

**Establecimiento *in vitro* de *Jatropha curcas* L.
a partir de hojas cotiledonares y su respuesta
a 6-Benciladenina y Ácido indol-3-butírico**

Abel David Almeida Montenegro

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2011

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Establecimiento *in vitro* de *Jatropha curcas* L.
a partir de hojas cotiledonares y su respuesta
a 6-Benciladenina y Ácido indol-3-butírico**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Abel David Almeida Montenegro

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2011

Establecimiento *in vitro* de *Jatropha curcas* L. a partir de hojas cotiledonares y su respuesta a 6-Benciladenina y Ácido indol-3-butírico

Presentado por:

Abel David Almeida Montenegro

Aprobado:

María Alexandra Bravo, M.Sc.
Asesora principal

Abel Gernat, Ph.D.
Director
Carrera de Ingeniería Agronómica

Renán Pineda, Ph.D.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Dinie Espinal de Rueda, M.Sc.
Asesora

RESUMEN

Almeida Montenegro, A.D. 2011. Establecimiento *in vitro* de *Jatropha curcas* L. a partir de hojas cotiledonares y su respuesta a 6-Benciladenina y Ácido indol-3-butírico. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 16 p.

El piñón *Jatropha curcas* pertenece a la familia Euphorbiaceae. Es una planta que por su gran adaptación a zonas marginales, alta resistencia a la sequía y alto rendimiento en la producción de aceite sirve como sustituto de combustibles fósiles, por lo que se ha incrementado su demanda. La propagación convencional resulta ineficiente debido a que su polinización es cruzada lo cual genera una alta variabilidad genética que puede causar problemas agroindustriales. Por esto, la propagación *in vitro* es de gran importancia. El objetivo fue evaluar la respuesta *in vitro* de las hojas cotiledonares de *Jatropha curcas* L. –variedad hindú- a 6-Benciladenina (BA) y Ácido indol-3-butírico (AIB). Los explantes se establecieron en medio de cultivo basal y vitaminas de Murashige y Skoog, suplementado con 12 combinaciones de BA (0 – 26.64 μM) y AIB (0 – 4.90 μM) según el tratamiento. Se usó un diseño completamente al azar, con cuatro réplicas. Las medias se separaron con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). La formación de callo morfogénico fue la respuesta que se obtuvo a la presencia de BA y AIB, las combinaciones BA 2.22 μM con AIB 2.45 μM y BA 4.44 μM con AIB 2.45 μM presentaron una formación de callo mayor a 60%. La presencia de BA en combinación con AIB fue necesaria para una alta formación de callos en las hojas cotiledonares de *Jatropha curcas* –variedad hindú-. Se debe de evaluar diferentes variedades de *Jatropha curcas*, con diferentes fuentes de explante y otros reguladores de crecimiento para ver si presentan las mismas respuestas.

Palabras clave: Auxinas, biodiesel, citoquininas, formación de callo, organogénesis indirecta

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	2
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
4 CONCLUSIONES.....	11
5 RECOMENDACIONES.....	12
6 LITERATURA CITADA.....	13
7 ANEXOS	15

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo basal y vitaminas Murashige y Skoog	3
2. Tratamientos para establecimiento <i>in vitro</i> de hojas cotiledonares de <i>Jatropha curcas</i> –variedad hindú-, combinación de 6-Benciladenina 0 a 26.64 μ M y Ácido indol-3-butírico 0 a 4.9 μ M.	4
3. Efecto de diferentes concentraciones de 6-Benciladenina y Ácido indol-3 butírico en la formación de callo de los explantes de hojas cotiledonares <i>Jatropha curcas</i> –variedad hindú-, al finalizar la cuarta semana.....	10
Figuras	Página
1. Hojas cotiledonares de <i>Jatropha curcas</i> -variedad hindú-, siembra del explante en medio MS.	5
2. Hojas cotiledonares de <i>Jatropha curcas</i> -variedad hindú-, una semana después de siembra.	6
3. Hojas cotiledonares de <i>Jatropha curcas</i> -variedad hindú-, dos semanas después de siembra	7
4. Hojas cotiledonares de <i>Jatropha curcas</i> -variedad hindú-, tres semanas después de siembra	8
5. Hojas cotiledonares de <i>Jatropha curcas</i> -variedad hindú-, cuatro semanas después de siembra.....	9
Anexos	Página
1. Equivalencias entre mg L^{-1} y micromoles de los tratamientos para establecimiento <i>in vitro</i> de explantes de hojas cotiledonares <i>Jatropha curcas</i> –variedad hindú-, combinación de 6-Benciladenina (BA) y Ácido indol-3-butírico (AIB).	15
2. Contaminación, muerte, sobrevivencia, y porcentaje de formación de callo como respuesta a 6-Benciladenina (BA) y Ácido indol-3-butírico (AIB) en el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Jatropha curcas</i> -variedad hindú- a partir de hojas cotiledonares.....	16

1. INTRODUCCIÓN

Jatropha curcas L. piñón, piñoncillo o pistache mexicano pertenece a la familia Euphorbiaceae, es una planta oleaginosa arbustiva con crecimiento rápido que puede superar los 6 m de altura, es originaria de México y Mesoamérica (Martínez 2007). El género *Jatropha* se encuentra distribuido en los climas tropicales y subtropicales desde cinco hasta 1,500 msnm (Bártoli 2008).

El aceite extraído de la semilla puede ser convertido en biodiesel por medio de una reacción química de transesterificación, este aceite es una fuente de energía renovable, amigable con el ambiente y de bajo costo (Lopez *et al.* 2011). El piñón por sus características de adaptación a zonas marginales semiáridas, tolerancia a sequía, alta producción de proteína, aceite y por su rendimiento de hasta dos toneladas de aceite por hectárea por año, puede servir como sustituto de los combustibles fósiles (Toral *et al.* 2008, King *et al.* 2009).

En la actualidad, la demanda de plantas de *Jatropha curcas* ha incrementado considerablemente y el método de propagación convencional a través de semillas produce plantas con alta variabilidad genética, lo que en un futuro causará problemas en los usos agroindustriales (Lopez *et al.* 2011).

En la propagación convencional asexual (estacas, acodos) la acumulación de enfermedades sistémicas es una de las principales causas que produce bajos rendimientos e incluso la desaparición de algunas especies comerciales (Jiménez 1998b). Debido a esta situación la regeneración *in vitro*, mediante las técnicas de cultivo de tejidos está teniendo una gran importancia para la productividad de este cultivo (Kalimuthu *et al.* 2007). La razón más importante es que con la propagación *in vitro* se obtienen plántulas genotípicamente iguales, esto hace posible la propagación de especies o variedades élites (Lopez *et al.* 2011).

El estudio evaluó la respuesta de explantes cotiledonares *in vitro* de *Jatropha curcas* -variedad hindú- al establecerlos en medio de cultivo basal de Murashige y Skoog con diferentes combinaciones de fitohormonas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), ubicada en el Valle del Yeguaré a 30 km de Tegucigalpa Honduras

Material vegetal y fuente de explante. La semilla que se utilizó para este estudio fue *Jatropha curcas* -variedad hindú- de la colección de la EAP Zamorano. Las semillas se lavaron con agua y jabón, luego se esterilizaron en solución de NaOCl (hipoclorito de sodio) al 20% (v/v) (Magia Blanca™ al 4.72% i.a) por 5 minutos, después se puso en solución al 0.2% (p/v) de Benlate® fungicida sistémico (ingrediente activo, benomilo) y 0.2% (p/v) Agri-mycin – 16.5 WP, bactericida sistémico (ingrediente activo: estreptomycin, terramicina).

Las semillas desinfectadas fueron sembradas en bandejas múltiples con arena estéril, al tercer día después de la siembra se aplicó 0.2% (p/v) Benlate y 0.2% (p/v) Agri-mycin. Dos semanas después de la germinación, las hojas cotiledonares fueron colectadas y desinfectadas con etanol al 70% por 15 segundos, luego se sumergieron en solución de NaOCl (hipoclorito de sodio) al 20% (v/v) con dos gotas de Tween80 por cada 100 ml, durante 15 minutos y se enjuagó tres veces con agua destilada estéril a nivel de cámara de flujo laminar horizontal marca EACIN (Environmental Air Control, Inc.). El Tween80 es un agente tenso activo (ingrediente activo: polioxietileno 20, polisorbato 80).

Se utilizaron hojas cotiledonares debido a que los explantes tomados de zonas jóvenes o de crecimiento activo tienen una mejor respuesta comparados con explantes tomados de plantas adultas. Mientras más joven es el tejido menor es la diferenciación celular lo que permite un mejor desarrollo *in vitro* (Jiménez 1998a).

Preparación del Medio de Cultivo. Se usó el medio de cultivo basal y vitaminas de Murashige y Skoog (Cuadro 1) suplementado con 0.18% (p/v) de Phytigel y con los reguladores de crecimiento 6-Benciladenina (BA) en concentraciones de 0 a 26.64 μM y Ácido indol-3-butírico (AIB) en concentraciones de 0 a 4.9 μM , añadidos en combinación según el tratamiento (Cuadro 2). Para la preparación de todas las soluciones y medios de cultivo se utilizó agua destilada, el pH se ajustó a 5.8, con HCl y/o KOH, se determinó el mismo con pH Meter S20 Seven Easy™, se dispensó el medio de cultivo en platos petri, 20 ml en cada uno, el medio se esterilizó en el autoclave Market Forge Sterilmatic STM-E a 15 PSI, 121°C por 20 minutos.

Cuadro 1. Medio de cultivo basal y vitaminas de Murashige y Skoog (Kyte 1987).

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg L ⁻¹
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.00
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.00
Macroelementos	KNO ₃	Nitrato de potasio	1,900.00
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.00
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1,650.00
	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.20
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
Microelementos	KI	Yoduro de potasio	0.83
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.30
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratao	0.25
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.60
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	50.00
		Myo-inositol	100.00
Componentes		Ácido nicotínico	0.50
Orgánicos		Piridoxina-HCL	0.50
		Tiamina-HCL	0.10
		Sacarosa	30,000.00

Tratamientos. Se usaron dos reguladores de crecimiento con las siguientes concentraciones 6-Benciladenina: 0, 2.22, 4.44, 13.32, y 26.64 µM y Ácido indol-3-butírico: 0, 0.49, 2.45, y 4.9 µM. Estos reguladores fueron agregados solos y combinados para obtener 12 tratamientos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos para establecimiento *in vitro* de hojas cotiledonares de *Jatropha curcas* –variedad hindú-, combinación de 6-Benciladenina 0 a 26.64 μM y Ácido indol-3-butírico 0 a 4.9 μM .

Tratamientos	6-Benciladenina (μM)	Ácido indol-3-butírico (μM)
0-0	0.00	0.00
444-0	4.44	0.00
444-049	4.44	0.49
1332-049	13.32	0.49
222-245	2.22	2.45
444-245	4.44	2.45
1332-245	13.32	2.45
2664-245	26.64	2.45
0-49	0.00	4.90
444-49	4.44	4.90
1332-49	13.32	4.90
2664-49	26.64	4.90

Preparación y siembra del material vegetal. La cámara de flujo laminar se desinfectó con alcohol al 70%, las herramientas se esterilizaron a 250°C en el esterilizador de calor seco Z3378550 – Steri 250, AC input 120V, luego se realizaron cortes longitudinales para obtener los explantes de las hojas cotiledonares de 1.0 cm², posteriormente se colocaron cuatro explantes por plato petri, se sellaron y luego se incubaron a 22°C, 60% de humedad relativa y 16 horas luz (Silvanya Daylight Incandescent 75 W) con una intensidad de 1450 Lux.

Diseño experimental. Se usó un Diseño Completo al Azar (DCA). Se realizó un Análisis de Varianza, ANDEVA y una separación de medias con el método de Tukey con un nivel de significancia ≤ 0.05 . Los datos fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1®)

Datos evaluados. Cada siete días se evaluó la respuesta de los explantes a los diferentes reguladores de crecimiento. La variable evaluada fue la formación de callo, al finalizar la semana cuatro se determinó la frecuencia de la formación de callo, esta fue expresada como porcentaje, se asignó 0% cuando no hay formación de callo y 100% cuando el callo cubrió totalmente al explante.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los explantes presentaron cambios significativos desde su establecimiento (Figura 1) hasta la semana cuatro, en todos los tratamientos. Al final de la primera semana se presentó, un incremento de tamaño en los explantes y ligeros enrollamientos en las hojas (Figura 2), esto se debe a la rápida división celular que hubo en los explantes sometidos a las concentraciones de las hormonas, la presencia de un mayor enrollamiento y crecimiento del explante indica el efecto de BA y AIB en mayor o menor cantidad.

Según observaciones de Mukherjee *et al.* (2011) y Khurana *et al.* (2010), el uso de los reguladores de crecimiento 6-Benciladenina (BA) en combinación con Ácido indol-3-butírico (AIB) presentaron la mejor respuesta para iniciación y formación de callos. Estos resultados concuerdan con las observaciones de este experimento.

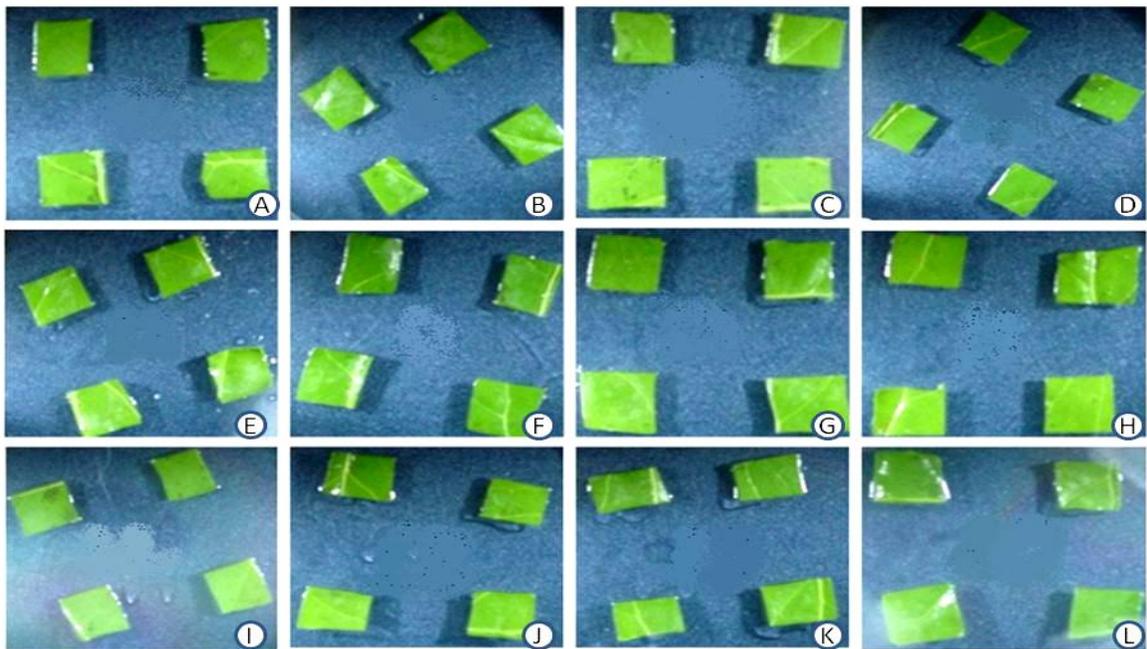


Figura 1. Hojas cotiledonares de *Jatropha curcas*, variedad hindú- siembra del explante en medio MS, **A** - 0-0, (BA 0 μM + AIB 0 μM); **B** - 444-0, (BA 4.44 μM + AIB 0 μM); **C** - 444-049, (BA 4.44 μM + AIB 0.49 μM); **D** - 1332-049, (BA 13.32 μM + AIB 0.49 μM); **E** - 222-245, (BA 2.22 μM + AIB 2.45 μM); **F** - 444-245, (BA 4.44 μM + AIB 2.45 μM); **G** - 1332-245, (BA 13.32 μM + AIB 2.45 μM); **H** - 2664-245, (BA 26.64 μM + AIB 2.45 μM); **I** - 0-49, (BA 0 μM + AIB 4.9 μM); **J** - 444-49, (BA 4.44 μM + AIB 4.9 μM); **K** - 1332-49, (BA 13.32 μM + AIB 4.9 μM); **L** - 2664-49, (BA 26.64 μM + AIB 4.9 μM).

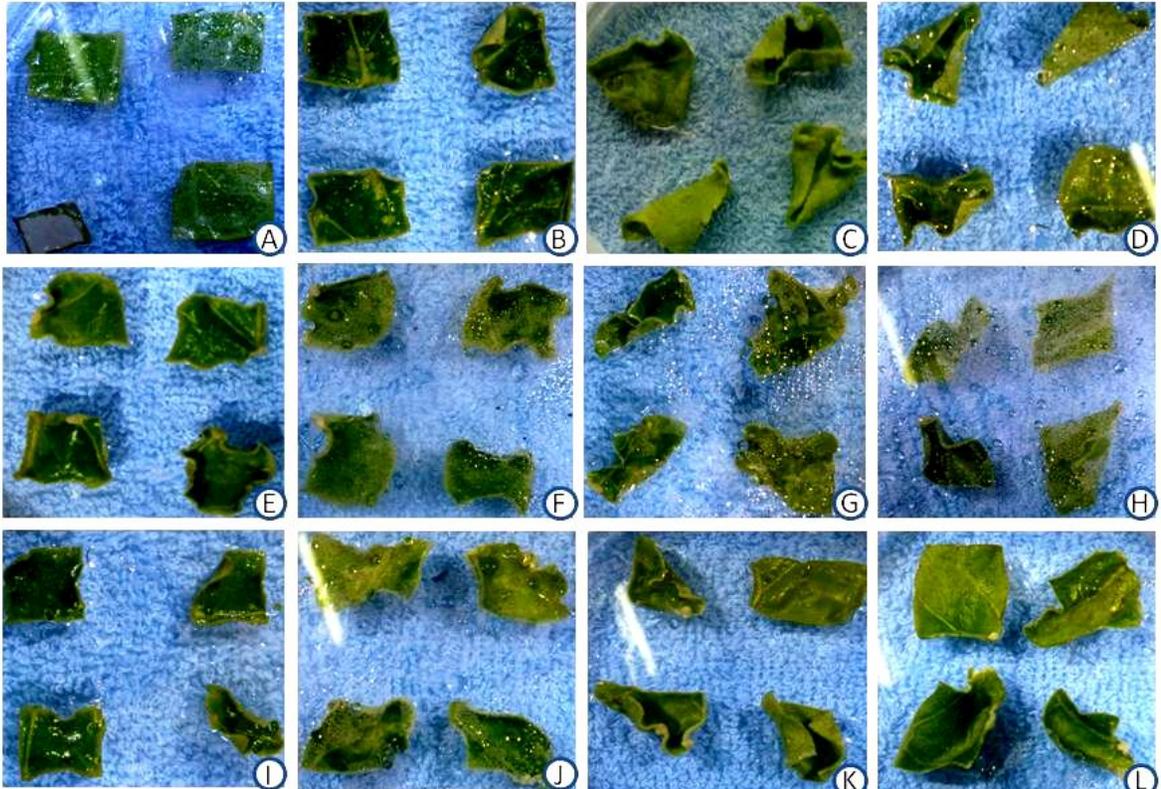


Figura 2. Hojas cotiledonares de *Jatropha curcas*, -variedad hindú- una semana después de siembra, **A** – 0-0, (BA 0 μM + AIB 0 μM); **B** – 444-0, (BA 4.44 μM + AIB 0 μM); **C** – 444-049, (BA 4.44 μM + AIB 0.49 μM); **D** – 1332-049, (BA 13.32 μM + AIB 0.49 μM); **E** – 222-245, (BA 2.22 μM + AIB 2.45 μM); **F** – 444-245, (BA 4.44 μM + AIB 2.45 μM); **G** – 1332-245, (BA 13.32 μM + AIB 2.45 μM); **H** – 2664-245, (BA 26.64 μM + AIB 2.45 μM); **I** – 0-49, (BA 0 μM + AIB 4.9 μM); **J** – 444-49, (BA 4.44 μM + AIB 4.9 μM); **K** – 1332-49, (BA 13.32 μM + AIB 4.9 μM); **L** – 2664-49, (BA 26.64 μM + AIB 4.9 μM).

Al finalizar la segunda semana (Figura 3), el incremento en el tamaño de los explantes continuó, se empezó a observar formación de callo en los bordes de los explantes. Los tratamientos que presentaron formación de callo de mayor a menor cantidad respectivamente fueron: 222-245, 444-245, 1332-49, 444-49, 1332-245 y 2664-245, mientras que el testigo 0-0 no presentó ningún tipo de enrollamiento, crecimiento del explante ni formación de callo. Los tratamientos 444-0, 444-049, 1332-049, 2664-245 y 2664-49 solo presentaron enrollamientos en los explantes sin formación de callo.

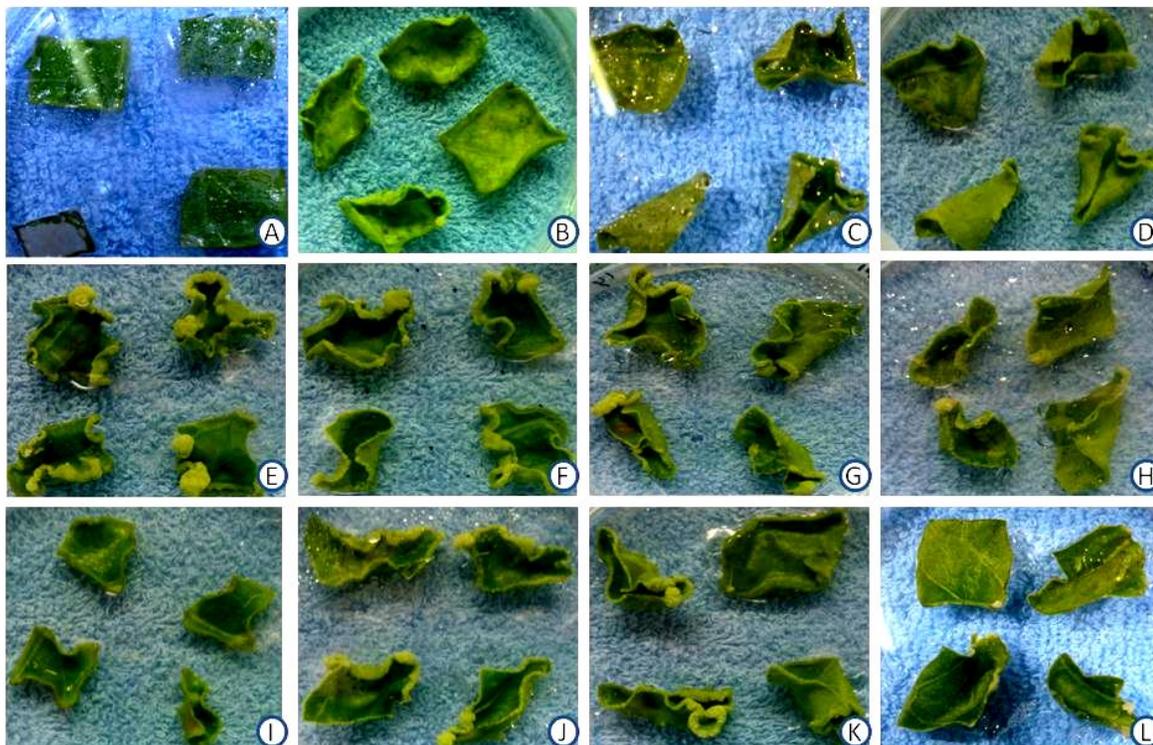


Figura 3. Hojas cotiledonares de *Jatropha curcas*, -variedad hindú- dos semanas después de siembra, **A** – 0-0, (BA 0 μM + AIB 0 μM); **B** – 444-0, (BA 4.44 μM + AIB 0 μM); **C** – 444-049, (BA 4.44 μM + AIB 0.49 μM); **D** – 1332-049, (BA 13.32 μM + AIB 0.49 μM); **E** – 222-245, (BA 2.22 μM + AIB 2.45 μM); **F** – 444-245, (BA 4.44 μM + AIB 2.45 μM); **G** – 1332-245, (BA 13.32 μM + AIB 2.45 μM); **H** – 2664-245, (BA 26.64 μM + AIB 2.45 μM); **I** – 0-49, (BA 0 μM + AIB 4.9 μM); **J** – 444-49, (BA 4.44 μM + AIB 4.9 μM); **K** – 1332-49, (BA 13.32 μM + AIB 4.9 μM); **L** – 2664-49, (BA 26.64 μM + AIB 4.9 μM).

En la semana tres se observó mayor incremento de tamaño del explante. En los tratamientos HC222-245, HC444-245, HC2664-245 y HC444-49 se observó formación de callo en los bordes del explante, mientras que en los tratamientos HC1332-245, HC1332-49 y HC2664-49 se observó formación de callo en toda la superficie del explante (Figura 4).

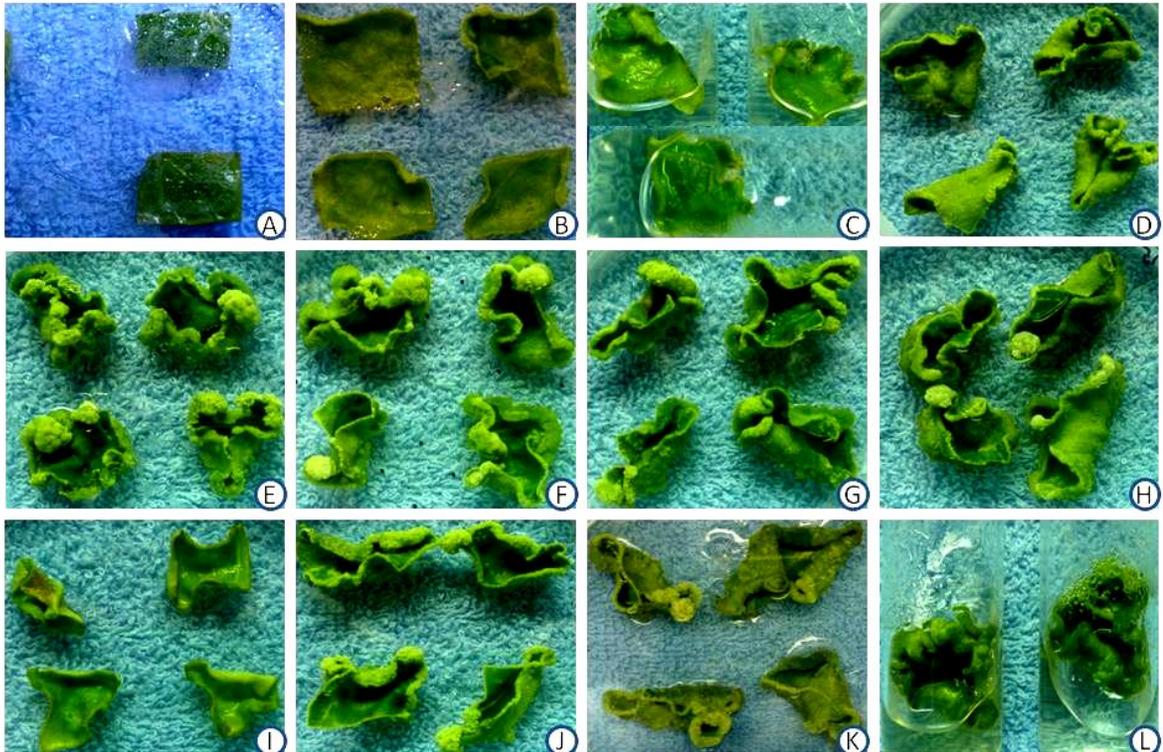


Figura 4. Hojas cotiledonares de *Jatropha curcas*, -variedad hindú- tres semanas después de siembra, **A** – 0-0, (BA 0 μ M + AIB 0 μ M); **B** – 444-0, (BA 4.44 μ M + AIB 0 μ M); **C** – 444-049, (BA 4.44 μ M + AIB 0.49 μ M); **D** – 1332-049, (BA 13.32 μ M + AIB 0.49 μ M); **E** – 222-245, (BA 2.22 μ M + AIB 2.45 μ M); **F** – 444-245, (BA 4.44 μ M + AIB 2.45 μ M); **G** – 1332-245, (BA 13.32 μ M + AIB 2.45 μ M); **H** – 2664-245, (BA 26.64 μ M + AIB 2.45 μ M); **I** – 0-49, (BA 0 μ M + AIB 4.9 μ M); **J** – 444-49, (BA 4.44 μ M + AIB 4.9 μ M); **K** – 1332-49, (BA 13.32 μ M + AIB 4.9 μ M); **L** – 2664-49, (BA 26.64 μ M + AIB 4.9 μ M).

La formación de callo se evaluó como un porcentaje al finalizar la semana cuatro después del establecimiento. Este porcentaje se calculó según la superficie del explante que estaba cubierta por callo. Como se puede observar en el Cuadro 3, se evaluó 0% al tratamiento HC0-0 (Figura 5, Foto A) y 50% al tratamiento HC1332-249 (Figura 5, Foto K).

El testigo (Figura 5, Foto A) no presentó formación de callo. En el tratamiento con BA sin AIB (Figura 5, Foto B), se observó un bajo porcentaje de formación de callo, de igual manera en el tratamiento con AIB sin BA (Figura 5, Foto I). Las combinaciones que presentaron una mayor formación de callo fueron: 222-245 (BA 2.22 μ M + IBA 2.45 μ M) y 444-245 (BA 4.44 μ M + IBA 2.45 μ M) (Cuadro 3). Resultados similares con otras variedades de *Jatropha curcas* fueron observados por Ajay *et al.* (2008), con los mismos reguladores de crecimiento y Misra *et al.* (2010) con combinaciones de BA con Ácido índol-3-acético.

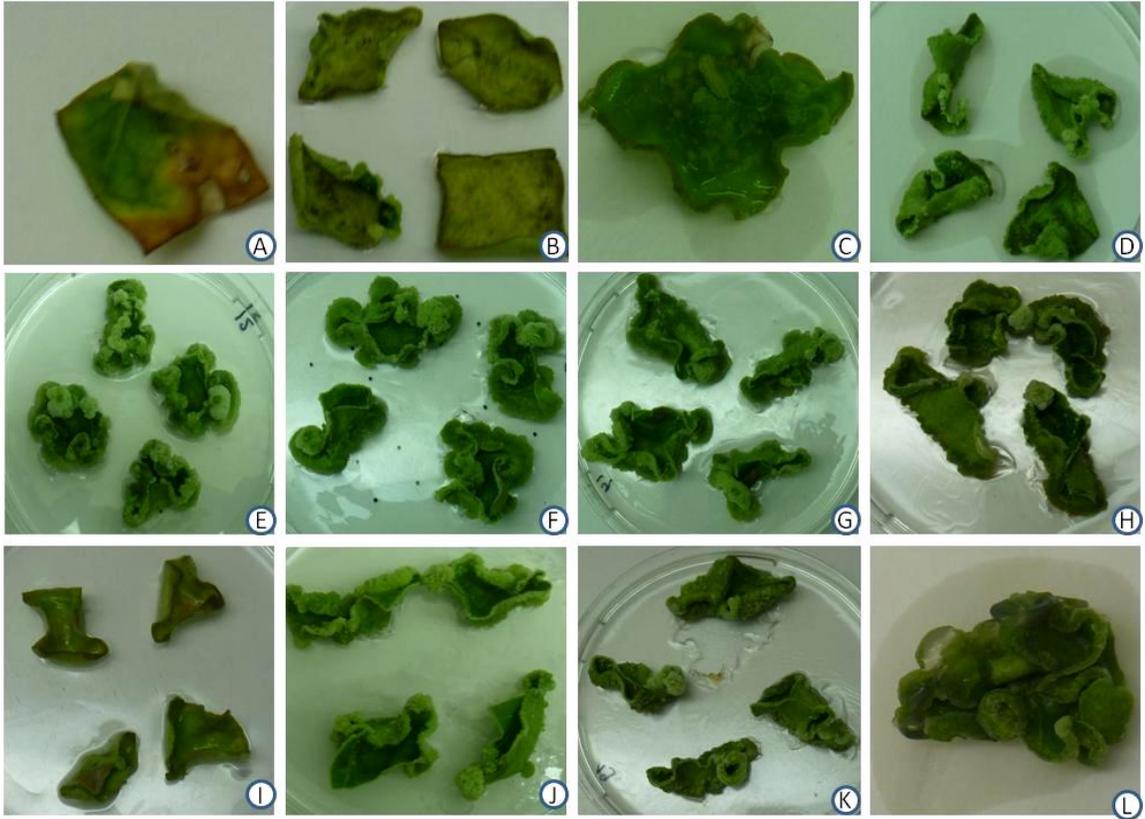


Figura 5. Hojas cotiledonares de *Jatropha curcas*, -variedad hindú- cuatro semanas después de siembra, **A** – 0-0, (BA 0 μM + AIB 0 μM); **B** – 444-0, (BA 4.44 μM + AIB 0 μM); **C** – 444-049, (BA 4.44 μM + AIB 0.49 μM); **D** – 1332-049, (BA 13.32 μM + AIB 0.49 μM); **E** – 222-245, (BA 2.22 μM + AIB 2.45 μM); **F** – 444-245, (BA 4.44 μM + AIB 2.45 μM); **G** – 1332-245, (BA 13.32 μM + AIB 2.45 μM); **H** – 2664-245, (BA 26.64 μM + AIB 2.45 μM); **I** – 0-49, (BA 0 μM + AIB 4.9 μM); **J** – 444-49, (BA 4.44 μM + AIB 4.9 μM); **K** – 1332-49, (BA 13.32 μM + AIB 4.9 μM); **L** – 2664-49, (BA 26.64 μM + AIB 4.9 μM).

Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de 6-Benciladenina y Ácido indol-3-butírico en la formación de callo de los explantes de hojas cotiledonares *Jatropha curcas* –variedad hindú-, al finalizar la cuarta semana.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (μM)		Respuesta de explante Formación de callo (%)
	BA [¥]	AIB [€]	
0-0	0.00	0.00	0.00 d §
444-0	4.44	0.00	4.00 d
444-049	4.44	0.49	3.25 d
1332-049	13.32	0.49	26.25 c
222-245	2.22	2.45	65.50 a
444-245	4.44	2.45	67.25 a
1332-245	13.32	2.45	50.75 ab
2664-245	26.64	2.45	61.50 ab
0-49	0.00	4.90	1.50 d
444-49	4.44	4.90	47.25 b
1332-49	13.32	4.90	51.25 b
2664-49	26.64	4.90	13.50 cd

¥ = 6-Benciladenina.

€ = Ácido indol-3-butírico.

§ = Los promedios con diferentes letras no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey con una probabilidad ≤ 0.05 .

4. CONCLUSIONES

- Para inducir a formación de callo morfogénico en hojas cotiledonares de *Jatropha curcas* -variedad hindú- es necesaria la presencia de 6-Benciladenina y Ácido indol-3-butírico.
- Las concentraciones de 6-Benciladenina entre 0 y 26.64 μM en combinación con Ácido indol-3-butírico menor a 2.45 μM presentaron bajo porcentaje de formación de callo.
- Concentraciones de 6-Benciladenina mayores a 13.32 μM en combinación con 4.9 μM de Ácido indol-3-butírico resultaron en un bajo porcentaje de formación de callo.
- La combinación de BA 2.22 μM con AIB 2.45 μM presentó formación de callo en mayor porcentaje a partir de la semana dos.
- Las mejores combinaciones para inducir a formación de callo en hojas cotiledonares de *Jatropha curcas* –variedad hindú- fueron: 6-Benciladenina 4.44 μM con Ácido indol-3-butírico 2.45 μM y 6-Benciladenina 2.22 μM con Ácido indol-3-butírico 2.45 μM .

5. RECOMENDACIONES

- Para inducir a formación de callo a partir de hojas cotiledonares de *Jatropha curcas* - variedad hindú-, se recomienda usar 6-Benciladenina 2.22 μM combinada con Ácido indol-3-butírico 2.45 μM .
- Continuar con la investigación para lograr la inducción de brotes a partir de los callos morfogénicos.
- Realizar ensayos similares con diferentes variedades de *Jatropha curcas* L. para conocer su respuesta a 6-Benciladenina y Ácido indol-3-butírico.
- Realizar ensayos utilizando distintas combinaciones de otras citoquininas y auxinas.
- Realizar ensayos con explantes: meristemos apicales y/o laterales, nudos, embriones; para evaluar su respuesta con las combinaciones de hormonas realizadas en este ensayo.

6. LITERATURA CITADA

Ajay, C., T. Sudhakar. 2008. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnol Reports* 2:7-11.

Bártoli, J. 2008. Manual para el cultivo de piñón (*Jatropha curcas*) en Honduras. La Lima, Cortés, Honduras. 30 p.

Jiménez, E.A. 1998a. Cultivo de ápices y meristemas. *In* Pérez J. N. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Santa Clara, Cuba. p. 45-56.

Jiménez, E.A. 1998b. Generalidades del Cultivo *in vitro*. *In* Pérez J. N. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Santa Clara, Cuba. p. 13-24.

Kalimuthu, K., S. Paulsamy, R. Senthilkumar, M. Sathya. 2007. *In vitro* propagation of the Biodiesel plant *Jatropha curcas* L. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 17(2):137-147.

Khurana-Kaul, V., S. Kachhwaha, S. L. Kothari. 2010. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in medium. *Biologia plantarum* 54(2):369-372.

King, A., J.A. Cuevas, M. Freudenberger, D. Ramiamanana, I. A. Graham. 2009. Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. *Journal of Experimental Botany* 60(10):2897-2905.

Kyte, L. 1987. Plants from test tubes an introduction to micro propagation. Portland, Oregon, Timber Press. 160 p.

Lopez, D., L. Peñate, M. Daquinta, D. Pina, M. Escalona. Cultivo de *Jatropha curcas*, L. (Euphorbiaceae). Resultados preliminares y estrategias futura (en línea). Consultado el 6 de mayo de 2011. Disponible en:
<http://www.cubasolar.cu/biblioteca/Ecosolar/Ecosolar21/HTML/articulo03.htm>

Martínez, J. 2007. El piñón mexicano: una alternativa bioenergética para México. *Revista digital universitaria* 8(12):1067-6079.

Misra, P., N. Gupta, D. Toppo, V. Pandey, M. Kumar, R. Tuli. 2010. Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 100:189-197.

Mukherjee, P., A. Varshney, T. Sudhakar, T. Baran. 2011. *Jatropha curcas*: a review on biotechnological status and challenges. *Plant Biotechnology Reports* 5:197-215.

Toral, O., J.M. Iglesias, S. Montes de Oca, J.A. Sotolongo, S. García y M. Torsti. 2008. *Jatropha curcas* L. una especie arbórea con potencial energético en Cuba. *Pastos y Forrajes* 31(3):191-207.

7. ANEXOS

Anexo 1. Equivalencias entre mg L^{-1} y micromoles de los tratamientos para establecimiento *in vitro* de explantes de hojas cotiledonares *Jatropha curcas* –variedad hindú-, combinación de 6-Benciladenina (BA) y Ácido indol-3-butírico (AIB).

Tratamientos	6-Benciladenina		Ácido indol-3-butírico	
	μM	mg L^{-1}	μM	mg L^{-1}
0-0	0.00	0.0	0.00	0.0
444-0	4.44	1.0	0.00	0.0
444-049	4.44	1.0	0.49	0.1
1332-049	13.32	3.0	0.49	0.1
222-245	2.22	0.5	2.45	0.5
444-245	4.44	1.0	2.45	0.5
1332-245	13.32	3.0	2.45	0.5
2664-245	26.64	6.0	2.45	0.5
0-49	0.00	0.0	4.90	1.0
444-49	4.44	1.0	4.90	1.0
1332-49	13.32	3.0	4.90	1.0
2664-49	26.64	6.0	4.90	1.0

Anexo 2. Contaminación, muerte, sobrevivencia, y porcentaje de formación de callo como respuesta a 6-Benciladenina (BA) y Ácido indol-3-butírico (AIB) en el establecimiento *in vitro* de *Jatropha curcas* -variedad hindú- a partir de hojas cotiledonares.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (µM)		Contaminación (%)	Muerte (%)	Sobrev ^b (%)	Callo (%)	
	BA	AIB					
	0-0	0.00					
222-0	2.22	0.00	100.00	0.00	0.00	dnd	♦
444-0	4.44	0.00	66.67	00.0	33.33	4.00	d
1332-0	13.32	0.00	100.00	0.00	0.00	dnd	♦
2664-0	26.64	0.00	100.00	0.00	0.00	dnd	♦
0-049	0.00	0.49	100.00	0.00	0.00	dnd	♦
222-049	2.22	0.49	100.00	0.00	0.00	ndd	♦
444-049	4.44	0.49	66.67	8.33	25.00	3.25	d
1332-049	13.32	0.49	33.34	8.33	58.33	26.25	c
2664-049	26.64	0.49	100.00	0.00	0.00	dnd	♦
0-245	0.00	2.45	100.00	0.00	0.00	dnd	♦
222-245	2.22	2.45	33.33	0.00	66.67	65.50	a
444-245	4.44	2.45	33.33	0.00	66.67	67.25	a
1332-245	13.32	2.45	66.67	0.00	33.33	50.75	a, b
2664-245	26.64	2.45	66.67	0.00	33.33	61.50	a, b
0-49	0.00	4.90	66.67	0.00	33.33	1.50	d
222-49	2.22	4.90	100.00	0.00	0.00	dnd	♦
444-49	4.44	4.90	66.67	0.00	33.33	47.25	b
1332-49	13.32	4.90	33.33	0.00	66.67	51.25	a, b
2664-49	26.64	4.90	66.67	16.67	16.67	13.50	c, d

§ = Los promedios con las mismas letras no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey con una probabilidad ≤ 0.05 .

♦ Datos no determinados (se observó contaminación pocos días después de establecimiento).

^b Sobrevivencia.