



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Energía Renovable

**Caracterización de una línea celular y análisis del patrón de poliaminas en plantas de *Jatropha curcas* expuestas a frío**

Tesis que presenta

Gloria Marisa Morales Artiguez

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN ENERGÍA RENOVABLE**

Mérida, Yucatán

Noviembre, 2011



## Reconocimiento

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR Y ANÁLISIS DEL PATRÓN DE POLIAMINAS EN PLANTAS DE *JATROPHA CURCAS* EXPUESTAS A FRÍO fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Víctor M. Loyola Vargas, en el programa de Maestría en Ciencias en Energía Renovable, de este Centro.

Atentamente

---

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico



## **Declaración de propiedad**

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular siendo el director de esta tesis el Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas en asesoría con el Dr. Rafael Rojas Herrera, así como en la Unidad de Energía Renovable con asesoría del Dr. Felipe Barahona Pérez, en Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida, Yucatán, 17 de noviembre de 2011

---

Gloria Marisa Morales Artiguez



## Agradecimientos

A Dios por...

... guiar mi camino.

... no dejarme de su mano.

... darme la fuerza y el coraje para seguir adelante.

... darme los padres, abuelita, hermana y sobrinos que tengo.

... darme un hombre de corazón bondadoso como  
compañero de vida.

Gracias.

Del mismo modo, agradezco al CONACYT por la beca otorgada a lo largo de estos dos años de maestría. Así como a mi Comité Tutoral y revisores por sus sugerencias y comentarios, los cuales hicieron este trabajo mejor.

Gracias a mis compañeros y amigos de la segunda generación de Energía renovable así como a mis amigos y compañeros del laboratorio 24. En especial a la maestra en ciencias Rosa María Galaz Avalos por ayudarme y aconsejarme en la conducción de mi trabajo de investigación, a Sara Hernández, María Teresa Cadenas y Pedro Xool, por compartir sus conocimientos alegrías y tristezas conmigo.

Finalmente al Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas por dirigir mi trabajo de investigación y a la maestra en ciencias Miriam Monforte González por sus asesorías y paciencia al enseñarme a usar los aparatos de laboratorio que me permitieron cuantificar mi poliaminas.





# Contenido

Índice de figuras .....	iii
Índice de tablas .....	vii
Resumen.....	ix
Abstarct .....	xi
Introducción .....	1
Capítulo 1. Antecedentes .....	3
1.1. Cultivo de tejidos vegetales .....	3
1.2. Las plantas y su relación con el estrés biótico y abiótico.....	5
1.3. <i>Jatropha curcas</i> y su exposición a distintos factores que afectan su viabilidad .....	7
1.4. Las plantas y las repercusiones a causa del frío .....	9
1.5. Estrés osmótico .....	10
1.6. Poliaminas en plantas y su relación con la exposición al frío.....	11
1.7. Biodiesel como recurso renovable .....	13
Justificación .....	16
Objetivo General .....	17
Objetivos específicos.....	17
Capítulo 2. Materiales y Métodos .....	19
2.1. Estrategia experimental .....	19
2.2. Material biológico .....	19
Obtención de plantas de <i>Jatropha curcas</i> .....	19
2.3. Establecimiento y evaluación de una línea celular en suspensión celular de <i>J. curcas</i> ....	20
Preparación del medio de cultivo .....	20
Inducción de callo.....	20
Ciclo de crecimiento de callos en medio MS+BA+AIA .....	21
Suspensiones celulares.....	22

Embriogénesis somática.....	25
2.4.    Exposición al frío en plántulas cigóticas de <i>Jatropha curcas</i> .....	26
Germinación de semillas de <i>J. curcas</i> .....	26
2.5.    Determinación de poliaminas en plantas de <i>J. curcas</i> .....	27
Capítulo 3. Resultados y Discusión.....	33
3.1.    Germinación de semillas de <i>Jatropha curcas</i> .....	33
3.2.    Inducción de callo.....	36
3.3.    Ciclo de cultivo de callos de <i>J. curcas</i> .....	37
a.    Suspensiones celulares.....	40
3.5.    Exposición al frío de plántulas cigóticas de <i>Jatropha curcas</i> .....	44
3.6.    Perfil de poliaminas en plantas de <i>Jatropha curcas</i> .....	47
3.7.    Embriogénesis somática en <i>Jatropha curcas</i> .....	58
Capítulo 4. Conclusiones .....	63
Apéndice 1. Desinfección de semillas de <i>Jatropha curcas</i> .....	65
Apéndice 2. Medio de germinación de semillas cigóticas de <i>Jatropha curcas</i> .....	66
Apéndice 3. Medio de maduración de embriones de <i>Jatropha curcas</i> .....	67
Apéndice 4. Medio de germinación de embriones de <i>Jatropha curcas</i> .....	68
Apéndice 5. Medio de enraizamiento de embriones de <i>Jatropha curcas</i> .....	69
Apéndice 6. Medio Murasashige y Skoog (MS).....	69
Referencias.....	71

## Índice de figuras

Figura 1.1. Plantación de *Jatropha curcas*, perteneciente a la empresa Kekén, Yucatán, México. Nov 2008.

Figura 1.2. Poliaminas. a) Putrescina, b) espermidina y c) espermina

Figura 1.3. Reacción de transesterificación

Figura 2.1 Origen del callo

Figura 2.2. Metodología para la germinación de semillas de *Jatropha curcas*.

Figura 2.3. Extracción de PAS

Figura 2.4. Hidrólisis de PAS

Figura 2.5. Preparación de estándares de PAS

Figura 2.6. Dansilación de PAS

Figura 2.7. Preparación de cámara de cromatografía

Figura 2.8. Preparación de soluciones para extracción de PAS

Figura 3.1. Germinación de semillas de *Jatropha curcas*

*Figura 3.2. Desarrollo de plántulas de Jatropha curcas*

*Figura 3.3. Proporción de plantas de Jatropha curcas en relación*

Figura 3.4. Crecimiento de callo en explante de hoja de *Jatropha curcas*.

Figura 3.5. A. Callo blanco B. Callo amarillo

Figura 3.6. Determinación del peso fresco de callo de *J. curcas* durante su ciclo de cultivo en medio semisólido MS con AIA 17.1  $\mu\text{M}$  y BA 13.3  $\mu\text{M}$  como reguladores de crecimiento.

Figura 3.7. Determinación del peso seco de callo de *J. curcas* durante su ciclo de cultivo en medio semisólido MS con AIA 17.1  $\mu\text{M}$  y BA 13.3  $\mu\text{M}$  como reguladores de crecimiento.

Figura 3.8. A. Matraces de inducción. B. Suspensiones celulares.

Figura 3.9. A y B, imagen al microscopio con un aumento 40x de células teñidas con azul de tripano. C. Suspensiones celulares durante su ciclo de cultivo.

Figura 3.10. Determinación de los pesos fresco y seco (mg) durante el ciclo de cultivo de suspensiones celulares de *J. curcas* en medio líquido MS con AIA 17.1  $\mu\text{M}$  y BA 13.3  $\mu\text{M}$  como reguladores de crecimiento.

Figura 3.11. Determinación del pH y conductividad del medio durante el ciclo de cultivo de suspensiones celulares de *J. curcas* en medio líquido MS con AIA 17.1  $\mu\text{M}$  y BA 13.3  $\mu\text{M}$  como reguladores de crecimiento.

Figura 3.12. Determinación del número de células durante el ciclo de cultivo de suspensiones celulares de *J. curcas* en medio líquido MS con AIA 17.1  $\mu\text{M}$  y BA 13.3  $\mu\text{M}$  como reguladores de crecimiento.

Figura 3.13. Plántulas cigóticas de *J. curcas* (testigo 25 °C).

Figura 3.14. Plántulas cigóticas de *J. curcas* (tratamiento 12 °C).

Figura 3.15. Longitud promedio de plántulas cigóticas de *J. curcas* sometidas a 25 °C y 12 °C (tratamiento).

Figura 3.16. PAS unidas en hojas de plantas de *Jatropha curcas* de un mes de edad en 25°C A y 12°C B.

Figura 3.17. PAS conjugadas en hojas de plantas de *Jatropha curcas* de un mes de edad en 25°C C y 12°C D.

Figura 3.18. PAS libres en hojas de plantas de *Jatropha curcas* de un mes de edad en 25°C E y 12°C F.

Figura 3.19. PAS unidas en hojas de plantas de *Jatropha curcas* de seis meses de edad en 25°C A y 12°C B.

Figura 3.20. PAS conjugadas en hojas de plantas de *Jatropha curcas* de seis meses de edad en 25°C C y 12°C D.

Figura 3.21. PAS libres en hojas de plantas de *Jatropha curcas* de seis meses de edad en 25°C E y 12°C F.

Figura 3.22. Determinación de PAS totales a 25 °C y 12 °C (tratamiento) en hojas de plantas de *J. curcas* de un mese de edad.

Figura 3.23. Determinación de PAS totales a 25 °C y 12 °C (tratamiento) en hojas de plantas de *J. curcas* de seis meses de edad.

Figura 3.24. Embriones somáticos y plántulas de *Jatropha curcas*.

Figura 3.25. Plántulas de *Jatropha curcas*, a partir de embriones somáticos.



## Índice de tablas

Tabla 1.1. Niveles de PAS en plantas y su relación con el estrés.

Tabla 1.2. Perfil de ácidos grasos de aceite de *Jatropha curcas*.

Tabla 2.1. Composición del medio de inducción de callo.

Tabla 2.2. Aplicación de tratamientos y réplicas.

Tabla 3.1. Edad de las semillas de *Jatropha curcas* y su capacidad de germinación.

Tabla 3.2. Descripción de los eventos ocurridos durante la germinación de semillas de *Jatropha curcas*.

Tabla 3.3. Contenido de PAS libres en dos plantas de la familia de las *Euphorbiaceae*.





## Resumen

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta muy poderosa que nos permite manipular células y tejidos vegetales. Por lo tanto, los cultivos energéticos, como es el caso de *Jatropha curcas*, son susceptibles a mejoras como lo es: la resistencia a plagas, frío, y sequías entre otros factores que finalmente repercuten en el rendimiento del cultivo.

Uno de los muchos metabolitos que se sintetizan en las plantas durante el estrés por frío son aminos alifáticos de baja masa molecular llamadas poliaminas: putrescina (put), espermina (spm) y espermidina [1] entre otras. Por lo tanto, es necesario conocer e investigar parámetros que nos permitan evaluar la resistencia de *Jatropha curcas* al frío, mediante la determinación de su perfil de poliaminas, así como la generación de conocimiento acerca de su cultivo *in vitro* a través de la caracterización de una línea celular de la misma planta, con el fin de contribuir a la mejora del cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas*.

En el presente trabajo, se evaluó el perfil de poliaminas (PAS) en plantas de *J. curcas* de uno y seis meses de edad que fueron expuestas a un régimen de frío (12 °C). En condiciones basales, las plantas más jóvenes presentaron mayores concentraciones de PAS totales en comparación con las plantas de seis meses. Cuando las plantas fueron sometidas al estrés por frío, independientemente de la edad de las mismas, los niveles de spm libre, conjugada y unida, una vez transcurridas las primeras 24 h, se mantuvieron prácticamente sin cambio, del mismo modo, y de manera independiente de la edad de las plantas, los niveles de PAS se encontraron distribuidos de la siguiente manera en relación a su concentración: spd > put > spm.

En plantas de seis meses, a diferencia de las de un mes, únicamente se identificó la presencia de put en su forma libre; sin embargo, al ser expuestas al frío, se indujo la síntesis de put unida y conjugada.



## Abstarct

Tissue culture is a powerful tool which allows us to manipulate cells and vegetable tissues. Therefore energy crops such *Jatropha curcas* are susceptible to improvements like pest resistance, cold, drought among other factors that finally affect crops yielding.

Polyamines are low weight aliphatic amines: putrescine (put), spemine (spm) and spermidine [1]. They are just some of the metabolites that are synthesized during cold stress. Therefore it is necessary to research biological and biochemical parameters that let us to determine *Jatropha curcas* cold resistance through polyamines profile determination and to generate knowledge related to *Jatropha curcas* in vitro culture through cell line characterization in order to improve its in vitro culture.

In this thesis was evaluated the polyamines (PAS) profile of *Jatropha curcas* plants of one and six months that were exposed to cold (12°C). Under basal conditions, younger plants showed higher PAS concentration compared with six months plants. Independently from age and after 24h of exposure to cold; conjugated, free and bound spm levels did not have any significant change. Also independently from age, PAS concentration were distributed as follow: spd > put > spm. Unlike one month plants, in six months plants at 25°C, only was found free put, however at 12°C it was observed the synthesis of conjugated and bound put.



## Introducción

El aumento de la población en el ámbito mundial, genera un aumento en el consumo de energía. Sin embargo, el tipo de energía de la cual depende principalmente el hombre, es la energía derivada de los combustibles fósiles [1], la cual en el transcurso de las últimas décadas, ha originado serios problemas al medio ambiente [2]. Debido a lo anteriormente descrito, existe un gran interés por tratar de explotar en mayor medida y de manera más eficiente las formas de energía alterna, que en conjunto permitan satisfacer las necesidades energéticas de la población mundial y que al mismo tiempo sean amigables con el medio ambiente.

En México, la Secretaría de Energía es el organismo encargado tanto de establecer y conducir, como de supervisar el cumplimiento de la política energética de nuestro país. Como se expresa en la Estrategia Nacional de Energía 2010, algunos de los objetivos que se plantean dentro de la misma y que se ven impactados directamente sobre el tema de las energías renovables son: la diversificación en el uso de fuentes de energía, promoción de la participación de las energías limpias y la reducción del impacto ambiental que genera el sector energético [3].

Una de las varias opciones de generación de energías renovables con las que se cuenta, es el uso del aceite que se extrae de las semillas de una planta conocida como higuierilla y de nombre científico *Jatropha curcas*. A pesar de que actualmente ya se sabe que a partir del aceite de *J. curcas* se puede obtener biodiesel; esto no significa que la planta no sea susceptible a mejoras ya que presenta una serie de características que la hacen en cierta medida vulnerable tanto a factores bióticos como abióticos.

Para abordar el tema del mejoramiento de una planta, se puede recurrir al cultivo de tejidos como una herramienta básica, puesto que nos permite la investigación a nivel fisiológico, bioquímico, genético y estructural así como a nivel práctico la clonación, conservación y manipulación *in vitro* [4].



# Capítulo 1. Antecedentes

## 1.1. Cultivo de tejidos vegetales

Se le llama cultivo de tejidos al conjunto de técnicas diseñadas para el crecimiento y manipulación de células y tejidos empleando soluciones nutritivas en ambientes asépticos y controlados [5].

Los principios básicos para el establecimiento de cultivo de tejidos vegetales fueron planteados por Gottfried Haberlandt en 1902 [5]. Con el paso del tiempo se lograron comprender los factores determinantes para el desarrollo de cultivo de tejidos vegetales, siendo estos [6]:

1. Nutrientes en el medio de cultivo.
2. Reguladores del crecimiento.
3. Células desdiferenciadas.

En el cultivo de tejidos es importante tener presente que los nutrientes adecuados, habrán de permitir el crecimiento y velocidad óptima de las células deseadas, es decir el uso de macro y micronutrientes dentro de los medios de cultivo. El medio más común en cultivo de tejidos es el medio (MS) Murashige y Skoog [7].

Adicionalmente a este medio rico en nutrientes, se le suele añadir reguladores del crecimiento que promuevan el crecimiento del tejido vegetal en condiciones *in vitro*. Los reguladores del crecimiento son comúnmente un componente esencial del medio de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Estos reguladores del crecimiento son compuestos orgánicos, que son sintetizados de manera natural por la planta y que ocasionan cambios en los patrones de crecimiento de los tejidos vegetales; además, cuando se utilizan *in vitro*, pueden dar origen a la formación de tejido calloso, brotes, embriones somáticos, raíces etc [4].

De acuerdo con Hurtado y Merino, un callo, es el conjunto de células obtenidas a partir del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados; en los cuales se habrá de generar una desdiferenciación celular de proliferación continua, dando origen a la masa amorfa de células que los caracteriza [8].

Como ya Haberland, en su artículo de 1902 había mencionado, la totipotencialidad de las células de callo, les confiere una característica morfogénica muy importante puesto que bajo condiciones específicas de nutrimentos, reguladores del crecimiento y ambientes controlados, dichas células pueden derivar en el desarrollo de brotes, raíces, embriones e inclusive plántulas.

Existen en la literatura diversos estudios en los que se evidencia lo anteriormente mencionado en relación al uso de determinado tipo de explante o regulador de crecimiento, los cuales influirán en la repuesta obtenida:

En el 2010, Purkayastha *et al.* determinó que para lograr la elongación del ápice de vástago de *J. curcas* como explante, era necesario el uso de ácido giberélico (Purkayastha). Sin embargo también se ha logrado la regeneración de *J. curcas* a partir de explante de hipocotilo empleando reguladores de crecimiento distintos a los empleados por Purkayastha, siendo estos benciladenina y ácido indol butírico [9].

Por lo tanto, debido al carácter de desdiferenciación celular con el que cuentan las células de callo, es común que el cultivo de tejidos vegetales se inicie precisamente con la inducción de callo a partir de un explante vegetal [8].

Otra forma de emplear el cultivo de tejidos vegetales como herramienta para determinar diferentes efectos en las células vegetales es mediante el uso suspensiones celulares, las cuales comúnmente son iniciadas mediante la transferencia de fragmentos de callo a un medio de cultivo líquido; logrando una disgregación gradual del callo debido, en parte a la agitación a la que son sometidas. Sin embargo, la calidad de la suspensión celular está en gran parte determinada por la friabilidad del callo con la cual fue iniciada [10]. El crecimiento de las suspensiones celulares es medido mediante el conteo de células, el volumen celular, peso seco y fresco y de la misma forma, también se puede evaluar la viabilidad de las células contenidas en dicha suspensión [11].



Existen varios estudios en los cuales se lleva a cabo el establecimiento de suspensiones celulares para comprender los efectos que determinadas sustancias tienen en el desarrollo de las mismas. Tal es el caso de lo reportado en el 2001 por Martínez-Estévez y colaboradores quienes retaron suspensiones celulares de *Coffea arabica L* con aluminio para determinar la dosis letal cincuenta y así estudiar los efectos del aluminio en el crecimiento de las células vegetales de *Coffea arabica L*. [12]. De la misma forma, Godoy-Hernández y Loyola-Vargas, establecieron suspensiones celulares pero de *Catharanthus roseus* con el fin de determinar la producción de alcaloides al someter las suspensiones celulares a estrés osmótico provocado por sacarosa-manitol [13].

## **1.2. Las plantas y su relación con el estrés biótico y abiótico**

En general, se puede decir que las plantas normalmente se encuentran sometidas a diferentes condiciones y grados de estrés (biótico y/o abiótico) los cuales repercuten negativamente sobre ellas y afectan su crecimiento, desarrollo, metabolismo, así como la productividad del cultivo. De este modo, la tolerancia o sensibilidad que presenten las plantas a diferentes tipos de estrés depende de varios aspectos: la especie, su genotipo, el estadio de desarrollo de la planta, entre otros<sup>1</sup>.

Las reacciones que presentan las plantas a los diferentes tipos de estrés varían dependiendo del tipo, intensidad y periodo de exposición al mismo, repercutiendo finalmente en la germinación de las semillas, en el establecimiento de plántulas, en el número de brotes, en el largo de las raíces, en el enrollamiento y muerte de las hojas, así como en la reducción de su tasa fotosintética, la viabilidad de su polen, así como en el llenado incompleto o reducción de sus frutos<sup>1</sup>.

La respuesta por parte de las plantas ante el estrés abiótico involucra la regulación de diversos genes, los cuales son capaces de mitigar los efectos del estrés y de este modo permitir el desarrollo de tolerancia por parte de la planta a determinados tipos de

---

<sup>1</sup> Mentaberry (2011), Tolerancias a estreses abióticos.  
[http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/2011\\_15%20Resistencia%20a%20estres%20a%20biotico.pdf](http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/2011_15%20Resistencia%20a%20estres%20a%20biotico.pdf)

estrés [14].

Así, el tipo de estrés al que se vea sometida una planta determinará la interacción entre las fitohormonas así como la formación de diversos metabolitos. Tanto el estrés biótico como el abiótico generan en las plantas una serie de eventos que inician con el reconocimiento de una señal, seguido de la síntesis de un mensajero, un cambio en el flujo de iones, la acumulación de especies reactivas del oxígeno, la fosforilación de determinadas proteínas para finalmente derivar en la transcripción de ciertos genes requeridos para la síntesis de ácido abscísico (ABA), jasmonato, etileno entre otros, que le permitan a la planta responder o adaptarse.

Existen en la literatura varios ejemplos de plantas que han sido expuestas a diversos tipos de estrés, con el fin de conocer la respuesta de las mismas ante tales condiciones:

De este modo, se ha reportado que en arroz, bajo condiciones de estrés en el medio (ácido abscísico, sal o manitol), sobre expresa una proteína, que actúa como inductor de la transcripción de genes relacionados al estrés [15].

También hay reportes en donde *Triticum aestivum L.* y *Medicago sativa L.*, fueron expuestas a temperaturas bajo cero, observándose un incremento de putrescina de entre seis y nueve veces en comparación con su concentración original; siendo este un aumento reversible [37].

Renaut en el 2005 reportó que cuando *Populus tremula* era expuesta a temperaturas de 4°C, experimentaba una reducción en la eficiencia de su tasa fotosintética, sin embargo pasada una semana de exposición al tratamiento, se iniciaba una acumulación de compuestos osmoprotectores como carbohidratos, así como de indicadores de estrés en plantas como la putrescina [16].

### 1.3. *Jatropha curcas* y su exposición a distintos factores que afectan su viabilidad

*J. curcas* es un arbusto que pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, su distribución se extiende a los trópicos y subtrópicos [17]. Esta planta se puede propagar por semilla o por esquejes. *J. curcas* vive hasta 50 años y fructifica anualmente por más de 30 años [18].

Los efectos del estrés sobre los cultivos energéticos como los no energéticos pueden afectar a la planta tanto en el aspecto molecular (cambios en la expresión de genes, síntesis de proteínas, etc.) o en el aspecto bioquímico (cambios celulares y biológicos)<sup>1</sup>.

Uno de los cultivos energéticos que se ven expuestos a los efectos de diferentes tipos de estrés es *J. curcas*.

De acuerdo con Jongschaap *et al.*, [18] *J. curcas* posee una serie de atributos, los cuales, no necesariamente han sido probados científicamente o no se encuentran incluidos dentro de todas sus accesiones.

1. Crece en suelos marginales.
2. Tiene un buen crecimiento en condiciones salinas.
3. Es tolerante a la sequía.
4. Sus semillas tienen un alto contenido de aceite.
5. Su aceite es de alta calidad.
6. Es tolerante y resistente a plagas y enfermedades.

Los puntos mencionados anteriormente son algunos de los que deben fundamentarse científicamente, para así tener atributos comprobados y homogéneos en la población de *J. curcas* en. Por ejemplo, *Jatropha* como la mayoría de los cultivos, sin un adecuado suministro de nutrientes, agua y condiciones ambientales, no es capaz de producir altos rendimientos de aceite por largos periodos [19].

Con base en la observación de plantaciones aisladas de *J. curcas*, se ha asumido que esta planta posee cierta resistencia a enfermedades, sin embargo, en México se ha observado lo contrario pues *J. curcas* ha mostrado tener susceptibilidad a las enfermedades, por ejemplo bajo ciertas condiciones de humedad, se han registrado serios problemas relacionados con ataques por hongos [18].

En el año 2007 se reportó por primera vez que se habían detectado una serie de signos en varios cultivos de *J. curcas*: hojas amarillentas, hojas caídas, ennegrecimiento y descomposición de la región de la planta conocida como collar, pudrición de la raíz, seguido de la muerte de la plantas en los casos más severos, el hongo causante de este padecimiento es *Lasiodiplodia theobromae* [20].



**Figura 1.1. Plantación de *Jatropha curcas*, perteneciente a la empresa Kekén, Yucatán, México. Nov 2008.**

Por otro lado, las bajas temperaturas también afectan a los cultivos en diferentes estadios del desarrollo de las plantas, ya sea a nivel de la germinación, crecimiento o reproducción<sup>1</sup> (Figura 1.1.). Del mismo modo, para el caso de *J. curcas*, ésta sólo es capaz de soportar cortos periodos de heladas. Por lo tanto, aspectos tales como el estrés abiótico en el caso del frío o las sequías, limitan el rendimiento de las diferentes

accesiones de *J. curcas*<sup>2</sup>.

Como ya se ha mencionado anteriormente, *J. curcas* es una planta que prefiere las altas temperaturas de los trópicos y subtropicos; sin embargo, dicha planta también puede crecer a bajas temperaturas, como se ha visto en plantaciones de Zimbabwe y Vietnam; lamentablemente no existe información relacionada con la producción o calidad de sus semillas<sup>3</sup>.

---

<sup>2</sup>Chávez, R. (2009). Transferencia de genes de precocidad y tolerancia al frío a poblaciones híbridas de maíz en zonas alto andinas del sur del Perú. IDESIA 27(1).

<sup>3</sup> Henning, R.K. (2009) The *Jatropha* system: an integrated approach of rural development. <http://jatropha.net/documents/The%20Jatropha%20Book-2009.pdf>

#### **1.4. Las plantas y las repercusiones a causa del frío**

Las bajas temperaturas son un factor medioambiental muy importante que restringe la distribución geográfica de las plantas y es este factor el que conlleva a dos aspectos:

1. La influencia del estrés por frío en las plantas se ve reflejado en el rendimiento de los cultivos [21].
2. El estrés que causa el frío en las plantas, desencadena entre otras muchas cosas, cambios en la regulación de genes, culminando en la aclimatación y tolerancia de la misma al frío [22].

La temperatura es un factor abiótico que limita el crecimiento y desarrollo de las plantas y en especial de aquellas plantas que han evolucionado en climas tropicales o subtropicales, las bajas temperaturas, entre 0 y 12 °C, llegan a causar severas limitaciones en dicho crecimiento; a esta clase de afección se le conoce con el nombre de daño por frío [23].

El daño por frío que llegan a sufrir las plantas, puede ocurrir bajo circunstancias

tales como en el caso de una planta cuyo origen son los trópicos o subtropicos y sin embargo, es plantada en un área que no obedece a estas características de clima o cuando la misma, es expuesta a bajas temperaturas fuera de temporada [23].

La susceptibilidad de las plantas hacia los daños ocasionados por bajas temperaturas no necesariamente es igual para todos los integrantes de una especie ya que son diferentes factores los que determinan la intensidad, forma y susceptibilidad al daño. Uno de estos factores es la variabilidad genética de las plantas dentro de los integrantes de una misma especie, puede haber variaciones en términos de la susceptibilidad a ciertos daños, duración de la exposición e intensidad de las bajas temperatura. Por lo tanto es recomendable la selección de cultivares de las especies que presenten una mayor tolerancia al frío [24].

### **1.5. Estrés osmótico**

Las altas concentraciones salinas, el frío y la sequía son algunos de los ejemplos de estrés abiótico al que con frecuencia se ven sometidos los cultivos de plantas, y los cuales habrán de afectar su crecimiento y productividad [25]. El estrés provocado por la salinidad, el frío y la sequía, se encuentran interconectados puesto que afectan la relación de agua en la planta, tanto a nivel celular como a nivel de todo el organismo [26], ocasionando una serie de reacciones que habrán de conducir a cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares [27].

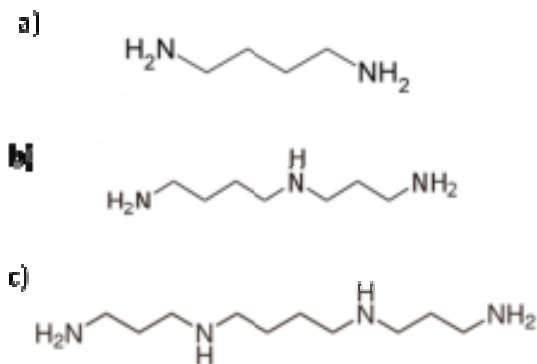
El estrés producido por la salinidad, la sequía o el frío, producen deshidratación en la planta lo cual desencadena un ajuste del potencial osmótico de las células logrando un equilibrio entre el potencial interno y externo de las células [28].

Como ya se ha mencionado anteriormente, la exposición de las plantas a condiciones abióticas adversas, estimulan el uso de mecanismos que contrarresten dicho estrés, como son los cambios fisiológicos y el aumento de la expresión de genes asociados al estrés, desencadenando así la síntesis de una gran variedad de metabolitos de baja masa molecular, osmolitos y proteínas [29].

Algunos de los osmolitos que son sintetizados durante condiciones de estrés osmótico son trealosa, manitol, mio-inositol, prolina y poliaminas (PAS) entre otros los cuales se acumulan en concentraciones tales que permiten mantener el potencial osmótico, el balance iónico, la integridad de la membrana, los niveles de radicales libres así como la protección de la cromatina [29].

### 1.6. Poliaminas en plantas y su relación con la exposición al frío

Las PAS son aminas alifáticas de baja masa molecular, que se presentan de manera natural en las plantas. Las PAS que mayormente se encuentran en las plantas son la putrescina (put), la espermina (spm) y la espermidina [30] [30], [31], [32] (Figura 1.2.).



**Figura 1.2. Poliaminas. a) Putrescina, b) espermidina y c) espermina.**

De acuerdo con Evans y Malmberg, las PAS juegan un papel muy importante en el desarrollo de las plantas, aún no definida del todo, dicha relación es con los procesos de control del desarrollo de las plantas, su senescencia, así como con las respuestas que presentan las plantas a diversos tipos de estrés [33]. Aunado a esto, la síntesis de PAS depende en gran medida de las condiciones externas de luz, temperatura, pH, salinidad etc., a las que son sometidas las plantas [34]. Así, el estrés provocado por el frío, la salinidad y la sequía, de acuerdo con Beck, se encuentran relacionados entre ellos y a su

vez, éstos afectan la relación del agua tanto a nivel celular como a nivel de la planta [28].

Las PAS se encuentran de manera natural en las plantas en tres formas:

- PAS libres (solubles en agua).
- PAS conjugadas con ácido ferúlico o hidroxicinámico (solubles en ácido).
- PAS unidas a lípidos, proteínas o ácidos nucleicos (no solubles en ácido).

Puede haber interconversiones entre las diferentes formas de PAS; adicionalmente, se sugiere que esto contribuye a mantener niveles adecuados de PAS libres durante procesos del desarrollo [35].

Diversos autores han propuesto una serie de posibles funciones o acciones de las PAs, dentro de las que destacan las siguientes:

1.- Participan en el término de la división celular en algunas células de plantas superiores [36].

2.- Son compuestos esenciales para el crecimiento y desarrollo de los organismos. Debido a que las PAS, a pH fisiológico, tienen carga positiva, éstas les permite unirse a los fosfolípidos de la membrana de las células; hecho que las convierte en participantes en la transducción de señales tal y como lo sugiere en el trabajo de Echevarría-Machado *et al.* (2005), en el que las PAS podrían ser las causantes de la modulación en la respuesta celular, al afectar los componentes de la cascada de los fosfolípidos en células de *C. arabica* [37].

3.- La unión o asociación a macromoléculas dentro de la célula o moléculas aniónicas, tales como el ADN o ARN, los fosfolípidos o inclusive a algunas proteínas; esto debido a la forma catiónica que presentan las PAS a pH celular.<sup>2</sup>

4.- Posiblemente, las PAS sean una clase de reguladores de crecimiento o

---

<sup>2</sup> Cohen, S.S. (1971). Introduction to the polyamines. Chapter book. Prentice Hall. Englewoods Cliffs, N.J.



mensajeros hormonales secundarios [38].

5.- La relación de la biosíntesis de PAS y la embriogénesis somática en diversas plantas tales como *Daucus carota* [31], *Araucaria angustifolia* [39], entre otras.

De este modo, existen varios reportes que relacionan los niveles de PAS con la respuesta de las plantas a diversos tipos de estrés tal y como se pone de manifiesto en la siguiente tabla (Tabla 1.1.):

**Tabla 1.1. Niveles de PAS en plantas y su relación con el estrés**

Especie	Explante	Tratamiento	Resultado	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Medio de cultivo	Frío 4 °C	<b>Put libre</b> = de 5 a 20 nmol/g PF <b>Spd libre</b> = SC* <b>Spm libre</b> = de 2.5 a 1 nmol/g PF	[40]
<i>Cucumis sativus</i> L.	Hoja	Frío 3 °C	<b>Put</b> = SCS* <b>Spm</b> = SCS* <b>Spd</b> = de 330 a 500 nmol/g PF	[41]
<i>Medicago sativa</i> L <i>Triticum aestivum</i> L	Hoja <sup>2</sup>	Frío 2 °C	<b>Put</b> = de 40 a 120 nmol/g PF <b>Spd</b> = 30 a 70 nmol/g PF <b>Spm</b> = SC*	[42]
<i>Citrus aurantium</i> L <i>Citrus sinensis</i> L <i>Citrus jambhiri</i> Lush	Hoja <sup>3</sup>	Frío 15.6 °C (día) 4.4 °C (noche)	<b>Put</b> = Incremento del 60% <sup>5</sup> <b>Spd</b> = Incremento de 2 a 3 veces <sup>5</sup> <b>Spm</b> = SCS*	[43]
<i>Avena sativa</i> <i>Avena fatua</i>	Hoja <sup>1</sup>	Estrés osmótico <sup>4</sup>	<b>Put</b> = de 26 a 395 nmol/g PF <b>Spd</b> = 230 nmol/g PF a 260 nmol/g PF	[44]

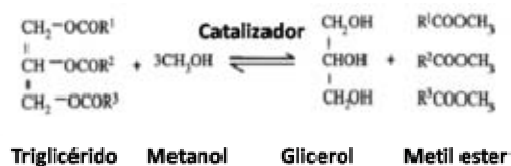
\*SC = sin cambios significativos, <sup>1</sup> Edad de la planta= 7-9 días, <sup>2</sup> Edad de la planta= 2 semanas, <sup>3</sup> Edad de la planta= 9 meses, <sup>4</sup> Estrés osmótico con sorbitol, <sup>5</sup> El incremento es con respecto a sus niveles basales

## 1.7. Biodiesel como recurso renovable

Actualmente el aceite derivado de las semillas de *J. curcas* se emplea para la elaboración del biodiesel [45], mismo que se plantea como una alternativa al petrodiesel [46].

El interés en el uso del biodiesel se ha visto incrementado con el paso del tiempo. En años recientes, se ha levantado una preocupación mundial debida a los altos precios de los combustibles fósiles, la dependencia de distintas naciones a los mismos, así como por el impacto que tienen sobre el medio ambiente [47].

Para lograr la obtención de biodiésel como tal, es necesario someter a los TAG a una reacción química con un alcohol, generalmente metanol, en presencia de un catalizador, ya sea ácido o base, para así obtener un alquil éster (Figura 1.3.) [48].



**Figura1.3. Reacción de transesterificación**

Los ácidos grasos contenidos en el aceite de *J. curcas*, son principalmente los ácidos linoléico y oléico. A continuación se muestra su perfil de ácidos grasos [49].

Ácido graso	% Contenido (m/m)
Ácido mirístico	0.38
Ácido palmítico	16 max
Ácido palmitoleico	1-3.5
Ácido esteárico	6-7.0
Ácido oleico	42-43.5
Ácido linoleico	33-34.4
Ácido linolénico	>0.80
Ácido araquidónico	0.20
Ácido gadoleico	0.12

**Tabla 1.2. Perfil de ácidos grasos de aceite de *Jatropha curcas*.**

El biodiesel presenta una serie de ventajas en comparación con el diesel: proviene de fuentes renovable, es biodegradable, posee un mayor punto de inflamación, lo que le

permite un almacenamiento y transporte mucho más seguro [50], contribuye a la disminución de emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera [46], no contiene azufre [51], posee mayor lubricidad [46] y miscibilidad con el petrodiesel [48]. Sin embargo, posee poca estabilidad ante la oxidación, una fluidez disminuida a bajas temperaturas así como precios mayores en comparación con el diesel [50].

## Justificación

Se sabe que una de las plantaciones de *J. curcas* ubicada en el estado de Yucatán, sufrió defoliación, en parte, debido a un periodo de frío que se registró en el 2009. Por lo tanto, uno de los mitos que se tienen acerca de la resistencia que presenta *J. curcas* al frío, no es del todo cierta. Si bien, la plantación sobrevivió, esta no lo hizo en las mejores condiciones, debido a que experimentó una defoliación masiva de sus hojas; lo que implicó que la planta tuvo que invertir energía y tiempo en la recuperación de su follaje, para así, darle paso a su posterior floración y fructificación. Este hecho, trajo como consecuencia la recolección de una única cosecha en el año siguiente. Por lo tanto, es necesario investigar parámetros biológicos y bioquímicos que nos permitan determinar que tan resistente es *J. curcas* al frío así como generar conocimiento acerca de su cultivo *in vitro*.

## **Objetivo General**

Caracterizar una línea celular de *Jatropha curcas* y determinar el perfil de poliaminas en plantas de *Jatropha curcas* de uno y seis meses expuestas a frío.

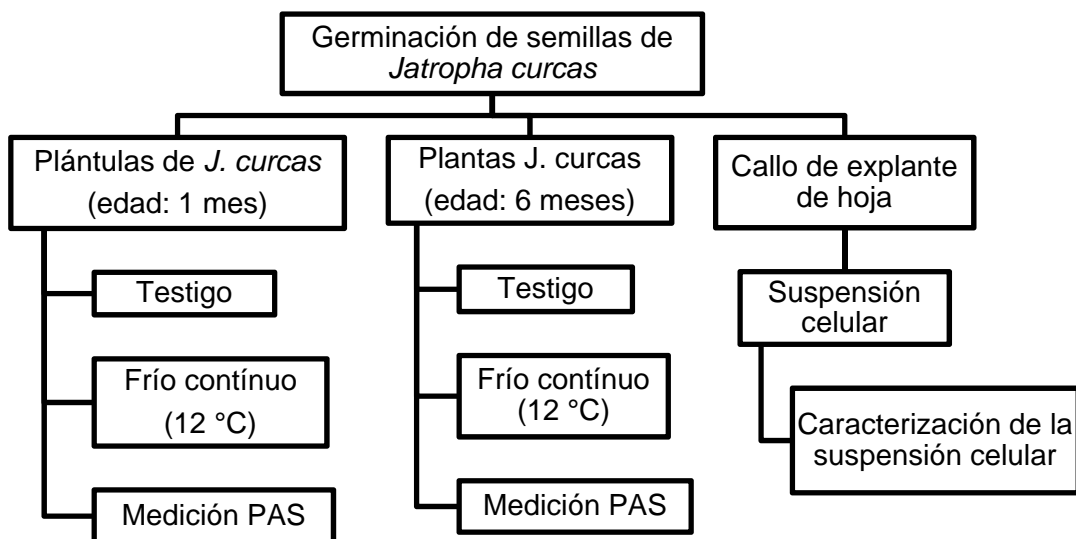
## **Objetivos específicos**

1. Obtener callos de *J. curcas*.
2. Obtener suspensiones celulares de *J. curcas*.
3. Caracterizar una línea de suspensiones celulares
4. Medir el contenido de poliaminas en hojas de plantas de *J. curcas* de uno y seis meses de germinación bajo condiciones de frío (12 °C).



## Capítulo 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Estrategia experimental



### 2.2. Material biológico

#### Obtención de plantas de *Jatropha curcas*

Las semillas de *J. curcas* se sometieron a un proceso de desinfección (ver apéndice uno). Una vez desinfectadas las semillas, en condiciones asépticas se procedió a la extracción del embrión cotiledonar y se sembraron en medio MS libre de reguladores de crecimiento. Pasados dos meses, se tomó una plántula, se llevó a la campana de flujo de aire laminar estéril y se tomó una de sus hojas, a partir de esta hoja y empleando un sacabocados, se tomaron los explantes circulares con un diámetro aproximado de 0.8 mm al presionar el sacabocados contra la hoja. Dicho explante, es necesario para la obtención de callo.

### 2.3. Establecimiento y evaluación de una línea celular en suspensión celular de *J. curcas*

#### Preparación del medio de cultivo

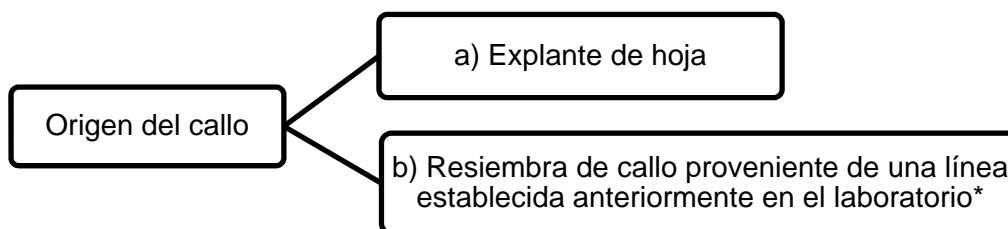
El medio de cultivo que se empleó para la inducción de callo, de explantes de hoja provenientes de plantas cultivadas en condiciones estériles, fue el medio **MS** (ver apéndice seis) + 17.1  $\mu\text{M}$  **AIA** + 13.3  $\mu\text{M}$  **BA**, nombrado de ahora en adelante como medio MS+BA+AIA. La composición del medio de inducción de callo se muestra a continuación:

**Tabla 2.1 Composición del medio de inducción de callo\***

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
Polvo MS	4.33 g/L
Mio-inositol	100 mg/L
Tiamina	4 mg/L
Cisteína	25 mg/L
Ácido nicotínico	1 mg/L
Sacarosa	30 g/L
AIA	17.1 $\mu\text{M}$
BA	13.3 $\mu\text{M}$
Gelrite	2.3 g/L
PPM	1 ml/L

\*Los reguladores del crecimiento empleados fueron seleccionados con base en el trabajo realizado previamente en el laboratorio por el estudiante de ingeniería en industrias alimentarias (IIA) Pedro Xool; siendo esta combinación una de las que mejores resultados presentaron en el desarrollo de callo de *J. curcas* [52].

#### Inducción de callo



**Figura 2.1 Origen del callo.**

\* Línea de callo obtenida por el IIA Pedro Xool en su tesis de licenciatura



Dentro de una campana de flujo de aire laminar estéril y bajo condiciones de asepsia, se cortaron explantes de hojas de *J. curcas* provenientes de semillas germinadas *in vitro*. Los explantes fueron colocados dentro de frascos con 10 ml de medio MS+BA+AIA y puestos a incubar a temperatura ambiente en oscuridad desde enero 2010. Se tomaron fotos cada 7 días de los explantes para observar su progreso.

### **Ciclo de crecimiento de callos en medio MS+BA+AIA**

1. Se pesaron 0.5 g de callo y se colocaron en frascos que contenían 25 ml de medio MS+BA+AIA sólido. Se preparó un total de 33 frascos. Todas las acciones se llevaron a cabo en una campana de flujo de aire laminar estéril.
2. Cada tres días se pesaron los callos de tres frascos para determinar su peso fresco. Las muestras se etiquetaron y se congelaron con nitrógeno líquido.
3. Una vez terminado el ciclo de cultivo, se procedió a liofilizar por 24 h todas las muestras congeladas.
4. Una vez liofilizadas las muestras se determinó el peso seco de las muestras.

También se procedió a realizar el cálculo del tiempo de duplicación (Td) y la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) a partir de los datos de peso fresco del día 21 y 27 del ciclo de cultivo de callo. Las fórmulas empleadas fueron las que a continuación se muestran:

$$\mu = (\ln X_f - \ln X_i) / (T_f - T_i) \text{ y } T_d = \ln 2 / \mu$$

donde:

Xf: peso o concentración final

Xi: peso o concentración inicial

Tf tiempo final

Ti: tiempo inicial

## **Suspensiones celulares**

Para seleccionar los callos que habrían de colocarse en suspensión celulares, éstos se clasificaron según sus características morfológicas, siendo la principal de ellas su friabilidad [7].

Una vez seleccionados los callos friables para las suspensiones celulares, se procedió a la elección del medio. Dicho medio fue el mismo medio MS + 17.1  $\mu\text{M}$  AIA + 13.3  $\mu\text{M}$  BA sin gelrite [17].

Se tomaron 0.5g del callo seleccionado y se colocó en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio líquido en agitación (100 rpm) en condiciones de oscuridad.

Las suspensiones celulares se resembraron cada 15 días [17]; sin embargo, debido a que las suspensiones comenzaron a tornarse color café, se decidió cambiarles el medio de cultivo cada 10 días. Después de un periodo de cuatro meses, se seleccionaron las suspensiones celulares cuyos conglomerados celulares se encontraron más dispersos.

Se procedió a realizar el ciclo de cultivo de las suspensiones celulares en el que se midieron los siguientes parámetros:

- Peso fresco.
- Peso seco.
- Paquete celular.
- Número de células.
- Conductividad.
- pH.

*Medición del crecimiento celular [5]*

1. En una campana de flujo de aire laminar estéril se filtró el contenido de varios matraces.
2. Se decantaron varios matraces de suspensiones celulares, el residuo sobrante en el fondo de cada matraz se colocó en un mismo tubo Eppendorf de 50 ml, el cual fue llevado a centrifugación por 2 min a 1700 rpm, se desechó el sobrenadante. Una vez que se tuvieron 15 ml de paquete celular libre de sobrenadante, éste se resuspendió en 15 ml de medio medio MS+AIA+BA. A cada uno de los 30 matraces de 250 ml que contenía 49 ml del mismo medio nuevo y esterilizado, se le agregó 1 ml de la suspensión concentrada.

3.- Cada tercer día se tomaron al azar tres matraces y se procedió a la medición de los siguientes parámetros: Todos los procedimientos que a continuación se mencionan, se realizaron por triplicado y cada tercer día por un periodo de 30 días.

#### Peso fresco

1. Se tomó uno de los matraces del ciclo de cultivo y se procedió a filtrarlo.
2. Con una espátula se retiró el material filtrado para pesarse sobre papel aluminio y así registrarse como peso fresco.
3. Una vez que el filtrado se pesó, se guardó en el papel aluminio. Una vez realizada esta acción, cada muestra se almacenó en nitrógeno líquido.

#### Peso seco

Una vez terminado el ciclo de cultivo, se procedió a liofilizar por 24 h todas las muestras que se habían almacenado en nitrógeno líquido. De este modo al terminar el proceso de liofilizado, se habrá retirado de la muestra el agua presente en el material, procediendo a pesar la muestra y determinando así su peso seco.

### *Conteo de células.*

Consistió en el conteo de células de una suspensión celular. Se requirió de una previa separación de los agregados celulares, mediante el uso de trióxido de cromo al 8% como a continuación se describe:

1. Se tomó una alícuota de un ml de la suspensión celular y se le adicionaron 2 ml de trióxido de cromo al 8% dentro de un tubo de ensaye y se agitaron por 5 minutos en un vortéx.
2. Se calentaron los tubos en baño María por 15 minutos a 70 °C; terminado este tiempo, se agitaron nuevamente por 15 minutos.
3. Se observaron las células al microscopio empleando un hemocitómetro y del total de cuadrantes, sólo se usaron cinco de ellos para el conteo de las mismas.
4. Se procedió a calcular el número total de células presentes en los cinco cuadrantes para ser multiplicados por  $10^4$  (factor de dilución del hemocitómetro) y luego por 3 (esto debido a la relación muestra: trióxido de cromo 1:3)

### Paquete celular

Se tomó un matraz del ciclo de cultivo y se agitó, para así homogeneizar su contenido. Se tomaron 10 ml de la suspensión celular y se colocaron en un tubo tipo Falcon graduado para ser centrifugados a 3,500 rpm durante 15 min. Una vez concluido este tiempo, se midió el volumen que ocupaba el paquete celular. Finalmente, estos 10 ml fueron devueltos al matraz para que pudiesen ser incluidos en las mediciones de peso fresco y seco.

### pH

Una vez que se filtró la suspensión celular, se procedió a medir el pH del filtrado.

Para ello se empleó un potenciómetro marca Beckman.

#### Conductividad

De la misma manera que en el caso de la medición del pH, se midió la conductividad del filtrado. Para ello se empleó un conductímetro marca Eppendorf.

#### Tiempo de duplicación (Td) y velocidad de crecimiento ( $\mu$ )

Se emplearon las mismas fórmulas para el cálculo de Td y  $\mu$  que en el caso del cultivo de callo de *J. curcas*. Los datos de peso fresco empleados para dicho cálculo fueron los pertenecientes a los días 9 y 15 del ciclo de cultivo.

#### **Embriogénesis somática**

La metodología que se siguió una vez que se observó el desarrollo de embriones de *J. curcas* a partir de explante de hoja en medio **MS** + 17.1  $\mu$ M **AIA** + 13.3  $\mu$ M **BA** durante seis meses fue la que a continuación se describe:

- 1.- Los embriones inmaduros se colocaron en medio de germinación durante 15 días. Ver apéndice tres [53].
- 2.- Los embriones maduros se colocaron en medio de maduración, hasta que se desarrollaron plántulas de aproximadamente 0.2cm. Ver apéndice cuatro [53].
- 3.- La mitad de las plántulas se trasplantaron a medio MS sin fitoreguladores y la otra mitad a medio MS media fuerza [54], hasta que las plantas alcanzaron una altura aproximada de 0.5cm. Ver apéndice 6.
- 4.- Finalmente, las plántulas se colocaron en medio de enraizamiento, ver apéndice cinco. Ver apéndice cinco.

## 2.4. Exposición al frío en plántulas cigóticas de *Jatropha curcas*

### Germinación de semillas de *J. curcas*

Se tomaron semillas maduras de plantas de *J. curcas* cultivadas en el CICY. Posteriormente se procedió a desinfectar las semillas tal y como se muestra en el siguiente diagrama:

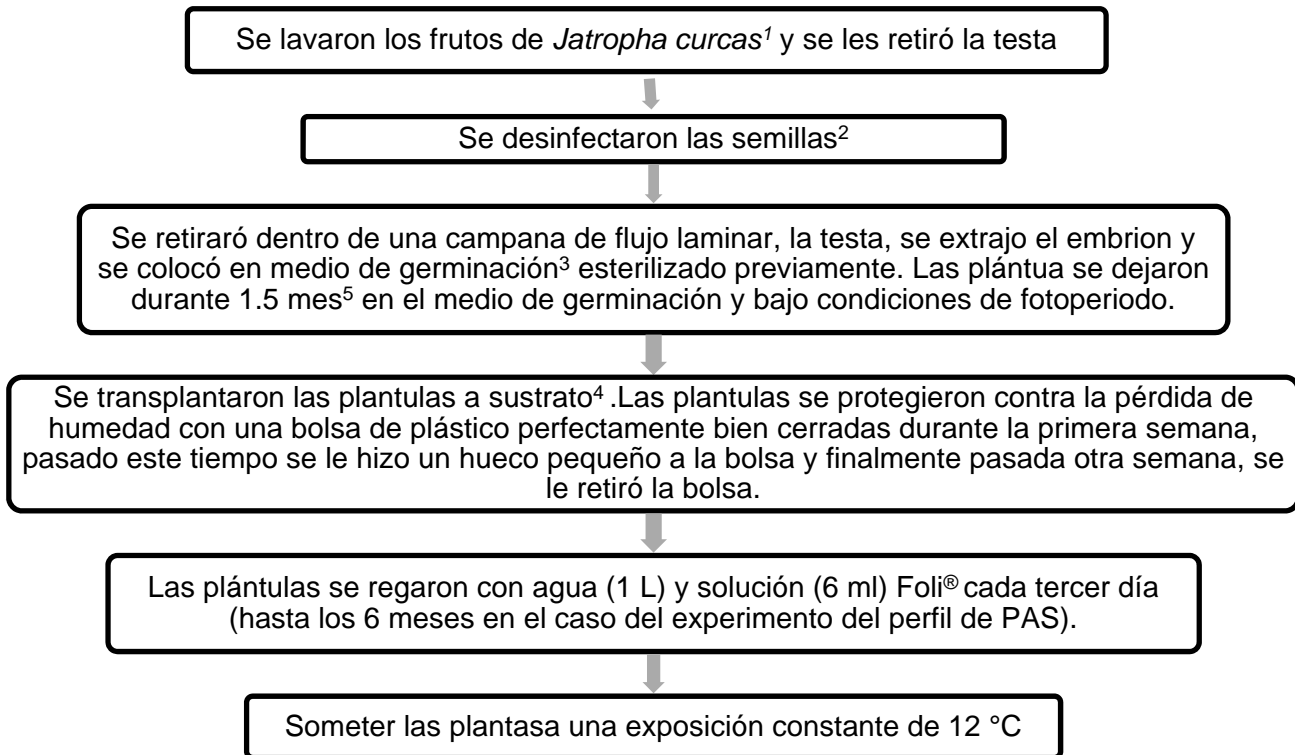


Figura 2.2 Metodología para la germinación de semillas de *Jatropha curcas*.

<sup>1</sup>Procedencia: Plantas del CICY.

<sup>2</sup>Anexo

<sup>3</sup>Anexo

<sup>4</sup> Composición del sustrato = 3:1:1 ( tierra:vermiculita:agrolita) <sup>5</sup> Para el experimento del perfil de PAS en plántulas de *Jatropha curcas* de 1 mes de edad, sólo se esperó un mes y fueron divididas en dos grupos y sometidas a 25°C y a 12°C.

Para el experimento observacional de plantas de *Jatropha curcas* sometidas a 25°C y 12°C, se esperó a que las plantas alcanzaran una altura aproximada de 8 a 9 cm,

se formaron dos grupos de 5 plantas cada uno, de los cuales, el primer grupo se mantendría a temperatura ambiente (25 °C), mientras que el segundo grupo se expondría a una temperatura constante de 12 °C por 21 días. A lo largo del proceso anteriormente mencionado, se llevó un registro fotográfico del experimento para ver la afectación que habrían de sufrir las plantas debido al frío.

## 2.5. Determinación de poliaminas en plantas de *J. curcas*

Se formaron dos grupos diferentes de plantas de acuerdo al tiempo de germinación en el cual se sometían a los diferentes tratamientos:

**Tabla 2.2. Aplicación de tratamientos y réplicas**

Nombre del grupo	Grupo 1		Grupo 2	
Edad de las plantas	1 mes		6 meses	
Tratamiento	Testigo (25 °C)	Frío continuo (12 °C)	Testigo (25 °C)	Frío continuo (12 °C)
Número de plantas (Réplicas)	21	21	1	1
Número de hojas por planta	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	6 <sup>b</sup>	6 <sup>b</sup>
Número de muestras por hoja (Réplicas)	1	1	3	3

<sup>a</sup>Hojas cotiledonares

<sup>b</sup>Hojas verdaderas

El procedimiento para realizar la extracción y cuantificación de PAs se realizó con base en la metodología originalmente reportada por Tiburcio et al. [55]; sin embargo, se le realizaron ciertas adecuaciones. Como a continuación se describe:

Se pesaron y se molieron 0.2g de hoja de *J. curcas* empleando nitrógeno líquido. Se agregó 1ml de ácido perclórico 5% (PCA). La mezcla se filtró y se dejó reposar por 30min (en hielo), para posteriormente centrifugarse por otros 30min (4°C y 14,000 rpm). Del sobrenadante se tomaron dos alícuotas (250µl c/u), las cuales correspondían a las PAs conjugadas y PAs libres que posteriormente se hidrolizaron y dansilaron respectivamente. La pastilla se resuspendió con NaOH (mismo volumen que el sobrenadante) y se tomó una alícuota de 250µl, siendo esta la correspondiente a las PAs unidas. Esta muestra también fue hidrolizada.

En una campana de extracción a las muestras de PAs unidas y conjugadas (en viales de vidrio) se le agregaron 250µl de HCl. Los viales de vidrio se sellaron (al calor del mechero) y se llevaron a una estufa a 110°C por 18hrs para su hidrólisis, pasado este tiempo, las muestras se filtraron y se pusieron a secar en un baño seco a 110°C.

Cada uno de los estándares de PAs se prepararon por separado de la siguiente manera: se pesaron Put (30-40mg), Spd (10-20mg), Spm (10-20mg) y cada uno se disolvió y aforó en un matraz volumétrico de 25ml. Se procedió a hacer una mezcla de las tres soluciones de PAs tomando 250µl de cada solución y aforando a 25ml. Se tomaron diferentes volúmenes de alícuotas de la mezcla (0, 50,100, 200 y 250µl) y cada nueva solución se llevó a un volumen final de 250µl con PCA 5%.

Las muestras de PAS unidas y conjugadas (previamente hidrolizadas y adicionadas con 250 µl de PCA 5%), los estándares y la muestra de Pas libres se procedieron a dansilar, para esto a cada muestra y cada estándar se le adicionaron 400µl de cloruro de dansilo y 250µl de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturada y se guardaron en condiciones de oscuridad por 16 hrs a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación se agregaron 100µl de prolina a cada muestra y estándar y posteriormente se guardaron en oscuridad por 30min. Se agregaron 250µl de benceno a cada muestra y se agitaron por 15seg (PAs-dansiladas). A continuación se tomaron 25µl la fase superior de cada muestra y estándares y se colocaron en cada uno de los carriles de una placa de cromatografía de capa fina (Whatman LK6D). La placa se introdujo en una cámara de cromatografía previamente saturada por 2hrs con una mezcla de 50ml de cloroformo y 4 ml de trietilamina.



Las placas de cromatografía se leyeron en un equipo Shimadzu Dual-wavelength Chromato Scanner CS-930 a una longitud de onda de 365 nm. Tres réplicas por cada análisis fueron realizadas.

En las siguientes figuras (figura 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 y 2.9) se muestra el procedimiento de un modo en el que facilita la ejecución de la metodología para la determinación de PAs:

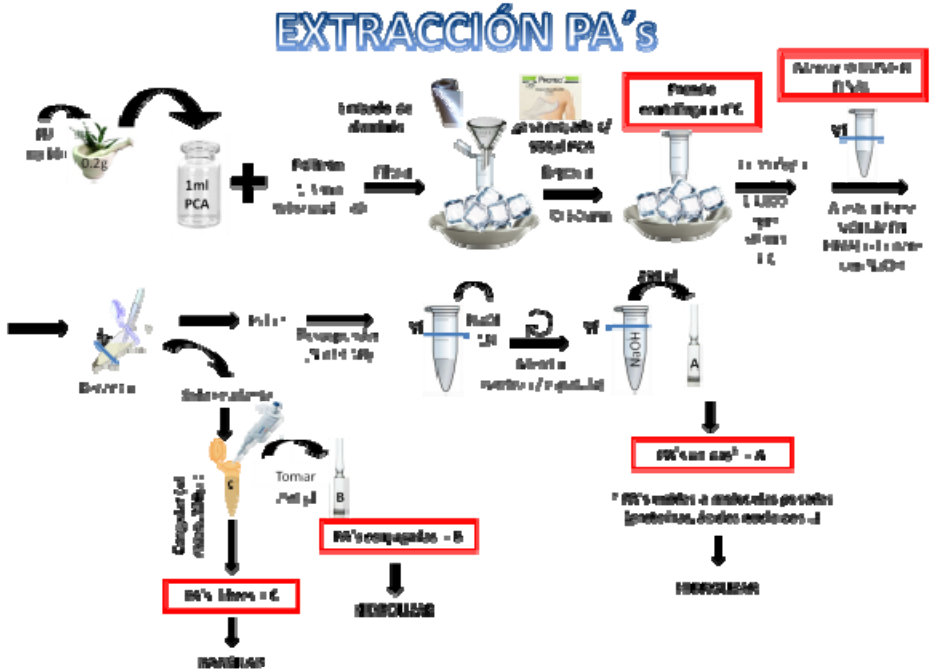


Figura 2.3. Extracción de PAS

# HIDRÓLISIS PA's

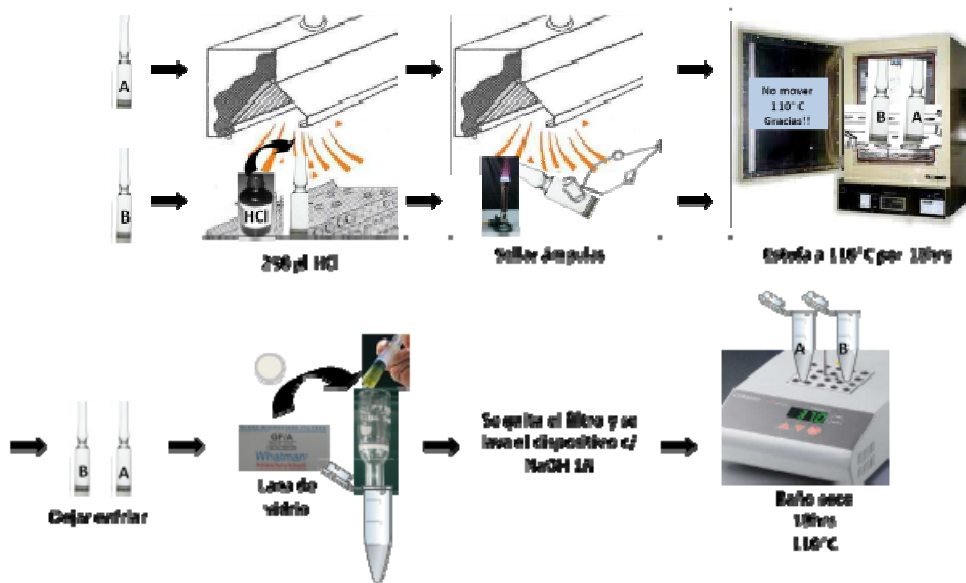


Figura 2.4. Hidrólisis de PAS

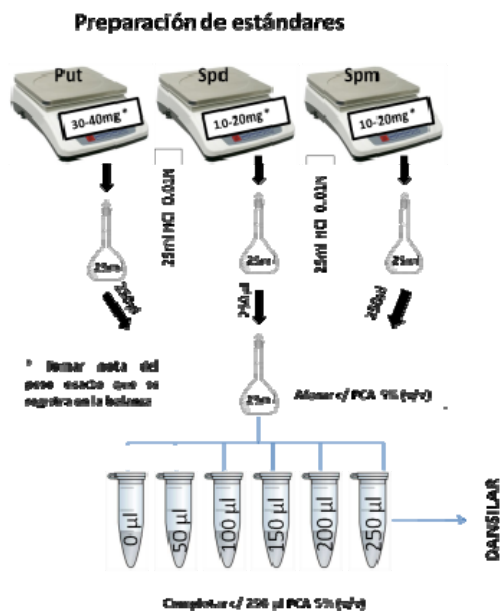


Figura 2.5. Preparación de estándares de PAS

## DANSILACIÓN PA's

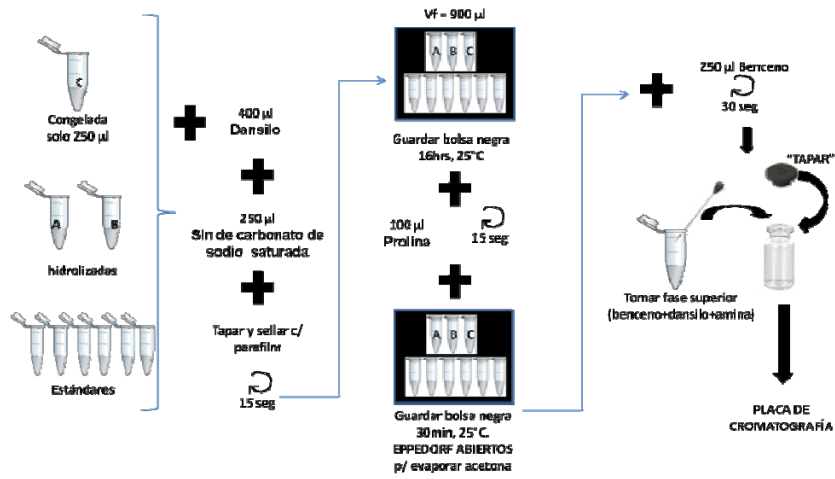
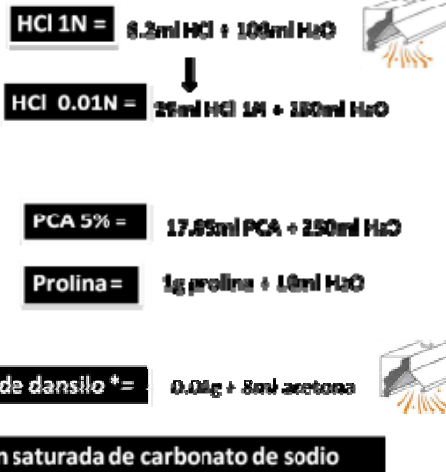


Figura 2.6. Dansilación de PAS

### Preparación de soluciones



\* Preparar en el momento de usarse y guardar en oscuridad y cerrado con agitador.

Figura 2.7. Preparación de cámara de cromatografía

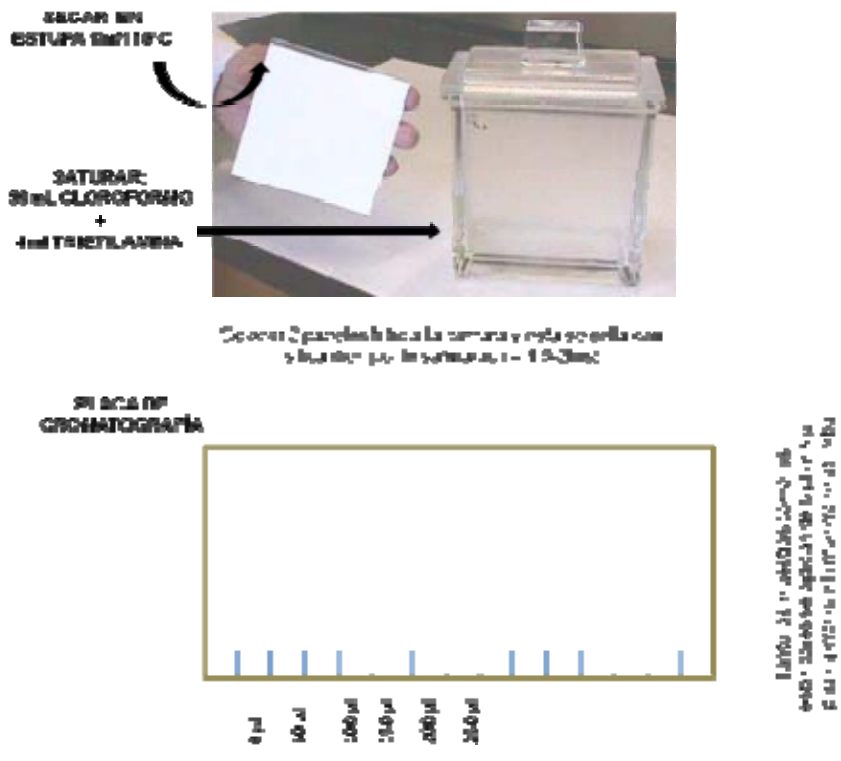


Figura 2.8. Preparación de soluciones para extracción de PAS

## Capítulo 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Germinación de semillas de *Jatropha curcas*

La elección correcta del explante para iniciar el cultivo de tejidos tiene una gran importancia en el éxito del mismo. Debido a esto, la planta que se elija para dichos fines, habrá de estar libre de contaminación [56].

Por lo tanto, para llevar a cabo la presente investigación se obtuvieron plantas de *J. curcas* a partir de la germinación de semillas (Figura 3.1.). El primer lote de semillas que se germinaron, se obtuvo de la plantación de Kuosol ubicada en el estado de Yucatán, México. El segundo y tercer lote de plántulas se obtuvieron a partir de semillas obtenidas de la plantación del CICY. En la siguiente figura se muestra el procedimiento general de la germinación de semillas de *Jatropha curcas*.

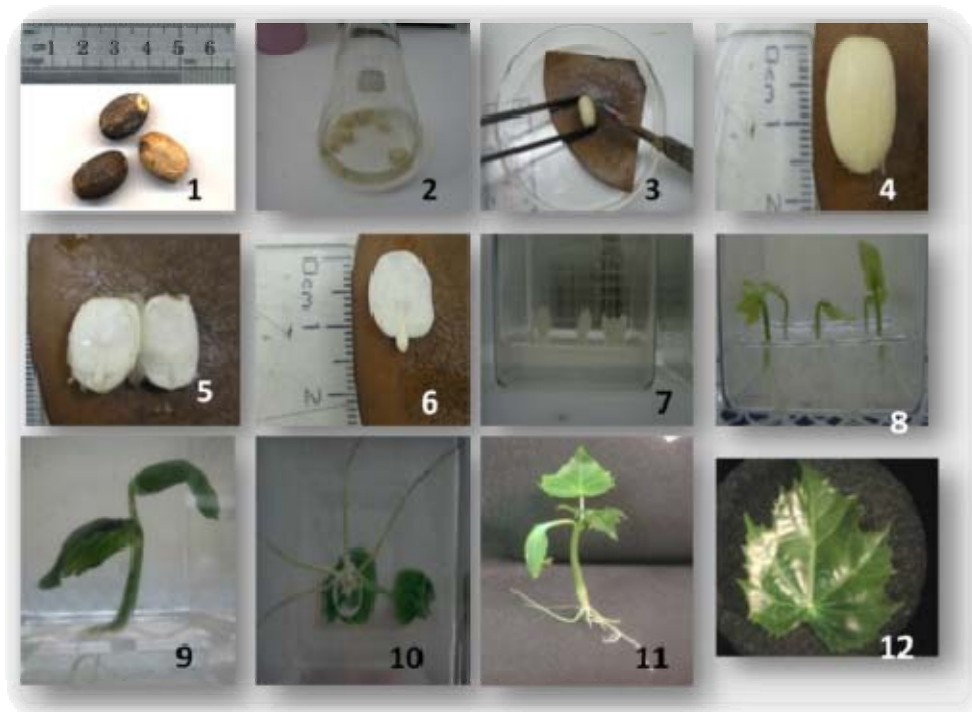
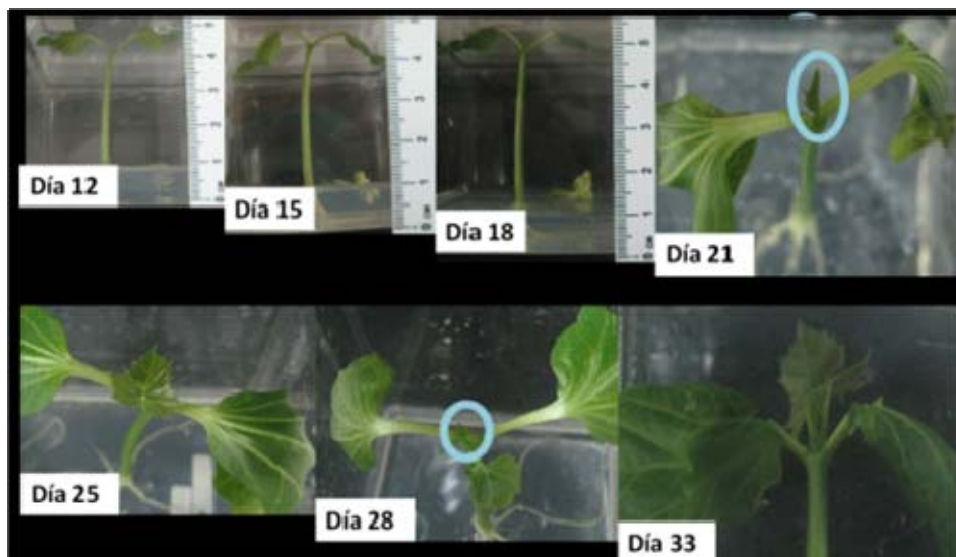


Figura 3.1 Germinación de semillas de *Jatropha curcas*.

Se hizo un seguimiento del desarrollo de las plántulas de *J. curcas*, el cual se muestra en la Figura 3.2:



**Figura 3.2 Desarrollo de plántulas de *Jatropha Curcas*.**

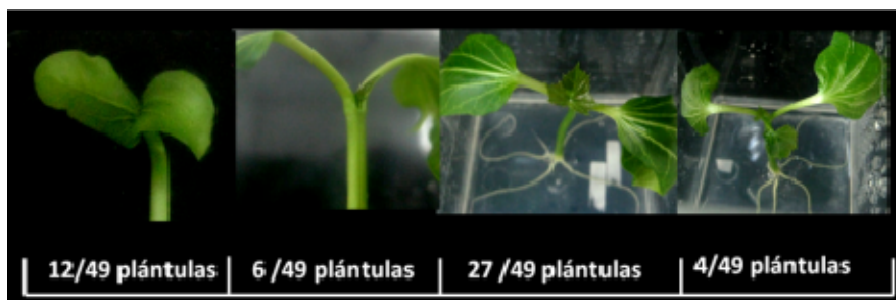
Para comenzar a describir las características que se observaron durante este proceso de seguimiento fotográfico, se partió de 70 embriones cigóticos de semillas de *J. curcas* almacenadas a temperatura ambiente, los cuales fueron colocados en cajas magenta con 40 ml de medio MS; al término de tres semanas se obtuvo la germinación exitosa\* del siguiente número de embriones:

\*Se consideró como germinación exitosa, todas aquellas plantas que pasadas las tres semanas de edad, ya habían desarrollado raíz.

**Tabla 3.1. Edad de las semillas de *Jatropha curcas* y su capacidad de germinación**

Edad de las semillas	Procedencia de las plantas	Número de plantas obtenidas
1 año	CICY	36/70
1 año	CICY	49/70
Recién cosechadas de frutos maduros	CICY	48/70

A los 21 días de germinados los embriones, se obtuvo la relación con respecto al número de hojas que poseían las plantas, tal y como se ve en la Figura 3.3.



**Figura 3.3 Proporción de plantas de *Jatropha curcas* en relación al estado de desarrollo de un grupo de 49 plántulas a lo largo de 21 días.**

Al inicio del día dos se comienza a observar en la mayoría de los embriones la elongación de la raíz. Ya al final del día tres es cuando se puede observar la forma característica de “cruz” de la raíz. Como es de esperarse, con el paso de los días las plántulas siguen elongando sus raíces y se hacen más delgadas y frágiles. Se puede decir que alrededor de los días 15 y 18 disminuye la velocidad de elongación de su hipocotilo, debido a que la planta se está preparando para el desarrollo de su primer par de hojas verdaderas. A continuación se muestra la descripción de los eventos ocurridos durante la germinación de semillas de *J. curcas*:

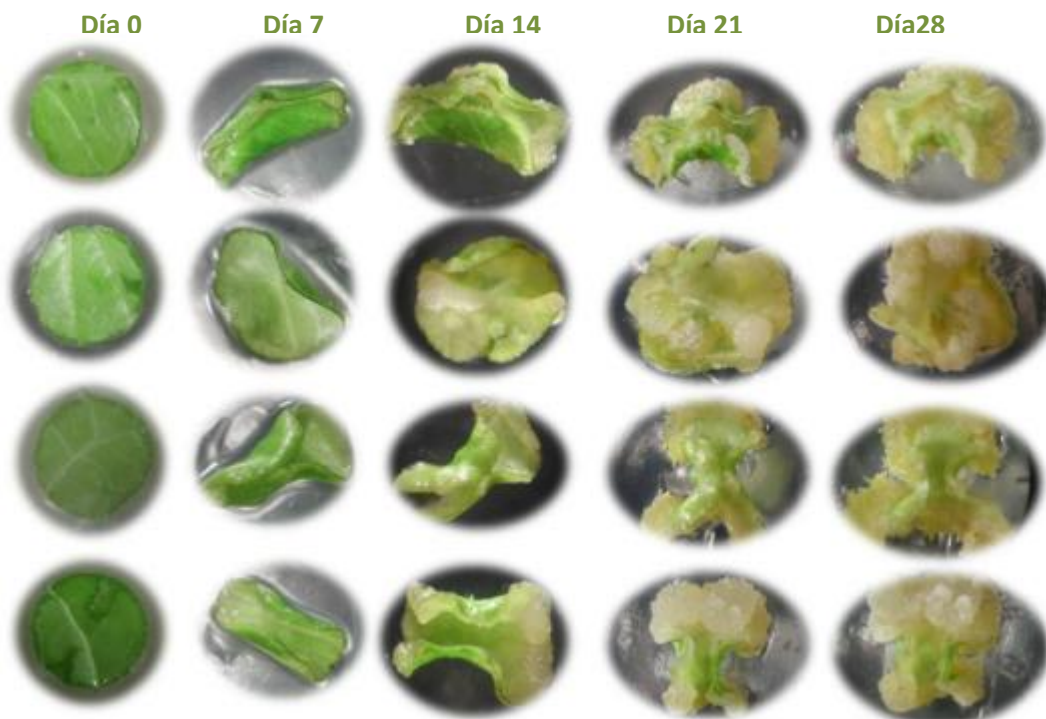
**Tabla 3.2. Descripción de los eventos ocurridos durante la germinación de semillas de *Jatropha curcas***

Día	Altura (cm)	Características
1	1 cm	Al final de este día comienzan a desdoblarse las dos hojas cotiledonares.
3	2 cm	Aparece la raíz característica en forma de “X”.
5	2.4 cm	La raíz sigue creciendo.
7	3.9 cm	Las hojas cotiledonares comienzan a elongarse
9	5 cm	Es cuando se observa la mayor elongación del hipocotilo, logrando casi duplicar su tamaño.
12	5.2 cm	-
13	5.2 cm	A causa de lo delgadas que se vuelven sus raíces, al tratar de retirar la planta del medio semisólido, sus

		raíces tienden a quebrarse.
15	5.2 cm	Entre el día 15 y 18, la planta disminuye la velocidad de elongación de su hipocotilo.
21	5.3 cm	Comienza la aparición del primer par de hojas verdaderas.
28	5.4 cm	Comienza el crecimiento del segundo par de hojas verdaderas.

### 3.2. Inducción de callo

Empleando explante de hoja de plántulas cigóticas de *J. curcas*, se llevó un registro fotográfico del crecimiento de callo en dicho explante, durante su primer mes, en un medio sólido MC en condiciones de oscuridad y a 25 °C. El día cero se consideró como el día en el cual se tomó el explante de hoja y se colocó en el medio MC.

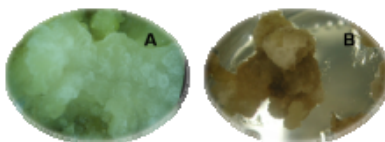


**Figura 3.4. Crecimiento de callo en explante de hoja de *Jatropha curcas*.**

Con el paso de los meses y las continuas transferencias para el mantenimiento de



los callos (cada 30 días), se comenzaron a notar cambios en la coloración y textura de los callos; diferenciándose principalmente dos tipos de callo (Figura 3.2):

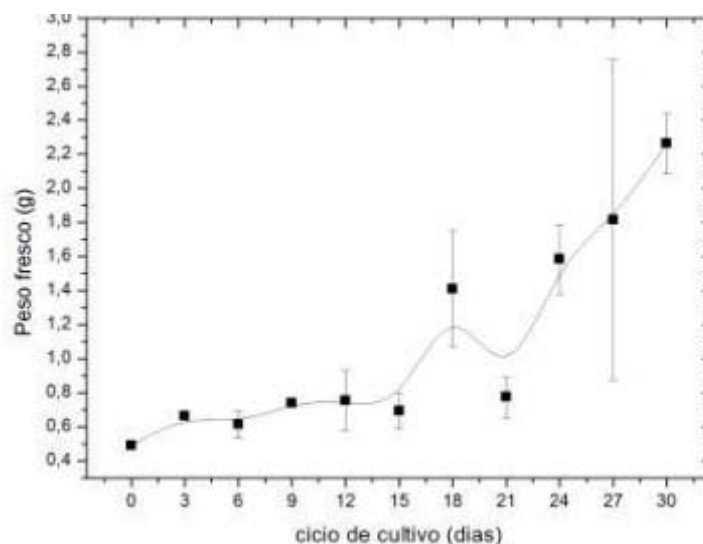


**Figura 3.5. A. Callo blanco B. Callo amarillo**

### 3.3. Ciclo de cultivo de callos de *J. curcas*

Se graficaron los parámetros de crecimiento del cultivo de callo de *J. curcas*. El ciclo finalizó al cabo del día 30. Se midieron los pesos seco y fresco y se calculó el error estándar. Se calcularon los parámetros de tiempo de duplicación ( $T_d$ ) y velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) a partir de los valores correspondientes a la etapa lineal del ciclo de crecimiento (de los días 21 y 27):

$$T_d = 5.3 \text{ días}, \mu = 0.13 \text{ g/día}$$

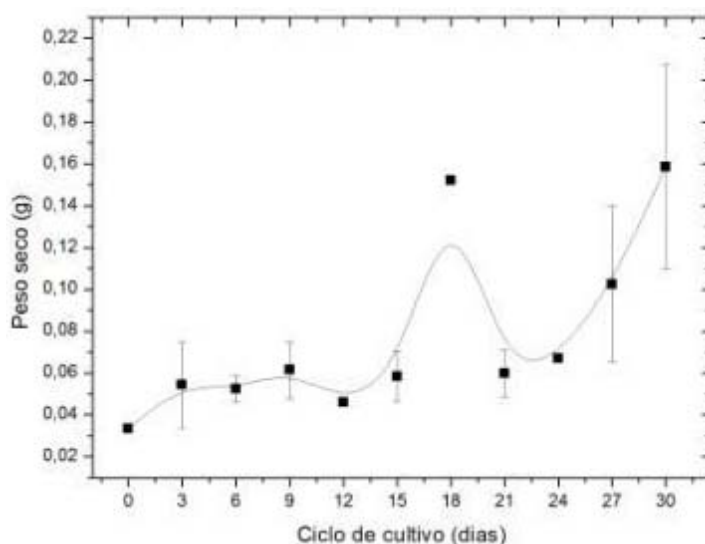


**Figura 3.6. Determinación del peso fresco de callo de *J. curcas* durante su ciclo de cultivo en medio semisólido MS con AIA 17.1  $\mu\text{M}$  y BA 13.3  $\mu\text{M}$  como reguladores de crecimiento.**

Estos valores se compararon contra los valores presentados en la tesis de licenciatura del IIA Pedro Xool en su trabajo de tesis titulado: Establecimiento de un cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas*, y cuyos valores de Td y  $\mu$  en un ciclo de cultivo de callo de explante de hoja de *J. curcas* fueron 3.29 días y 0.21 g/d respectivamente.

De este modo, al comparar los tiempos de duplicación y las velocidades de crecimiento, se observó lo siguiente:

- El callo que se obtuvo en el presente trabajo de investigación le toma dos días más duplicar su peso, de igual modo su velocidad de crecimiento es casi la mitad del valor reportado por Xool,



**Figura 3.7. Determinación del peso seco de callo de *J. curcas* durante su ciclo de cultivo en medio semisólido MS con AIA 17.1  $\mu\text{M}$  y BA 13.3  $\mu\text{M}$  como reguladores de crecimiento.**

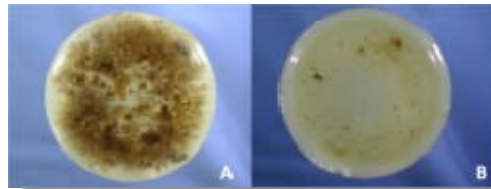
En la Figura 3.6 y 3.7, se puede observar el desarrollo del ciclo de cultivo medido como peso fresco durante un periodo de 30 días. El ciclo de cultivo se comenzó con un peso inicial de 0.5 g de callo peso fresco y finalizó con un peso promedio de 2.27 g de peso fresco. Mientras que en el caso de peso seco se registró un peso inicial de 0.04 g y uno final de 0.16 g.

Durante el desarrollo del ciclo de cultivo, se presentaron las siguientes fases:

1. Fase de retardamiento: dentro de esta fase, las células se preparan para dividirse puesto que primero es necesario que el callo, el cual ha sido colocado en un medio fresco, se adapte a las condiciones del mismo. Sin embargo, debido a que el medio original en el que se encontraba contenido el callo y el medio empleado para el ciclo de cultivo es el mismo, el cambio de la fase de retardamiento al momento donde las células del callo comienzan a dividirse para así aumentar su peso, no se alcanzó a percibir.
2. Fase exponencial: se presentó división celular y un crecimiento progresivo de las células. Se puede observar por el crecimiento exponencial, que las diferentes células que componen al callo; entran a la fase exponencial de manera desfasada con respecto a sus compañeras; por lo tanto, no necesariamente, todas las células se encontraban en las mismas condiciones fisiológicas.
3. En cuanto a la fase estacionaria del ciclo de cultivo, se puede decir que al cabo de los 30 días que duró el experimento, no se observó dicha fase; esto podría deberse a que los nutrientes con los que contaba el medio, aun eran suficientes para satisfacer los requerimientos del callo, de igual manera, se puede suponer que las sustancias de desechos presentes en el medio no fueron tantas como para afectar el crecimiento del mismo.

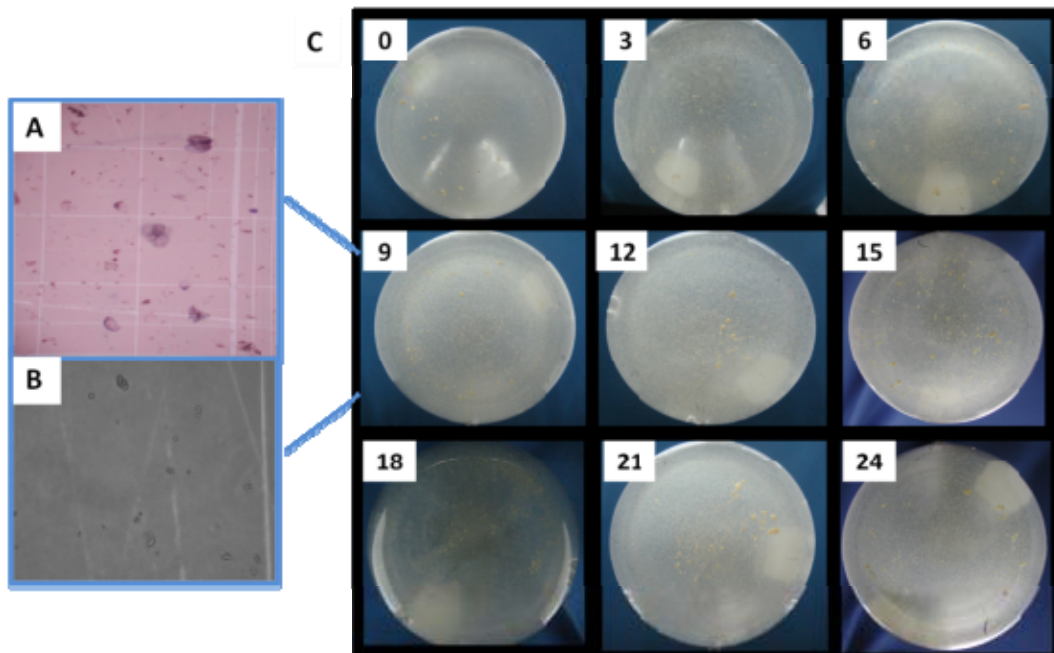
### a. Suspensiones celulares

Un mes después de haber iniciado la inducción de las suspensiones celulares, se notó un mayor grado de desagregación celular, tal y como se muestra en Figura 3.8.



**Figura 3.8. A. Matraces de inducción. B. Suspensiones celulares.**

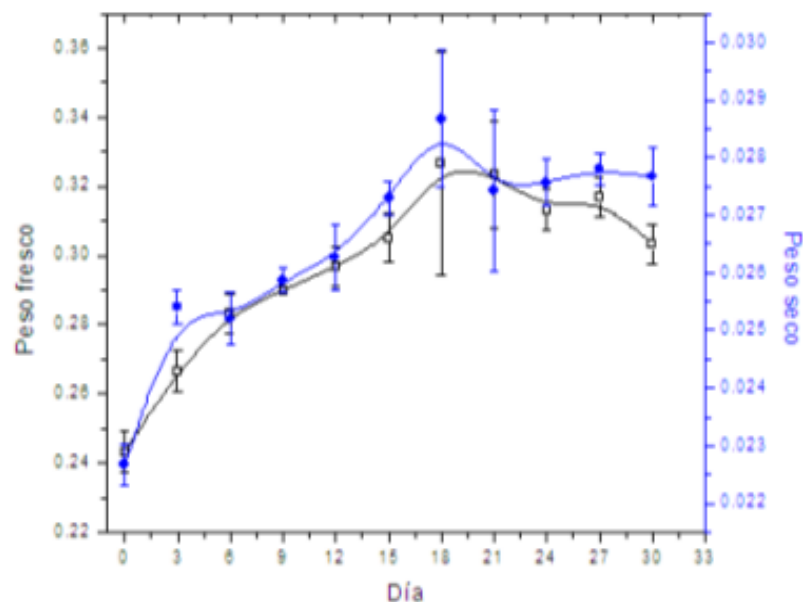
Durante el desarrollo del ciclo de cultivo de las suspensiones celulares de *J. curcas*, se llevó un registro fotográfico de su crecimiento, el cual se muestra en la Figura 3.9



**Figura 3.9. A y B, imagen al microscopio con un aumento 40x de células teñidas con azul de tripano. C. Suspensiones celulares durante su ciclo de cultivo.**

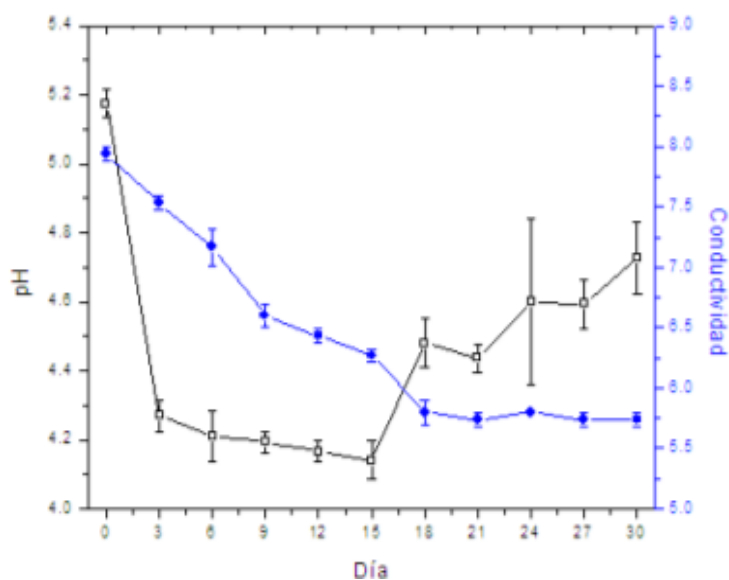
Con el paso de los días, las células eran observadas al microscopio, a pesar de que el número de ellas aumentaba con el paso del tiempo, su tamaño no lo hacía, adicionalmente, se observaban fragmentos celulares; tal y como se observa en los paneles A y B de la Figura 3.9. Del mismo modo, casi no se observaban agregados celulares.

A continuación se muestran las gráficas correspondientes al ciclo de cultivo de las suspensiones celulares:



**Figura 3.10. Determinación de los pesos fresco y seco (mg) durante el ciclo de cultivo de suspensiones celulares de *J. curcas* en medio líquido MS con AIA 17.1  $\mu\text{M}$  y BA 13.3  $\mu\text{M}$  como reguladores de crecimiento.**

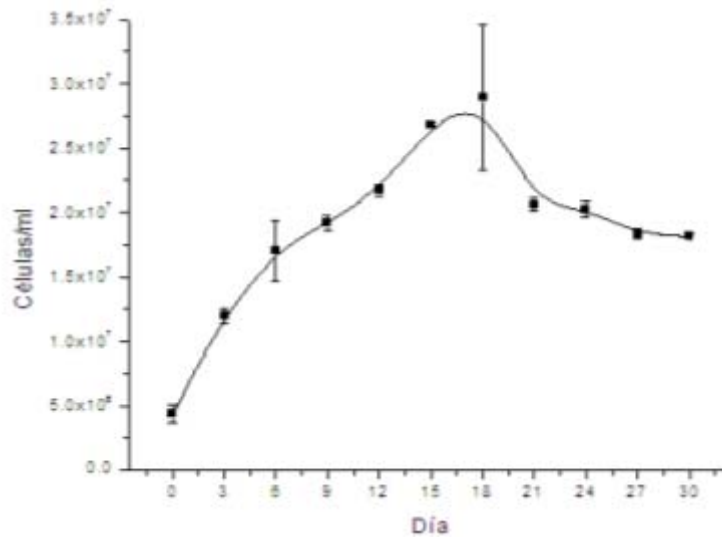
La fase de crecimiento exponencial comienza alrededor del día seis del ciclo de cultivo. Y es hasta el día nueve que se hace el recambio de medio de cultivo de las suspensiones celulares. Sin embargo, ya para el día 21 se observa que se detiene el crecimiento de las suspensiones. Partiendo de los datos del ciclo de crecimiento de la Figura 3.10, se determinó la velocidad de crecimiento de las suspensiones celulares en términos de su peso fresco, siendo esta de 0.011 g/día.



**Figura 3.11. Determinación del pH y conductividad del medio durante el ciclo de cultivo de suspensiones celulares de *J. curcas* en medio líquido MS con AIA 17.1  $\mu\text{M}$  y BA 13.3  $\mu\text{M}$  como reguladores de crecimiento.**

En la Figura 3.11 se muestran dos aspectos característicos del crecimiento celular. El primero es el pH; el cual al inicio del cultivo tiende a bajar, esto debido a que a pesar de que las células tienen disponible el nitrógeno en el medio MS tanto en forma de amonio ( $\text{NH}_4$ ) como de nitrato ( $\text{NO}_3$ ), estas células consumen primero el amonio; el cual para ser introducido al interior de la célula, se libera un protón; así este continuo intercambio conlleva a la baja en el pH. Sin embargo, una vez que la célula ha consumido todo el amonio disponible en el medio, continúa con el nitrato, lo que provocará un aumento del pH, esto debido a que el ingreso del nitrato al interior de la célula libera iones hidroxilo al medio<sup>3</sup> [57]. El segundo parámetro que se muestra en la Figura arriba expuesta es la conductividad; la cual, con el paso del tiempo tendió a disminuir, debido a que las células tomaron los nutrientes del medio; sin embargo, pasados el día 18 de cultivo, la disminución de la conductividad se detuvo, lo que indicó que las células ya no tomaron nutrientes del medio.

<sup>3</sup> Información obtenida de uno de los seminarios impartidos por el Dr. Loyola Vargas, en el grupo del laboratorio 24 del CICY.



**Figura 3.12. Determinación del número de células durante el ciclo de cultivo de suspensiones celulares de *J. curcas* en medio líquido MS con AIA 17.1  $\mu\text{M}$  y BA 13.3  $\mu\text{M}$  como reguladores de crecimiento.**

En la Figura 3.12 se muestra el incremento celular medido como número de células por mililitro. Con esta Figura se puede ver que al inicio del ciclo de cultivo contenían en promedio 4,320,000 células/ml y fue en el día 18 cuando se alcanzó el mayor número de células, siendo este de 28,900,000 células/ml. Ya para el día 21 del ciclo de cultivo, las células comenzaron a morir.

Finalmente, con estos resultados, se pudo ver que a pesar de que se obtuvieron células disgregadas, el crecimiento del cultivo es escaso, por lo que a manera de perspectivas, es necesario definir las características del cultivo que permitan el rápido crecimiento celular. De este modo, existen reportes que indican que comúnmente, los cultivos de suspensiones celulares experimenta un mayor crecimiento en presencia de algún aminoácido; tal es el caso de suspensiones celulares de caña de azúcar, las cuales para lograr un crecimiento óptimo requiere de un suministro de arginina [58] pero así como el uso de un determinado aminoácido puede promover un mayor crecimiento de las suspensiones celulares, también puede ser capaz de inhibirlo [59].

### 3.5. Exposición al frío de plántulas cigóticas de *Jatropha curcas*

Se llevó un registro fotográfico de la exposición de plantas cigóticas de *J. curcas* al exponerse de manera constante a una temperatura de 12 °C por 28 días así como una serie de plantas que se emplearon como testigo 25 °C.

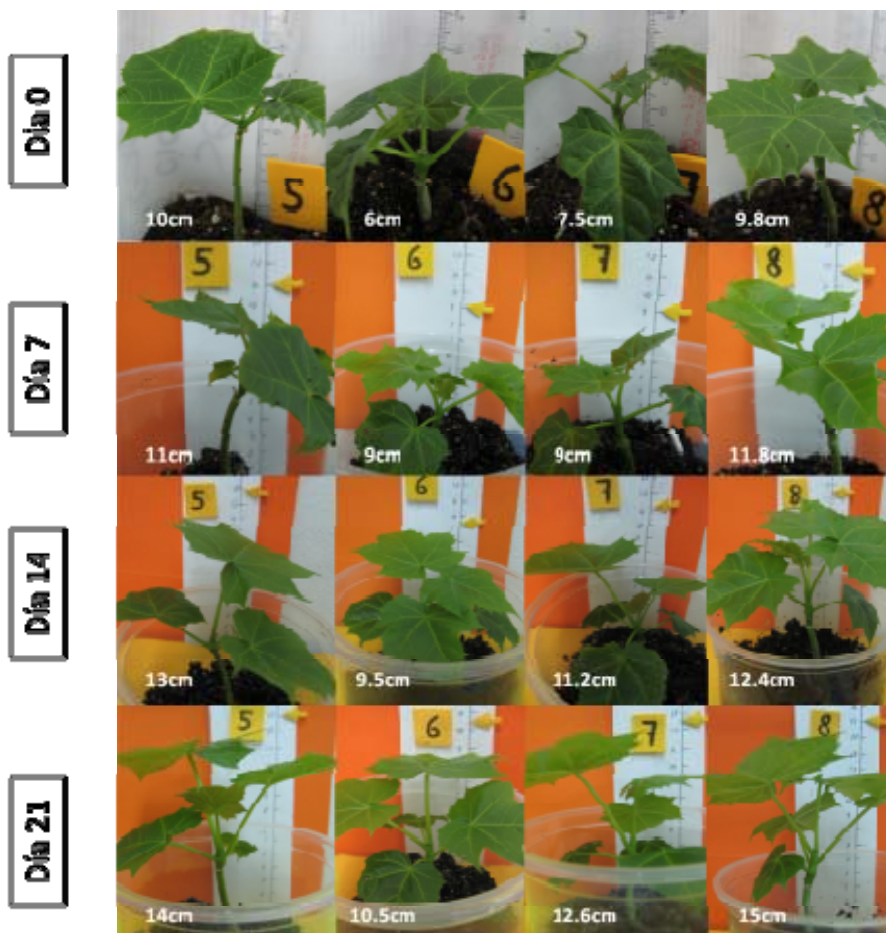


Figura 3.13. Plántulas cigóticas de *J. curcas* (testigo 25 °C).



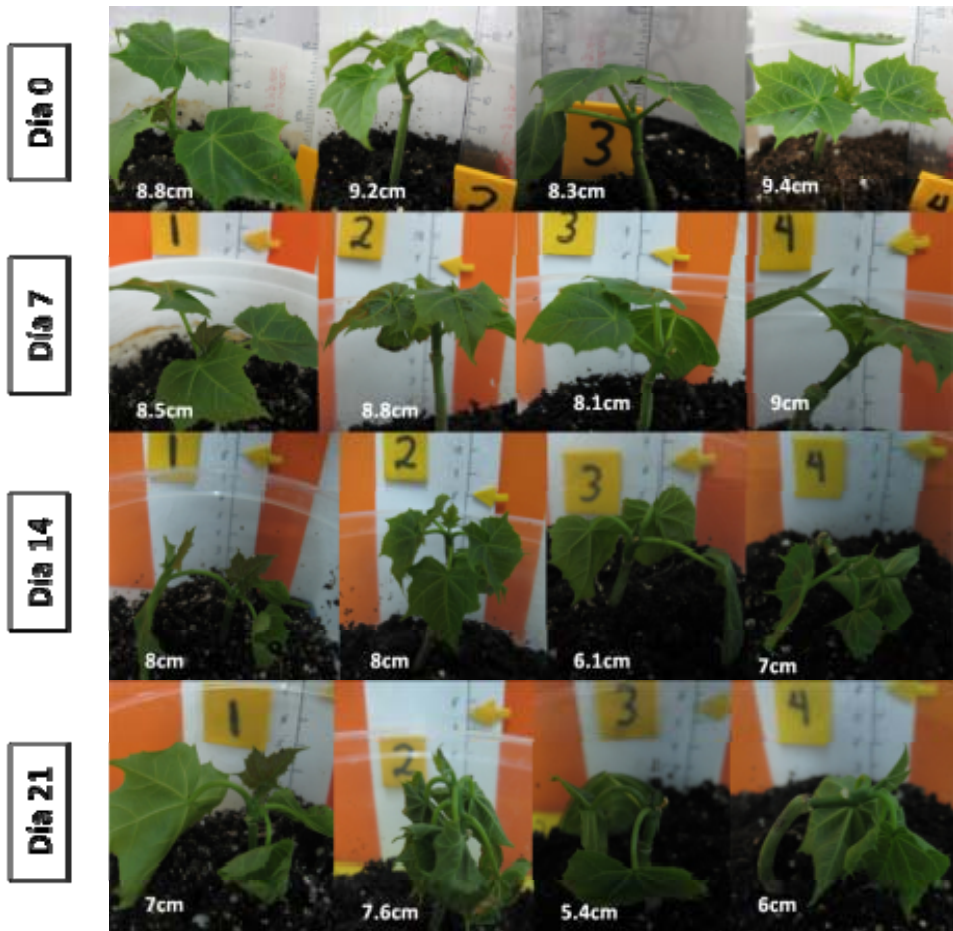
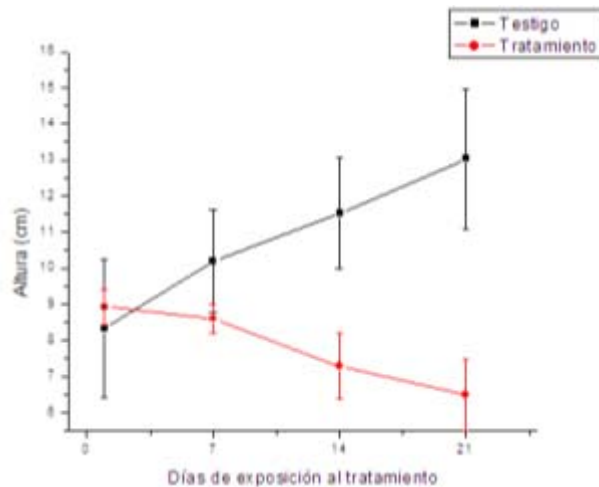


Figura 3.14. Plántulas cigóticas de *J. curcas* (tratamiento 12 °C).



**Figura 3.15. Longitud promedio de plántulas cigóticas de *J. curcas* sometidas a 25 °C y 12 °C (tratamiento).**

Al comparar tanto el registro fotográfico (Figuras 3.13 y 3.14) y la Figura 3.15, del grupo de plántulas testigo y el grupo de plántulas sometidas a tratamiento, se registraron las siguientes características:

1. Durante la primera semana no se observó daño aparente en las hojas de ninguno de los dos grupos de plántulas de *J. curcas*. Durante el transcurso de la segunda semana, las plantas comenzaron a perder humedad, puesto que sus hojas perdieron aparentemente habían perdido tono
2. Al inicio de la semana tres se comenzó a observar la pérdida de tono en las plántulas sometidas al tratamiento; sin embargo, no se presentó amarillamiento de las hojas.

3. Las plántulas testigo mostraron un aumento progresivo de su biomasa; tanto en longitud como en el número de sus hojas (Figura 3.12)
4. Las plántulas bajo tratamiento comenzaron a registrar una disminución de su longitud, debido a la pérdida de tono de sus hojas. Aunado a esto, no se observó el brote de nuevas hojas (Figura 3.14).

Los resultados de la Figura 3.15, concuerdan con lo mencionado por Wang en 1990 [23], quien describe que la temperatura es un factor abiótico que limita el crecimiento y desarrollo de las plantas; puesto que con el paso del tiempo se observó que las plántulas testigo mostraron un aumento en su longitud y en el número de brotes de hojas, mientras que, las plántulas bajo tratamiento experimentaron una disminución en el tono de las mismas, así como la ausencia de nuevos brotes.

Con estos resultados se puede decir que al ser *J. curcas* una planta de clima tropical, la exposición de la misma a una temperatura constante de 12 °C provoca en ella severas limitaciones en su crecimiento.

### **3.6. Perfil de poliaminas en plantas de *Jatropha curcas***

Las PAS son compuestos de bajo peso molecular, que se presentan de manera natural en las plantas. Las PAS tienden a variar dependiendo de las condiciones de estrés abiótico al que se sometan y la edad de las plantas [60], [27].

Sin embargo, hasta el momento se desconoce si estas son resultado de métodos de ajuste y control fisiológico de la planta o si éstas actúan como señales para dar origen a otros mecanismos de protección durante periodos de estrés abiótico; es decir que actúan como segundos mensajeros [61].

Antognoni reportó en 1998 los valores de put, spm y spd libres en hojas cotiledonares de *Ricinus communis* [62], planta que a pesar de pertenecer a la misma familia que *J. curcas*, únicamente compartió similitud en el valor de spd libre (Tabla 3.3.)

**Tabla 3.3. Contenido de PAS libres en dos plantas de la familia de las *Euphorbiaceae***

Edad de la planta	Planta	Spm libre (nmol/g PF)	Spd libre (nmol/g PF)	Put libre (nmol/g PF)
1-2 meses	<i>R. communis</i>	55+/-17*	613+/-34*	2100+/-107*
1 mes	<i>J. curcas</i>	230+/-41	670+/-34	288+/-90

\*Valores tomados de Antognoni *et al.*, 1998. [62]

Al someter plantas de uno y seis meses de edad, se obtuvo el siguiente perfil de poliaminas:

*Plantas de un mes de edad:*

Los niveles de spd unida en el testigo y en las plantas sometidas a tratamiento no se lograron cuantificar a lo largo del tiempo evaluado, salvo a las 72 h en ambos casos y a las 24 h en el caso de las plantas sometidas a 12 °C (Figura 3.16). Al compararse estos datos con los de las plantas de 6 meses, en estas últimas, sí se observó la presencia de spd unida a lo largo de todo el ciclo de crecimiento evaluado (Figura 3.19). Por lo tanto, al menos en este caso podríamos decir que la formación de spd depende por lo menos de la edad de la planta; lo cual es congruente con lo dicho por Evans *et al.* (1989); es decir que las PAS se encuentran implicadas en el proceso de crecimiento de las plantas [33].

En el caso de la put conjugada y libre, se observó un marcado pico una vez cumplidas las 24 h de exposición al frío, pasado este tiempo se presentó una fuerte disminución de los niveles de estas PAs a las 48 h y posteriormente se mantuvieron las concentraciones hasta la conclusión del experimento (Figura 3.17 y 3.18); esto a diferencia de lo reportado por Nayyar *et al.*(2004), en chícharo sometido a un estrés de 10 °C, el cual presentó un pico de put libre hasta las 72 h, de mucha menor intensidad que el presentado aquí y a partir de este momento comienza a estabilizar sus niveles [63].

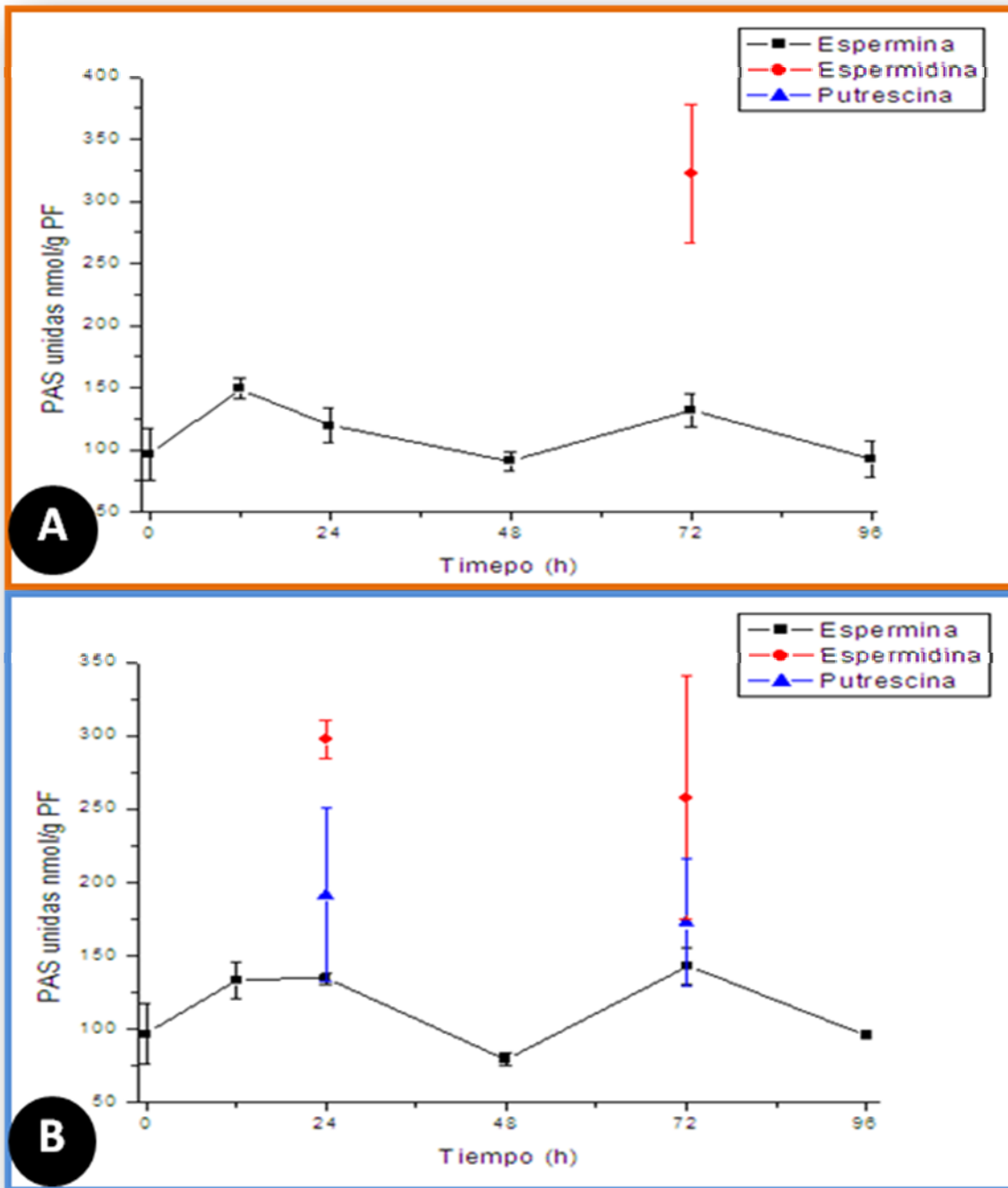


Figura 3.16. PAS unidas en hojas de plantas de *Jatropha curcas* de un mes de edad en 25°C A y 12°C B.

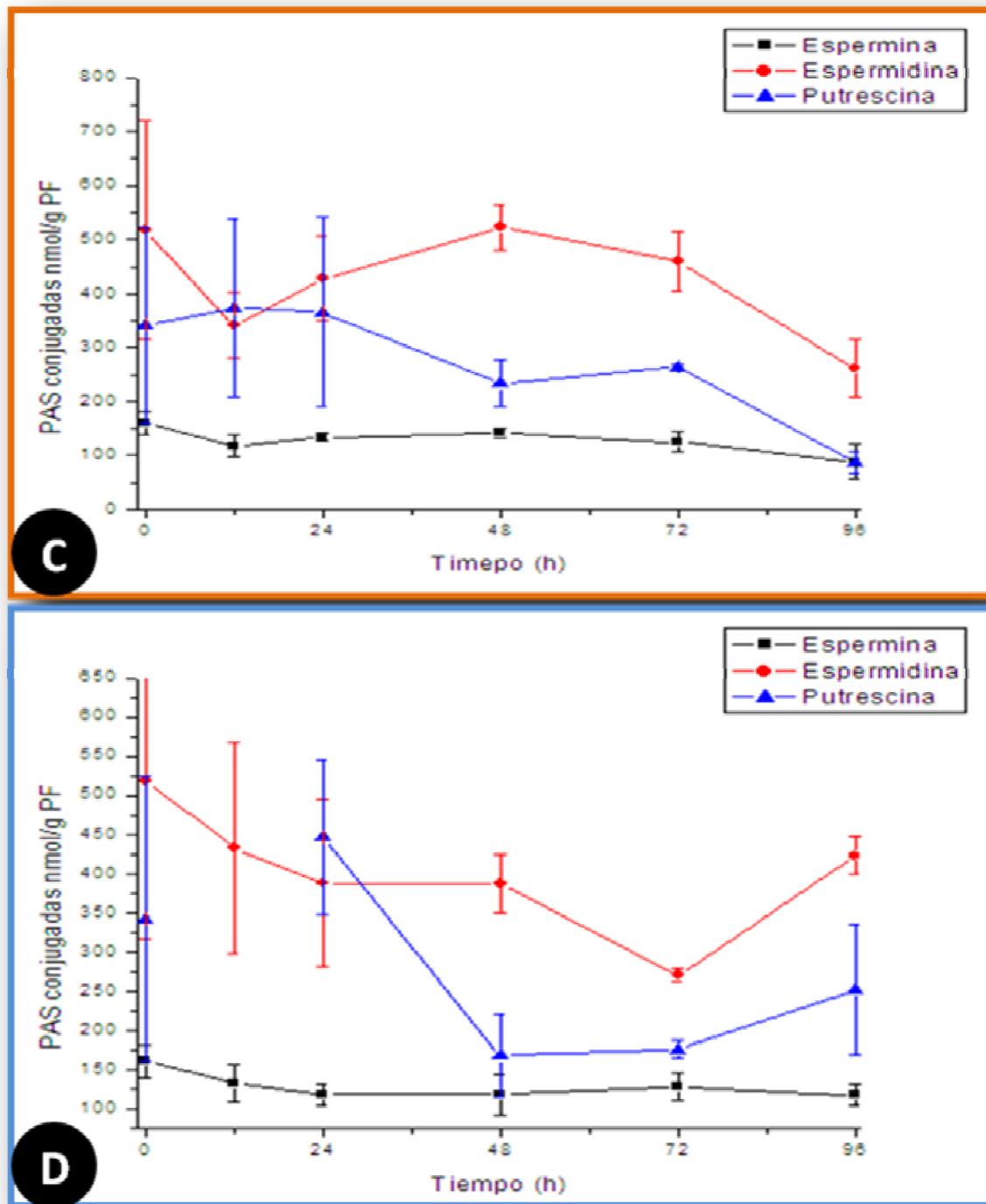


Figura 3.17. PAS conjugadas en hojas de plantas de *Jatropha curcas* de un mes de edad en 25°C C y 12°C D.

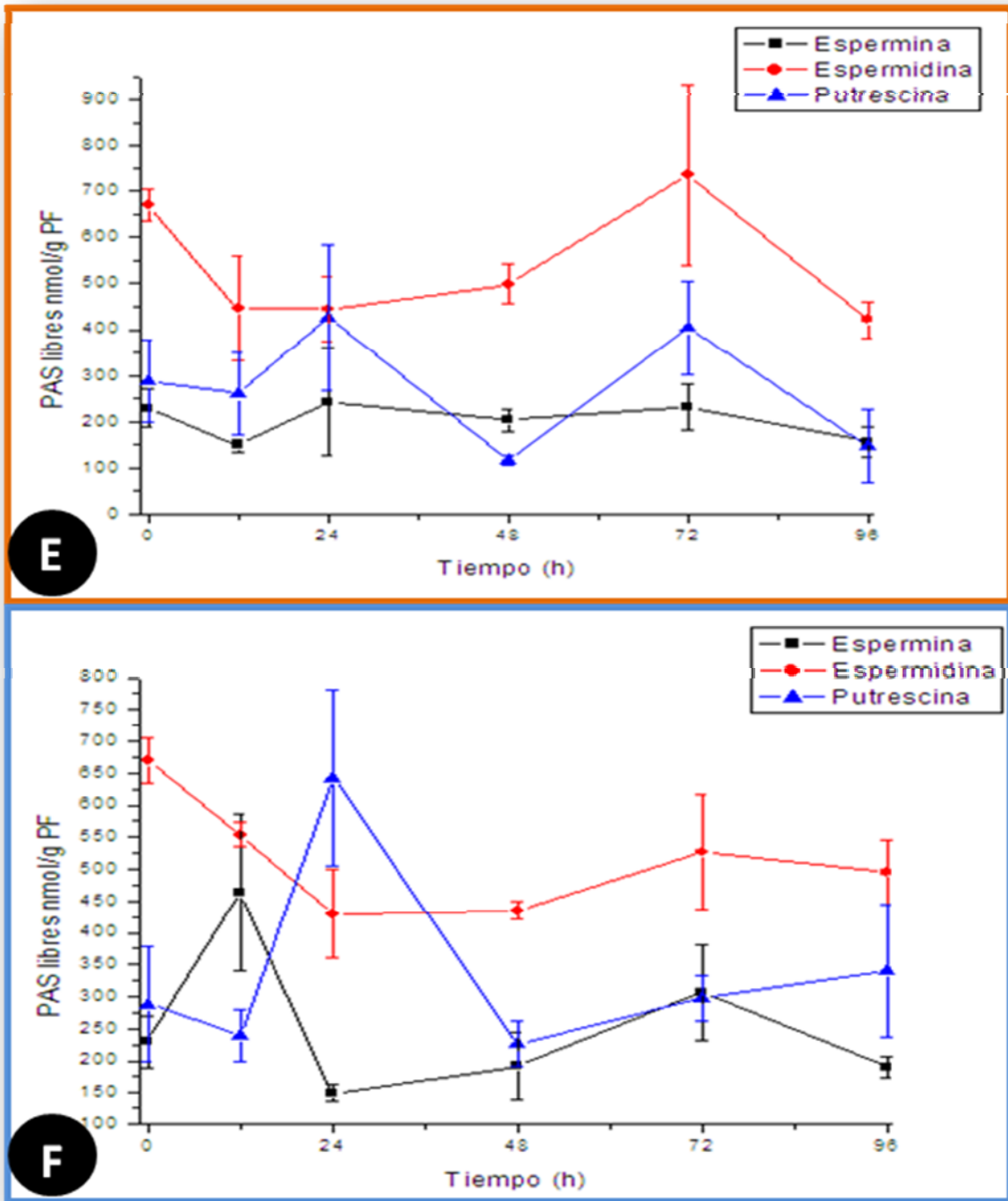


Figura 3.18. PAS libres en hojas de plantas de *Jatropha curcas* de un mes de edad en 25°C E y 12°C F.

*Plantas de seis meses de edad:*

A diferencia de Cuevas *et al* 2008, cuyo estudio demostró que la spd libre se mantiene sin cambios durante la exposición al frío [40]; en el caso de *J. curcas* de seis meses de edad, son la spm libre, conjugada y unida las que se mantienen prácticamente sin cambios una vez transcurridas las primeras 24 h (Figura 3.19, 3.20, 3.21).

En el caso de put unida y conjugada en plantas testigo, no se detectaron valores de dicha poliamina, sin embargo, las plantas expuestas a 12 °C, registraron la formación de put (Figura 3.19 y 3.20), lo cual coincide con lo reportado por Kasukabe *et al.* 2004, quienes reportaron que en tejido foliar de *Arabidopsis thaliana* expuesta a 5 °C, se presentaron aumentos significativos de put y spd libre con respecto al testigo [64], tal y como sucedió también en el caso de spd en este trabajo. Así, en términos generales, spd mostró un incremento en su concentración con respecto al testigo a lo largo del periodo de prueba.

Al comparar la Figura 3.21 (panel E y F) contra la Figura 3.19 (panel B), y 3.20 (panel D), se observa que mientras a una temperatura de 25 °C solamente se cuantificó put libre, al someter a la planta al estrés por frío, se indujo la producción de put conjugada y unida también. Aunado a esto, los niveles de put libre (Figura 3.21 panel F) sufrieron un incremento significativo durante las primeras 12 h y este aumento se mantuvo hasta las 72 h en comparación con los valores del testigo; lo cual es congruente con lo expuesto por Cuevas *et al.* (2008), quienes reportaron que *A. thaliana* presentó un incremento significativo de put en las primeras 24 h de su exposición a 4 °C y que dicho incremento permaneció también hasta las 72 h [40].

Se puede mencionar que posiblemente el aumento de put en hojas de *J. curcas* expuestas a estrés por frío se debe a que esta poliamina, a diferencia de la spm y spd se encuentra homeostáticamente menos regulada [65].

Finalmente, de acuerdo con Groppa y Benavides 2008, se sabe que usualmente, es la put la poliamina que reacciona rápidamente ante los cambios ambientales, lo cual se puede observar claramente en las plantas de *J. curcas* de seis meses; puesto que a



temperatura ambiente, no se determinó ni put conjugada ni unida, sino que fue hasta que se expuso a la planta al estrés por frío cuando se observó la síntesis de la misma [66].

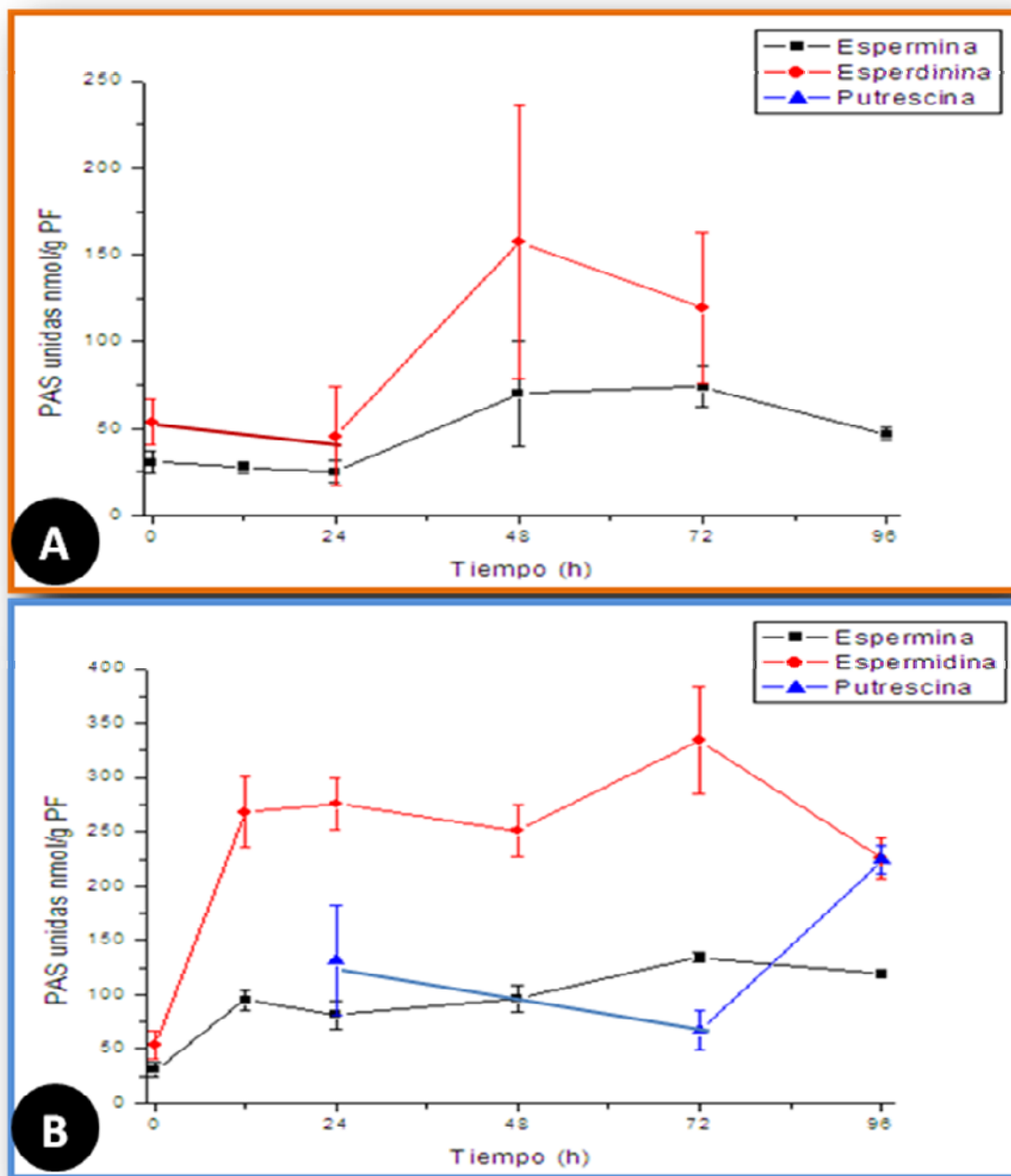


Figura 3.19. PAS unidas en hojas de plantas de *Jatropha curcas* de seis meses de edad en 25°C A y 12°C B.

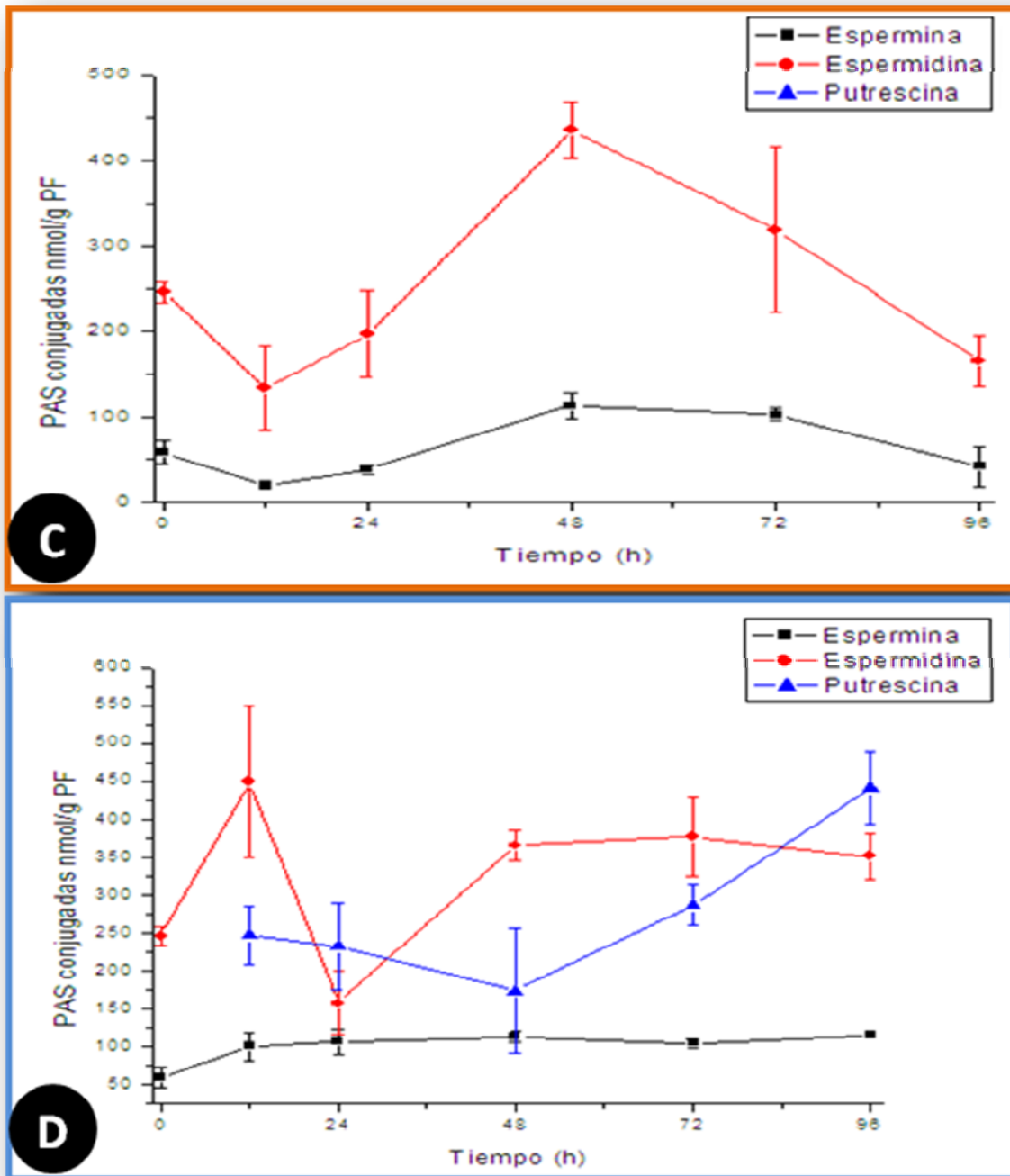


Figura 3.20. PAS conjugadas en hojas de plantas de *Jatropha curcas* de seis meses de edad en 25°C C y 12°C D.

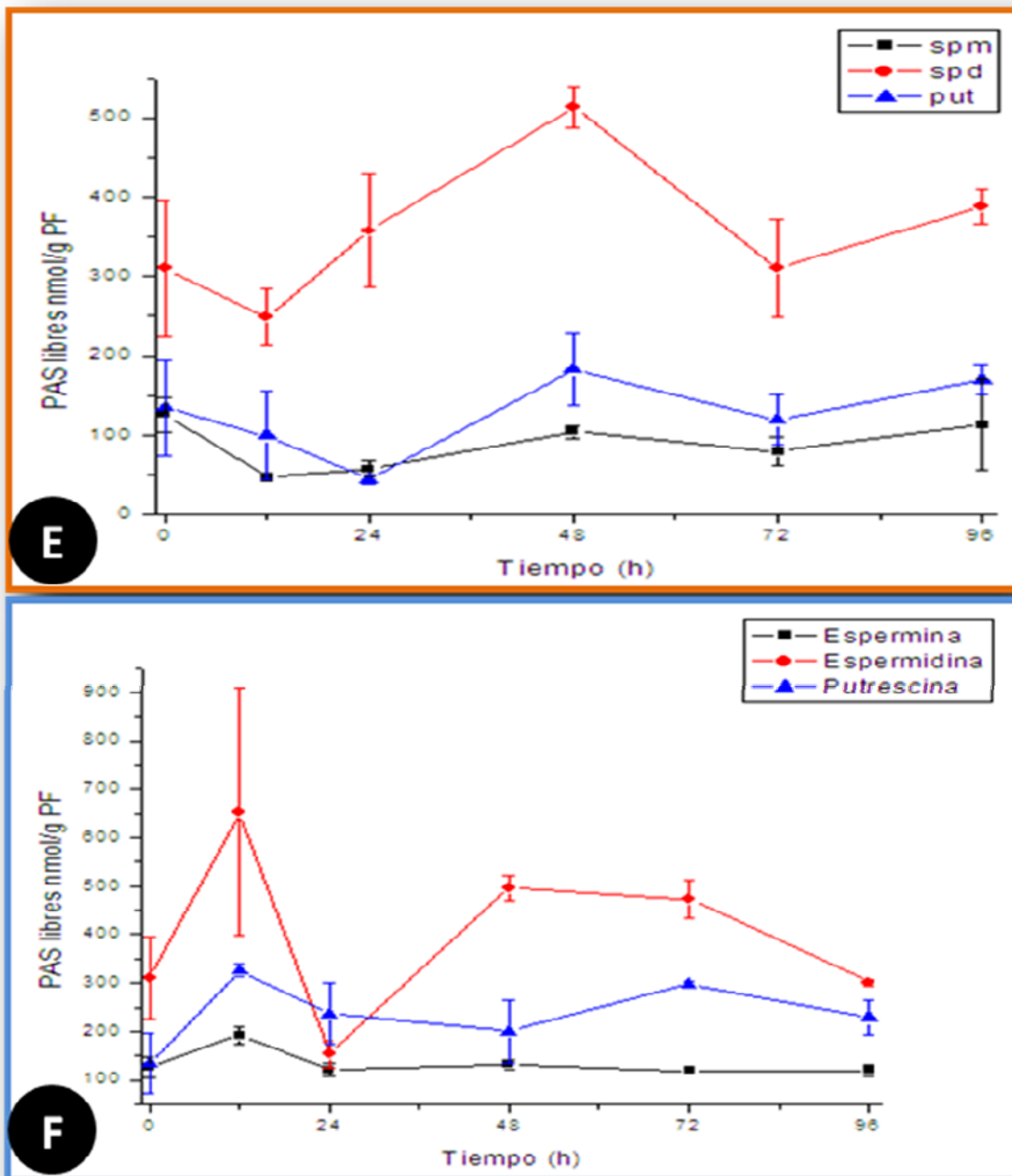


Figura 3.21. PAS libres en hojas de plantas de *Jatropha curcas* de seis meses de edad en 25°C E y 12°C F.

*Perfil comparativo de poliaminas en plantas de Jatropha curcas de uno y seis meses (Figura 3.22 y 3.23):*

Las PAS totales en plantas testigo de un mes después de la germinación son mayores en comparación con las testigo de seis meses.

Las plantas testigo de seis meses únicamente tienen put libre; mientras que, en las plantas de un mes aparece no sólo put libre sino también conjugada. En las plantas testigo, los valores de spm totales se vieron por lo menos duplicado a lo largo de 72 h y en el caso de spd totales en las primeras 12 h.

Se puede decir que tanto en las plantas de *J. curcas* de uno y seis meses, con excepción de las primeras 12 a 24 h, no se presentaron cambios significativos de spm totales al exponerse al estrés abiótico. Sin embargo, en el caso de put libre, en plantas de seis meses, durante las primeras 24 h, por lo menos se incrementó en cinco veces su concentración al someterse a frío.

Cuando las plantas fueron expuestas al frío, y en este caso particular de forma independientemente de su edad, los niveles de PAS se encontraron distribuidos de la siguiente manera en relación con su concentración:  $spd > put > spm$ ; lo cual es comparable con lo obtenido en *A. thaliana*, cuyas concentraciones de spd y put aumentaron al someterse a bajas temperaturas, mientras que spm no mostró cambios en su concentración al exponerse al tratamiento [64].

Finalmente, es importante decir que aun no se sabe si los cambios en las concentraciones de PAS, durante la exposición a diversos tipos de estrés abiótico, son únicamente el resultado de cambios en el metabolismo de las plantas o si en realidad las PAS se ven involucradas directamente en la regulación de los cambios metabólicos [44], [42].

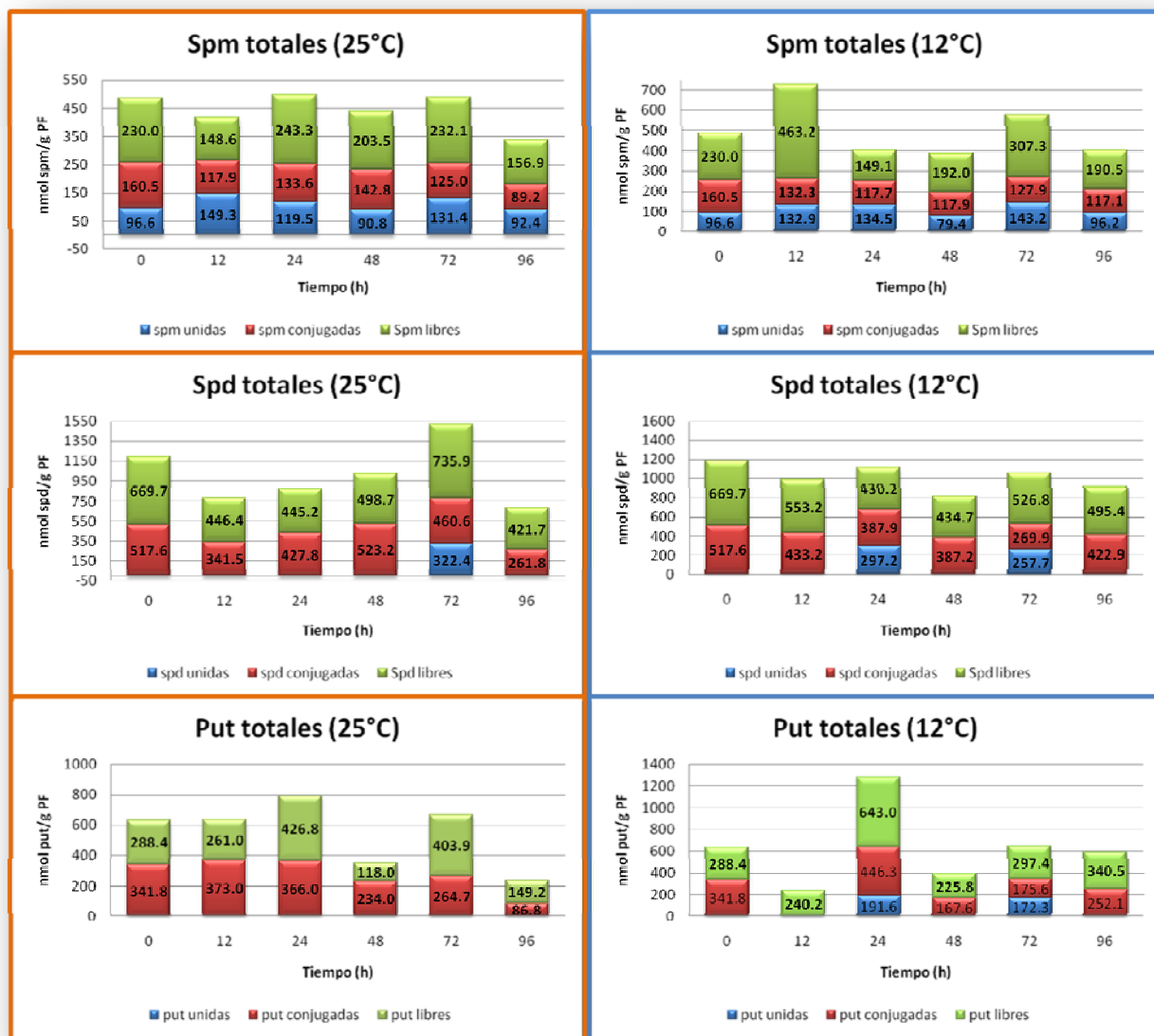


Figura 3.22. Determinación de PAS totales a 25 °C y 12 °C (tratamiento) en hojas de plantas de *J. curcas* de un mes de edad.

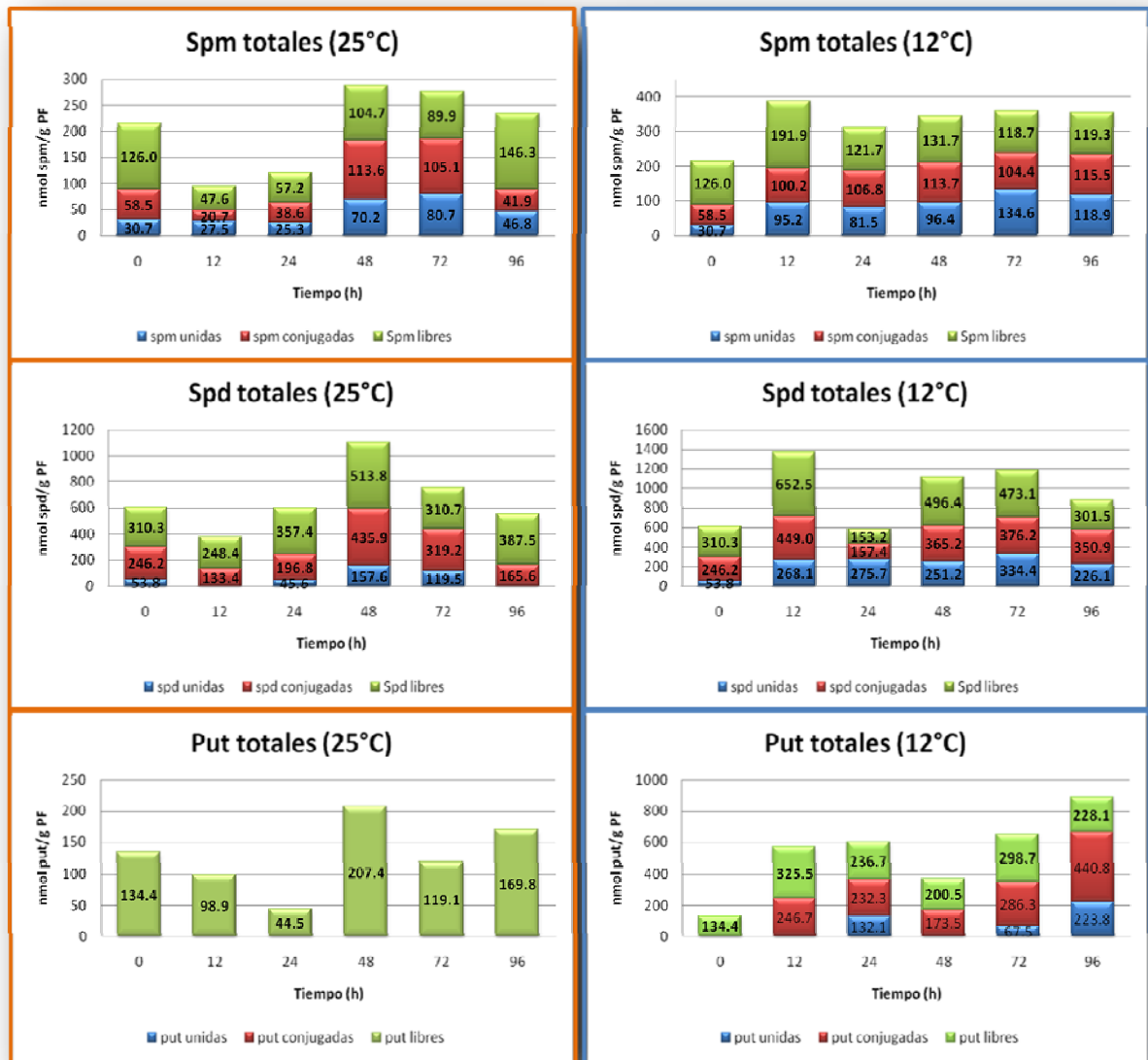
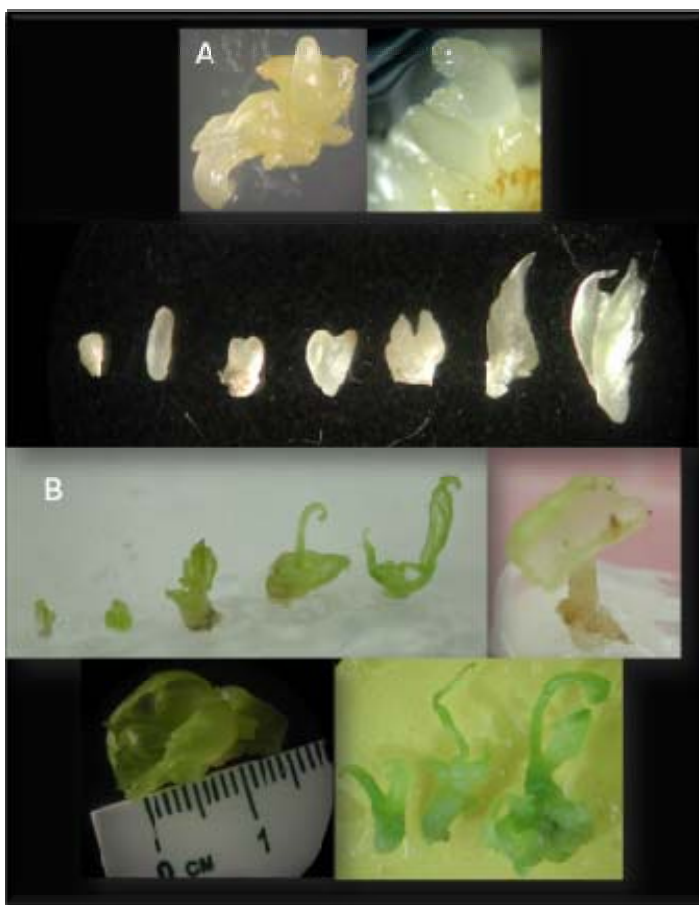


Figura 3.23. Determinación de PAS totales a 25 °C y 12 °C (tratamiento) en hojas de plantas de *J. curcas* de seis meses de edad.

### 3.7. Embriogénesis somática en *Jatropha curcas*

La embriogénesis somática es un proceso mediante el cual las células somáticas dan origen a estructuras bipolares, las cuales habrán de desarrollarse en plantas completas sin la necesidad de la fusión de gametos. Sin embargo, este proceso depende tanto del genotipo, del tipo y estadio fisiológico del explante, de la composición del medio

de cultivo como de las condiciones de cultivo del mismo<sup>4</sup>. De este modo, a partir del momento en el cual, tanto Steaward como Reinert, en 1958 [67], descubrieron embriones somáticos en sus suspensiones celulares, éstos se han convertido en una característica de gran importancia para el cultivo de tejidos [56].



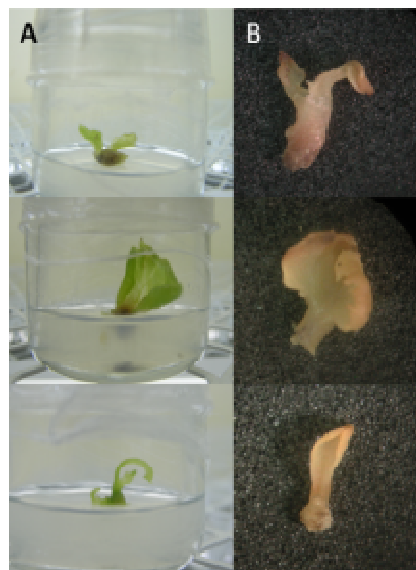
**Figura 3.24. Embriones somáticos y plántulas de *Jatropha curcas*.**

En el caso de plantas dicotiledóneas, como es el caso de *J. curcas*, la embriogénesis somática puede ser dividida en los siguientes estadios: globular, corazón,

<sup>4</sup> Iantcheva, A.; Vlahova, M.; Atanassov, A.; Duque, A.S.; Araújo, S.; Dos Santos, D.F.; Feveiro, P. (2006). *Medicago truncatula* handbook, cell suspension cultures. <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/pdf/CellSuspensionCultures.pdf>

torpedo y cotiledonar.

Así, en el presente trabajo de investigación y como parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de la investigación, se presentó embriogénesis somática en callo de explantes de hoja de *J. curcas*. Vale la pena resaltar que el callo embriogénico se obtuvo exclusivamente de aquellos callos que no eran friables y de color amarillo oscuro. A continuación se muestran los pasos que se siguieron para la obtención de la embriogénesis somática (Figura 3.24).



**Figura 3.25. Plántulas de *Jatropha curcas*, a partir de embriones somáticos.**

En el panel A de la Figura anterior se muestra los diferentes estadios de desarrollo por los que atravesaron los embriones de *J. curcas*. Mientras que en el panel B aparecen ilustrados el nivel de desarrollo que alcanzaron las plántulas sometidas a este tratamiento.

El callo que dio origen a los embriones mostrados en la Figura 3.24, es el que se muestra en la Figura 3.4. Este callo, proveniente de explante de hoja, cuyo día cero inició en el mes uno, comenzó a desarrollar estructuras embriogénicas en algunos de los callos en el mes seis. Sin embargo, no fue sino hasta el mes siete cuando el desarrollo embriogénico se hizo evidente en todos los callos.



En el panel A de la Figura 3.25. se muestran las plántulas de *J. curcas* en medio de germinación, mientras que, en el panel B recién extraídas del medio de enraizamiento.

Uno de los últimos reportes que se han manejado en relación a la regeneración de plantas de *J. curcas* a partir de embriogénesis somática, fue del grupo de Purkayastha *et al.* 2010 [68], quienes a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo , consiguieron enraizar y transferir las plántulas a invernadero; empleando para el enraizamiento medio MS a la mitad de la fuerza iónica, adicionado con ácido indol butírico (IBA) 0.5  $\mu$ M. Esta diferencia en los resultados podría deberse a:

- a) El empleo de diferentes reguladores de crecimiento a los que se emplearon en este trabajo durante la inducción de la embriogénesis.
- b) El grupo de Purkayastha *et al.* 2010 trasplantó sus plántulas hasta que alcanzaron una longitud mayor a los 2 cm, mientras que en mi caso lo hice cuando en promedio medían 1 cm.



## Capítulo 4. Conclusiones

1.- Se obtuvo un cultivo de tejidos de *J. curcas* que mostraron diferentes niveles de diferenciación celular, en particular la formación de embriones y brotes. Sin embargo, el trabajo con suspensiones celulares requiere de un esfuerzo adicional.

2.- El frío afecta de manera importante el desarrollo de plantas de *J. curcas* expuestas a bajas temperaturas.

3.- El contenido de poliaminas varía de forma importante con la edad de la planta. Dicho contenido también cambia con la temperatura a la cual es cultivada la planta, en particular la putresina.

4. Los niveles de poliaminas siempre se mantienen en el orden  $spd > put > spm$  en relación con su concentración sin importar la edad de la planta.



## **Apéndice 1. Desinfección de semillas de *Jatropha curcas***

Para obtener plántulas bajo condiciones estériles, las semillas de *J. curcas*, provenientes de la plantación de Kekén, se sometieron al procedimiento que a continuación se describe:

1. Lavar semillas con agua y Extrán.
2. Poner a secar.
3. Retirar la testa.
4. Colar, dentro de una campana de flujo laminar, las semillas sin testa en un matraz con agua estéril.
5. Lavar las semillas con extrán al 5% durante 5 minutos.
6. Quitar el exceso de Extrán con agua estéril 3 veces.
7. Lavar con etanol al 70% durante 3 minutos.
8. Lavar tres veces las semillas con agua estéril.
9. Lavar con una solución al 10% de Cloralex<sup>®</sup> durante 15 minutos.
10. Lavar las semillas con agua estéril.
11. Dejar las semillas en una solución de PPM al 2% durante 8 horas.
12. Extraer los embriones y colocarlos en medio de germinación.

## **Apéndice 2. Medio de germinación de semillas cigóticas de *Jatropha curcas***

<b>Polvo MS</b>	4.3 g/L
<b>Sacarosa</b>	30 g/L
<b>Mio-inositol</b>	100 mg/L
<b>Cisteína</b>	25 mg/L
<b>Tiamina</b>	4 mg/L
<b>Gel rite</b>	2.3 g/L

Previo a agregar el gelrite, el medio se ajusta a un pH de 5.8. Finalmente, el medio de germinación es esterilizado durante 20 minutos a una presión de 1 kg/cm<sup>2</sup> y a 121 °C.

### **Apéndice 3. Medio de maduración de embriones de *Jatropha curcas***

<b>Polvo MS</b>	4.3 g/L
<b>Mio-inositol</b>	100 mg/L
<b>Cisteína</b>	25 mg/L
<b>Tiamina</b>	10 mg/L
<b>Ácido nicotínico</b>	1 mg/L
<b>Sacarosa</b>	3%
<b>AIA</b>	5.7 µM
<b>GA</b>	8.7 µM
<b>Agar</b>	0.8 %

Previo a agregar el gelrite, el medio se ajusta a un pH de 5.8. Finalmente el medio de germinación es esterilizado durante 20 minutos a una presión de 1 kg/cm<sup>2</sup> y a 121 °C.

#### **Apéndice 4. Medio de germinación de embriones de *Jatropha curcas***

Polvo MS	4.3 g/L
Mio-inositol	100 mg/L
Cisteína	25 mg/L
Tiamina	10 mg/L
Ácido nicotínico	1 mg/L
Sacarosa	3 %
Agar	0.8 %

Previo a agregar el gelrite, el medio se ajusta a un pH de 5.8. Finalmente el medio de germinación es esterilizado durante 20 minutos a una presión de 1 kg/cm<sup>2</sup> y a 121 °C.



## Apéndice 5. Medio de enraizamiento de embriones de *Jatropha curcas*

Medio MS a la mitad de la fuerza iónica y adicionado con los siguientes reguladores de crecimiento: IBA 1  $\mu\text{M}$ , IBA 0.5  $\mu\text{M}$  o sin IBA. Seguido de esto, se ajusta el pH del medio a 5.8, se adiciona 0.7% de agar y finalmente se esteriliza durante 20 minutos a una presión de 1  $\text{kg}/\text{cm}^2$  o 121  $^{\circ}\text{C}$ .

## Apéndice 6. Medio Murasashige y Skoog (MS)

Stock	Reactivos	mg/L	SIn Stock	ml/L de medio
A	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440	g/500 ml	5
			44	
B	KNO <sub>3</sub>	1900	g/2000 ml	50
			76	
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	g/2000 ml	
			66	
C	KI	0.83	g/500 ml	5
			0.083	
	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.025	g/500 ml	
			0.0025	
D	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	g/1000 ml	25
			6.8	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	g/1000 ml	
			0.248	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.25	g/1000 ml	
			0.01	
E	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370	g/500 ml	5
			37	
	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	22.3	g/500 ml	
			2.23	
	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.025	g/500 ml	
			0.0025	
	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8.1	g/500 ml	
			0.81	
F	FeSO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	27.95	g/1000 ml	10
			2.795	

	<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	<b>37.23</b>	<b>g/1000 ml</b>	
			<b>3.723</b>	

Referencia: Plant Propagation by Tissue Culture Part 1. Edwin F. [56]. 1993.

## Referencias

- [1] S.Ye; C.Jiayang, *Biores. Technol.* 83, 1-11, 2002.
- [2] C.N.Hamelinck; G.van Hooijdonk; A.P.C.Faaij, *Biomass Bioenerg.* 28, 384-410, 2005.
- [3] J.Herrera-Flores; I.Malo-Bolívar; J.Vale-Pereña; R.De la Maza-Hernández; M.Parra-Hernández; R.Torres-Enriquez; G.Arboleya-González; D.Guzmán-Velázquez; C.Núñez-Velasco; C.Ceballos-Cordoso, Programa especial para el aprovechamiento de energías renovables SENER, 2009.
- [4] M.B.E.M.Pérez, M.R.Ramírez, P.H.G.Núñez, N.Ochoa-Alejo, *Introducción al cultivo de tejidos vegetales*, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México, 1999.
- [5] V.M.Loyola-Vargas, F.A.Vázquez-Flota, *Plant cell culture protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2006.
- [6] T.A.Thorpe, K.R.Patel, in *Cell culture and somatic cell genetics of plants Vol. 1. Laboratory procedures and their applications*, Vol. 1 (Ed: I.K.Vasil), Academic Press Inc., Orlando, 1984, Ch. 7.
- [7] T.A.Thorpe, *Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture*, Academic Press, New York, 1981.
- [8] D.V.M.Hurtado, M.E.M.Merino, *Cultivo de Tejidos Vegetales*, Trillas, México, 1987.
- [9] Q.We; W.Lu; Y.Liao; S.Pan; Y.Xu; L.Tang; F.Cheng, *Plant Physiology and Molecular Biology.* 30, 475-478, 2004.
- [10] J.H.Dodds, L.W.Roberts, *Experiments in Plant Tissue Culture*, Cambridge University Press, Cambridge, 1982.
- [11] S.S.Bhojwani, M.K.Razdan, *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, Elsevier, Amsterdam, 1983.
- [12] M.Martínez-Estévez; J.A.Muñoz-Sánchez; V.M.Loyola-Vargas; S.M.T.Hernández-Sotomayor, *Plant Cell Rep.* 20, 469-474, 2001.

- [13] G.Godoy-Hernández; V.M.Loyola-Vargas, *Plant Cell Rep.* 10, 537-540, 1991.
- [14] X.Hou; K.Xie; J.Yao; Z.Qi; L.Xiong, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 106, 6410-6415, 2009.
- [15] X.Zhang; S.Liu; T.Tanako, *Plant Mol. Biol.* 68, 131-143, 2008.
- [16] J.Renaut; S.Lutts; L.Hoffmann; J.-F.Hausman, *Plant Biol.* 146, 81-90, 2004.
- [17] S.Rashida; A.Rabia, *Pak. J. Bot.* 39, 2431-2441, 2007.
- [18] R.E.E.Jongschaap, W.J.Corré, P.S.Bindraban, W.A.Brandenburg, *Claims and facts on Jatropha curcas L.: global Jatropha curcas evaluation, breeding and propagation programme. Report 158*, Plant Research International, Wageningen, Netherlands, 2007.
- [19] R.Sims, M.Taylor, J.Saddler, W.Mabee, *From 1<sup>st</sup> to 2<sup>nd</sup> Generation Biofuel Technologies. An overview of current industry and RD and D activities*, OECD/IEA, Paris, 2008.
- [20] P.Latha; V.Prakasam; A.Kamalakaran; C.Gopalakrishnan; T.Raguchander; M.Paramathma; R.Samiyappan, *Aust. Plant Dis. not.* 4, 20, 2009.
- [21] M.Korn; T.Gartner; A.Erban; J.Kopka; J.Selbig; D.Hinchaa, *Mol. Plant* 3, 224-235, 2010.
- [22] M.F.Thomashow, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 571-599, 1999.
- [23] C.Y.Wang, in *Chilling injury of horticultural crops*, CRC Press, Boca Raton, 1990.
- [24] K.Wang; A.Herrera-Estrella; M.Van Montagu, *J. Bacteriol.* 172, 4432-4440, 1990.
- [25] Y.H.Cheong; B.C.Moon; J.K.Kim; C.Y.Kim; M.C.Kim; I.H.Kim; C.Y.Park; J.C.Kim; O.Park; S.C.Koo; H.W.Yoon; W.S.Chung; C.O.Lim; S.Y.Lee; M.J.Cho, *Plant Physiol.* 132, 1961-1972, 2003.
- [26] E.H.Beck; R.Heim; J.Hansen, *J. Biosci.* 29, 449-459, 2007.
- [27] W.X.Wang; B.Vinocur; O.Shoseyou; A.Altmon, *Acta Hort.* 560, 285-292, 2001.

- [28] K.Neeraj; G.Danswring; K.S.Narendra; S.Pramila; R.Meenal; A.Sivalingam; S.Dinesh; A.Mohomand; A.Zakwan, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 103, 267-277, 2010.
- [29] M.V.Rajam; S.Dagar; B.Waie; J.S.Yadau; P.A.Kumar; F.Shoeb, *J. Biosci.* 23, 473-482, 1998.
- [30] A.Moons, *FEBS Lett.* 553, 370-376, 2003.
- [31] C.A.Robie; S.C.Minocha, *Plant Sci.* 65, 45-54, 1989.
- [32] A.E.Pegg; P.P.McCann, *American Journal of Physiology and Cell Physiology* 243, 212-221, 1982.
- [33] P.T.Evans; R.L.Malmberg, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 235-269, 1989.
- [34] A.W.Galston; R.K.Sawhney, *Plant Physiol.* 94, 406-410, 1990.
- [35] Z.Li; D.J.Burritt, *Plant Growth Regul.* 40, 65-74, 2003.
- [36] U.Bachrach; Y.M.Plessner, *Anal. Biochem.* 152, 423-431, 1986.
- [37] I.Echevarría-Machado; L.Brito-Argáez; G.Racagni-Di Palma; A.L.Ramos-Díaz; V.M.Loyola-Vargas; S.M.T.Hernández-Sotomayor, *Plant Physiol. Biochem.* 43, 874-881, 2005.
- [38] A.W.Galston, *BioScience* 33, 382-388, 1983.
- [39] N.Steiner; C.Santa-Catarina; V.Silveira; E.Floh; M.Guerra, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 89, 55-62, 2007.
- [40] J.C.Cuevas; R.Lopez-Cobollo; R.Alcazar; X.Zarza; C.Koncz; T.Altabella; J.Salinas; A.F.Tiburcio; A.Ferrando, *Plant Physiol.* 148, 1094-1105, 2008.
- [41] W.Shen; K.Nada; S.Tachibana, *Plant Physiol.* 124, 431-439, 2000.
- [42] P.Nadeau; S.Delaney; L.Chouinard, *Plant Physiol.* 84, 73-77, 1987.
- [43] M.M.Kushad; G.Yelenosky, *Plant Physiol.* 84, 692-695, 1987.
- [44] H.E.Flores; A.W.Galston, *Plant Physiol.* 75, 102-109, 1984.

- [45] K.Openshaw, *Biomass Bioenerg.* 19, 1-15, 2000.
- [46] M.Cetinkaya; F.Karaosmanoglu, *Energy & Fuels* 18, 1888-1895, 2004.
- [47] S.Shah; S.Sharma; M.N.Gupta, *Biomass Bioenerg.* 18, 154-159, 2004.
- [48] G.Knothe, in *Biofuels refining and performance* (Ed: A.Nag), McGraw Hill, United States of America, 2008, Ch. 5.
- [49] N.C.Om Tapanes; D.A.Gomes Aranda; J.W.de Mesquita Carneiro; O.A.Ceva Antunes, *Fuel* 87, 2286-2295, 2008.
- [50] S.Z.Erhan, R.O.Dunn, G.Knothe, B.R.Moser, in *Biocatalysis and Bioenergy* (Eds: C.T.Hou, J.-F.Shaw), John Willey and Sons Inc., New Jersey, 2008, Ch. 1.
- [51] M.P.Dorado, in *Biofuels refining and performance* (Ed: A.Nag), McGraw Hill, United States of America, 2008, Ch. 4.
- [52] P.A.Xool-González, *Establecimiento de cultivo in vitro de Jatropha curcas*, Mérida, 2011.
- [53] J.Sardana; A.Batra; D.J.Ali, *Phytomorphology* 50, 239-242, 2000.
- [54] T.Jha; P.Mukherjee; M.Datta, *Plant Biotechnol. Rep.* 1, 135-140, 2007.
- [55] A.F.Tiburcio; R.Kaur-Sawhney; R.B.Ingersoll; A.W.Galston, *Plant Physiol.* 78, 323-326, 1985.
- [56] E.F.George, *Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology*, Exegetics Limited, Great Britain, 1993.
- [57] M.L.Van Beusichem; E.A.Kirkby; R.Baas, *Plant Physiol.* 86, 914-921, 1988.
- [58] A.Maretzki; L.G.Nickell; M.Thom, *Physiol. Plant.* 22, 827-839, 1969.
- [59] J.Behrend; R.I.Mateles, *Plant Physiol.* 58, 510-512, 1976.
- [60] L.Yong; Z.Hong-Feng; W.Weiz; H.Yu-Jun; T.Ai-Guo; J.Huang; L.Yun-Feng; Z.Jin-Song; S.Chen, *Planta* 228, 225-240, 2008.

- [61] H.E.Flores, R.N.Arteca, J.C.Shannon, *Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology, and Interactions*, American Society of Plant Physiologists, Maryland, 1990.
- [62] F.Antognoni; S.Fornalè; C.Grimmer; E.Komor; N.Bagni, *Planta* 204, 520-527, 1998.
- [63] H.Nayyar; S.Chander, *J. Agronomy and Crop Science* 190, 355-365, 2004.
- [64] Y.Kasukabe; L.He; K.Nada; S.Misawa; I.Ihara; S.Tachibana, *Plant Cell Physiol.* 45, 712-722, 2004.
- [65] P.Bhatnagar; B.M.Glasheen; S.K.Bains; S.L.Long; R.Minocha; C.Walter; S.C.Minocha, *Plant Physiol.* 125, 2139-2153, 2001.
- [66] M.D.Groppa; M.P.Benavides, *Aminoacids* 34, 35-45, 2008.
- [67] F.C.Steward; M.O.Mapes; K.Mears, *Am. J. Bot.* 45, 705-708, 1958.
- [68] J.Purkayastha; T.Sugla; A.Paul; S.Solleti; P.Mazumdar; A.Basu; A.Mohammad; Z.Ahmed; L.Sahoo, *Biol. Plant.* 54, 13-20, 2010.