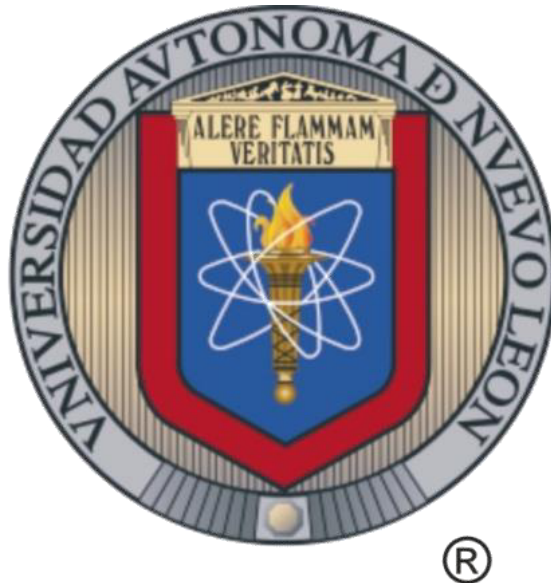


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**EFFECTO DEL TIPO DE EXPLANTE, REGULADOR DE  
CRECIMIENTO Y MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA CAPACIDAD  
MORFOGÉNICA DE *Jatropha curcas* L.**

PRESENTA

**IVÁN LUCIANO PEQUEÑO GRANADO**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

**MARZO 2015**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**EFFECTO DEL TIPO DE EXPLANTE, REGULADOR DE  
CRECIMIENTO Y MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA CAPACIDAD  
MORFOGÉNICA DE *Jatropha curcas* L.**

PRESENTA

**IVÁN LUCIANO PEQUEÑO GRANADO**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

**MARÍN, NUEVO LEÓN, MÉXICO.**

**MARZO DE 2015**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**EFFECTO DEL TIPO DE EXPLANTE, REGULADOR DE  
CRECIMIENTO Y MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA CAPACIDAD  
MORFOGÉNICA DE *Jatropha curcas* L.**

**PRESENTA**

**IVÁN LUCIANO PEQUEÑO GRANADO**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

**MARÍN, NUEVO LEÓN, MÉXICO.**

**MARZO DE 2015**

ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL  
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

---

Dra. Ma. del Carmen Ojeda Zacarías

Asesor Principal

---

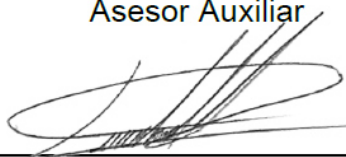
Ph. D. Emilio Olivares Sáenz

Asesor Auxiliar

---

Ph. D. Francisco Zavala García

Asesor Auxiliar



---

Dr. Leobardo Iracheta Donjuan

Asesor Auxiliar

---

Dr. Ernesto Javier Sánchez Alejo

Subdirector de Estudios de Posgrado

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Luciano Pequeño Pérez y Rosa Nelly Granado García, por su grande apoyo en cada etapa de mi vida, los amo.

A mis hermanas, Yesenia Pequeño Granado y Rocio Iracema Pequeño Granado, por su confianza, amistad y la sana competencia entre nosotros, las amo.

Con cariño y respeto en memoria de mi abuelo, Santiago Granados, gracias por tanto querido abuelo.

Con cariño y respeto en memoria de mis tíos, Emiliano Velázquez y María de Jesús Pequeño, gracias por su apoyo y confianza.

Con cariño para esa persona que me ha apoyado en mis metas y con la que comparto sueños, Maricela Bernal.

A mis amigos de la vida, en cada etapa de ella, en especial para aquellos que ahora sólo viven en mis recuerdos y de otros que les aman.

A todo México, en especial aquellas personas que luchan día a día por hacer de éste un mejor país.

A mi familia en general, con aprecio y gratitud.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Ma. del Carmen Ojeda Zacarías por la asesoría y conocimientos brindados en el área de cultivo de tejidos vegetales, además de su valioso apoyo para la presente investigación.

Al Dr. Emilio Olivares Sáenz por su apoyo, paciencia y conocimientos concedidos en las áreas de la nutrición vegetal y estadística.

Al Dr. Leobardo Iracheta Donjuan por su apoyo en la adquisición de material vegetal para esta investigación, además de sus consejos en el área de cultivo de tejidos vegetales.

Al Dr. Francisco Zavala García por su apoyo, paciencia y conocimientos otorgados para la realización de esta investigación.

A mis compañeros y amigos de posgrado, que con su apoyo y desahogo hicieron más venidera esta etapa.

A mi compañera Nimbe Nayeli Carbajal por su apoyo en la realización de esta investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para la realización de mis estudios de posgrado.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
RESUMEN .....	xv
ABSTRACT .....	xviii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. HIPÓTESIS .....	5
2.1. Hipótesis principal.....	5
2.2. Hipótesis secundarias.....	5
3. OBJETIVOS .....	6

3.1. Objetivo principal.....	6
3.2. Objetivos secundarios.....	6
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
4.1. Aspectos generales del piñoncillo.....	7
4.2. Descripción botánica de <i>Jatropha curcas</i> L.....	7
4.2.1. Hojas.....	8
4.2.2. Raíces.....	9
4.2.3. Flores.....	9
4.2.4. Frutos.....	11
4.2.5. Semillas.....	11
4.3. Hábitos de crecimiento.....	11
4.4. Origen.....	13
4.5. Importancia.....	13
4.6. Métodos de propagación tradicional.....	14
4.7. Propagación mediante cultivo de tejidos vegetales.....	15
4.7.1. Factores que intervienen en el cultivo de tejidos vegetales.....	16
4.7.2. Rutas morfogénicas del cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	17



4.8. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales.....	18
4.9. Micropropagación <i>in vitro</i> .....	20
4.10. Etapas de la micropropagación <i>in vitro</i> .....	21
4.10.1. Etapa 0: Preparación del material vegetal .....	22
4.10.2. Etapa 1: Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> .....	23
4.10.3. Etapa 2: Multiplicación .....	24
4.10.4. Etapa 3: Enraizamiento.....	25
4.10.5. Etapa 4: Aclimatación .....	26
4.11. Métodos de micropropagación <i>in vitro</i> .....	26
4.11.1. Regeneración de órganos vegetales a partir de callo .....	27
4.11.2. Brotación de yemas preexistentes o yemas axilares .....	27
4.11.3. Formación de brotes adventicios .....	28
4.12. Complicaciones en el cultivo <i>in vitro</i> .....	28
4.12.1. Complicaciones asociadas a especies leñosas .....	29
4.13. Antecedentes del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Jatropha curcas</i> .....	30
4.13.1. Regeneración vegetal directa .....	31
4.13.2. Regeneración vegetal indirecta.....	32

4.14. Fundamento del estudio.....	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
5.1. Lugar del experimento .....	34
5.2. Material vegetal.....	34
5.3. Preparación del material vegetal.....	34
5.4. Preparación de medios de cultivo .....	37
5.4.1. Preparación de sales basales.....	37
5.4.2. Preparación de compuestos orgánicos.....	38
5.4.3. Preparación de reguladores de crecimiento .....	38
5.5. Técnica de desinfección del material vegetal.....	40
5.6. Establecimiento aséptico de explantes .....	41
5.7. Inducción morfogénica en explantes cultivados <i>in vitro</i> .....	42
5.8. Efecto del NaClO sobre el comportamiento de la enzima PPO en explantes de hojas y peciolo.....	44
5.8.1. Preparación de muestras de PPO .....	44
5.8.2. Determinación de curva de reacción sustrato-enzima .....	45
5.8.3. Determinación de la actividad de PPO .....	46

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
6.1 Evaluación de viabilidad de explantes de hoja en medio de establecimiento .....	47
6.2 Evaluación de viabilidad de explantes de peciolo en medio de establecimiento.....	49
6.2.1. Relación peciolo-viabilidad .....	49
6.2.2. Relación viabilidad-genotipo .....	50
6.2.3. Relación viabilidad-PVP.....	51
6.2.4. Relación callo-genotipo.....	52
6.2.5. Efecto del PVP sobre la producción de callo. ....	54
6.3. Respuesta de explantes en medio de inducción .....	55
6.4. Efecto del NaClO sobre el comportamiento de la enzima PPO en explantes de hoja y peciolo .....	62
6.4.1. Curva de reacción sustrato-enzima .....	62
6.4.2. Actividad de la enzima PPO .....	63
7. CONCLUSIONES.....	66
8. RECOMENDACIONES .....	67
9. BIBLIOGRAFÍA .....	69

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Ubicación taxonómica de <i>Jatropha curcas</i> L. ....	8
2	Componentes de los medios basales Yasuda y MS.....	37
3	Preparación de soluciones madre de compuestos orgánicos (20x) ..	38
4	Disolución de reguladores de crecimiento y preparación de soluciones madre 20 mg / 20 ml.....	39
5	Factores de estudio en la etapa de inducción .....	43
6	Tratamientos de hipoclorito de sodio (NaClO) en explantes de hoja y peciolo de los genotipos INI-6 e INI-3 de <i>Jatropha curcas</i> L.....	44
7	Preparación de solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.1 M a 25 °C .....	45
8	Porcentaje de viabilidad de explantes y presencia de callo.....	51
9	Tabla de contingencia de explantes viables y prueba de ji-cuadrada entre genotipos.....	51
10	Tabla de contingencia de explantes viables y prueba de ji-cuadrada de tratamientos de PVP.....	52
11	Tabla de contingencia de explantes con callo y prueba de ji- cuadrada entre genotipos .....	53

12	Análisis de varianza y comparación de medias de peso fresco de callo entre genotipos en medio adicionado con 500 mg L <sup>-1</sup> de PVP..	55
13	Efecto del tratamiento de inducción sobre la respuesta del explante <i>in vitro</i> a ocho semanas de cultivo.....	57
14	Puntuación eficiente de Rao en análisis de regresión logística para factores de estudio y sus interacciones sobre la variable dicotómica presencia de callo a ocho semanas de cultivo <i>in vitro</i> .....	58
15	Análisis de regresión logística para variables significativas con base en el estadístico puntuación eficiente de Rao sobre la presencia de callo en tratamientos <i>in vitro</i> .....	59
16	Probabilidad estimada para la presencia de callo en los tratamientos de inducción.....	60
17	Probabilidad estimada para la presencia de callo según la combinación reguladores de crecimiento .....	61
18	Análisis de varianza de unidades de actividad enzimática de factores de estudio y sus interacciones.....	63
19	Unidades de actividad enzimática para el factor NaClO.....	64
20	Unidades de actividad enzimática para el factor explante.....	64
21	Unidades de actividad enzimática para el factor genotipo.....	65
22	Unidades de actividad enzimática para los tratamientos de NaClO en explantes de hoja y peciolo de los genotipos INI-6 e INI-3 de <i>Jatropha curcas</i> L. ....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Clasificación de factores ambientales <i>in vitro</i> que afectan el desarrollo y crecimiento de cultivos (Kozai y Kubota, 2005).....	16
2	Relación de auxina y citocinina típicamente requerida para el crecimiento y morfogénesis (George <i>et al.</i> , 2008a) .....	17
3	Estaca enraizada a 60 días de establecimiento .....	35
4	Estacas con respuesta en cámara bioclimática.....	36
5	Plantas madre en campo.....	36
6	Peciolos agrupados del primer al tercer nudo con respecto a la yema terminal .....	40
7	Unidades experimentales de peciolo en condiciones controladas.....	43
8	Explantos de hoja con presencia de oscurecimiento a siete días del establecimiento <i>in vitro</i> .....	48
9	Porcentajes de viabilidad con base en el posicionamiento de peciolos .....	49
10	Selección de explantes viables a siete días en cultivo <i>in vitro</i> .....	50
11	Explantos con producción de callo a los 15 días de cultivo <i>in vitro</i> en medio adicionado con 500 mg L <sup>-1</sup> de PVP .....	54

12	Diferentes expresiones morfogénicas de peciolo de <i>Jatropha curcas</i> en tratamientos de inducción .....	56
13	Incremento de la actividad relativa de PPO en función del tiempo de reacción .....	62

## RESUMEN

La especie *Jatropha curcas* L., comúnmente conocida en México como piñoncillo, es una planta productora de aceite que ha recibido gran atención en recientes años al utilizarse como fuente de energía por su gran potencial para la elaboración de biodiesel. Sin embargo, su introducción mundial como especie bioenergética se ha dado con diferentes grados de éxito debido al heterogéneo rendimiento de semillas y contenido de aceite como consecuencia de su amplia variabilidad genética. Esto ha impulsado la selección de genotipos elite, los cuales deben contar con un protocolo de propagación clonal por medio del cultivo de tejidos vegetales para acelerar el desarrollo de cultivares. La mayoría de los estudios morfogénicos se han hecho a partir de explantes de genotipos procedentes de la India, de modo que es necesario el estudio de los factores que afectan la morfogénesis en genotipos mexicanos, debido a la amplia variación genética.

Los objetivos del presente estudio fueron: i) evaluar la expresión morfogénica de explantes bajo diferentes niveles de reguladores de crecimiento (thidiazurón, 6-bencilaminopurina y ácido indol-3-butírico) en dos medios de cultivo (Yasuda y MS), ii) estudiar la respuesta de explantes por efecto de 500 mg L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP) en la etapa de establecimiento *in vitro* de dos genotipos de *Jatropha curcas* (INI-3 e INI-6), y iii) determinar el comportamiento de la enzima polifenol oxidasa



(PPO) en explantes de hoja y peciolo de dos genotipos de *Jatropha curcas* (INI-3 e INI-6) bajo la aplicación de hipoclorito de sodio (NaClO) al 3.24 % como agente desinfectante.

En la etapa de establecimiento *in vitro* se evaluó el efecto del PVP en explantes de hoja y peciolo de los genotipos INI-3 e INI-6 bajo un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial 2x2 con 90 repeticiones por tratamiento y un explante por unidad experimental, donde en el factor A fueron los genotipos (INI-3 e INI-6) y el factor B las dosis de PVP (control y 500 mg L<sup>-1</sup>). Las variables evaluadas en una prueba de ji-cuadrada fueron: viabilidad y presencia de callo, mientras que el peso de callo se evaluó por un análisis de varianza. En la etapa de inducción se analizaron los medios de cultivo Yasuda y MS más la interacción con diferentes dosis de thidiazurón (1.5 y 3.0 mg L<sup>-1</sup>), 6-bencilaminopurina (1.5 y 3.0 mg L<sup>-1</sup>), y (AIB) ácido indol-3-butírico (0.0, 0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup>) en explantes de peciolo del genotipo INI-6, bajo un DCA con arreglo factorial 2x2x2x3 con tres repeticiones, compuestas de dos explantes por unidad experimental, donde la variable presencia de callo fue evaluada en un análisis de regresión logística. La determinación de la actividad de PPO se realizó bajo un DCA con arreglo factorial 2X2X2 con tres repeticiones, donde en el factor A fueron las dosis de NaClO (control y 3.24 %), el factor B los tipos de explantes (hoja y peciolo) y el factor C los genotipos (INI-6 e INI-3).

Los resultados del establecimiento *in vitro* mostraron que únicamente el explante de peciolo fue viable al cultivo, revelando que los genotipos de estudio no presentan asociación con las frecuencias de explantes viables de acuerdo con las pruebas de ji-cuadrada. En esta misma etapa se encontró que la viabilidad de explantes varió

según la posición del peciolo con base en el ápice terminal, donde los explantes del segundo nudo presentaron la mayor viabilidad con base en una prueba de ji-cuadrada. Además, la adición de PVP aumentó la viabilidad de explantes de peciolo e indujo la proliferación de callo con una diferencia significativa en la producción de callo fresco entre genotipos según el análisis de varianza. En la etapa de inducción se encontró que los factores AIB y TDZ además de las interacciones “TDZ\*AIB” y “TDZ\*BAP\*AIB” están relacionadas significativamente con la presencia de callo y ningún tratamiento indujo el desarrollo de brotes a las ocho semana de cultivo *in vitro*. En la determinación de la actividad de PPO, se encontró que estadísticamente la aplicación de NaClO al 3.24 % causa el aumento en la actividad de PPO, además se descubrió diferencias estadísticas entre explantes y genotipos de estudio.

## ABSTRACT

Commonly known in Mexico as piñoncillo, *Jatropha curcas* L., is an oil-producing specie that has received much attention in recent years because of its use as an energy source for its great potential for the production of biodiesel. Nonetheless, its worldwide introduction has been seen with varying degrees of success due to the heterogeneous seed yield and oil content, as a result of its high genetic variability. This has prompted the selection of elite genotypes, which must have a cloning propagation protocol through the culture of plant tissue to accelerate the development of cultivars. Most of the morphogenic studies come from explants of Indian genotypes, therefore a study is necessary to determine the factors that affect organogenesis on Mexican genotypes due to wide genetic variation among genotypes.

The objectives of this study were: i) to evaluate the morphogenic capacity of explants under different levels of growth regulators (thidiazuron, 6-benzylaminopurine and indole-3-butyric acid) in two culture media (Yasuda and MS), ii) study the response of explants by effect of 500 mg L<sup>-1</sup> of polyvinylpyrrolidone (PVP) in the stage of establishment *in vitro* of two genotypes of *Jatropha curcas* (INI-3 and INI-6), and iii) determine the behavior of the enzyme polyphenol oxidase (PPO) in leaf and petiole

explants of two genotypes of *Jatropha curcas* (INI-3 and INI-6) under the application of sodium hypochlorite (NaClO) at 3.24 % as a disinfecting agent.

In the *in vitro* establishment stage, the effect of PVP was evaluated on leaf and petiole explants of genotypes INI-3 and INI-6, under a 2X2 factorial completely randomized design (DCA) with 90 replicates of one explant per experimental unit, where the factor A were genotypes (INI-3 and INI-6) and factor B were doses of PVP (control and 500 mg L<sup>-1</sup>). The variables evaluated by a chi-square test were viability and presence of callus while the weight of callus was evaluated by analysis of variance. In the induction stage, were analyzed the media MS and Yasuda plus the interaction with different doses of thidiazuron (1.5 and 3.0 mg L<sup>-1</sup>), 6-benzylaminopurine (1.5 and 3.0 mg L<sup>-1</sup>) and (AIB) indole-3-butyric acid (0.0, 0.5 and 1.0 mg L<sup>-1</sup>) on petiole explants of INI-6 genotype in a 2x2x2x3 factorial DCA with three repetitions, composed of two explants per experimental unit, where the variable presence of callus was evaluated by logistic regression analysis. The determination of PPO activity was performed under a DCA with factorial arrangement 2X2X2 with three replications, where the factor A were doses of NaClO (control and 3.24 %), factor B types of explants (leaf and petiole) and the factor C genotypes (INI-6 and INI-3).

The results of the *in vitro* establishment showed that only the petiole explant was viable to culture, revealing that the genotypes of study do not present association with the frequencies of viable explants according to chi-square tests. At this same stage, it was found that the viability of explants varied according to the petiole position from the terminal bud, where the second node explants showed the highest viability based

on a chi-square test. Furthermore, the addition of PVP increased petiole explant viability and induced callus proliferation with a significant difference in the production of fresh callus between genotypes by analysis of variance. In the induction stage was found that factors AIB and TDZ in addition to interactions "TDZ\*AIB" and "TDZ\*BAP\*AIB" are significantly related to the presence of callus and any treatment induced shoot development to eight weeks *in vitro* culture. In the determination of PPO activity, it was found that statistically the application of 3.24 % NaClO causes an increase in the PPO activity, in addition was found statistical differences between explants and genotypes studied.

## 1. INTRODUCCIÓN

La planta de *Jatropha curcas* L., comúnmente conocida en México como piñoncillo, es una especie perteneciente a la familia Euphorbiaceae que se puede encontrar en climas tropicales y subtropicales. Se considera que el centro de origen de la especie es México y Centroamérica donde se localiza en forma silvestre (Heller, 1996), y se distribuye mundialmente en América Latina, África y Asia (Francis *et al.*, 2005; Brittain y Litaladio, 2010). Es un arbusto grande o árbol pequeño de fácil propagación y rápido crecimiento que puede alcanzar más de cinco metros de altura en buenas condiciones (Divakara *et al.*, 2010). Entre los principales usos de la planta, encontramos su utilización como cerco vivo, tutor de otros cultivos, control de erosión, materia prima para elaboración de jabones y plaguicidas, y con fines medicinales (Brittain y Litaladio, 2010), donde sobresale su comprobada actividad antiviral contra cepas resistentes del VIH (Dahake *et al.*, 2012). Por otro lado, la producción de semillas, con contenidos de aceite que varían de 46 a 64 % (Martinez-Herrera *et al.*, 2010), ha recibido gran atención en recientes años por su gran potencial para la elaboración de biodiesel, que podría ayudar a amortiguar el problema de la contaminación ambiental, el agotamiento de reservas de combustibles fósiles y el incremento en los precios de los mismos (Ceasar y Ignacimuthu, 2011; De Filippis, 2014).

El cultivo de la especie alrededor del mundo se ha dado con diferentes grados de éxito debido al heterogéneo rendimiento de semillas y contenido de aceite, como consecuencia de su amplia variabilidad genética y en ciertos casos de bajos rendimientos económicos (Sujatha *et al.*, 2008). Esto ha impulsado la selección de genotipos superiores o genotipos elite, con mayor número de flores femeninas, precocidad, rendimiento de semilla y contenido de aceite; resistencia a plagas y enfermedades; tolerancia a sequía, porte bajo y alta ramificación lateral (Divakara *et al.*, 2010).

Bajo este criterio de genotipos elite, un protocolo de propagación clonal debe ser propuesto para superar la amplia variabilidad genética atribuida a la polinización cruzada de la especie (Ginwal *et al.*, 2005). La propagación clonal mediante el uso de estacas es posible, pero tiene múltiples desventajas como: menor rendimiento de semillas, menor longevidad, menor resistencia a plagas y enfermedades, débil anclaje al suelo y baja tolerancia a sequía debido al desarrollo de pseudoraíces (Sujatha *et al.*, 2005; Brittain y Litaladio, 2010; Mukherjee *et al.*, 2011; Tomar *et al.*, 2014).

Con base en lo anterior, el desarrollo de un protocolo de propagación clonal mediante el cultivo de tejidos es indispensable debido a que tiene alto potencial para producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (Sujatha *et al.*, 2005; Misra *et al.*, 2010a; Olmos *et al.*, 2010).

Para el cultivo *in vitro*, el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) es el más utilizado en estudios de regeneración de *Jatropha curcas*, porque induce y mejora la respuesta

de los tejidos (Ceasar y Ignacimuthu, 2011; Mukherjee *et al.*, 2011). En la inducción de la organogénesis directa a partir de explantes de hoja y peciolo, los reguladores de crecimiento más empleados son thidiazurón (TDZ), 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido indol-3-butírico (AIB). Deore y Johnson (2008) mencionaron que el medio MS adicionado con TDZ y BAP en combinación de AIB induce una alta frecuencia de regeneración de brotes adventicios en explantes de hoja sin la intervención de callo. En peciolos, Sujatha y Mukta (1996) señalaron la inducción de brotes mediante el uso de BAP en combinación de AIB. Asimismo, Kumar *et al.* (2011) reportaron que el TDZ induce una significativa respuesta de brotes adventicios directamente proporcional a la concentración de este regulador de crecimiento en medio de cultivo.

La organogénesis directa en *Jatropha curcas*, ha sido reportada en la literatura a partir de diferentes tipos de explantes: peciolos (Sujatha y Mukta, 1996; Kumar y Reddy, 2010), peciolos cotiledónares (Kumar *et al.*, 2010a; Kumar y Reddy, 2012), hipocótilos (Sujatha y Mukta, 1996; Sharma *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013), hojas (Sujatha y Mukta, 1996; Deore y Johnson, 2008; Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2010c; Misra *et al.*, 2010a; Sarkar *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013), cotiledones (Li *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2010b; Zhang *et al.*, 2013), epicótilos (Wei *et al.*, 2004), nudos axilares (Datta *et al.*, 2007; Shrivastava y Banerjee, 2008; Misra *et al.*, 2010b; Singh *et al.*, 2010), radículas (Zhang *et al.*, 2013) y ápices (Purkayastha *et al.*, 2010; Daud *et al.*, 2013). Por otro lado, la organogénesis indirecta se ha reportada poco en comparación con la organogénesis directa de *Jatropha curcas*. Existen reportes sobre la inducción de callo o regeneración indirecta en diferentes tipos de explante como: embriones inmaduros (Varshney y Johnson,



2010), cotiledones (Li *et al.*, 2012), hojas (Sujatha y Mukta, 1996; Rajore y Batra, 2007; Soomro y Memon, 2007; Misra *et al.*, 2010a), epicótilos (Wei *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012), peciolos (Sujatha y Mukta, 1996; Li *et al.*, 2012), hipocótilos (Sujatha y Mukta, 1996; Soomro y Memon, 2007; Li *et al.*, 2012). Sin embargo, la mayoría de estos estudios morfogénicos se han hecho a partir de genotipos de la India, de modo que es necesario el estudio de los factores que afectan la morfogénesis en genotipos mexicanos, debido a que se han encontrado amplias variaciones genéticas entre genotipos hindúes y mexicanos (Basha y Sujatha, 2007); además, el genotipo es uno de los principales factores que afectan la respuesta organogénica de *Jatropha curcas* (Kumar y Reddy, 2010; Mukherjee *et al.*, 2011; Kumar y Reddy, 2012).

## **2. HIPÓTESIS**

### **2.1. Hipótesis principal**

La combinación e interacción de los reguladores de crecimiento y medios de cultivo podrían presentar un efecto positivo sobre la capacidad morfogénica en explantes de *Jatropha curcas*.

### **2.2. Hipótesis secundarias**

1. La aplicación de 500 mg L<sup>-1</sup> PVP podría aumentar la viabilidad de explantes al establecimiento.
2. La aplicación de NaClO al 3.24 % como agente desinfectante podría afectar el comportamiento de la enzima PPO en explantes de hoja y peciolo de los genotipos de estudio.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo principal**

Evaluar la expresión morfogénica de explantes bajo diferentes niveles de reguladores de crecimiento (thidiazurón, 6-bencilaminopurina y ácido indol-3-butírico) en dos medios de cultivo (Yasuda y MS).

#### **3.2. Objetivos secundarios**

1. Estudiar la respuesta de explantes por efecto de 500 mg L<sup>-1</sup> de PVP en la etapa de establecimiento *in vitro* de dos genotipos de *Jatropha curcas* (INI-3 e INI-6).
2. Determinar el comportamiento de la enzima PPO en explantes de hoja y peciolo de dos genotipos de *Jatropha curcas* (INI-3 e INI-6) bajo la aplicación de NaClO al 3.24 % como agente desinfectante.

## **4. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **4.1. Aspectos generales del piñoncillo**

La clasificación de *Jatropha curcas* por primera ocasión fue realizada por el botánico sueco Carlos Linneo en 1753 (Heller, 1996; Brittain y Litaladio, 2010). Esta especie se sitúa dentro de la familia Euphorbiaceae, una de las más grandes familias, ocupando el sexto lugar en diversidad a nivel mundial (Steinmann, 2002). La clasificación taxonómica de *Jatropha curcas* se presenta en el Cuadro 1. El género *Jatropha* se compone de 170 especies, la mayoría nativas del continente Americano, en donde posiblemente se encuentra el centro de origen de *J. curcas*, debido a que muchos de los ecotipos de la especie, se encuentran en forma silvestre en México y Centro América al contrario de otras regiones como África y Asia, en donde solamente se encuentran de manera cultivada (Heller, 1996).

### **4.2. Descripción botánica de *Jatropha curcas* L.**

La planta de *Jatropha curcas* es un arbusto o árbol pequeño que puede alcanzar una altura de 5 metros en buenas condiciones de cultivo (Heller, 1996; Carels, 2009; Brittain y Litaladio, 2010). La especie demuestra tolerancia a sequía por lo que frecuentemente se desarrolla en áreas marginales con condiciones de baja precipitación y suelos pobres (Francis *et al.*, 2005). Además, presenta poco valor

maderable, al poseer ramas y tallos huecos con madera blanda, como otros miembros de la familia Euphorbiaceae (Brittaine y Lutaladio, 2010).

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

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

(Toral *et al.*, 2008)

#### 4.2.1. Hojas

La planta cuenta con hojas simples, con 5 a 7 lóbulos, lamina foliar que varía de 6 a 15 cm en longitud y amplitud, aunque el tamaño y forma de las mismas varía de una variedad a otra (Heller, 1996; Carels, 2009; Brittaine y Lutaladio, 2010). En el tallo, las hojas de color verde brillante se encuentran alternas con peciolos largos (Arruda *et al.*, 2004; Fresnedo-Ramírez, 2013), las cuales en épocas de sequía o invierno se desprenden, al ser esta especie del tipo caducifolio (Tomar *et al.*, 2014) aunque también se reporta como cultivo perennifolio con expresión de paraletargo (Fresnedo-Ramírez, 2013).

#### 4.2.2. Raíces

Las plántulas en general presentan una raíz central, cuatro laterales y abundantes raíces secundarias. En plantas propagadas vegetativamente no se presenta la raíz pivotante o principal (Heller, 1996; Carels, 2009; Brittain y Litaladio, 2010).

#### 4.2.3. Flores

La planta de *Jatropha curcas* presenta mayor proporción de flores unisexuales, siendo esta del tipo monoica, aunque en algunos casos se presentan flores hermafroditas (Dehgan y Webster, 1979; Tomar *et al.*, 2014). Por otro lado, en la floración se desarrolla menor número de flores femeninas que masculinas. Del mismo modo, las flores femeninas abundan en el ápice de la inflorescencia; en contraste con la parte baja, donde abundan las flores masculinas (Brittain y Litaladio, 2010).

Las inflorescencias son del tipo compuesto a manera de panícula (Carels, 2009), variando de 5 a 25 cm de longitud, estas nacen axilar o terminalmente, la mayoría presenta flores de ambos sexos (bisexuales), pero pueden ser unisexuales (Burger y Huft, 1995). Los pedúnculos que las componen exhiben una ligera presencia de pubescencia (puberulento) o la ausencia de la misma (glabro), la longitud y espesor de los mismos se encuentra en el rango de 1.5 a 10 cm y 0.8 a 2 mm, respectivamente. Las inflorescencias presentan brácteas lanceoladas sin glándulas marginales, con un rango de longitud de 2 a 5 mm y con ejes distales puberulentos (Burger y Huft, 1995).

Asimismo, las flores masculinas son de un color entre verde-amarillo y con una ligera fragancia (Luo *et al.*, 2007) se presentan en pedicelos con longitudes en un rango de 1 a 5 mm y sépalos de oblongos a obovados, ligeramente pubescentes, con longitud y espesor en un rango de 2.8 a 4.5 mm y 1.3 a 1.8 mm, respectivamente (Burger y Huft, 1995). De la misma forma, oblongo-obovados e imbrincados en el capullo, se presentan los pétalos con una longitud en el rango de 5 a 7.5 mm de largo (Burger y Huft, 1995) y sépalos alrededor de 5 mm de longitud (Luo *et al.*, 2007). Las flores poseen de 8 a 10 estambres en el androceo con una longitud de 3 a 7 mm y anteras de 1 a 2.2 mm de largo (Burger y Huft, 1995).

Por otro lado, las flores femeninas son similares en color y fragancia a flores masculinas (Luo *et al.*, 2007) y se presentan en pedicelos de 5 a 9 mm de largo, con sépalos de forma oblonga a lanceolada de aproximadamente de 2.5 mm de ancho, los pétalos de 7 a 9 mm de largo, llegan a ser recurvados en presencia del fruto (Burger y Huft, 1995). Cada flor presenta sépalos y pétalos no unidos, los sépalos lucen en forma de diamante sin dobleces, con una longitud de 3.6 a 6 mm de longitud y pétalos de 7 mm de longitud con un dobles hacia fuera de la flor (Luo *et al.*, 2007). El gineceo presenta tres estilos delgados y aproximadamente a dos tercios de su longitud, se encuentra el estigma bifurcado (Dehgan y Webster, 1979). El ovario mide aproximadamente 2.5 x 2 mm y presenta una columna estilar glabra de 0.5 mm de largo y ramificaciones del estilo de 1.5 a 2 mm de largo (Burger y Huft, 1995). Cada flor femenina presenta 3 óvulos (Luo *et al.*, 2007).

De la misma manera, las flores hermafroditas presentan muchas similitudes a flores femeninas en tamaño, forma, color y disposición de órganos reproductivos pero con

la presencia de un arreglo de 8 a 10 estambres de similar disposición a flores masculinas (Fresnedo-Ramírez, 2013).

#### **4.2.4. Frutos**

Son de forma elipsoidal trilobular de color verde, exocarpio carnoso hasta la madurez, donde se tornan amarillos y después oscuros (Heller, 1996; Brittain y Litaladio, 2010; Fresnedo-Ramírez, 2013; Tomar *et al.*, 2014). Cada inflorescencia produce alrededor de 10 o más frutos (Luo *et al.*, 2007; Tomar *et al.*, 2014), los cuales miden de 2.5 a 3 cm de largo y 2.2 a 2.5 cm de diámetro (Burger y Huft, 1995).

#### **4.2.5. Semillas**

Cada fruto presenta de dos a tres semillas negras de aproximadamente 2 cm de largo y 1 cm de diámetro con la presencia de una carúncula lobulada de 3 a 4 mm de ancho (Burger y Huft, 1995; Brittain y Litaladio, 2010). Asimismo, esta especie ha recibido gran atención en recientes años debido al alto contenido de aceite presente en sus semillas, el cual varía de 46 a 64 % en plantas de diferente región climática de México (Martinez-Herrera *et al.*, 2010).

### **4.3. Hábitos de crecimiento**

Esta especie presenta hábitos de crecimiento de un cultivo perenne con expresión de paraletargo, lo cual implica que la especie presenta la inhibición del crecimiento y desarrollo con el fin de conservar energía y asegurar su sobrevivencia en periodos críticos ambientales, como en invierno o temporadas de condiciones extremas tales



como ausencia de lluvia y oscilaciones extremas de temperatura (Fresnedo-Ramírez, 2013). La floración se presenta durante la temporada húmeda, en donde dos picos son vistos comúnmente en verano y otoño, aunque en regiones húmedas la floración ocurre a lo largo del año (Tomar *et al.*, 2014). La distribución de inflorescencias sobre la cubierta vegetal es mayor en áreas con gran exposición a luz solar (Fresnedo-Ramírez, 2013). Los árboles de *Jatropha curcas* pueden tener una vida útil de 30 a 50 años o más (Brittaine y Lutaladio, 2010). La germinación acontece cerca de los 10 días con un rápido crecimiento, igualmente en la brotación y enraizamiento de estacas (Heller, 1996; Brittaine y Lutaladio, 2010). En la temporada de lluvia, las plantas se ven marcadas por un fuerte crecimiento y desarrollo, al contrario de la temporada seca. Además, con buenas precipitaciones, las plantas en vivero dan frutos después de la primera temporada de lluvias, en contraste a las plantas sembradas directamente en suelo, que fructifican hasta la segunda temporada de lluvias (Heller, 1996; Brittaine y Lutaladio, 2010). Por otro lado, la utilización de propagación vegetativa provee un mayor rendimiento de semilla en la primera fructificación en comparación con plantas propagadas por semilla (Heller, 1996).

La especie prospera bien en regiones áridas y semiáridas con precipitaciones que rondan de 300 a 1000 mm; además, presenta un buen crecimiento en suelos calcáreos con un pH arriba de 8.5; sin embargo, su crecimiento es restringido a pH menor de 5.2 y suelos salinos (Tomar *et al.*, 2014).

#### 4.4. Origen

El centro de origen de *Jatropha curcas* aún no se sabe con exactitud (Toral et al., 2008), pero probablemente México y Centro América son centro de origen de la especie (Heller, 1996). Sin embargo, según Carels (2009) Sur América tropical es el centro de origen de *Jatropha curcas* basado en restos antiguos del género *Jatropha* encontrados por E.W. Berry (1929 citado por Carels, 2009) en formaciones geológicas en Perú.

#### 4.5. Importancia

La planta de *Jatropha curcas* cuenta con múltiples atributos y se utiliza ampliamente como: cerco vivo, tutor de otros cultivos, control de erosión, en la elaboración de jabones y plaguicidas; y con fines medicinales (Brittaine y Lutaladio, 2010) donde sobresale su comprobada actividad antiviral en contra de cepas resistentes del VIH (Dahake et al., 2012). Por otro lado, la producción de semillas con alto contenido de aceite que varían de 46 a 64 % (Martinez-Herrera et al., 2010), ha recibido gran atención en recientes años al ser una fuente de energía alterna por su gran potencial para la elaboración de biodiesel, que podría ayudar a amortiguar el grave problema de contaminación ambiental, el agotamiento de reservas de combustibles fósiles y el incremento en los precios de los mismos (Ceasar y Ignacimuthu, 2011). Por ello algunos gobiernos e instituciones consideran a *Jatropha curcas* como uno de los más prometedores sustitutos de los combustibles fósiles (Tomar et al., 2014). Además, gobiernos como la India han establecido políticas que proponen la utilización de mezclas de biocombustibles de hasta un 20 % para el año 2017 (Gahukar, 2009).

#### 4.6. Métodos de propagación tradicional

Las plantas puede reproducirse a través de dos ciclos de desarrollo: sexual y asexual. El desarrollo sexual se produce de la fusión de dos gametos haploides parentales para formar los embriones zigóticos con nuevas combinaciones de genes contenidos en semillas. El ciclo asexual o vegetativo se produce a través de la mitosis que mantiene copias exactas de la planta madre (George *et al.*, 2008b). En muchos cultivos agrícolas es sumamente importante el trabajar material vegetal clonal (George *et al.*, 2008b), tal es el caso del cultivo de *Jatropha curcas* en donde el suministro de material elite para siembra es uno de los problemas más críticos en los esfuerzos para transformar la especie en un cultivo viable (Jingura, 2012). La propagación tradicional de esta especie se compone del empleo de estacas o semillas para abastecer el suministro de material vegetal. Sin embargo, la propagación mediante el uso de estacas y semillas cuenta con múltiples inconvenientes. La propagación clonal mediante el empleo de estacas presenta desventajas como: menor rendimiento de semillas, menor longevidad, menor resistencia a plagas y enfermedades, débil anclaje al suelo y baja tolerancia a sequía debido al desarrollo de pseudoraíces (Sujatha *et al.*, 2005; Brittain y Litaladio, 2010; Mukherjee *et al.*, 2011; Tomar *et al.*, 2014). Por otro lado, la gran variabilidad genética atribuida a la polinización cruzada de la especie impide el eficiente uso de semillas como un método de propagación viable (Ginwal *et al.*, 2005).

Con base en lo anterior, el desarrollo de un protocolo de propagación clonal mediante el cultivo de tejidos es indispensable, debido a que tiene el potencial para producir plantas de calidad uniforme a escala comercial a partir de un genotipo

selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada (Sujatha *et al.*, 2005; Misra *et al.*, 2010a; Olmos *et al.*, 2010). Asimismo, el desarrollo de esta metodología permite implementar los avances de la biotecnología en el mejoramiento de especies vegetales (Peddaboina *et al.*, 2006; Singh y Tiwari, 2012).

#### **4.7. Propagación mediante cultivo de tejidos vegetales**

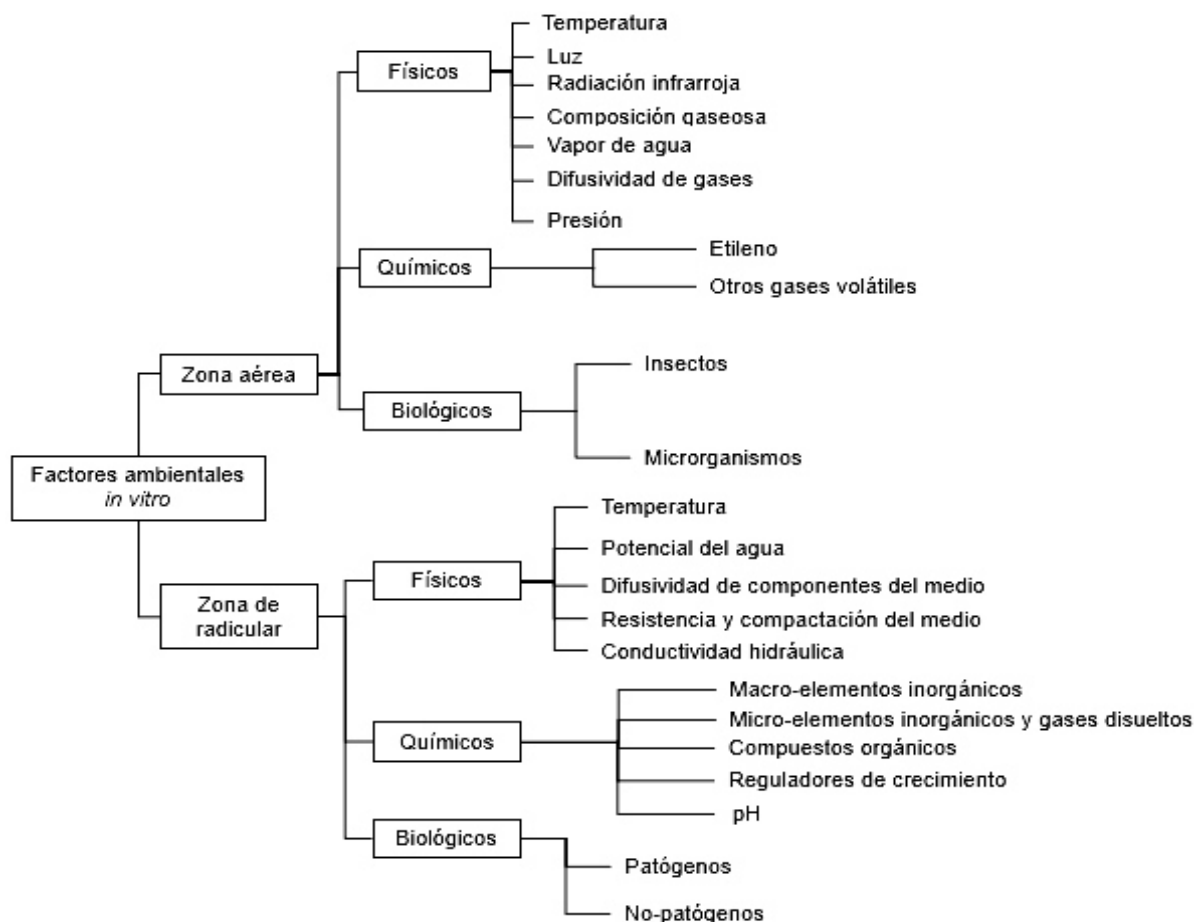
Una de las herramientas más esenciales de la biotecnología vegetal es el cultivo *in vitro* de plantas comúnmente llamado como cultivo de tejidos vegetales (De Filippis, 2014). Esta herramienta se utiliza principalmente en estudios celulares y con fines de propagación clonal (Yesil-Celiktas y Vardar-Sukan, 2013). La aplicación del cultivo de tejidos vegetales es un importante factor de algunos cultivos en donde la calidad del material vegetal de siembra es uno de los más importantes aspectos en la producción agrícola (De Filippis, 2014).

El cultivo de tejidos vegetales no es una ciencia, sino un conjunto de técnicas heterogéneas, que básicamente consiste en el cultivo aséptico de un explante *in vitro* sobre un medio cultivo conocido, bajo condiciones ambientales controladas. (Mroginski *et al.*, 2010; De Filippis, 2014). Este conjunto de técnicas *in vitro* es posible debido al principio de la totipotencia, que consiste en la cualidad de las células vegetales para diferenciarse en células especializadas presentes en tejidos y órganos con el fin de regenerar una planta entera (Iliev *et al.*, 2010). Este principio fue propuesto en 1912 por el botánico Gottlieb Haberlandt (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2012). En tiempos recientes se sabe poco sobre el proceso que controla la regeneración de una planta entera a partir de una célula somática individual (Vogel, 2005), motivo por el cual este enigma es considerado una de las 25 preguntas de lo

que no sabemos en una publicación de la revista Science (Kennedy y Norman, 2005).

#### 4.7.1. Factores que intervienen en el cultivo de tejidos vegetales

Son numerosos los factores que afectan el desarrollo y crecimiento de tejidos *in vitro*, pero en general los factores ambientales que se pueden controlar al mantener un tejido *in vitro* se dividen en dos principales que son la zona aérea y radicular, los cuales a su vez se dividen en factores físicos, químicos y biológicos, mismos que deben ser tomados en cuenta a la hora de plantear un experimento, para ser utilizados como factores de estudio (Figura 1).



**Figura 1.** Clasificación de factores ambientales *in vitro* que afectan el desarrollo y crecimiento de cultivos (Kozai y Kubota, 2005).

#### 4.7.2. Rutas morfogénicas del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

Las células somáticas del explante pueden regenerar embriones somáticos (embriogénesis) o brotes (organogénesis) a partir de estímulos en el cultivo *in vitro* (Verdeil *et al.*, 2007; Mroginski *et al.*, 2010; Olmos *et al.*, 2010; Radice, 2010).

Estos estímulos principalmente se componen de la relación entre los reguladores de crecimiento auxina-citocinina (Figura 2), que desencadenan la regeneración de diferentes vías morfogénicas (Skoog y Miller, 1957). Para aclarar lo anterior, una alta relación de auxina-citocinina produce la formación radicular, en cambio si la relación citocinina-auxina es alta se produce la formación de brotes, además las altas concentraciones de ambos reguladores promueven la formación de callo (Beyl, 2011b).



**Figura 2.** Relación de auxina y citocinina típicamente requerida para el crecimiento y morfogénesis (George *et al.*, 2008a).

Adicionalmente, al establecer un explante *in vitro* en condiciones adecuadas, es posible la formación de órganos de manera directa (organogénesis directa). En cambio, si se produce la formación de embriones somáticos, se conoce como embriogénesis directa. Otro posible escenario es la proliferación de células parenquimatosas en forma desordenada, conocido como callo. Este callo puede estimularse para la formación de órganos, lo que se conoce como organogénesis indirecta, o formación de embriones, lo que se denomina embriogénesis indirecta (Radice, 2010).

#### **4.8. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de tejidos vegetales es el mayor sistema experimental usado en ingeniería genética y estudios de regulación de crecimiento y desarrollo (Iliev *et al.*, 2010). Las múltiples aplicaciones con las que cuenta el cultivo de tejidos vegetales se pueden agrupar en: 1) estudios básicos, para experimentar procesos fisiológicos; 2) obtención de plantas con sanidad controlada, para producir plantas libres de virus; 3) micropropagación, con potencial para producir plantas de calidad uniforme a escala comercial; 4) rescate de híbridos derivados de cruces interespecíficos; 5) salvamento de semillas con embriones rudimentarios; 6) producción de plantas haploides; 7) inducción de variación somaclonal, con fines de mejoramiento genético; 8) extracción y conversión de sustancias útiles; 10) fusión de protoplastos; 11) conservación e intercambio de germoplasma; 12) establecimiento de suspensiones celulares (Mroginski *et al.*, 2010).

En el caso de la producción de plantas haploides, El-Hennawy *et al.* (2011) reportaron la producción de 94 líneas dobles haploides de trigo (*Triticum aestivum* L.) derivadas de las cruces F1, en donde algunas de estas líneas presentaron un adecuado desarrollo y superaron a sus respectivos progenitores y variedades de verificación. Por otro lado, Sánchez-Romero *et al.* (2007) reportaron el rescate *in vitro* de embriones inmaduros de aguacate (*Persea americana* Mill.) en diferentes estados de desarrollo. Este estudio fue realizado debido al grave problema de aborto prematuro de embriones lo que resulta en la disminución de la progenie híbrida viable en programas de mejoramiento de aguacate. Asimismo, Podwyszyńska y Sochacki (2010) describieron un nuevo método de micropropagación para Tulipán (*Tulipa* sp.) basado en ciclos de multiplicación de brotes, lo que permite la producción de plantas madre libres de virus, acelera el mejoramiento y proporciona nuevos genotipos para el mercado, además confirmaron la estabilidad genética usando marcadores moleculares dentro de 5 a 10 ciclos de multiplicación.

Por otro lado, un claro ejemplo de la utilidad de la variación somaclonal en programas de mejoramiento fue publicado por Jalaja *et al.* (2006) en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) con el desarrollo de la variedad Co 94012 producto del cultivo de callo de CoC 671. Esta variante somaclonal presentó mejor contenido de sacarosa y mejor resistencia a enfermedades. De similar importancia, una muestra del empleo de la fusión de protoplastos puede ser demostrado en lo publicado por Grosser *et al.* (1989) con la producción de híbridos somáticos de la fusión interespecífica de lima (*Citrus aurantifolia*) con naranja Valencia (*Citrus sinensis*), los



cuales resultaron ser extremadamente vigorosos y con una morfología intermedia a los progenitores.

Por otra parte, la superior producción de metabolitos secundarios *in vitro* fue reportado por Singh *et al.* (2014) en *Stevia rebaudiana* en donde se demostró que plantas regeneradas *in vitro* producen un 2 % más de esteviósido en comparación con plantas cultivadas en campo. De similar importancia, Wang *et al.* (2014) reportaron la producción de 17.64 mg g<sup>-1</sup> de rhaponticin en suspensión celular de *Rheum franzenbachii*, lo cual es 4.05 veces superior al contenido en raíces, lugar donde se produce la mayor cantidad del antioxidante en la planta. En cambio, la implementación de la crioconservación de germoplasma *in vitro* de *Vitis vinifera* se reportó por Wang *et al.* (2002) con la encapsulación de células embriogénicas y su posterior regeneración en plántulas.

#### **4.9. Micropropagación *in vitro***

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales cuentan con múltiples ventajas sobre los métodos de propagación tradicional, en donde la micropropagación es de importancia en programas de mejoramiento genético y propagación comercial de plantas (Iliev *et al.*, 2010; Olmos *et al.*, 2010). El éxito de la micropropagación a escala comercial necesita del claro entendimiento de dos factores igualmente complejos y dinámicos: la especie y el mercado (Suttle, 2011). La micropropagación se fundamenta en la propagación de plantas a partir del establecimiento de un explante en un medio de cultivo conocido y bajo un ambiente artificial adecuado y controlado (Olmos *et al.*, 2010). El uso más evidente de la micropropagación es conseguir un salto en el

crecimiento de especies en demanda debido a que la micropropagación puede reducir de 3 a 10 años el tiempo necesario para propagar masivamente nuevas selecciones y llevarlas al mercado (Suttle, 2011).

Dentro de las principales ventajas de la micropropagación sobre los métodos tradicionales de propagación clonal se encuentran: a) la producción de un gran número de plantas a partir de un genotipo selecto en un corto espacio y tiempo, b) necesidad de pequeñas piezas de tejido para iniciar el cultivo, c) la tasa de multiplicación es casi siempre mayor que los métodos de propagación convencional, d) puede aplicarse en genotipos en donde la propagación vegetativa es difícil o imposible, e) la multiplicación puede desarrollarse en cualquier época del año, f) los germoplasmas libres de virus pueden mantenerse a salvo de una reinfección y las plantas micropropagadas pueden exportarse sin problemas, g) las plantas *in vitro* se mantienen relativamente seguras de infestaciones de microorganismos, h) la producción *in vitro* puede ser mejor planeada debido al almacenaje de cultivos *in vitro* en bajas temperaturas en temporadas de baja demanda de mercado, i) en plantas micropropagadas se puede adquirir nuevos rasgos deseables del cultivo (Bhojwani y Dantu, 2013).

#### **4.10. Etapas de la micropropagación *in vitro***

La micropropagación se compone principalmente de cuatro etapas, que son: 1) establecimiento del cultivo *in vitro*, 2) desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de las plántulas (Suttle, 2011). Es importante considerar una etapa previa a las antes mencionadas, que consiste en la selección y preparación de planta madre y los explantes para el establecimiento,

conocida como etapa 0 (Bhojwani y Razdan, 1996; Olmos *et al.*, 2010). La formulación del medio de cultivo por etapa se puede describir de la siguiente manera: en la etapa 1 y 2 los medios de cultivo presentan altos niveles de sales, azúcar y citocininas; en la etapa 3 los medios presentan bajos niveles de sales, algunas veces de azúcar y citocininas pero altos de auxinas (Suttle, 2011). En contraste con las demás etapas, la etapa 4 no utiliza medio de cultivo en sí, en cambio utiliza la irrigación de soluciones nutritivas ricas en fósforo para promover el enraizamiento de plántulas (Bhojwani y Dantu, 2013).

#### **4.10.1. Etapa 0: Preparación de material vegetal**

Esta etapa comprende todas las medidas necesarias para mejorar parámetros de calidad de la planta madre, entre estos, el estatus higiénico y fisiológico principalmente; las medidas tomadas comprenden desde la manipulación de parámetros de luz y temperatura ambiental del cultivo hasta la aplicación de diferentes compuestos químicos, buscando influenciar la respuesta y sanidad de explantes en cultivo *in vitro* (Bhojwani y Dantu, 2013). Según Suttle (2011) uno de los más simples e importantes puntos en esta etapa es el correcto etiquetado de plantas madre debido a que es común que sucedan errores.

Son diversos los factores que inciden sobre la respuesta del explante *in vitro*, entre ellos, los principales son la correcta elección y preparación del explante. Según Olmos *et al.* (2010), los factores más importantes que inciden sobre la calidad del explante son el tipo de órgano como explante, edad ontogénica y fisiológica del mismo, temporada de colecta del material vegetal, tamaño y estado sanitario general

de la planta donante. Lo cual implica, que en esta etapa, la selección de un genotipo superior que cumpla con las características deseables es fundamental, seguido de la elección del tipo de órgano o tejido como explante de estudio, siempre teniendo en cuenta que los órganos jóvenes o rejuvenecidos tienen una respuesta superior.

En cuanto al control de la contaminación, es conveniente la elección de explantes expuestos a bajos niveles de vitropatógenos, un método eficaz es la utilización de material vegetal procedente de plantas en invernadero, con base en que es posible el control de los factores que afectan el estado sanitario y la calidad de explantes (Olmos *et al.*, 2010; Bhojwani y Dantu, 2013). Debergh y Maene (1985) señalan que el resultado de la preparación higiénica de plantas madre, es el incremento en la tasa de sobrevivencia de explantes; además, ocasiona que el material vegetal sea más limpio, de tal manera que necesita de una desinfección más débil y como consecuencia disminuye los problemas de oscurecimiento en tejidos.

#### **4.10.2. Etapa 1: Establecimiento del cultivo *in vitro***

Según Olmos *et al.* (2010), un cultivo viable y axénico es el objetivo principal de esta etapa, lo cual es posible mediante la preparación adecuada del material que nos confiere un explante de calidad al cultivo. Aunque idealmente el objetivo de esta etapa debería ser un cultivo “axénico”, que significa libre de toda contaminación biológica, esto resulta sumamente difícil de corroborar, por lo tanto el término “aséptico”, que significa libre de contaminación detectable, es más comúnmente usado (Cassells, 2011). El éxito en esta etapa depende de procesos como la

selección, desinfección y prevención de reacciones de hipersensibilidad (oscurecimiento) de explantes (Olmos *et al.*, 2010; Bhojwani y Dantu, 2013).

La obtención de un cultivo viable y aséptico implica trabajar con los controles preventivos y curativos. El control preventivo se compone del empleo de métodos de verificación de patógenos en los explantes, por lo cual se debe elegir material vegetal de especies vigorosas sin signos de enfermedades o patógenos (Cassells, 2011). En cuanto al control curativo, las plantas enfermas pueden tratarse con técnicas para la eliminación de patógenos como la termoterapia, la quimioterapia o a través de la aplicación de antibióticos, desinfectantes, antivirales o el cultivo de meristemas (Olmos *et al.*, 2010; Cassells, 2011).

Uno de los métodos para el control de contaminación microbiana más empleado en cultivo de tejidos vegetales consiste en la inmersión de explantes en una solución acuosa de etanol al 70 % seguido de la inmersión en una solución acuosa de hipoclorito de sodio (NaClO) adicionado con un agente humectante (Mroginski *et al.*, 2010; Cassells, 2011).

En muchos de los casos, la contaminación se presenta después de la desinfección debido a la presencia de patógenos endógenos, los cuales pueden ser controlados con la aplicación de bacteriostáticos o antibióticos en el medio de cultivo (Olmos *et al.*, 2010; Cassells, 2011).

#### **4.10.3. Etapa 2: Multiplicación**

La etapa de multiplicación principalmente se compone de dos fases: inducción y multiplicación. La fase de inducción implica la desdiferenciación del explante

mediante concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento, principalmente auxinas. La fase de multiplicación emplea un balance adecuado de reguladores de crecimiento para producir la diferenciación y multiplicación celular (Olmos *et al.*, 2010). Por otro lado, en la embriogénesis somática se suma una tercera y cuarta fase, denominadas maduración y germinación. Es importante señalar que si el objetivo de la micropropagación es la propagación clonal en masa, es conveniente evitar la regeneración vegetal a partir de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal (Bhojwani y Dantu, 2013). Los propagadores deben monitorear la calidad de plantas y usar estrategias para limitar el número y tiempo de subcultivos para reducir la presencia de plantas quimeras (Suttle, 2011). Los tipos, dosis y combinaciones de reguladores de crecimiento pueden variar entre especies e incluso genotipos, por lo cual, es sumamente importante su estandarización en esta etapa (Olmos *et al.*, 2010). El principal objetivo de esta etapa es conseguir el mayor número de brotes mediante subcultivos sucesivos y llevar la mayoría de brotes a la siguiente etapa, lo cual puede llevarse a cabo mediante la vía directa o indirecta de la morfogénesis (Olmos *et al.*, 2010). Generalmente los brotes son subcultivados cada 2-8 semanas a medio nuevo hasta alcanzar la cantidad necesaria de brotes (Iliev *et al.*, 2010; Suttle, 2011).

#### **4.10.4. Etapa 3: Enraizamiento**

El principal objetivo de esta etapa es la producción de raíces adventicias en brotes y la sobrevivencia de estos a la aclimatación mediante la regulación gradual de temperatura y humedad relativa. El enraizamiento puede realizarse de manera *in vitro* o *ex vitro*, en el enraizamiento *in vitro* se emplean diferentes substratos y

reguladores de crecimiento (auxinas principalmente) para inducir la rizogénesis, entre los substratos se encuentran: medio solidificado con agar u otro agente gelificante, perlita, turba (peat moss) o vermiculita humedecidos con agua o medio nutritivo. En caso de usar medio semisólido es común realizar diluciones del mismo y reducción de la sacarosa a 1 o 2 %. Bajo condiciones *ex vitro*, el enraizamiento y la aclimatación son simultáneos y utilizan diferentes substratos estériles (Olmos *et al.*, 2010). La principal ventaja del enraizamiento *ex vitro* es la menor probabilidad de daño radicular en comparación con explantes *in vitro* (Iliev *et al.*, 2010).

#### **4.10.5. Etapa 4: Aclimatación**

Para llevar a cabo la aclimatación se debe contar con instalaciones de invernadero o cámaras de crecimiento que regulen la temperatura y humedad relativa de una manera que permita normalizar la transpiración acelerada de las plántulas (Olmos *et al.*, 2010), debido a que las plantas transferidas de condiciones *in vitro* a *ex vitro* deben someterse a una gradual modificación de la anatomía y morfología de la hoja y estructura estomatal (Iliev *et al.*, 2010). De acuerdo con Suttle (2011) el proceso de aclimatación toma de 3 días hasta 6 semanas dependiendo de la especie, el clima y si el material fue enraizado *in vitro*; además, la fertilización no se recomienda hasta que las plantas se establezcan y presenten crecimiento.

#### **4.11. Métodos de micropropagación *in vitro***

Los métodos de micropropagación varían de acuerdo con el tipo explante utilizado u origen de órgano regenerado, entre estas técnicas se encuentran el cultivo de ápices, yemas axilares y meristemos, así como la formación de brotes adventicios y

embriones somáticos. Además, dependiendo de las características de la planta que se pretenda propagar y del objetivo perseguido, la micropropagación puede realizarse a través de tres vías: regeneración a partir de callo (organogénesis o embriogénesis), brotación de yemas preexistentes (yemas axilares) (Bhojwani y Dantu, 2013) y la formación de brotes adventicios o embriones somáticos a partir del explante (Olmos *et al.*, 2010). El principal método utilizado en la micropropagación de plantas leñosas es la brotación de yemas axilares aunque la proliferación de brotes adventicios se puede realizar en algunas especies (Suttle, 2011).

#### **4.11.1. Regeneración de órganos vegetales a partir de callo**

La gran mayoría de las células vegetales son capaces de formar callo bajo condiciones de cultivo adecuadas y a su vez este conjunto de células puede inducirse a la formación de plantas mediante la vía organogénica o embriogénica (Bhojwani y Dantu, 2013). En la micropropagación por vías indirectas se corre el riesgo de variación genética entre plantas regeneradas, sin embargo las diferencias entre plantas derivadas de callo o suspensión celular son de interés en programas de mejoramiento vegetal como nuevas fuentes de variabilidad genética (George *et al.*, 2008b).

#### **4.11.2. Brotación de yemas preexistentes o yemas axilares**

El dominio en la capacidad de crecimiento del ápice, fenómeno comúnmente conocido como dominancia apical, es la principal razón de que las yemas presentes en las axilas de las hojas comúnmente permanezcan aletargadas (Bhojwani y Dantu, 2013). Esta supresión en el crecimiento puede superarse con la remoción de



meristemas apicales o con la aplicación de reguladores de crecimiento, particularmente citocininas, debido a que ambos métodos estimulan el crecimiento axilar (Bhojwani y Dantu, 2013). La brotación de yemas axilares es un método normalmente utilizado en la propagación clonal mediante estacas; sin embargo, este proceso es lento y limitado al número de estacas que pueden obtenerse de la planta madre (Bhojwani y Dantu, 2013). Por otro lado, la brotación de yemas axilares en la propagación clonal *in vitro* ha sido exitosamente utilizada, incluso llegando a ser uno de los métodos de micropropagación comercial más utilizados (Bhojwani y Dantu, 2013).

#### **4.11.3. Formación de brotes adventicios**

El cultivo de tejidos vegetales impulsa la regeneración *de novo* de brotes adventicios, a partir de vástagos, raíces o explantes de hoja bajo la influencia de reguladores de crecimiento exógenos (Beyl, 2011b). De igual manera es posible el desarrollo de brotes adventicios a partir de callo formado en las superficies seccionadas del explante, por lo cual, la variación somaclonal es posible en este tipo de regeneración (Iliev *et al.*, 2010).

#### **4.12. Complicaciones en el cultivo *in vitro***

Dos de los principales problemas que enfrenta el cultivo de tejidos vegetales son la contaminación microbiana y oxidación fenólica del explante (Hernández y González, 2010). La oxidación fenólica en el cultivo de tejidos es causada por la acción de la enzima polifenol oxidasa (PPO) que se libera o sintetiza cuando los tejidos sufren lesiones (Azofeifa, 2009), como los realizados en la extirpación y desinfección del

explante, donde ambas prácticas son un factor sumamente importante sobre el oscurecimiento, y por lo tanto en la tasa de supervivencia de los explantes (Tabiyeh *et al.*, 2006; Chien-Ying *et al.*, 2009). La enzima PPO es la principal causa del oscurecimiento en tejidos de *Jatropha curcas* debido a que esta enzima cataliza la reacción entre variados compuestos fenólicos y oxígeno molecular para producir quinonas (He *et al.*, 2009). Estas moléculas producto de la acción del PPO son altamente reactivas con una variedad de nucleófilos proteicos produciendo pigmentos oscuros conocidos como polímeros de melanina (Steffens *et al.*, 1994; Li y Steffens, 2002), las cuales pueden inhibir el crecimiento e incluso causar la muerte celular de explantes.

En especies leñosas, particularmente angiospermas, los explantes de tejidos jóvenes regularmente secretan polifenoles oxidados al medio del cultivo, visibles como pigmentos marrones o negros. En explantes obtenidos de árboles adultos el problema aumenta, por ello es recomendable usar explantes de partes juveniles (Hernández y González, 2010).

#### **4.12.1. Complicaciones asociadas a especies leñosas**

Dentro de las principales complicaciones que limitan el éxito de la micropropagación de especies leñosas encontramos la falta de totipotencia en explantes, protocolos de regeneración irreproducibles, liberación de exudados polifenólicos, bajas tasas de crecimiento y altas tasas de contaminación (De Filippis, 2014). Por otro lado, la dificultad de multiplicar material adulto es mucho mayor comparado con el juvenil, debido a que las especies leñosas son altamente recalcitrantes (Hernández y

González, 2010). Sin embargo, existen dos métodos para obtener explantes de mayor capacidad regenerativa: seleccionando los tejidos más juveniles dentro de un árbol (Olmos *et al.*, 2010) e induciendo el rejuvenecimiento del árbol donante antes de aislar los explantes (Aftab y Preece, 2007; Ewald, 2007). La expresión celular de la totipotencia es influenciada por factores como el grado de diferenciación y especialización de las células, así como el impacto de un tejido en la expresión génica sobre el tejido adyacente (Gahan, 2007). Además, otros factores que afectan la capacidad de una célula para formar un brote o embrión somático con el fin de producir una planta completa, son: a) si el tejido presenta competencia y b) si este es recalcitrante (Gahan, 2007). Aunque para Christianson y Warnick (1985) estos pueden dividirse en tres etapas: adquisición de la competencia, inducción y diferenciación morfogénica.

Existen dos formas de lograr el rejuvenecimiento: 1) mediante el empleo de estacas enraizadas de árboles adultos y 2) recurriendo al rejuvenecimiento de partes adultas mediante la iniciación de yemas adventicias o embriones (nuevo ciclo ontogénico), injerto de yemas adultas sobre pies juveniles, el tratamientos con reguladores de crecimiento (citocininas como el BA), por la poda severa y, a través del cultivo *in vitro* de meristemas (Olmos *et al.*, 2010).

#### **4.13. Antecedentes del cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas***

El cultivo *in vitro* aprovecha la flexibilidad de células vegetales en función de la competencia inherente o inducida para regenerar plantas y clasifica los sistemas de regeneración como directa o indirecta en donde casi todos los tipos de explantes se

utilizan en ambos sistemas de regeneración (Mukherjee *et al.*, 2011). La propagación *in vitro* de *Jatropha curcas* se ha reportado por varios autores usando diferentes tejidos como explantes, presentando variaciones en las concentraciones de reguladores de crecimiento dependiendo del genotipo y explante utilizado (Ceasar y Ignacimuthu, 2011). Para el cultivo *in vitro*, el medio Murashige Skoog (MS) es el más utilizado en estudios de regeneración de *Jatropha curcas*, debido a que induce y mejora la respuesta de los tejidos (Ceasar y Ignacimuthu, 2011; Mukherjee, Varshney *et al.*, 2011).

#### **4.13.1. Regeneración vegetal directa**

Son múltiples las ventajas que presenta un sistema de regeneración directa en comparación con un sistema que implica la organogénesis indirecta mediante callo. Cabe mencionar que la regeneración de plantas a partir de la organogénesis directa muestra mayor estabilidad genética en comparación con plantas producidas mediante la organogénesis indirecta (D'Amato, 1975; Mukherjee *et al.*, 2011). La regeneración de *Jatropha curcas* por medio de la organogénesis directa se ha reportado en la literatura a partir de diferentes tipos de explantes: peciolos (Sujatha y Mukta, 1996; Kumar y Reddy, 2010), peciolos cotiledónares (Kumar *et al.*, 2010a; Kumar y Reddy, 2012), hipocótilos (Sujatha y Mukta, 1996; Sharma *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013), hojas (Sujatha y Mukta, 1996; Deore y Johnson, 2008; Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2010c; Misra *et al.*, 2010a; Sarkar *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013), cotiledones (Li *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2010b; Zhang *et al.*, 2013), epicótilos (Wei *et al.*, 2004), nudos axilares (Datta *et al.*, 2007; Shrivastava y Banerjee, 2008; Misra *et al.*, 2010b; Singh *et al.*, 2010), radículas

(Zhang *et al.*, 2013) y ápices (Purkayastha *et al.*, 2010; Daud *et al.*, 2013). En la inducción de la organogénesis directa a partir de explantes de hoja y peciolo, los reguladores de crecimiento más empleados son TDZ, BAP y AIB. Deore y Johnson (2008) mencionaron que el medio MS adicionado con TDZ y BAP en combinación con AIB induce una alta frecuencia de regeneración de brotes adventicios en explantes de hoja sin la intervención de callo. En peciolos, Sujatha y Mukta (1996) mencionaron la inducción de brotes mediante el uso de BAP en combinación de AIB. Asimismo, Kumar *et al.* (2011) informaron que el TDZ induce una significativa respuesta de brotes adventicios directamente proporcional a la concentración de este regulador de crecimiento en el medio de cultivo.

#### **4.13.2. Regeneración vegetal indirecta**

En la regeneración indirecta de *Jatropha curcas* se precisa de una fase intermediaria de callo. Este sistema de regeneración se ha reportado poco en *Jatropha curcas* en comparación con la organogénesis directa. Se han realizado reportes sobre la inducción de callo o regeneración indirecta en embriones inmaduros (Varshney y Johnson, 2010), cotiledones (Li *et al.*, 2012), hojas (Sujatha y Mukta, 1996; Rajore y Batra, 2007; Soomro y Memon, 2007; Misra *et al.*, 2010a), epicótilos (Wei *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012), peciolos (Sujatha y Mukta, 1996; Li *et al.*, 2012), hipocótilos (Sujatha y Mukta, 1996; Soomro y Memon, 2007; Li *et al.*, 2012). Por otro lado, Soomro y Memon (2007) publicaron el establecimiento de un cultivo de rápido crecimiento de callo y células en suspensión a largo plazo en un periodo de dos años sin cambios aparentes en las tasas de crecimiento. Li *et al.* (2012) reportaron un sistema de inducción, producción de callo y regeneración vegetal en epicótilos,

hipocótilos, peciolo y cotiledones de plántulas de *Jatropha curcas* donde el mejor medio de cultivo para la inducción de callo fue el suplementado con 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético (ANA) y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de kinetina (KIN). Asimismo, el mejor medio de cultivo para la regeneración *in vitro* fue el adicionado con una concentración de 1 mg L<sup>-1</sup> de TDZ y KIN, además de 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIB.

#### **4.14. Fundamento del estudio**

Los estudios de la morfogénesis *in vitro* de *Jatropha curcas* en su mayoría se han realizado a partir de explantes de genotipos de la India, de modo que es necesario el estudio de los factores que afectan la morfogénesis en genotipos mexicanos, debido a que se han encontrado amplias variaciones genéticas entre genotipos hindúes y mexicanos (Basha y Sujatha, 2007); además, que el genotipo es uno de los principales factores que afectan la respuesta la organogénica de *Jatropha curcas* (Kumar y Reddy, 2010; Mukherjee *et al.*, 2011; Kumar y Reddy, 2012).

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Lugar del experimento**

La presente investigación se realizó en el periodo de julio de 2012 a diciembre de 2013, en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía, unidad Marín de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Ubicado en la carretera Zuazua-Marín Km 17.5 del municipio de Marín, Nuevo León, México.

### **5.2. Material vegetal**

El material vegetal utilizado en los experimentos constó de árboles adultos en producción de *J. curcas* de los genotipos INI-6 e INI-3, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Rosario Izapa (CERI), km 18 de la carretera Tapachula a Cacahoatán, 30870 Tuxtla Chico, Chiapas, México.

### **5.3. Preparación del material vegetal**

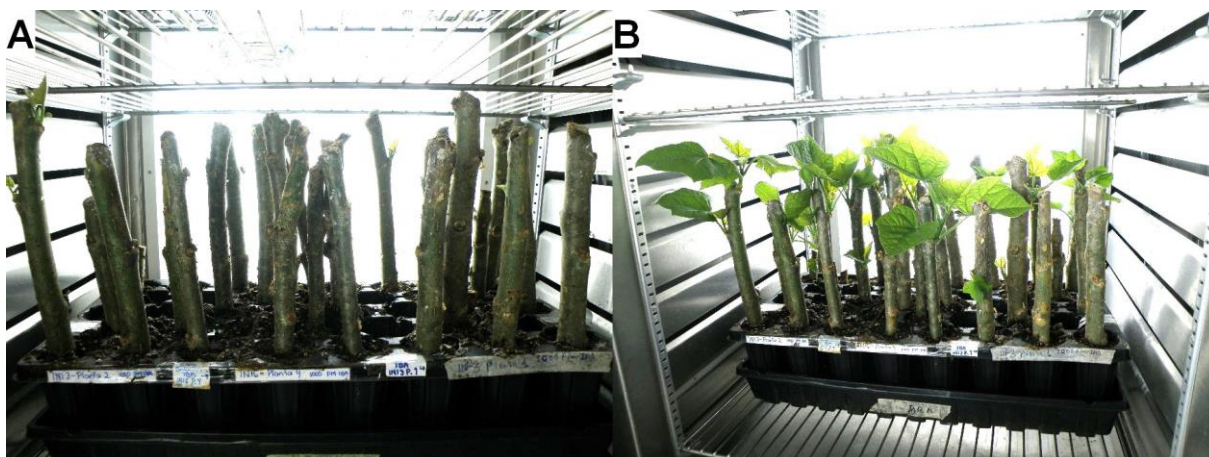
En esta etapa, el material vegetal se multiplico mediante estacas tratadas en una solución compuesta de 1000 mg L<sup>-1</sup> de AIB e impregnadas con Raizal 400, para después establecerse en cajas de propagación con turba (peat moss). Las estacas se mantuvieron en una cámara bioclimática a 26 °C con 70 % de humedad y un fotoperiodo de 12 horas luz. Se realizaron riegos de auxilio solamente para mantener

la humedad del sustrato. Con este método de propagación tradicional se obtuvo un 80 % de estacas enraizadas a los 60 días del establecimiento (Figura 3 y 4). Por otro lado, se realizó la aplicación de una solución acuosa compuesta de 10 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.1 % de Tween-20 a estacas enraizadas en campo con el fin de estimular la brotación de yemas laterales y aumentar el material experimental de plantas madre (Figura 5). El método anterior es comúnmente utilizado en el CERI para inducir la brotación. Además el BAP es el regulador de crecimiento más utilizado en la formación del dosel de árboles de vivero (Bubán, 2000).



**Figura 3.** Estaca enraizada a 60 días de establecimiento.





**Figura 4.** Estacas con respuesta en cámara bioclimática. A) 15 días del tratamiento. B) 40 días del tratamiento.



**Figura 5.** Plantas madre en campo. A) Tres meses de establecimiento en campo. B) Ocho meses de establecimiento en campo.

## 5.4. Preparación de medios de cultivo

### 5.4.1. Preparación de sales basales

Los medios basales Yasuda (Yasuda *et al.*, 1985) y MS (Murashige y Skoog, 1962) se prepararon con base en lo recomendado por Beyl (2011a), separando y disolviendo los compuestos en nitratos, sulfatos, halogenuros, compuestos de fósforo, boro y molibdeno (PBMo) y solución de quelatos de hierro como NaFeEDTA (Cuadro 2). Este procedimiento se llevó a cabo con el fin de mantener biodisponibles los nutrientes evitando la precipitación de las sales básicas.

**Cuadro 2.** Componentes de los medios basales Yasuda y MS.

Grupo	Componente	Cantidad (mg L <sup>-1</sup> )	
		MS	Yasuda*
Nitratos	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	412.5
	KNO <sub>3</sub>	1900	475
Sulfatos	MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	370	92.5
	MnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	16.9	6.83
	ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	8.6	4.3
	CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0.025	0.05
Halogenuros	CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	440	110
	KI	0.83	---
	CoCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	0.025	----
PBMo	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	85
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	3.1
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0.25	0.125
NaFeEDTA	Na <sub>2</sub> -EDTA	37.26	37.26
	FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8

\* El medio Yasuda fue adicionado con la solución de quelatos de hierro del medio MS.

### 5.4.2. Preparación de compuestos orgánicos

Los compuestos orgánicos para los medios de cultivo Yasuda y MS se prepararon en soluciones madre (Cuadro 3), mediante la disolución de compuestos por separado, con el fin de mezclar estos en una única solución de 20 ml. La adición de compuestos orgánicos a medios de cultivos, se realizó agregando 1.0 ml de solución madre en su medio respectivo, además de la incorporación del compuesto mio-inositol a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  en cada medio de cultivo.

**Cuadro 3.** Preparación de soluciones madre de compuestos orgánicos (20x).

Compuesto	Cantidad (mg)	
	MS	Yasuda
Glicina	40	----
Ácido Nicotínico	10	20
Piridoxina-HCl	10	20
Tiamina-HCl	1	200

Nota. Las cantidades mencionadas en cada columna deben disolverse en agua destilada y aforarse a 20 ml. Para la preparación de un litro de medio de cultivo debe ser usado 1.0 ml de alguna de las dos soluciones según sea el caso.

### 5.4.3. Preparación de reguladores de crecimiento

La preparación de los reguladores de crecimiento se realizó de la siguiente manera: primero se efectuó el pesaje del regulador de crecimiento, enseguida se realizó la disolución por medio de solvente (Cuadro 4) y finalmente se ejecutó el aforo para obtener la concentración deseada. En el caso del regulador de crecimiento TDZ se

realizó la solución madre utilizando como solvente del KOH porque según Huetteman y Preece (1993) el KOH no produce la degradación de este regulador de crecimiento. En comparación, la utilización del NaOH como solvente puede degradar hasta la mitad del regulador de crecimiento (Volkert Sjut, Schering AG Germany, comunicación personal citada por Huetteman y Preece, 1993). Por otro lado, como experiencia personal la utilización de dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente para TDZ en diluyentes agua y etanol, presentó la precipitación de este regulador de crecimiento en ambos casos.

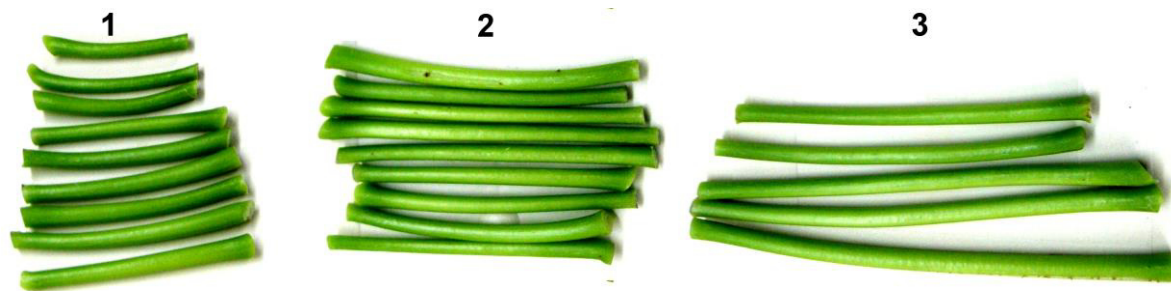
**Cuadro 4.** Disolución de reguladores de crecimiento y preparación de soluciones madre 20 mg / 20 ml.

Regulador de crecimiento	Solvente	Diluyente	Cantidad (mg)
BA	1N NaOH	AGUA	20
AIB	1N NaOH	AGUA	20
TDZ	1N KOH	AGUA	20

Una vez adicionadas las sales básicas, compuestos orgánicos y reguladores de crecimiento; los medios de cultivo se suplementaron con 6.0 g L<sup>-1</sup> de Phytigel como agente gelificante y se ajustaron con 1N KOH o HCl a un pH de 5.80 ± 0.02. Por último, se efectuó la esterilización del medio de cultivo a 1.2 kg cm<sup>-2</sup> de presión y 121 °C durante 20 min. Este procedimiento se realizó en todos los medios de cultivo de las etapas estudiadas.

### 5.5. Técnica de desinfección del material vegetal

La pre-desinfección consistió en seleccionar como material vegetal, peciolo y hojas del primer al tercer nudo en sentido basípeto (Figura 6) de árboles adultos (INI-6 e INI-3) en óptimas condiciones, tratados tres y seis días antes de la siembra con una solución fungicida-bactericida compuesta por Amistar (azoxistrobin 50 %) a 300 mg L<sup>-1</sup>, Bavistin (carbendazim 50 %) a 300 mg L<sup>-1</sup> y Novobacter (oxitetraciclina 5 %) a 300 mg L<sup>-1</sup>. El material vegetal colectado se lavó en jabón líquido y agua potable para transferirse a una solución antioxidante compuesta de 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico y 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico por 30 minutos, seguido por una inmersión en fungicida-bactericida compuesto por Amistar a 1 g L<sup>-1</sup>, Bavistin a 1 g L<sup>-1</sup>, Novobacter a 1 g L<sup>-1</sup> por 30 minutos y por último se efectuó un enjuague con agua bidestilada. La desinfección se realizó en una campana de flujo laminar mediante la inmersión de explantes en etanol al 70 % por 30 segundos, seguido de la inmersión por 5 min en NaClO al 3.24 % adicionado con 0.1 % de tween-20. Una vez concluido el tratamiento se realizaron cinco enjuagues con agua bidestilada estéril.



**Figura 6.** Peciolo agrupados del primer al tercer nudo con respecto a la yema terminal.

## 5.6. Establecimiento aséptico de explantes

Para la siembra se utilizaron secciones de 1 cm<sup>2</sup> para hoja y 1.5 cm de longitud para peciolo, las hojas se establecieron con el envés en contacto del medio y los peciolos de manera horizontal al mismo. Ambos explantes se establecieron en medio basal MS más 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 25 mg L<sup>-1</sup> de glutatión reducido, 20 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 25 mg L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>, 3.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP y con o sin la adición de 500 mg L<sup>-1</sup> de polivinilpirrolidona (PVP). Al medio basal se adicionaron 25 mg L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub> con base en lo publicado por Khurana-Kaul *et al.* (2010) quienes mencionaron que la adición de este compuesto mejoró la eficiencia de regeneración y disminuyó el tiempo de desdiferenciación en explantes de hoja de *Jatropha curcas*. Concluida la siembra, las unidades experimentales se incubaron en condiciones controladas a 26 ± 2 °C en oscuridad por 15 días. Este experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x2 con 90 repeticiones por tratamiento y un explante por frasco (55 mm x 40 mm) como unidad experimental, donde en el factor A fueron los genotipos (INI-3 e INI-6) y el factor B las dosis de PVP (control y 500 mg L<sup>-1</sup>). Las diferencias estadísticas entre explantes viables fueron analizadas mediante una comparación múltiple de proporciones, la cual equivale a una comparación múltiple de medias por Tukey en un análisis de varianza de una vía (Zar, 2010). Las variables evaluadas en la etapa de establecimiento fueron: porcentaje de viabilidad de explantes, presencia de callo y peso fresco de callo. Los porcentajes de viabilidad y presencia de callo, fueron calculados después de 15 días del establecimiento a partir de las frecuencias de explantes viables y con la presencia de callo. El peso fresco de callo fue evaluado a los 15 días de

establecimiento. Se consideró a simple vista como viable cualquier explante con menos de 1/3 del tejido con la presencia de oscurecimiento y viceversa para explantes no viables. Las variables cualitativas y dicotómicas: viabilidad de explantes y presencia de callo se evaluaron mediante una prueba de ji-cuadrada, mientras que la variable cuantitativa peso fresco de callo se evaluó con un análisis de varianza. Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 20.

### **5.7. Inducción morfogénica en explantes cultivados *in vitro***

Los explantes viables sin presencia de callo (tratamiento sin PVP) del genotipo INI-6 se subcultivaron en los medios basales Yasuda y MS suplementados con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 25 mg L<sup>-1</sup> de glutatión reducido, 20 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico y 25 mg L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>; además de diferentes concentraciones de TDZ (1.5 y 3.0 mg L<sup>-1</sup>), BAP (1.5 y 3.0 mg L<sup>-1</sup>) y AIB (0, 0.5 y 1.0 mg L<sup>-1</sup>). Los explantes se incubaron a una temperatura de 26 ± 2 °C bajo un fotoperiodo de 16 horas luz con lámparas fluorescentes a una intensidad de 35-40 μmol m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> (Figura 7).

En esta etapa se estableció un segundo experimento bajo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x2x2x3 (Cuadro 5), con un total de 24 tratamientos con tres repeticiones, la unidad experimental consistió en frascos de vidrio (66 mm x 59 mm) con 15 ml de medio de cultivo conteniendo dos explantes por repetición. La variable cualitativa, presencia de callo se evaluó a través de un análisis de regresión logística después de ocho semanas *in vitro* del cultivo, con el objetivo de encontrar

significancia estadística asociada entre los factores de estudio y esta variable. Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico SPSS versión 20.



**Figura 7.** Unidades experimentales de peciolo en condiciones controladas.

**Cuadro 5.** Factores de estudio en la etapa de inducción.

Niveles	Factor A: Medio de cultivo	Factor B: TDZ (mg L <sup>-1</sup> )	Factor C: BAP (mg L <sup>-1</sup> )	Factor D: AIB (mg L <sup>-1</sup> )
1	Yasuda	1.5	1.5	0
2	MS	3.0	3.0	0.5
3	----	----	----	1.0



## 5.8. Efecto del NaClO sobre el comportamiento de la enzima PPO en explantes de hoja y peciolo

Con la finalidad de determinar el comportamiento de la enzima PPO en la aplicación de NaClO como agente desinfectante, se utilizaron ocho tratamientos con tres repeticiones, bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2X2X2, donde en el factor A fueron las dosis de NaClO (control y 3.24 %), el factor B los tipos de explantes (hoja y peciolo) y el factor C los genotipos INI-6 e INI-3 (Cuadro 6). En todos los tratamientos se realizó la inmersión de explantes en etanol al 70 % por 30 segundos. A la solución de NaClO se adicionó con 0.1 % de tween-20, seguido del tratamiento de desinfección se realizaron tres enjuagues con agua estéril y por último, se incubaron los tejidos vegetales en agua por una hora.

**Cuadro 6.** Tratamientos de hipoclorito de sodio (NaClO) en explantes de hoja y peciolo de los genotipos INI-6 e INI-3 de *Jatropha curcas* L.

NaClO	INI-6		INI-3	
	Peciolo	Hoja	Peciolo	Hoja
3.24 %	T1	T2	T3	T4
Control	T5	T6	T7	T8

La solución de hipoclorito de sodio fue preparada a partir de Cloralex®, el cual tiene una concentración de 5.4 % de NaClO (Cárdenas-Bahena *et al.*, 2012).

### 5.8.1. Preparación de muestras de PPO

Los extractos enzimáticos se prepararon a partir de 1.0 g de hoja o peciolo del tercer nudo después de su tratamiento (Cuadro 6), los cuales se trituraron en mortero con

12.5 ml de solución amortiguadora de fosfato potasio 0.1 M, pH 7 (Cuadro 7) y se centrifugaron a 10, 000 rpm por 15 min a 4 °C. Por último se extrajo el sobrenadante para ser utilizado en los ensayos enzimáticos.

**Cuadro 7.** Preparación de solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.1 M a 25 °C.

pH de solución	Solución 1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ml)	Solución 1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (ml)
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.5
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	9.2
8.0	94.0	6.0

Nota. Mezclar las cantidades mencionadas por columna según pH y aforar a un 1 L con agua destilada.

### 5.8.2. Determinación de curva de reacción sustrato-enzima

Se determinó el aumento en la absorbancia con base en el sustrato ácido gálico mediante espectrofotometría a 420 nm, después de incubar las muestras en los tiempos: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 y 120 min a 35 °C, con el fin de encontrar el punto en el cual la absorbancia se vuelve una constante. La mezcla de reacción consistió en 1.7 ml de solución amortiguadora de fosfato potásico (0.1 M, pH 7), 0.5 ml de solución enzimática y 0.5 ml de sustrato (ácido gálico 1 mM).

### **5.8.3. Determinación de la actividad de PPO**

Finalmente la actividad enzimática se determinó por espectrofotometría a 420 nm después de incubar las muestras a 35 °C por 120 min. Se realizaron controles en donde el extracto enzimático o sustrato se remplazaron por el buffer. La unidad de actividad enzimática (UE) se definió como la cantidad de enzima que causa la variación en la absorbancia de 0.001 a los 120 min de reacción.

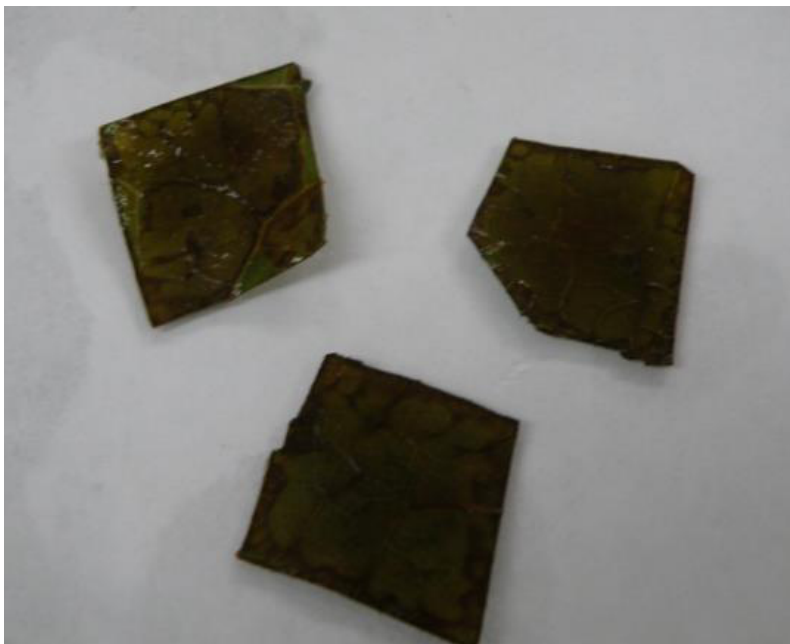
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Evaluación de viabilidad de explantes de hoja en medio de establecimiento

Los explantes de hoja mostraron un oscurecimiento total en sus tejidos, lo que impidió su utilización en la etapa de inducción (Figura 8). Este hecho propició la necesidad de determinar la actividad de PPO en explantes de hoja y peciolo (punto 6.4) en donde se demostró, que los explantes de hoja presentaron mayor actividad de PPO en comparación con peciolos; específicamente el tratamiento de hojas con NaClO al 3.24 % presentó la mayor actividad de PPO, lo que explica la alta frecuencia de oscurecimiento en este tipo de explante; por lo tanto la enzima PPO juega un papel esencial en la inducción de oscurecimiento de *Jatropha curcas* (He *et al.* 2009).

De la misma manera, Tomar *et al.* (2014) publicaron que las hojas presentaron uno de los más altos contenidos de fenoles totales en *Jatropha curcas*, lo cual es un factor correlacionado con el oscurecimiento. Por su parte, Leng *et al.* (2009) mostraron que las hojas de pistacho (*Pistacia vera* L.) presentan altos contenidos de fenoles totales en comparación con semillas y brotes. En este mismo estudio Leng *et al.* (2009) reportaron una correlación positiva entre el oscurecimiento de explantes y el contenido de fenoles en pistacho. Por otro lado, Misra *et al.* (2010b) mencionaron

que el cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas* a largo plazo se dificulta debido al oscurecimiento de tejidos, lo cual es un grave problema en esta especie.



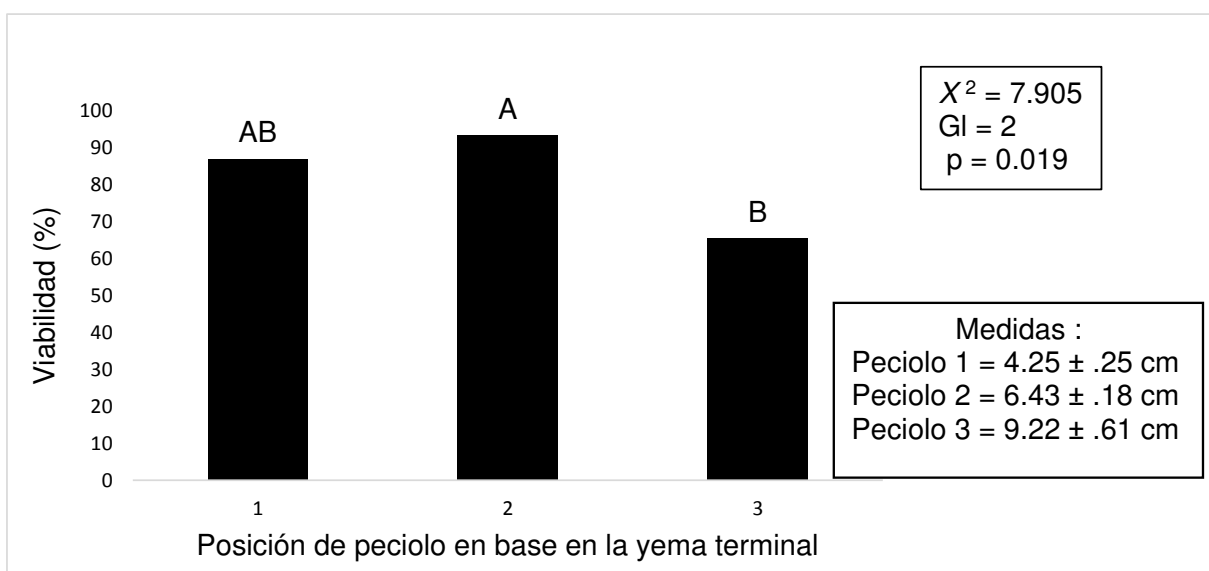
**Figura 8.** Explantes de hoja con presencia de oscurecimiento a siete días del establecimiento *in vitro*.

La utilización de plantas madre expuestas a altos niveles lumínicos genera altas tasas de fenoles totales y de oxidación. Esto se demostró por Mole *et al.* (1988), quienes reportaron que el incremento en la intensidad lumínica produce un incremento en los niveles de fenoles totales en plantas de *Acacia pennata*, *Cynometra leonensis*, *Diospyros thomasii* y *Trema guineensis*. En igual forma, Chien-Ying *et al.* (2009) mencionaron que la intensidad lumínica afecta significativamente la inducción de fenoles afectando la tasa de sobrevivencia de explantes debido a que en baja luminosidad (500 lux), las tasas de sobrevivencia varían de 89.2 a 100 % y en alta luminosidad (1000 lux) de 44.4 a 55.5 %.

## 6.2. Evaluación de viabilidad de explantes de peciolo en medio de establecimiento

### 6.2.1. Relación peciolo-viabilidad

Las frecuencias de explantes viables variaron en los tres tipos de peciolo de estudio, presentando una relación de dependencia en el análisis de ji-cuadrada, por lo cual se realizó una comparación múltiple de proporciones, que expresó dos conjuntos; uno compuesto por el segundo y primer nudo, presentando el peciolo del segundo nudo la mayor proporción de explantes viables con un 93.33 %, seguido del primer nudo con 86.95 %. El otro conjunto estuvo formado por el primer y tercer nudo, donde este último presentó el porcentaje más bajo de viabilidad con 65.38 % (Figura 9).



**Figura 9.** Porcentajes de viabilidad con base en el posicionamiento de peciolo. Letras diferentes muestran diferencias estadísticas entre porcentajes ( $p=0.05$ ) basado en una comparación múltiple de proporciones. Las medidas se presentan con media  $\pm$  error estándar.

Estos resultados son similares a los publicados por Misra *et al.* (2010a) en donde los explantes de hojas provenientes del segundo nudo presentaron el mayor porcentaje de respuesta al cultivo *in vitro*. Por otro lado, Zhang *et al.* (2013) reportaron un descenso gradual en el número de brotes por explante, porcentaje de inducción y elongación de brotes, conforme aumentó la edad de hoja.

### 6.2.2. Relación viabilidad-genotipo

Con base en la selección de explantes viables (Figura 10) se encontró que en esta etapa, el porcentaje de viabilidad de explantes presentó una diferencia entre genotipos (Cuadro 8), mostrando un mayor porcentaje el genotipo INI-6 en los tratamientos: control con 40.2 % y PVP (500 mg L<sup>-1</sup>) con 82.3 %; en comparación con el genotipo INI-3 con 30.4 y 70.9 %, respectivamente, por lo cual se realizó una tabla de contingencia con una prueba de ji-cuadrada para determinar si la viabilidad es independiente de los genotipos de estudio (Cuadro 9), donde se encontró que las variables estudiadas son independientes, por lo cual no hay una relación significativa entre el porcentaje de viabilidad y los genotipos de estudio.



**Figura 10.** Selección de explantes viables a siete días en cultivo *in vitro*.

**Cuadro 8.** Porcentaje de viabilidad de explantes y presencia de callo.

PVP	Viabilidad (%)		Presencia de callo (%)	
	Genotipos		Genotipos	
	INI-6	INI-3	INI-6	INI-3
Control	40.2	30.4	0	0
500 mg L <sup>-1</sup>	82.3	70.9	50.6	70.9

**Cuadro 9.** Tabla de contingencia de explantes viables y prueba de ji-cuadrada entre genotipos.

Genotipo	Viable		
	NO	SI	Total
INI-3	89	89	178
INI-6	69	102	171
Total	158	191	349
Prueba de ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	3.277		
GL	1		
SIG.	.070		

Resultados similares fueron publicados por Chien-Ying *et al.* (2009) en fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) donde la sobrevivencia de explantes de distintos cultivares no presentó diferencias estadísticas dentro de tratamientos. Por otro lado, la contaminación presentó bajos porcentajes, en donde el genotipo INI-3 mostró el mayor porcentaje de contaminación con un 13.7 % en comparación con el genotipo INI-6 con un 8.7%.

### 6.2.3. Relación viabilidad-PVP

Los porcentajes de viabilidad presentaron mayores valores en el tratamiento adicionado con PVP en comparación con el tratamiento control (Cuadro 8), por lo cual se realizó una tabla de contingencia con una prueba de ji-cuadrada para determinar si existe relación entre la viabilidad y la adición del compuesto PVP



(Cuadro 10). El resultado fue una relación altamente significativa entre las variables ( $P \leq 0.01$ ), lo que demostró que la adición de PVP al medio de cultivo favorece las frecuencias de explantes viables. Según Hohtola (1988) la adición de PVP reduce el oscurecimiento causado por la acumulación de compuestos fenólicos en *Pinus sylvestris* L. Resultados similares se encontraron por Hosni (2001) quien utilizó el 0.05 % ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) de PVP en medio de cultivo controlando el oscurecimiento oxidativo y permitiendo la exitosa propagación *in vitro* de *Strelitzia reginae*. Asimismo, de Medeiros Rapôso (2012) observó un aumento de hasta un 36 % en la tasa de supervivencia de explantes de castaña de Brasil (*Bertholletia excelsa* HBK) en un tratamiento con  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de PVP.

**Cuadro 10.** Tabla de contingencia de explantes viables y prueba de ji-cuadrada de tratamientos de PVP.

PVP	Viable		
	NO	SI	Total
Control	119	65	184
500 mg L <sup>-1</sup>	39	126	165
Total	158	191	349
Prueba de ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	59.129		
GL	1		
SIG.	.000		

#### 6.2.4. Relación callo-genotipo

La incorporación del compuesto PVP al medio de establecimiento indujo la proliferación de callo en explantes de ambos genotipos de estudio, al contrario del tratamiento control (Cuadro 8). La presencia de callo blanco fue evidente a los siete días de cultivo en las áreas de corte de peciolos. Lo cual, concuerda con lo publicado

por Reustle y Natter (1994) quienes muestran que la aplicación de PVP al inicio del cultivo es esencial para la formación de microcallo en protoplastos de vid (*Vitis sp*). Por otro lado, las frecuencias de explantes con presencia de callo difieren entre los genotipos de estudio, dando como resultado un porcentaje mayor de inducción de callo en el genotipo INI-3 (70.9 %) a diferencia del genotipo INI-6 (50.6 %), debido a esto se realizó una tabla de contingencia con una prueba de ji-cuadrada para comprobar la relación entre genotipos y la presencia de callo en explantes, resultando una relación altamente significativa ( $P \leq 0.01$ ) entre los mismos (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Tabla de contingencia de explantes con callo y prueba de ji-cuadrada entre genotipos.

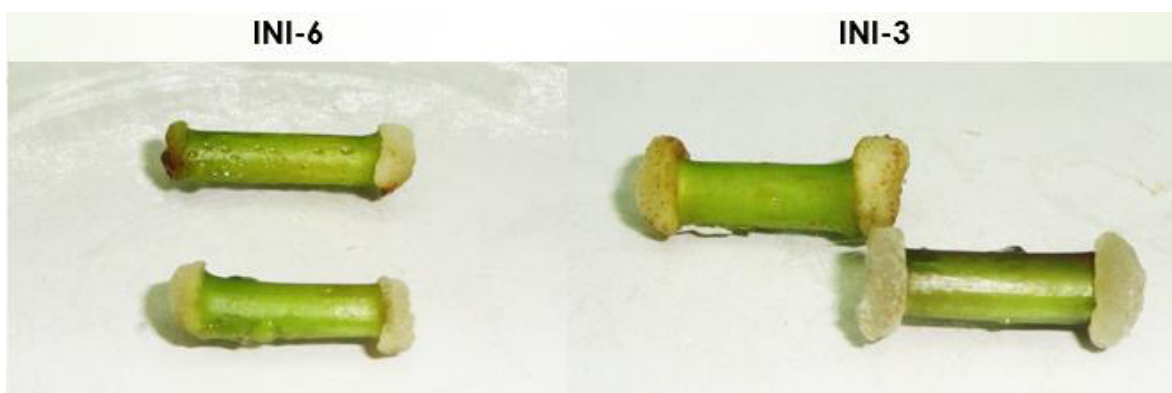
Genotipo	Presencia de callo		
	NO	SI	Total
INI-3	25	61	86
INI-6	39	40	79
Total	64	101	165
Prueba de ji-cuadrada			
Ji-cuadrada	7.145		
GL	1		
SIG.	.008		

Resultados similares fueron publicados por Kumar y Reddy (2010, 2012) en peciolos normales y cotiledónares, en donde muestran diferencias en el porcentaje de inducción de brotes entre genotipos. Por otro lado, Sujatha y Mukta (1996) demostraron la gran capacidad regenerativa de callo de peciolos expuestos a una

amplia gama de combinaciones de reguladores de crecimiento en comparación con explantes de hipocótilos

### 6.2.5. Efecto del PVP sobre la producción de callo

La producción de callo expresó diferente respuesta entre los genotipos de estudio a los 15 días de cultivo en medio de establecimiento con PVP (Figura 11). El peso fresco de callo fue mayor en el genotipo INI-3 (90.3 mg) en comparación con el genotipo INI-6 (39.4 mg), por lo cual se procedió a realizar un análisis de varianza encontrando diferencia significativa ( $P \leq 0.01$ ) entre genotipos (Cuadro 12).



**Figura 11.** Explantes con producción de callo a los 15 días de cultivo *in vitro* en medio adicionado con 500 mg L<sup>-1</sup> de PVP.

Estos resultados indican que tanto la presencia como la producción de callo fresco en *Jatropha curcas* son altamente influenciados por el genotipo, lo cual concuerda con Basha y Sujatha (2007) quienes mencionaron que la dependencia genotípica es uno de los mayores factores que afectan la regeneración de *Jatropha curcas*. Así mismo, la dependencia genotípica sobre el crecimiento celular *in vitro* de *Jatropha*

*curcas* fue documentada por Vendrame y Pinares (2013) usando genotipos de la India, Brasil y Tanzania; mientras que Myers *et al.* (2013) utilizaron genotipos de la India, Brasil y México. Por otro lado, la presencia de callo es frecuentemente asociada con la variación somaclonal (Singh y Chikara, 2013), lo cual puede ser exitosamente utilizado en programas de mejoramiento debido a que la variación genética es una condición esencial para el establecimiento de un programa de mejoramiento genético (Bhering *et al.*, 2013).

**Cuadro 12.** Análisis de varianza y comparación de medias de peso fresco de callo entre genotipos en medio adicionado con 500 mg L<sup>-1</sup> de PVP.

Fuente	Gl	CM	F	Sig.
Genotipos	1	9050.029	48.485	.000
Error	12	186.657		
Total	13			

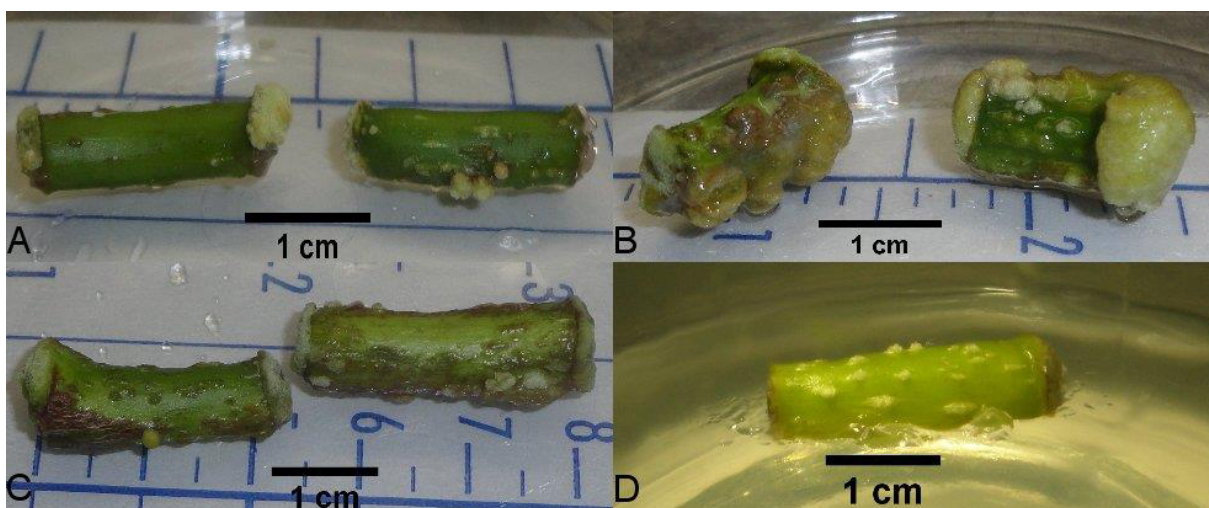
Comparación de medias	
Genotipo	Media de peso fresco (mg) **
INI-3	90.3 ± 5.4 a
INI-6	39.4 ± 4.8 b

\*\* Diferencia altamente significativa a 1 %, el peso fresco de callo por explante se presenta como media ± error estándar.

### 6.3. Respuesta de explantes en medio de inducción

En esta etapa solamente fue posible evaluar el genotipo INI-6 debido a que el genotipo INI-3 expresó la contaminación de sus explantes a una semana del subcultivo en medio de inducción. Los explantes asépticos del genotipo INI-6

manifestaron una apariencia hinchada y en algunos tratamientos se presentó el desarrollo de callo (Cuadro 13). Por otro lado, no se presentó el desarrollo de brotes, únicamente se alcanzó a observar el desarrollo de protuberancias en explantes a ocho semanas de cultivo *in vitro* (Figura 12).



**Figura 12.** Diferentes expresiones morfológicas de peciolo de *Jatropha curcas* en tratamientos de inducción. A) Tratamiento 22 con la presencia de callo blanco a ocho semanas de cultivo. B) Tratamiento 24 con la presencia de callo y protuberancias a ocho semanas de cultivo. C) Tratamiento 18 con la presencia de callo y protuberancias a ocho semanas de cultivo. D) Tratamiento dos con la presencia de callo a seis semanas de cultivo.

Con base en la variable dicotómica presencia de callo, se realizó un análisis de regresión logística con un fin exploratorio de los factores de estudio y sus interacciones en donde en función del estadístico puntuación eficiente de Rao (puntuación) se encontró significancia estadística para los factores AIB y TDZ además de las interacciones “TDZ\*AIB” y “TDZ\*BAP\*AIB” (Cuadro 14).

**Cuadro 13.** Efecto del tratamiento de inducción sobre la respuesta del explante *in vitro* a ocho semanas de cultivo.

Tratamiento	Factores de estudio				INI-6
	Medio	TDZ (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	AIB (mg L <sup>-1</sup> )	Presencia de callo (%)
1	MS	1.5	1.5	0	0
2	MS	1.5	3	0.5	33.3
3	MS	1.5	1.5	1	33.3
4	MS	1.5	3	0	0
5	MS	1.5	1.5	0.5	0
6	MS	1.5	3	1	0
7	MS	3	1.5	0	0
8	MS	3	3	0.5	33.3
9	MS	3	1.5	1	33.3
10	MS	3	3	0	0
11	MS	3	1.5	0.5	33.3
12	MS	3	3	1	0
13	YASUDA	1.5	1.5	0	0
14	YASUDA	1.5	3	0.5	33.3
15	YASUDA	1.5	1.5	1	0
16	YASUDA	1.5	3	0	0
17	YASUDA	1.5	1.5	0.5	0
18	YASUDA	1.5	3	1	0
19	YASUDA	3	1.5	0	0
20	YASUDA	3	3	0.5	0
21	YASUDA	3	1.5	1	100
22	YASUDA	3	3	0	0
23	YASUDA	3	1.5	0.5	100
24	YASUDA	3	3	1	100

El paso anterior se realizó debido a que según Menard (2002) se sugiere utilizar el método de selección “paso a paso” (stepwise) en regresión con un fin exploratorio o

de predicción pura, debido a que este método tiene desventajas como la posible exclusión de variables con efectos supresores.

**Cuadro 14.** Puntuación eficiente de Rao en análisis de regresión logística para factores de estudio y sus interacciones sobre la variable dicotómica presencia de callo a ocho semanas de cultivo *in vitro*.

Variables	Puntuación	GL	SIG.
Medio	3.192	1	.074
TDZ	5.675	1	.017
BAP	.355	1	.551
AIB	6.517	1	.011
Medio * TDZ	2.612	1	.106
Medio * BAP	2.612	1	.106
Medio * AIB	.608	1	.436
TDZ * BAP	.915	1	.339
TDZ * AIB	13.370	1	.000
BAP * AIB	3.747	1	.053
Medio * TDZ * BAP	2.173	1	.140
Medio * TDZ * AIB	.714	1	.398
Medio * BAP * AIB	.714	1	.398
TDZ * BAP * AIB	8.384	1	.004
Medio * TDZ * BAP * AIB	.714	1	.389

Hipótesis nula = El coeficiente de regresión logística para la variable es cero.

Con base en el análisis anterior se incluyeron las cuatro variables significativas en el modelo de regresión logística principal donde la variable AIB\*TDZ continua siendo la

más sobresaliente dentro del modelo con base en el estadístico de Wald (Cuadro 15). Es necesario mencionar que aunque las variables no son significativas en conjunto dentro del modelo con base en el estadístico de Wald, las estimaciones del modelo se ajustan a un nivel aceptable con base en la prueba de Hosmer y Lemeshow. Asimismo, la prueba de Omnibus sobre los coeficientes del modelo demostró que estos son estadísticamente diferente de cero, es importante mencionar que esta prueba es equivalente a la prueba de F del análisis de varianza que se utiliza para evaluar los modelos regresión lineal (Cuadro 15).

**Cuadro 15.** Análisis de regresión logística para variables significativas con base en el estadístico puntuación eficiente de Rao sobre la presencia de callo en tratamientos *in vitro*.

Variables	Coeficiente	Error estándar	Wald	GL	SIG.	Exp(B)
AIB	-.536	3.363	.025	1	.873	.585
TDZ	.400	.983	.165	1	.684	1.491
AIB*TDZ	1.498	1.422	1.109	1	.292	4.472
AIB*TDZ*BAP	-.173	.229	.573	1	.449	.841
Constante	-3.655	2.543	2.065	1	.151	.026
Prueba	$\chi^2$	GL	SIG.			
Omnibus	14.736	4	.005			
Hosmer y Lemeshow	14.177	8	0.077			

Cabe mencionar que las  $R^2$  de Nagelkerke y Cox & Snell fueron de 0.185 y 0.295 respectivamente aunque es necesario resaltar que el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) no debe utilizarse sistemáticamente como medida de bondad de ajuste, especialmente en la regresión no lineal (Onofri *et al.*, 2010). Con base en los



coeficientes y la intercepción del análisis de regresión logística para variables significativas se formuló la ecuación para el cálculo de la probabilidad de presencia de callo por tratamiento (Cuadro 16).

**Cuadro 16.** Probabilidad estimada para la presencia de callo en los tratamientos de inducción.

Tratamiento	AIB B <sub>1</sub> : -.536	TDZ B <sub>2</sub> : .400	AIB*TDZ B <sub>3</sub> : 1.498	AIB*BAP*TDZ B <sub>4</sub> : -.173	Constante B <sub>0</sub> : -3.655	Probabilidad estimada para presencia de callo <sup>¶</sup>
1	0	1.5	0	0	-3.655	.045
2	0.5	1.5	0.75	2.25	-3.655	.070
3	1	1.5	1.5	2.25	-3.655	.150
4	0	1.5	0	0	-3.655	.045
5	0.5	1.5	0.75	1.125	-3.655	.084
6	1	1.5	1.5	4.5	-3.655	.107
7	0	3	0	0	-3.655	.079
8	0.5	3	1.5	4.5	-3.655	.221
9	1	3	3	4.5	-3.655	.673
10	0	3	0	0	-3.655	.079
11	0.5	3	1.5	2.25	-3.655	.296
12	1	3	3	9	-3.655	.485
13	0	1.5	0	0	-3.655	.045
14	0.5	1.5	0.75	2.25	-3.655	.070
15	1	1.5	1.5	2.25	-3.655	.150
16	0	1.5	0	0	-3.655	.045
17	0.5	1.5	0.75	1.125	-3.655	.084
18	1	1.5	1.5	4.5	-3.655	.107
19	0	3	0	0	-3.655	.079
20	0.5	3	1.5	4.5	-3.655	.221
21	1	3	3	4.5	-3.655	.673
22	0	3	0	0	-3.655	.079
23	0.5	3	1.5	2.25	-3.655	.296
24	1	3	3	9	-3.655	.485

<sup>¶</sup> Las probabilidades fueron calculadas con la fórmula:  $P_{\text{callo}} = p / (1+p)$

$p = \exp (-3.655 + B_1 (\text{AIB}) + B_2 (\text{TDZ}) + B_3 (\text{AIB*TDZ}) + B_4 (\text{AIB*BAP*TDZ}))$ .

Los efectos de las variables dentro de la ecuación logística sobre la probabilidad de presencia de callo muestran que el AIB presentó un efecto inductor sobre la presencia de callo, además la combinación de AIB y TDZ en concentraciones altas causó el aumento en la probabilidad, por otro lado, el BAP presentó un efecto antagonista dentro de la interacción AIB\*BAP\*TDZ, puesto que esta interacción disminuyó la probabilidad de presencia de callo (Cuadro 17).

**Cuadro 17.** Probabilidad estimada para la presencia de callo según la combinación reguladores de crecimiento.

AIB (mg L <sup>-1</sup> )	BAP (mg L <sup>-1</sup> )	1.5	1.5	3	3
	TDZ (mg L <sup>-1</sup> )	1.5	3	1.5	3
1		0.150	0.673	0.107	0.485
0.5		0.084	0.296	0.070	0.221
0		0.045	0.079	0.045	0.079

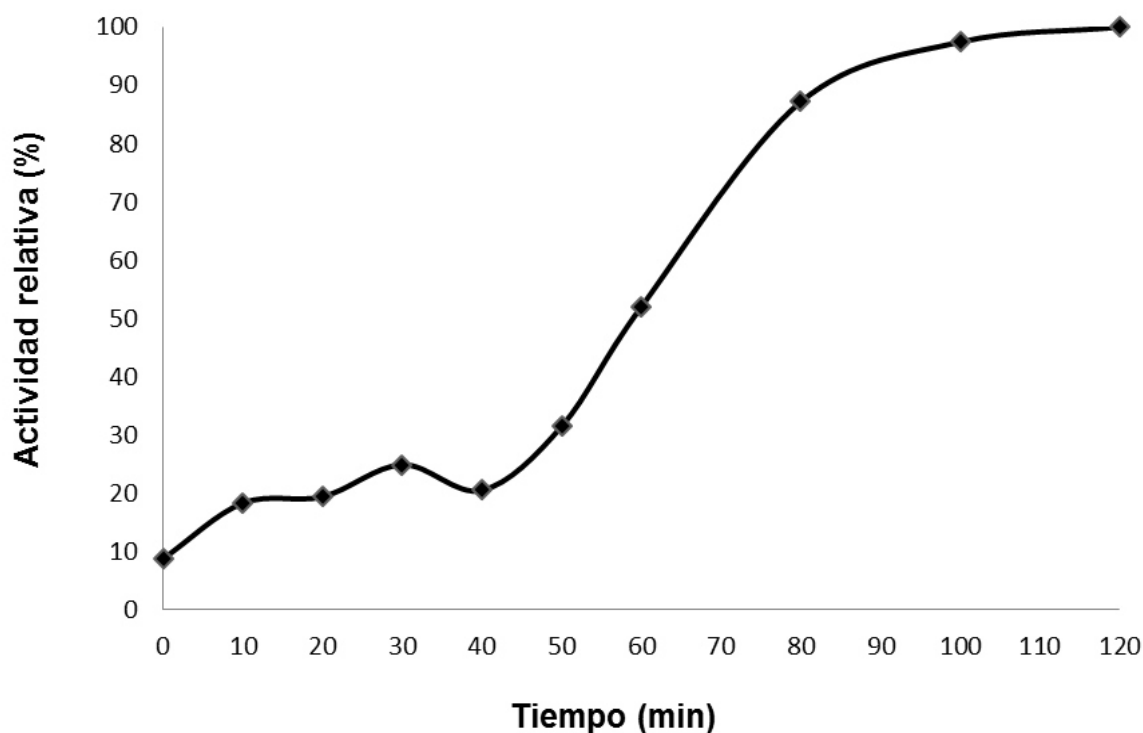
Estos resultados son similares a los mencionados por Sujatha y Mukta (1996) en explantes de hoja de *Jatropha curcas* donde se muestra la relación del AIB con la formación de callo. De igual importancia, Basalma *et al.* (2008) demostraron la capacidad en conjunto del AIB y TDZ para la formación de callo en cártamo (*Carthamus tinctorius* L.), sin embargo en su estudio no analizan la interacción entre estos componentes. Asimismo Landi y Mezzetti (2006) reportaron un alto porcentaje de presencia de callo en hojas (99.3 %) de diferentes especies de *Fragaria* en medios adicionados con 4.54 µM de TDZ y 0.98 µM de AIB. Por otro lado, Khurana-Kaul *et al.* (2010) informaron la presencia de estructuras nodulares en explantes de hoja cultivados en matraces Erlenmeyer de 100 cm<sup>3</sup> con medio MS adicionado con 0.90 µM de TDZ y 0.98 µM AIB; además definen estas estructuras como posibles brotes no bien diferenciados. Nogueira *et al.* (2013) mencionaron la emergencia de

protuberancias que resultan en la formación de brotes y concluyen que al menos en su especie de estudio, el proceso organogénico se realizó a través de la vía directa. Asimismo, asocian la emergencia de protuberancias a células parenquimatosas y quizás a la vaina del haz.

#### 6.4. Efecto del NaClO sobre el comportamiento de la enzima PPO en explantes de hoja y peciolo

##### 6.4.1. Curva de reacción sustrato-enzima

La máxima actividad enzimática se encontró a los 120 min para el ácido gálico en la cantidad y concentración utilizada. Con base en esto se seleccionó el tiempo 120 min, para la determinación de la actividad enzimática en este estudio (Figura 13).



**Figura 13.** Incremento de la actividad relativa de PPO en función del tiempo de reacción.

#### 6.4.2. Actividad de la enzima PPO

El análisis de varianza mostró significancia estadística para los factores de estudio: NaClO, explante y genotipo aunque no fueron significativas las interacciones (Cuadro 18); se demostró que la aplicación de NaClO influyó significativamente la actividad de la enzima PPO independiente del genotipo y tipo de explante empleado en comparación con los tratamientos control (Cuadro 19). Del mismo modo, los explantes de hoja presentaron un significativo aumento en la actividad de la enzima PPO en comparación con los explantes de peciolo (Cuadro 20).

**Cuadro 18.** Análisis de varianza de unidades de actividad enzimática de factores de estudio y sus interacciones.

Fuente	Gl	F	Sig.
NaClO	1	58.251	.000
Explante	1	335.474	.000
Genotipo	1	15.037	.001
NaClO x Explante	1	1.022	.327
NaClO x Genotipo	1	1.270	.276
Explante x Genotipo	1	2.462	.136
NaClO x Explante x Genotipo	1	3.153	.095
Error	16		
Total	24		

Por otro lado, el genotipo INI-3 presentó un significativo aumento en la actividad de la enzima PPO en comparación con el genotipo INI-6 (Cuadro 21). Las diferencias estadísticas son notables en todos los casos, mostrando la mayor actividad el tratamiento (T4) con hipoclorito de sodio al 3.24 % en explantes de hoja del genotipo INI-3 (Cuadro 22).

**Cuadro 19.** Unidades de actividad enzimática para el factor NaClO.

NaClO	Media (UE) †	Error estándar (±)
3.24 %	53.158 a	0.716
Control	45.845 b	0.636

† Letras diferentes muestran diferencias estadísticas entre medias ( $p=0.05$ ) basadas en el análisis de varianza general. Esto debido a que no es necesario una comparación de medias separada al análisis de varianza cuando solamente hay dos tratamientos (Compton, 2012).

Las diferencias entre los tratamientos de hipoclorito de sodio en contraste con los tratamientos control se fundamentan posiblemente en el efecto oxidante del agente desinfectante, el cual aumentó la actividad de la enzima PPO. Esto es importante debido a que la enzima PPO juega un papel central en la inducción de oscurecimiento en callo de *Jatropha curcas* (He *et al.*, 2009).

**Cuadro 20.** Unidades de actividad enzimática para el factor explante.

Explante	Media (UE) †	Error estándar (±)
Hoja	58.276 a	0.716
Pecíolo	40.727 b	0.636

† Letras diferentes muestran diferencias estadísticas entre medias ( $p=0.05$ ) basadas en el análisis de varianza general.

Los altos niveles de actividad de esta enzima en los tratamientos de hoja pueden justificarse por lo publicado por Tomar *et al.* (2014) quienes mencionaron que el contenido de fenoles totales resultó superior en hojas en comparación con otras partes de la planta.

Por otro lado, la diferencia estadística encontrada entre los genotipos se relaciona con lo publicado por Scalzo *et al.* (2005) quienes demostraron la variabilidad en el contenido de fenoles entre variedades de fresa (*Fragaria x ananassa*), albaricoque

(*Prunus armeniaca* L.) y durazno (*Prunus pérsica* L.), lo cual pudo afectar la actividad de PPO entre genotipos. Asimismo, Brandelli y Lopes (2005) encontraron una correlación positiva entre el grado de oscurecimiento de duraznos (*Prunus persica*) y la actividad de PPO.

**Cuadro 21.** Unidades de actividad enzimática para el factor genotipo.

Genotipo	Media (UE) †	Error estándar (±)
3.00	51.359 a	0.677
6.00	47.644 b	0.677

† Letras diferentes muestran diferencias estadísticas entre medias ( $p=0.05$ ) basadas en el análisis de varianza general.

Por su parte, Tanaka *et al.* (2011) reportaron que la utilización de cinamaldehído reprimió la inducción de fenilalanina amonio liasa (PAL) mRNA, razón por la cual se suprimió la síntesis de polifenoles y con eso, inhibió el oscurecimiento de lechuga (*Lactuca sativa* L.) en almacenamiento en frío.

**Cuadro 22.** Unidades de actividad enzimática para los tratamientos de NaClO en explantes de hoja y peciolo de los genotipos INI-6 e INI-3 de *Jatropha curcas* L.

Tratamientos	Media†	Error estándar (±)
T4	66.416 a	1.500
T2	58.416 b	0.166
T8	55.354 b	1.398
T6	52.916 b	0.693
T3	44.694 c	0.580
T1	43.104 c	0.571
T7	38.972 cd	1.785
T5	36.138 d	2.119

† Letras diferentes muestran diferencias estadísticas entre medias de unidades de actividad enzimática con base en una múltiple comparación de medias de Tukey al 5 % ( $p=0.05$ ).

## 7. CONCLUSIONES

1. Con respecto a la expresión morfogénica de peciolo se encontró que los factores AIB y TDZ además de las interacciones “TDZ\*AIB” y “TDZ\*BAP\*AIB” están relacionadas significativamente con la presencia de callo después de ocho semanas de cultivo *in vitro* en *Jatropha curcas*.
2. Los explantes de hoja presentaron el total oscurecimiento a los siete días de cultivo *in vitro* en medio de establecimiento. Mientras que en peciolo la frecuencia de explantes viables presentó una relación independiente del genotipo, pero dependiente de la incorporación del PVP, el cual favoreció las frecuencias de explantes viables. En cuanto a la viabilidad de peciolo por tipo de explante, se encontró una relación de dependencia entre la viabilidad y el tipo de explante, presentando la mayor viabilidad los explantes del segundo nudo. Por otro lado, la adición de PVP en medio de establecimiento produjo la proliferación de callo. Además conjuntamente, la presencia y producción de callo fresco fueron altamente influenciadas por el genotipo.
3. La aplicación de NaClO al 3.24 % como agente desinfectante en hojas y peciolo de ambos genotipos de *Jatropha curcas* ocasionó un significativo aumento en la actividad de PPO, asimismo se presentó diferencias estadísticas en la actividad enzimática entre explantes y genotipos.

## 8. RECOMENDACIONES

De acuerdo a las observaciones realizadas durante el transcurso de esta investigación se realizan las siguientes recomendaciones:

- Se sugiere utilizar el genotipo INI-3 para la producción de callo e evaluarlo en la etapa de inducción.
- Por otro lado, el genotipo INI-6 se recomienda debido a su mayor viabilidad de explantes al establecimiento y menor actividad de PPO en tejidos. Asimismo, por la expresión de diferentes respuestas morfogénicas como la presencia de callo y protuberancias en etapa de inducción.
- Se propone el manejo de plantas madre en condiciones de invernadero para controlar la presencia de contaminación y reducir el porcentaje de NaClO en el tratamiento de desinfección, lo que provocaría un descenso en la actividad de PPO y un aumento en la viabilidad de explantes.
- Por otro lado, en la etapa de inducción se recomienda realizar el subcultivo de explantes antes de las ocho semanas de cultivo *in vitro* para evitar el deterioro de los mismos.
- En la formulación de medios de cultivo se recomienda tener en cuenta que el AIB presenta un efecto inductor de callo además de la combinación de AIB y TDZ en altas concentraciones. Por otro lado, el BAP presenta un efecto



antagonista dentro de la interacción AIB\*BAP\*TDZ puesto que esta disminuye la probabilidad de presencia de callo.

- Asimismo, en el medio de establecimiento se sugiere la aplicación de 500 mg L<sup>-1</sup> PVP para inducir la presencia de callo y aumentar la viabilidad de explantes de peciolo, sin embargo para evitar la presencia de callo se recomienda trabajar con dosis bajas de PVP para aumentar la viabilidad de explantes.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Aftab F. and J. Preece. 2007. Forcing and *in vitro* establishment of softwood shoots from large stem segments of woody plants. *In*: Xu Z., Li, J., Xue, Y. and Yang, W. (eds.). *Biotechnology and sustainable agriculture 2006 and beyond*. Springer Netherlands. pp. 437-444.
- Arruda F. P., N. E. Beltrão, A. P. Andrade, W. E. Pereira and L. S. Severino. 2004. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. *Revista brasileira de oleaginosas e fibrosas* 8: 789-799.
- Azofeifa Á. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20: 153-175.
- Basalma D., S. Uranbey, S. Mirici and Ö. Kolsarici. 2008. TDZ x IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and *in vitro* multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *African Journal of Biotechnology* 7: 960-966.
- Basha S. D. and M. Sujatha. 2007. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica* 156: 375-386.
- Beyl C. A. 2011a. Getting started with tissue culture—media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. *In*: Trigiano R. N. and Gray, D. J. (eds.).

- Plant tissue culture, development and biotechnology. CRC Press. Boca Raton, FL. pp. 11-26.
- Beyl C. A. 2011b. PGRS and their use in micropropagation. *In*: Triggiano R. N. and Gray, D. J. (eds.). Plant tissue culture, development and biotechnology. CRC Press. Boca Raton, FL. pp. 33-56.
- Bhering L. L., C. F. Barrera, D. Ortega, B. G. Laviola, A. A. Alves, T. B. Rosado and C. D. Cruz. 2013. Differential response of *Jatropha* genotypes to different selection methods indicates that combined selection is more suited than other methods for rapid improvement of the species. *Ind. Crop. Prod.* 41: 260-265.
- Bhojwani S. S. and P. K. Dantu. 2013. Micropropagation. Plant tissue culture: An introductory text. Springer India. pp. 245-274.
- Bhojwani S. S. and M. K. Razdan. 1996. Plant tissue culture: Theory and practice, a revised edition. Elsevier. Amsterdam. 767 pp.
- Brandelli A. and C. H. G. L. Lopes. 2005. Polyphenoloxidase activity, browning potential and phenolic content of peaches during postharvest ripening. *J. Food Biochem.* 29: 624-637.
- Brittaine R. and N. Lutaladio. 2010. *Jatropha*: A smallholder bioenergy crop. The potential for pro-poor development, integr crop manag. FAO. Rome, Italy. 96 pp.
- Bubán T. 2000. The use of benzyladenine in orchard fruit growing: A mini review. *Plant Growth Regul.* 32: 381-390.
- Burger W. and M. Huft. 1995. Flora costaricensis: family 113 euphorbiaceae. Field Museum of Natural History. Chicago 130 pp.

- Cárdenas-Bahena A., S. Sánchez-García, C. Tinajero-Morales, V. M. González-Rodríguez y L. Baires-Vázquez. 2012. Hipoclorito de sodio en irrigación de conductos radiculares: Sondeo de opinión y concentración en productos comerciales. *Revista Odontológica Mexicana* 16: 242-251.
- Carels N. 2009. *Jatropha curcas*: A review. *In*: Jean-Claude K. and Michel, D. (eds.). *Adv. Bot. Res.* Academic Press. London, U.K. pp. 39-86.
- Cassells A. C. 2011. Detection and elimination of microbial endophytes and prevention of contamination in plant tissue culture. *In*: Trigiano R. N. and Gray, D. J. (eds.). *Plant tissue culture, development and biotechnology*. CRC Press. Boca Raton, FL. pp. 223-238.
- Cesar S. A. and S. Ignacimuthu. 2011. Applications of biotechnology and biochemical engineering for the improvement of *Jatropha* and biodiesel: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 15: 5176-5185.
- Compton M. 2012. Use of statistics in plant biotechnology. *In*: Loyola-Vargas V. M. and Ochoa-Alejo, N. (eds.). *Plant cell culture protocols*. Humana Press. pp. 109-127.
- Chien-Ying K., A. M. Al-Abdulkarim, S. M. Al-Jowid and A. Al-Baiz. 2009. An effective disinfection protocol for plant regeneration from shoot tip cultures of strawberry. *African Journal of Biotechnology* 8: 2611-2615.
- Christianson M. L. and D. A. Warnick. 1985. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis *in vitro*. *Dev. Biol.* 112: 494-497.
- D'Amato F. 1975. The problem of genetic stability in plant tissue and cell cultures. *In*: Frankel O. H. and Hawkes, J. G. (eds.). *Crop genetic resources for today and tomorrow*. Cambridge University Press. pp. 338-348.

- Dahake R., S. Roy, D. Patil, A. Chowdhary and R. Deshmukh. 2012. Evaluation of anti-viral activity of *Jatropha curcas* leaf extracts against potentially drug-resistant HIV isolates. BMC Infect. Dis. 12: 1-1.
- Datta M. M., P. Mukherjee, B. Ghosh and J. Timir Baran. 2007. *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). Curr. Sci. 93: 1438-1442.
- Daud N., A. Faizal and D. Geelen. 2013. Adventitious rooting of *Jatropha curcas* L. is stimulated by phloroglucinol and by red led light. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 49: 183-190.
- De Filippis L. F. 2014. Crop improvement through tissue culture. *In: Ahmad P., Wani, M. R., Azooz, M. M. and Tran, L. S. P. (eds.). Improvement of crops in the era of climatic changes. Springer New York. pp. 289-346.*
- De Medeiros Rapôso N. V. 2012. Influencia del cloranfenicol y polivinilpirrolidona (PVP) en la regeneración *in vitro* de la castaña de brasil (*Bertholletia excelsa* HBK). *Investigación y Saberes* 1: 15-19.
- Debergh P. and L. Maene. 1985. Some aspects of stock-plant preparation for tissue culture propagation. *Acta Hort. (ISHS)* 166: 21-24.
- Dehgan B. and G. L. Webster. 1979. Morphology and infrageneric relationships of the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). *University of California Publications in Botany* 74: 1-73.
- Deore A. and T. S. Johnson. 2008. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports* 2: 7-11.

- Divakara B. N., H. D. Upadhyaya, S. P. Wani and C. L. L. Gowda. 2010. Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. *Applied Energy* 87: 732-742.
- El-Hennawy M. A., A. F. Abdalla, S. A. Shafey and I. M. Al-Ashkar. 2011. Production of doubled haploid wheat lines (*Triticum aestivum* L.) using anther culture technique. *Annals of Agricultural Sciences* 56: 63-72.
- Ewald D. 2007. Micropropagation of *Larix* species via organogenesis. *In*: Jain S. M. and Häggman, H. (eds.). *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Springer Netherlands. pp. 125-136.
- Francis G., R. Edinger and K. Becker. 2005. A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. *Natural Resources Forum* 29: 12-24.
- Fresnedo-Ramírez J. 2013. The floral biology of *Jatropha curcas* L.—a review. *Tropical Plant Biology* 6: 1-15.
- Gahan P. B. 2007. Totipotency and the cell cycle. *In*: Jain S. M. and Häggman, H. (eds.). *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Springer Netherlands. pp. 3-14.
- Gahukar R. T. 2009. Food security: The challenges of climate change and bioenergy. *Curr. Sci.* 96: 26-28.
- George E., M. Hall and G. J. Klerk. 2008a. Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists. *In*: George E., Hall, M. and Klerk, G. J. (eds.). *Plant propagation by tissue culture*. Springer Netherlands. pp. 205-226.

- George E. F., M. A. Hall and G. J. De Klerk. 2008b. Micropropagation: Uses and methods. *In*: George E. F., Hall, M. A. and De Klerk, G. J. (eds.). Plant propagation by tissue culture. Springer Netherlands. pp. 29-64.
- Ginwal H. S., S. S. Phartyal, P. S. Rawat and R. L. Srivastava. 2005. Seed source variation in morphology, germination and seedling growth of *Jatropha curcas* Linn. in central India. *Silvae Genet.* 54: 76-80.
- Grosser J. W., G. A. Moore and F. G. Gmitter Jr. 1989. Interspecific somatic hybrid plants from the fusion of 'key' lime (*Citrus aurantifolia*) with 'valencia' sweet orange (*Citrus sinensis*) protoplasts. *Scientia Horticulturae* 39: 23-29.
- He Y., X. Guo, R. Lu, B. Niu, V. Pasapula, P. Hou, F. Cai, Y. Xu and F. Chen. 2009. Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 98: 11-17.
- Heller J. 1996. Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilised and neglected crops. 1. International Plant Genetic Resource Institute. Rome, Italy. 66 pp.
- Hernández Y. and M. E. González. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales* 31: 00-00.
- Hohtola A. 1988. Seasonal changes in explant viability and contamination of tissue cultures from mature scots pine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 15: 211-222.
- Hosni A. M. 2001. Increasing the potencial of *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae* aiton. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences* 9: 839-852.
- Huetteman C. A. and J. E. Preece. 1993. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33: 105-119.

- Iliev I., A. Gajdosová, G. Libiaková and S. M. Jain. 2010. Plant micropropagation. *In*: Davey M. R. and Anthony, P. (eds.). Plant cell culture essential methods. Wiley-Blackwell. pp. 1-23.
- Jalaja N. C., T. V. Sreenivasan, S. M. Pawar, P. G. Bhoi and R. M. Garker. 2006. Co 94012— a new sugarcane variety through somaclonal variation. *Sugar Tech* 8: 132-136.
- Jingura R. 2012. Socio-economy, agro-ecological zones, agronomic practices and farming system of *Jatropha curcas* L. in sub-saharan Africa. *In*: Carels N., Sujatha, M. and Bahadur, B. (eds.). *Jatropha*, challenges for a new energy crop: Volume 1: Farming, economics and biofuel. Springer New York. pp. 53-69.
- Kennedy D. and C. Norman. 2005. What don't we know? *Science* 309: 75.
- Khurana-Kaul V., S. Kachhwaha and S. L. Kothari. 2010. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium. *Biol. Plant.* 54: 369-372.
- Kozai T. and C. Kubota. 2005. *In vitro* aerial environments and their effects on growth and development of plants. *In*: Kozai T., Afreen, F. and Zobayed, S. M. A. (eds.). Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system. Springer Netherlands. pp. 31-52.
- Kumar N. and M. P. Reddy. 2010. Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: A biofuel plant. *Ann. Appl. Biol.* 156: 367-375.



- Kumar N. and M. P. Reddy. 2012. Thidiazuron (TDZ) induced plant regeneration from cotyledonary petiole explants of elite genotypes of *Jatropha curcas*: A candidate biodiesel plant. *Ind. Crop. Prod.* 39: 62-68.
- Kumar N., K. G. V. Anand and M. Reddy. 2011. Plant regeneration of non-toxic *Jatropha curcas*—impacts of plant growth regulators, source and type of explants. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 20: 125-133.
- Kumar N., K. G. V. Anand and M. P. Reddy. 2010a. *In vitro* plant regeneration of non-toxic *Jatropha curcas* L.: Direct shoot organogenesis from cotyledonary petiole explants. *J. Crop Sci. Biotechnol.* 13: 189-194.
- Kumar N., K. G. V. Anand and M. P. Reddy. 2010b. Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: A biodiesel plant. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 917-924.
- Kumar S., S. Kumaria and P. Tandon. 2010c. Efficient *in vitro* plant regeneration protocol from leaf explant of *Jatropha curcas* L. — a promising biofuel plant. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 19: 273-275.
- Landi L. and B. Mezzetti. 2006. TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. *Plant Cell Rep.* 25: 281-288.
- Leng P., S. Su, F. Wei, F. Yu and Y. Duan. 2009. Correlation between browning, total phenolic content, polyphenol oxidase and several antioxidation enzymes during pistachio tissue culture. *Acta Horticulturae* 829: 127-132.
- Li L. and J. C. Steffens. 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215: 239–247.

- Li M., H. Li, H. Jiang, X. Pan and G. Wu. 2008. Establishment of an agrobacterium-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 92: 173-181.
- Li Z. G., M. Gong, S. Z. Yang and W. B. Long. 2012. Efficient callus induction and indirect plant regeneration from various tissues of *Jatropha curcas*. *African Journal of Biotechnology* 11: 7843-7849.
- Loyola-Vargas V. and N. Ochoa-Alejo. 2012. An introduction to plant cell culture: The future ahead. *In: Loyola-Vargas V. M. and Ochoa-Alejo, N. (eds.). Plant Cell Culture Protocols.* Humana Press. pp. 1-8.
- Luo C. W., K. Li, Y. Chen and Y. Y. Sun. 2007. Floral display and breeding system of *Jatropha curcas* L. *Forestry Studies in China* 9: 114-119.
- Martinez-Herrera J., A. L. Martinez-Ayala, H. Makkar, G. Francis and K. Becker. 2010. Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. from México. *Eur. J. Sci. Res.* 3: 396-407.
- Menard S. 2002. *Applied logistic regression analysis.* 2<sup>a</sup> ed. Sage. Thousand Oaks, CA. 111 pp.
- Misra P., N. Gupta, D. Toppo, V. Pandey, M. Mishra and R. Tuli. 2010a. Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 100: 189-197.
- Misra P., D. D. Toppo, N. Gupta, D. Chakrabarty and R. Tuli. 2010b. Effect of antioxidants and associated changes in antioxidant enzymes in controlling

- browning and necrosis of proliferating shoots of elite *Jatropha curcas* L. *Biomass Bioenergy* 34: 1861-1869.
- Mole S., J. A. M. Ross and P. G. Waterman. 1988. Light-induced variation in phenolic levels in foliage of rain-forest plants. *J. Chem. Ecol.* 14: 1-21.
- Mroginski L., P. Sansberro y E. Flaschland. 2010. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *In: Levitus G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E. y Mroginski, L. (eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. pp. 17-25.*
- Mukherjee P., A. Varshney, T. S. Johnson and T. B. Jha. 2011. *Jatropha curcas*: A review on biotechnological status and challenges. *Plant Biotechnology Reports* 5: 197-215.
- Murashige T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Myers A., W. A. Vendrame and A. Pinares. 2013. *In vitro* growth of *Jatropha curcas* L. Cell cultures in microgravity. *Florida State Horticultural Society* 126: 292-295.
- Nogueira A. R. C., A. A. Soares, A. B. Ibrahim and F. A. P. Campos. 2013. Analysis of organogenic competence of cotyledons of *Jatropha curcas* and their *in vitro* histological behavior. *African Journal of Biotechnology* 10: 11249-11258.
- Olmos S., G. Luciani y E. Galdeano. 2010. Micropropagación. *In: Levitus G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E. y Mroginski, L. (eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. pp. 353-362.*

- Onofri A., E. A. Carbonell, H. P. Piepho, A. M. Mortimer and R. D. Cousens. 2010. Current statistical issues in weed research. *Weed Res.* 50: 5-24.
- Peddaboina V., C. Thamidala and S. Karampuri. 2006. *In vitro* shoot multiplication and plant regeneration in four *Capsicum* species using thidiazuron. *Scientia Horticulturae* 107: 117-122.
- Podwyszyńska M. and D. Sochacki. 2010. Micropropagation of tulip: Production of virus-free stock plants. *In: Jain S. M. and Ochatt, S. J. (eds.). Protocols for in vitro propagation of ornamental plants.* Humana Press. pp. 243-256.
- Purkayastha J., T. Sugla, A. Paul, S. K. Solleti, P. Mazumdar, A. Basu, A. Mohommad, Z. Ahmed and L. Sahoo. 2010. Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. *Biol. Plant.* 54: 13-20.
- Radice S. 2010. Morfogénesis. *In: Levitus G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E. y Mroginski, L. (eds.). Biotecnología y mejoramiento vegetal II.* Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina. pp. 26-33.
- Rajore S. and A. Batra. 2007. An alternative source for regenerable organogenic callus induction in *Jatropha curcas* L. *Indian J. Biotechnol.* 6: 545.
- Reustle G. and I. Natter. 1994. Effect of polyvinylpyrrolidone and activated charcoal on formation of microcallus from grapevine protoplasts (*Vitis* sp.). *Vitis* 33: 117-121.
- Sánchez-Romero C., R. Perán-Quesada, B. Márquez-Martín, A. Barceló-Muñoz and F. Pliego-Alfaro. 2007. *In vitro* rescue of immature avocado (*Persea americana* Mill.) embryos. *Scientia Horticulturae* 111: 365-370.

- Sarkar T., K. G. V. Anand and M. P. Reddy. 2010. Effect of nickel on regeneration in *Jatropha curcas* L. and assessment of genotoxicity using RAPD markers. *Biometals* 23: 1149-1158.
- Scalzo J., A. Politi, N. Pellegrini, B. Mezzetti and M. Battino. 2005. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition* 21: 207-213.
- Sharma S., N. Kumar and M. P. Reddy. 2011. Regeneration in *Jatropha curcas*: factors affecting the efficiency of *in vitro* regeneration. *Ind. Crop. Prod.* 34: 943-951.
- Shrivastava S. and M. Banerjee. 2008. *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): influence of additives. *International Journal of Integrative Biology* 3: 73-79.
- Singh A. and J. Chikara. 2013. Large scale micropropagation of *Jatropha curcas* for quality germplasm. *In: Bahadur B., Sujatha, M. and Carels, N. (eds.). Jatropha, challenges for a new energy crop.* Springer New York. pp. 503-511.
- Singh A., M. P. Reddy, J. Chikara and S. Singh. 2010. A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas*—a biodiesel plant. *Ind. Crop. Prod.* 31: 209–213.
- Singh J. and K. N. Tiwari. 2012. *In vitro* plant regeneration from decapitated embryonic axes of *Clitoria ternatea* L.—an important medicinal plant. *Ind. Crop. Prod.* 35: 224-229.

- Singh P., P. Dwivedi and N. Atri. 2014. *In vitro* shoot multiplication of *Stevia* and assessment of stevioside content and genetic fidelity of the regenerants. Sugar Tech 16: 430-439.
- Skoog F. and C. O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symposia of the Society for Experimental Biology 11: 118-130.
- Soomro R. and R. A. Memon. 2007. Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas*. Pak. J. Bot 39: 2431-2441.
- Steffens J., E. Harel and M. Hunt. 1994. Polyphenol oxidase. *In*: Ellis B., Kuroki, G. and Stafford, H. (eds.). Genetic engineering of plant secondary metabolism. Springer US. pp. 275-312.
- Steinmann V. 2002. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. Acta Botánica Mexicana 61: 61-93.
- Sujatha M., H. P. S. Makkar and K. Becker. 2005. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. Plant Growth Regul. 47: 83-90.
- Sujatha M. and N. Mukta. 1996. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 44: 135-141.
- Sujatha M., T. P. Reddy and M. J. Mahasi. 2008. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. Biotechnol. Adv. 26: 424-435.
- Suttle G. R. L. 2011. Commercial laboratory production. *In*: Trigiano R. N. and Gray, D. J. (eds.). Plant tissue culture, development and biotechnology. CRC Press. Boca Raton, FL. pp. 213-221.

- Tabiyeh D. T., F. Bernard and H. Shacker. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. *Acta Horticulturae* 726: 201-204.
- Tanaka E., S. Okumura, R. Takamiya, H. Hosaka, Y. Shimamura and M. Murata. 2011. Cinnamaldehyde inhibits enzymatic browning of cut lettuce by repressing the induction of phenylalanine ammonia-lyase without promotion of microbial growth. *J. Agric. Food Chem.* 59: 6705-6709.
- Tomar N. S., M. A. Ahanger and R. M. Agarwal. 2014. *Jatropha curcas*: An overview. *In*: Ahmad P. and Wani, M. R. (eds.). *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment*. Springer New York. pp. 361-383.
- Toral O. C., J. M. Iglesias, S. Montes de Oca, J. A. Sotolongo, S. García and M. Torsti. 2008. *Jatropha curcas* L., una especie arbórea con potencial energético en cuba. *Pastos y Forrajes* 31: 191-207.
- Varshney A. and T. S. Johnson. 2010. Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant. *Plant Biotechnol. Rep.* 4: 139-148.
- Vendrame W. A. and A. Pinares. 2013. Characterizing parameters of *Jatropha curcas* cell cultures for microgravity studies. *Advances in Space Research* 51: 2069-2074.
- Verdeil J. L., L. Alemanno, N. Niemenak and T. J. Tranbarger. 2007. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: Dependence versus autonomy? *Trends Plant Sci.* 12: 245-252.

- Vogel G. 2005. How does a single somatic cell become a whole plant? *Science* 309: 86.
- Wang J. L., M. F. Liu, X. X. Li, Q. Wang, L. Zhang and J. F. Li. 2014. Anti-oxidative activities of ethanol extracts from both wild plant and suspension cell cultures of *Rheum franzenbachii*. *Chinese Herbal Medicines* 6: 115-119.
- Wang Q., R. Gafny, N. Sahar, I. Sela, M. Mawassi, E. Tanne and A. Perl. 2002. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. *Plant Sci.* 162: 551-558.
- Wei Q., W. D. Lu, Y. Liao, S. L. Pan, Y. Xu, L. Tang and F. Chen. 2004. Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 30: 475-478.
- Yasuda T., Y. Fujii and T. Yamaguchi. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol.* 26: 595-597.
- Yesil-Celiktas O. and F. Vardar-Sukan. 2013. Downstream processes for plant cell and tissue culture. *In: Chandra S., Lata, H. and Varma, A. (eds.). Biotechnology for medicinal plants.* Springer Berlin Heidelberg. pp. 1-27.
- Zar J. H. 2010. *Biostatistical analysis.* 5<sup>a</sup> ed. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey. 944 pp.
- Zhang C., S. Fu, G. Tang, X. Hu and J. Guo 2013. Factors influencing direct shoot regeneration from mature leaves of *Jatropha curcas*, an important biofuel plant. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 49: 529-540.