



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL
PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN

Jatropha curcas L.

Tesis que presenta

HEIDY GUADALUPE MARTÍNEZ SÁNCHEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2011



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS DE YUCATÁN



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL
PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN

Leptotheca curcas L.

Tesis que presenta

HEIDY GUADALUPE MARTÍNEZ SÁNCHEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas, Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2011



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Jatropha curcas* L. 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, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Mérida, Yucatán, México, 19 de agosto de 2011.

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 las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:  _____

Nombre: I. B. Heidy Guadalupe Martínez Sánchez_

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado Mejoramiento genético de *Jatropha curcas* bajo la dirección del Dr. Víctor M. Loyola Vargas.

La microscopía electrónica de barrido se llevó a cabo en el laboratorio de microscopía electrónica a cargo de la Dra. Goreti Campos.

AGRADECIMIENTOS

En general resulta difícil poder expresar con palabras todo el agradecimiento que siento por muchas personas que me ofrecieron su apoyo a través de todo el trayecto de la maestría quiero que sepan que cada una de esas personas, por mucho o poco que hayan hecho, siempre estarán presentes en mi recuerdo y que por tal motivo con alegría les comparto esta tesis.

Por lo tanto quiero agradecer a mi asesor el Dr. Víctor M. Loyola Vargas, por compartirme su gran experiencia en la investigación científica y especialmente por haberme ayudado a llegar al final de una de las metas de mi vida.

De igual manera agradezco a quienes sin escatimar esfuerzo, han sacrificado parte de su tiempo y me compartieron sus experiencias. A Felipe A. Barredo Pool, por la paciencia que tuvo al enseñarme las técnicas de histología y a Rosa Ma. Galaz Ávalos por compartir su experiencia técnica, además de su amistad.

También quiero agradecer a mis amigos que me apoyaron con sugerencias, consejos, ideas y sobre todo por brindarme su valiosa amistad: Yuri, Cristy, Israel y Alfredo.

A los compañeros del laboratorio que me compartieron sus alegrías e hicieron que los momentos fueran agradables: Marisa, Pedro, Tere y Sara.

Mis agradecimientos especiales a mi familia por todo lo que significan en mi vida y a Leobardo por su compañía y cariño.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
LISTADO DE FIGURAS.....	iv
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
BIBLIOGRAFÍA.....	6
CAPÍTULO I	9
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Jatropha curcas</i> L.	9
1.1 TOXICIDAD DE LA SEMILLA.	10
1.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Jatropha</i>	11
1.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	11
1.4 ¿POR QUÉ SON IMPORTANTES LOS CULTIVOS DE <i>Jatropha curcas</i> ?	12
2. GENERALIDADES DEL CULTIVO DE TEJIDOS.	14
2.1 CULTIVO DE TEJIDO EN LA FAMILIA <i>EUPHORBIACEAE</i>	15
2.1.1 <i>Jatropha</i> spp.	16
3. ASPECTOS GENERALES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.	19

3.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA – INDIRECTA.....	20
3.2 FACTORES QUE AFECTAN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	21
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
JUSTIFICACIÓN.....	24
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	25
BIBLIOGRAFÍA.....	25
CAPÍTULO II.....	33
INDUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN <i>Jatropha curcas</i> L.....	33
RESUMEN.....	33
2.1. INTRODUCCIÓN.....	33
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	34
2.2.2. DESINFECCIÓN DE LAS SEMILLAS.....	35
2.2.3. OBTENCIÓN DEL EXPLANTE QUE SE UTILIZA PARA LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	35
2.2.4. MEDIO DE CULTIVO Y REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL PARA LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	36
2.2.5. MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES PARA EL DESARROLLO DE LOS	

EMBRIONES SOMÁTICOS DE <i>J. curcas</i>.....	36
2.2.6. HISTOLOGÍA.	36
2.2.6.1. MÉTODO PARA LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA CORTES HISTOLÓGICOS.	37
2.2.7. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.	38
2.2.7.1. MÉTODO DE PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA MICROSCOPIA. ELECTRÓNICA DE BARRIDO.	38
2.3. RESULTADOS.	39
2.3.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN <i>Jatropha curcas</i> L.	40
2.3.2. HISTOLOGÍA DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS EN <i>JATROPHA CURCAS</i> L.	42
2.3.3. ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DEL EXPLANTE DE HOJA DE <i>Jatropha curcas</i>.	44
2.4. DISCUSIÓN.	53
3. BIBLIOGRAFÍA.	55
CAPÍTULO III 59	59
3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	59
3.1. CONCLUSIONES.....	59
3.2. PERSPECTIVAS.....	59
3.3. BIBLIOGRAFÍA.....	60

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. La planta de <i>J. curcas</i> . a) Planta adulta de <i>J. curcas</i> L. b) Inflorescencia. c) Frutos. d) Semillas.....	12
Figura 1.2. Estadios de desarrollo de los embriones somáticos en las plantas dicotiledóneas.....	20
Figura 2.1. Asepsia del material biológico. a) Semilla de <i>Jatropha curcas</i> . b) Desinfección de semillas con Extrán. c) En presencia de etanol. d) En presencia del hipoclorito de sodio. e) En presencia del PPM. f) Extracción del embrión cigótico.	39
Figura 2.2. Obtención del explante. a) Cultivo de plántulas <i>in vitro</i> . b) Cultivos hidropónicos. c) Segundo par de hojas de las plántulas. d) Discos de hoja de 5 mm. e) Explante colocado de forma adaxial sobre el medio de cultivo. f) Cultivo de explantes. ...	40
Figura 2.3. Proceso de desarrollo de la embriogénesis somática en <i>Jatropha curcas</i> , desde la formación del callo proembriogénico alrededor de los 39 días, hasta la aparición de los embriones somáticos en el estadio cotiledonar después de 123 días de cultivo.....	42
Figura 2.4. Desarrollo de la embriogénesis somática en <i>J. curca</i> . a) Callo proembriogénico a los 39 días de cultivo. b) Grupo de embriones somáticos en los estadios globular y corazón después de 50 días de cultivo. c) Explante con embriones somáticos en condiciones de fotoperiodo después de 122 días de cultivo. d) Embriones somáticos después de 135 días de cultivo. e) Embriones somáticos en los estadios globulares, corazón y torpedo. f) Embrión cotiledonar.	43
Figura 2.5. Cortes histológicos de los diferentes estadios de desarrollo. A) Grupos de células embriogénicas a los 40 días de cultivo (20X). B y C) Estructuras organizadas después de 60 días de incubación, uno de ellas en etapa globular parte inferior del panel B (20X). D) Embrión globular en la transición al estadio de corazón (40X). E y F) Embriones en estadio de corazón a los 75 días (40X). G y H) Embrión en el estadio de torpedo a los 90 días (40X). La barra representa 1 mm.	45

Figura 2.6. Microscopía electrónica de barrido de los explantes durante el proceso de inducción de la embriogénesis somática. En la columna del lado izquierdo se muestra la parte adaxial del explante. **A)** Imagen de la epidermis de la hoja y de las nervaduras menores. **B)** Visión detallada de la epidermis de la hoja compuestas por células normales, unidas sin espacios. **C, D, E y F)** Complejos estomáticos. En la columna del lado derecho se muestra el lado abaxial. **A)** Células normales de la epidermis y nervaduras mayores donde se observan células de color blanco que brotan hacia la superficie de la hoja (marcadas con círculo verde). **B) y C)** Visión detallada de la nervadura y grupos de células del complejo estomático con los poros abiertos y expulsando células. **D), E) y F)** Acercamiento de los complejos estomáticos con los poros abierto permitiendo ver el interior de la hoja.46

Figura 2.7. Microscopía electrónica de barrido (MRB) de los explantes durante el proceso de inducción de la embriogénesis somática. En la columna del lado izquierdo se muestra la parte adaxial del explante. **E y F)** Complejos estomáticos. En la columna del lado derecho se muestra el lado abaxial. **E) y F)** Acercamiento de los complejos estomáticos con los poros abierto permitiendo ver el interior de la hoja.47

Figura 2.8. Microscopía electrónica de barrido de los explantes testigo. En la columna del lado izquierdo se muestra la parte adaxial del explante. **A)** Enfoque del explante completo presentando nervaduras secundarias bien definidas sobre la epidermis. **B)** La epidermis está compuesta de células muy unidas sin espacios entre ellas y abultadas en la zona de la nervadura secundaria. **C)** Epidermis con algunas zonas fracturadas en donde se generan células que brotan a la superficie. Imágenes de la superficie abaxial. **A)** Explante completo con una zona averiada en la parte inferior; **B)** Acercamiento de una zona de la epidermis y algunos complejos estomáticos. **C)** Enfoque de la zona dañada en el cual se observan células en división.....48

Figura 2.9. Microscopía electrónica de barrido de los explantes testigo. En la columna del lado izquierdo se muestra la parte adaxial del explante. **D), E) y F)** Complejos estomáticos. En la columna del lado derecho se muestra el lado abaxial. **D) E) y F)** Acercamiento de los complejos estomáticos con los poros abierto permitiendo ver el interior de la hoja.49

Figura 2.10. Imágenes de un callo embriogénico. A) Fotografía de un explante con callo embriogénico a los 58 días. B) Imagen de MEB de un explante al inicio de la formación del callo embriogénico sobre la superficie del explante. C) y D) Imágenes de explantes que muestran el inicio de la formación del callo embriogénico.51

Figura 2.11. Primeros estadios de desarrollo del embrión somático. A) Imagen de proembriones (flechas amarilla) emergiendo del callo embriogénico. B) Embriones en el estadio globular en la región del callo después de 60 días de cultivo. C) y D) Embrión globular con protoderma definido. E) Conjunto de embriones somáticos en estadios globular y corazón después de 75 días de cultivo (lado izquierdo). F) Imagen ultraestructural de embriones somáticos en estadio globular, corazón (lado derecho).....52

Figura 2.12. Estructuras embriogénicas en estadios avanzados. A) Fotografía de un embrión torpedo y embriones globulares después de 90 días de cultivo. B) MEB de un embrión torpedo. C) Fotografía de un embrión somático en estadio cotiledonar temprano alrededor de los 130 días de cultivo. D) MEB de un embrión cotiledonar temprano.....53

ABREVIATURAS

Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2,4-D
Ácido 3,6-dicloroanisico	Dicamba
Ácido indolacético	AIA
Ácido indolbutírico	AIB
Ácido naftalenacético	ANA
6-Benciladenina	BA
Cinetina	KIN
Cultivo de tejido vegetal	CTV
Embriogénesis somática	ES
Embriogénesis somática directa	ESD
Embriogénesis somática indirecta	ESI
Masa proembriogénica	MPE
Medio Murashige and Skoog	MS
Regulador de crecimiento vegetal	RCV
Revoluciones por minutos	RPM
Zeatina	ZEA

RESUMEN

Desde hace más de cien años Haberlandt {Haberlandt, 1902 26530 /id /d}, propuso que todas las células vegetales tienen la capacidad de formar plantas completas. A este fenómeno le dio el nombre de totipotencialidad. La totipotencialidad es el fenómeno que describe la formación de una planta completa o un órgano como: hoja, raíz o una planta, a partir de una sola célula. Se conocen dos principales vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis somática. El modelo para estudiar la embriogénesis somática a lo largo de los años ha sido zanahoria (*Daucus carota*); en este modelo se puede observar claramente el proceso embriogénico, es altamente reproducible, eficiente y fácil de llevar a cabo. Los eventos de embriogénesis somática y de organogénesis pueden llevarse a cabo de forma directa o indirecta. Esta técnica es ampliamente utilizada para multiplicar diferentes especies de importancia económica que van desde ornamentales hasta cultivos alimenticios. Actualmente esta técnica está siendo aplicada a cultivos que son productores de aceites, como algunos miembros de la familia *Euphorbiaceae*, entre los cuales se encuentra *Jatropha curcas* L., cuyo aceite y algunos metabolitos son utilizados en la fabricación de jabones, pinturas, lubricantes y como purgante en la medicina tradicional china. En la actualidad el interés se centra exclusivamente en el aceite de la semilla, el cual puede ser utilizado para producir biodiesel.

La presente investigación tuvo como propósito generar un sistema de embriogénesis somática en *Jatropha curcas*, el cual puede ser utilizado para diferentes estudios de tipo bioquímico, molecular y anatómico del desarrollo del embrión somático, así como para diversas aplicaciones, como la transformación de la planta para mejorarla genéticamente. El proceso de formación del callo y de embriogénesis somática se caracterizó mediante microscopía electrónica de barrido; por histología para observar específicamente la estructura anatómica y morfológica del desarrollo del embrión somático. La embriogénesis somática en *J. curcas* se indujo después de la formación de la masa proembriogénica en explantes de hoja en medio Yasuda modificado {Quiroz-Figueroa, 2006 25818 /id} suplementado con 0.5 μM de BA. La inducción de la embriogénesis somática se llevó a cabo aumentando la concentración de benciladenina a 8.9 μM y cambiando el medio de cultivo al medio de Murashige and Skoog.

ABSTRACT

Since more than hundred years ago, Haberlandt proposed that all plant cells have the capacity to form a whole functional plant. This capacity was coined with the name of totipotenciality which is the phenomenon that described the formation of a complete plant or tissue (leave, root or stem) from a single cell. There are two principal ways of regeneration in plants, organogenesis and somatic embryogenesis. The model for excellence to study somatic embryogenesis has been carrot (*Daucus carota*). In this model, it is possible to observe the whole embryogenic process, which it is highly reproducible, efficient and easy to perform. Somatic embryogenesis and organogenesis can be carried out directly or indirectly. This technique is highly used to multiply different species of economical value, e.g. ornamental plants or plants used as food. Nowadays, this technique has been applied to oil producer crops such as the *Euphorbiacea* family in which *Jatropha curcas* has become the most studied plant due to its oils and metabolites that have been used in soap, paint, lubricant manufacturing as well as in the use of Chinese traditional medicine. However, more recently the interest on this plant has only been focused on the seed oil which can be used to produce biodiesel. The present work had the goal to generate a somatic embryogenesis system in *J. curcas* which can be used for different studies such as biochemical, molecular or anatomic in the somatic embryo development, as well as in the use of wide modern applications such as plant transformation to genetically improve this plant. In addition, in this work it was histological characterized the process for the callus and somatic embryogenesis formation by scanning electronic microscopy to observed the anatomical and morphological structures during the somatic embryo development. The somatic embryogenesis in *J. curcas* was induced after the proembryogenic mass formation in leaves explants in a modified Yasuda media supplemented with 0.5 μM de BA. The somatic embryogenesis induction was carried out by increasing the benciladenine concentration to 8.9 μM and changing the culture media to Murashige and Skoog.

INTRODUCCIÓN

Jatropha curcas L. pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, que está integrada por alrededor de 220 géneros y más de 7,200 especies que se hallan ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales, con sus mayores centros de localización en América y África. Las especies son arbóreas, arbustivas o herbáceas, anuales o perennes, en algunos casos leñosas, con o sin látex. En la literatura se hallan diversos ejemplos de especies de esta familia utilizadas en la medicina popular, varias de las cuales han sido clasificadas como tóxicas. El centro de origen de *J. curcas* es México y posiblemente Centroamérica (Fairless, 2007).

El árbol de *J. curcas* crece a una altura de entre tres y cinco metros, en ocasiones su altura puede llegar a los ocho o diez metros en condiciones climáticas y de cultivo favorables. Se ha señalado que es tolerante a la sequía. *J. curcas* es ahora un cultivo importante en todo el mundo, especialmente en las zonas tropicales, por las bondades que dicha especie presenta como fuente de aceite para producir biocombustible (Sujatha y Mukta, 1996), sus semillas contienen entre 20 a 60% de aceite, dependiendo del origen de la semilla (Openshaw, 2000). Los principales ácidos grasos que componen los triacilglicéridos presentes en su aceite son, linoleico y oleico, que en conjunto representan hasta el 80% del aceite; otros de los ácidos grasos presentes son el palmítico y esteárico. El aceite generalmente no es comestible, debido a la presencia de sustancias tóxicas.

J. curcas presenta diversos problemas, comunes a otros cultivos, como pérdida de viabilidad de la semilla, ataque de diversas plagas, enfermedades y una baja homogeneidad genética en los cultivos, lo que genera bajo rendimiento en la producción de aceite. Uno de los principales problemas por resolver en *J. curcas* es su susceptibilidad a plagas y enfermedades. Entre las plagas que afectan el cultivo, es de particular importancia la del orden de insectos *Heteroptera*. Otro de los problemas es el poco conocimiento que se tiene acerca de los cuidados que se deben tener con el desarrollo de los cultivos, debido a que *J. curcas* es una planta que se puede señalar como no domesticada.

Entre las ventajas del cultivo de tejidos como herramienta, está la de que se puede emplear para diversos usos, por ejemplo, la obtención de un cultivar con características

de resistencia a enfermedades, ya sea mediante la formación de un organismo transgénico o al generar variación somaclonal. También se puede utilizar la generación de mutaciones, el efecto de rejuvenecimiento fisiológico y los cambios epigenéticos, ya que el cultivo de tejidos puede ser una fuente de variación genética (Larkin y Scowcroft, 1981). Sin embargo, los modelos generados mediante el cultivo de tejidos vegetales (CTV) son ampliamente utilizados, como es el caso de la embriogénesis somática (ES) la cual es utilizada, tanto para el mejoramiento genético de la especie, como para su propagación.

En el proceso de ES se genera una estructura bipolar de forma asexual y, en general, sin conexión vascular con el tejido original. Dicho proceso se lleva a través de diferentes cambios tanto bioquímicos, moleculares, como morfológicos, en donde el primer estadio reconocible es la globular, con lo cual se inicia la diferenciación celular y se establece la estructura básica de la futura planta; la estructura más visible de esta etapa es el protodermo, el cual ha sido revelado por análisis histológicos (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Después continúa el proceso con el desarrollo de los siguientes estadios: oblongo, corazón, torpedo y cotiledonar (Nakamura et al., 1992). La transición del estadio globular a corazón está claramente marcada por la presencia de dos cotiledones, el alargamiento del hipocotilo y el comienzo del desarrollo de la radícula, estos procesos continúan hasta los estadios torpedo y cotiledonar. En el caso de *D. carota*, dos a tres semanas después de la inducción, las plántulas son claramente visibles con cotiledones verdes, el hipocotilo alargado y la radícula con pelos radiculares desarrollados (Zimmerman, 1993).

En este trabajo se analiza el proceso de la ES utilizando como modelo de estudio *J. curcas*. Se llevó a cabo la inducción del proceso embriogénico y se analizaron los diferentes estadios de desarrollo mediante técnicas histológicas y de microscopía electrónica de barrido.

BIBLIOGRAFÍA

- Fairless D., Biofuel: The little shrub that could - maybe, *Nature*, 449: 652-655, (2007).
- Larkin P. J. y W. R. Scowcroft, Somaclonal variation -a novel source of variability from cell cultures for plant improvement, *Theor. Appl. Genet.*, 60: 197-214, (1981).
- Nakamura T., T. Taniguchi y E. Maeda, Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope, *Jpn. J. Crop. Sci.*, 61: 476-486, (1992).

Openshaw K., A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise, *Biomass Bioenerg.*, 19: 1-15, (2000).

Quiroz-Figueroa F. R., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas, Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 86: 285-301, (2006).

Sujatha M. y N. Mukta, Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 44: 135-141, (1996).

Zimmerman J. L., Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants, *Plant Cell*, 5: 1411-1423, (1993).

CAPÍTULO I**1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Jatropha curcas* L.**

El género *Jatropha* está representado aproximadamente por 175 especies conocidas (Dehgan, 1984), es una de las más grandes a nivel mundial y ocupa el sexto lugar en diversidad después de *Orchidaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Poaceae* y *Rubiaceae* (Steinmann, 2002). Las especies más comunes que integran el género son *Jatropha curcas*, *J. glandulifera*, *J. gossypifolia*, *J. multifida*, *J. nana*, *J. panduraefolia*, *J. villosa*, y *J. podagrica*. La mayoría de estas especies son ornamentales, a excepción de *J. curcas* y *J. glandulifera* debido a que producen aceite (Basha y Sujatha, 2007; Debnath y Bisen, 2008; Ganesh Ram et al., 2008; Sudheer Pamidimarri et al., 2009; Tanya et al., 2011).

J. curcas es una dicotiledónea perenne, clasificada como una especie diploide con $2n = 22$ cromosomas (Carvalho et al., 2008; Dehgan, 1984). Es originaria de México y América Central (Heller, 1996). Se ha distribuido por todo el mundo con clima tropical y subtropical (Banerji et al., 1985) se adapta bien al trópico muy seco con precipitaciones de 250 mm hasta el subtrópico húmedo con precipitaciones de más de 1,500 mm, teniendo un mejor desarrollo en terrenos de 600 a 800 msnm: se ha mencionado que sobrevive en suelos áridos o pedregosos, debido a estas características es una planta que no compite por tierras fértiles, de tal manera que no afecta a otros cultivos con fines alimenticios.

A *J. curcas* se le conoce por diferentes nombres como: nuez purgante, coquito, tempate, piñón, piñol, higos del duende, barbasco, en la república mexicana se le conoce comúnmente como piñoncillo, en la zona de la península de Yucatán como tsikil-té.

La palabra *Jatropha* deriva del Griego *jatrós* (doctor) y *trophé* (comida), lo que hace referencias a su uso medicinal. Se ha documentado que cualquier parte de la planta puede ser utilizada con esta finalidad. En cuanto al aceite se ha utilizado para la producción de jabón, velas y actualmente el interés se enfoca en su uso como materia prima para la producción de biocombustible, principalmente porque los aceites vegetales son una excelente fuente para obtener combustible libre de contaminantes.

1.1 TOXICIDAD DE LA SEMILLA.

Las especies del género *Jatropha* se conocen por ser muy tóxicas e irritantes para los humanos y animales. Las semillas contienen una proteína llamada curcina, además de ésteres de forbol (Huang et al., 2008; Lin et al., 2003; Qin et al., 2005). El análisis de la semilla ha permitido determinar que los principales irritantes en *J. curcas* y en *J. gossypifolia* están representados mayormente por el 12-deoxy-16-hidroxiforbol- acetilado con elevadas fracciones de ácidos insaturados (Adolf et al., 1984).

También se han evaluado variedades tóxicas y no tóxicas de *J. curcas*, en este caso siendo las más comunes las tóxicas, por lo tanto se han analizado parámetros como la composición química, la digestibilidad, la degradación de proteínas y los compuestos tóxicos de cada una de las variedades las cuales provenían de cuatro diferentes lugares Cabo Verde, Nicaragua, Nigeria y México (no tóxica) (Makkar et al., 1998a). Los ésteres de forbol se encuentran en la semilla o en el látex, el cual es exudado de las plantas al hacer una herida y son los principales agentes responsables de la toxicidad.

En el aceite de las semillas también se encuentran presentes otros metabolitos secundarios, en bajas concentraciones, que se sintetizan y acumulan como mecanismos de defensa, tales como fitatos, lectinas, taninos, glucósidos cianogénicos, saponinas, inhibidores de tripsina, glucósidos de pirimidina, alcaloides e inhibidores de proteasa (Makkar et al., 1998a). Algunos procesos empleados por los seres humanos para procesar sus alimentos ayudan a eliminar algunos de los compuestos tóxicos presentes en los alimentos. Por ejemplo, en el estado de Veracruz las semillas son consumidas por la gente después de ser cocidas y la harina de esta semilla es utilizada en la elaboración de platillos tradicionales en Puebla, Morelos, Hidalgo, Veracruz y Quintana Roo (Makkar et al., 1998b).

De acuerdo con los reportes hasta ahora publicados se ha demostrado que todas las partes de la planta tienen propiedades medicinales aunque provengan de variedades tóxicas y se utilizan en varios lugares del mundo. Las hojas presentan actividad antileucémica, el aceite tiene propiedades de laxante o de emético, el látex contiene un

alcaloide conocido como jatrofina que se considera tener propiedades anticancerígenas y también se utiliza para enfermedades de la piel (Debnath y Bisen, 2008).

1.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Jatropha*.

La clasificación taxonómica de *J. curcas* es la siguiente:

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
División	<i>Embryophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Sub Clase	<i>Rosidae</i>
Orden	<i>Malpighiales</i>
Familia	<i>Euphorbiaceae</i>
Subfamilia	<i>Crotonoideae</i>
Tribu	<i>Jatropheae</i>
Género:	<i>Jatropha</i>
Especie:	<i>J. curcas</i>

1.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Las plantas de *J. curcas* poseen raíces cortas y poco ramificadas. Las plantas poseen cinco raíces, una central y cuatro periféricas. El tallo no presenta uniformidad en su crecimiento, el tronco es en forma de cilindro robusto, verde y está dividido desde la base en ramas largas. Las hojas son simples alternas, verdes, amplias y brillantes en forma de palmas con peciolo de 5-35 cm de largo, lámina acorazonada, de 7-32 cm de diámetro, con tres a cinco lóbulos, de borde liso. El haz es verde, el envés verde claro, glabro o este último con pelillos finos. Es un arbusto de hojas caducifolias y en verano es muy común ver los tallos sin hojas. Son ovoides con un diámetro aproximado de 1.5 a 3.0 cm de largo, el desarrollo del fruto necesita alrededor de 90 días desde la floración hasta que madura la fruta, este fruto se divide en tres partes, en cada cavidad se encuentra una semilla, formado por un pericarpio o cáscara dura y leñosa, que no se abre hasta que alcance la madures, en el proceso de maduración inicialmente es de color verde pasando a amarillo, luego a café y en la fase final de maduración a negro. Contiene tres semillas las cuales son generalmente grande, miden de 1.2 a 2.0 cm de largo con un diámetro de 1.0 a 1.3 cm, debajo del pericarpio se encuentra una envoltura de color blanco que cubre al

endospermo y donde se almacenan proteínas, almidón y ácidos grasos. Es un arbusto grande que crece de dos a tres metros y puede alcanzar hasta ocho metros en ciertas condiciones, el tronco presenta un fuste ramificado, corteza lisa de madera suave (Heller, 1996).

La planta produce flores unisexuales, las flores individuales se agrupan en inflorescencia las cuales se forman en la parte axial de la hoja, ambas flores masculinas/femeninas son de 6-8 mm, de color verde-amarillo con pétalos de 6 mm de largo y blanquecinos (Solomon Raju y Ezradanam, 2001).

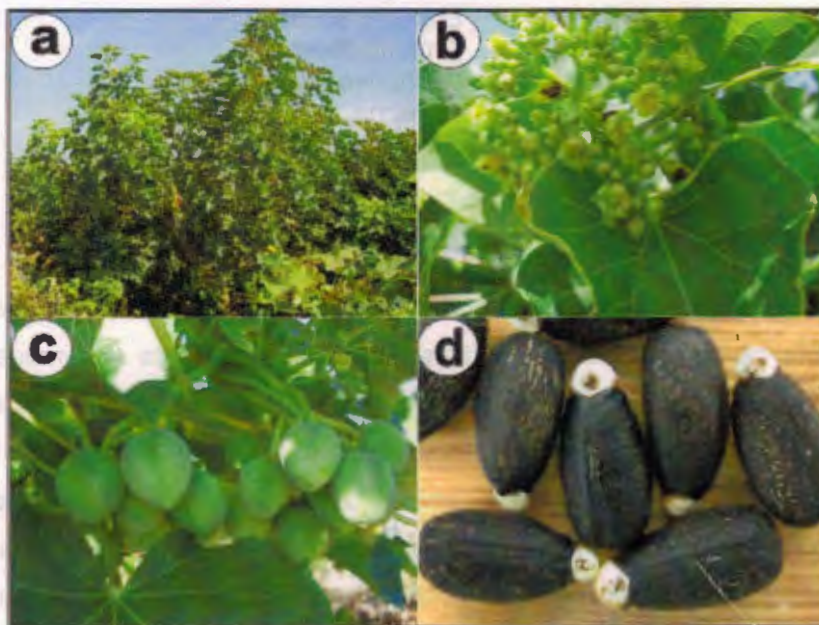


Figura 1.1. La planta de *J. curcas*. a) Planta adulta de *J. curcas* L. b) Inflorescencia. c) Frutos. d) Semillas.

1.4 ¿POR QUÉ SON IMPORTANTES LOS CULTIVOS DE *Jatropha curcas*?

Dentro del grupo de las *Euphorbiaceae*, *J. curcas* y *Ricinus communis* son plantas de cuyas semillas se obtienen aceites. En cuanto al aceite de *J. curcas*, debido a que no es comestible, tiene un potencial comercial muy prometedor y es una fuente alterna para producir combustible (Banerji et al., 1985). Las estimaciones actuales sugieren que tan solo en la India y China existen ya más de 2.5 millones de hectáreas plantadas de *J.*

curcas y se espera que actualmente existan 23 millones de hectáreas (Fairless, 2007). En las plantaciones de *J. curcas* se obtienen alrededor de dos kilos de semillas por árbol y en plantaciones donde los suelos son pobres y desérticos se obtiene un kilogramo de semilla por árbol. La producción total de las plantaciones varía entre 2.5 toneladas y 5 toneladas por hectárea (Debnath y Bisen, 2008).

En diferentes estudios se ha reportado el contenido de ácidos grasos de la semilla que van de 25-30% y en la harina de 50-60%, donde el 21% está integrado por los ácidos grasos saturados y el 79% restante por los ácidos grasos insaturados (de Oliveira et al., 2009). El aceite de *Jatropha* está compuesto de ácido linoleico (C18:2), ácido oleico (C18:1) y en concentraciones más bajas se encuentran el ácido palmítico (C16:0) y el ácido esteárico (C18:0) (Heller, 1996; Openshaw, 2000).

La producción de biodiésel implica la transesterificación de los ácidos grasos presentes en los triacilglicéridos con metanol, para producir ésteres metílicos de ácidos grasos (King et al., 2009).

Además del aceite de *J. curcas*, el biodiésel puede ser producido a partir de una variedad de materias primas, tales como el aceite de colza, soja, canola, lino, cocotero, palma aceitera, mostaza y algas, así como de grasas animales y/o aceite vegetal usado (Vasudevan y Briggs, 2008). Sin embargo, si se utilizan especies comestibles para producir biodiesel, podrían producirse una serie de disturbios en la producción agrícola y suministro de alimentos para alimentación humana y animal. Por lo tanto, tiene sentido y es importante examinar la producción de biodiesel a partir de aceites usados y otros aceites que provengan de cultivares no comestibles como es el caso de *J. curcas*. es una especie que generalmente no se utiliza como alimento, la mayoría de las especies de *Jatropha* son adaptables a diferentes tipos de condiciones del suelo, por ejemplo suelos degradados y erosionados (Thakur y Rai, 1982), por lo que no compite con otros cultivos por el uso del suelo.

De forma indirecta, la producción de biodiésel es muy importante para combatir los efectos del cambio climático y la conservación de los ecosistemas.

Los factores que determinan las condiciones para hacer uso de un tipo particular de

materia prima para la producción de biodiesel aún se están estableciendo. Por otro lado algunos países han definido estándares para producir biodiésel y su uso en el ámbito local, sin embargo, dichas especificaciones no están disponibles para muchos de los países que cultivan *J. curcas* (King et al., 2009)

2. GENERALIDADES DEL CULTIVO DE TEJIDOS.

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) se define como el conjunto de técnicas que permite el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de células, tejidos u órganos en condiciones asépticas, con potencial de diferenciación en un medio de cultivo, bajo condiciones físicas y químicas, en un ambiente controlado (Loyola-Vargas et al., 2008). Es decir, consiste en cultivar pequeños segmentos de una planta (explante) sobre un medio de cultivo, con el propósito de regenerar plantas completas, o mantener células desdiferenciadas. De esta forma, se pueden regenerar plantas a partir de cualquier parte de una planta: meristemos, yemas axilares, embriones cigóticos, cotiledones, hipocótilo, tallo, hoja, raíz, inflorescencias, pétalos, óvulos y polen. La base del CTV fue propuesta por Gottlieb Haberlandt 1902 (1902), cuando hipotetizó que puede generarse una planta funcional y completa a partir de una sola célula.

El establecimiento de los primeros cultivos fue difícil porque no se conocían los requerimientos de los medios de cultivo, como la concentración de reguladores del crecimiento, entre otros. Otro problema era que se utilizaban tejidos muy diferenciados, en lugar de tejidos jóvenes y poco diferenciados.

En el CTV es fundamental establecer los requerimientos del medio de cultivo, el cual está formado por sales orgánicas e inorgánicas. Una de las primeras formulaciones establecidas para el medio de cultivo que dio mejores resultados fue el que se obtuvo de los extractos de hoja de tabaco principalmente por los compuestos orgánicos, en vez de los inorgánicos del extracto, comprobándose que existen elementos esenciales para el desarrollo o crecimiento del cultivo (Murashige y Skoog, 1962). Entre otros componentes del medio de cultivo se encuentran los reguladores de crecimiento vegetal los cuales están involucrados tanto en la división como en la elongación celular (Kende y Zeevaart,

1997).

El CTV es útil para multiplicación y conservación de especies, las cuales son difíciles de regenerar con otros métodos con la finalidad de evitar su extinción. Por ejemplo, mediante la criopreservación del germoplasma se puede mantener la diversidad genética de especies en peligro de extinción. La tecnología para el cultivo de células y tejidos ayuda a producir compuestos activos *in vitro* con una mejor productividad y sin afectar los recursos naturales (Oksman-Caldentey y Inze, 2004).

Entre los diferentes CTV que se pueden obtener están los cultivos de callo, de suspensiones celulares, protoplastos, anteras, cultivo de meristemos y cultivo de embriones somáticos (Loyola-Vargas et al., 2008).

Actualmente, las facilidades para el CTV se encuentran prácticamente en cada laboratorio de biología de plantas, con diferentes objetivos, debido a que se ha convertido en un recurso básico para la biotecnología moderna, desde los fundamentales aspectos bioquímicos y moleculares, hasta la propagación masiva de individuos élite. Hoy en día hay cinco principales áreas del CTV: a) como un sistema modelo para estudiar aspectos fundamentales de la fisiología celular de plantas, b) generación de individuos genéticamente modificados, c) la propagación a gran escala de materiales élite, d) la preservación de especies en peligro de extinción, y e) la ingeniería metabólica de sustancias químicas (Loyola-Vargas et al., 2008).

Con la continua expansión de las tecnologías *in vitro*, el CTV se ha convertido en el título general de un tema muy amplio. Si bien desde el principio era posible el cultivo de células vegetales, ya sea como órganos establecidos, tales como raíces, o como masas desorganizadas, ahora ya es posible el cultivo de células vegetales en una variedad de formas, de manera individual (como células individuales en los sistemas de microcultivo); colectivamente (como callos o suspensiones, en placas Petri, en matraces Erlenmeyer, o en fermentadores de gran escala), o como unidades organizadas, si se trata de brotes, raíces, óvulos, flores o frutos (Hall, 1999). Dentro del CTV se cuenta con tres principales vías de regeneración de plantas, la primera es la proliferación de yemas, en las que se parte de meristemos ya formados para la obtención de una o varias plantas completas, la organogénesis y la embriogénesis somática.

2.1 CULTIVO DE TEJIDO EN LA FAMILIA *EUPHORBIACEAE*.

Los miembros de esta familia son una fuente valiosa de diversos productos de los cuales se obtiene tintes, tubérculos comestibles, aceites, implementos agrícolas, plantas ornamentales, productos farmacológicos. Se ha reportado la propagación vegetativa *in vitro* para varias especies de la familia *Euphorbiaceae* (Etienne et al., 1997; Sushamakumari et al., 2000). En el caso de *Hevea brasiliensis* el mayor énfasis se ha puesto en el desarrollo de protocolos de embriogénesis somática (ES) con fines de micropropagación (Carron et al., 1995; Lardet et al., 2009).

2.1.1 *Jatropha* spp.

En el caso de *Jatropha* en particular, es posible la propagación tradicional a través de esquejes, pero el bajo rendimiento de semilla y la facilidad con que se desprenden las plantas de los suelos pobres y marginales impiden la utilidad práctica de este método de propagación.

Las primeras investigaciones sobre el cultivo de tejidos del género *Jatropha* estuvieron confinadas al cultivo de endospermos de *J. panduraefolia* (Syn, *J. integerrina*). Se obtuvo un crecimiento continuo del tejido de endospermos maduros de *J. panduraefolia* en medio de White adicionado de ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D), kinetina (KIN) y extracto de levadura (Srivastava, 1971; Srivastava y Johri, 1974). También se ha reportado la proliferación de cultivos de endospermo y la formación de plántulas triploides en la misma especie (Johri y Srivastava, 1973). Actualmente se han reportado protocolos de cultivo de tejidos para el cultivo de endospermo y la propagación rápida de genotipos selectos de *Jatropha* (Deore y Johnson, 2008; Jha et al., 2007; Kochhar et al., 2008; Rajore y Batra, 2005; Sujatha et al., 2000; Sujatha et al., 2005; Sujatha et al., 2008; Sujatha y Dhingra, 1993; Sujatha y Mukta, 1996; Weida et al., 2003), así como para la regeneración directa de brotes, a partir de callos y de embriones somáticos (Deore y Johnson, 2008; Jha et al., 2007; Sardana et al., 2000; Sujatha y Dhingra, 1993; Sujatha y Mukta, 1996).

En vista de la necesidad de propagar masivamente líneas elite, se han desarrollado protocolos para la regeneración de plantas de *J. curcas* mediante la regeneración directa

de brotes a partir de yemas adventicias o axilares (Sujatha et al., 2005). Para ello se utilizaron tejidos de plántulas y segmentos de hoja de plantas maduras; los mejores resultados se obtuvieron con los tejidos de hoja. El medio basal de Murashige y Skoog en presencia de una citocinina (benciladenina, BA, o tiadiazuron) en combinación con la auxina ácido indolbutírico (AIB) promueven de manera efectiva la regeneración de brotes y la ES. El trabajo pionero de Sujatha y Mukta (1996) reveló la efectividad de la combinación de BA con ácido indolbutírico para obtener organogénesis en *J. curcas*. Esta composición del medio, con cambios menores en las concentraciones de reguladores del crecimiento, ha sido utilizada exitosamente para la regeneración en otros cultivares y especies de *Jatropha* (Prabakaran y Sujatha, 1999; Sujatha et al., 2005; Sujatha y Prabakaran, 2003).

Los callos inducidos en un medio con la mezcla de reguladores del crecimiento AIA y AIB regenera brotes cuando los explantes son transferidos a un medio con una relación citocinina/auxina mayor que la usada para la inducción de los callos (Deore y Johnson, 2008; Sujatha et al., 2005; Sujatha y Mukta, 1996). La citocinina tiazurón produce la proliferación de brotes múltiples a partir de yemas axilares (Sujatha et al., 2005) y la inducción de brotes adventicios a partir de explantes de hoja (Deore y Johnson, 2008). Mientras que la combinación de BA con AIB induce la formación de brotes junto con callos, la combinación de tiadiazuron con estos dos reguladores del crecimiento suprime el crecimiento de los callos y promueve la regeneración directa de los brotes (Deore y Johnson, 2008). La inclusión de ácido giberélico favorece la elongación de los brotes (Deore y Johnson, 2008).

También se han reportado diversos protocolos para la regeneración de plantas de *J. integerrima* (Sujatha y Dhingra, 1993). Sujatha et al. (2005) desarrollaron un método para la diferenciación de brotes adventicios combinados con callos a partir de explantes vegetativos de *J. curcas* no tóxica. Weida et al. (2003) reportaron la inducción de brotes a partir de callos de *J. curcas*. A pesar de que se han reportado diferentes sistemas de regeneración a partir de explantes de hoja, la presencia de callos no es deseable para la producción de plantas (Deore y Johnson, 2008).

La adición de sulfato de adenina estimula el proceso de desarrollo de los embriones

somáticos (Jha et al., 2007). La frecuencia de enraizamiento es alta en un medio libre de reguladores del crecimiento (Jha et al., 2007; Sujatha y Mukta, 1996), con 1.0 mg L^{-1} de ácido naftalén acético (ANA) (Sujatha et al., 2005) y con $0.1 - 0.3 \text{ mg L}^{-1}$ de AIB (Deore y Johnson, 2008; Li et al., 2008). La sobrevivencia de las plantas enraizadas es mayor al 80% (Deore y Johnson, 2008; Jha et al., 2007; Sujatha y Mukta, 1996).

También se ha reportado un protocolo altamente eficiente para la regeneración de plantas a través de ES (Jha et al., 2007). La frecuencia en la formación de callos fue del 56%, con un promedio de 58.5 embriones somáticos por callo, y con una conversión a planta del 80%. La aparición de los embriones somáticos en su primer estadio de desarrollo se observa después de 4 a 6 semanas de iniciado el cultivo y la conversión de los embriones somáticos a plántulas requiere de otras 4 a 6 semanas. La ES se asoció con la inducción de una ES de baja frecuencia cuyos embriones también maduran en brotes completos.

Kalimuthu et al. (2007) micropropagaron *J. curcas* usando explantes nodales e incubados en medio de Murashige y Skoog complementado con BA (1.5 mg L^{-1}), KIN (0.5 mg L^{-1}) y AIA (0.1 mg L^{-1}). La ES directa se indujo en los explantes provenientes de cotiledones verdes incubados en medio de Murashige y Skoog adicionado con 2 mg L^{-1} de BA. Los resultados de los estudios histológicos mostraron varias capas de células meristemáticas en la formación de los embriones. El enraizamiento se llevó a cabo de forma efectiva en medio de Murashige y Skoog adicionado con 1 mg L^{-1} de AIA. El endurecimiento de las plantas se llevó a cabo en un medio compuesto de una mezcla de fibra de coco, perlita y composta orgánica en una relación de 1:1:1. Alrededor del 80% de las plantas sobrevivieron.

Entre las especies estudiadas, *J. integerrima* mostró una gran tendencia a la callogénesis y a la regeneración de brotes (75 a 100%) a partir de todos los tipos de explantes usados, incluyendo los tejidos florales (Sujatha et al., 2000; Sujatha y Dhingra, 1993; Sujatha y Reddy, 2000). El medio complementado con BA y AIB facilitó la regeneración de brotes en explantes de diferentes especies de *Jatropha* (Sujatha y Dhingra, 1993), mientras que la combinación de 2,4-D y KIN favoreció la formación de callos (Reddy et al., 1986). La elevada capacidad regenerativa de *J. integerrima* es la base de los estudios para entender

los cambios histológicos y bioquímicos que se llevan a cabo durante la organogénesis *in vitro* (Sujatha et al., 2000). Estos estudios revelaron el área en la cual el mejoramiento mediante ES, en cruza interespecíficas limitadas por las barreras interespecíficas, puede ser usado.

Científicos del Indonesian Research Centre of Biotechnology estudiaron como proveer individuos selectos de *J. curcas*, tanto por multiplicación de brotes, organogénesis o ES. Ellos usaron explantes obtenidos de individuos que producían el mayor número de frutos grandes por planta. Un estudio comparativo entre plantas de *J. curcas* producidas por propagación *in vitro* y a partir de semilla no mostró diferencias entre ellas (Sujatha y Dhingra, 1993). Sin embargo, en un reporte reciente se demostró que las plantas propagadas clonalmente (cutting-raised) se comportan mejor en el campo que las producidas a partir de semilla (Kochhar et al., 2008).

3. ASPECTOS GENERALES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

La ES es el proceso de iniciación y desarrollo de embriones a partir de células que no son el producto directo de la fusión de los gametos. Como se conoce de la naturaleza, existen dos tipos de reproducción vegetal: la reproducción sexual y la asexual. En el caso de la ES su reproducción es de tipo asexual y se refiere al proceso por el cual células somáticas bajo condiciones de inducción, genera células embriogénicas, debido a una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares resultando en la formación de embriones somáticos, los cuales pueden desarrollarse hasta una planta completa (Zimmerman, 1993). La ES representa una vía única de desarrollo que incluye una serie de eventos que la caracterizan como la dediferenciación celular, la activación de la división celular y una reprogramación de su fisiología, metabolismo y los patrones de expresión génica (Yang y Zhang, 2010).

La embriogénesis cigótica, en plantas superiores, se compone de dos fases principales, la morfogénesis y la maduración. La morfogénesis implica el establecimiento de la estructura del cuerpo del embrión, mientras que la maduración implica la expansión celular y la acumulación de macromoléculas de almacenamiento para prepararse para la desecación, la germinación y el inicio del crecimiento de las plántulas (Park y Harada, 2008). Los embriones somáticos tienen, al igual que los cigóticos, la capacidad de formar una nueva

planta, después de un proceso de germinación, con la diferencia de que la ES es un proceso asexual por lo que la nueva planta será exactamente igual a la planta donadora de la célula inicial. Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje apical-radical y carecen de conexión vascular con el tejido materno (Reinert et al., 1977).

La transición en el desarrollo del embrión es generado por una serie de estadios con formas características, en las dicotiledóneas (Figura 1.2), el primer estadio que se presenta es el globular, y a continuación siguen los estadios corazón, torpedo y cotiledonar (Kato y Takeuchi, 1963). En las plantas monocotiledóneas sólo se logran observar tres estadios: globular, escutelar y coleoptilar.



Figura 1.2. Estadios de desarrollo de los embriones somáticos en las plantas dicotiledóneas.

En el desarrollo del embrión existen dos mecanismos simultáneos, uno de ellos es el que dependiendo de la posición de la célula se determina su destino y el otro es el de que una división desigual provoca que la célula se polarice. Los planos de división celular juegan un papel importante durante la embriogénesis, dando como resultado divisiones asimétricas lo que inicia el proceso de histodiferenciación (Von Arnold et al., 2002).

3.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA – INDIRECTA.

Existen dos tipos de ES *in vitro*, la directa y la indirecta, sugiriendo que en la primera los embriones aparecen directamente sobre el explante original es decir, las células

embrionarias están presentes y lo único que se requiere para la formación de los embriones somáticos, es la presencia de una sustancia inductora o la eliminación de una sustancia inhibidora, para que estas células reanuden su actividad mitótica y su desarrollo embrionario; en tanto que la embriogénesis somática indirecta (ESI) o de alta frecuencia, permite la obtención de embriones a partir de callos (Denchev y Atanassov, 1995). En forma particular las diferencias entre la embriogénesis somática directa (ESD) y la ESI no son claras. Las hipótesis al respecto sugieren que la ESD debería tener lugar a partir de células embrionarias predeterminadas. Por el contrario, la ESI debería tener lugar a partir de células indeterminadas y primero se debe formar el callo no diferenciado. Sin embargo, en realidad, los callos embrionarios se forman o no se forman, es menos complicado distinguir entre callos embrionarios y no embrionarios con base en su morfología y color (Von Arnold et al., 2002).

Los callos embrionarios se componen de masas proembrionarias (MPE) y masas no embrionarias. En la actualidad, no se sabe si las primeras MPE formadas en realidad son un embrión que se desvía de su desarrollo normal y prolifera en respuesta a los reguladores de crecimiento vegetal (RCV).

En la ESI el proceso de regeneración se lleva a cabo en múltiples pasos, que comienzan con la formación de MPE, seguido por la formación del embrión somático, la maduración, la desecación y la regeneración de la planta. Para ejecutar eficientemente esta vía, se requiere de un número de tratamientos físicos y químicos, que deben aplicarse con la regulación correcta. Aunque ya hay avances en el desarrollo de estos tratamientos y la comprensión de su mecanismo de acción, también se ha puesto de manifiesto que algunos tratamientos de maduración, coinciden con un mayor rendimiento de embriones somáticos, pero pueden provocar efectos adversos sobre la calidad del embrión, y con ello menor capacidad para la germinación de los embriones somáticos y el crecimiento de las plantas *ex vitro* (Von Arnold et al., 2002; Yang y Zhang, 2010).

3.2 FACTORES QUE AFECTAN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

Alguno de los factores importantes que influyen en la inducción de la ES son, el genotipo, la edad de la planta, el estadio fisiológico de la planta al momento de tomar el explante, las condiciones, las condiciones de incubación y el medio de cultivo.

Se denomina explante a la parte de un tejido u órgano que se aísla del resto de la planta y que se utiliza como material inicial para el cultivo *in vitro*. La elección apropiada del explante es de gran importancia para la exitosa regeneración de plantas, la respuesta morfológica de los explantes cultivados *in vitro* varía notablemente de acuerdo con el estadio de desarrollo y la edad de la planta madre (Tisserat, 1985). Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos y García, 1999).

Para que las células puedan crecer, requieren una variedad de nutrimentos orgánicos e inorgánicos los cuales están estrictamente definidos en los medio de cultivo, por lo que la composición del medio de cultivo juega un papel importante, el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio incluyendo su composición química y su forma física (Gamborg et al., 1976). La finalidad del medio es suministrar un mínimo esencial de los elementos requeridos al explante, se han desarrollado una gran cantidad de fórmulas para el cultivo de tejidos. Dentro de los medio de cultivos que se han formulado se encuentran el medio de White (Loyola-Vargas, 2006), Murashige and Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), Gamborg (B₅) (Gamborg et al., 1968), entre otros. Los medios generalmente varían en el contenido de sales, en el caso del MS presenta alto contenido de NH₄⁺ y K. Es importante señalar ya que la toma de nitrógeno puede variar entre especies y puede estar en el medio de cultivo en forma de amonio o sales de nitrato.

La adición de sustancias que regulan el crecimiento al medio de cultivo es útil para el establecimiento y mantenimiento del cultivo de tejidos. Estos reguladores generalmente son del tipo de las auxinas y citocinina.

Auxinas. Estimulan el alargamiento celular y la mitosis en los meristemos secundarios; en concentraciones moderadamente altas estimulan la formación de callo, mientras que en bajas cantidades estimula la formación de raíces (Stickens et al., 1996),.

Citocininas. Se encuentran en casi todos los tejidos de la planta, son particularmente abundantes en los granos, frutos y raíces (Amasino, 2005). La citocinina natural de planta es la zeatina, ya que fue aislada por primera vez de mazorcas de maíz, se encuentra

principalmente en tejidos que están dividiéndose. Dentro de las citocininas sintéticas se encuentra la BA y la KIN. Los estudios sobre el efecto que produce la aplicación exógena de citocinina, revelan que interactúan con otros RCV en el control de la división celular, la morfogénesis y el crecimiento de yemas laterales (Davies, 1995).

En la mayoría de las especies estudiadas, las auxinas y citocininas son factores clave en la determinación de la respuesta embriogénica, probablemente debido a que participan en la regulación del ciclo celular y la división celular (Francis y Sorrell, 2001)

El proceso de ES se inicia muy a menudo en un medio de cultivo rico en auxinas, principalmente el 2,4-D o el AIA. El AIA, fue la primera auxina natural identificada, existen auxinas sintéticas, tales como el 2,4-D, el ANA, que son particularmente eficaces para promover el establecimiento y proliferación de cultivos embriogénicos, los cuales inducen efectos similares a las auxinas naturales y suelen ser menos metabolizado por las células. El transporte polar de la auxina juega un papel importante en los procesos regulados por la misma y en la formación del cotiledón en el desarrollo del embrión (Tromas y Perrot-Rechenmann, 2010). Las células, que responden a la auxina vuelven a un estadio indiferenciado y empiezan a dividirse. Se ha señalado en algunos cultivos que con el fin de estimular un mayor crecimiento de los embriones somáticos es necesario transferir los cultivos embriogénicos a un medio ausente de auxinas, con el agotamiento de la auxina, se genera el bloqueo de la expresión génica el cual es necesaria para la transición al estadio de corazón (Zimmerman, 1993).

Las citocininas, son muy poco utilizadas para inducir ES; sin embargo, hay especies que han respondido a ciertas citocininas como única fuente de RCVs, incluyendo *Zoysia japonica* (Asano et al., 1996), *Begonia gracilis* (Castillo y Smith, 1997) y *Coffea canephora* (Quiroz-Figueroa et al., 2006).

El genotipo es un factor determinante en la capacidad de respuesta a las auxinas o citocininas para la inducción de la ES (Schäfer et al., 1990). En alfalfa la respuesta embriogénica es específica del genotipo y altamente heredable, al parecer es controlada por dos genes codominantes (Kielly y Bowley, 1997). La obtención de cultivos embriogénicos de soya es dependiente del genotipo (Simmonds y Donaldson, 2000). En cacahuate la respuesta embriogénica es influenciada por el estadio de desarrollo del

explante, el medio de cultivo y el tiempo de inducción (Baker y Wetzstein, 1998).

Lo ideal es que los cultivos sean incubados en condiciones controladas, en particular luz y temperatura. Aunque se conoce poco al respecto, se ha señalado que las respuestas morfogénicas pueden ser alteradas por la temperatura de incubación así como por la calidad e intensidad de la luz (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Una elevada intensidad lumínica ha sido esencial para inducir la ES en *Nicotiana tabacum*, aunque en *Daucus carota* es necesaria la oscuridad para el desarrollo y maduración normal de los embriones somáticos (Litz y Jarret, 1991).

OBJETIVO GENERAL.

Obtener y caracterizar el proceso de embriogénesis somática en *Jatropha curcas* L.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Establecer cultivos de plántulas de *J. curcas in vitro*.
- Evaluar la concentración de reguladores de crecimiento vegetal (auxinas y citocininas) requeridos para la inducción de la embriogénesis somática.
- Caracterizar el proceso desarrollo de los embriones somáticos, por medio de microscopía electrónica de barrido.
- Analizar mediante cortes histológicos el proceso de desarrollo de los embriones somáticos.

JUSTIFICACIÓN.

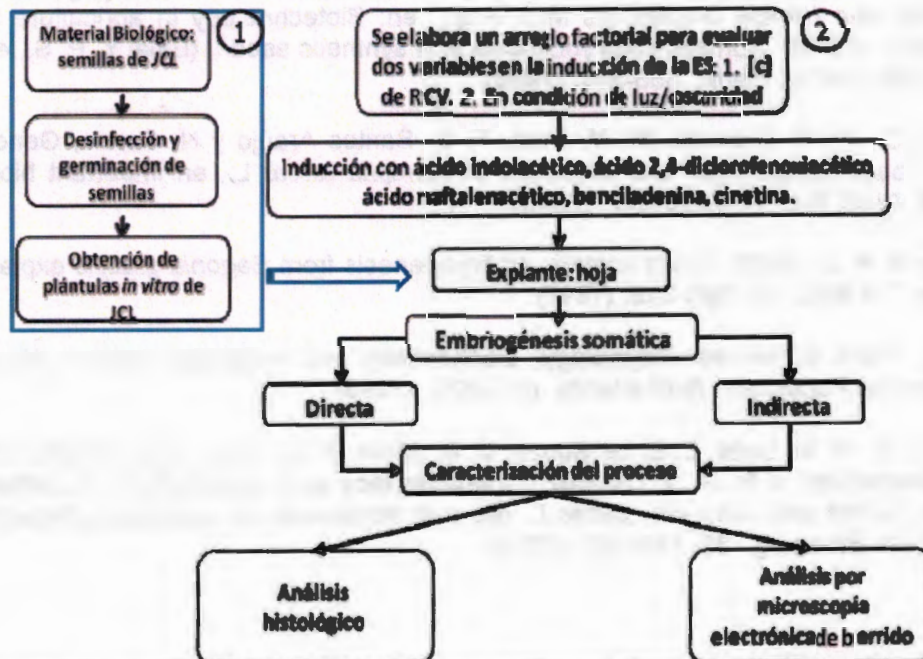
Desde hace algunos años las investigaciones con *Jatropha* se han orientado a la optimización de la regeneración de plantas *in vitro* por las dos principales vías de regeneración. En *Jatropha*, existen hasta la fecha tres reportes de ES. En uno se describe la inducción de la embriogénesis somática de forma directa (ESD) descrita por Kalimuthu et al., (2007). También se ha reportado embriogénesis somática indirecta (ESI) (Jha et al.,

2007; Sardana et al., 2000).

En el caso de ES en *J. curcas*, al igual que en otros sistemas, el problema ha sido la reproducibilidad. Por ello, aún no hay una estrategia que sea eficaz para establecer un sistema de regeneración por ES confiable, que permita regenerar genotipos élites, libre de patógenos, en forma masiva y en un tiempo relativamente corto, en el cual se puedan introducir caracteres deseables con fines de mejoramiento genético. La ES es la vía más adecuada para estos fines; por otro lado, es importante señalar que tampoco se ha analizado y documentado el desarrollo de la ES en esta especie.

La ES se ha reportado en un amplio número de especies de plantas. En un número importante de reportes se ha descrito la ontogenia de la ES mediante microscopía electrónica de barrido y técnicas histológicas. Con el uso de estas técnicas se ha descrito en detalle la formación del embrión somático desde estadios tempranos hasta los más avanzados y se han identificado los principales tipos de células que los componen. En relación con la inducción de la ES en *Jatropha*, se conoce claramente que existen diferentes factores que limitan el desarrollo de los embriones somáticos y que no depende solamente del genotipo de la especie, sino también del tipo del explante y la composición del medio de cultivo.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



BIBLIOGRAFÍA

- Adolf W., H. J. Opferkuch y E. Hecker, Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species, *Phytochemistry*, 23: 129-132, (1984).
- Amasino R., 1955: Kinetin arrives. The 50th anniversary of a new plant hormone, *Plant Physiol.*, 138: 1177-1184, (2005).
- Asano Y., H. Katsumoto, C. Inokuma, S. Kaneko, Y. Ito y A. Fujiie, Cytokinin and thiamine requirements and stimulative effects of riboflavin and α -ketoglutaric acid on embryogenic callus induction from the seeds of *Zoysia japonica* Steud, *J. Plant Physiol.*, 149: 413-417, (1996).
- Baker C. M. y H. Y. Wetzstein, Leaflet development, induction time, and medium influence somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.), *Plant Cell Rep.*, 17: 925-929, (1998).
- Banerji R., A. R. Chowdhury, G. Misra, G. Sudarsanan, S. C. Verma y G. S. Srivastava, *Jatropha* seed oils for energy, *Biomass*, 8: 277-282, (1985).
- Basha S. y M. Sujatha, Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers, *Euphytica*, 156: 375-386, (2007).
- Carron M. P., H. Etienne, N. Michaux-Ferrière y P. Montoro, Somatic embryogenesis in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.), en: *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 30. Somatic embryogenesis and synthetic seed I, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, 353-369, (1995).
- Carvalho C. C., W. R. Clarindo, M. M. Prac, F. S. Santos Araújo y N. Carels, Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant, *Plant Sci.*, 174: 613-617, (2008).
- Castillo B. y M. A. L. Smith, Direct somatic embryogenesis from *Begonia gracilis* explants, *Plant Cell Rep.*, 16: 385-388, (1997).
- Davies P.J., *Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 1-833, (1995).
- de Oliveira J. S., P. M. Leite, L. B. de Souza, V. M. Mello, E. C. Silva, J. C. Rubim, S. M. P. Meneghetti y P. A. Z. Suarez, Characteristics and composition of *Jatropha gossypifolia* and *Jatropha curcas* L. oils and application for biodiesel production, *Biomass Bioenerg.*, 33: 449-453, (2009).

- Debnath M. y P. S. Bisen, *Jatropha curcas* L., a multipurpose stress resistant plant with a potential for ethnomedicine and renewable energy, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9: 288-306, (2008).
- Dehgan B., Phylogenetic significance of interspecific hybridization in *Jatropha* (Euphorbiaceae), *Systematic Botany*, 9: 467-478, (1984).
- Denchev P. D. y A. I. Atanassov, Micropropagation through somatic embryos, en: *Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 30. Somatic embryogenesis and synthetic seed I*, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, 193-206, (1995).
- Deore A. y T. Johnson, High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant, *Plant Biotechnol. Rep.*, 2: 7-11, (2008).
- Etienne H., M. Lartaud, M. P. Carron y N. Michaux-Ferrière, Use of calcium to optimize long-term proliferation of friable embryogenic calluses and plant regeneration in *Hevea brasiliensis* (Mull Arg), *J. Exp. Bot.*, 48: 129-137, (1997).
- Fairless D., Biofuel: The little shrub that could - maybe, *Nature*, 449: 652-655, (2007).
- Francis D. y D. A. Sorrell, The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review, *Plant Growth Regul.*, 33: 1-12, (2001).
- Gamborg O. L., R. A. Miller y K. Ojima, Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, *Exp. Cell Res.*, 50: 151-158, (1968).
- Gamborg O. L., L. H. Murashige, T. A. Thorpe y I. K. Vasil, Plant tissue culture media, *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant*, 12: 473-478, (1976).
- Ganesh Ram S., K. Parthiban, R. Senthil Kumar, V. Thiruvengadam y M. Paramathma, Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers, *Genet. Resour. Crop Evol.*, 55: 803-809, (2008).
- Haberlandt G., Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen, *Sber. Akad. Wiss. Wein.*, 111: 69-92, (1902).
- Hall R.D., *Plant cell culture protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 1-421, (1999).
- Heller J., *Physic Nut. Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1., Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, pp 1-66, (1996).
- Huang M. X., P. Hou, Q. Wei, Y. Xu y F. Chen, A ribosome-inactivating protein (curcin 2) induced from *Jatropha curcas* can reduce viral and fungal infection in transgenic tobacco, *Plant Growth Regul.*, 54: 115-123, (2008).

- Jha T., P. Mukherjee y M. Datta, Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant, *Plant Biotechnol. Rep.*, 1: 135-140, (2007).
- Johri B. M. y P. S. Srivastava, Morphogenesis in endosperm cultures, *Z. Pflanzenphysiol.*, 70: 285-304, (1973).
- Kalimuthu K., S. Paulsamy, R. Senthilkumar y M. Sathya, *In vitro* propagation of the biodiesel plant *Jatropha curcas* L., *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.*, 17: 137-147, (2007).
- Kato H. y M. Takeuchi, Morphogenesis *in vitro* starting from single cells of carrot root, *Plant Cell Physiol.*, 4: 243-245, (1963).
- Kende H. y J. A. D. Zeevaart, The five "classical" plant hormones, *Plant Cell*, 9: 1197-1210, (1997).
- Kielly G. A. y S. R. Bowley, Quantitative genetic analysis of *in vitro* callus proliferation in alfalfa, *Can. J. Plant Sci.*, 77: 225-229, (1997).
- King A. J., W. He, J. A. Cuevas, M. Freudenberger, D. Ramiarmanana y I. A. Graham, Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed, *J. Exp. Bot.*, 60: 2897-2905, (2009).
- Kochhar S., S. P. Singh y V. K. Kochhar, Effect of auxins and associated biochemical changes during clonal propagation of the biofuel plant--*Jatropha curcas*, *Biomass Bioenerg.*, 32: 1136-1142, (2008).
- Lardet L., F. Dessailly, M. P. Carron, P. Montoro y O. Monteuis, Influences of aging and cloning methods on the capacity for somatic embryogenesis of a mature *Hevea brasiliensis* genotype, *Tree Physiol.*, 29: 291-298, (2009).
- Li M., H. Li, H. Jiang, X. Pan y G. Wu, Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 92: 173-181, (2008).
- Lin J., X. Y. Li, X. W. Zhou, K. X. Tang y F. Chen, Cloning and characterization of a curcin gene encoding a ribosome inactivating protein from *Jatropha curcas*, *DNA Sequence*, 14: 311-317, (2003).
- Litz R. E. y R. L. Jarret, Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis, en: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*, (Roca W. M. y L. A. Mroginski, eds.), Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia, 143-172, (1991).
- Loyola-Vargas V. M., The components of the culture media, en: *Plant cell culture protocols*, (Loyola-Vargas V. M. y F. A. Vázquez-Flota, eds.), Humana Press,

Totowa, New Jersey, 369-378, (2006).

- Loyola-Vargas V. M., C. De-la-Peña, R. M. Galaz-Avalos y F. R. Quiroz-Figueroa, Plant tissue culture. An intemporal set of tools, en: Protein and Cell Biomehtods Handbook, (Walker J. M. y R. Rapley, eds.), Humana Press, Totowa, 875-904, (2008).
- Makkar H. P. S., A. O. Aderibigbe y K. Becker, Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors, Food Chem., 62: 207-215, (1998a).
- Makkar H. P. S., K. Becker y B. Schmook, Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds, Plant Food. Hum. Nutr., 52: 31-36, (1998b).
- Murashige T. y F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, Physiol. Plant., 15: 473-497, (1962).
- Oksman-Caldentey K. M. y D. Inze, Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites, Trends Plant Sci., 9: 433-440, (2004).
- Openshaw K., A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise, Biomass Bioenerg., 19: 1-15, (2000).
- Park S. y J. J. Harada, Arabidopsis embryogenesis, en: Plant Embryogenesis, (Suárez M. F. y P. V. Bozhkov, eds.), Humana Press, Totowa, 3-16, (2008).
- Prabakaran A. J. y M. Sujatha, *Jatropha tanjorensis* Ellis & Saroja, a natural interspecific hybrid occurring in Tamil Nadu, India, Genet. Resour. Crop Evol., 46: 213-218, (1999).
- Qin W., H. Ming-Xing, X. Ying, Z. Xin-Shen y C. Fang, Expression of a ribosome inactivating protein (curcin 2) in *Jatropha curcas* is induced by stress, Journal of Biosciences, 30: 351-357, (2005).
- Quiroz-Figueroa F. R., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas, Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*, en: Plant cell culture protocols, (Loyola-Vargas V. M. y F. A. Vázquez-Flota, eds.), Humana Press, Totowa, New Jersey, 111-117, (2006).
- Rajore S. y A. Batra, Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L., J. Plant Biochem. Biot., 14: 73-75, (2005).
- Reddy K. R. K., G. P. Rao y B. Bahadur, *In vitro* studies on castor (*Ricinus communis* L.), Journal of Swamy Botanical Cl, 3: 119-122, (1986).
- Reinert J., Y. P. S. Bajaj y B. Zbell, Aspects of organization organogenesis, embryogenesis, cytodifferentiation, en: Plant tissue and cell culture. Botanical monographs Vol. 11, (Street H. E., ed.), University of California Press, Berkeley,

- 389-427, (1977).
- Sardana J., A. Batra y D. J. Ali, An expeditious method for regeneration of somatic embryos in *Jatropha curcas* L., *Phytomorphology*, 50: 239-242, (2000).
- Schäfer E., B. Bruns, H. Frohnmeier, K. Hanfbrock, K. Harter, T. Merkle y S. Ohl, Phytochrome in plant cell cultures, en: *Progress in plant cellular and molecular biology*, (Nijkamp H. J. J., L. H. W. Van der Plas y J. Van Aartrijk, eds.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 355-365, (1990).
- Simmonds D. H. y P. A. Donaldson, Genotype screening for proliferative embryogenesis and biolistic transformation of short-season soybean genotypes, *Plant Cell Rep.*, 19: 485-490, (2000).
- Solomon Raju A. J. y V. Ezradanam, Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae), *Curr. Sci.*, 83: 1395-1398, (2001).
- Srivastava P. S., *In vitro* induction of triploid roots and shoots from mature endosperm of *Jatropha panduraefolia*, *Z. Pflanzenphysiol.*, 66: 93-96, (1971).
- Srivastava P. S. y B. M. Johri, Morphogenesis in mature endosperm cultures of *Jatropha panduraefolia*, *Beitr. Biol. Pflanzen*, 50: 255-268, (1974).
- Steinmann V. W., Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México, *Acta Bót. Mex.*, 61: 61-93, (2002).
- Stickens D., W. Tao y J. P. Verbelen, A single cell model system to study hormone signal transduction, *Plant Growth Regul.*, 18: 149-154, (1996).
- Sudheer Pamidimarri D., B. Chattopadhyay y M. Reddy, Genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence, *Mol. Biol. Rep.*, 36: 1929-1935, (2009).
- Sujatha M. y M. Dhingra, Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerrima*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 35: 293-296, (1993).
- Sujatha M., H. P. S. Makkar y K. Becker, Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L., *Plant Growth Regul.*, 47: 83-90, (2005).
- Sujatha M. y N. Mukta, Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 44: 135-141, (1996).
- Sujatha M. y A. J. Prabakaran, New ornamental *Jatropha* hybrids through interspecific hybridization, *Genet. Resour. Crop Evol.*, 50: 75-82, (2003).

- Sujatha M. y T. P. Reddy, Role of cytokinins and explant interaction on adventitious shoot regeneration in *Jatropha integerrima* Jacq., *Biologia* (Bratislava), 55: 99-104, (2000).
- Sujatha M., T. P. Reddy y M. J. Mahasi, Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L, *Biotechnol. Adv.*, 26: 424-435, (2008).
- Sujatha M., N. Sivaraj y M. S. Prasad, Biochemical and histological changes during *in vitro* organogenesis in *Jatropha Integerrima*, *Biol. Plant.*, 43: 167-171, (2000).
- Sushamakumari S., M. P. Asokan, P. Anthony, K. C. Lowe, J. B. Power y M. R. Davey, Plant regeneration from embryogenic cell suspension-derived protoplasts of rubber, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 61: 81-85, (2000).
- Tanya P., P. Taeprayoon, Y. Hadkam y P. Srinives, Genetic diversity among *Jatropha* and *Jatropha*-related species based on ISSR markers, *Plant Molecular Biology Reporter*, 29: 252-264, (2011).
- Thakur P. S. y V. K. Rai, Effect of water stress on protein content in two maize cultivars differing in drought resistance, *Biol. Plant.*, 24: 96-100, (1982).
- Tisserat B., Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration, en: *Plant Cell Culture. A Practical Approach*, (Dixon R. A., ed.), IRL Press, Oxford, 79-105, (1985).
- Tromas A. y C. Perrot-Rechenmann, Recent progress in auxin biology, *Comptes Rendus Biologies*, 333: 297-306, (2010).
- Vasudevan P. T. y M. Briggs, Biodiesel production: current state of the art and challenges, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 421-430, (2008).
- Villalobos A. V. M. y V. A. García, Plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemos y apices vegetativos, *Centro de Génética*, 107-118, (1999).
- Von Arnold S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok y L. Filonova, Developmental pathways of somatic embryogenesis, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 69: 233-249, (2002).
- Weida L., W. Qim, T. Lin, Y. Fang y C. Fang, Induction of callus from *Jatropha curcas* and its rapid propagation, *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 9: 127-130, (2003).
- Yang X. y X. Zhang, Regulation of somatic embryogenesis in higher plants, *Crit. Rev. Plant Sci.*, 29: 36-57, (2010).
- Zimmerman J. L., Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants, *Plant Cell*, 5: 1411-1423, (1993).

CAPÍTULO II

INDUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Jatropha curcas* L.

RESUMEN.

El objetivo principal de esta investigación fue identificar y describir los eventos morfológicos e histológicos de la embriogénesis somática de *Jatropha curcas*. Los embriones somáticos fueron inducidos de secciones de hojas cultivadas *in vitro* en medio de Yasuda et al. (1985), suplementado con 5 μM de BA. Después de treinta nueve días de cultivo el explante formó un callo en los bordes del corte, inicialmente la respuesta empezó en la superficie adaxial de la hoja, posteriormente en la abaxial, el proceso continuó y después de tres meses de cultivo, aparecieron las primeras señales de organización, embriones globulares, a los ochenta y dos días el explante se cambió a medio MS fresco, con 8.87 μM de BA, en el que se desarrollaron las estructuras de corazón, torpedo y cotiledonar. Con la finalidad de documentar el proceso de embriogénesis somática se realizaron estudios anatómicos y ultraestructurales.

2.1. INTRODUCCIÓN.

La ES es un proceso que ha sido utilizado generalmente en dos aspectos, para el estudio del desarrollo y la regeneración y para la propagación de plantas con fines comerciales. Debido a que es un evento importante en el cultivo de tejidos, desde hace cincuenta se ha reportado para más de 300 especies, de diferentes familias de plantas (Rojas-Herrera et al., 2002). En general, se puede decir que la ES, es la reorientación del desarrollo de las células somáticas hacia la vía embriogénica y constituye la base de la totipotencialidad celular en plantas superiores (Karami et al., 2009).

Alternativamente, la planta puede generarse de una sola célula somática o de grupos de células somáticas. Por ejemplo, en *Panax ginseng* se ha observado que la primera división celular para el desarrollo del embrión somático se produce a partir de células de la epidermis a los pocos días de cultivo (Choi et al., 1997).

Un punto central del proceso son los reguladores de crecimiento vegetal los cuales median la cascada de transducción de señales que conducen a la reprogramación de la expresión génica, seguido por una serie de divisiones celulares que inducen el crecimiento desorganizado (callos) o el crecimiento polarizado que conduce a la ES (Yang y Zhang, 2010). La formación de los embriones somáticos puede ser de forma directa o indirecta, la ESI se desarrolla después de la formación de callo, sin embargo, el desarrollo de estas células embriogénicas en embriones somáticos requieren de más tiempo (Söndahl et al., 1979), la ESD se logra a través de las células proembriogénicas del tejido en ausencia de callo embriogénico (Gatica et al., 2007); existen factores involucrados en la respuesta de cualquiera de las dos vías embriogénicas y estos dependen de la fuente, del estadio fisiológico del explante empleado, y el tipo y la concentración de los reguladores de crecimiento vegetal. Cada factor es determinante para la formación del cuerpo básico de los embriones somáticos, el cual es establecido en el primer tercio de la embriogénesis y se hace completamente evidente en el momento que llega al estadio de corazón y el posterior inicio del estadio de torpedo, caracterizado por la diferenciación celular y el crecimiento polarizado, en particular el alargamiento y la iniciación de los cotiledones en las especies dicotiledóneas (Trigiano y Gray, 2005), los acontecimientos posteriores incluyen un mayor crecimiento del embrión (Laux y Jürgens, 1997).

Los embriones somáticos permiten y facilitan la observación de los diferentes procesos que ocurren durante el desarrollo del embrión así como el análisis estructural del desarrollo del embrión, como por ejemplo la formación de la pared celular (Malinowski y Filipecki, 2002). Dado que en *J. curcas* no se ha documentado el desarrollo de los embriones somáticos mediante análisis histológico o ultraestructural, en esta investigación se documentó el desarrollo de los embriones somáticos mediante estas técnicas, con el fin de determinar si el proceso se está llevando a cabo de forma correcta y si los embriones somáticos producidos presentan todas las características y cualidades de los embriones sanos.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Las semillas de *J. curcas* fueron colectadas en la plantación del grupo Kekén, localizada

cerca de la ciudad de Mérida. Las semillas fueron utilizadas para crear un sistema de germinación y propagación *in vitro*, con el propósito de contar con material libre de contaminación, para los experimentos de inducción.

2.2.2. DESINFECCIÓN DE LAS SEMILLAS.

Las semillas se lavaron con detergente y agua por 25 minutos, posteriormente se dejaron por 30 minutos al aire libre para que se secan. Se retiró la testa de la semilla, dejando el endospermo al descubierto. Se lleva a cabo una segunda desinfección dentro de la campana de flujo laminar de la siguiente manera.

1. Las semillas fueron tratadas con el detergente Extrán (5% v/v) por 5 min y se enjuagaron con agua destilada estéril, hasta remover todo el residuo de Extrán.
2. Posteriormente se lavaron con una solución de etanol al 70% (v/v), con agitación constante por 3 min.
3. El siguiente paso de desinfección se llevó a cabo con una solución de hipoclorito de sodio al 30% (v/v) a partir de una solución de hipoclorito de sodio comercial (6.5%), por 15 min, después las semillas fueron enjuagadas por 5 veces con agua destilada estéril.
4. Por último se trataron con una solución de PPM al 2% (v/v) durante 8 horas.
5. Después de las 8 horas el embrión cigótico fue extraído de la semilla y sembrado en el medio correspondiente para su germinación. El medio utilizado para la germinación de la semilla se describe en el cuadro 1.

2.2.3. OBTENCIÓN DEL EXPLANTE QUE SE UTILIZA PARA LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

A los 20 días de edad, las plantas fueron transferidas a un sistema hidropónico por 15 días. Al término de este tiempo se utilizó el segundo par de hojas para la obtención del explante. Con la ayuda de un bisturí se cortan las hojas y se dentro de una caja de Petri y con la ayuda de un sacabocado y pinzas estériles se obtuvieron discos de aproximadamente cinco mm de diámetro, los que se colocan de forma adaxial sobre el medio de inducción de la embriogénesis somática (Figura 2.4.).

2.2.4. MEDIO DE CULTIVO Y REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL PARA LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

El medio de cultivo que se utiliza para la inducción de la ES de *J. curcas*, es el medio que fue utilizado para inducir la ESD en café. De acuerdo a dicho protocolo primero es necesario que las plántulas tengan un acondicionamiento previo en medio líquido por 14 días el cual contiene 0.54 μM de ANA y 2.33 μM de KIN (Quiroz-Figueroa et al., 2002). Las plantas tratadas se mantienen por quince días, en un sistema hidropónico a 60 rpm, en condiciones de fotoperíodo 16/8 (luz/oscuridad), a 25 ± 2 °C. Después del tratamiento, las hojas se cortan para obtener los explantes, se utiliza el segundo par de hojas. Con la ayuda de un sacabocados se obtiene el explante en forma de círculo que se coloca en el medio de cultivo, de tal manera que la parte adaxial de la hoja quede en contacto con el medio. El medio que se utiliza para la inducción de la ES es el medio de Yasuda et al. (1985), como se describe en el cuadro 2. El medio se elaboró de forma semisólida utilizando 2.5 g.L⁻¹ gelrite como agente gelificante, el frasco contiene 20 ml del medio, de acuerdo a la formulación mencionada (Cuadro 2), adicionado de 5 μM de BA y ajustando el pH a 5.8, los explantes son cultivados en condiciones de oscuridad a 25 ± 2 °C. Se documentó la respuesta diariamente.

2.2.5. MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES PARA EL DESARROLLO DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS DE *J. curcas*.

El medio semisólido utilizado para el desarrollo de los embriones somáticos, está compuesto de sales orgánica e inorgánica del MS (Murashige y Skoog, 1962) como se describe en el cuadro 1. A este medio se le adiciona 8.87 μM de BA (Kalimuthu et al., 2007) a pH 5.8, gelificado con gelrite 2.5 g.L⁻¹, el cultivo se mantiene en condiciones de fotoperíodo 16/8 (luz/oscuridad), a 25 ± 2 °C.

2.2.6. HISTOLOGÍA.

Para el análisis histológico se tomaron muestra de callo embriogénico a los 30 días de cultivo, así como también de embriones somáticos de 58 y 113 días de cultivo. Como testigos se utilizaron hojas de plántulas tratadas y sin tratar. Las hojas se diseccionaron en discos de aproximadamente 5 mm de diámetro. Todas las muestras fueron fijadas con FAA [formaldehído 10%, ácido acético 5%, etanol 50% (v/v)] durante 48 h en el interior de un desecador. A continuación se deshidrataron en una serie de soluciones con contenido

creciente de etanol [30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100% (v/v)] por dos veces durante 30 min cada paso y después las muestras fueron embebidas en resina JB-4 (JB-4 Kit de Incorporación, Polyscience). Cada muestra se cortó de forma serial con un espesor de 2 a 5 μm en un micrótopo (Microtome Blades Disposable), los cortes se tiñeron con negro-azul de naftol (Naphthol Blue Black) y contrastado con el reactivo de Schiff lo que da un color rojo (ácido periódico-Schiff). Finalmente las muestras fueron observadas en un estereoscopio y fotografiadas.

2.2.6.1. MÉTODO PARA LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA CORTES HISTOLÓGICOS.

1. La solución fijadora está compuesta de 5 ml de formaldehído, 2.5 ml de ácido acético glacial, 25 ml de alcohol al 96% (v/v) y 17.5 ml de agua destilada. El tiempo de fijación fue de 48 h hasta 20 días.
2. La deshidratación se llevó a cabo a través de una serie de concentraciones crecientes de alcohol a 4 °C (30, 50, 70, 85, 96 y 100% v/v). Cuando se deshidrató con alcohol al 30% se hicieron dos cambios por una hora, con vacío por 30 minutos en un desecador. Cuando se llegó al 70% de alcohol la muestra se dejó en infiltración por 24 h, con vacío y a -4 °C.
3. La pre-infiltración, se inició mezclando los componentes del estuche de imbibición JB-4B, la solución (A), más el catalizador y alcohol en una relación 1:1 (v/v). Las muestras se dejaron en la solución por 24 h en condiciones de vacío a -4 °C.
4. Para la infiltración se mezclaron 0.9 g del catalizador con 100 ml de la solución (A). La muestra se dejó en reposo durante 24 a 48 h, en vacío a -4 °C.
5. El embebido de la muestra se realizó mezclando la solución A (JB-4 Embedding monomer), el catalizador (peróxido de benzoilo Plasticized), después se adicionó la solución B (JB-4 Embedding), el volumen de los componentes depende de la cantidad de muestras a embeber.
6. Para la confección de los cortes se utilizó un micrótopo, que consta de un porta bloques, un sistema de avance mecánico, para regular el espesor de cada corte (en micras), y un portador para la cuchilla de acero: Los cortes se realizaron a un espesor

de 2 – 5 μm .

7. Los cortes se extendieron introduciéndolos en un cristalizador con agua a 30 °C y simultáneamente se hizo la adhesión de los cortes al portaobjetos. Cada portaobjeto se introdujo en el cristalizador con agua templada y se “pescan” con ayuda de una cerda fina.
8. Posteriormente se dejaron secar los portaobjetos y se acidificaron con ácido periódico.

Para la tinción se utilizaron dos colorantes uno azul (negro-azul de naftol) y para el contraste se utilizó un colorante rojo (reactivo de Schiff).

2.2.7. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.

Para los estudios ultraestructurales se fijaron porciones de muestras de callo embriogénico de 30 días de cultivo y de embriones somáticos de tres estadios de desarrollo (globular, corazón y torpedo) de muestras de 58 y 113 días de cultivo, en un amortiguador de fosfato 0.2 M durante 48 h a 4 °C. Las muestras fueron deshidratadas a través de una serie de soluciones con concentración creciente de alcohol [30%, 50%, 70%, 85%, 96% y 100% (v/v)] por 30 minutos en vacío en un desecador. Después las muestras se llevaron a punto crítico (Semi-automatic, Sandri-795 tousimis) secando las muestras a una presión de 1070 psi, a una temperatura de entre 26 y 31 °C durante 2 min. Las muestras se colocaron sobre una base con cinta doble adherente, para cubrirlas con oro (Metalizador Denton vacuum, Modelo Desk II). Las observaciones se efectuaron con un microscopio electrónico de barrido marca JEOL (JSM-636OLV).

2.2.7.1. MÉTODO DE PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.

1. Para la fijación del material biológico se utilizó una mezcla de amortiguador de fosfatos 0.2 M a pH 7.1. Con la solución de fosfatos se hizo una solución al 2.5% de glutaraldehído. Las muestras se fijaron por un tiempo de 48 a 72 h. Después de 72 h, las muestras se lavaron con el mismo amortiguador de fosfatos a pH 7.1, de 5 a 10 veces para eliminar toda traza de glutaraldehído.
2. La deshidratación se llevó a cabo a través de una serie de soluciones de

concentración creciente de alcohol (30, 50, 70, 85, 96 y 100%) a 4 °C. La deshidratación con alcohol al 30% se hizo en dos cambios para un promedio de una hora con vacío por 30 minutos en un desecador y cuando llegó al 70% la muestra se dejó en infiltración por 24 horas con vacío y a -4 °C.

3. Al finalizar la deshidratación, las muestras se mantuvieron en vacío y CO₂, lo que mantiene los detalles morfológicos.
4. El metalizado de las muestras se llevó a cabo con un baño de partículas finas de oro, con este paso se previene la rehidratación, evitando el colapso de las muestras celulares.

2.3. RESULTADOS.

El establecimiento *in vitro* de plántulas de *J. curcas*, se obtuvo después de un proceso de asepsia de la semilla que se describió anteriormente (Figura 2.1). Una vez que se extrajo el embrión cigótico y se colocó en el medio de germinación se siguió el desarrollo del embrión cigótico.

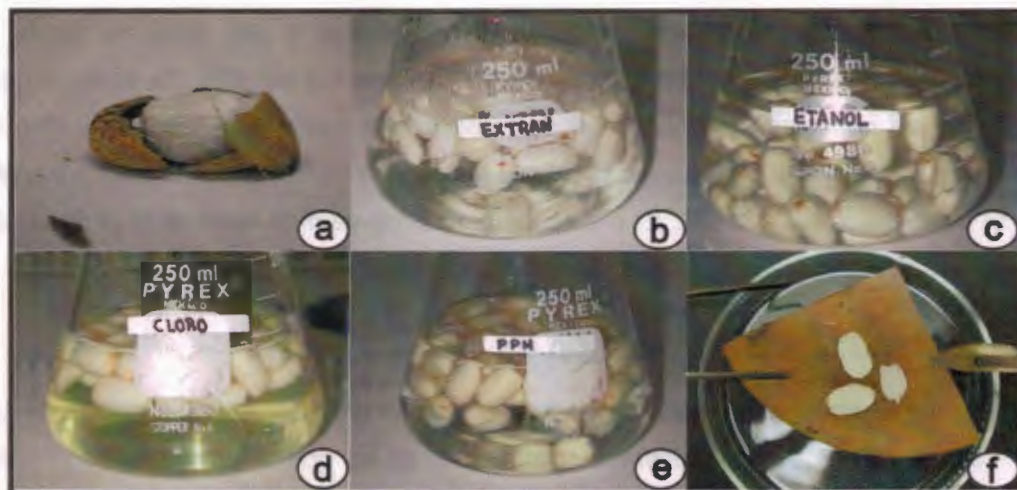


Figura 2.1. Asepsia del material biológico. a) Semilla de *Jatropha curcas*. b) Desinfección de semillas con Extrán. c) En presencia de etanol. d) En presencia del hipoclorito de sodio. e) En presencia del PPM. f) Extracción del embrión cigótico.

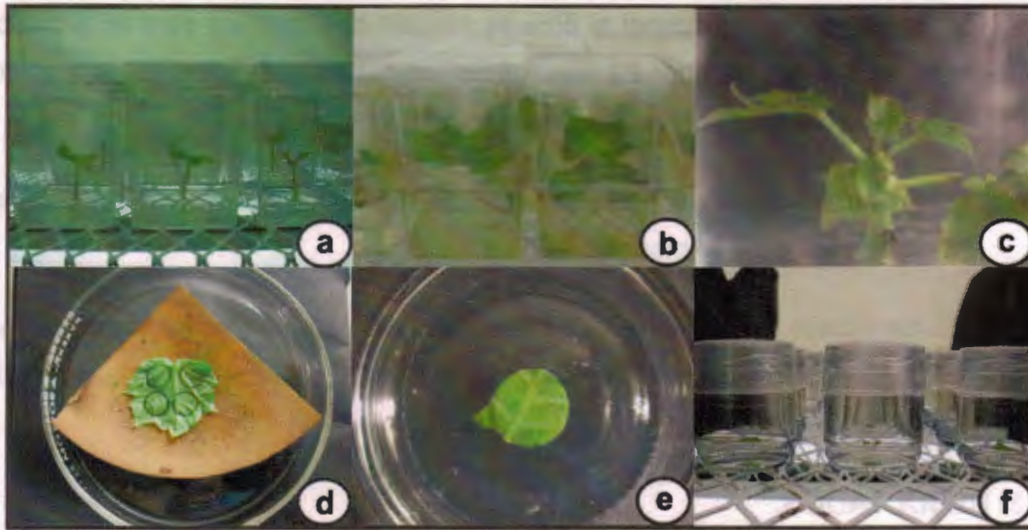


Figura 2.2. Obtención del explante. **a)** Cultivo de plántulas *in vitro*. **b)** Cultivos hidropónicos. **c)** Segundo par de hojas de las plántulas. **d)** Discos de hoja de 5 mm. **e)** Explante colocado de forma adaxial sobre el medio de cultivo. **f)** Cultivo de explantes.

A los siete días el embrión cigótico ya ha germinado y las plántulas están bien desarrolladas (Figura 2.2A), la respuesta de germinación fue del 80%. Se observó que las raíces de las plántulas se fenolizan si permanecen en medio semisólido, por lo que se implementó un sistema hidropónico en el que las plantas se desarrollan mejor y sus raíces no se fenolizan (Figura 2.2B). El sistema hidropónico permite realizar el pretratamiento que se requiere para la inducción de la ES (Quiroz-Figueroa et al., 2006).

2.3.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Jatropha curcas*.

Para inducir la respuesta embriogénica en *J. curcas* se probaron los protocolos reportados por Yasuda et al. (1985) y Kalimuthu et al. (2007) en los que la característica dominante es el uso de una citocinina en lugar de una auxina para inducir la ES. La composición del medio semisólido empleado se muestra en el cuadro 2. Dado que la posición del explante influye en la respuesta a la inducción embriogénica, todos los explantes de hoja se colocaron con la parte adaxial hacia el medio de cultivo y fueron incubados en la oscuridad.

El evento de embriogénesis se inicia cuando en respuesta a la herida algunas células proliferan rápidamente y se convierten en el callo de cicatrización sobre los bordes de los explantes. Este callo aparece a partir de la tercera semana de incubación. A los 39 días de cultivo, se observó en los explantes un aumento en la proliferación de un callo compacto de color crema (Figura 2.3) sobre la superficie del corte. A los 58 días de cultivo el explante presenta una mayor proliferación de callo proembriogénico. Posteriormente, entre los días 70 y 82 de incubación, el explante presenta algunas zonas necrosadas, sin embargo, ya se observan algunas estructuras pequeñas esféricas (embriones globulares) (Figura 2.3). Al observar esta respuesta los explantes se cambiaron a medio MS fresco de acuerdo a la formulación mostrada en el cuadro 1, el cual contiene $8.87 \mu\text{M}$ de BA.

Alrededor de los 92 días de cultivo se observó que también las zonas oxidadas empezaron a responder al tratamiento, observándose más estructuras globulares y algunas estructuras de corazón. Se vio que alrededor del día 117 el proceso se detenía y no continuaba el desarrollo de las estructuras embrionarias. Los explantes se cambiaron a un medio MS fresco sin reguladores del crecimiento y en condiciones de fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad), a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Este cambio favoreció la formación de estructuras tipo torpedo y algunas estructuras cotiledonarias al día 123 después del inicio de la incubación (Figura 2.3). Es importante señalar que la frecuencia de proliferación es muy baja para los dos últimos estadios, de 3 a 4 estructuras de tipo torpedo o cotiledonar. En la figura 2.3 se puede observar que el cambio de condición de los cultivos a los 117 días, de la obscuridad a fotoperiodo, provoca un enverdecimiento de las estructuras embrionarias y una mejor definición de dichas estructuras.

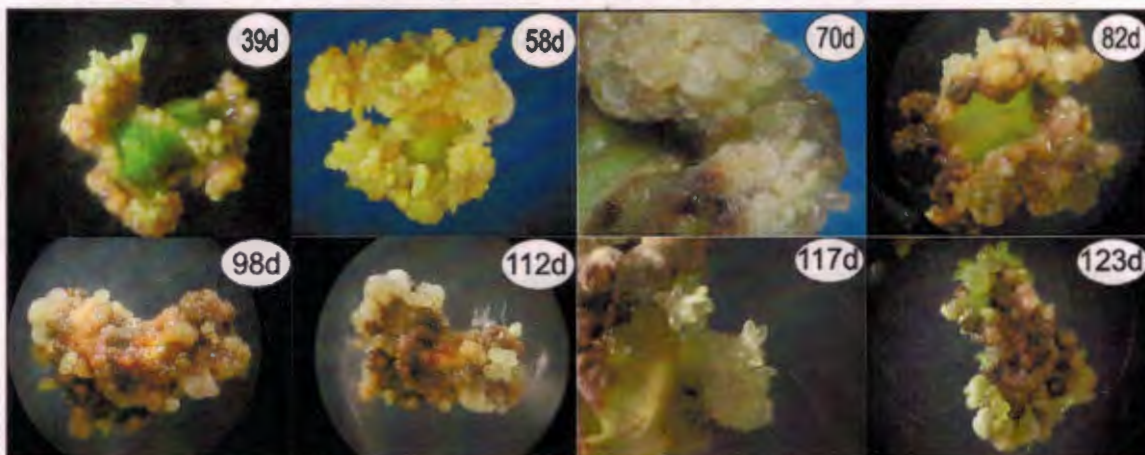


Figura 2.3. Proceso de desarrollo de la embriogénesis somática en *Jatropha curcas*, desde la formación del callo proembriogénico alrededor de los 39 días, hasta la aparición de los embriones somáticos en el estadio cotiledonar después de 123 días de cultivo.

En la figura 2.4, se muestran algunos acercamientos del proceso embriogénico en *J. curcas*, desde el callo proembriogénico (Figura 2.4a) en el que ya se distinguen algunas estructuras embrionarias, hasta estadios más avanzados (Figura 2.4b-f). En algunos casos los embriones somáticos se encuentran vitrificados (Figura 2.4d y 2.4f). Este suele ser un problema que se presenta en tejidos cultivados *in vitro*, debido, entre otros factores, al potencial osmótico del medio de cultivo producido por la concentración de carbohidratos presentes o los elevados niveles de RCV y la baja intensidad lumínica (Ziv, 1991). Si bien el fenómeno de vitrificación está presente en ciertas etapas del proceso, los embriones somáticos continúan con su desarrollo y pueden ser individualizados (Figura 2.4f). Sin embargo, es importante hacer notar que hasta este punto el proceso es poco eficiente y requiere de modificaciones en su protocolo para hacerlo más eficiente.

2.3.2. HISTOLOGÍA DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS EN *JATROPHA CURCAS* L.

Para hacer un seguimiento del origen de la ES y documentar el desarrollo de los embriones somáticos se realizaron cortes histológicos cuando aparecen las primeras estructuras embriogénicas en la periferia del callo proembriogénico, entre los 36 y 40 días de incubación en el medio de inducción de la ES.

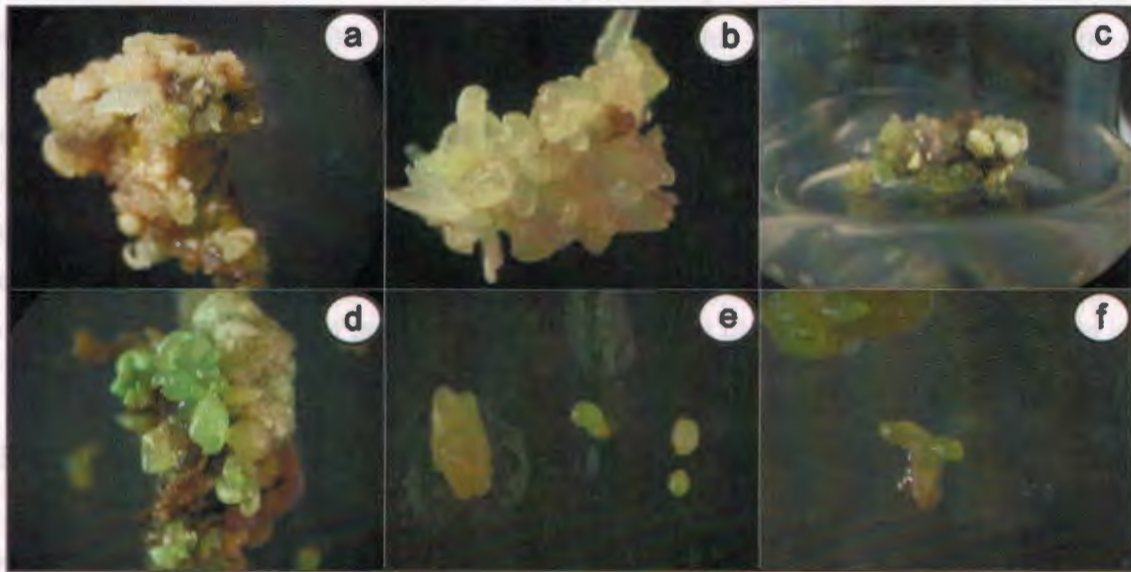


Figura 2.4. Desarrollo de la embriogénesis somática en *J. curca*. **a)** Callo proembriogénico a los 39 días de cultivo. **b)** Grupo de embriones somáticos en los estadios globular y corazón después de 50 días de cultivo. **c)** Explante con embriones somáticos en condiciones de fotoperiodo después de 122 días de cultivo. **d)** Embriones somáticos después de 135 días de cultivo. **e)** Embriones somáticos en los estadios globulares, corazón y torpedo. **f)** Embrión cotiledonar.

Los resultados de este análisis se presentan en la figura 2.5A. Lo primero que se observa es la presencia de grupos de células embriogénicas en diferentes regiones del tejido del explante. Estas células presentan una pared un poco gruesa, son redondas, con citoplasma denso y sus núcleos son prominentes y se colorean intensamente de azul.

Por otro lado, las células no embriogénicas son muy diferentes a las embriogénicas. Las células no embriogénicas están vacuoladas, son alargadas y su pared celular es delgada. También se puede determinar la presencia de varios espacios intercelulares entre ellas y en el borde de estas células se encuentran las células embriogénicas. Es posible que las células embriogénicas se originen de las células parenquimatosas. El desarrollo de los proembriones ya es evidente alrededor de los 60 días de cultivo, así como la formación de embriones globulares es claramente visible (Figuras 2.5B y 2.5C). Los embriones globulares, a su vez están llenos de células embriogénicas que darán origen más tarde a embriones somáticos secundarios, como las estructuras que se ven en la parte superior

del panel 2.5C. Otra posible explicación puede ser que las células de los embriones somáticos de la parte superior del panel están dividiéndose activamente, en tanto que las células del embrión somático de la parte inferior dejaron de dividirse. En los paneles D-F de la figura 2.5 se puede observar el subsecuente desarrollo de los embriones somáticos hasta los estadios de corazón, torpedo y cotiledonar. Algunas de estas estructuras se encuentran llenas de zonas meristemáticas, lo que sugiere que continuarán con su desarrollo. El estadio de corazón se alcanza después de 70 y 75 días de cultivo. Cuando el embrión alcanza el estadio de torpedo, se pueden observar las células del procambium (Figura 2.5E-H).

2.3.3. ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DEL EXPLANTE DE HOJA DE *Jatropha curcas*.

Para este estudio se tomó el segundo par de hojas de plantas cultivadas en el sistema hidropónico descrito anteriormente. Una de las hoja sirvió como fuente de explante para la obtención de embriones somáticos y la otra sirvió como testigo. Los explantes testigo fueron manipulados, incubados y tratados exactamente igual excepto que el medio de cultivo no contenía BA, la cual es indispensable para la inducción de la ES.

En la figura 2.6A izquierda se muestra la parte adaxial de un explante incubado en el sistema para la inducción de la ES y observado por microscopía electrónica de barrido (MEB). Se pueden ver claramente una serie de nervaduras secundarias menores sobre la epidermis de la hoja. Cuando se realiza un acercamiento para ver más detalles de la superficie adaxial de la hoja se puede apreciar la capa de células epidérmicas y algunos complejos estomáticos, señalados por las flechas amarillas en la figura 2.6B izquierda. Cuando se observa el tejido a una mayor resolución, se pueden distinguir claramente las estructuras estomáticas, la mayoría de ellas abiertas (Figura 2.6C-D y 2.7E-F izquierda).

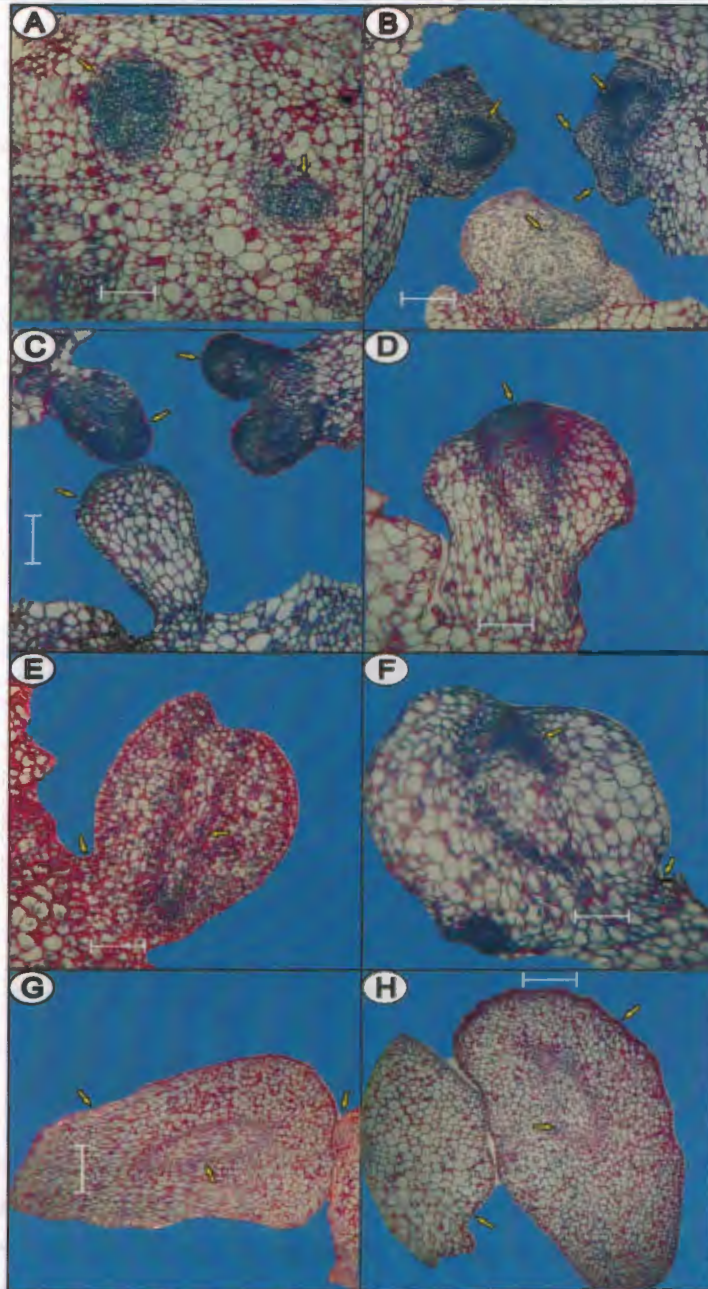


Figura 2.5. Cortes histológicos de los diferentes estadios de desarrollo. **A)** Grupos de células embrionarias a los 40 días de cultivo (20X). **B y C)** Estructuras organizadas después de 60 días de incubación, uno de ellas en etapa globular parte inferior del panel B (20X). **D)** Embrión globular en la transición al estadio de corazón (40X). **E y F)** Embriones en estadio de corazón a los 75 días (40X). **G y H)** Embrión en el estadio de torpedo a los 90 días (40X). La barra representa 1 mm.

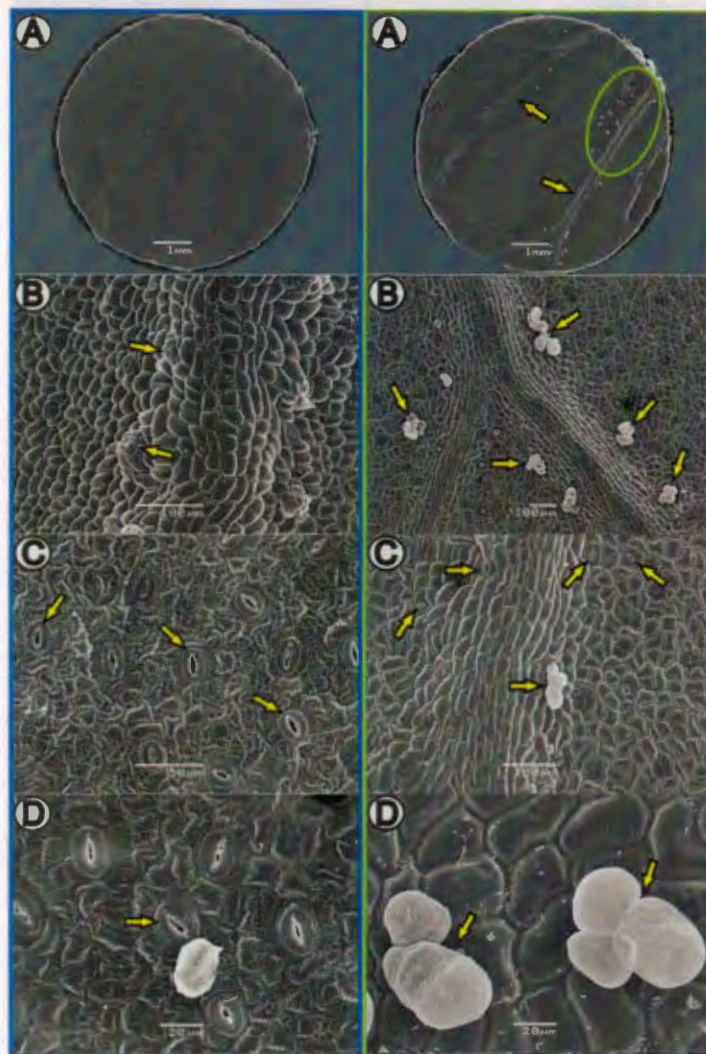


Figura 2.6. Microscopía electrónica de barrido de los explantes durante el proceso de inducción de la embriogénesis somática. En la columna del lado izquierdo se muestra la parte adaxial del explante. **A)** Imagen de la epidermis de la hoja y de las nervaduras menores. **B)** Visión detallada de la epidermis de la hoja compuestas por células normales, unidas sin espacios. **C, D, E y F)** Complejos estomáticos. En la columna del lado derecho se muestra el lado abaxial. **A)** Células normales de la epidermis y nervaduras mayores donde se observan células de color blanco que brotan hacia la superficie de la hoja (marcadas con círculo verde). **B)** y **C)** Visión detallada de la nervadura y grupos de células del complejo estomático con los poros abiertos y expulsando células. **D), E)** y **F)** Acercamiento de los complejos estomáticos con los poros abiertos permitiendo ver el interior de la hoja.

Los efectos del tratamiento para la inducción de la ES en la cara abaxial se muestran en las figuras 2.6 y 2.7 lado derecho. En la figura 2.6A derecha se muestra una microfotografía del explante completo. Se pueden distinguir claramente dos nervaduras bien marcadas (señaladas con flecha amarilla), precisamente a lado de la nervadura se observa varias células redondas sobre la epidermis (señaladas con un círculo verde). Un acercamiento sobre la zona marcada con el círculo verde (Figura 26.B-D). Las células de forma redonda parece que son expulsadas desde el interior de las hojas a través de los complejos estomáticos. Algunas de estas células se empiezan a dividir justo sobre la cara del explante (Figura 27E-F).

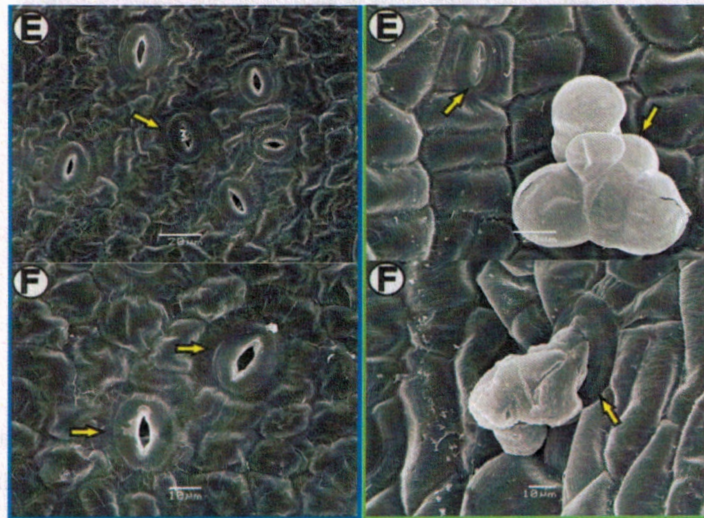


Figura 2.7. Microscopía electrónica de barrido (MRB) de los explantes durante el proceso de inducción de la embriogénesis somática. En la columna del lado izquierdo se muestra la parte adaxial del explante. **E y F)** Complejos estomáticos. En la columna del lado derecho se muestra el lado abaxial. **E) y F)** Acercamiento de los complejos estomáticos con los poros abiertos permitiendo ver el interior de la hoja.

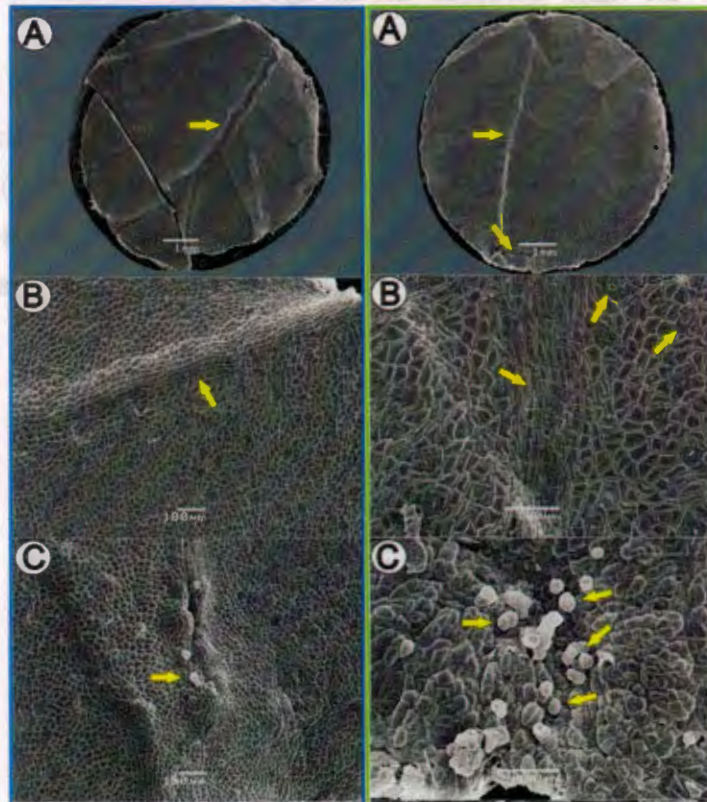


Figura 2.8. Microscopía electrónica de barrido de los explantes testigo. En la columna del lado izquierdo se muestra la parte adaxial del explante. **A)** Enfoque del explante completo presentando nervaduras secundarias bien definidas sobre la epidermis. **B)** La epidermis está compuesta de células muy unidas sin espacios entre ellas y abultadas en la zona de la nervadura secundaria. **C)** Epidermis con algunas zonas fracturadas en donde se generan células que brotan a la superficie. Imágenes de la superficie abaxial. **A)** Explante completo con una zona averiada en la parte inferior; **B)** Acercamiento de una zona de la epidermis y algunos complejos estomáticos. **C)** Enfoque de la zona dañada en el cual se observan células en división.

En este estudio también se incluyó un análisis estructural detallado del testigo. Los resultados se muestran en las figuras 2.8 y 2.9. En el lado izquierdo de las figuras se muestran los cambios en la cara adaxial. En la figura 2.8A lado izquierdo se puede observar un explante completo en el que se observa la capa de células epidérmicas y la

presencia de nervaduras secundarias muy bien delineadas (flecha amarilla). También se pueden notar los daños mecánicos producidos por el manejo de la muestra. En la figura 2.8B lado izquierdo se muestra un acercamiento de la epidermis en la que se puede apreciar una de las nervaduras secundarias; en la misma imagen se aprecia la disposición de las células que componen la epidermis, generalmente estas células son aplanadas muy unidas sin dejar espacios intercelulares. En la figura 2.8C izquierda se muestra un acercamiento de una fractura sobre la epidermis en donde se observa la presencia de células que al parecer salen del interior de la epidermis (flecha amarilla). En la figura 2.9D-F izquierda se muestran los detalles de las células que salen del interior de la hoja hacia la cara adaxial exclusivamente en el sitio en el que la epidermis sufrió daño.

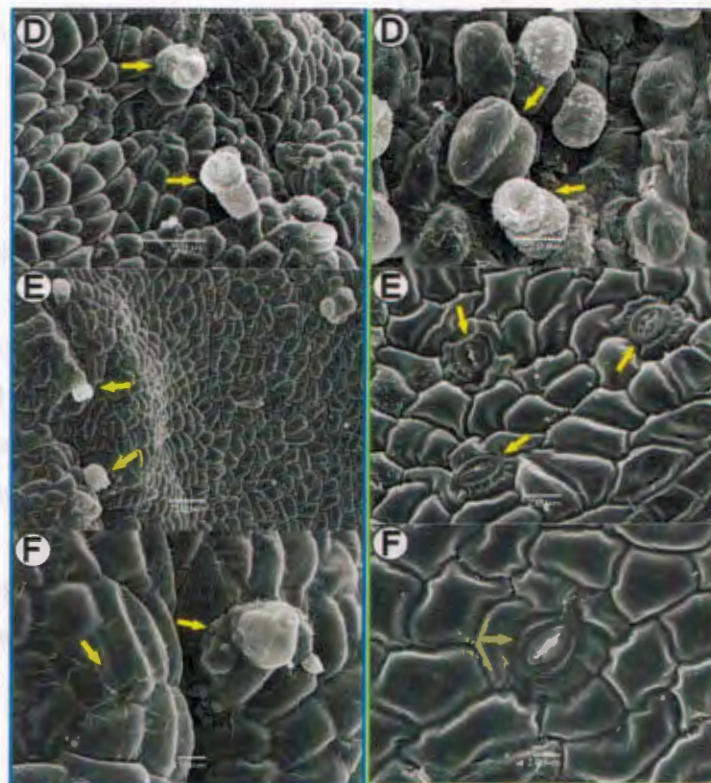


Figura 2.9. Microscopía electrónica de barrido de los explantes testigo. En la columna del lado izquierdo se muestra la parte adaxial del explante. D), E) y F) Complejos estomáticos. En la columna del lado derecho se muestra el lado abaxial. D) E) y F) Acercamiento de los complejos estomáticos con los poros abierto permitiendo ver el interior de la hoja.

El comportamiento de la cara abaxial de los explantes testigo se muestran en el lado derecho de las figura 2.8 y 2.9. En el panel A de la figura 2.8 del lado derecho se muestra una fotografía del explante completo. Se puede apreciar una nervadura secundaria bien delineada sobre la epidermis (flecha amarilla). En el panel B derecho de la figura 2.8 se muestra una toma cercana de la superficie en la que se distinguen las células de la epidermis y los complejos estomáticos (flecha amarilla). En el panel C derecho de la figura 2.8 se muestra una zona de la epidermis que sufrió daño y se pueden observar las células que provienen de las capas de células interiores de la hoja (flechas amarillas), las células son de forma esférica e incluso se observa que presentan actividad mitótica.

En el panel D derecho de la figura 2.9 se muestra un acercamiento de las células emergiendo de la herida, así como de estas células dividiéndose (flecha amarilla). En los pánels E y F derecho de la figura 2.9 se muestran acercamientos de la superficie de la hoja en los que se pueden apreciar algunos estomas (flecha amarilla) pero no ningún daño.

Una vez que emergen las células de las heridas del explante, y en la presencia de reguladores del crecimiento adecuados, se produce un callo con características embriogénicas. En el panel A de la figura 2.10 se puede apreciar como el callo se forma alrededor de la herida. También se puede ver que el callo no es del tipo friable, sino que tiene un cierto grado de organización. Esta organización se puede apreciar claramente en el panel B de la misma figura, en particular en la parte de la esquina superior derecha. En los pánels C y D de la figura 2.10 se puede apreciar en detalle el inicio de la formación del callo embriogénico. Parece ser que cada célula que emerge de la herida se empieza a dividir, probablemente por la presencia de los reguladores del crecimiento adicionados. También se puede apreciar que las células han perdido su plano de división, lo que permite que se forme la masa proembriogénica.

Una vez que se forma la masa proembriogénica, algunos de los centros meristemáticos empiezan a diferenciarse en embriones. En los pánels A y B de la figura 2.11 se puede apreciar como inicia la emergencia de las primeras estructuras embriogénicas, en este caso embriones globulares. En los pánels C y D se presenta un acercamiento de un embrión en el estadio globular. El embrión del panel C se puede ver claramente al protodermo rodeando la estructura del embrión. En tanto que el embrión que se muestra

en el panel D aún no ha desarrollado esta estructura.

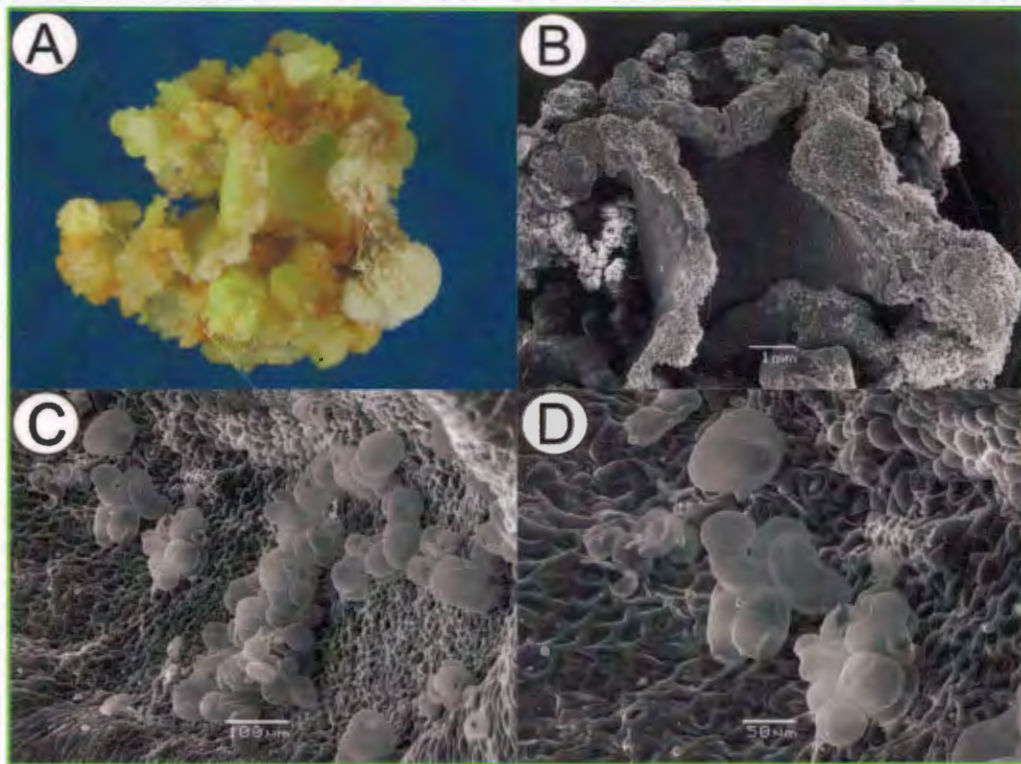


Figura 2.10. Imágenes de un callo embriónico. A) Fotografía de un explante con callo embriónico a los 58 días. B) Imagen de MEB de un explante al inicio de la formación del callo embriónico sobre la superficie del explante. C) y D) Imágenes de explantes que muestran el inicio de la formación del callo embriónico.

La formación de los embriones en las masas proembriónicas no es sincrónica. En el panel E de la figura 2.11 se puede ver que hay embriones en diferentes estadios de desarrollo emergiendo de la masa proembriónica, principalmente globular y corazón. La MEB que se presenta en el panel F de la misma figura permite apreciar con un mayor detalle este desarrollo. En particular la estructura de la parte superior izquierda, un embrión en el estadio de corazón y del lado derecho en la parte inferior derecha un embrión en el estadio de torpedo.

Finalmente, en la figura 2.12 se muestran algunos embriones individualizados. En el panel A de la figura 2.12 se puede ver un conjunto de embriones en los estadios de torpedo y de

corazón. Se ve que toda la masa proembriónica se convierte en embriones somáticos. En el panel B se muestra la MEB de un embrión en el estadio de torpedo emergiendo de la masa proembriónica.

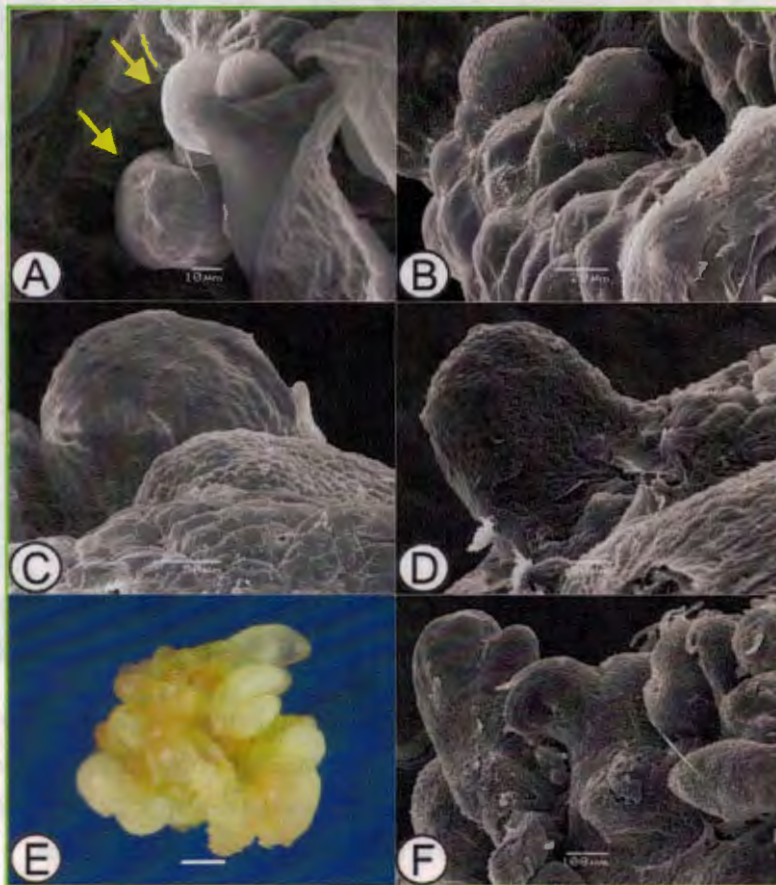


Figura 2.11. Primeros estadios de desarrollo del embrión somático. A) Imagen de proembriones (flechas amarilla) emergiendo del callo embriogénico. B) Embriones en el estadio globular en la región del callo después de 60 días de cultivo. C) y D) Embrión globular con protoderma definido. E) Conjunto de embriones somáticos en estadios globular y corazón después de 75 días de cultivo (lado izquierdo). F) Imagen ultraestructural de embriones somáticos en estadio globular, corazón (lado derecho).

En los paneles C y D se muestra a un embrión en el estadio cotiledonar. En ambos casos se puede distinguir claramente el desarrollo de que se serán los cotiledones. El embrión

está completamente desarrollado y se puede apreciar que su estructura está completa.

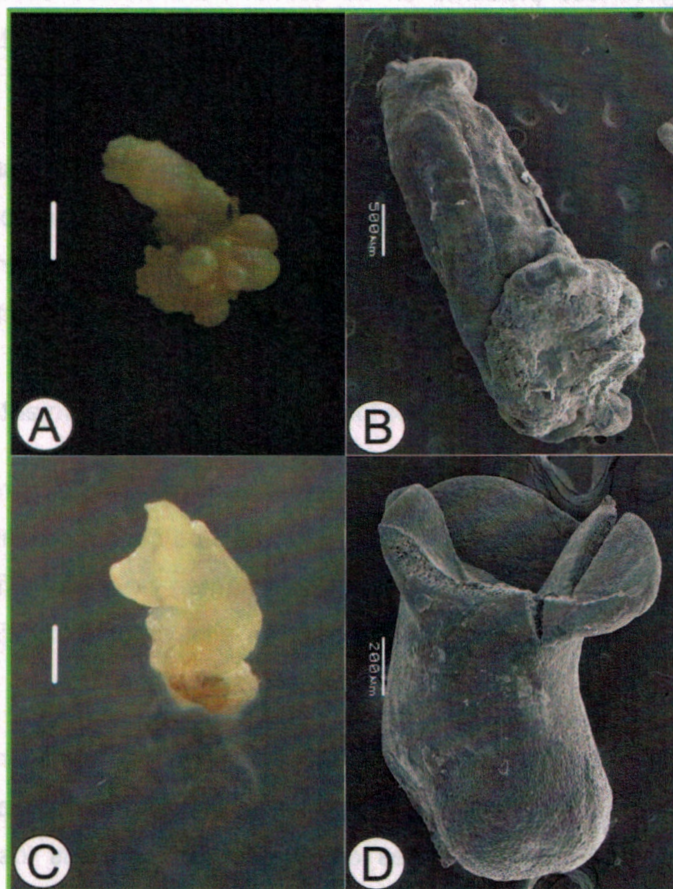


Figura 2.12. Estructuras embriogénicas en estadios avanzados. A) Fotografía de un embrión torpedo y embriones globulares después de 90 días de cultivo. B) MEB de un embrión torpedo. C) Fotografía de un embrión somático en estadio cotiledonar temprano alrededor de los 130 días de cultivo. D) MEB de un embrión cotiledonar temprano.

2.4. DISCUSIÓN.

Jatropha curcas es un cultivo comercial de gran valor por su potencial en el área de los biocombustibles. Sin embargo, se ha visto en plantaciones alrededor del mundo que la planta tiene una serie de debilidades que deben ser atendidas antes de que la promesa que es se convierta en realidad. En particular hay dos áreas en las que se tiene que trabajar intensamente, una de ellas es la obtención de resistencia a diferentes plagas y

enfermedades y la segunda es el mejoramiento en la calidad de los ácidos grasos que conforman los triacilglicéridos presente en su aceite. Para ambos casos se requieren sistemas de cultivo *in vitro*, ya sea para la propagación de las plantas elite producidas, o para regenerar transformantes que lleven los genes de interés.

En esta investigación se establecieron las primeras bases para el establecimiento de un proceso de embriogénesis somática eficiente en *J. curcas*. El primer reporte de ES en *J. curcas* fue publicado hace diez años (Sardana et al., 2000), desde entonces se han realizado otro par de intentos de establecer protocolos eficientes para este proceso (Jha et al., 2007; Kalimuthu et al., 2007). Es interesante ver que los tres protocolos son bastante diferentes entre sí, empezando por los reguladores del crecimiento empleados.

En nuestro caso, los primeros experimentos estuvieron encaminados a reproducir estos protocolos. Sin embargo, no tuvimos éxito en ninguno de los casos, probablemente, entre otras causas por las diferencias en el origen de los explantes y el estadio fisiológico de las plantas de las que se obtuvieron dichos explantes. Por ello, en este trabajo se exploraron condiciones diferentes con el fin de obtener embriones somáticos.

Los resultados positivos mostrados en esta investigación se obtuvieron cuando los explantes provenían de plántulas cultivadas *in vitro* en un sistema hidropónico y con un tratamiento en el que dos semanas antes de que fueran tomados los explantes, las plantas eran sometidas a un tratamiento de 0.54 μM de ANA y 2.33 μM de KIN y los explantes eran cultivados en el medio de Yasuda et al. (1985) en presencia de 5 μM de BA. Si bien en general se ha argumentado que se requiere de la presencia de una auxina para inducir la ES y de su posterior eliminación (Fehér, 2008; Yang y Zhang, 2010), existen algunos reportes, uno de ellos en *J. curcas* (Kalimuthu et al., 2007), en los que no se usan auxinas en el proceso de inducción de la ES.

La otra diferencia importante con los métodos previamente reportados fue el uso de plantas mantenidas en un sistema hidropónico, y sometidas a un pretratamiento. Es importante analizar en una investigación posterior, si la presencia de ANA durante el pretratamiento es el factor desencadenante de la ES en *J. curcas*. Se sabe que los niveles endógenos de reguladores del crecimiento, tanto de auxinas como de citocininas, son consideradas como un factor crucial que determina el curso del proceso embriogénico

(Gaj, 2004). Algunas observaciones previas sugieren que la presencia de reguladores del crecimiento exógenos puede modificar la concentración de los reguladores del crecimiento endógenos de la planta (Jiménez y Thomas, 2006). La modulación en la concentración de reguladores del crecimiento endógenos por sus pares exógenos puede llevarse a cabo de dos formas, una directa a través de la síntesis de enzimas o indirectamente a través de efectores (Gaspar et al., 1996).

Una de las primeras evidencias de que los RCV exógenos modifican los niveles de RCV endógenos durante la ES, se ejemplifica cuando el contenido de AIA aumenta como resultado de suministrar 2,4-D a un cultivo embriogénico de zanahoria (Michalczuk et al., 1992). En nuestro laboratorio hemos obtenido resultados similares en el sistema de *Coffea canephora* (Ayil y Loyola-Vargas, datos no publicados)

En el caso de la investigación reportada en este documento, el proceso requirió alrededor de cuatro meses para llegar a visualizar todas los estadios de la ES. Se emplearon dos cambios de medio de cultivo así como de condiciones de cultivo para obtener embriones en estadio de torpedo y cotiledonar. Sin embargo, la eficiencia del proceso es baja. Uno de los principales problemas que deberá resolverse es el de la vitrificación. La vitrificación como se sabe puede ser problema serio en cultivos *in vitro*, el tejido se caracteriza por tener una apariencia vidriosa, tallos y hojas traslucidas (Brand, 1993; Hazarika, 2006; Ziv, 1991).

3. BIBLIOGRAFÍA.

- Brand M. H., Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 35: 203-209, (1993).
- Choi Y. E., D. C. Yang, H. S. Kim y K. T. Choi, Distribution and changes of reserve materials in cotyledon cells of *Panax ginseng* related to direct somatic embryogenesis and germination, Plant Cell Rep., 16: 841-846, (1997).
- Fehér A., The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't, Acta Biologica Szegediensis, 52: 53-56, (2008).
- Gaj M. D., Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, Plant Growth Regul., 43: 27-47, (2004).

- Gaspar T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. Reid y T. Thorpe, Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture, *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant*, 32: 272-289, (1996).
- Gatica A. M., G. Arrieta y A. M. Espinoza, Comparison of three *in vitro* protocols for direct somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. *CVS. Caturra and Catuaí, Agronomía Costarricense*, 31: 85-94, (2007).
- Hazarika B. N., Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants, *Sci. Hortic.*, 108: 105-120, (2006).
- Jha T., P. Mukherjee y M. Datta, Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant, *Plant Biotechnol. Rep.*, 1: 135-140, (2007).
- Jiménez V. M. y C. Thomas, Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis, en: *Somatic embryogenesis*, (Mujib A. y J. Samaj, eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, 103-118, (2006).
- Kalimuthu K., S. Paulsamy, R. Senthilkumar y M. Sathya, *In vitro* propagation of the biodiesel plant *Jatropha curcas* L., *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.*, 17: 137-147, (2007).
- Karami O., B. Aghavaisi y A. M. Pour, Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants, *J. Chem. Biol.*, 2: 177-190, (2009).
- Laux T. y G. Jürgens, Embryogenesis: a new start in life, *Plant Cell*, 9: 989-1000, (1997).
- Malinowski R. y M. K. Filipecki, The role of cell wall in plant embryogenesis, *Cellul. Mol. Biol. Lett.*, 7: 1137-1151, (2002).
- Michalczuk L., T. J. Cooke y J. D. Cohen, Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis, *Phytochemistry*, 31: 1097-1103, (1992).
- Murashige T. y F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, 15: 473-497, (1962).
- Quiroz-Figueroa F. R., C. F. J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera y V. M. Loyola-Vargas, Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*, *Plant Cell Rep.*, 20: 1141-1149, (2002).
- Quiroz-Figueroa F. R., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas, Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*, en: *Plant cell culture protocols*, (Loyola-Vargas V. M. y F. A. Vázquez-Flota, eds.), Humana Press, Totowa, New Jersey, 111-117, (2006).
- Rojas-Herrera R., F. R. Quiroz-Figueroa, F. Sánchez-Teyer y V. M. Loyola-Vargas, Molecular analysis of somatic embryogenesis: An overview, *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 8: 171-184, (2002).

-
- Sardana J., A. Batra y D. J. Ali, An expeditious method for regeneration of somatic embryos in *Jatropha curcas* L., *Phytomorphology*, 50: 239-242, (2000).
- Söndahl M. R., D. Spahlinger y W. R. Sharp, A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L., *Z. Pflanzenphysiol.*, 94: 101-108, (1979).
- Trigiano R.N. y D.J.Gray, *Plant development and biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 1-363, (2005).
- Yang X. y X. Zhang, Regulation of somatic embryogenesis in higher plants, *Crit. Rev. Plant Sci.*, 29: 36-57, (2010).
- Yasuda T., Y. Fujii y T. Yamaguchi, Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine, *Plant Cell Physiol.*, 26: 595-597, (1985).
- Ziv M., Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants, en: *Micropropagation Technology and Application*, (Debergh P. C. y R. H. Zimmerman, eds.), Kluwer Academic Publishers, London, 45-69, (1991).

CAPÍTULO III

3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

3.1. CONCLUSIONES.

Durante el desarrollo de esta investigación se desarrolló un protocolo reproducible para la inducción de la ES en hojas de *J. curcas*. Este proceso fue caracterizado tanto histológicamente como mediante microscopía electrónica de barrido y se pudo determinar la presencia de todos los estadios de desarrollo de los embriones somáticos.

Además, se estableció un protocolo de cultivo hidropónico *in vitro*, altamente eficiente, cuyas plantas pueden ser empleadas para la obtención de explantes para la inducción de la ES.

3.2. PERSPECTIVAS.

Entre todos los cultivos que producen aceite, *Jatropha curcas* ha emergido como el punto focal para la industria del biodiésel (Rajagopal, 2008). Sin embargo, parece ser que las muchas buenas características que se le atribuyen a *Jatropha* no están apoyadas científicamente. Por otra parte, sólo se ha identificado a una de las enzimas que se requieren para la biosíntesis de los ácidos grasos que se almacenan en los cotiledones de sus semillas (Li et al., 2008). En términos de beneficios agrícolas y económicos el potencial completo de *Jatropha* está lejos de realizarse. Si este potencial se va a alcanzar, se requerirá de mucha más investigación con la ayuda de herramientas, agronómicas, celulares, bioquímicas y moleculares para poder proveer las plantas elite para generar la materia prima para la producción de biodiésel.

Puesto que varios caracteres ofrecen un grado sustancial de interacción con el medio ambiente, es imperativo analizar la variabilidad presente en el germoplasma y separarlos por su naturaleza genética o fenotípica (epigenética). Deberá realizarse un extenso trabajo en la evaluación de germoplasma, crecimiento y morfología de las semillas, resistencia a extremos ambientales y rendimiento bajo diferentes condiciones. La tolerancia hacia las plagas y enfermedades atribuida a esta especie está basada en observaciones de pocos individuos que crecen aislados (Fu et al., 2007; Jongschaap et al., 2007). Puesto que la variabilidad es un prerrequisito para los programas de selección,

es necesario detectar y documentar la cantidad de variación existente en las poblaciones. Entre las características a ser evaluadas deberán estar las relacionadas con la composición química de los aceites en las semillas bajo diferentes condiciones climáticas. El reto más importante que se tiene es la falta de variedades mejoradas y la disponibilidad de semilla. Finalmente, pero no menos importante es el hecho de que se desconoce la ruta de biosíntesis de los ácidos grasos en *J. curcas*. No se sabe cuál es el sitio de biosíntesis de estos importantes compuestos y por ende si son transportados desde su sitio de síntesis hasta el sitio de almacenamiento. Tampoco conocemos el proceso mediante el cual los ácidos grasos son esterificados al glicerol para producir los triacilglicéridos que se encuentran en el fruto.

Estas son áreas en las que deberá desarrollarse la investigación en *J. curcas*.

Por otro lado, en lo referente a la continuación de este trabajo y al cultivo de tejidos de la planta, deberá aumentarse la eficiencia del protocolo de ES. En particular se deberán probar otras combinaciones de reguladores del crecimiento, diferentes medios de cultivo, otros tipos de explante, así como ensayar otras condiciones fisiológicas de cultivo para las plantas de las que se obtienen los explantes.

Adicionalmente, también deberá establecerse un sistema de germinación de los embriones somáticos, su enraizamiento y finalmente, el protocolo de su transferencia al campo.

3.3. BIBLIOGRAFÍA

- Fu G., S. L. Huang, J. G. Wei, G. Q. Yuang, J. G. Ren, W. H. Yan y Z. L. Cen, First record of *Jatropha podagrica* gummosis caused by *Botryodiplodia theobromae* in China, *Aust. Plant Dis. not.*, 2: 75-76, (2007).
- Jongschaap R.E.E., W.J.Corré, P.S.Bindraban y 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, 1, (2007).
- Li J., M.-R. Li, P.-Z. Wu, C.-E. Tian, H.-W. Jiang y G.-J. Wu, Molecular cloning and expression analysis of a gene encoding a putative β -ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) synthase III (KAS III) from *Jatropha curcas*, *Tree Physiol.*, 28: 921-927, (2008).

Rajagopal R., Best practices for long-term Jatropha development, KnowGenix, Mumbai, India, pp 1-14, (2008).

