



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS APLICADAS

ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA  
MICROPROPAGACIÓN POR FASES DE CLONES PROMISORIOS DE  
PIÑÓN (*Jatropha curcas L.*) DEL INSTITUTO NACIONAL DE  
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS CON FINES DE  
MEJORAMIENTO GENÉTICO VÍA IRRADIACIÓN.

AUTORA

Emely Valentina Gordillo López

AÑO

2020



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA  
MICROPROPAGACIÓN POR FASES DE CLONES PROMISORIOS DE  
PIÑÓN (*Jatropha curcas L.*) DEL INSTITUTO NACIONAL DE  
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS CON FINES DE  
MEJORAMIENTO GENÉTICO VÍA IRRADIACIÓN.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el Título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

M.Sc. Fernando Xavier Rivas

Romero Autora

Emely Valentina Gordillo

López Año

2020

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Establecimiento de las condiciones óptimas para la micropropagación por fases de clones promisorios de piñón (*Jatropha curcas L.*) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias con fines de mejoramiento genético vía irradiación, a través de reuniones periódicas con la estudiante Emely Valentina Gordillo López, en el semestre 202010, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".



---

Fernando Xavier Rivas Romero

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de

Plantas

C.I. 171809270-1

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Establecimiento de las condiciones óptimas para la micropropagación por fases de clones promisorios de piñón (*Jatropha curcas* L.) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias con fines de mejoramiento genético vía irradiación de la estudiante Emely Valentina Gordillo López, en el semestre 202010, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and flourishes, positioned above a horizontal line.

María Isabel Ballesteros Redondo

Doctora en Biología con mención en Genética

CI: 175716861-0

### DECLARACIÓN DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”



Emely Valentina Gordillo López

C.I. 172002483-3

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, a mi familia, en especial a mis padres y hermanos por su constante apoyo durante este duro pero satisfactorio camino que he recorrido.

Al INIAP por su confianza y permitirme poner en práctica todo lo aprendido a lo largo de mi carrera y a Fernando Rivas por su colaboración y ser un guía fundamental para la elaboración de mi Trabajo de Titulación.

## DEDICATORIA

A Dios por permitirme culminar esta etapa con su bendición, a mis padres por su apoyo a pesar de las adversidades y a mis hermanos por ser un ejemplo de dedicación y superación.

## RESUMEN

El cultivo de piñón se ha expandido durante los últimos años. Sin embargo, el sistema de producción clásico no es suficiente para cubrir la demanda del mercado. En la actualidad, no existen variedades comerciales ni individuos silvestres con características de interés en Ecuador. Estudios anteriores han demostrado que un alto porcentaje de las semillas obtenidas en campo son desechadas debido a su bajo nivel de germinación. Existen otros problemas como el bajo nivel de viabilidad y desarrollo no uniforme de las plántulas. El presente trabajo propone una solución parcial a los problemas anteriormente mencionados, a partir del estudio de las condiciones óptimas para la propagación *in vitro* por fases de clones promisorios de piñón (*Jatropha curcas L.*). Se ha formulado un protocolo para el establecimiento de los clones a partir de meristemos apicales y axilares. Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial de 2x4x2. Después de cuatro semanas de evaluación y empleando MIBJ - 2 suplementado con IBA, Kn y sulfato de adenina, el piñón fue capaz de generar 2.2 brotes y sus tres hojas verdaderas al día 18. Adicionalmente, se validó un procedimiento para la multiplicación de brotes establecidos de clones promisorio mediante un DCA con arreglo factorial de 2x2x2x2. El medio de cultivo MEBJ – 2 complementado con BAP y AIA mostró los mejores resultados con respecto a sus variables. En su mejor tratamiento, generó incrementos de 0.64 cm en longitud y un total de 3.8 internodos por explante. Finalmente, para la fase de enraizamiento de explantes se empleó un DCA con arreglo factorial 2x4. Después de seis semanas de evaluación, el MEJ-1 suplementado con 0.2 mg/L de IBA, incrementó 0,12 cm la longitud del brote y generó raicillas de aproximadamente 0,3 cm.



## ABSTRACT

Piñon culture has expanded in recent years. However, the classical production system has not been sufficient to fulfill the market demand. Nowadays, there is no commercial variety nor wild type individuals with interesting characteristics in Ecuador. Previous research has shown that a large percentage of the seeds obtained from the field are discarded due to low germination levels. There are some other issues regarding low viability level and heterogeneous development of the seedlings. The present work proposes a partial solution to the above-mentioned problems by studying the optimal conditions for in vitro propagation of promising *Jatropha curcas L* clones. A protocol has been developed in order to establish the clones from apical and axillary meristems. A Completely-Random-Design (DCA) with a 2x4x2 factorial arrangement has been employed. After four weeks of evaluation and employing the MIBJ - 2 supplemented by IBA, Kn, the piñon was capable of generating 2.2 shoots and its three true leaves after 18 days. Additionally, a procedure for the multiplication of established shoots was validated by a DCA and a 2x2x2x2 factorial arrangement. MEBJ-2 plus BAP and AIA has shown the best results with respect to its variables. On its best treatment, it generated 0.64 cm increments in length and a total of 3.8 internodes per explant. Finally, for rooting phase a DCA was designed with 2x4 factorial arrangement. After six weeks of evaluation, in MEJ-1 supplemented with 0.2 mg/L of IBA, the shoot reached a 0,12 cm length, and generated rootlets of 0,3 cm approximately.

## ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema .....	3
1.3 Objetivo General.....	4
1.4 Objetivos Específicos.....	4
1.5 Justificación de la investigación .....	4
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	6
2.1 Descripción de la familia Euphorbiaceae .....	6
2.2 Descripción de la especie vegetal <i>Jatropha curcas</i> L.....	6
2.3 Estudios realizados de especies vegetales con potencial para la industria.....	9
2.3.1 Plantas con interés industrial para biocombustible .....	9
2.3.2 Especies de la familia Euphorbiaceae con interés industrial para elaboración de biocombustible.....	10
2.3.3 Estudios realizados con <i>Jatropha curcas</i> L.....	12
3. CAPÍTULO III. METODOLOGÍA .....	16

3.1 Población y obtención de material vegetal .....	16
3.2 Implementación de pre – ensayos .....	17
3.2.1 Desinfección del tejido vegetal.....	17
3.2.2 Fase de inducción de brotes.....	18
3.2.3 Fase de elongación de brotes.....	18
3.2.4 Fase de enraizamiento de explantes .....	18
3.3 Condiciones de cultivo .....	18
3.4 Análisis Estadístico .....	25
3.5 Diagrama de Procesos .....	26
<b>4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>27</b>
4.1 Control de bacteria endógena.....	27
4.2 Fase 1: Inducción de brotes de piñón ( <i>Jatropha curcas L.</i> ) .....	31
4.3 Fase 2: Elongación de brotes de piñón ( <i>Jatropha curcas L.</i> ).....	37
4.4 Fase 3: Enraizamiento de explantes de piñón ( <i>Jatropha curcas L.</i> ) .....	44
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>47</b>
5.1 Conclusiones .....	47

5.2 Recomendaciones .....	48
REFERENCIAS.....	49
ANEXOS .....	59

## 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

El género *Jatropha curcas* L., conocido como piñón, pertenece a la familia Euphorbiaceae y cuenta con 175 especies aproximadamente. Es procedente de América y está presente en casi todas las regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo. De entre todas las especies del género *Jatropha*, el piñón es la especie más importante desde el punto de vista industrial. Tiene la capacidad de crecer en diversos tipos de suelos como arenoso y rocoso, recuperándolos de procesos de degradación y erosión (Pandey et al., 2012). En Ecuador, específicamente en la provincia de Manabí, el cultivo de piñón florece y produce frutos durante todo el año, a pesar de la humedad presente en la zona (Cañadas et al., 2017). Es usada a manera de planta fronteriza para pastizales y ganado por su efecto positivo de protección contra vientos, teniendo en cuenta que los animales no pastan sobre la misma (Zamarripa y Solís, 2013).

El piñón ha generado un gran interés en la industria farmacéutica al ser considerado como una planta medicinal, ya que posee compuestos terapéuticos como antimicrobianos, hemostáticos y purgantes (Mendoza et al., 2015). También es considerado un cultivo no comestible de gran importancia gracias a su potencial para producir biodiesel, debido a su elevado contenido en aceite en semilla, el cual oscila entre el 61% y 66% con respecto al peso total de la semilla (Iracheta et al., 2016). La investigación sobre el uso del aceite proveniente de *J. curcas* se inició durante la Segunda Guerra Mundial, como una alternativa para sustituir el combustible proveniente de fósiles (Iracheta et al., 2015).

Debido al gran interés generado por el cultivo de piñón para la producción de biocombustibles a nivel industrial, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, ha desarrollado varios estudios con el fin de identificar materiales promisorios de piñón de campo. Dos líneas provenientes de la Estación

Experimental Portoviejo, fueron las que obtuvieron un alto rendimiento y mayor porcentaje de aceite en semilla a los 12 meses después del trasplante (Mendoza et al., 2015).

Varias investigaciones se han desarrollado con *J. curcas*, como la de Vinicio y Escudero (2015), en donde se determinó el efecto de los medios de cultivo suplementados y la edad del explante, para su establecimiento durante la propagación *in vitro*. Por otro lado, Daudet y colaboradores (2013) se plantearon una metodología para la micropropagación *in vitro* de *J. curcas* a partir de brotes. El objetivo de su investigación fue la generación de plantas completas a partir de nódulos expuestos a diferentes fitorreguladores. En el estudio, Daudet logró obtener elevados índices de supervivencia en fases de multiplicación y aclimatación. Al final se logró determinar que, para el establecimiento de nuevos brotes, las yemas apicales y axilares son ideales, debido a su actividad meristemática, la cual permite la regeneración y obtención de plántulas completamente morfogénicas y viables (Kalimuthu et al., 2007).

Los programas de agrocombustibles se han venido desarrollando en mayor porcentaje, con el fin de reemplazar el combustible proveniente de fósiles. En México, se sembraron miles de hectáreas de *J. curcas* a partir de semillas importadas de India. Sin embargo, las semillas no germinaron de manera adecuada y apenas el 10% sobrevivió. Un caso similar se presentó en India y China, en donde las cosechas fueron por debajo de lo esperado por la falta de germinación (Kant y Wu, 2011). En Ecuador, a fines del 2017 a través del Ministerio de Energía y Minas, se presentó la iniciativa “Cero Combustibles Fósiles” en las Islas Galápagos, donde se planteó reemplazar el combustible fósil por biodiesel producido a partir de aceite puro de piñón, para la generación de energía eléctrica en la Isla Floreana. Debido a esto aumentó la producción de piñón, ya que el aceite se obtenía a partir de la cerca viva. Se tomó en cuenta la huella de carbono (HC) generada por el piñón, la cual es de 1,2 kg CO<sub>2</sub>e en comparación con la HC de combustibles fósiles que es de 1,8 kg CO<sub>2</sub>e (Openshaw, 2000).

Múltiples técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales pueden ser utilizadas como herramientas para la producción vegetal e investigación científica, como por ejemplo el mejoramiento genético, el cual tiene como objetivo aumentar la producción y calidad de las variedades, a un menor costo y tiempo reducido, obteniéndose híbridos con mayor capacidad productiva, resistentes a factores bióticos y abióticos, y con mayor calidad industrial (Sharry, Adema, y Abedini, 2015). Se han realizado estudios para inducir mutaciones en *J. curcas* a partir de irradiación con rayos gamma para determinar porcentajes de crecimiento, germinación de semilla y supervivencia (Songsri et al., 2011).

## 1.2 Planteamiento del problema

A pesar que el cultivo de piñón se ha expandido durante los últimos años, el sistema de producción tradicional no es suficiente para cubrir con la demanda de biocombustibles. Actualmente no existen variedades comerciales, además de haber poca tecnificación del cultivo, y a todo esto se le suma la escasez de individuos silvestres con características de interés.

Estudios realizados en campo han determinado que *J. curcas* realiza polinización cruzada, generando un alto grado de variabilidad genética, haciendo que las características de interés de los clones seleccionados se vean alteradas. De las semillas obtenidas en campo, un alto porcentaje son descartadas por su menor peso y tamaño, ya que son sinónimo de baja germinación (Rathore et al., 2015). El cultivo en campo presenta otros problemas como el bajo nivel de viabilidad, el desarrollo no uniforme de las plántulas, debilidad al momento de ser trasplantadas o simplemente las semillas entran a un estado de latencia. Diferentes métodos son empleados para garantizar la germinación de la semilla, como el uso de pregerminadores, sin embargo, generan un problema grave e irreversible en el desarrollo radicular, ya que al momento de trasplantar las plántulas *in vitro* al campo, las raíces se doblan generando un semi nudo, perdiendo por completo la posición de la raíz pivotante (Sharry et al., 2015).

### 1.3 Objetivo General

Establecer las condiciones óptimas para la micropropagación por fases de clones promisorios de piñón (*Jatropha curcas L.*) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias con fines de mejoramiento genético vía irradiación

### 1.4 Objetivos Específicos

- Desarrollar un protocolo para el establecimiento de clones promisorios de *Jatropha curcas L.*
- Validar un procedimiento para la multiplicación de brotes establecidos de clones promisorios
- Estandarizar un protocolo para el enraizamiento de explantes establecidos de clones promisorios de *Jatropha curcas L.*

### 1.5 Justificación de la investigación

A pesar que el petróleo sigue considerándose como la principal fuente de obtención de combustibles fósiles, es un recurso finito no renovable. Esto se debe a que su acumulación tarda millones de años mientras que los depósitos son extraídos regularmente (Höök et al., 2010). También es considerado con una fuente emisora de gases de efecto de invernadero y tóxicos, afectando a los suelos, aire y agua (Höök y Tang, 2013).

Es por eso que se han buscado alternativas efectivas para reemplazarlo, y una de ellas es la generación de bioetanol a partir de caña de azúcar, remolacha o maíz. Al momento de considerar el impacto que tendrían estos cultivos usados como materia prima, presentan varias desventajas en común como una densidad baja en comparación con la gasolina, haciendo que un tanque deba ser recargado en menor tiempo y con más frecuencia, la contaminación producida por los residuos de procesos de destilación (vinazas), el incremento de la corrosión, entre otras (Díaz



et al., 2019), (Cardona et al., 2010). Otra posible alternativa que se ha planteado es el uso de microalgas para la generación de biodiesel, sin embargo, los costos de producción son elevados por la energía que se requiere para mantener en condiciones óptimas los cultivos, además de los procesos que deben realizarse para la extracción de los triglicéridos (Rawat et al., 2013).

A diferencia de lo ya mencionado, el cultivo de *J. curcas* ha sido denominado como agro energético al ser una planta oleaginosa con capacidad de adaptación a cualquier tipo de suelo sin un requerimiento exigente de agua (Parthiban et al., 2011). La semilla es la estructura vegetal más estudiada del piñón ya que contiene entre el 29 y 32% de proteína, y de lípidos entre el 61 y 66%. El interés se centra principalmente en el uso de su aceite para producir biocombustible ya que este no es comestible, por lo que no atenta contra la seguridad alimentaria, además que el biodiesel generado tiene propiedades químicas muy parecidas a las del petróleo (Abdelgadir y Van Staden, 2013). El aceite extraído es altamente estable con bajo nivel de viscosidad y alto índice de cetanos, a diferencia de aceites de palma y ricino. Uno de los subproductos que se obtiene durante el proceso de generación de biodiesel es el glicerol, pero este no representa ninguna amenaza ambiental y puede ser usado para producir insecticidas o pasar por un proceso de purificación y utilizarlo como aceite para cocina (Koh y Tinia, 2011).

De acuerdo con lo anterior mencionado, la presente propuesta busca desarrollar la metodología para la micropropagación por fases de *Jatropha curcas L.* como una estrategia que permita a futuro la propagación masiva de clones élites y otros abordajes metodológicos para su mejoramiento genético.

## 2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Descripción de la familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae está conformada por varias especies de árboles, arbustos y hierbas laticíferas. Son habitantes de zonas tropicales y subtropicales capaces de sobrevivir a condiciones templadas y secas (León et al., 2011). Varias especies que forman parte de esta familia son de gran importancia económica como *Jatropha curcas*, *Ricinus communis*, *Manihot esculenta*, entre otras. Sin embargo, también se pueden encontrar malezas nocivas como *Euphorbia maculata*. Por lo antes mencionado se considera a esta familia como compleja y con un alto potencial de investigación (Mwine y Damme, 2011).

Es conocida como la familia más amplia de las angiospermas, formada por 300 géneros y más de 7000 especies, de las cuales 5 han sido declaradas extintas. Es complejo caracterizarla debido a la variedad morfológica que abarca, por lo que su origen es polifilético (Bittner et al., 2001). Al estar conformado por diversos compuestos como alcaloides, ácidos glicósidos, entre otros, es aprovechada a nivel industrial con el fin de producir aceites, grasas, así como en la producción de medicinas (Cañadas et al., 2017).

En Latinoamérica especies del género *Croton* se emplean como alternativa para tratar y prevenir infecciones de la piel, bronquitis, úlceras, entre otras de manera natural (Rodríguez y Hechevarría, 2004). En el Ecuador, más de 200 especies han sido registradas, siendo 45 declaradas endémicas. Alrededor del 45% de los clasificados como endémicos crecen en bosques con vegetación interandina (León et al., 2011).

### 2.2 Descripción de la especie vegetal *Jatropha curcas* L.

Es un arbusto grande propio de México y América Central. Ha sido introducido en América del Sur, Australia e India. Está bien adaptado a tierras degradadas

y marginales de zonas tropicales consideradas áridas y semiáridas (Cañadas et al., 2017). Al ser mínimo su requerimiento de agua, puede soportar periodos de sequías extensos, eliminando un alto porcentaje de sus hojas para así reducir los procesos de transpiración. Sin embargo, el potencial e importancia del cultivo es la capacidad que tiene para crecer en lugares secos y con baja concentración de nutrientes (Kumar y Sharma, 2008).

Tabla 1.

*Clasificación taxonómica de piñón (Jatropha curcas L.)*

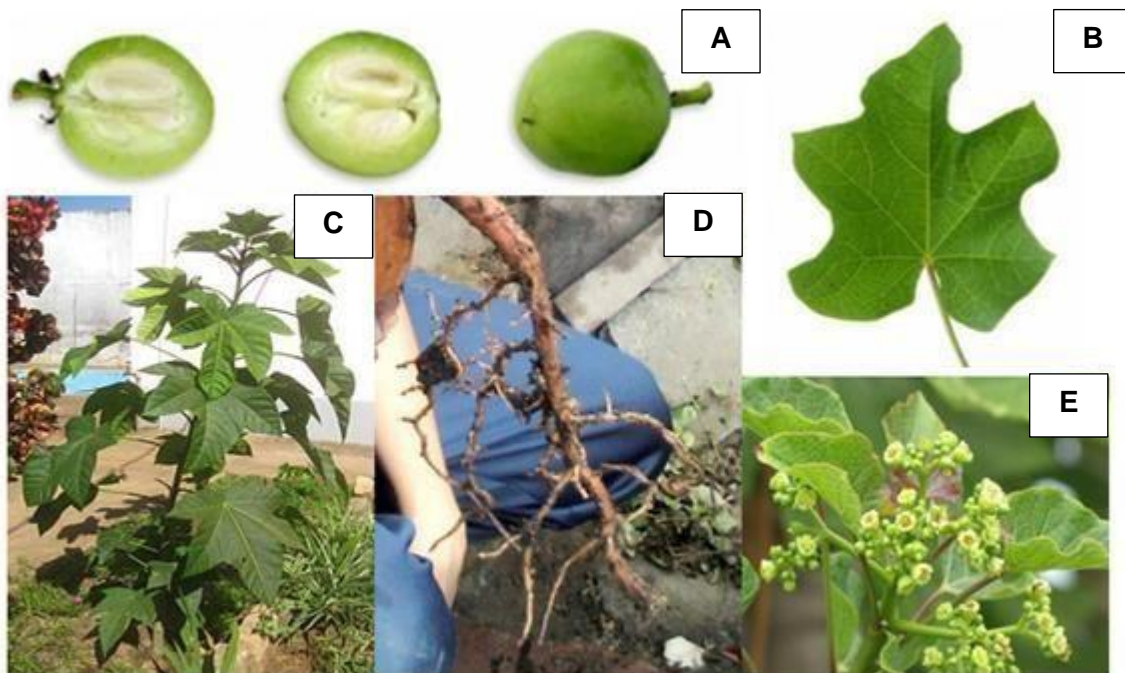
<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Euphorbiales
<b>Familia</b>	Euphorbiaceae
<b>Género</b>	<i>Jatropha</i>
<b>Especie</b>	<i>Jatropha curcas</i>

*Tomada de (NCBI Taxonomy Browser)*

La planta puede llegar a medir entre los 8 y 10 metros de longitud, generando un total de cinco raíces, cuatro periféricas y una pivotante, aunque en suelos

densos la cantidad de raíces periféricas tiende a reducirse (Nahar y Ozores, 2013). El piñón puede tener hasta 7 hojas lobuladas, pero al ser caducifolio las pierde durante la estación seca. Al caerse, suelen cubrir la base de la planta mejorando la actividad de las lombrices situadas alrededor de las raíces, así como también la fertilidad del suelo (Alves et al., 2018).

El proceso de floración ocurre durante la estación húmeda, pero en regiones donde esta condición está presente diariamente, se da a lo largo del año. Es una planta monoica al tener flores unisexuales por lo que puede auto polinizarse. Pero también pueden ser polinizadas por insectos, específicamente abejas. Cada inflorescencia llega a producir más de 10 frutas en forma de ovoide y después de tres o cuatro meses del proceso de floración las semillas obtenidas maduran. (Contran et al., 2013).



*Figura 1.* Partes de la planta de piñón (*Jatropha curcas L.*).

A: Semilla; B: Hoja; C: Planta completa; D: Raíz; E: Flor.

## **2.3 Estudios realizados de especies vegetales con potencial para la industria**

### **2.3.1 Plantas con interés industrial para biocombustible**

Existen varias fuentes de suministro de biomasa para la elaboración de biocombustible. El interés que ha generado es por ser un recurso renovable y sostenible, haciendo que la contaminación medioambiental disminuye de manera significativa al no producir emisiones netas de dióxido de carbono y un bajo contenido de azufre, además de tener un alto potencial económico a futuro por el aumento de precio de los combustibles fósiles (Demirbas, 2008).

Varias especies oleaginosas son consideradas como materia prima para la generación de biocombustible. Existen alrededor de 300 especies con este fin, pero las más estudiadas son el girasol, palma, soja y canola, siendo estos aceites altos en producción a nivel mundial y solicitados en el mercado alimenticio (Grossmann y Martín, 2010).

El aceite de girasol tiene un elevado contenido de ácido linoleico. La extracción de este se realiza mediante un proceso llamado transesterificación en donde, se usa alcohol monohídrico más un catalizador salino para descomponer a la molécula de aceite en ésteres de tipo etílico o metílico. Una vez que la reacción este completa se deben eliminar los catalizadores, pero esta reacción representa un costo adicional. Para la vía no catalítica se usa metanol supercrítico haciendo que el producto sea más fácil de purificar, haya un menor tiempo de reacción y menor uso de energía (Demirbas, 2008).

En el estudio de Demirbas (2007) se quiso obtener biodiesel a partir de aceite de girasol en metanol supercrítico con óxido de calcio. Se determinó que el óxido de calcio a temperatura ambiente es débil y el rendimiento de biodiesel llego a ser del 5%. Los factores que intervienen en el proceso de transesterificación es la temperatura, tiempo de reacción y la cantidad de agua y ácidos grasos en el aceite. Varias investigaciones se han llevado a cabo, como el mejoramiento genético para

incrementar la cantidad de ácido oleico y ácidos grasos, como la de Alberio y colaboradores (2016), en donde se obtuvo una mutación estructural que codifica un alto contenido en aceite oleico, ayudando a disminuir la variación del ácido con respecto a los cambios de temperatura. Se compararon con genotipos tradicionales y el porcentaje de ácido fue de 51% en comparación con los mutantes que obtuvieron un 87% (Kurnia et al., 2016).

Por otro lado, el aceite a partir de palma es económico y de fácil acceso por lo que es considerado como el reemplazo del aceite de soja. Debido a esto, su producción ha aumentado significativamente con un total de 46 millones de toneladas anuales (Lahijani y Zainal, 2011). Las variedades de palma para cultivo *in vitro* son híbridos de palma dura y palma pisífera, tomándose en cuenta factores de productividad, contenido de ácidos grasos y crecimiento. Desde el año de 1970 se empezó el estudio acerca de las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*, tomando en cuenta que injertos no pueden ser aplicados ya que posee solo un capullo vegetativo. Al fracasar el cultivo a partir de ápices, se estudió la regeneración de plántulas morfológicamente completas a partir de callos generados a partir de hojas y florescencias, donde se obtuvo casi 2.000 explantes después de tres meses de incubación (Noiret, Gascón y Pannetier, 2000).

### **2.3.2 Especies de la familia Euphorbiaceae con interés industrial para elaboración de biocombustible**

Actualmente, esta familia es reconocida por tener importancia económica por tener especies empleadas para la industria, al ser productoras de sustancias de interés como aceites y cauchos. La planta de aceite de ricino (*Ricinus communis*) es versátil ya que es usada para tratar enfermedades de riñón, infecciones y para producir biodiesel. Es la única fuente de ácido ricinoleico y es usado para lubricantes, plásticos y pinturas. India es considerado como el más grande productor de aceite de ricino, con más del 60% de producción mundial, atrás le

sigue Brasil y China (Salimon et al, 2010). Debido al gran interés que genera esta especie, varios estudios han sido desarrollados.

Uno de ellos es el de Nahar y Borna (2012), donde se determinó el efecto de fitorreguladores de crecimiento relacionados con la longitud total del brote, número de brotes y hojas. Además, se planteó la metodología ideal para propagar *in vitro* plantas de *Ricinus communis*, y establecerlas en campo. Después del protocolo de desinfección, se cultivaron los explantes en medio Muraskige & Skoog (MS), suplementado con Bencilaminopurina (BAP) y Ácido Indol Butírico (IBA) con el objetivo de multiplicarlos. Los brotes ya establecidos se subcultivaron en medios MS gelificados para que induzcan raíces. Seguido de un proceso de adaptación a campo en vasos con tierra estéril y compost.

Después de seis semanas de cultivo se analizaron los resultados y se obtuvo que, en la generación de callos y la formación de la planta a concentraciones de 1,11uM/L y 0,481,11uM/L de BAP e IBA respectivamente, se presentó la mejor respuesta, en comparación con los medios de cultivo con concentraciones elevadas de los mismos fitorreguladores. También hubo una mayor inducción de brotes, con mayor longitud de hoja y peciolo en el medio previamente mencionado. Una vez analizados los datos, se corroboraron con otras investigaciones, como la de Danso y colaboradores (2011), donde se determinó que la punta de brotes es el explante ideal para la generación de plantas completas.

Por otro lado, la especie *Phyllanthus niruri* es usada principalmente como medicinal, al poseer compuestos terapéuticos y activos. Una investigación relacionada con la composición de extractos de callo de *P. niruri*, determinó que esta especie posee compuestos como fenoles y flavonoides. El objetivo de la investigación fue establecer un protocolo que permita la regeneración de *P. niruri*, además de estudios de germinación y análisis de la respuesta que presenten los explantes sometidos a diferentes concentraciones de Ácido

naftalenacético (ANA) y BAP. Como resultado, se obtuvo un alto porcentaje de producción de yemas y brotes en un medio suplementado con MS, sacarosa y *Phytigel*. Determinó también que las semillas de *P. niruri* tienen un periodo de dormancia, el cual pudo ser superado sometiendo las semillas a Ácido Giberílico (AG<sub>3</sub>). (Jiménez, 2007)

Otra especie de gran interés dentro de la industria farmacológica es *Phyllanthus amarus*, al ser usada para tratar enfermedades como úlceras y hepatitis. Contiene taninos y lignanos como la filtetralina capaz de inhibir la actividad de la quinasa responsable de la actividad anticancerígena. Debido a esto Gnanam y colaboradores (2012) decidieron investigar la manera de hacer propagación *in vitro* de *P. amarus* para ser utilizado como hepatoprotector.

Para los estudios de propagación *in vitro* se tomaron las hojas, y los nódulos. Durante la fase de multiplicación de brotes se evaluó el efecto de BAP a una concentración de 1 uM/L. Una vez obtenidos los resultados, se logró inducir 6 brotes de un solo nodo. Durante la fase de elongación, el uso de BAP y Ácido Indol Acético (AIA) demostró mejores resultados en cuanto a la longitud del brote, a diferencia del medio de cultivo suplementado solamente con BAP. Los brotes obtenidos llegaron a crecer hasta 7 cm. Por los resultados obtenidos, se pudo determinar que BAP a concentraciones elevadas en un medio de cultivo, inhibe la generación de brotes (Xavier et al., 2012).

### **2.3.3 Estudios realizados con *Jatropha curcas* L.**

El piñón (*J. curcas*) es un aceite no comestible con una producción al año de aproximadamente 200 mil toneladas en la India (Kumar et al. 2007). Es en la actualidad uno de los cultivos más usados como materia prima para la producción de biocombustible. El rendimiento relacionado con la generación de semilla puede ser de ocho toneladas por cada hectárea. Es considerada como una planta con baja variabilidad genética al no tener diferencias morfológicas evidentes. Se han desarrollado varios estudios relacionados con mutaciones y



cruces para aumentar este factor (Campuzano, Ríos, y Cardeño, 2016).

Para que la producción a gran escala sea efectiva y eficiente, los explantes deben generar una respuesta óptima frente a los fitorreguladores de crecimiento y las condiciones físicas de cultivo *in vitro*. Varios investigadores se han planteado el desarrollo de una metodología capaz de diferenciar brotes, con o sin la presencia de callos a partir de *Jatropha curcas*. La regeneración del piñón puede realizarse mediante la vía de la organogénesis a partir de varios tipos de explante como hoja, yemas apicales y axilares, peciolo y cotiledones jóvenes. Los estudios han podido demostrar que la regeneración *in vitro* es dependiente del genotipo con el cual se está trabajando (Ferreira et al., 2013).

En el estudio de Kalimuthu y colaboradores (2007), se quiso detallar una metodología para micropropagación *in vitro* de piñón. Se realizó el cultivo a partir de explantes nodales provenientes de campo en medio MS basal más la adición de BAP, Kn e AIA donde se indujeron varios brotes y se diferenciaron cada uno de ellos para los subcultivos. Se determinó que las auxinas y citoquininas son necesarias e importantes para la multiplicación de brotes. Los explantes sometidos a bajas concentraciones de AIA y Kn, pero a una concentración alta de BAP obtuvieron mejores resultados, debido a que las concentraciones altas de auxinas en un medio de cultivo tienden a inhibir el proceso de morfogénesis. Para la fase de enraizamiento, los brotes fueron cultivados en medio MS, suplementado con AIA e IBA en concentraciones de 0,5 hasta 2,5  $\mu\text{M/L}$ . Se determinó que el medio de cultivo con concentración media de AIA generó raíces en 7 días, pero los explantes que estaban en medio con mayor concentración del fitorregulador redujeron el número de raíces significativamente. En el caso del medio de cultivo con IBA, no fue adecuado para la generación de raíces ya que la tendencia era producción de callos en la parte basal del explante (Kalimuthu et al., 2007).

Otra investigación se llevó a cabo por Banerjee y Shrivastava (2008), donde se

buscó determinar la influencia que tienen los aditivos en la propagación clonal *in vitro* de piñón. Se usó nódulos axilares para el establecimiento de plantas con tres meses de edad antes de su proceso de floración. Para la fase de inducción de brotes, los medios de cultivo estaban suplementados con BAP, IBA y ANA. El mejor resultado se obtuvo en el medio de cultivo que tenía BAP e IBA a una concentración de 3 y 1  $\mu\text{M/L}$  respectivamente con cuatro brotes inducidos. En el medio de cultivo solamente con BAP, se obtuvo los mismos resultados. Por otro lado, los explantes en medio con BAP y ANA, al tener una concentración alta, inhibía el crecimiento de la planta al inducir la formación de callos. En la fase de enraizamiento, se transfirió los explantes a medios de cultivo con IBA y ANA. La generación de raíces inicio en la segunda semana de subcultivo y el mejor medio demostró tener IBA a una concentración de 3  $\mu\text{M/L}$ , generando cuatro raíces más que el control.

En el estudio realizado por Thepsamran y colaboradores (2008), se planteó el protocolo para la inducción de brotes y raíces *in vitro* de explantes de *Jatropha curcas*. El material vegetal se obtuvo de árboles cultivados en Tailandia y los explantes usados fueron hojas, nodos apicales y peciolo. El medio usado para la fase de inducción de brotes fue el MS basal adicionado BAP e IBA a diferentes concentraciones. Para la fase de enraizamiento se usó un MS basal más fluroglucinol e IBA. Después de seis semanas de enraizados los brotes, se intensificó la luz y se transfirieron a macetas cubiertas con plástico para que ocurra el intercambio gaseoso.

Como resultado del efecto de BAP para la producción de brotes, se determinó que la concentración a la que se encuentre el fitorregulador es dependiente de la inducción de brotes. Mientras más alta sea la concentración, el número de brotes va a ser sobre los 5 por explante. Pero al combinarse con IBA el resultado fue más eficiente, se obtuvo un mayor número de hojas y brotes. Sin embargo, cuando la concentración de IBA y BAP eran elevadas, producía el efecto contrario, es decir menor cantidad de brotes y hojas. En el estudio de generación

de callos, la combinación ideal de medio de cultivo es de BAP con IBA a una concentración de 4,44 y 2,46 ppm respectivamente, se obtuvo un porcentaje de formación de callos de 89% y este variaba dependiente la concentración desde 37 hasta 56% (Rajore & Batra, 2005). En la fase de enraizamiento se evaluó un medio basal de MS y uno suplementado con IBA. Los explantes se sumergieron en IBA a concentraciones altas por dos minutos y luego fueron cultivados al medio por 30 días. Las raíces empezaron a formarse en el día 15 obteniéndose 5 raíces por explante con un rendimiento mayor al 50% (Thepsamran et al., 2008).

Se ha estudiado también técnicas mediante las cuales se pueda mejorar genéticamente la planta de piñón. Como la de Dwimahyani y Ishak, que pensaron en mejorar las características de las semillas de piñón, en temas de producción de semilla, contenido de aceite y madurez de las plántulas con el fin de producir biocombustible en Indonesia. Dividieron la investigación en dos partes. Primero, se quiso determinar la variabilidad genética usando rayos. Y después, se analizó el contenido de aceite en semilla y la calidad de las líneas de piñón empleadas.

Para esto, el material vegetal que se recolectó fue de Yakarta, tomando ramas y semillas. Se irradiaron esquejes usando rayos gamma en dosis de entre 10 a 30 Gray (Gy). Una vez culminado este proceso, se cortaron los esquejes y sembraron en tierra la cual paso por un proceso de secado y se homogeneizo con estiércol de granja. Como resultado se obtuvo que a dosis de 20 Gy la planta presentaba enanismo con un bajo nivel de supervivencia. Con la dosis de 10 y 15 Gy la tasa de supervivencia aumentó, llegando a ser de 70%. Generó una variabilidad genética relacionada con el crecimiento y aumentó en un 20% el peso de la semilla (Dwimahyani y Ishak, 2004).

### 3. CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

#### 3.1 Población y obtención de material vegetal

El permiso de recolección e investigación científica se enmarca dentro del contrato Marco de acceso a los recursos genéticos MAE-DNB-CM-2015-0024 denominado: "Estudio de caracterización bioecológica y desarrollo de componentes de manejo integrado de cultivos del Ecuador" entre el Ministerio del Ambiente y el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

Las plantas de piñón (*Jatropha curcas* L.) de los genotipos CP041 y CP052 se almacenaron en el Invernadero de la Estación Experimental Santa Catalina a una temperatura de 28 °C. Se recolectaron los meristemos apicales y axilares de cada genotipo y se trasladaron al laboratorio de Cultivo de Tejidos en agua estéril para su posterior manejo.

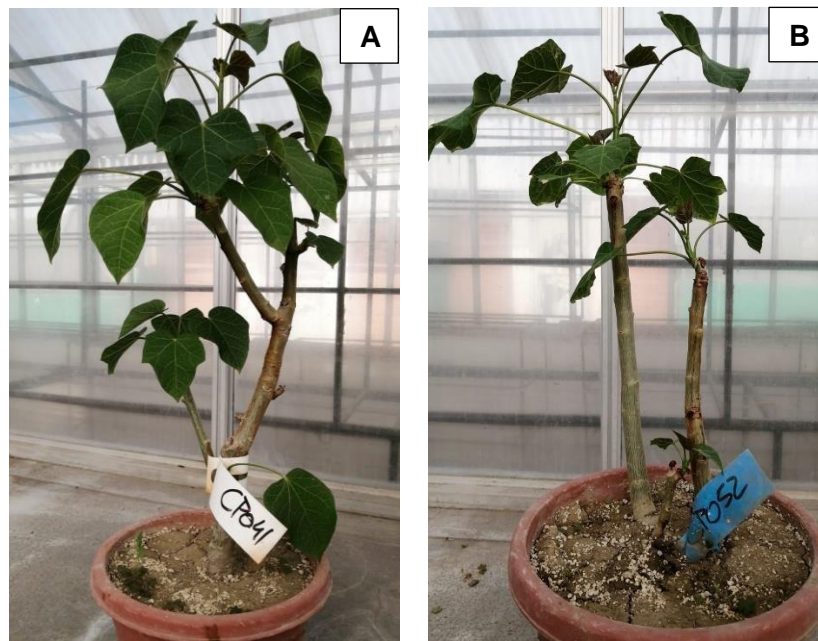


Figura 2. Plantas de *Jatropha curcas* L. (piñón).

A: Genotipo CP041; B: Genotipo CP052

### **3.2 Implementación de pre – ensayos**

Se realizaron pre – ensayos para determinar los tratamientos con potencial para la investigación. Se siguieron los protocolos establecidos por Mve y colaboradores (2009) y Datta y Pandey (2007) para las fases de establecimiento y elongación, con medios suplementados con auxinas y citoquininas como BAP, IBA, sulfato de adenina y Kn. Algunos medios fueron suplementados con cloranfenicol y estreptomicina a una concentración de 5 mg/L. El antibiótico se añadió de dos formas: Primero aplicando directamente al medio de cultivo previamente autoclavado y posteriormente se dejó gelificar, y la otra añadiendo directamente al medio gelificado. Una vez realizados los ensayos, se determinó qué medios de cultivo eran efectivos para los genotipos de estudio.

En los medios en donde se reportó contaminación, se obtuvieron muestras de los contaminantes, con el fin de determinar específicamente su tipo. Se identificó a la bacteria contaminante y se realizó un antibiograma para determinar las sensibilidades de esta bacteria. Con los resultados del antibiograma, se formularon nuevos medios de cultivo, con los antibióticos seleccionados para prevenir la contaminación y verificar la no inhibición de la morfogénesis. A las cuatro semanas, se evaluó la presencia y ausencia de la bacteria endógena y la morfogénesis de los explantes.

#### **3.2.1 Desinfección del tejido vegetal**

Para este proceso se siguió el protocolo de desinfección para los meristemos apicales y axilares de Datta y colaboradores (2007), el cual consistió en lavar los explantes en una solución de agua estéril jabonosa para eliminar impurezas. Posteriormente, se pasaron los explantes a frascos que contenían una solución de 100 mL de agua destilada estéril y 1 mL del antifúngico Carbendazim (Agripac) y se llevaron a agitación a 65 rpm durante 3 horas.

Una vez transcurridas las 3 horas, se pasaron los frascos a cámara de flujo laminar y se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril para remover en su totalidad el antifúngico. Luego, se añadieron los explantes a una solución de 90 mL de agua estéril, 10 mL de hipoclorito de sodio al 5% de concentración y 5 gotas de TWEEN 20, se agitaron durante 25 minutos y finalmente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril.

### **3.2.2 Fase de Inducción de brotes**

Dentro de cámara de flujo laminar se tomaron los meristemos apicales y axilares previamente desinfectados y con el instrumental esterilizado, se realizaron cortes en la base del explante y se individualizó cada meristemo apical y axilar. Luego, se cultivaron los meristemos en los tubos de ensayo con los medios de cultivo para la inducción de brotes (MIBJ-1, 2, 3 y 4) detallados en el Anexo 1.

### **3.2.3 Fase de elongación de brotes**

A partir del mejor medio de cultivo seleccionado de la fase de inducción de brotes, se trasplantaron los brotes de dicho medio y se subcultivaron en los medios de elongación (MEBJ-1 y 2) detallados en el Anexo 2, dentro de cámara de flujo laminar con el instrumental esterilizado. Se tomaron explantes provenientes del MEBJ-1 y 2 para someterlos a un fotoperiodo de 24 h de oscuridad.

### **3.2.4 Fase de enraizamiento de explantes**

Una vez seleccionado el mejor medio de cultivo y condición física de la fase de elongación, se tomaron los explantes de dicho medio y se separaron los nuevos brotes obtenidos a partir de una unidad experimental y se subcultivaron a los medios de cultivo de enraizamiento (MEJ-1, 2, 3 Y 4) detallados en el Anexo 3.

### 3.3 Condiciones de cultivo

Se mantuvieron los explantes cultivados en un cuarto de incubación a una temperatura de  $25,2^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa del 10%, intensidad de luz de  $42\text{--}48 \text{ mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Los tratamientos sin fotoperiodo de la Fase de Elongación permanecieron bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad relativa, pero en ausencia de luz (24 horas de oscuridad). Para el presente trabajo de investigación se empleó en la Fase de inducción un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial de  $2 \times 4 \times 2$  con 5 observaciones por cada tratamiento. En la Tabla 2 se detallan los factores de estudio.

Tabla 2.

*Factores de estudio empleados en la Fase de Inducción de brotes de piñón*

<b>FACTORES DE ESTUDIO (FASE DE INDUCCIÓN DE BROTES)</b>		
<b>GENOTIPO (G)</b>	<b>MEDIOS DE CULTIVO (M)</b>	<b>TIPO DE EXPLANTE (E)</b>
CP052	MIBJ - 1	Meristemo Apical
	MIBJ - 2	
CP041	MIBJ - 3	Meristemo Axilar
	MIBJ - 4	

La unidad experimental para esta fase consistió en un tubo de ensayo de 20 x 150 mm con tapa, conteniendo 6 mL de medio de cultivo y un explante (apical o axilar).





Tabla 3.

*Tratamientos de Fase de Inducción de brotes de piñón*

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>CÓDIGO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
T1	g1m1e1	CP052 + MIBJ-1 + yema apical
T2	g1m2e1	CP052 + MIBJ-2 + yema apical
T3	g1m3e1	CP052 + MIBJ-3 + yema apical
T4	g1m4e1	CP052 + MIBJ-4 + yema apical
T5	g1m1e2	CP052 + MIBJ-1 + yema axilar
T6	g1m2e2	CP052 + MIBJ-2 + yema axilar
T7	g1m3e2	CP052 + MIBJ-3 + yema axilar
T8	g1m4e2	CP052 + MIBJ-4 + yema axilar
T9	g2m1e1	CP041 + MIBJ-1 + yema apical
T10	g2m2e1	CP041 + MIBJ-2 + yema apical
T11	g2m3e1	CP041 + MIBJ-3 + yema apical
T12	g2m4e1	CP041 + MIBJ-4 + yema apical
T13	g2m1e2	CP041 + MIBJ-1 + yema axilar
T14	g2m2e2	CP041 + MIBJ-2 + yema axilar
T15	g2m3e2	CP041 + MIBJ-3 + yema axilar
T16	g2m4e2	CP041 + MIBJ-4 + yema axilar

Como variables de respuesta se evaluaron el número de brotes por explante y el tiempo de apareamiento de primera, segunda y tercera hoja verdadera mediante la verificación visual. La evaluación de las dos variables se realizó semanalmente durante cuatro semanas.

Para la Fase de Elongación de brotes se aplicó un DCA con arreglo factorial de 2x2x2x2 con 5 repeticiones por cada tratamiento. A continuación, en la Tabla 4 se describen los factores de estudio.

Tabla 4.

*Factores de estudio empleados en la Fase de Elongación de brotes de piñón*

<b>FACTORES DE ESTUDIO (FASE DE ELONGACIÓN DE BROTES)</b>			
<b>GENOTIPOS (G)</b>	<b>MEDIO DE CULTIVO (M)</b>	<b>TIPO DE EXPLANTE (E)</b>	<b>FOTOPERIODO (F)</b>
CP052	MEBJ - 1	Meristemo Apical	Con Fotoperiodo (16 h luz / 8 h oscuridad)
CP041	MEBJ -2	Meristemo Axilar	Sin fotoperiodo (24 h oscuridad)

La unidad experimental para esta fase consistió en un frasco con tapa, conteniendo 30 mL de medio de cultivo y un explante (apical o axilar).

En la Tabla 5 se detalla la integración de los cuatro factores de estudio descritos (g x m x e x f) para cada tratamiento realizado.

Tabla 5.

*Tratamientos para la Fase de Elongación de explantes de piñón*

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>CÓDIGO</b>	<b>DESCRIPCIÓN</b>
T1	g1m1e1f1	CP052+ MEBJ-1+ yema apical+ fotoperiodo
T2	g1m1e1f2	CP052+ MEBJ-1+ yema apical+ sin fotoperiodo
T3	g1m1e2f1	CP052+ MEBJ-1+ yema axilar+ fotoperiodo
T4	g1m1e2f2	CP052+ MEBJ-1+ yema axilar+ sin fotoperiodo
T5	g1m2e1f1	CP052 + MEBJ-2 + yema apical + fotoperiodo
T6	g1m2e1f2	CP052+ MEBJ-2+ yema apical+ sin fotoperiodo
T7	g1m2e2f1	CP052+ MEBJ-2+ yema axilar+ fotoperiodo
T8	g1m2e2f2	CP052+ MEBJ-2+ yema axilar+ sin fotoperiodo
T9	g2m1e1f1	CP041+ MEBJ-1+ yema apical+ fotoperiodo
T10	g2m1e1f2	CP041+ MEBJ-1+ yema apical+ sin fotoperiodo
T11	g2m1e2f1	CP041+ MEBJ-1+ yema axilar+ fotoperiodo
T12	g2m1e2f2	CP041+ MEBJ-1+ yema axilar+ sin fotoperiodo
T13	g2m2e1f1	CP041+ MEBJ-2+ yema apical+ fotoperiodo
T14	g2m2e1f2	CP041+ MEBJ-2+ yema apical+ sin fotoperiodo
T15	g2m2e2f1	CP041+ MEBJ-2+ yema axilar+ fotoperiodo
T16	g2m2e2f2	CP041+ MEBJ-2+ yema axilar+ sin fotoperiodo

Como variables de respuesta se evaluaron el número de internodos, contabilizándolos por explante y la longitud de los brotes medidos en centímetros (cm), desde la base hasta el meristemo apical más alto del brote. El registro se hizo semanalmente durante cuatro semanas.

Para la fase de enraizamiento de explantes se aplicó un DCA con arreglo factorial de 2x4 con 5 observaciones por cada tratamiento. En la Tabla 6 se detallan los factores de estudio para esta fase.

Tabla 6.

*Factores de estudio empleados en la Fase de Enraizamiento de explantes de piñón*

<b>FACTORES DE ESTUDIO (FASE DE ENRAIZAMIENTO DE EXPLANTES)</b>	
<b>GENOTIPOS (G)</b>	<b>MEDIOS DE CULTIVO (M)</b>
CP052	MEJ – 1
	MEJ – 2
CP041	MEJ – 3
	MEJ – 4

La unidad experimental estuvo conformada por un frasco con tapa conteniendo 30 mL de medio de cultivo y un explante.

En la Tabla 7 se muestra la integración de los cuatro factores de estudio descritos (g x m) para cada tratamiento realizado.

Tabla 7.

*Tratamientos de fase de enraizamiento in vitro de piñón*

TRATAMIENTOS	CÓDIGO	DESCRIPCIÓN
T1	g1m1	CP052 + MEJ-1
T2	g1m2	CP052 + MEJ-2
T3	g1m3	CP052 + MEJ-3
T4	g1m4	CP052 + MEJ-4
T5	g2m1	CP041 + MEJ-1
T6	g2m2	CP041 + MEJ-2
T7	g2m3	CP041 + MEJ-3
T8	g2m4	CP041 + MEJ-4

Las variables de respuesta evaluadas fueron el número de raíces por explante donde se contabilizó las raíces generadas, la longitud total de raíz medida desde la base de la planta *in vitro* hasta el extremo de las raíces y la longitud total del brote medida desde la base hasta la yema más alta. El registro se realizó semanalmente durante seis semanas.

Las hipótesis para el experimento son las siguientes:

Ho: Las metodologías aplicadas en esta investigación para la propagación *in vitro* por fases de material vegetal de dos clones de piñón (*Jatropha curcas L.*), no presentan diferencias significativas entre sí.

Ha: Las metodologías aplicadas en esta investigación para la propagación *in vitro* por fases de material vegetal de dos clones de piñón (*Jatropha curcas L.*), si presentan diferencias significativas entre sí.

### **3.4 Análisis Estadístico**

Para las tres fases en estudio, se realizaron pruebas de normalidad. Posteriormente se llevaron a cabo pruebas de análisis de varianza (ANOVA) seguido de pruebas de significancia *post hoc* para determinar diferencias significativas entre los tratamientos y determinar los mejores con un valor  $p = 0,05$ . Las pruebas estadísticas se realizaron en el programa estadístico *Infostat*. Los tratamientos se realizaron por duplicado para cada una de las fases en estudio.

### 3.5 Diagrama de Procesos

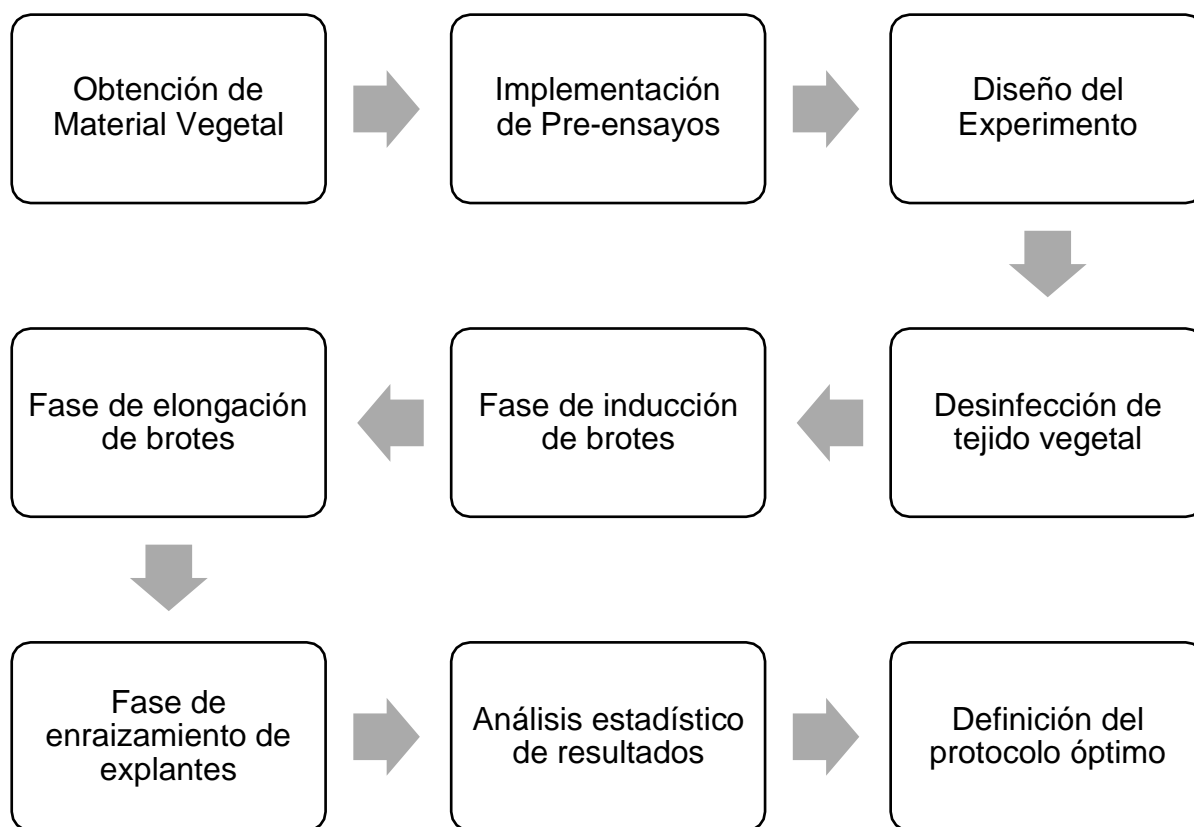


Figura 3. Diagrama experimental del proceso.

## 4. CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Control de bacteria endógena

En los medios de cultivo realizados para los ensayos, se observó la presencia de bacteria en los explantes, independientemente del genotipo y del tipo de explante a los tres días después del cultivo. Por tal motivo, se planteó el uso de antibióticos como cloranfenicol y estreptomicina para inhibir el desarrollo de la bacteria. Como se muestra en la Tabla 8, del total de explantes expuestos al cloranfenicol, el 66,6% se contaminaron a los 6 días aproximadamente, y culminadas las cuatro semanas de evaluación, alcanzaron un 50% de supervivencia. A diferencia de lo obtenido con los explantes expuestos a la estreptomicina, en donde se presentó una contaminación del 83,3% y la supervivencia de los explantes alcanzó un 20% después del tiempo de evaluación. Se determinó que el cloranfenicol generó una mejor respuesta al inhibir en mayor proporción a la bacteria sin afectar la morfogénesis del tejido vegetal.

Tabla 8.

*Porcentaje de contaminación de explantes expuestos a antibióticos previo al antibiograma*

Antibiótico	Concentración	Total de explantes	Total de explantes contaminados	% Contaminación	% de Supervivencia
Cloranfenicol	5 mg/L	6 Yemas apicales	8	66,6 %	50 %
Estreptomicina		6 Yemas axilares	10	83,3 %	20 %



A pesar de lo obtenido, se planteó disminuir el número de explantes contaminados. Por lo que, se propuso identificar el tipo de bacteria. Se realizó un cultivo y purificación de la bacteria; seguido de esto se envió a un laboratorio comercial y se realizó un antibiograma para conocer sensibilidades, el cual esta detallado en el Anexo 1. Como resultado se determinó que se trataba de un *Bacillus licheniformis* sensible a la penicilina y sulfatrimetoprim. A partir de dicho resultado, se realizaron los ensayos con los nuevos antibióticos seleccionados y se evaluó la capacidad de inhibir el desarrollo de la bacteria, sin afectar la morfogénesis del tejido. Como se muestra en la Tabla 9, del total de explantes expuestos a la penicilina, el 16,6 % se contaminaron a los 8 días aproximadamente, y culminadas las cuatro semanas de evaluación, alcanzaron un 90% de supervivencia. A diferencia de lo obtenido con los explantes expuestos al sulfatrimetoprim, en donde se presentó una contaminación del 33,3 % y la supervivencia de los explantes alcanzó un 75% después del tiempo de evaluación. Se determinó que la penicilina generó una mejor respuesta al inhibir en un alto porcentaje a la bacteria sin afectar la morfogénesis del tejido vegetal. En la Figura 4 se puede observar la presencia de la bacteria endógena en el tejido vegetal después de cuatro semanas de estudio.

Tabla 9

*Porcentaje de contaminación de explantes expuestos a antibióticos sensibles a Bacillus licheniformis*

Antibiótico	Concentración	Total de explantes	Total de explantes contaminados	% Contaminación	% de Supervivencia
Penicilina	5 mg/L	6 Yemas apicales	2	16,6 %	90 %
Sulfatrimetoprim		6 Yemas axilares	4	33,3 %	75 %



*Figura 4.* Crecimiento de bacteria endógena en el tejido vegetal después del tiempo de evaluación

Las células vegetales que crecen *in vitro*, se encuentran bajo estrés y en algunos casos pueden estar predispuestas a infecciones por bacterias, que pueden o no ser patógenas para ellas. Se considera que, las infecciones generadas por bacterias endógenas, generan muchos problemas al no ser evidentes al momento que el material vegetal se introduce por primera vez, ya que suelen emerger semanas más tarde (Chandra Jena y Chandra Samal, 2011).

Las bacterias son los principales microorganismos capaces de interactuar con las plantas generando una relación simbiótica *in vivo*. Se denominan rizobacterias ya que se encargan de promover el crecimiento de las plantas, al liberar factores encargados de evitar los efectos nocivos de microorganismos patógenos, facilitando la absorción de los nutrientes. Los géneros *Pseudomonas*, *Acetobacter* y *Bacillus*, son las cepas bacterianas con mayor cantidad de rizobacterias (Gutiérrez-Mañero et al., 2001). Según la investigación de Gutiérrez, varias especies del género *Bacillus*, como *licheniformis* y *pumilus* son promotores del crecimiento al ser productores de auxinas.

Sin embargo, esta simbiosis que se genera *in vivo* entre la planta, específicamente la raíz y bacteria endógena se rompe en condiciones *in vitro* ya que la bacteria llega a tener las condiciones óptimas para su desarrollo a partir del medio de cultivo. Además, se considera que los denominados vitropatógenos llegan a competir con el explante por la obtención de los nutrientes del medio de cultivo, afectando en ciertos casos el desarrollo del explante o una pérdida total del mismo (Morell et al., 2009).

De las primeras investigaciones realizadas sobre el uso de agentes químicos para evitar infecciones por bacterias, la de Reed y colaboradores (1995) ha demostrado que, el uso de antibióticos *in vitro* puede ser efectivo para controlar la generación de bacteria al actuar como agente bacteriostático, esto quiere decir que no mata la cepa bacteriana, pero dificulta su desarrollo y reproducción, haciendo que esta desaparezca. Mientras que en la investigación de Quambusch y colaboradores (2014) se planteó que los microorganismos que llegan a los explantes *in vitro* pueden provenir del suelo en el cual estuvo cultivada la planta donante.

#### 4.2 Fase 1: Inducción de brotes de piñón (*Jatropha curcas L.*)

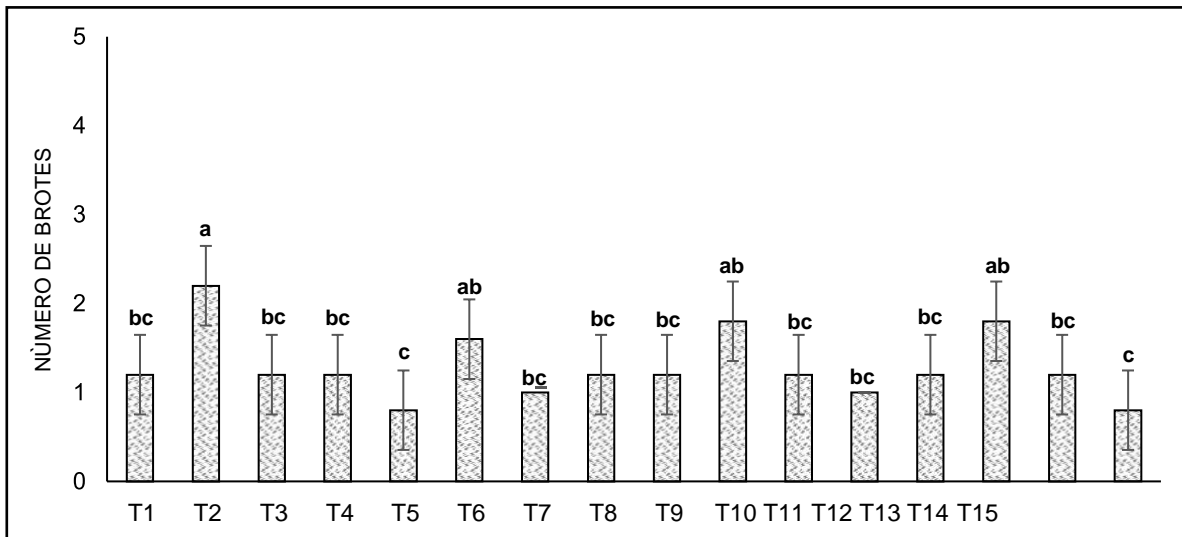
Una vez concluidas las cuatro semanas en fase de inducción de brotes, se analizaron los resultados obtenidos estadísticamente para determinar las diferencias significativas de cada tratamiento realizado y seleccionar el medio de cultivo óptimo. Para la variable de respuesta “número de brotes”, el mejor tratamiento fue el T2, siendo este la yema apical del genotipo CP052, seguido del T10 y T14, los cuales estaban conformados por yema apical y axilar respectivamente del genotipo CP041. Como se evidencia en la Figura 5, de las cinco observaciones realizadas el T2 obtuvo un total de 2,2 brotes, mientras que el T10 y T14 obtuvieron un total de 1,8 brotes después del tiempo de evaluación. Una constante de los tres tratamientos seleccionados como óptimos fue el medio de cultivo, siendo este el MIBJ – 2 detallada su composición en el Anexo 2.

En la Tabla 10 a continuación se muestra el ADEVA con los cuadrados medios obtenidos estadísticamente con la prueba de significancia Tukey.

Tabla 10.

*ADEVA de fase de inducción de brotes de Jatropha curcas L.*

		CUADRADOS MEDIOS	
		NUMERO DE BROTES	HOJAS VERDADERAS
<b>TOTAL</b>	79	-	-
<b>TRATAMIENTOS</b>	15	0,77	39,20
<b>Genotipos (G)</b>	1	0,05	22,05
<b>Medios de cultivo (M)</b>	3	3,23	140,47
<b>Tipo de Explantes (E)</b>	1	0,45	9,80
<b>G x M</b>	3	0,28	35,12
<b>G x E</b>	1	0,20	2,45
<b>M x E</b>	3	0,20	6,53
<b>G x M x E</b>	3	0,10	2,45
<b>Error experimental</b>	64	0,18	19,29
<b>Promedio</b>		1,30	25,205
<b>CV</b>		32,18	17,43



*Figura 5.* Número de brotes obtenidos por cada tratamiento después de cuatro semanas en estudio

En cuanto a la variable de “aparición y formación de primera, segunda y tercer hoja verdadera”, se determinó que los brotes cultivados en el MIBJ – 2 generaron sus hojas verdaderas en menor tiempo, como se muestra en la Figura 6. Debido a esto, se seleccionó como mejor tratamiento al T2, seguido del T6 detallados en la Tabla 3. Para el T2, las cinco observaciones generaron la primera hoja verdadera al día 7 y al día 21 ya tenían sus tres hojas verdaderas. Un comportamiento similar tuvo el T6, a diferencia de los tratamientos T8 y T16 en donde la generación de sus tres hojas verdaderas ocurrió al día 28 o una semana después. Para las dos variables en estudio en la fase de inducción de brotes de piñón, se determinó como mejor medio de cultivo el MIBJ–2. La morfología de los brotes obtenidos se puede visualizar en la Figura 7, en donde se observan los dos genotipos en estudio, CP052 y CP041 cultivados en el seleccionado como mejor medio de cultivo para la fase de inducción de brotes después de cuatro semanas. Se puede evidenciar la generación de la primera, segunda y tercera hoja verdadera a partir de meristemas apicales y axilares.

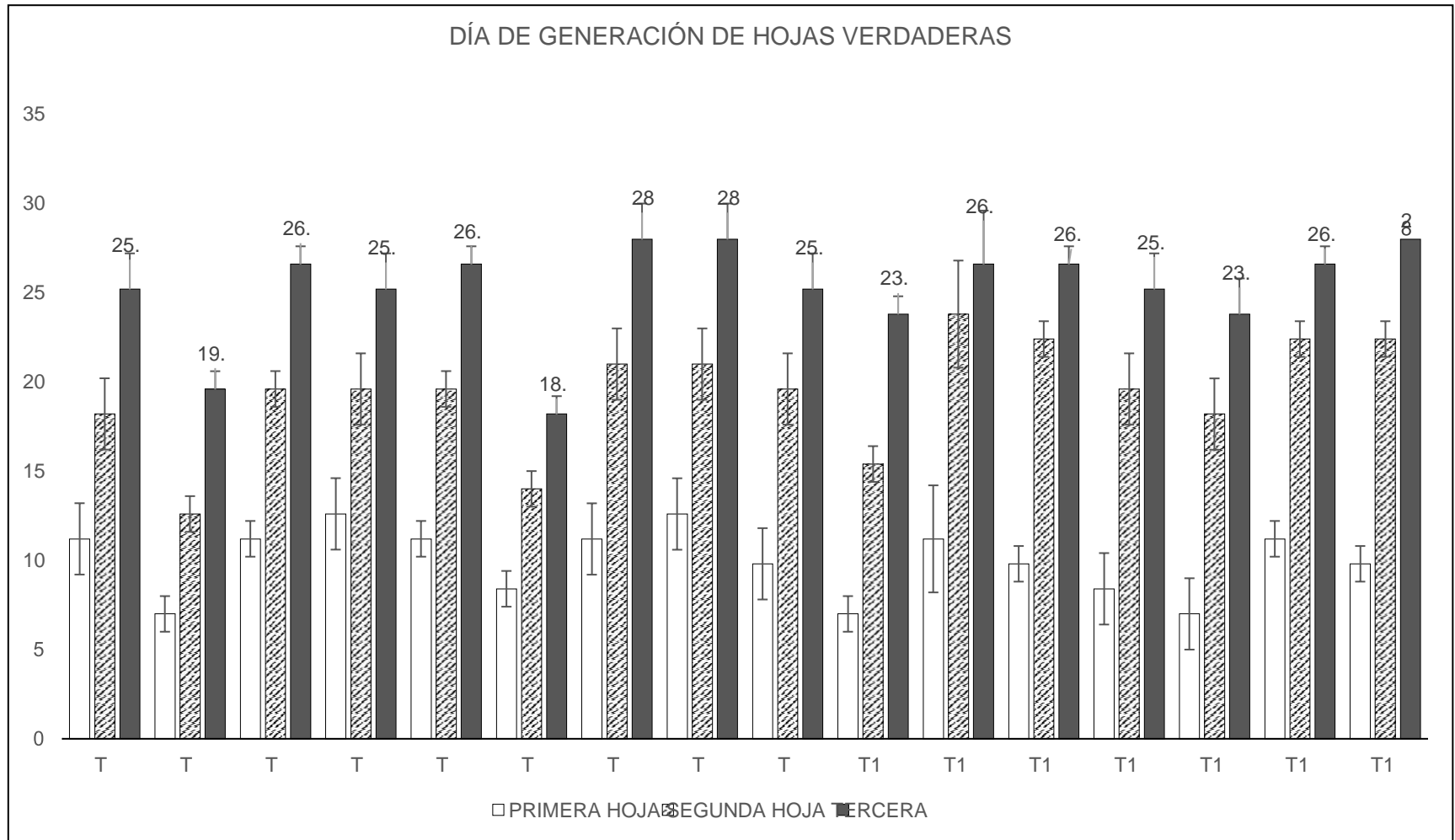


Figura 6. Día de generación de primera, segunda y tercera hoja verdadera después de cuatro semanas de evaluación

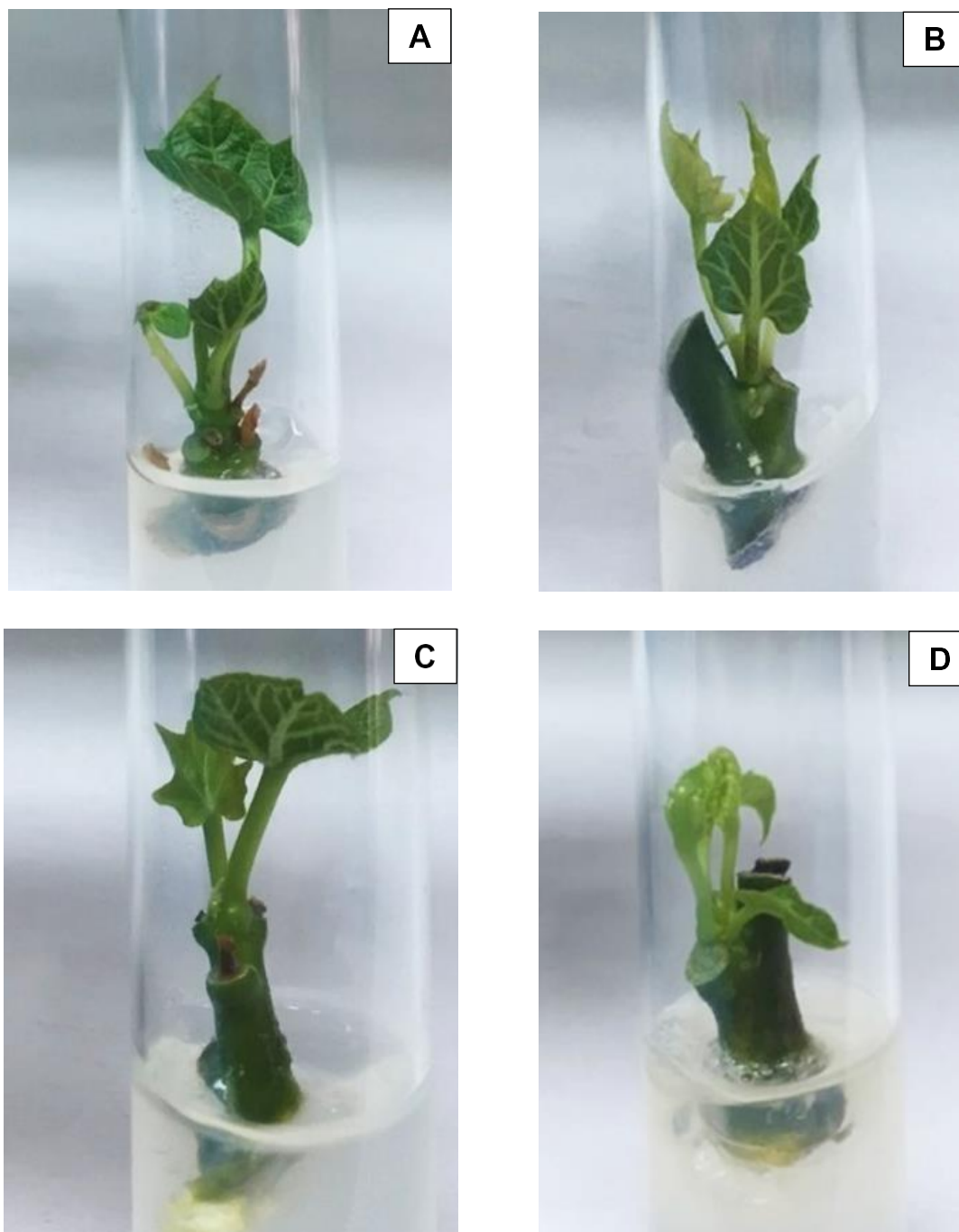


Figura 7. Brotes de piñón (*Jatropha curcas L.*) obtenidos después de cuatro semanas de fase de inducción en el MIBJ - 2.

A: Cp052 yema apical; B: Cp052 yema axilar; C: Cp041 yema apical y D: Cp041 yema axilar.

Los tratamientos óptimos, provinieron del medio de cultivo MIBJ-2 como se puede apreciar en la Figura 4, el cual a diferencia de los otros medios de cultivo en estudio (MIBJ-1, 3 Y 4), estuvo complementado con fitorreguladores como ácido indol butírico (IBA), kinetina (Kn) y sulfato de adenina en una concentración de 0,1 mg/L, 0,5 mg/L y 10,24 mg/L respectivamente. El desarrollo del explante en dicho medio, generando la mayor cantidad de brotes, pudo haberse generado a la influencia de los fitorreguladores y la interacción de los mismos, teniendo en cuenta que el piñón requiere una elevada concentración de citoquinina conjuntamente con otros elementos del medio de cultivo, para la proliferación de nuevos brotes. Adicionalmente, el sulfato de adenina pudo haber jugado un rol importante en la respuesta observada, ya que se demostró que, al añadirlo al medio, influía tanto en generación de brotes como en la elongación del mismo (Mukherjee et al., 2011). Sin embargo, es fundamental lograr la proporción adecuada entre auxinas y citoquininas para la obtención de nuevos brotes (Datta y Pandey, 2013).

En el estudio de Kalimuthu y colaboradores (2007), se determinó que la interacción entre los fitorreguladores en el medio de cultivo estaba relacionada con la generación de nuevos brotes de piñón, pues se ha demostrado que una elevada concentración de citoquininas en el medio de cultivo, produce simultáneamente dos efectos sobre las células que aún no están diferenciadas; el primero es que estimula la síntesis de DNA y el segundo es que aumenta el factor de división celular (Garg, Khatri, & Gandhi, 2011). En la investigación previamente citada, el medio de cultivo estuvo complementado con ácido indol acético (AIA), bencil amino purina (BAP) y Kn. A los 40 días en estudio, se obtuvo aproximadamente 7 brotes por explante. A diferencia de lo obtenido en la presente investigación, ya que el tiempo de exposición del explante a los fitorreguladores se consideró como importante para la generación de un mayor número de brotes, teniendo en cuenta que se obtuvieron un máximo de 2,2 brotes en un periodo de 28 días. Se determinó que una baja concentración de AIA y Kn, complementada con una concentración más alta de BAP producía mejores resultados en cuanto a generación de brotes se refiere. Sin



embargo, es importante tomar en cuenta el potencial de acción que poseen los fitorreguladores para determinar la concentración ideal en el medio de cultivo. Según la investigación de Rout (2006), IBA estimula un incremento en la actividad peroxidasa de las células, en comparación con otras auxinas como AIA y ANA, generando como consecuencia una mayor cantidad de compuestos fenólicos, los cuales actúan como antioxidantes, protegiendo al explante del estrés oxidativo, además de ser un estimulador del metabolismo. Esto concuerda con lo obtenido en la presente investigación en donde, el medio de cultivo suplementado con IBA y Kn generó mejor respuesta en los dos genotipos en estudio.

La generación de primera, segunda y tercera hoja verdadera se consideró como importante debido a que, según lo mencionado por Daudet y colaboradores (2013) en su investigación, es necesaria para que los explantes puedan sobrevivir al cambio de medio de cultivo para la siguiente fase. Los explantes cultivados en el MIBJ – 2 fueron los que menor tiempo tardaron en generar sus tres hojas verdaderas. Como se menciona en la investigación de DeMason (2005) relacionada con la interacción de auxinas y citoquininas durante la morfogénesis de hojas, las citoquininas promueven la proliferación celular en los meristemos apicales y axilares aumentando la producción de la auxina endógena del tejido vegetal, la cual se complementa con la auxina proporcionada en el medio de cultivo, provocando una mayor inducción de brotes y en consecuencia la generación de hojas. La Kn tiene la capacidad de estimular el enverdecimiento de las hojas, lo que resulta un aumento de la cantidad de cloroplastos, estimulando un conjunto de reacciones fotosintéticas, encargadas del desarrollo de nuevas hojas. Esta citoquinina muestra una mayor frecuencia de regeneración de brotes y hojas en un factor de 4 a 6 en comparación con otras citoquininas como TDZ y BA (Sairam Reddy, Rodrigues y Rajasekharan, 2001)

### 4.3 Fase 2: Elongación de brotes de piñón (*Jatropha curcas L.*)

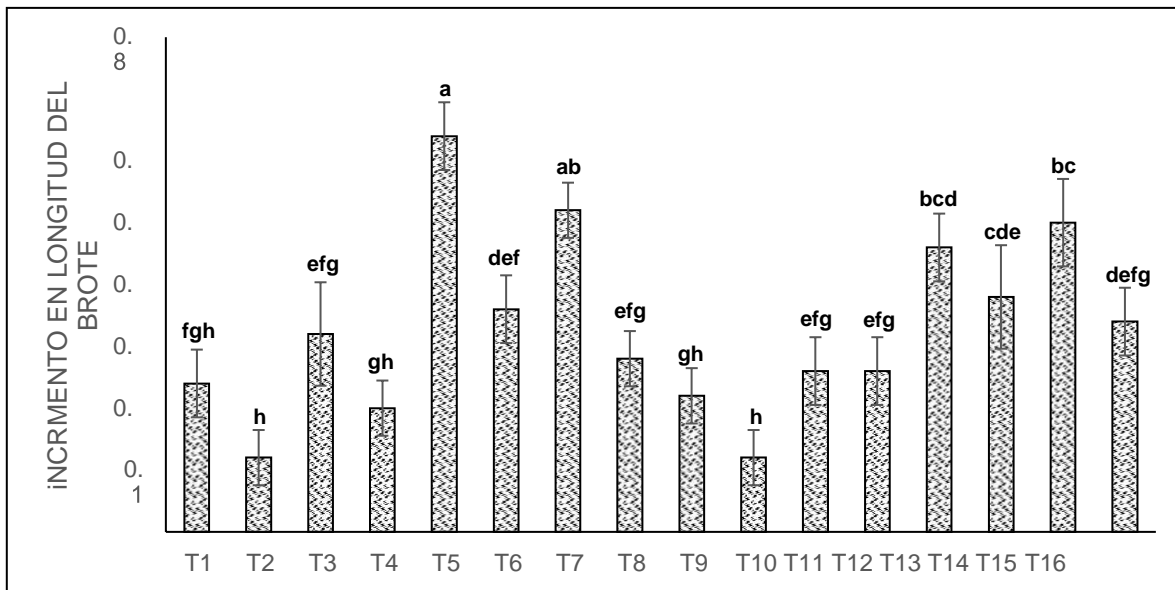
Una vez concluidas las cuatro semanas en fase de elongación de brotes de piñón, se analizaron los resultados obtenidos para determinar las diferencias significativas entre cada tratamiento evaluado y seleccionar el medio de cultivo óptimo. Para la variable de respuesta en estudio “longitud de brote”, el mejor tratamiento fue el T5, seguido de T7, los cuales estaban conformados por la yema apical y axilar respectivamente del genotipo CP052 y el T15, siendo este la yema apical el genotipo CP041. Como se muestra en la Figura 8, de las cinco observaciones realizadas, el tratamiento óptimo incrementó 0,64 cm a las cuatro semanas de evaluación, seguido de 0,52 y 0,50 cm respectivamente de los otros tratamientos mencionados. Una constante del T5, T7 y T15 es que todos estuvieron cultivados en el MEBJ-2 y expuestos al fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad; a diferencia del T2 y T10, en donde los brotes estuvieron en oscuridad constante y cultivados en el MEBJ-1. En estos tratamientos, los brotes incrementaron un total de 0,12 cm después de cuatro semanas de estudio. La composición de los medios de cultivo está detallado en el Anexo 3.

En la Tabla 11 a continuación se muestra el ADEVA con los cuadrados medios obtenidos estadísticamente con la prueba Tukey.

Tabla 11.

*ADEVA de fase de elongación de brotes de Jatropha curcas L.*

		CUADRADOS MEDIOS	
		LONGITUD DE BROTES	NÚMERO DE INTERNODOS
<b>TOTAL</b>	79	-	-
<b>TRATAMIENTOS</b>	15	0,10	3,35
<b>Genotipos (G)</b>	1	0,01	2,11
<b>Medios de Cultivo (M)</b>	3	0,92	23,11
<b>Tipo de Explantes (E)</b>	1	0,01	4,51
<b>Fotoperiodo (F)</b>	1	0,36	6,61
<b>G x M</b>	1	2 E -3	0,31
<b>G x E</b>	1	0,01	1,01
<b>G x F</b>	1	0,05	1,01
<b>M x E</b>	1	0,10	2,81
<b>M x F</b>	1	0,06	6,61
<b>E x F</b>	1	2 E -3	0,11
<b>G x M x E</b>	1	0,01	0,11
<b>G x M x F</b>	1	0,01	1,01
<b>G x E x F</b>	1	5 E -4	0,01
<b>M x E x F</b>	1	0,01	0,61
<b>G x M x E x F</b>	1	0,01	0,31
<b>Error experimental</b>	64	0,0033	0,1812
<b>Promedio</b>		0,33	1,54
<b>CV</b>		17,41	27,69



*Figura 8.* Incremento en longitud del brote de los tratamientos en fase de elongación de brotes del día 0 al día 28

En cuanto a la variable de respuesta “número de internodos”, se seleccionó como mejor tratamiento el T5, seguido del T7 y T13 detallados en la Tabla 5. Como se muestra en la Figura 9, los tratamientos óptimos estuvieron cultivados en el MEBJ-2 y sometidos al fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. De las cinco observaciones realizadas, el T5 generó 3,8 internodos después de las cuatro semanas de evaluación; seguido de 2,5 y 2,6 internodos de los tratamientos previamente mencionados. Nuevamente el MEBJ-2 fue el medio de cultivo que tuvo un mejor comportamiento con los brotes de los genotipos de estudio. Se determinó que el fotoperiodo podría ser indispensable para un desarrollo adecuado del brote. Se realizaron cuatro repiques de los explantes subcultivados en el MEBJ-2.

El factor de multiplicación del genotipo CP052 fue de tres nuevos brotes por explante, a diferencia del genotipo CP041 con un nuevo brote por explante. La morfología de los explantes obtenidos se puede visualizar en la Figura 10, en donde se observan los dos genotipos en estudio, CP052 y CP041 cultivados en el seleccionado como mejor medio de cultivo de la fase de elongación de brotes, después de cuatro

semanas. Se puede evidenciar la elongación y multiplicación de yemas de los explantes a partir de meristemos apicales y axilares.

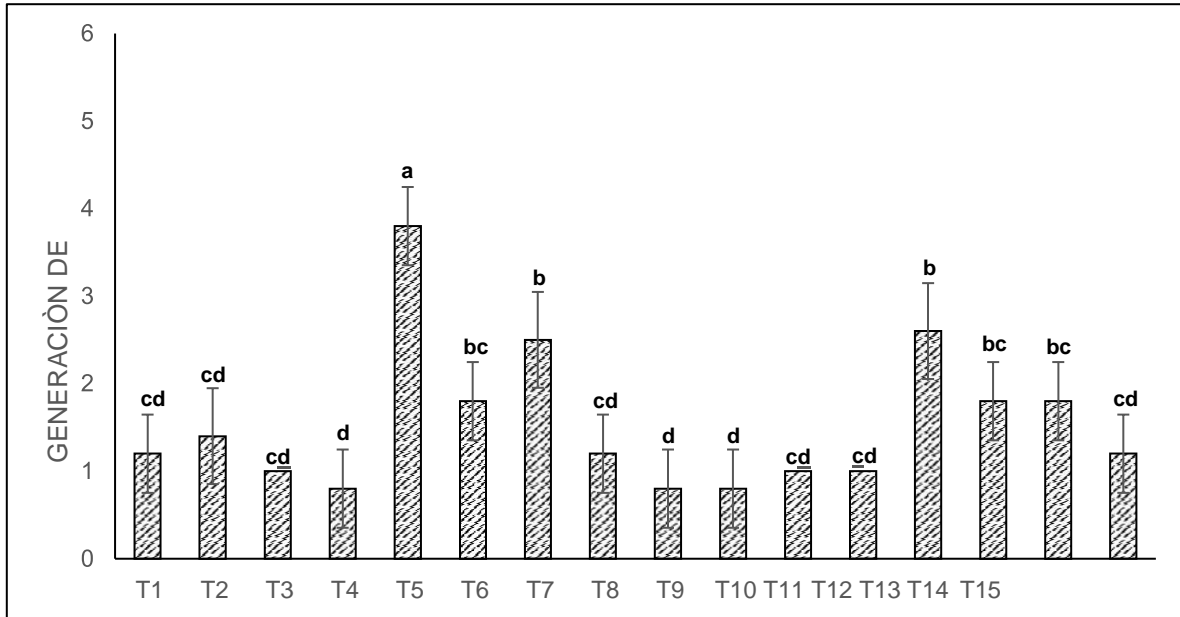


Figura 9. Generación de internodos durante las cuatro semanas de evaluación

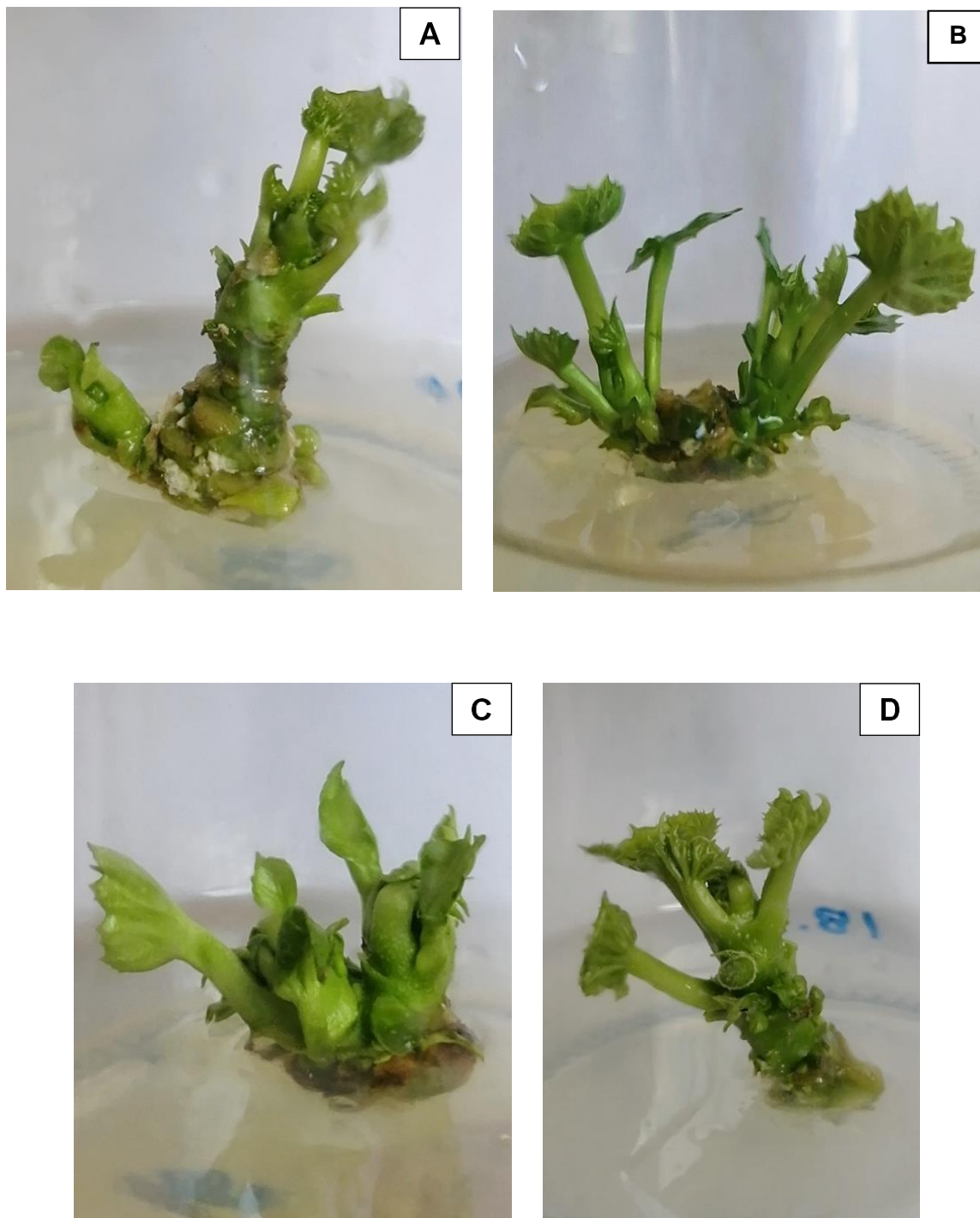


Figura 10. Explantes de piñón (*Jatropha curcas* L.) obtenidos después de cuatro semanas de fase de elongación en el MEBJ – 2 con fotoperiodo.

A: Cp052 yema apical; B: Cp052 yema axilar; C: Cp041 yema axilar y D: Cp041 yema apical.

En la presente fase, los mejores tratamientos fueron los cultivados en el medio de elongación MEBJ-2 como se muestra en la Figura 8, el cual estaba complementado con ácido indol acético (AIA) y bencil amino purina (BAP) a concentraciones de 1 mg/L y 0,5 mg/L respectivamente, además que estuvieron expuestos al fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. En la investigación de Datta y colaboradores (2007) se presentó un protocolo para la propagación clonal *in vitro* de *Jatropha curcas L.* a partir de explantes nodales, en donde se empleó el medio de cultivo MEBJ-2. Después de seis semanas en evaluación, sus explantes incrementaron entre 1,5 a 2 cm de longitud, a diferencia de lo obtenido en esta investigación. Esto pudo haber ocurrido debido al tiempo de exposición de los explantes a los fitorreguladores, siendo de seis semanas en la investigación mencionada tomando en cuenta que su factor de elongación fue de aproximadamente 0,25 cm por semana. Adicionalmente, los explantes nodales que Datta empleó en su investigación provenían de plantas de piñón de 7 meses edad, a diferencia de las plantas empleadas para la presente investigación, tomando en cuenta que un tejido joven se regenera más rápido en comparación con un tejido adulto debido a que los procesos de división y regeneración celular se realizan en menor tiempo y son más efectivos (Ozudogru et al., 2011).

Por otro lado, los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con la investigación realizada por Condemarín y colaboradores (2007), en donde el BAP está relacionado con el desarrollo de yemas y regeneración de las mismas, con el fin de incrementar el factor de multiplicación de los explantes. Mientras mayor sea la concentración de BAP, mayor será la estimulación de la división celular, y por ello se promoverá la generación de nuevas yemas axilares, ya que la dominancia apical disminuye. Además de este, otros estudios previos han reportado que la combinación entre BAP y AIA en medios de cultivo, actúa con un efecto sinérgico, aumentado así la longitud y el número de internodos por explante, tomando en cuenta que AIA, influye en los procesos metabólicos y de división celular (Nagaraju y Mani, 2005).

Los tratamientos que presentaron un mayor incremento en longitud de brote y generación de internodos estuvieron expuestos al fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Como se menciona en la investigación de Kurilčik y colaboradores (2008) relacionada con el efecto del fotoperiodo y temperatura para el desarrollo de brotes, el fotoperiodo influía desde la germinación hasta la floración de explantes al activar fenómenos propios de la planta. Se determinó que un fotoperiodo de 16/8 puede ser ideal para aumentar la cantidad de clorofila foliar, generando un aumento de procesos fotosintéticos y promoviendo el desarrollo y crecimiento *in vitro*. Sin embargo, es importante determinar el fotoperiodo ideal para cada especie vegetal, ya que una excesiva exposición a niveles de luz podría causar estrés fotooxidativo, generando altos niveles de formación de carbohidratos foliares causando clorosis, amarillamiento en hojas e inhibición de crecimiento (Vaz, Figueiredo-Ribeiro, y Kerbauy, 2004).



#### 4.4 Fase 3: Enraizamiento de explantes de piñón (*Jatropha curcas L.*)

Una vez concluidas las seis semanas en fase de enraizamiento, se analizaron los resultados obtenidos. Para las variables de respuesta en estudio “longitud final del explante” y “generación de raíces”, de las cinco observaciones realizadas, el T1 incrementó un total de 0,12 cm, seguido del T5 que tuvo un incremento de 0,06 cm, como se observa en la Figura 11. Los tratamientos T4 y T8 provenientes del MEJ-4 no reportaron ningún incremento en longitud del brote después del tiempo de evaluación. La composición de los tratamientos y medios de cultivo esta detallado en la Tabla 6 y Anexo 4 respectivamente.

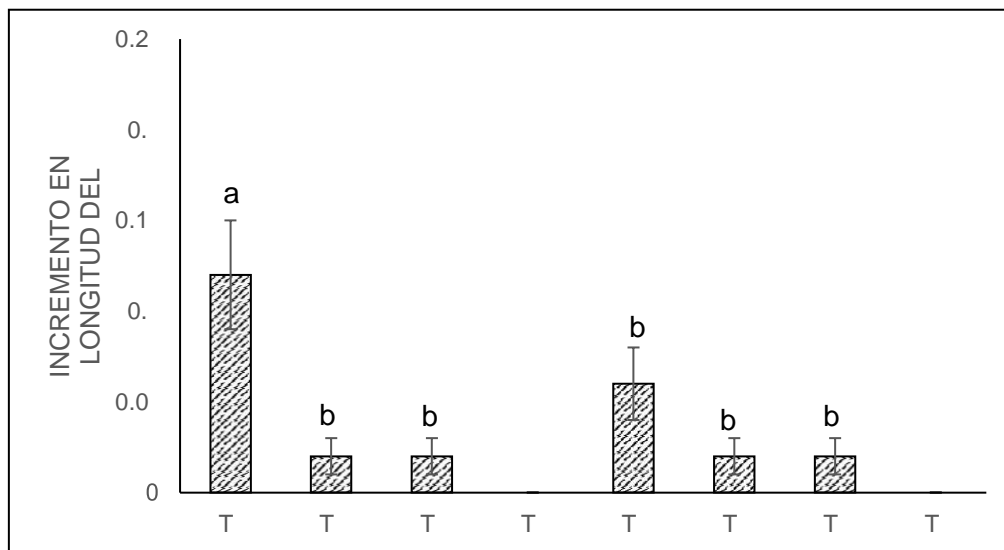


Figura 11. Incremento en longitud de explantes de piñón (*Jatropha curcas L.*) después de seis semanas de fase de enraizamiento en el MEJ – 1



Figura 12. Explante de piñón (*Jatropha curcas* L.) después de seis semanas de fase de enraizamiento en el MEJ – 1

En la presente fase, para las variables de respuesta en estudio, el T1 cultivado en el MEJ – 1, suplementado con IBA a una concentración de 0,2 mg/L desarrollo pequeñas raicillas de aproximadamente 3 mm como se aprecia en la Figura 11. Según la investigación de Rajore y Batra (2005), dicha auxina es ideal para el enraizamiento de *Jatropha curcas* L., a una concentración de 1 mg/L a 3 mg/L, ya que las raíces se desarrollaron directamente sin la generación de callos, a diferencia de lo que obtuvo con el medio de cultivo con AIA a la misma concentración, el cual generó una mínima respuesta de enraizamiento debido a la generación de callos friables, ya que la raíz se origina directamente de la endodermis; mientras que para el medio de cultivo complementado con ANA obtuvo una respuesta nula en cuanto a la generación de raíces. Los resultados concuerdan con la presente investigación, sin embargo, el bajo número de raíces generadas podría ser por la concentración de IBA en el medio de cultivo, a pesar de que los explantes estuvieron más tiempo expuestos a la auxina. Investigaciones revelan que el número de raíces aumenta a

medida que la concentración de IBA es mayor, ya que migra para desarrollar otro tejido, promoviendo el alargamiento celular (Camellia et al., 2009).

En la investigación de Kochhar y colaboradores (2008) se empleó IBA y ANA para enraizar brotes de piñón. Después de 30 días, el 75% de los explantes cultivados en el medio con IBA presentaron una raíz visible. Mientras que los brotes cultivados en el medio con ANA, después de 30 días tenían un porcentaje de enraizamiento del 33%. Un factor que influyó en el estudio para la obtención de dichos resultados y fue el pretratamiento realizado, ya que en sus preliminares usaron IBA a una concentración de 10 mg/L, y después de un mes de evaluación, ningún brote presentó raíces. El pretratamiento consistió en exponer a los explantes a elevadas concentraciones de IBA durante 24 horas y después realizar el cultivo.

Otro factor influyente pueden ser los genotipos, ya que Kochhar obtuvo sus explantes a partir de una planta madre pre – tratada con fitorreguladores para estimular el desarrollo de nuevos brotes y raíces. Mientras que, los genotipos empleados en esta investigación forman parte del banco de germoplasma del INIAP, y fueron seleccionados como promisorios después de realizarse varias investigaciones para determinar su potencial productivo sin la necesidad de realizar un pre - tratamiento (Mendoza et al., 2015). En el estudio, se determinó la calidad del esqueje y semilla de los genotipos empleados con respecto al tiempo de generación de nuevos brotes, cantidad de semilla y viabilidad. Sin embargo, la respuesta *in vitro* de los explantes difiere debido a cambios de temperatura, fluctuaciones generadas por precipitaciones, haciendo que se produzcan cambios en sus patrones de expresión, afectando su respuesta morfogénica (Cañadas-López et al., 2017).

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

Para la fase de inducción de brotes de piñón (*Jatropha curcas L.*), se determinó como mejor medio de cultivo a MIBJ-2, ya que generó un mayor número de brotes e inducción de primera, segunda y tercera hoja verdadera en menor tiempo. Esto ocurrió debido al efecto sinérgico entre los fitorreguladores (IBA y Kn), ya que generan una proliferación de nuevos brotes y estimulan el metabolismo del explante.

Para la fase de elongación de brotes, se seleccionó como medio de cultivo óptimo al MEBJ-2, compuesto por BAP y AIA ya que están relacionado con el desarrollo de yemas y regeneración de estas, al estimular la división celular. Al momento de combinarse los fitorreguladores, provocaron el aumento de la longitud del brote y la cantidad de internodos por explante. Finalmente, el fotoperiodo es importante para activar los fenómenos y fotorreceptores de la planta y estimular los procesos fotosintéticos.

En la fase de enraizamiento de explantes, el medio de cultivo MEJ – 1 fue el que mejor respuesta generó. Se plantea que, mientras más alta es la concentración de IBA, se incrementa el número de raíces, ya que, esta migra para generar un nuevo tejido, promoviendo el alargamiento celular. Además, los genotipos pudieron ser un factor influyente en la respuesta *in vitro* al no ser pre-tratados.

## 5.2 Recomendaciones

Se recomienda el uso de penicilina a una concentración de 10 mg/ml en caso de contaminación con *Bacillus licheniformis* ya que su uso no inhibe la morfogénesis del explante.

Para la fase de enraizamiento se recomienda realizar ensayos de dosimetría con el MEJ - 1 y aumentar el tiempo de evaluación para un mayor desarrollo de raíces y elongación de las mismas.

Se recomienda seguir con el estudio para optimizar y aumentar el factor de multiplicación de los explantes, teniendo en cuenta las pocas investigaciones realizadas de los genotipos promisorios

## REFERENCIAS

- Abdelgadir, H. A., & Van Staden, J. (2013, September). Ethnobotany, ethnopharmacology and toxicity of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae): A review. *South African Journal of Botany*, Vol. 88, pp. 204–218. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.07.021>
- Alberio, C., Izquierdo, N. G., Galella, T., Zuil, S., Reid, R., Zambelli, A., & Aguirrezábal, L. A. N. (2016). A new sunflower high oleic mutation confers stable oil grain fatty acid composition across environments. *European Journal of Agronomy*, 73, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2015.10.003>
- Alves, R. S., de Azevedo Peixoto, L., Teodoro, P. E., Silva, L. A., Rodrigues, E. V., de Resende, M. D. V., ... Bhering, L. L. (2018). Selection of *Jatropha curcas* families based on temporal stability and adaptability of genetic values. *Industrial Crops and Products*, 119, 290–293. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.029>
- Banerjee, M., & Shrivastava, S. (n.d.). *Regular International Journal of Integrative Biology A journal for biology beyond borders In vitro clonal propagation of physic nut (Jatropha curcas L.): Influence of additives.* <https://www.researchgate.net/publication/298352405>
- Bittner, M., Alarcon, J., Aqueveque, P., Becerra, J., Hernandez, V., Hoeneisen, M., & Suva, M. (2001). Estudio químico de especies de la familia euphorbiaceae en Chile. *Boletín de La Sociedad Chilena de Química*, 46(4), 419–431. <https://doi.org/10.4067/S0366-16442001000400006>
- Camellia, N., Thohirah, N. A., Abdullah, N. A. P., & Khidir, M. (2009). Improvement on Rooting Quality of *Jatropha curcas* Using Indole Butyric Acid (IBA). In *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* (Vol. 5).

- Campuzano-Duque, L. F., Ríos, L. A., & Cardeño-López, F. (2016). Caracterización composicional del fruto de 15 variedades de *Jatropha curcas* L. En el departamento del Tolima, Colombia. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 17(3), 379–390. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol17\\_num3\\_art:514](https://doi.org/10.21930/rcta.vol17_num3_art:514)
- Cañadas-López, Á., Rade-Loor, D., Domínguez-Andrade, J. M., Vargas-Hernández, J. J., Molina-Hidrovo, C., Macías-Loor, C., & Wehenkel, C. (2017). Variation in seed production of *Jatropha curcas* L. accessions under tropical dry forest conditions in Ecuador. *New Forests*, 48(6), 785–799. <https://doi.org/10.1007/s11056-017-9597-1>
- Cardona, C. A., Quintero, J. A., & Paz, I. C. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, 101(13), 4754–4766. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.097>
- Chandra Jena, R., & Chandra Samal, K. (2011). Endogenous microbial contamination during In vitro culture of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]: identification and prevention. In *Journal of Agricultural Technology* (Vol. 7). <http://www.ijat-aatsea.com>
- Condemarin-Montealegre, C. E., Chico-Ruiz, J., & Vargas-Artaega, C. (2007). Efecto del ácido indolbutírico (IBA) y 6-bencilaminopurina (BAP) en el desarrollo in vitro de yemas axilares de *Encyclia microtos* (Rchb.f.) Hoehne (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 7(1–2), 247–254. <https://doi.org/10.15517/lank.v7i1-2.19513>
- Contran, N., Chessa, L., Lubino, M., Bellavite, D., Roggero, P. P., & Enne, G. (2013, March). State-of-the-art of the *Jatropha curcas* productive chain: From sowing to biodiesel and by-products. *Industrial Crops and Products*, Vol. 42, pp. 202–215. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.037>
- Danso, K. E., Afful, N. T., Annor, C., & Amoatey, H. M. (2011). In vitro regeneration

- of ricinus communis L. and jatropha curcas L. for Biofuel production. *Biotechnology*, 10(5), 400–407. <https://doi.org/10.3923/biotech.2011.400.407>
- Datta, M. M., Mukherjee, P., Ghosh, B., & Baran Jha, T. (2007). *In vitro clonal propagation of biodiesel plant (Jatropha curcas L.)*.
- Datta, S. K., & Pandey, R. K. (2013). Studies on Jatropha curcas L. and Its Improvement Through Induced Mutagenesis. In *Jatropha, Challenges for a New Energy Crop* (pp. 321–334). [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4915-7\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4915-7_16)
- Daudet, S., Mve, M., Mergeai, G., Druart, P., Baudoin, J. P., & Toussaint, A. (2013). In Vitro Micropropagation of Jatropha curcas L. from Bud Aggregates. In *Journal of Technology Innovations in Renewable Energy*. <https://pdfs.semanticscholar.org/1fe0/f7754fa13dd919647b7cf130de10ff44f761.pdf>
- DeMason, D. A. (2005). Auxin-cytokinin and auxin-gibberellin interactions during morphogenesis of the compound leaves of pea (*Pisum sativum*). *Planta*, 222(1), 151–166. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1508-6>
- Demirbas, A. (2007). Biodiesel from sunflower oil in supercritical methanol with calcium oxide. *Energy Conversion and Management*, 48(3), 937–941. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2006.08.004>
- Demirbas, A. (2008). Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. *Energy Conversion and Management*, 49(8), 2106–2116. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2008.02.020>
- Ferreira Nunes, C., Nazaré, D., Santos, D., Pasqual, M., Cainã, T., Valente, T., ... Setotaw, T. A. (n.d.). *Morphogenesis and regeneration of adventitious shoots in Jatropha curcas L.*
- Garg, P., Khatri, P., & Gandhi, D. (2011). *Imperial Journal of Pharmacognosy &*



*Natural Products*. 1(June), 6–13.

Grossmann, I. E., & Martín, M. (2010). Energy and water optimization in biofuel plants. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 18(6), 914–922. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(09\)60148-8](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(09)60148-8)

Gutiérrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F. R., & Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111(2), 206–211. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x>

Höök, M., Bardi, U., Feng, L., & Pang, X. (2010). Development of oil formation theories and their importance for peak oil. *Marine and Petroleum Geology*, 27(9), 1995–2004. <https://doi.org/10.1016/j.marpetgeo.2010.06.005>

Höök, M., & Tang, X. (2013). Depletion of fossil fuels and anthropogenic climate change-A review. *Energy Policy*, 52, 797–809. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2012.10.046>

Induced Mutation on *Jatropha* (*Jatropha Curcas* L.) for Improvement of Agronomic Characters Variability | Dwimahyani | Atom Indonesia. (n.d.). <http://aij.batan.go.id/index.php/aij/article/view/215/154>

Iracheta Donjuan, L., Díaz Fuentes, V. H., Basulto Graniel, J. A., González Jiménez, A., Rico Ponce, H. R., & López Gómez, P. (2016). *Propagación in vitro del piñón mexicano (Jatropha Curcas L.)*. <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/handle/123456789/4331?show=full>

Iracheta Donjuan, L., Hugo, V., Fuentes, D., Alberto, J., Graniel, B., & Jiménez, A. G. (2015). *Propagación in vitro de piñon- INIFAP*.

Kalimuthu, K., Paulsamy, S., Senthilkumar, R., & Sathya, M. (2007a). In vitro

- propagation of the biodiesel plant *Jatropha curcas* L. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 17(2), 137–147. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v17i2.3234>
- Kalimuthu, K., Paulsamy, S., Senthilkumar, R., & Sathya, M. (2007b). In vitro Propagation of the Biodiesel Plant *Jatropha curcas* L. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 17(2), 137–147. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v17i2.3234>
- Kant, P., & Wu, S. (2011). The Extraordinary Collapse of *Jatropha* as a Global Biofuel. *Environmental Science & Technology*, 45(17), 7114–7115. <https://doi.org/10.1021/es201943v>
- Kochhar, S., Singh, S. P., & Kochhar, V. K. (2008). Effect of auxins and associated biochemical changes during clonal propagation of the biofuel plant-*Jatropha curcas*. *Biomass and Bioenergy*, 32(12), 1136–1143. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.02.014>
- Koh, M. Y., & Tinia, T. I. (2011, June). A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 15, pp. 2240–2251. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.02.013>
- Kumar, A., & Sharma, S. (2008, July). An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Industrial Crops and Products*, Vol. 28, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.01.001>
- Kumar Tiwari, A., Kumar, A., & Raheman, H. (2007). Biodiesel production from *Jatropha* oil (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: An optimized process. *Biomass and Bioenergy*, 31(8), 569–575. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2007.03.003>
- Kurilčik, A., Dapkūnienė, S., Kurilčik, G., Žilinskaitė, S., Žukauskas, A., & Duchovskis, P. (n.d.). *Effect of the photoperiod duration on the growth of Chrysanthemum plantlets in vitro.*

- Kurnia, J. C., Jangam, S. V, Akhtar, S., Sasmito, A. P., & Mujumdar, A. S. (2016). advances in biofuel from oil palm and palm oil processing waste: a review. *Advances in biofuel production from oil palm and palm oil processing wastes: A review. Prolysis. Biofuel Research Journal*, 9, 332–346. <https://doi.org/10.18331/BRJ2016.3.1.3>
- Lahijani, P., & Zainal, Z. A. (2011). Gasification of palm empty fruit bunch in a bubbling fluidized bed: A performance and agglomeration study. *Bioresource Technology*, 102(2), 2068–2076. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.101>
- León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa Ulloa, C., & Navarrete, H. (2011). *LIBRO ROJO DE LAS PLANTAS ENDÉMICAS DEL ECUADOR SEGUNDA EDICIÓN*.
- Marzo, C., Díaz, A. B., Caro, I., & Blandino, A. (2019). Status and Perspectives in Bioethanol Production From Sugar Beet. In *Bioethanol Production from Food Crops* (pp. 61–79). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813766-6.00004-7>
- Mendoza, H., López, J., Cedeño, L., Ponce, W., Mejía, N., & Mejía, N. (2015). Rendimiento inicial de líneas de piñón (*Jatropha curcas* L.) bajo dos métodos de siembra. *La Técnica: Revista de Las Agrociencias*. ISSN 2477-8982, 0(15), 46. [https://doi.org/10.33936/la\\_tecnica.v0i15.547](https://doi.org/10.33936/la_tecnica.v0i15.547)
- Morell, F., Hernández, A., Borges, Y., & Marentes, F. (2009). Arbuscular mycorrhizal fungal activity on soil structure. *Cultivos Tropicales*, 30(4), 00–00.
- Mukherjee, P., Varshney, A., Johnson, T. S., & Jha, T. B. (2011). *Jatropha curcas*: A review on biotechnological status and challenges. *Plant Biotechnology Reports*, 5(3), 197–215. <https://doi.org/10.1007/s11816-011-0175-2>
- Mve, M., Daudet, S., Mergeai, G., Baudoin, J.-P., & Toussaint, A. (2009). *In vitro clonal propagation of a promising agrofuel producing plant: Jatropha curcas* L. 93(10), 6–10.

- Mwine, J. T., & Damme, P. Van. (2011). Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(5), 652–662. <http://www.academicjournals.org/JMPR>
- Nagaraju, V., & Mani, S. K. (2005). Rapid in vitro propagation of orchid *Zygopetalum intermedium*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 14(1), 27–32. <https://doi.org/10.1007/BF03263220>
- Nahar, K., & Borna, R. S. (2012). In vitro Propagation from Shoot tip Explants of Castor oil plant (*Ricinus communis* L): A Bioenergy Plant Biofuel production from non food crops View project In vitro Propagation from Shoot tip Explants of Castor oil plant (*Ricinus communis* L): A Bioenergy Plant. In *Canadian Journal on Scientific and Industrial Research* (Vol. 3). <https://www.researchgate.net/publication/291336115>
- Nahar, K., & Ozores-Hampton, M. (n.d.). *Jatropha: An Alternative Substitute to Fossil Fuel 1*. <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- Openshaw, K. (2000). A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass and Bioenergy*, 19(1), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(00\)00019-2](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(00)00019-2)
- Ozudogru, E. A., Kaya, E., Kirdok, E., & Issever-Ozturk, S. (2011). In vitro propagation from young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* and *T. longicaulis*) resulting in genetically stable shoots. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 47(2), 309–320. <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9347-6>
- Pandey, V. C., Singh, K., Singh, J. S., Kumar, A., Singh, B., & Singh, R. P. (2012). *Jatropha curcas*: A potential biofuel plant for sustainable environmental development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(5), 2870–2883.

<https://doi.org/10.1016/J.RSER.2012.02.004>

- Parthiban, K. T., Selvan, P., Paramathma, M., Kanna, S. U., Kumar, P., Subbulakshmi, V., & Vennila, S. (2011). Physico-chemical characterization of seed oil from *Jatropha curcas* L. genetic resources. *Journal of Ecology and the Natural Environment*, 3(5), 163–167. <http://www.academicjournals.org/jene>
- Quambusch, M., Pirtila, A. M., Tejesvi, M. V., Winkelmann, T., & Bartsch, M. (2014). Endophytic bacteria in plant tissue culture: Differences between easy-and difficult-to-propagate *Prunus avium* genotypes. *Journal of Refugee Studies*, 34(5), 524–533. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu027>
- Rajore, S., & Batra, A. (2005). Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 14(1), 73–75. <https://doi.org/10.1007/BF03263231>
- Rathore, M. S., Yadav, S., Yadav, P., Kheni, J., & Jha, B. (2015). Biomass and Bioenergy Micropropagation of elite genotype of *Jatropha curcas* L. through enhanced axillary bud proliferation and ex vitro rooting. *Biomass and Bioenergy*, 83, 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.10.023>
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2013). Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, Vol. 103, pp. 444–467. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.10.004>
- Reed, B. M., Buckley, P. M., & DeWilde, T. N. (1995). Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 31(1), 53–57. <https://doi.org/10.1007/BF02632228>
- Rodríguez González, H., & Hechevarría Sosa, I. (2004). Efectos estimulantes del crecimiento de extractos acuosos de plantas medicinales y gel de *Aloe vera* (L.)

N. L. Burm. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 9(2), 0–0.

- Rout, G. R. (2006). Effect of auxins on adventitious root development from single node cuttings of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze and associated biochemical changes. *Plant Growth Regulation*, 48(2), 111–117. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-5665-1>
- Sairam Reddy, P., Rodrigues, R., & Rajasekharan, R. (2001). Shoot organogenesis and mass propagation of *Coleus forskohlii* from leaf derived callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66(3), 183–188. <https://doi.org/10.1023/A:1010697813852>
- Salimon, J., Mohd Noor, D. A., Nazrizawati, A. T., Mohd Firdaus, M. Y., & Noraishah, A. (2010). Fatty acid composition and physicochemical properties of Malaysian castor bean *ricinus communis* L. seed oil. *Sains Malaysiana*, 39(5), 761–764.
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta*. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/46738>
- Songsri, P., Surinam, B., Sanitchon, J., Srisawangwong, S., & Kesmala, T. (2011). Effects of gamma radiation on germination and growth characteristics of physic nut (*Jatropha curcas* L.). *Journal of Biological Sciences*, 11(3), 268–274. <https://doi.org/10.3923/jbs.2011.268.274>
- Taxonomy browser (*Jatropha curcas*). (n.d.), from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=180498>
- Thepsamran, N., Thepsithar, C., & Thongpukdee, A. (2008). In vitro induction of shoots and roots from *Jatropha curcas* L. explants. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(1), 106–112. <https://doi.org/10.1080/14620316.2008.11512354>
- Vaz, A. P. A., Figueiredo-Ribeiro, R. D. C. L., & Kerbauy, G. B. (2004). Photoperiod

and temperature effects on in vitro growth and flowering of *P. pusilla*, an epiphytic orchid. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(5), 411–415. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.03.008>

Vinicio, M., & Escudero, Á. (2015). *Propagación in vitro de Jatropha curcas -variedad cabo verde- a partir de láminas foliares.*

Xavier, J. R., Gnanam, R., Murugan, M. P., & Pappachan, A. (2012). Clonal propagation of *Phyllanthus amarus*: A hepatoprotector. *Pharmacognosy Magazine*, 8(29), 78–82. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.93332>

Zamarripa Colmenero, A., & Solís-Bonilla, J. (2013). *Jatropha curcas L. Alternativa Bioenergética en Mexico.*

## **ANEXOS**



Anexo 1. Resultado de antibiograma para determinar sensibilidades de *Bacillus licheniformis*

Prueba:	CULTIVO-ANTIBIOGRAMA	Método:	LVX / MAL/ 024
Unidad:	SIN DESARROLLO/ DESARROLLO (Sensible/ Intermedio/ Resistente)		

N°	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO	ANTIBIOGRAMA		
			SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
T-1476	PLANTULA	Desarrollo de <i>Bacillus licheniformis</i>	Carbenicilina Eritromicina Kanamicina Neomicina Penicilina Vancomicina Ciprofloxacina Sulfatrimetoprim Gentamicina		Cefotaxime Clindamicina

Anexo 2. Medios de cultivo empleados en la fase de inducción de brotes de piñón.

<b>MEDIOS DE INDUCCIÓN DE BROTES</b>				
<b>COMPUESTOS:</b>	<b>M1: MIBJ-1 (Datta et al 2007)</b>	<b>M2: MIBJ-2 (Garg et al., 2011) mod.</b>	<b>M3: MIBJ-3 (Garg et al., 2011)</b>	<b>M4: MIBJ-4 (Mve et al., 2013)</b>
<b>Sales MS</b>	4,3 g/L	4,3 g/L	4,3 g/L	4,3 g/L
<b>Sacarosa</b>	30 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L
<b>Sulfato de adenina</b>	10,24 mg/L	10,24 mg/L	10.24 mg/L	-
<b>Ácido Indol butírico (IBA)</b>	-	0,1 mg/L	-	-
<b>Kinetina</b>	-	0,5 mg/L	-	-
<b>Benzilamino purina (BAP)</b>	5 mg/L		5 mg/L	0,49 mg/L
<b>Ácido Indol acético (IAA)</b>	-	-	-	1 mg/L
<b>L- arginina</b>	-	-	-	15 mg/L
<b>Agar</b>	7,5 g/L	7,5 g/L	7,5 g/L	7 g/L
<b>Ph</b>	5,7	5,7	5,7	5,8

Anexo 3. Medios de cultivo para elongación de brotes de piñón (*Jatropha curcas L.*)

<b>MEDIOS DE ELONGACIÓN DE BROTES</b>		
<b>COMPUESTOS:</b>	<b>M1: MEBJ-1 (Mve et al., 2013)</b>	<b>M2: MEBJ-2 (Garg et al., 2011)</b>
<b>Sales MS</b>	4,3 g/L	4,3 g/L
<b>Sacarosa</b>	20 g/L	30 g/L
<b>Ácido Indol acético (IAA)</b>		1 mg/L
<b>Ácido Indol butírico (IBA)</b>	0,5 mg/L	-
<b>Benzilamino purina (BAP)</b>	-	0,5 mg/L
<b>Agar</b>	7 g/L	7,5 g/L
<b>pH</b>	5,8	5,7

Anexo 4. Medios de cultivo para la fase de enraizamiento de explantes in vitro de piñón.

<b>MEDIOS DE ENRAIZAMIENTO DE BROTES</b>				
<b>COMPUESTOS:</b>	<b>M1: MIBJ-1 (Garg et al., 2011)</b>	<b>M2: MIBJ-2 (INIAP, 2019)</b>	<b>M3: MIBJ-3 (INIAP, 2019)</b>	<b>M4: MIBJ-4 (INIAP, 2019)</b>
<b>Sales MS</b>	4,3 g/L	4,3 g/L	4,3 g/L	4,3 g/L
<b>Sacarosa</b>	30 g/L	30 g/L	30 g/L	30 g/L
<b>Ácido Indol butírico (IBA)</b>	0,2 mg/L	-	-	-
<b>Ácido Indol acético (IAA)</b>	-	0,2 mg/L	-	-
<b>Ácido naftalenacético (ANA)</b>	-	-	0,2 mg/L	-
<b>Agar</b>	7,5 g/L	7,5 g/L	7,5 g/L	7 g/L
<b>pH</b>	5,7	5,7	5,7	5,8

Anexo 5. Resumen de estadístico Tukey para todos los tratamientos de fase de inducción de brotes

Factores	Código	Variables	
		Número de brotes	Hojas verdaderas
<b>Genotipos (G)</b>	CP052	1,33 a	24,68 a
	CP041	1,28 a	25,73 a
<b>Medios de cultivo (M)</b>	MIBJ-1	1,10 b	25,55 b
	MIBJ-2	1,90 a	21,35 a
	MIBJ-3	1,15 b	26,95 b
	MIBJ-4	1,05 b	26,95 b
<b>Tipos de explante (E)</b>	Apical	1,39 a	24,85 a
	Axilar	1,23 a	25,55 a
<b>G x M x E</b>	T1	1,2 b	25,2 b
	T2	2,2 a	19,6 ab
	T3	1,2 b	26,6 c
	T4	1,2 b	25,2 c
	T5	0,8 b	26,6 c
	T6	1,8 a	18,6 a
	T7	1 b	28 c
	T8	1,2 b	28 c
	T9	1,2 b	25,2 c
	T10	1,8 a	23,8 bc
	T11	1,3 b	26,6 c
	T12	1 b	26,6 c
	T13	1,2 b	25,2 c
	T14	1,8 a	23,8 bc
	T15	1,2 b	26,6 c
	T16	0,8 b	28 c

Anexo 6. Resumen de estadístico Tukey para todos los tratamientos de fase de elongación de brotes

Factores	Código	Variables	
		Longitud de brotes	Número de internodos
<b>Genotipos (G)</b>	CP052	0,34 a	1,70 a
	CP041	0,32 a	1,38 b
<b>Medios de cultivo (M)</b>	MEBJ-1	0,22 b	1,00 b
	MEBJ-2	0,44 a	2,08 a
<b>Tipos de explante (E)</b>	Apical	0,32 a	1,78 a
	Axilar	0,34 a	1,30 b
<b>Fotoperiodo (F)</b>	Con fotoperiodo 16h luz/ 8h oscuridad	0,40 a	1,83 a
	Sin fotoperiodo 8h oscuridad	0,26 b	1,25 b
<b>G x M x E</b>	T1	0,24 f	1,2 de
	T2	0,12 g	1,4 cd
	T3	0,32 cde	1 de
	T4	0,2 f	0,8 e
	T5	0,64 a	3,8 a
	T6	0,36 c	1,8 c
	T7	0,52 b	2,5 b
	T8	0,28 def	1,2 de
	T9	0,22 f	0,8 e
	T10	0,12 g	0,8 e
	T11	0,26 ef	1 de
	T12	0,26 ef	1 de
	T13	0,46b	2,6 b
	T14	0,38 c	1,8 c
	T15	0,5 b	1,8 c
	T16	0,34 cd	1,2 de

