

**Propagación *in vitro* de *Jatropha curcas*
-variedad cabo verde- a partir de láminas
foliares**

Marco Vinicio Álvarez Escudero

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2015

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Propagación *in vitro* de *Jatropha curcas*
-variedad cabo verde- a partir de láminas
foliares**

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

Presentado por

Marco Vinicio Álvarez Escudero

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2015

Propagación *in vitro* de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde- a partir de láminas foliares

Presentado por:

Marco Vinicio Álvarez Escudero

Aprobado:

María Alexandra Bravo, M.Sc.
Asesora principal

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Renán Pineda, Ph.D.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Propagación *in vitro* de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde- a partir de láminas foliares

Marco Vinicio Álvarez Escudero

Resumen. El Piñón, *Jatropha curcas* L. tiene el potencial de ser una alternativa viable para fabricar biodiesel a partir de aceites extraídos de la semilla. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la edad de la fuente de explante para el establecimiento *in vitro* y evaluar el efecto dos medios de cultivo y la edad de la fuente del explante en la multiplicación de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde-. Para el establecimiento se utilizó el medio de cultivo (MS) suplementado con 0.2 mg L⁻¹ de TDZ + 0.2 mg L⁻¹ de AIB y se evaluó la respuesta al medio de cultivo de los explantes extraídos de plantas de 10 días (P10D), 60 días (P60D) y plantas adultas (4 años) (PA). Los brotes y callos formados en establecimiento se pasaron a dos medios de inducción/multiplicación de brotes: MS a 50% de sales y MS 100% de sales suplementado con 1 mg L⁻¹ de BAP. En la etapa de establecimiento se observó formación de brotes en el 24% de los explantes de P10D, 16% de los explantes P60D y un 6% de los explantes de PA. En la etapa de inducción/multiplicación de brotes no hubo interacción entre el medio y el explante. Se observó a los 21 días en el medio de inducción/multiplicación los explantes de P10D formaron un promedio de 0.87 brotes/explante, lo cual fue mejor que en los otros explantes. Luego de 21 días del segundo refrescamiento se observó un promedio de 3.32 brotes/explante en los explantes de P10D, los brotes de los otros explantes presentaron deformaciones. El mejor resultado para la proliferación de brotes se obtuvo con los explantes extraídos de P10D.

Palabras clave: Brotes adventicios, micropropagación, piñón, tidiázurón.

Abstract. *Jatropha curcas* L. is a highly energy crop. Its most important characteristic is the production of oil from the seed, which has the potential to be a viable alternative for manufacturing biodiesel. The objective of this study was to evaluate the effect of the age of the source of explant for *in vitro* establishment and assess the effect of two culture media and the age of the source of explant in the proliferation of *Jatropha* -variety cabo verde-. For establishment it was used a culture medium (MS) supplemented with 0.2 mg L⁻¹ of TDZ + 0.2 mg L⁻¹ of IBA and also the response of each media culture was evaluated in the explants taken from plants of 10 days (P10D), 60 days (P60D), and adults plants (4 years) (PA). Callus and shoots were formed in the establishment, then were passed into two mediums for the shoot induction/multiplication: MS 50% of salt and 100% MS of salt supplemented with 1 mg L⁻¹ BAP. In the stage of establishment, formation of shoots were observed only in 24% of explants of P10D, 16% of P60D explants sprouted and 6% of PA explants sprouted. In the induction/multiplication shoot stage no interaction between the medium and the explant was observed. At 21 days in the induction/multiplication medium the explants of plants of P10D formed an average of 0.87 shoots/explant, which was statistically significant compared to the other explants. The shoots count after 21 days of the second medium refreshing the P10D explants showed an averaged of 3.32 shoots/explant, buds from other explants showed deformations. The best result for shoot proliferation was obtained with explants taken from P10D.

Keywords: adventitious buds, micro propagation, pinion, thidiazuron.

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.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
4 CONCLUSIONES.....	12
5 RECOMENDACIONES.....	13
6 LITERATURA CITADA.....	14
7 ANEXOS.....	16

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog usado para el establecimiento de explantes foliares de <i>Jatropha curcas</i> -variedad cabo verde-	4
2. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS 1) para multiplicación de brotes de <i>Jatropha curcas</i> -variedad cabo verde-.....	7
3. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS 2) para multiplicación de brotes de <i>Jatropha curcas</i> -variedad cabo verde-.....	8
4. Porcentaje de explantes con brotes de <i>Jatropha curcas</i> -variedad cabo verde- 10 días después del establecimiento <i>in vitro</i>	10
5. Porcentaje de explantes con brotes de <i>Jatropha curcas</i> -variedad cabo verde- 21 días después del primer refrescamiento a medio para inducción y multiplicación de brotes.....	10
Figuras	Página
1. Corte de la hoja de <i>Jatropha curcas</i> -variedad cabo verde- antes del establecimiento <i>in vitro</i>	5
2. Siembra del explante de <i>Jatropha curcas</i> -variedad cabo verde- observando la orientación del explante con el envés en contacto con el medio de cultivo.	5
3. Explantes de <i>Jatropha curcas</i> -variedad cabo verde- con presencia de enrollamiento y callosidades A los cinco días y B a los 10 días después de establecimiento en un medio MS suplementado con 0.2 mg L ⁻¹ de TDZ y 0.2 mg L ⁻¹ de AIB.....	9
4. Brotes de <i>Jatropha curcas</i> -variedad cabo verde- 21 días después de establecimiento un medio MS suplementado con 1 mg L ⁻¹ de BAP.....	11
5. Brotes de <i>Jatropha curcas</i> -variedad cabo verde- a los 21 días del refrescamiento en un medio para inducción/multiplicación MS suplementado con 1 mg L ⁻¹ de BAP.	11
6. Brotes deformes generados a partir de láminas foliares de planta de 60 días de germinación y plantas adultas de <i>Jatropha curcas</i> -variedad cabo verde- a los 21 días del refrescamiento en un medio para inducción/multiplicación MS suplementado con 1 mg L ⁻¹ de BAP.	11

1. Contaminación por hongos y bacterias de callos usados para la propagación *in vitro* de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde- en medio suplementado con 0.2 mg L⁻¹ de TDZ y 0.2 mg L⁻¹ de AIB 16
2. Contaminación de callos de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde-. A) contaminación por hongos. B) Contaminación por bacterias..... 16

1. INTRODUCCIÓN

Jatropha curcas es un arbusto perenne perteneciente a la familia Euphorbiaceae, que tiene más de 3.500 especies agrupadas en 210 géneros (Falasca y Ulberich 2008), está considerado como un cultivo que permite la producción de biocombustibles, la obtención de productos importantes en farmacéutica, alimentación y en agricultura (Pabón y Hernández-Rodríguez 2012).

La *Jatropha curcas* es originaria de América central y México fue trasladada a otros lugares del mundo durante épocas de la colonia (López 2009). Crece en regiones tropicales y subtropicales, en altitudes menores a 500 metros sobre el nivel del mar (FAO 2010). Es un arbusto de crecimiento rápido, alcanza una altura aproximada de 6 metros dependiendo de las condiciones de crecimiento (Guerrero 2014, FAO 2010).

La *Jatropha curcas* tiene propiedades importantes como su alta resistencia a sequía, su tolerancia a condiciones salinas y su baja necesidad de nutrientes. Además es un cultivo altamente energético, su característica más importante es la de producción de aceite a partir de la semilla (Jongschaap *et al.* 2007).

El aceite vegetal de la *Jatropha curcas* no es comestible pero tiene el potencial de ser una alternativa viable para a partir de este fabricar biodiesel. El contenido de aceite es 35 - 40% en las semillas. El aceite contiene 21% de ácidos grasos saturados y 79% ácidos grasos insaturados. Existen elementos químicos en la semilla que son venenosos estos hacen que el aceite no sea apto para el consumo humano. El análisis químico de la semilla está presentado por humedad 6.2%, proteínas 18%, grasa 38%, hidratos de carbono 17%, fibra 15.5%, cenizas 5.3% (FAO 2011).

Comprendiendo la capacidad de la *Jatropha curcas* para producción aceite y siguiendo una tendencia de buscar fuentes de energías inofensivas con el ambiente, el aceite de las semillas de *Jatropha curcas* puede ser transformado en biodiesel, en bio-pesticidas, los derivados pueden ser glicerina y fertilizantes (López 2009). La propagación de la *Jatropha curcas* se realiza por tres métodos los cuales son generativa partir de semillas, vegetativo a partir de estacas, e *in vitro* (SAGARPA 2012).

La *Jatropha curcas* tiene polinización abierta por lo que sus semillas son genéticamente heterocigotas por lo tanto tienen un alto grado de variabilidad. Para alcanzar la futura demanda de material vegetal elite es necesario desarrollar técnicas de propagación masiva (Khurana-Kaul *et al.* 2004).

Los explantes usados para la micropropagación de *Jatropha curcas* son hojas, cotiledones, peciolo e hipocotilo. Chiangmai *et al.* (2014) reportaron haber obtenido regeneración adventicia de brotes a partir de hojas verdaderas y callos preformados, usando el medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con 0.5 mg L^{-1} de BAP (6-bencilaminopurina) y 1.0 mg L^{-1} AIB (ácido 3-indolbutírico).

Khurana-Kaul *et al.* (2004) obtuvo brotes a partir de hojas de *Jatropha curcas* en respuesta a Tiazurón y altos contenidos de cobre en el medio, Khurana-Kaul *et al.* (2004) obtuvo los mejores resultados con el medio suplementado con 0.2 mg L^{-1} de Tiazurón (TDZ) y 0.2 mg L^{-1} de AIB. Noriega *et al.* (2011) obtuvo organogénesis directa a partir de cotiledones en un medio MS suplementado con 1.5 mg L^{-1} BAP, 0.05 mg L^{-1} AIB y 0.5 mg L^{-1} GA (Ácido giberélico). Para la etapa de multiplicación Delgado (2011) probó dos formulaciones MS a 50% de su composición y un medio MS suplementado con 1 mg L^{-1} de BAP.

El objetivo de este estudio fueron

- Evaluar la edad de la fuente de explante para el establecimiento *in vitro*
- Evaluar el efecto de dos medios de cultivo y la edad de la fuente del explante en la multiplicación de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde-.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El estudio fue realizado en los meses de febrero a septiembre del año 2015 en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.

Experimento 1. Establecimiento *in vitro* de explantes foliares. El material vegetal fue extraído de plantas de 10 días (P10D), plantas de 60 días (P60D) y de la plantas adultas (PA) de la plantación de la Escuela Agrícola Panamericana ubicada en Santa Inés. Para el experimento se seleccionaron y recolectaron hojas de los ápices y de 5 centímetros de diámetro de estas tres plantaciones.

La recolección de explantes se realizó cortando las hojas del área apical, a las hojas se les eliminaron los pecíolos dejando únicamente el área foliar. Posterior a la recolección de explantes, estos fueron llevados al laboratorio donde fueron sometidos a desinfección, preparación, establecimiento para la producción de brotes.

Método de Desinfección. La desinfección de los explantes, consistió en un lavado con agua y jabón suave por dos minutos, luego se los sumergió en un solución de etanol al 70% por 15 segundos seguido de una inmersión en la solución de cloro comercial al 20% v/v (NaOCl 4.72 % de ingrediente activo) se agregaron dos gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución desinfectante por 10 minutos.

Medio de cultivo. Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Cuadro 1), suplementado con 0.2 mg L^{-1} de TDZ y 0.2 mg L^{-1} de AIB (Khurana-Kaul *et al.* 2004) y con 2 g L^{-1} de Phytigel (compuesto gelificante), el pH se ajustó a 5.8, esterilizado en autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, a 15 PSI por 20 minutos.

Cuadro 1. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog usado para el establecimiento de explantes foliares de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde-.

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg L ⁻¹
Macro elementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1,900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650.000
Micro elementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	50.000
Vitaminas		Myo-inositol	100.000
		Tiamina	0.400
		Piridoxina	0.500
		Ácido Nicotínico	0.500
Carbohidrato		Sacarosa	30,000.000

Fuente: Kyte (1987)

Preparación, siembra y manejo del material vegetal. La siembra se realizó dentro de la cámara de flujo laminar, esta se desinfectó con etanol al 70% y encendió 15 minutos antes de la siembra. Los bisturís y pinzas que se usaron para el procedimiento se lavaron con agua y jabón y desinfectaron con etanol al 70%, y se las colocaron en los esterilizadores de calor seco a 250°C por 15 segundos.

Dentro de la cámara de flujo laminar los explantes se lavaron tres veces con agua destilada estéril y a continuación se realizó la siembra en medio de cultivo estéril. Para la siembra las hojas se cortaron en segmentos de aproximadamente de 1.5 cm × 1.5 cm (Figura 1) con nervadura central. Se colocó un explante por frasco y además se aseguró que el envés del explante quede en contacto con el medio (Figura 2).



Figura 1. Corte de la hoja de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde- antes del establecimiento *in vitro*.

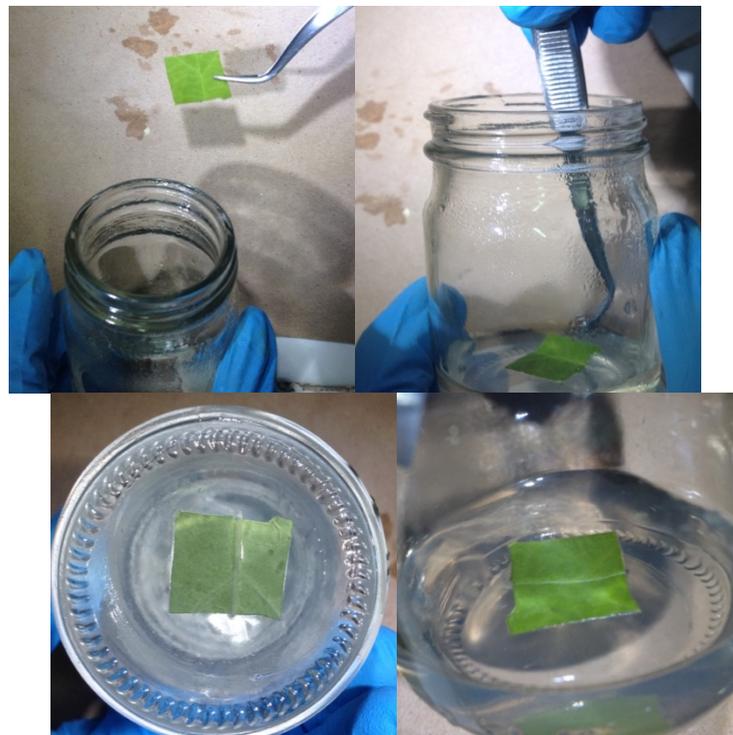


Figura 2. Siembra del explante de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde- observando la orientación del explante con el envés en contacto con el medio de cultivo.

Incubación. Las condiciones de incubación en el cuarto de crecimiento fueron de 24 °C, con una humedad relativa de 70 %, con intensidad lumínica de 2000 Lux y un fotoperiodo de 16 horas luz por lámparas fluorescentes, estas condiciones se mantuvieron en todo el experimento.

Tratamientos. En este experimento se evaluó la respuesta al medio de cultivo de los explantes extraídos de plantas de 10 días (P10D), plantación de 60 días (P60D) y plantas adulta (PA).

Variables a evaluar. Los explantes sembrados se observaron por 21 días. La variable medida fue formación de brotes por explante.

Diseño Experimental. Se utilizó un Diseño Completo al Azar con tres tratamientos, cinco repeticiones por tratamiento, 10 unidades experimentales por tratamiento. Se realizó el análisis de varianza, y una separación de medias con el método de Tukey con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Los datos fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1[®]).

Experimento 2. Inducción/multiplicación de brotes. Después de 21 días del establecimiento *in vitro* los explantes foliares que presentaban brotes o desarrollaron callos fueron colocados en dos medios para la producción de mayor número de brotes.

Para la multiplicación de brotes se probaron dos formulaciones MS 1 (Cuadro 2) a 50% de su composición y un medio MS 2 (Cuadro 3) suplementado con 1 mg L⁻¹ de BAP (Delgado 2011).

Dentro de la cámara de flujo laminar se cortó una porción de callo tratando de obtener un mejor contacto con el medio. Se colocó una porción de callo por frasco, fueron trasladados a condiciones de incubación en el cuarto de crecimiento, similares a las del establecimiento.

Variables a evaluar. Los explantes sembrados se observaron por 21 días. La variable medida fue formación de brotes en los tres tipos de explantes (P10D, P60D y PA).

Diseño Experimental. Se utilizó un Diseño completamente al azar con un arreglo factorial de tres × dos, tres fuentes de explantes y dos medios de cultivo con cinco repeticiones por tratamiento. Se realizó el análisis de varianza y una separación de medias con el método de Tukey con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Los datos fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1[®]).

Cuadro 2. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS 1) para multiplicación de brotes de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde-.

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg L⁻¹
Macro elementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	220.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	85.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	950.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	185.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	825.000
Micro elementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	3.100
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.0125
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.0125
	KI	Yoduro de potasio	0.415
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	11.150
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.125
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	4.300
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	25.000
Vitaminas		Tiamina	0.400
		Ácido Nicotínico	0.500
Carbohidrato		Sacarosa	30,000.000

Fuente: Kyte (1987)

Cuadro 3. Medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS 2) para multiplicación de brotes de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde-.

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg L⁻¹
Macro elementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1,650.000
Micro elementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Hierro	FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido Etilendiaminotetraacético	50.000
Fitohormona	BAP	6-bencilamino purina	1.000
Vitaminas		Tiamina	0.400
		Ácido Nicotínico	0.500
Carbohidrato		Sacarosa	30,000.000

Fuente: Kyte (1987)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1. Establecimiento *in vitro* de explantes foliares. A los cinco días del establecimiento se observó que los explantes de todos los tratamientos se enrollaron, se hincharon y además presentaron cambio de color (Figura 3). A los 10 días de establecidos se observó presencia de callos friables y de un color verde tenue. Se observó 6% de explantes muertos y 21% de explantes contaminados.

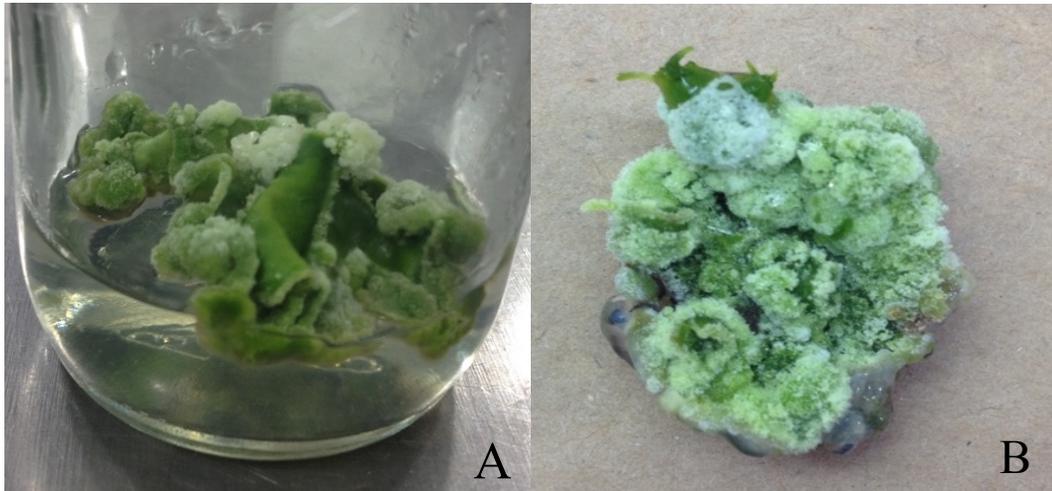


Figura 3. Explantes de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde- con presencia de enrollamiento y callosidades **A** los cinco días y **B** a los 10 días después de establecimiento en un medio MS suplementado con 0.2 mg L^{-1} de TDZ y 0.2 mg L^{-1} de AIB.

Se observó formación de brotes de 24% en explantes P10D, un 16% en explantes P60D y 6% en explantes PA (Cuadro 4). Khurana-Kaul *et al.* (2004) evaluó el efecto de TDZ para la producción directa de brotes adventicios usando hojas de *Jatropha curcas* de una plantación de dos años de edad, los resultados que Khurana-Kaul *et al.* obtuvo en el 2004 fue una respuesta a formación de brotes con un 88%.

Cuadro 4. Porcentaje de explantes con brotes de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde- 10 días después del establecimiento *in vitro*.

Explante	Explantes con callo (%)	Explantes con brotes (%)
Hojas de plantas de 10 días	92 ^{ns}	24 ^{a§}
Hojas de plantas de 60 días	80	16 ^a
Hojas de plantas adultas	74	6 ^b

ns no hay deferencia significativa en la columna.

§ Los promedios seguidos con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$)

Con un R Cuadrado (R^2) de 0.123 y un Coeficiente de Variación (CV) de 24.55.

Experimento 2. Inducción/multiplicación de brotes. A los 21 días del cambio a los medios de multiplicación se observó formación de brotes en los callos que no habían formado en el medio de establecimiento. Luego de hacer el análisis estadístico se observó que no hay interacción entre el explante y el medio de cultivo y que el efecto del medio tampoco es estadísticamente significativo en la formación de brotes. Sí se observó que el efecto de la edad de las plantas de donde se extrae el explante es estadísticamente significativo.

A los 21 días de permanecer en el medio de multiplicación e inducción de brotes se observó que callos provenientes de los explantes de la P10D formaron un promedio de 0.87 brotes/explante lo cual fue estadísticamente significativo comparando con los otros explantes (Cuadro 5).

Cuadro 5. Promedio de explantes con brotes de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde- 21 días después del primer refrescamiento a medio para inducción y multiplicación de brotes.

Fuente del Explante	Promedio de brotes por explante
Hojas de plantas de 10 días	0.87 ^{a§}
Hojas de plantas de 60 días	0.51 ^b
Hojas de plantas adultas	0.31 ^b

§ Los promedios seguidos con la misma letra en la columna no son significativamente diferentes ($P \geq 0.05$).

Con un R Cuadrado (R^2) de 0.680 y un Coeficiente de Variación (CV) de 36.866.

A los 21 días los brotes formados se pasaron nuevamente a un medio fresco. En esta ocasión se dejó el brote con una porción de callo en su base, la base de este callo se raspó tratando de mejorar contacto con el medio de cultivo (Figura 5). A los 21 días después del segundo refrescamiento se observó un promedio de 3.32 brotes por explante en los callos que provenían de explantes de P10D (Figura 5).

Khurana-Kaul *et al.* (2004) obtuvieron hasta 18 brotes por explante luego de un tercer refrescamiento del medio y de haber incrementado la dosis de cobre lo que indica que es necesario seguir haciendo cambios a medio fresco y ajustar la dosis de este micronutriente

en futuros experimentos. Los brotes generados de los explantes P60D y PA presentaron deformación (Figura 6).



Figura 4. Brotes de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde- 21 días después de establecimiento un medio MS suplementado con 1 mg L^{-1} de BAP.

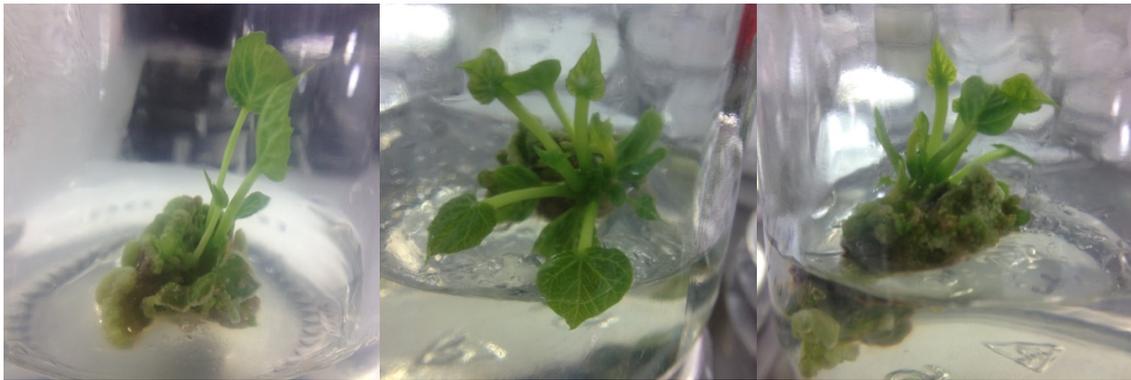


Figura 5. Brotes de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde- a los 21 días del refrescamiento en un medio para inducción/multiplicación MS suplementado con 1 mg L^{-1} de BAP.



Figura 6. Brotes deformes generados a partir de láminas foliares de planta de 60 días de germinación y plantas adultas de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde- a los 21 días del refrescamiento en un medio para inducción/multiplicación MS suplementado con 1 mg L^{-1} de BAP.

4. CONCLUSIONES

- Los mejores explantes para el establecimiento *in vitro* son los extraídos de hojas de plantas de 10 días.
- En la multiplicación el medio de cultivo no tiene efecto en la producción de brotes por explante, pero sí la edad del explante. Durante la multiplicación las hojas de plantas de 10 días generaron mayor cantidad de brotes y las hojas de explante de 60 días y adultas generaron brotes deformes.

5. RECOMENDACIONES

- Continuar el experimento con el fin de completar el protocolo de micropropagación de *Jatropha curcas*.
- Repetir el experimento usando meristemas *Jatropha curcas* -variedad cabo verde- de una plantación recién podada y que haya sido identificada como élite.

6. LITERATURA CITADA

Chiangmai, P.N., Y. Pootaeng-on, P. Meetum, K. Kamkajon, W. Yuiam, N. Rungph y P. Ninkaew. 2014. Regeneration of Adventitious Shoots from Callus and Leaf Explants in *Jatropha curcas* L. 'Phetchaburi'. Faculty of Animal Science and Agricultural Technology 9 (1): 28-39.

Delgado, H. 2011. Manual protocolos para el cultivo *in vitro* de Piñón Blanco (*Jatropha curcas* L.). Ministerio de Agricultura y Riego, Instituto Nacional de Innovación Agraria, Estación Experimental Agraria "El Porvenir – San Martín". Perú. 17p.

Falasca, S. y A. Ulberich. 2008. Las especies del género *Jatropha* para producir biodiesel en Argentina. Revista Virtual de REDESMA. Recuperado en Marzo de 2015
<http://www.ambientalex.info/normasnal/Espgenjatprobioar.pdf>

FAO. 2010. *A Smallholder Bioenergy Crop*. Recuperado el 15 de Marzo de 2015, de Food and Agriculture Organization of the United Nations.
<http://www.fao.org/docrep/012/i1219e/i1219e02.pdf>

FAO. 2011. The cultivation of *Jatropha curcas* in Egypt. Recuperado el 14 de Marzo de 2015, de Food and Agriculture Organization of the United Nations:
<http://www.fao.org/docrep/x5402e/x5402e11.htm>

Guerrero, J. 2014. Biología Floral en *Jatropha curcas* L. Consultado el 11 de Febrero de 2015. disponible en
http://www.procitropicos.org.br/portal/newbb/dl_attachment.php?attachid=1329992452&post_id=110

Jongschaap, R.E.E., W.J. Corré, P.S. Bindraban y W.A. Brandenburg. 2007. Claims and Facts on *Jatropha curcas* L. Global *Jatropha curcas* evaluation, breeding and propagation programme. Plant Research International. Report 158.

Khurana-Kaul, K., S. Kachhwaha y S. Kothari. 2004. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium. *Biologia Plantarum* 54 (2): 369-372.

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

López, R. 2009. Potencial de Producción de semilla de *Jatropha curcas*. Consultado el 14 de Febrero de 2015. Disponible en <http://www.geociencias.unam.mx/~bole/eboletin/treRebecaLM09.pdf>

Noriega, A., A. Soares, A.B. Ibrahim y F. Campos. 2011. Analysis of organogenic competence of cotyledons of *Jatropha curcas* and their *in vitro* histological behavior. African Journal of Biotechnology 10 (54):11249-11258.

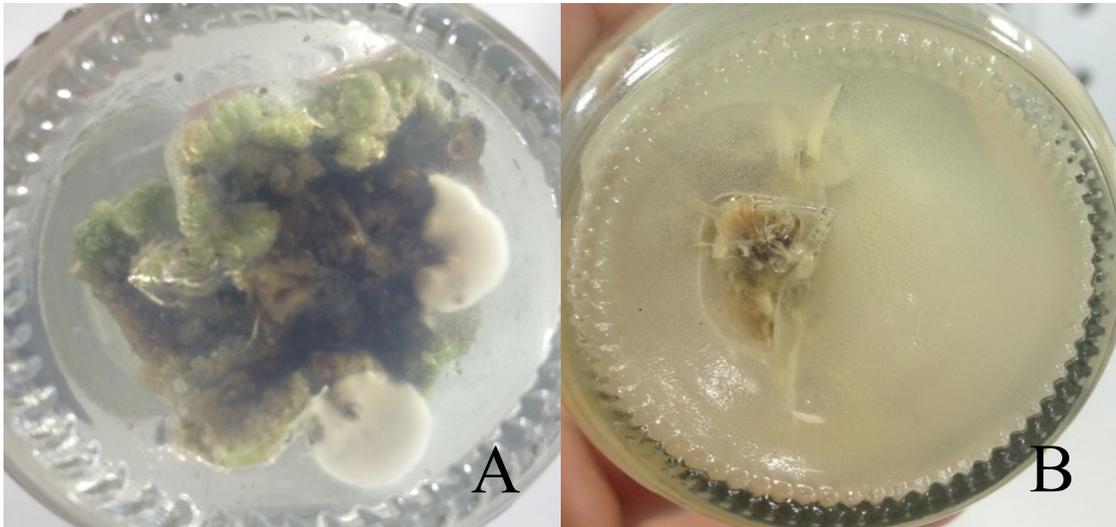
Pabón, L.C. y P. Hernández-Rodríguez. 2012. Importancia química de *Jatropha curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales. Revista Cubana de Plantas Medicinales 17(2): 194-209.

SAGARPA. 2012. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Consultado el 20 de Marzo de 2015, de Información Técnica de Semillas de *Jatropha curcas* Mexicana para Exportación. Disponible en <https://www.google.hn/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0CCQQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.senasica.gob.mx%2Fincludes%2Fasp%2Fdownload.asp%3FIdDocumento%3D23492%26IdUrl%3D47165&ei=ByFkVbawMsHbgwSiqIDYDQ&usg=AFQjCNEwe05d3ZkUCw74LKeGFhLRAZPLFw&sig2=7kuYbrZ6oEBwEEKOT1kTiQ&bvm=bv.93990622,d.eXY>

7. ANEXOS

Anexo 1. Contaminación por hongos y bacterias de callos usados para la propagación *in vitro* de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde- en medio suplementado con 0.2 mg L^{-1} de TDZ y 0.2 mg L^{-1} de AIB

Explantos	Porcentaje (%)
Sembrados	100
Contaminación con hongos y bacterias	21
Muertos	6
Asépticos	73



Anexo 2. Contaminación de callos de *Jatropha curcas* -variedad cabo verde-. A) contaminación por hongos. B) Contaminación por bacterias.