los explantes sometidos al tratamiento 5 segunda fase.

Cuadro 62A. Resultado del tratamiento 6 de la segunda fase de la investigación.

TRATAMIENTO NO. 6 SEGUNDA FASE						
No. Repeticiones	TAMAÑO		COLOR	PESO Grs.	ESTADO	OBSERVACIONES
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO	
1	4.78	4.6	3	7.2	sano	
2	3.5	3.2	3	4.7	sano	
3	1.76	1.23	3	3.2	sano	
4	4.3	3.87	3	5.6	sano	
5	3.65	3.4	3	4.5	sano	
6	3.45	3.12	5	5.4	sano	oxidación
7	1.89	1.31	3	2.5	sano	
8	2.3	1.89	3	3.4	sano	
9	-----	-----	-----	-----	-----	Muerto
10	2.1	1.85	5	3.3	sano	oxidado
PROMEDIO	3.08	2.72		4.42		

Fuente: Elaboración propia basados en datos obtenidos durante la investigación.



Figura 73A. (A,B) Desarrollo y coloración de los explantes en dicho tratamiento.



Figura 74A. Coloración de los explantes sometidos al tratamiento .6 de la segunda fase.



Figura 75A. Estado fitosanitario de los explantes en el tratamiento 6.

Cuadro 63A. Tratamiento únicamente con MS al 100%.

TRATAMIENTO 1 ADICIONAL					
No. Repeticiones	TAMAÑO		COLOR	PESO Grs.	ESTADO
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO
1	1.45	1.2	3	0.65	sano
2	1.54	0.98	3	0.56	sano
3	1.28	1	3	0.45	sano
4	1.56	1.4	3	0.69	sano
PROMEDIO	1.46	1.14		0.59	

Fuente: Elaboración propia basada en datos de la investigación.



Figura 76A. (A) Desarrollo de explantes a este tratamiento, (B) sembrando explantes.



Figura 77A. Coloración de los explantes en el tratamiento adicional.



Figura 78A. Estado fitosanitario de los explantes en este tratamiento.

Cuadro 64A. Tratamiento 2 conteniendo MS al 50%.

TRATAMIENTO 2 ADICIONAL					
No. Repeticiones	TAMAÑO		COLOR	PESO Grs.	ESTADO FITOSANITARIO
	LARGO	ANCHO			
1	1.24	0.9	2	0.86	sano
2	1.12	0.6	3	0.45	sano
3	0.54	0.32	4	0.23	sano
4	0	0	0	0	Hongo
PROMEDIO	0.97	0.61		0.51	

Fuente: Elaboración propia basada en datos reunidos durante la investigación.



Figura 79A. Tamaño de uno de los explantes sometidos a este tratamiento.

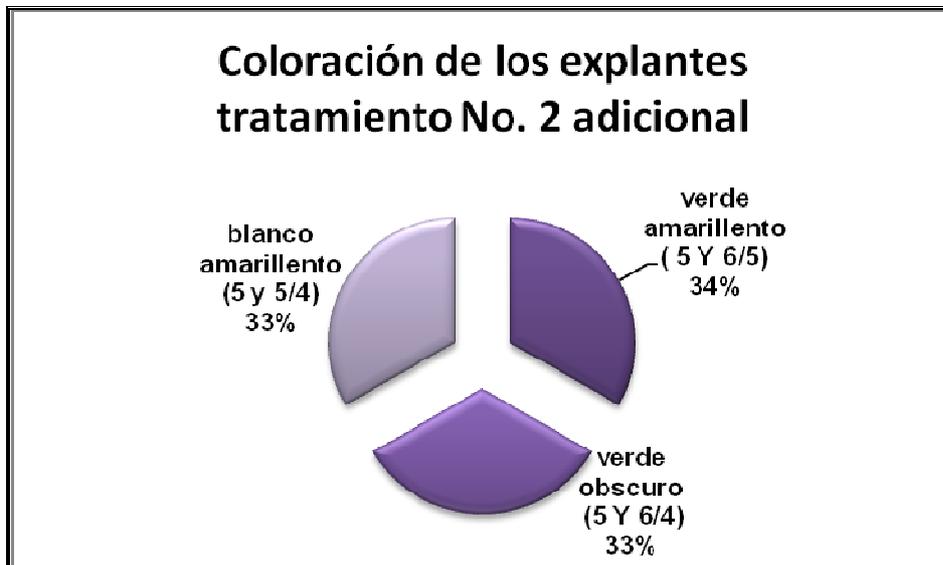


Figura 80A. Coloración de los explantes sembrados en el tratamiento No. 2 adicional.



Figura 81A. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en el tratamiento 2 de cinetina.

Cuadro 65A. Tratamiento No. 3 adicional.

TRATAMIENTO 3 ADICIONAL					
No. Repeticiones	TAMAÑO		COLOR	PESO Grs.	ESTADO
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO
1	1.53	1.65	3	1.4	sano
2	1.48	1.56	3	1.2	sano
3	0.23	1.49	3	1.1	sano
4	1.50	1.58	3	1.38	sano
PROMEDIO	1.19	1.57	-----	1.27	-----

Fuente: Elaboración propia basada en datos recabados durante la investigación.

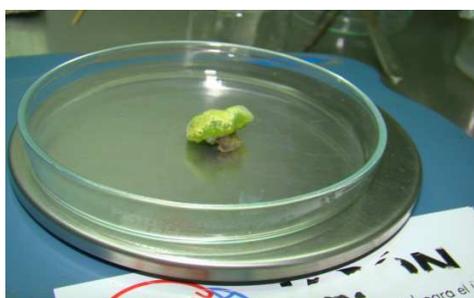
**Figura 82A.** Desarrollo del explante sometido a dicho tratamiento.**Figura 83A.** Coloración de los explantes sometidos a este tratamiento.



Figura 84A. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en el tratamiento 3 adicional.

Cuadro 66A. Resultados del tratamiento 4 adicional.

TRATAMIENTO 4 ADICIONAL					
No. Repeticiones	TAMAÑO		COLOR	PESO Grs.	ESTADO
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO
1	1.34	1.41	3	0.98	sano
2	1.42	1.45	3	1.01	sano
3	1.46	1.51	3	1.12	sano
4	1.41	1.42	3	0.95	sano
PROMEDIO	1,41	1.45		1.02	

Fuente: Elaboración propia basada en datos recabados durante la investigación.



Figura 85A. Desarrollo del explante sometido al tratamiento 4 adicional.



Figura 86A. Coloración de los explantes sembrados en el tratamiento 4 adicional.



Figura 87A. Estado fitosanitario presentado en los explantes sembrados en el Trat. 4 adicional.

Cuadro 67A. Tratamiento 5 adicional con combinaciones de cinetina y ácido giberélico.

TRATAMIENTO 5 ADICIONAL					
No. Repetición	TAMAÑO		COLOR	PESO Grs.	ESTADO
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO
1	1.24	0.94	2	0.51	sano
2	1.12	0.85	3	0.46	sano
3	1.32	0.96	2	1.52	sano
4	1.38	1.0	3	0.55	sano
PROMEDIO	1.27	0.94		0.76	

Fuente: Elaboración propia basados en datos recabados durante la investigación.

**Figura 88A.** Desarrollo del explante en el tratamiento 5 adicional.



Figura 89A. Coloración de los explantes sometidos al tratamiento 5 adicional.



Figura 90A. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en el tratamiento 5 adicional.

Cuadro 68A. Resultados obtenidos en el tratamiento No. 6 adicional.

TRATAMIENTO 6 ADICIONAL					
No. Repetición	TAMAÑO		COLOR	PESO Grs.	ESTADO
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO
1	3.45	3.12	4	5.4	sano
2	3.34	3.10	3	5.2	sano
3	2.98	2.85	3	4.96	sano
4	3.41	3.33	3	5.55	sano
PROMEDIO	3.30	3.1		5.28	

Fuente: Elaboración propia basados en datos recabados durante la investigación.



Figura 91A. Desarrollo obtenido en el explante, sometido al tratamiento 6 adicional.

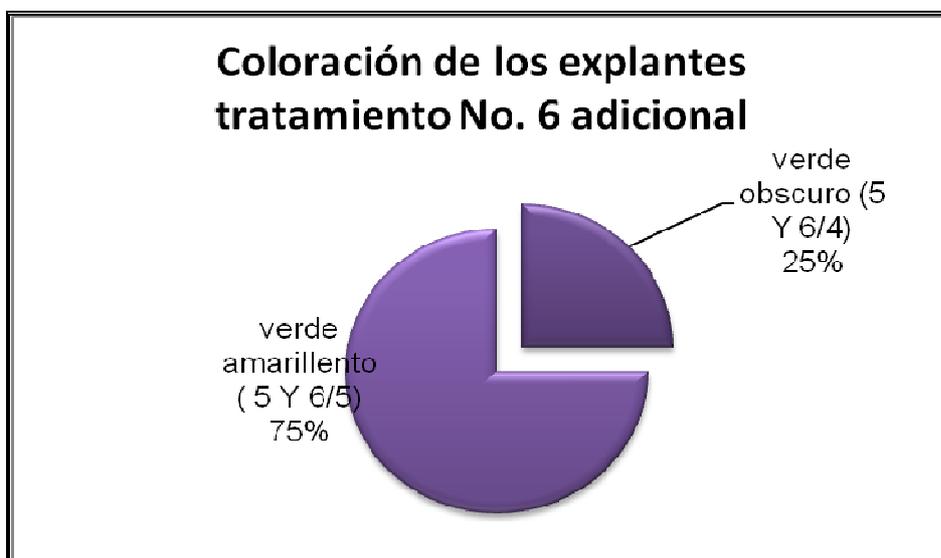


Figura 92A. Coloración de los explantes sometidos al tratamiento. 6 adicional.



Figura 93. Estado fitosanitario de los explantes sometidos al tratamiento 6 adicional.

Cuadro 69A. Resultados obtenidos del tratamiento 7 adicional.

TRATAMIENTO 7 ADICIONAL					
No. Repeticiones	TAMAÑO		COLOR	PESO Grs.	ESTADO FITOSANITARIO
	LARGO	ANCHO			
1	2.79	2.65	3	4.88	sano
2	2.65	2.44	3	4.82	sano
3	2.76	2.69	3	4.68	sano
4	2.85	3.0	3	4.54	sano
PROMEDIO	2.76	2.70		4.73	

Fuente: Elaboración propia basada en datos recabados durante la investigación.



Figura 94A. Desarrollo del explante sometido al tratamiento 7 adicional.



Figura 95A. Coloración de los explantes sometidos al tratamiento 7 adicional.



Figura 96A. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en el medio 7 adicional.

Cuadro 70A. Tratamiento 8 adicional, combinación de BAP y ANA.

TRATAMIENTO No. 9 CON BAP Y ANA					
No. Repetición	TAMAÑO		COLOR	PESO Grs.	ESTADO
	LARGO	ANCHO			FITOSANITARIO
1	4.1	3.0	3	14.51	sano
2	5.7	3.5	3	11.25	sano
3	3.8	2.3	3	9.11	sano
4	3.3	2.5	3	9.75	sano
	4.22	2.83		11.15	

Fuente: Elaboración propia basados en datos recabados durante la investigación.



Figura 97A. Se muestra el desarrollo de los explantes sometidos a este tratamiento.

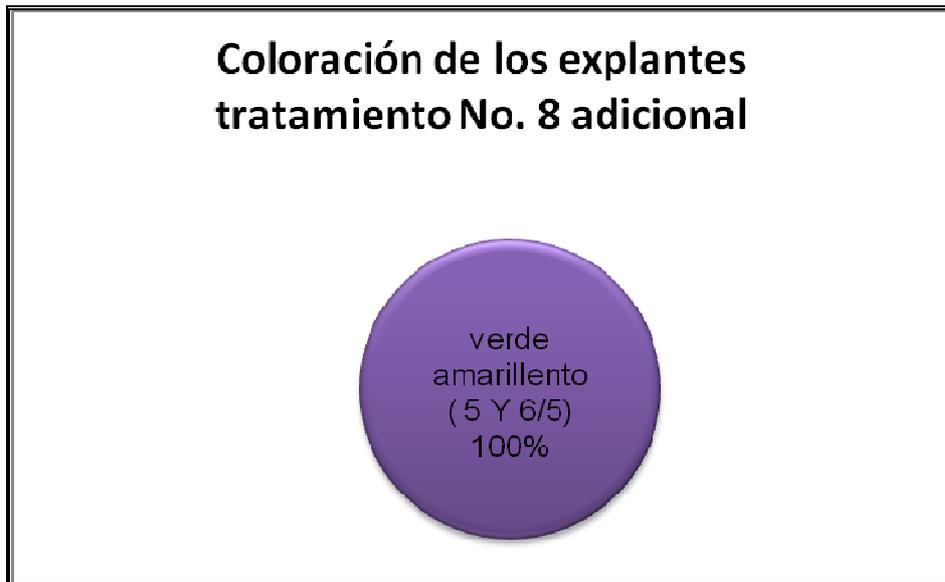


Figura 98A. Coloración de los explantes sembrados el tratamiento 8 adicional.



Figura 99A. Estado fitosanitario de los explantes sembrados en este tratamiento.