



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *Jatropha curcas*

Tesis que presenta

RAÚL ENRIQUE VALLE GOUGH

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción Biotecnología

Mérida, Yucatán. Febrero de 2011





**CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **“Morfogénesis *in vitro* de *Jatropha curcas*”** fue realizado en los laboratorios de la Unidad de **Biología y de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de los **Dr. Manuel Luis Robert Díaz y Dra. Nancy Santana Buzzy**, dentro de la Opción **Biología**, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

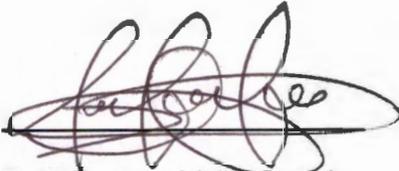
Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela
Director Académico
Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC

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 dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida, Yucatán. 14 de Febrero de 2011.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Raúl Enrique Valle Gough', written over a horizontal line.

Raúl Enrique Valle Gough.

DEDICATORIA

A mis padres por todo el apoyo, amor, dedicación y consejos que me han dado a lo largo de mi vida, por que sin ustedes no estaría aquí.

Para Abril por todo su apoyo y por creer en mi gracias por darme la dicha de ser padre.

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres, Raúl Alfonso y María Patricia, por darme el regalo de la vida y haberme formado como persona.
- A mis hermanos, Patricia Ivonne, Luis Ángel y María Aimeé por haberme dado apoyo y confianza cuando más lo necesitaba.
- A mis directores de tesis: Dr. Manuel Luis Robert Díaz y Dra. Nancy Santana Buzzy por haberme aceptado y orientado en el transcurso de la tesis.
- A mi comité tutorial: Dra. Lourdes Iglesias Andreu, Dr. Javier Mijangos Cortes, Dr. Carlos Oropeza Salin y Dra. Maria del Carmen Montalvo Peniche por sus observaciones, sugerencias y comentarios que sirvieron de mucho para la elaboración y enriquecimiento de este documento.
- A los técnicos del laboratorio 09: M.C Adriana Canto Flick y M.C Eduardo Balam Uc por su ayuda y soporte durante mi estadía.
- A mis compañeros de laboratorio: Stephanie, Susana, Jericó, Carlos Alberto, Carlos Fernando, Eunice y Emily. Por su amistad y consejos muchas gracias.
- A la Unidad de Biotecnología y a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas por las instalaciones proporcionadas para realizar el trabajo experimental y los cursos impartidos.
- Al CONACYT por el apoyo otorgado por medio de la beca No. 228676.

Muchas gracias.

| CONTENIDO | |
|---|-----|
| LISTADO DE FIGURAS | iv |
| LISTADO DE CUADROS | vii |
| ABREVIATURAS | ix |
| RESUMEN | 1 |
| CAPITULO I. MARCO TEÓRICO | 5 |
| 1.1 INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1.2 ANTECEDENTES GENERALES | 7 |
| 1.2.1 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS | 7 |
| 1.2.2 PROPIEDADES Y USOS DE LA PLANTA | 8 |
| 1.2.3 DISTRIBUCIÓN MUNDIAL | 9 |
| 1.2.4 DISTRIBUCIÓN NACIONAL | 10 |
| 1.3 RELEVANCIA DE <i>Jatropha curcas</i> EN LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES | 11 |
| 1.4 PROBLEMÁTICA DEL CULTIVO | 14 |
| 1.5 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES | 15 |
| 1.5.1 REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL | 17 |
| 1.5.2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES EN <i>Jatropha curcas</i> | 18 |
| 1.6 OBJETIVOS | 22 |
| 1.6.1 OBJETIVO GENERAL | 22 |
| 1.6.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 22 |
| 1.7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA EL ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS DE REGENERACIÓN DE <i>J. curcas</i> | 23 |
| 1.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 24 |

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO II GERMINACIÓN DE EMBRIONES CIGÓTICOS <i>in vitro</i> E | 39 |
| INDUCCIÓN DE BROTES DE <i>Jatropha curcas</i> | |
| 2.1 INTRODUCCIÓN | 39 |
| 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS | 40 |
| 2.2.1 FUENTE MATERIAL VEGETAL | 40 |
| 2.2.2 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS | 40 |
| 2.2.3 AISLAMIENTO Y GERMINACIÓN DE EMBRIONES CIGÓTICOS | 41 |
| DE <i>Jatropha curcas</i> | |
| 2.2.4 INDUCCIÓN DE BROTES CON BAP Y TDZ | 41 |
| 2.2.5 EVALUACIÓN DE VARIABLES DE RESPUESTA | 42 |
| 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 43 |
| 2.3.1 GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE EMBRIONES CIGÓTICOS | 43 |
| DE <i>Jatropha curcas</i> | |
| 2.3.2 INDUCCIÓN DE BROTES EN NUDOS CON YEMAS AXILARES | 45 |
| 2.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 51 |
| CAPITULO III. ORGANOGÉNESIS Y EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA | 53 |
| DE <i>Jatropha curcas</i> L. | |
| 3.1 INTRODUCCIÓN | 53 |
| 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS | 54 |
| 3.2.1 EVALUACIÓN DE DIFERENTES EXPLANTES Y DIFERENTES | 54 |
| RCV SOBRE LA MORFOGÉNESIS <i>in vitro</i> DE <i>J. curcas</i> | |
| 3.2.2 ELONGACIÓN DE LOS BROTES FORMADOS | 55 |
| 3.2.3 ANÁLISIS HISTOLÓGICO | 55 |
| 3.2.3.1 HISTOLOGÍA CON RESINAS PLÁSTICAS | 55 |
| 3.3 EVALUACIÓN DE VARIABLES DE RESPUESTA | 56 |
| 3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 57 |
| 3.4.1 INDUCCIÓN DE LA MORFOGÉNESIS EN <i>Jatropha curcas</i> | 57 |

| | |
|---|----|
| 3.4.1.1 EFECTO DE LA KIN Y 2,4-D SOBRE LA RESPUESTA DE DIFERENTES EXPLANTES | 57 |
| 3.4.1.2 EFECTO DEL BAP Y 2,4-D EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE DIFERENTES EXPLANTES | 61 |
| 3.4.1.3 EFECTO DEL TDZ EN LA ORGANOGÉNESIS DE DIFERENTES EXPLANTES DE <i>J. curcas</i> | 67 |
| 3.4.1.4 ELONGACIÓN DE BROTES EN PRESENCIA DE AG ₃ | 73 |
| 3.4.1.5 ENRAIZAMIENTO DE BROTES | 75 |
| 3.5 ANÁLISIS HISTOLÓGICO | 76 |
| 3.5.1 HISTOLOGÍA EN ORGANOS INDIRECTOS | 76 |
| 3.6 REFERENCIAS BILIOGRÁFICAS | 77 |
| | |
| CAPITULO IV DISCUSIÓN GENERAL | 81 |
| 4.1 DISCUSIÓN GENERAL | 81 |
| 4.2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 82 |
| | |
| CAPITULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 83 |
| 5.1 CONCLUSIONES | 83 |
| 5.2 PERSPECTIVAS | 84 |
| | |
| ANEXOS | 85 |
| ANEXOS 1. FORMULACIONES PARA HISTOLOGÍA | 85 |

LISTADO DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 Distribución mundial de <i>Jatropha curcas</i> | 9 |
| Figura 1.2 Distribución nacional de <i>Jatropha curcas</i> | 10 |
| Figura 1.3 Esquema de las diferentes vías de regeneración <i>in vitro</i> . | 16 |
| Figura 1.4 Estrategia experimental para inducir diferentes respuestas morfogénicas en <i>Jatropha curcas</i> | 23 |
| Figura 2.1 Plantas cultivadas de <i>Jatropha curcas</i> : A) Planta cultivadas de <i>Jatropha curcas</i> en campo. B) Planta de <i>Jatropha curcas</i> con frutos y semillas | 40 |
| Figura 2.2 Plántulas de <i>Jatropha curcas</i> desarrolladas <i>in vitro</i> con: A) 4 semanas de cultivo, B) 8 semanas de cultivo. C) 16 semanas de cultivo | 43 |
| Figura 2.3 Respuesta de yemas axilares en nudos de <i>J. curcas</i> con 5.5 μM BAP: A) 2 semanas. B) 4 semanas y C) 8 semanas. Nudos con yemas axilares con 6.6 μM BAP: D) 2 semanas, E) 4 semanas y F) 8 semanas. Nudos con yemas con axilares con 7.7 μM BAP: G) 2 semanas, H) 4 semanas e I) 8 semanas | 46 |
| Figura 2.4 Organogénesis directa de <i>J. curcas</i> en la base de nudos con yemas axilares en medio adicionado con A) 5.5 μM BAP, B) 6.6 μM BAP y C) 7.7 μM de BAP | 47 |
| Figura 2.5 Formación inicial de brotes de <i>J. curcas</i> inducidos en presencia de TDZ con 2 semanas de cultivo: A) 3.4 μM TDZ, B) 4.5 μM TDZ y C) 5.5 μM TDZ. Formación de brotes a las 4 semanas de cultivo en: D) 3.4 μM TDZ, E) 4.5 μM TDZ y F) 5.5 μM TDZ. Brotes desarrollados con 8 semanas de cultivo G) 3.4 μM TDZ, H) 4.5 μM TDZ e I) 5.5 μM TDZ | 49 |
| Figura 3.1 Explantes de embriones cigóticos de <i>J. curcas</i> con 4 semanas de cultivo: A) 9.3 μM Kin, B) 9.3 μM Kin + 5.6 μM 2,4-D, C) 9.3 μM Kin + 6.7 μM 2,4-D y D) 9.3 μM Kin + 7.9 μM 2,4-D. Embriones cigóticos con 8 semanas de cultivo: E) 9.3 μM Kin, F) 9.3 μM Kin + 5.6 μM 2,4-D, G) 9.3 μM Kin + 6.7 μM 2,4-D y H) 9.3 μM Kin + 7.9 μM 2,4-D. Embriones cigóticos con 12 semanas de cultivo: I) 9.3 μM Kin, J) 9.3 μM Kin + 5.6 μM 2,4-D, K) 9.3 μM Kin + 6.7 μM 2,4-D y L) 9.3 μM Kin + 7.9 μM 2,4-D | 58 |

- Figura 3.2** Respuesta de explantes de hoja de *J. curcas* con: 4 semanas de cultivo 59
A) 9.3 μ M Kin, B) 9.3 μ M Kin + 5.6 μ M 2,4-D, C) 9.3 μ M Kin + 6.7 μ M 2,4-D y
D) 9.3 μ M Kin + 7.9 μ M 2,4-D. Explantes con 8 semanas de cultivo:
E) 9.3 μ M Kin, F) 9.3 μ M Kin + 5.6 μ M 2,4-D, G) 9.3 μ M Kin + 6.7 μ M 2,4-D,
H) 9.3 μ M Kin + 7.9 μ M 2,4-D. Explantes con 12 semanas de cultivo:
I) 9.3 μ M Kin, J) 9.3 μ M Kin + 5.6 μ M 2,4-D, K) 9.3 μ M Kin + 6.7 μ M 2,4-D,
L) 9.3 μ M Kin + 7.9 μ M 2,4-D
- Figura 3.3** Respuesta de explantes de embriones cigóticos de *J. curcas* a las 4 semanas de 62
cultivo con: A) 8.9 μ M BAP, B) 8.9 μ M BAP + 5.6 μ M 2,4-D, C) 8.9 μ M BAP + 6.7
 μ M 2,4-D y D) 8.9 μ M BAP + 7.9 μ M de 2,4-D. Explantes con 8 semanas de
cultivo con: E) 8.9 μ M BAP, F) 8.9 μ M BAP + 5.6 μ M de 2,4-D, G) 8.9 μ M BAP +
6.7 μ M de 2,4-D y H) 8.9 μ M BAP + 7.9 μ M de 2,4-D. Explantes con 12 semanas
de cultivo con: I) 8.9 μ M BAP, J) 8.9 μ M BAP + 5.6 μ M 2,4-D, K) 8.9 μ M BAP +
6.7 μ M 2,4-D y L) 8.9 μ M BAP + 7.9 μ M 2,4-D.
- Figura 3.4** Estructuras embrionarias directas de *J. curcas* en tratamientos con A) 8.9 μ M 63
BAP + 5.6 μ M 2,4-D; B) 8.9 μ M BAP + 6.7 μ M 2,4-D y C) 8.9 μ M BAP + 7.9 μ M
2,4-D. Con 4 semanas de cultivo.
- Figura 3.5** Desarrollo de embriones somáticos directos de *J. curcas* A) Embriones 64
somáticos con diferentes grados de desarrollo. B) Embriones somáticos
ordenados de izquierda a derecha: embriones globulares, acorazonados,
torpedos, cotiledonares y en conversión a planta con 6 semanas de cultivo.
C) Embriogénesis somática secundaria a las 8 semanas de cultivo.
- Figura 3.6** Segmentos de tallos de *J. curcas* con 8 semanas de cultivo: A) 8.9 μ M BAP + 66
5.5 μ M 2,4-D; B) 8.9 μ M BAP + 6.7 μ M 2,4-D y C) 8.9 μ M BAP + 7.9 μ M 2,4-D
- Figura 3.7** Respuesta de embriones cigóticos con diferentes concentraciones de TDZ A) 68
3.4 μ M TDZ, B) 4.5 μ M TDZ y C) 5.5 μ M TDZ con 4 semanas de cultivo.
Respuesta de embriones cigóticos con 8 semanas de cultivo D) 3.4 μ M TDZ,
E) 4.5 μ M TDZ y F) 5.5 μ M TDZ

| | |
|--|----|
| Figura 3.8 Respuesta de cotiledones con diferentes concentraciones de TDZ | 69 |
| A) 3.4 μM TDZ, B) 4.5 μM TDZ y C) 5.5 μM TDZ, con 4 semanas de cultivo. Organogénesis indirecta con 8 semanas de cultivo D) 3.4 μM TDZ, E) 4.5 μM TDZ y F) 5.5 μM TDZ | |
| Figura 3.9 Organogénesis en tejido foliar de <i>J. curcas</i> Organogénesis directa con | 71 |
| 3.4 μM TDZ con A) 4 semanas, D) 8 semanas G) 12 semanas de cultivo. Organogénesis indirecta con 4.5 μM TDZ con B) 4 semanas, E) 8 semanas, H) 12 semanas de cultivo. Organogénesis indirecta con 5.5 μM TDZ con C) 4 semanas, F) 8 semanas, I) 12 semanas de cultivo | |
| Figura 3.10 Elongación de brotes de <i>J. curcas</i> con 4 semanas de cultivo A) Testigo, | 73 |
| B) 1.4 μM AG ₃ , C) 2.8 μM AG ₃ y D) 4.2 μM AG ₃ . Elongación con 8 semanas de cultivo E) Testigo, F) 1.4 μM AG ₃ , G) 2.8 μM AG ₃ y H) 4.2 μM AG ₃ . | |
| Figura 3.11 Histología de la organogénesis indirecta de <i>J. curcas</i> A) Formación de tejido | 76 |
| organogénico (SE: Sección del explante; ZV: Zona vascular y ZM: Zona meristemática apical), B) Acercamiento a estructura organogénica (HV: Haces vasculares y MA: Meristemo apical), C) Acercamiento a la sección del meristemo apical (ZC: Zona central, ZP: Zona periférica y ZD: Zona de división). | |

LISTADO DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1.1 Clasificación taxonómica de <i>Jatropha curcas</i> L. | 7 |
| Cuadro 1.2 Características generales de diferentes carburantes | 11 |
| Cuadro 1.3 Perfil de ácidos grasos en diferentes cultivos oleaginosos (porcentaje de ácidos grasos totales) | 12 |
| Cuadro 1.4 Precio y rendimientos de aceite para biodiesel de diferentes especies oleaginosas | 12 |
| Cuadro 1.5 Propiedades del biodiesel de diferentes fuentes | 13 |
| Cuadro 1.6 Ventrajas y desventajas del cultivo de <i>J. curcas</i> | 15 |
| Cuadro 1.7 Reguladores de crecimiento utilizados en la inducción de procesos de regeneración <i>in vitro</i> de <i>J. curcas</i> | 20 |
| Cuadro 1.8 Trabajos realizados en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>J. curcas</i> | 21 |
| Cuadro 2.1 Tratamientos utilizados en la inducción de brotes de <i>J. curcas</i> a partir de nudos con yemas axilares | 41 |
| Cuadro 2.2 Respuesta de embriones cigóticos de <i>Jatropha curcas</i> en diferentes medios de germinación | 43 |
| Cuadro 2.3 Respuesta de nudos con yemas axilares de <i>J. curcas</i> en tratamientos con diferentes concentraciones de BAP | 45 |
| Cuadro 2.4 Respuesta de nudos con yemas axilares de <i>J. curcas</i> en tratamientos con diferentes concentraciones de TDZ | 48 |
| Cuadro 3.1 Reguladores utilizados en la inducción de respuestas morfogenéticas de <i>J. curcas</i> utilizando diferentes explantes | 54 |
| Cuadro 3.2 Deshidratación de tejidos en etanol | 55 |
| Cuadro 3.3 Respuesta a la formación de callos de diferentes tipos de explantes de <i>J. curcas</i> a 12 semanas de cultivo en presencia de Kin y 2,4-D | 57 |
| Cuadro 3.4 Respuesta morfogénica de diferentes tipos de explantes de <i>J.</i> <i>curcas</i> en presencia de BAP y 2,4-D | 61 |
| Cuadro 3.5 Embriogénesis somática en <i>J. curcas</i> | 65 |
| Cuadro 3.6 Respuesta de diferentes tipos de explantes con diferentes concentraciones de TDZ | 67 |

| | |
|---|----|
| Cuadro 3.7 Inducción de procesos organogénicos en diferentes explantes de <i>J. curcas</i> | 69 |
| Cuadro 3.8 Organogénesis directa e indirecta en explantes de hojas de <i>J. curcas</i> | 72 |
| Cuadro 3.9 Tratamientos de elongación en brotes de <i>J. curcas</i> | 73 |
| Cuadro 3.10 Tratamientos de elongación de brotes en presencia de ácido giberélico (AG ₃) | 74 |
| Cuadro 3.11 Respuesta de brotes de <i>J. curcas</i> en diferentes medio de enraizamiento. | 75 |
| Cuadro A 1.1 Formulación para solución FAA | 85 |
| Cuadro A 1.2 Formulación de soluciones de infiltración e inclusión en resina | 85 |
| Cuadro A 1.3 Formulación de soluciones para tinción. | 85 |

ABREVIATURAS

| Término | Abreviatura |
|------------------------------------|--------------------|
| 2 isopenteniladenina | 2-ip |
| Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético | 2,4-D |
| Ácido giberélico | AG ₃ |
| Ácido indolacético | AIA |
| Acido indolbutírico | AIB |
| Ácido naftalenacético | ANA |
| Bencilaminopurina | BAP |
| Centímetros | cm |
| Dólares americanos | USD |
| Grados centígrados | °C |
| Gramos | g |
| Hectáreas | Ha |
| <i>Jatropha curcas</i> | <i>J. curcas</i> |
| Kilogramos | Kg |
| Kinetina | Kin |
| Litros | L |
| Micrómetros | μm |
| Micromoles | μM |
| Milímetros | mm |
| Reguladores de crecimiento vegetal | RCV |
| Tidiazurón | TDZ |
| Zeatina | Zea |

RESUMEN

Los biocombustibles son una fuente de energía renovable los cuales emiten menor cantidad de gases de invernadero. Sin embargo, la mayor parte provienen de cultivos agrícolas de consumo humano.

Jatropha curcas es un arbusto utilizado tradicionalmente con fines medicinales pero recientemente se ha utilizado para la producción de biodiesel por su elevado contenido de aceite. Es una planta que crece en condiciones adversas como salinidad, sequía así como en suelos pobres en nutrientes y controla la erosión. Las semillas no son comestibles por lo que no surge el tema de comida contra combustibles.

En determinados estados de la república mexicana se cuenta con variedades no tóxicas de esta especie, por lo que los residuos de las semillas producto de la extracción de aceite pueden ser utilizados con otros fines tales como la preparación de alimento para ganado otorgando un valor agregado a este subproducto y proporciona un mejor aprovechamiento de este cultivo. A pesar de todas las ventajas antes mencionadas esta planta presenta problemas en cuanto a su poca tolerancia a frío, la gran variabilidad de los materiales colectados y la baja tasa de germinación de semillas en campo.

Una de las herramientas propuestas para la propagación de esta especie es el cultivo de tejidos vegetales, la cual es una herramienta biotecnológica que permite la propagación, selección y conservación del material vegetal en un menor espacio en condiciones estériles y controladas. Mediante esta técnica se puede tener un suministro de material de manera constante a diferencia de la propagación vegetativa que es de naturaleza estacional.

En este estudio se obtuvo la formación de brotes dando los mejores resultados los tratamientos con 6.6 μM de BAP y 4.5 μM de TDZ siendo estos últimos los que tuvieron un desarrollo más rápido. Se obtuvo la formación de embriones somáticos directos de *J. curcas* en presencia de 8.9 μM BAP y 5.6 – 7.9 μM 2,4-D con un aproximado de 12 – 18 embriones por explante obteniéndose estadios avanzados de desarrollo a las 6 semanas de cultivo. Al adicionar 3.4 μM TDZ en tejido foliar se obtuvo organogénesis directa e indirecta en 4.5 y 5.5 μM TDZ los brotes se elongaron exitosamente en presencia de 2.8 μM AG_3 en un 73%.

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo principal describir el uso de la tecnología de información en el sector de la salud en México, así como los factores que influyen en su adopción. Para ello se realizó una investigación de tipo cuantitativa, mediante la aplicación de un cuestionario a un grupo de profesionales de la salud en un hospital de tercer nivel de atención en México. Los resultados indican que el uso de la tecnología de información en el sector de la salud en México es aún limitado, pero existe un interés creciente por parte de los profesionales de la salud en utilizarla para mejorar la atención al paciente y la gestión de los recursos. Los factores que influyen en la adopción de la tecnología de información en el sector de la salud en México son: la falta de recursos humanos y económicos, la falta de capacitación de los profesionales de la salud en el uso de la tecnología de información, la falta de infraestructura tecnológica y la falta de apoyo institucional. Los resultados de esta investigación pueden ser utilizados como base para el diseño de estrategias de intervención que permitan mejorar el uso de la tecnología de información en el sector de la salud en México.

ABSTRACT

Biofuels are a source of renewable energy promoted for its low carbon emissions. However the vast majority of the energetic crops are also used as a human foodstock. *Jatropha curcas* is a medicinal tree which recently has been used in the production of biodiesel because of its high amount of oil in the seeds. This shrub can grow in adverse conditions such as drought, saline soils or barren wastelands. This plant also has the ability to control the erosion. The seeds are non edible, because of this the subject of food versus fuel does not arise.

In some regions in Mexico there are non toxic varieties of *J. curcas*, the byproducts of these varieties can be used as animal feed giving an aggregate value to this byproduct and improving the use of this crop. Despite of all the advantages exposed, this plant is pretty susceptible to cold, it has a low germination rate and there is a great genetic variability in the collected material.

One of the tools proposed for the propagation of this shrub is the plant tissue culture; this biotechnological tool allows the selection, propagation and preservation of plant material in a small space within axenic and controlled conditions. Through this technique we could have a constant supply of plant material without the seasonal nature of the vegetative propagation.

There are only one study related on *Jatropha curcas* using Mexican genotypes from Veracruz and they were compared with genotypes of India with the induction of shoot buds and the direct adventitious shoot induction from leaf tissue.

In this study we achieved the shoot bud formation giving the best results the treatments with 6.6 μM BAP and 4.5 μM TDZ. This treatment showed a quicker development compared with the BAP treatment. We managed to induce the direct somatic embryogenesis in leaf tissue of *J. curcas* in presence of 8.9 μM BAP and 5.6 – 7.9 μM 2,4-D with 12 – 18 somatic embryos per explant within 6 weeks of culture with advanced phases of development. The direct adventitious shoot formation were achieved in 3.4 μM TDZ and the indirect adventitious shoot were induced with 4.5 – 5.5 μM TDZ. The well developed shoots were successfully elongated in 2.8 μM GA₃ with an average response of 73% of elongated shoots.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En los últimos años se ha observado un crecimiento de las empresas de servicios de consultoría en el sector de la construcción. Este crecimiento se debe a la necesidad de las empresas de contar con servicios especializados para mejorar su gestión y aumentar su competitividad. En este sentido, el presente trabajo tiene como objetivo analizar el impacto de la consultoría en el sector de la construcción en Chile, considerando tanto los aspectos económicos como los sociales y ambientales.

Para ello se realizó una investigación documental y se analizaron los datos obtenidos de los informes de las empresas consultoras y de los organismos reguladores del sector. Los resultados indican que la consultoría ha contribuido positivamente al desarrollo del sector, mejorando la eficiencia y la calidad de los servicios.

Sin embargo, también se han identificado algunos desafíos, como la falta de regulación adecuada y la necesidad de fortalecer la capacidad técnica de los consultores. Por lo tanto, se recomienda que el Estado implemente políticas que fomenten el desarrollo del sector de la consultoría, promoviendo la capacitación y la innovación. Asimismo, se sugiere que las empresas consultoras continúen trabajando en estrecha colaboración con los organismos reguladores para garantizar la transparencia y la integridad de sus servicios.

En conclusión, la consultoría juega un papel fundamental en el desarrollo del sector de la construcción en Chile. A través de sus servicios, las empresas pueden mejorar su gestión y aumentar su competitividad, lo que contribuye al crecimiento económico y social del país.

El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar el impacto de la consultoría en el sector de la construcción en Chile, considerando tanto los aspectos económicos como los sociales y ambientales. Para ello se realizó una investigación documental y se analizaron los datos obtenidos de los informes de las empresas consultoras y de los organismos reguladores del sector.

Los resultados indican que la consultoría ha contribuido positivamente al desarrollo del sector, mejorando la eficiencia y la calidad de los servicios. Sin embargo, también se han identificado algunos desafíos, como la falta de regulación adecuada y la necesidad de fortalecer la capacidad técnica de los consultores.

CAPITULO I. MARCO TEORICO

1.1 INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas el parcial agotamiento de las reservas de petróleo disponibles, el incremento del precio del barril de petróleo y de sus derivados así como los efectos del calentamiento global han propiciado el interés en la búsqueda de energías alternas que sean más amigables con el medio ambiente y que al mismo tiempo sean redituables (Sotolongo-Pérez *et al.*, 2009; Basha y Sujatha, 2007).

Dentro de las opciones propuestas para abatir esta problemática encontramos la producción de biocombustibles. Sin embargo, uno de los principales argumentos en contra de estos es el uso de cultivos alimentarios como el maíz y la soya (Misra *et al.*, 2010; Jimmu *et al.*, 2009; Kingsbury, 2009; Molina *et al.*, 2008).

En años recientes *Jatropha curcas* (*J. curcas*) ha sido promocionada en todos los trópicos para la fabricación de biodiesel, debido a que esta planta presenta las siguientes características: un alto contenido de aceite en semilla, es capaz de crecer en suelos pobres en nutrientes sin poner en riesgo el suministro alimentario. Es un arbusto altamente adaptable al ambiente por lo que ha sido utilizado en programas de reforestación y reclamación de terrenos en países tropicales (Misra *et al.*, 2010; Varshney y Jhonson, 2010; Effendi *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2008; Nakashini, 2008; Basha y Sujatha, 2007; De La Vega-Lozano, 2007; Márquez y Campos, 2007; De La Vega-Lozano, 2006).

México cuenta con variedades no tóxicas de *J. curcas* por lo que los subproductos resultantes de la extracción de aceite pueden utilizarse como forraje, sin la necesidad de tratamientos para extraer estos compuestos tóxicos (Basha y Sujatha, 2007; Datta *et al.*, 2007; Makkar *et al.*, 1998).

El panorama futuro del mercado de biocombustibles hace necesario el suministro de material vegetal de forma constante. Una de las maneras de lograr este objetivo es mediante el cultivo de tejidos vegetales el cual nos puede producir un número elevado de plantas en un espacio reducido, en condiciones asépticas y controladas (George *et al.*, 2008; Hartmann y Kester, 2001; Pérez *et al.*, 1999).

En *J. curcas* el uso de técnicas biotecnológicas, como el cultivo de tejidos vegetales, es una alternativa para propagar esta especie al inducir diferentes tipos de respuestas morfogénicas como la organogénesis y la embriogénesis somática (Kumar y Reddy, 2010;

Kaewpoo y Te-chato, 2009; Deore y Jhonson, 2008; Li *et al.*, 2008; Shrivastava y Banerjee, 2008; Jha *et al.*, 2007; Kalimuthu *et al.*, 2007; Rajore y Batra, 2005; Sujatha y Mukta, 1996). La mayor parte de los estudios en esta especie se realizaron con variedades tóxicas de genotipos de la India (Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Kumar y Reddy, 2010; Kaewpoo y Te-chato, 2009; Deore y Jhonson, 2008; Li *et al.*, 2008; Shrivastava y Banerjee, 2008; Jha *et al.*, 2007; Kalimuthu *et al.*, 2007; Rajore y Batra, 2005; Sujatha y Mukta, 1996).

La mayor parte de la información relacionada con la regeneración *in vitro* de esta especie se ha realizado fuera de México. Se ha reportado un trabajo con genotipos de la India y de Veracruz por meristemas axilares y de hojas (Sujatha *et al.*, 2005). En dicho estudio se tuvo como respuesta la inducción de brotes y organogénesis indirecta teniendo los mejores resultados con el tidiazurón (TDZ) para inducir brotes y la benciladenina (BAP) como medio de subcultivo para el desarrollo de los brotes (Sujatha *et al.*, 2005).

1.2 ANTECEDENTES GENERALES

1.2.1 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DE *Jatropha curcas*.

Jatropha curcas (Piñón) es un arbusto perenne de la familia Euforbiácea (Cuadro 1.1), la cual engloba unos 300 géneros y 5,000 especies. Entre las especies pertenecientes a esta familia podemos encontrar a: Ricino, Yuca, Caucho y la Flor de Nochebuena (Jimmu *et al.*, 2009; Blanc *et al.*, 1999; Prabakaran y Sujatha, 1999; Gounhua, 1998; Perrin *et al.*, 1997).

Cuadro 1.1 Clasificación taxonómica de *Jatropha curcas* L (USDA, 2008).

| | |
|----------|------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Embryophyta |
| Clase | Spermatopsidae |
| Orden | Malpighiales |
| Familia | Euphorbiaceae |
| Género | <i>Jatropha</i> |
| Especie | <i>curcas</i> L. |

El piñón es una especie de gestación corta, crece de 3 – 5 m de alto, con un diámetro de 20 cm, su corteza es de color gris rojizo y puede vivir de 40 – 45 años (Benge, 2006; Heller, 1996). Las hojas son largas, alternas y de color verde pálido (México Forestal., 2008; Basha y Sujatha, 2007; Bolivar-Manaut, 2007; Torres, 2007; Heller, 1996).

Es una especie monoica, con flores de color amarillo, una longitud de 0.6 – 2.3 cm y con una proporción de 29 de inflorescencias masculinas por cada femenina (México Forestal, 2008; De La Vega-Lozano, 2007; De La Vega-Lozano, 2006; Raju y Ezradanam, 2002).

Es una especie alógama que necesita la visita de polinizadores como: hormigas, abejas y polillas, con presencia de cultivos diploides y tetraploides, siendo los diploides la forma silvestre común (Achten *et al.*, 2010; Soontornchainaksaeng y Jenjittikul, 2003; Raju y Ezradanam, 2002).

El fruto es una cápsula semiesférica triloculada de 1.5 – 3 cm de diámetro, con un peso aproximado de 3.3 g, el fruto maduro cambia de color de verde a amarillo al madurar. La semilla es elíptica de color negro, con un largo de 1.6 – 2 cm y está cubierta por una cáscara dura con una almendra interna formada por un albumen aceitoso y blanquecino (Torres, 2009; White, 2009; Sotolongo-Pérez *et al.*, 2008; De La Vega-Lozano, 2007; Bolivar-Manaut, 2006; De La Vega-Lozano, 2006).

Se conocen tres variedades de *Jatropha curcas*: la variedad Cabo Verde adaptada a clima semiáridos y montañosos, la variedad de Nicaragua que presenta frutos y semillas grandes y la variedad de México la cual tiene una menor cantidad de compuestos tóxicos en semilla (Sotolongo-Pérez *et al.*, 2008; Sujatha *et al.*, 2005; Henning, 2006; Henning, 2004; Heller, 1996).

Entre sus nombres conocidos están: piñón, piñón tempate, coquillo, nuez purgante, piñón botija, barbasco, piñones purgativos, purga del fraile y tsikil-té (México Forestal, 2008; Martínez-Herrera, 2007; De La Vega-Lozano, 2007; Torres, 2007; De La Vega-Lozano, 2006).

1.2.2 PROPIEDADES Y USOS DE LA PLANTA

Esta especie se ha utilizado como planra medicinal. Los tallos tienen acción antimalárica, antitumoral, antirreumática y se uiltizan para tratar tanto eczema como disentería (Henning, 2006; Kureel, 2006; Martinez-Herrera *et al.*, 2006; Henning, 2004; Hirota *et al.*, 1988; Little *et al.*, 1974; Watt y Breyer-Brandwijk, 1962).

Esta planta se utiliza como cerco vivo, para reforestación, como barrera contra la erosión y para la mejora del suelo (Achten *et al.*, 2010; Effendi *et al.*, 2009; México Forestal, 2008; Sotolongo-Pérez *et al.*, 2008; De La Vega-Lozano, 2007; Bolivar-Manaut, 2008; De La Vega-Lozano, 2006; Henning, 2006; Kureel, 2006). La cáscara de los frutos se utiliza como sustrato para producir biogás (Huang *et al.*, 2008; Sotolongo-Pérez *et al.*, 2008; Martínez-Herrera, 2007; Martínez-Herrera, 2006; Rajore y Batra, 2005)

El aceite se usa con fines cosméticos como en la elaboración de jabones. La pasta residual de la extracción de aceite se utiliza como abono en variedades tóxicas y en variedades no tóxicas se usa como forraje (Padimarri *et al.*, 2009; BayerCropScience, 2008; Benge, 2006; Dangué *et al.*, 2006; Henning, 2006; Henning, 2004).

1.2.3 DISTRIBUCIÓN MUNDIAL

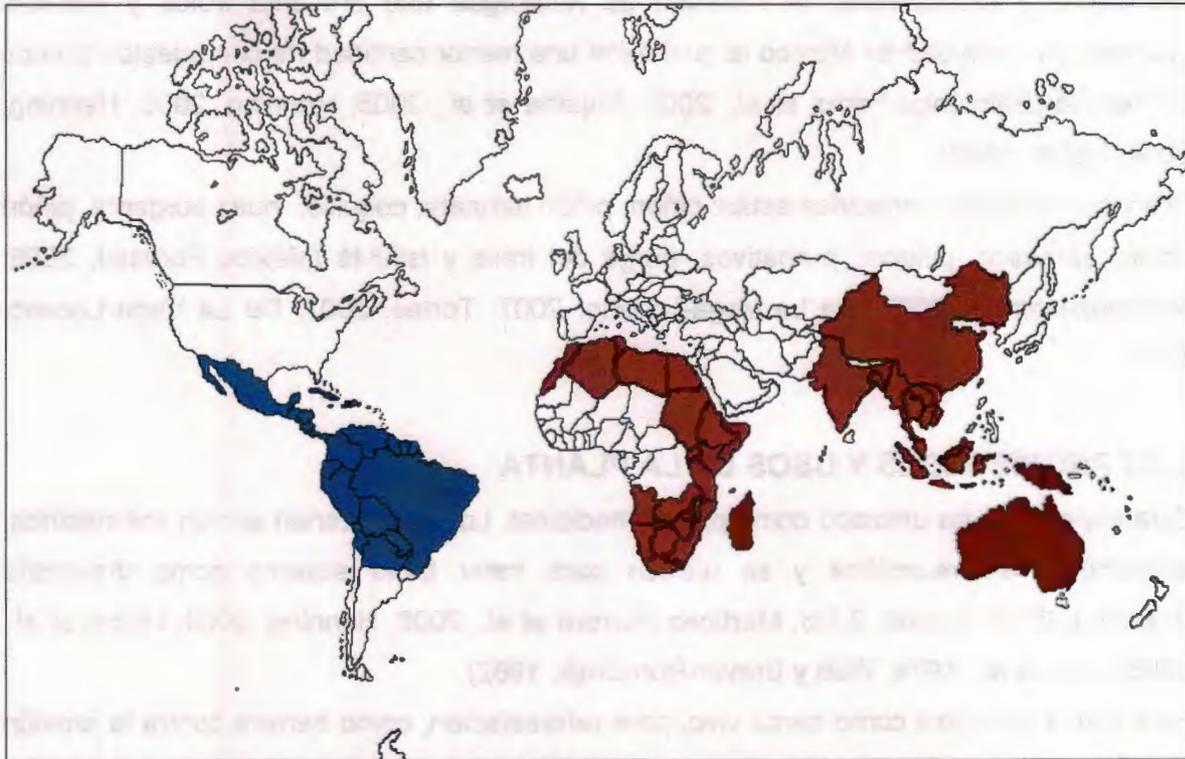


Figura 1.1 Distribución mundial de *Jatropha curcas*. En azul la distribución en el continente americano. En color rojo se muestra donde se introdujo esta especie. Imagen modificada de: <http://www.blackboxavto.ru/images/cms/externals.php?t=mapa-mundial-politico>.

En *Jatropha curcas* todavía no está definido el centro de origen, se considera de manera general que puede abarcar desde México hasta Brasil (Figura 1.1) (Achten *et al.*, 2010; CJP, 2009^b, 2009^c; Jha *et al.*, 2007; Heller, 1994). La distribución de esta especie fue realizada por marinos mercantes portugueses en el siglo XVI. En la actualidad podemos encontrar esta especie en diferentes partes de Asia como: India, China y Tailandia. En África se encuentra distribuida en Sudán, Malawi, Zimbabwe, Sudáfrica, Nigeria y Egipto (De La Vega-Lozano, 2007; De La Vega-Lozano, 2006; Heller, 1994).

En el mundo hay una superficie sembrada de 11 millones de hectáreas de *J. curcas* (White, 2009; Nakashini, 2008), las plantaciones principales se encuentran en India, China, Ghana, Egipto y Sudáfrica (CJP, 2009^b, 2009^c; Henning, 2006; Henning, 2004; Little, 1974).

A futuro países como India ha planeado sembrar de 11 – 13 millones de hectáreas de esta especie por lo que avances en la identificación de variedades con altos rendimientos y en la identificación de individuos con resistencia a diferentes tipos de factores

ambientales se han llevado a cabo por compañías privadas (CJP, 2009^a, 2009^b, 2009^c; Gibson, 2009; BayerCropScience, 2008; Nakashini, 2008; Casado y Santana, 2006).

1.2.4 DISTRIBUCIÓN NACIONAL



Figura 1.2 Distribución nacional de *Jatropha curcas*: En color verde se muestran los estados con variedades tóxicas y en amarillo se muestran los estados con variedades no tóxicas. Imagen modificada de: <http://www.prisma.com.mx/registro.htm>.

La distribución de *J. curcas* (Figura 1.2) se da en los estados de: Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Sinaloa, Sonora, Puebla, Chiapas, Yucatán, Campeche, Hidalgo y Quintana Roo. Las variedades no tóxicas representan el 10% del total de las plantas y están limitadas a ciertas regiones como: Yucatán, Quintana Roo, Veracruz, Morelos, Tabasco, Guerrero, Michoacán y Puebla (Martínez-Herrera *et al.*, 2010; De La Vega-Lozano, 2007; Martínez-Herrera, 2007; De La Vega-Lozano, 2006). El territorio mexicano cuenta con 6 millones de hectáreas adecuadas para cultivar *J. curcas* sin competir con otros cultivos (Carrasco, 2009; Diario de Yucatán, 2009; Morales, 2009; Perea, 2009; Rosenberg, 2009).

En México existen plantaciones con un total de 50 mil hectáreas en el estado de Veracruz, 7 mil hectáreas en Chiapas, 4 mil hectáreas en Michoacán y 3,500 hectáreas en Yucatán con financiamiento por parte de CONAFOR conjuntamente con empresas particulares como MDLM Green Oil Corp y Global Energy (Sedeco, 2010; Carrasco, 2009; Diario de Yucatán, 2009; Gómez-Hernández, 2009; Morales, 2009; Perea, 2009).

1.3 RELEVANCIA DE *Jatropha curcas* EN LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

Los biocombustibles son carburantes líquidos o gaseosos derivados de fuentes de origen vegetal, su principal ventaja es que son renovables y emiten menos gases de efecto invernadero, como es el bióxido de carbono (Kywe y Oo, 2009; Molina *et al.*, 2008; Allen y Watts, 2000; Ali y Hanna, 1994). Aunque desde inicios del siglo XX se conocen las propiedades carburantes de determinados cultivos, estos han aumentado su relevancia por el incremento en los precios y la disponibilidad de petróleo (Kywe y Oo, 2009; Molina *et al.*, 2008; Martínez-Herrera, 2007; Martínez-Herrera *et al.*, 2006).

Las características de los diferentes combustibles (producción, ventajas y desventajas) se resumen en el Cuadro 1.2.

Cuadro 1.2 Características generales de diferentes carburantes (Ciria, 2009; Kywe y Oo, 2009; Zhao *et al.*, 2009; Molina *et al.*, 2008).

| Carburante | Fuentes | Métodos de producción | Ventajas | Desventajas |
|--------------------|------------------|--|----------------------|---|
| Biodiesel | Canola | Transesterificación de aceites vegetales | No sulfurado | Degradación rápida |
| | <i>J. curcas</i> | | Biodegradable | Solidificación en frío |
| Bioetanol | Maíz | Fermentación y destilación | Fácil almacenaje | Gran emisión de gases (maíz) |
| | Caña | | | |
| Petrodiesel | Reservas fósiles | Destilación fraccionada | Punto de fusión bajo | Menor combustión Gran emisión de gases |

El principal auge en esta especie se debe a que la semilla contiene hasta el 40 % de su peso en aceite (Tang *et al.*, 2007; Dangué *et al.*, 2006;). Aunado a esto es poco demandante en cuanto a condiciones de cultivo pudiendo crecer en suelos con poca cantidad de nutrientes (De La Vega-Lozano, 2007; De La Vega-Lozano, 2006; Francis *et al.*, 2005), en condiciones adversas como suelos contaminados y en suelos salinos (Gao *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008; Mangkoedihardjo, 2008; Mangkoedihardjo *et al.*, 2008). Las semillas de esta planta tienen un perfil similar al de otros aceites comestibles que pueden procesarse para obtener biodiesel (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.3 Perfil de ácidos grasos en diferentes cultivos oleaginosos (porcentaje de ácidos grasos totales) (Milinsk *et al.*, 2007; Kopma *et al.*, 2006; Martínez-Herrera *et al.*, 2006; Moh-Din *et al.*, 2000).

| Especie | Palmítico (C16:0) | Estearico (C18:0) | Oleico (C18:1) | Linoleico (C18:2) | Linolénico (C18:3) |
|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <i>Elais oleifera</i> | 17.9 ± 0.9 | 1 ± 0.1 | 60.9 ± 1.7 | 18.8 ± 1.2 | 0.8 ± 0.2 |
| <i>Glycine max</i> | 13.27 ± 0.62 | 3.59 ± 0.26 | 19.31 ± 0.18 | 55.51 ± 0.27 | 6.34 ± 0.09 |
| <i>Brassica napus</i> | --- | --- | 62.9 | 17.8 | 7.5 |
| <i>Jatropha curcas</i> | 10.5 | 2.45 | 41.5 | 44.4 | 0.2 |
| <i>J. curcas var no tóxica</i> | 12.3 | 2.8 | 47.1 | 36.7 | 0.18 |

Dado que esta especie es poco demandante, tiene un rango de distribución mas amplio que otros cultivos oleaginosos (BayerCropScience, 2009; CJP, 2009^a, 2009^b; Jongschaap, 2008; Jongschaap *et al.*, 2007) y el aceite obtenido es similar al de otras oleaginosas se proyecta que el precio de barril de biodiesel tendría un menor costo (Cuadro 1.4).

Cuadro 1.4 Precio y rendimientos de aceite para biodiesel de diferentes especies oleaginosas (BayerCropScience, 2009; CJP, 2009^a, 2009^b; Volckaert, 2009).

| Cultivo | Rendimiento (L/Ha) | Rendimiento (Kg/Ha) | Precio del Barril (USD) |
|------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| <i>Glycine max</i> | 521 | 454 | 73 |
| <i>Brassica napus</i> | 1427 | 1000 | 78 |
| <i>Elais guinensis</i> | 7133 | 5994 | 46 |
| <i>Jatropha curcas</i> | 2268 | 2268 | 43 |

La pasta residual de la extracción de aceite tiene un elevado contenido de aminoácidos esenciales por lo que el uso como forraje en variedades de baja toxicidad significaría un valor agregado, el precio de este sub-producto se proyecta en 200 – 300 dólares por tonelada (Pérez, 2010; CJP, 2009^a, 2009^b; Volckaert, 2009; Henning, 2006; Euler y Goritz, 2004; Henning, 2004; Makkar *et al.*, 1998)

El biodiesel de *J. curcas* presenta un mayor número de cetano, lo que significa combustión, al compararse con el biodiesel de soya pero menor al de palma de aceite y palma de coco (Cuadro 1.5). La viscosidad es menor al biodiesel de palma de coco y similar al de soya y palma de aceite. Sin embargo el biodiesel de *J. curcas* es menos corrosivo que el obtenido de soya, palma de aceite y palma de coco lo que significa un menor desgaste de las partes metálicas del motor.

Cuadro 1.5 Propiedades del biodiesel de diferentes fuentes (Becker y Makkar, 2008; Alleman y McCormick, 2006, May *et al.*, 2005).

| Propiedades del biodiesel | Materia prima del biodiesel | | | |
|---------------------------------|-----------------------------|---------------|------------------------|------|
| | Palma de aceite | Palma de coco | <i>Jatropha curcas</i> | Soya |
| Número de cetano | 62 | 70 | 58 | 55 |
| Viscosidad (mm ² /s) | 4.5 | 2.65 | 4.4 | 4.2 |
| Índice de acidez (mg KOH/g) | 0.25 | 0.17 | 0.11 | 0.35 |

El hecho mas relevante para la propagación de esta especie es que hay una demanda de materia prima para la producción de biodiesel, siendo las aerolíneas las principales interesadas en utilizar hasta el 10 % de este biocombustible para 2017, por lo que se han establecido plantas procesadoras e incentivando la producción de biocombustibles de fuentes no alimenticias (Coca, 2010; Pérez, 2010; Rosenberg, 2009).

1.4 PROBLEMÁTICA DEL CULTIVO

J. curcas es una especie poco domesticada, con alta heterocigocidad lo que conlleva a rendimientos variables de aceite y a material de baja calidad (Achten *et al.*, 2010; Montes-Osorio *et al.*, 2008; Basha y Sujatha, 2007; Jha *et al.*, 2007; Dangué *et al.*, 2006; Martínez-Herrera *et al.*, 2006).

Las semillas de esta especie requieren de un manejo especial para su establecimiento, el tiempo de germinación es muy variable y la viabilidad decae drásticamente después de un año de almacenaje (Li *et al.*, 2008; Márquez y Campos, 2007). Las semillas presentan una serie de compuestos tóxicos en la pasta residual los que pueden presentar riesgos a la salud de los trabajadores o contaminar el suelo fertilizado con esta pasta (Achten *et al.*, 2010; Volckaert, 2008; De La Vega Lozano, 2007; Martínez-Herrera, 2007; De La Vega-Lozano, 2006; Henning, 2006)).

Este arbusto se puede propagar fácilmente por estacas sin embargo, las plantas desarrolladas son menos productivas, se reduce su ciclo de vida, presentan una menor productividad. Esto se debe a que no se forma adecuadamente su sistema radicular y a la fructificación temprana (Sun *et al.*, 2008; Jha *et al.*, 2007; Sujatha *et al.*, 2005).

Esta especie es susceptible a diferentes tipos de estrés ambiental como son heladas e inundaciones (Datta *et al.*, 2007; Jha *et al.*, 2007).

Se han reportado enfermedades que afectan los monocultivos como la antracnosis (*Colletotrichum spp.*), mosaico amarillo (*Genminivirus*) y los que atacan el fruto como: *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.* (Datta *et al.*, 2007; De La Vega-Lozano, 2007; De La Vega-Lozano, 2006; Grimm, 1999). Entre las plagas más importantes encontramos a los consumidores de semillas (*Pinnaspis strachani*) y a los barrenadores que causan abortos y malformaciones de frutos tanto en variedades tóxicas como de baja toxicidad (*Legocheyrus undatus*, *Pachycoris klugii* y *Leptoglossus zonatus*) (Martínez-Herrera *et al.*, 2010; Gonzáles-Fernández, 2008; Torres, 2007; Grimm, 1999).

En el cuadro 1.6 se resumen las ventajas y desventajas de *J. curcas*.

Cuadro 1.6 Ventajas y desventajas del cultivo de *J. curcas*.

| Ventajas | Desventajas |
|-------------------------|-----------------------------------|
| Resistente a sequía | Especie poco domesticada |
| Controla la erosión | Baja viabilidad de semilla |
| Cultivo poco demandante | Tiempo de germinación variable |
| Fructificación temprana | Susceptible a frío e inundaciones |

1.5 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

La necesidad de tener un suministro constante de material así como la selección de materiales que presenten altos rendimientos o tolerancia a diferentes tipos de factores bióticos y abióticos hacen necesaria la aplicación de técnicas biotecnológicas como el cultivo de tejidos vegetales.

El *cultivo in vitro* es un conjunto de técnicas que permiten el cultivo (en condiciones totalmente estériles) de órganos, tejidos y células empleando medios nutritivos artificiales ricos en sales minerales, vitaminas y reguladores de crecimiento vegetal (Pérez *et al.*, 1999). Es la aplicación del concepto de la totipotencia celular que es la capacidad que tiene una célula no embrionaria para diferenciarse y convertirse en una planta completa (George *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 1999).

Dentro del cultivo de tejidos vegetales existentes varias vías para generar plantas, como es la morfogénesis el cual de acuerdo con George *et al.*, (2008) es el fenómeno de formación de nuevas estructuras donde previamente eran inexistentes.

Los procesos morfogénicos se dividen en:

Organogénesis: producción de órganos en explantes cultivados, ya sean raíces o brotes adventicios los cuales al enraizarse pueden dar origen a una planta completa (George *et al.*, 2008; Hartmann y Kester, 2001; Pérez *et al.*, 1999).

Embriogénesis somática: fenómeno de naturaleza asexual en el cual se forman sobre el explante estructuras bipolares que imitan muchos aspectos de la reproducción sexual, en especial el desarrollo histológico de los embriones cigóticos, la principal diferencia es que al no existir la fusión de gametos es que la planta generada es una "copia" de la planta madre (George *et al.*, 2008; Hartmann y Kester, 2001; Pérez *et al.*, 1999). Este proceso se distingue de la formación de brotes adventicios en que los embriones somáticos son

estructuras bipolares y carecen de conexión vascular con el tejido materno (George *et al.*, 2008; Hartmann y Kester, 2001; Pérez *et al.*, 1999).

Ambas vías organogénesis y embriogénesis somática se pueden dar de manera directa cuando sobre el mismo explante se forman órganos o embriones y de manera indirecta cuando sobre el explante se forma un tejido desdiferenciado conocido como callo, en el cual se pueden formar órganos o embriones (Figura 1.3) (Castillo, 2004; Pérez *et al.*, 1999).

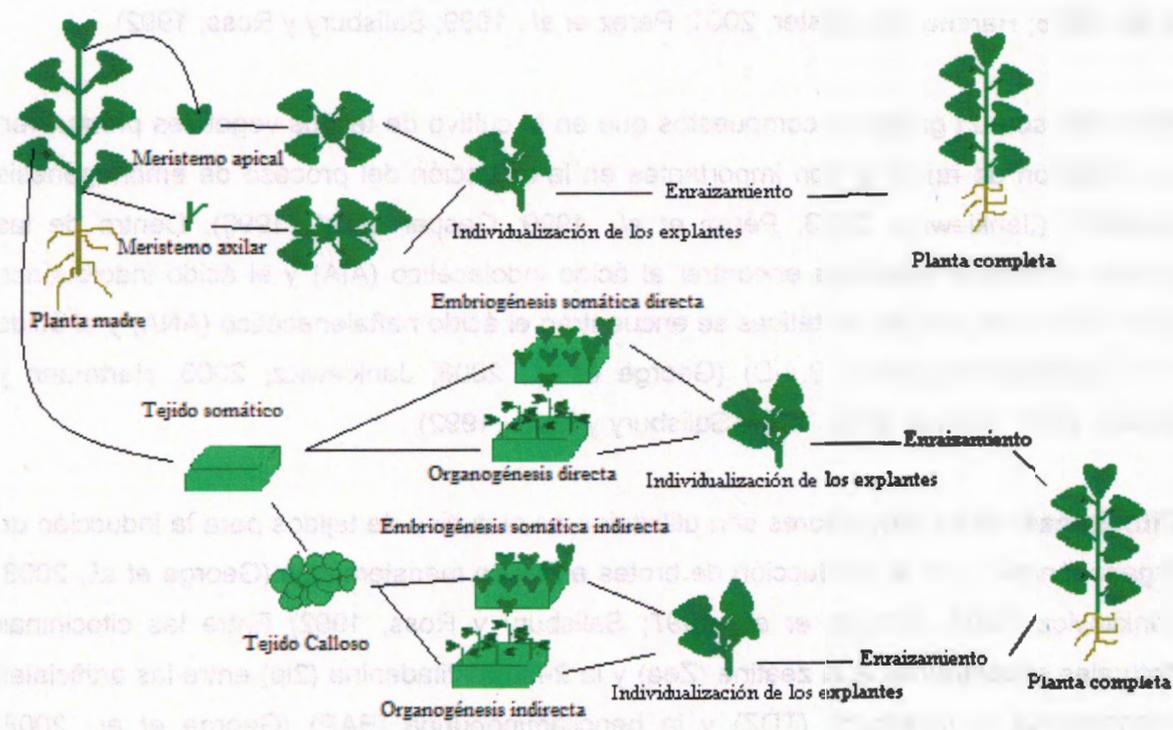


Figura 1.3 Esquema de las diferentes vías de regeneración *in vitro*. Imagen de elaboración propia.

La principal ventaja de estas técnicas es que permiten producir un gran número de plantas en un espacio reducido y menor mano de obra. Dentro de las aplicaciones de estas técnicas está la mejora y selección genética, obtención de organismos haploides y líneas puras, conservación del germoplasma, producción de plantas libres de patógenos, micropropagación y producción de metabolitos secundarios de interés industrial (George *et al.*, 2008).

1.5.3 REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL

Los reguladores de crecimiento vegetal son compuestos que exhiben propiedades fuertes en la regulación del crecimiento en plantas a bajas concentraciones. Se distinguen de las fitohormonas en que los reguladores de crecimiento vegetal son sintéticos lo que los hace más persistentes en el medio de cultivo. Son ampliamente utilizados en el cultivo de tejidos vegetales para la inducción de procesos de organogénesis y embriogénesis somática entre las que podemos encontrar a las auxinas, citocininas y giberelinas (George *et al.*, 2008; Hartmann y Kester, 2001; Pérez *et al.*, 1999; Salisbury y Ross, 1992).

Auxinas: son un grupo de compuestos que en el cultivo de tejidos vegetales promueven la formación de raíces y son importantes en la inducción del proceso de embriogénesis somática (Jankiewicz, 2003; Pérez *et al.*, 1999; Gaspar *et al.*, 1996). Dentro de las auxinas naturales podemos encontrar al ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (AIB). Entre las auxinas sintéticas se encuentran el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) (George *et al.*, 2008; Jankiewicz, 2003; Hartmann y Kester, 2001; Gaspar *et al.*, 1997; Salisbury y Ross, 1992).

Citocininas: estos reguladores son utilizados en el cultivo de tejidos para la inducción de organogénesis y en la producción de brotes en tejido meristemático (George *et al.*, 2008; Jankiewicz, 2003; Gaspar *et al.*, 1997; Salisbury y Ross, 1992) Entre las citocininas naturales encontramos a la zeatina (Zea) y la 2-Isopentiladenina (Zip) entre las artificiales encontramos el tidiazurón (TDZ) y la bencilaminopurina (BAP) (George *et al.*, 2008; Gaspar *et al.*, 1997; Salisbury y Ross, 1992).

Giberelinas: las principales funciones dentro del cultivo *in vitro* para este regulador está la elongación del tallo y estimular la germinación (George *et al.*, 2008; Jankiewicz, 2003; Pérez *et al.*, 1999; Salisbury y Ross, 1992).

1.5.4 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES EN *Jatropha curcas*

La importancia de esta especie ha llevado a realizar el cultivo de tejidos vegetales mediante propagación por meristemos, organogénesis y embriogénesis somática.

De manera general la mayor parte de los estudios previos parten de explantes de campo (Kumar *et al.*, 2010; Kumar y Reddy, 2010; Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Misra *et al.*, 2010; Shrivastava y Banerjee, 2008; Datta *et al.*, 2007; Thepsharam *et al.*, 2006; Rajore y Batra, 2005; Sujatha *et al.*, 2005).

Reportes mas recientes se utilizan explantes de plantas regeneradas *in vitro* obteniendo una mayor respuesta de cada proceso inducido (Purkayastha *et al.*, 2010; Kaewpoo y Te-chato, 2009; Deore y Johnson, 2008; Li *et al.*, 2008; Kalimuthu *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2004).

La propagación por meristemos se ha dado en medios adicionados con Kin, BAP y TDZ. Los resultados más relevantes se obtuvieron en medios con una combinación de BAP con Kin así como con la adición de diferentes vitaminas, aminoácidos y minerales (Purkayastha *et al.*, 2010; Kaewpoo y Te-chato, 2009; Valle-Gough, 2009; Shrivastava y Banerjee, 2008; Datta *et al.*, 2007; Kalimuthu *et al.*, 2007; Thepsharam *et al.*, 2006; Rajore y Batra, 2005; Sujatha *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2004)

El proceso de organogénesis directa e indirecta se obtuvo en estudios previos en presencia de BAP, TDZ y Kin de forma aislada, en combinaciones de estos reguladores y en presencia de auxinas (Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Kumar y Reddy, 2010; Misra *et al.*, 2010; Varshney y Jhonson, 2010; Valle-Gough, 2009; *et al.*, 2008; Sujatha *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2004). En la elongación de los brotes se han utilizado diferentes auxinas (Kumar y Reddy, 2010) y el AG₃ tanto de forma individual como en combinación con auxinas y citocininas (Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Purkayastha *et al.*, 2010; Valle-Gough, 2009; Deore y Johson, 2008; Li *et al.*, 2008)

El enraizamiento de brotes se ha realizado en medio MS sin reguladores (Rajore y Batra, 2005) o MS al mitad de su concentración (Purkayastha *et al.*, 2010). De igual manera se ha reportado el uso de AIA, AIB y ANA de forma individual como en sinergismo con otros reguladores (Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Kumar y Reddy, 2010; Kumar *et al.*, 2010; Varshney y Jhonson, 2010; Kaewpoo y Te-chato, 2009; Deore y Johnson, 2008; Shrivastava y Banerjee, 2008; Li *et al.*, 2008; Datta *et al.*, 2007; Kalimuthu *et al.*, 2007; Thepsharam *et al.*, 2006).

En resumen las respuestas organogénicas mencionadas anteriormente tienen frecuencias variables de inducción (53 – 88 %) obteniendo con un máximo de 18 brotes directos y 11 brotes indirectos por explante con un tiempo promedio de inducción de 8 semanas.

La embriogénesis somática indirecta en esta especie se ha reportado en explantes de hoja utilizando Kin para producir callo embriogénico, con la posterior adición de Kin y AIA para la fase de diferenciación a embriones produciendo 58 embriones por explante en 12 semanas de cultivo (Jha *et al.*, 2007).

La embriogénesis somática directa se ha reportado en cotiledones, con ocho días de inducción y con la formación de 40 embriones somáticos por explante (Kalimuthu *et al.*, 2007).

En el Cuadro 1.7 se enlistan los diferentes reguladores y explantes utilizados en el cultivo *in vitro* de *J. curcas*.

Cuadro 1.7 Reguladores y explantes utilizados en la inducción de procesos de regeneración *in vitro* de *J. curcas*.

| Respuesta | RCV | Tipo de explante | Explantes responsivos (%) | Brotos/explante | Referencias |
|-----------|-----------------|------------------|---------------------------|-------------------|---------------------------------|
| PM | BAP | Ápice | NR | 3.4 | Rajore y Batra, 2005 |
| | TDZ | | 60 | 5.9 | Thepsanram <i>et al.</i> , 2006 |
| | Kin | Yema axilar | 52 | 30 | Datta <i>et al.</i> , 2007 |
| | AIA | | 90 | 35 | Kalimuthu <i>et al.</i> , 2007 |
| | AIB | | NR | 10 | Shrivastava y Banerjee, 2008 |
| | | | | 60 | 5 |
| | | | 70 | 8 | Valle-Gough, 2009 |
| OD | TDZ | Epicotilos | 38 | NR | Wei <i>et al.</i> , 2004 |
| | BAP | Hoja | 79 | NR | Sujatha <i>et al.</i> , 2005 |
| | Kin | Cotiledón | 90 | 8 | Valle-Gough, 2009 |
| | AIB | Peciolos | 58 | 10 | Kumar y Reddy, 2010 |
| | AIA | | | | |
| | AG ₃ | | | | |
| OI | TDZ | Epicotilo | 44 | NR | Wei <i>et al.</i> , 2004 |
| | BAP | E.C | 90 | 10 | Varshney y Johnson, 2010 |
| | AIA | Hoja | 53 | 11 | Deore y Johnson, 2008 |
| | AIB | | 83 | 9.7 | Kumar <i>et al.</i> , 2010 |
| | 2,4-D | | 83 | 7 | Misra <i>et al.</i> , 2010 |
| | | Cotiledón | 95 | NR | Li <i>et al.</i> , 2008 |
| | | 88 | 7 | Valle-Gough, 2009 | |

RCV: regulador de crecimiento vegetal, **PM:** proliferación de brotes, **OD:** organogénesis directa, **OI:** organogénesis indirecta, **E.C:** embrión cigótico, **NR:** no reportado.

Los resultados más relevantes, elegidos en función de la frecuencia de respuesta, para nuestro estudio se agruparon en el Cuadro 1.8 donde se incluye el tiempo de respuesta y la efectividad del proceso.

Cuadro 1.8 Trabajos realizados en el cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas*.

| Proceso | RCV | Explantos | Eficiencia | Explantos responsivos | Tiempo (semanas) | Referencia |
|---------|--------------------------------|-------------|--------------|--------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| PM | TDZ | Yemas | 12 brot/expl | NR | 12 | Sujatha <i>et al.</i> , 2005 |
| | BAP | Ápices | 6 brot/expl | 98% | 6 | Purkayastha <i>et al.</i> , 2010 |
| OD | TDZ, AIB AG ₃ | Hoja | 18 brot/expl | 88% | 10 | Khurana-Kaul <i>et al.</i> , 2010 |
| OI | TDZ, BAP AIB | Hoja | 11 brot/expl | 53% | 12 | Deore y Johnson, 2008 |
| ESI | BAP | Cotiledones | 40 emb/expl | 90% | 1 | Kalimuthu <i>et al.</i> , 2007 |
| ESD | Kin, AIA | Hoja | 58 embr/expl | 45% | 16 | Jha <i>et al.</i> , 2007 |

RCV: regulador de crecimiento vegetal, **PM:** proliferación de brotes. **OD:** organogénesis directa, **OI:** organogénesis indirecta. **ESD:** embriogénesis somática directa. **ESI:** embriogénesis somática indirecta

Los resultados y los tipos de reguladores utilizados en cada uno de los reportes sirvieron de base para establecer el diseño experimental de este estudio (Figura 1.4) para inducir diferentes procesos morfogénicos de *J. curcas*.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones de cultivo para la regeneración *in vitro* de variedades mexicanas no tóxicas de *Jatropha curcas*.

1.6.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer un protocolo para la formación de brotes *in vitro* de la especie.
- Evaluar la respuesta de diferentes tipos de explantes durante la inducción de la organogénesis y la embriogénesis somática *in vitro*.
- Evaluar el efecto de diferentes reguladores del crecimiento sobre la organogénesis y embriogénesis somática *in vitro* de *J. curcas*.

1.7 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARA EL ESTABLECIMIENTO DE PROTOCOLOS DE REGENERACIÓN EN *Jatropha curcas*

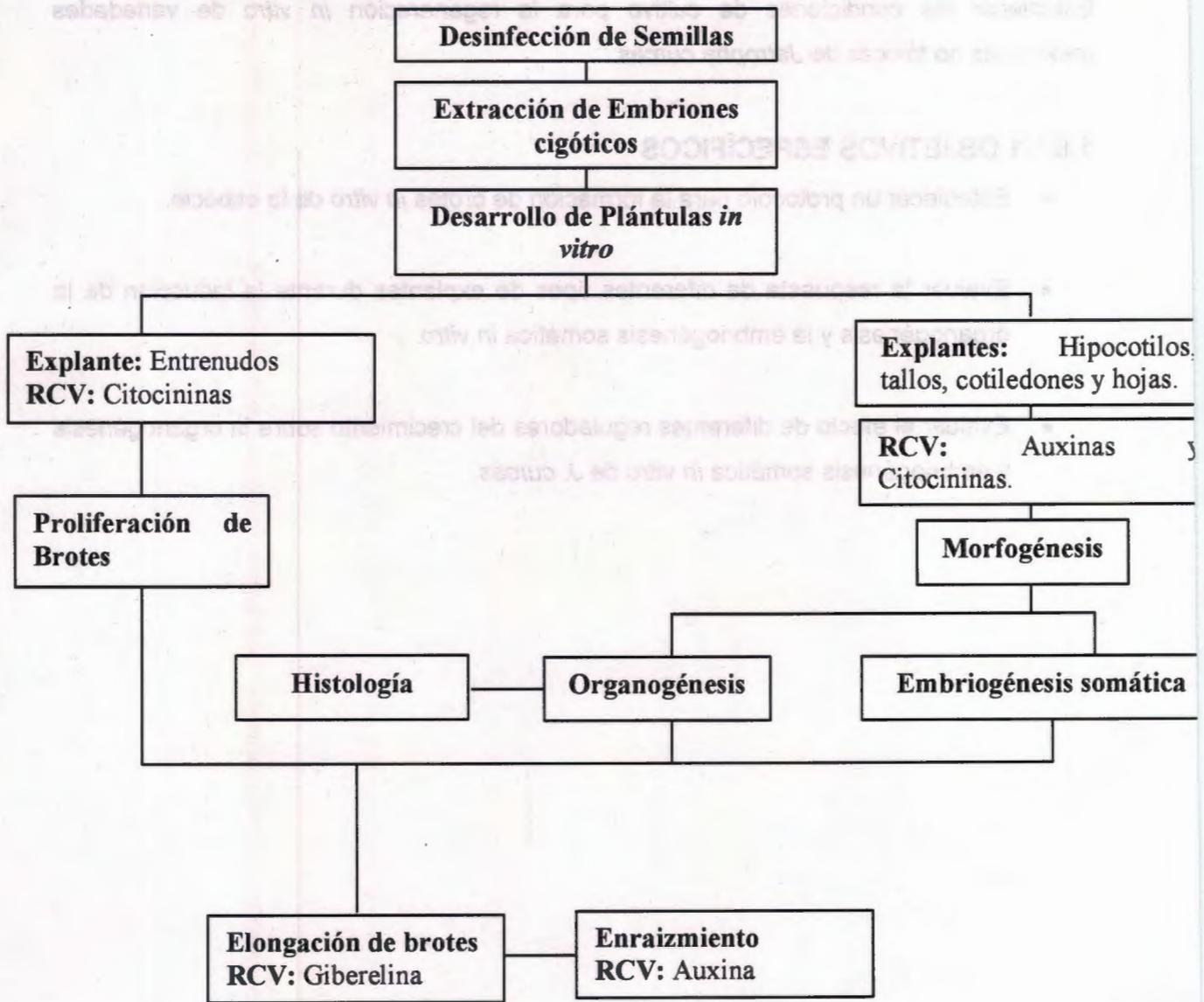


Figura 1.4 Estrategia experimental para inducir diferentes respuestas morfológicas en *Jatropha curcas*.

1.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Achten, W.M.J., L.R. Nielsen, R. Aert, A.G. Lengkeek, E.D. Kjaer, A. Trabucco, J.K. Hansen, W. Maes, L. Graudal, F.K. Akinnifesi y B. Myus. (2010). Towards domestication of *Jatropha curcas*. *Biofuels*, 1 (1), 91 – 107.
- Ali, Y y M.A. Hanna. (1994). Alternative Diesel Fuels from Vegetable Oils. *Bioresource Technology*, 50, 153 – 163.
- Allen, C.A.W y K.C. Watts. (2000). Comparative Analysis of the Atomization Characteristics of Fifteen Biodiesel Fuel Types. *American Society of Agricultural Engineers*, 43 (2), 207 – 211.
- Alleman, T.L y R.L. McCormick, 2006. Analysis of Coconut-Derived Biodiesel and Conventional Diesel Fuel Samples from the Phillipines. National Renewable Energy Laboratory. [Online] (Enero de 2006)
Disponible en: <http://www.osti.gov/bridge>
[Acceso 13 Enero 2011]
- Basha, S.D y M. Sujatha. (2007). Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica*, 156, 375 – 386.
- Basiron, Y. (2007). Palm oil production through sustainable plantations. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 289 – 295.
- BayerCropScience, 2009. Editorial Service Issue 1 – *Jatropha* Diagram Yield. [Online] (Actualizado Junio 2009)
Disponible en:
http://www.bayercropscience.com/bcsweb/cropprotection.nsf/id/EN_Editorial_Service_Issue_1_-_Jatropha_Diagram_Yield?open&l=EN&ccm=500
[Acceso 18 Julio 2009]
- BayerCropScience, 2008. *Jatropha* – This particular oil well holds a lot of future promise. [Online] (Actualizado Febrero 2009)
Disponible en:
http://www.bayercropscience.com/bcsweb/cropprotection.nsf/id/EN_2008-ES-001?open&l=EN&ccm=500035
[Acceso 18 Julio 2009]

- Blanc, G., N. Michaux-Ferrière, C. Teisson, L. Lardet y M.P. Carron. (1999). Effect of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 59, 103 – 112.
- Becker, K y H.P.S. Makkar. (2008). *Jatropha curcas*: A potential source for tomorrows oil and biodiesel. *Lipid Technology*, 2 (5). 104 – 107.
- Benge, M., 2006. Assessment of the potential of *Jatropha curcas*, (biodiesel tree), for energy production and other uses in developing countries. [Online] (Actualizado Agosto 2006).
 Disponible en: <http://www.ascension-publishing.com/BIZ/jatropha.pdf>
 [Acceso 15 Julio 2009].
- Bolivar-Manaut, L., 2006. Le llaman “La Planta Mágica” y es una de las Mejores Fuentes de Combustible Natural. [Online] (Actualizado Marzo 2009)
 Disponible en: <http://www.biodiesel-uruguay.com/articulos/jatrophacurcas.php>.
 [Acceso 22 Abril 2009].
- Carrasco, T., 2009. Motivan a ejidatarios a plantar *Jatropha* en el sur. *Imagen del Golfo*. [Online] (Actualizado Marzo 2008)
 Disponible en: <http://www.imagendelgolfo.com.mx/resumen.php?id=86401>
 [27 Julio 2009].
- Casado, O y P. Santana, 2006. Experiencias Cultivo de *Jatropha* en la República de la India. [Online] (Actualizado Enero 2009) Disponible en:
http://www.jatropha.de/Dominican%20Republic/workshop/O-asado_experiencia%20India.pdf.
 [Acceso 12 Julio 2009].
- Center for *Jatropha* Promotion (CJP), 2009. *Jatropha* Biodiesel Overview. [Online] (Actualizado Junio 2008)
 Disponible en: <http://www.jatrophabiodiesel.org/economics.php?divid=menu4>
 [Acceso 20 Julio 2009].
- Center for *Jatropha* Promotion (CJP), 2009. Biodiesel. [Online] (Junio de 2008)
 Disponible en: <http://www.jatrophabiodiesel.org/bioDiesel.php?divid=menu6>.
 [Acceso 20 Julio 2009].
- Center for *Jatropha* Promotion (CJP), 2009. Indian Programs. The National Mission on *Jatropha* Biodiesel. [Online] (Actualizado Junio de 2008)

- Disponible en: <http://www.iatrophabiodiesel.org/indianPrograms.php?divid=menu5>.
[Acceso 10 Julio 2009].
- Ciria, J.I., 2009. Propiedades y características de los combustibles Diesel y Biodiesel. Wearcheck Ibérica. [Online] (Enero de 2009).
Disponible en: <http://www.fiagro.org.sw/archivos/0/997.pdf>
[Acceso 22 Julio 2009].
- Coca, J.R., 2010. El aceite de *Jatropha* se consolida como biocombustible para la aviación. [Online] (Actualizado 20 de Octubre de 2010)
Disponible en: http://www.tendencias21.net/El-aceite-de-Jatropha-se-consolida-como-biocombustible-para-la-aviacion_a4969.html
[Acceso 12 Noviembre 2010]
- Comisión Nacional Forestal (CONAFOR), 2009. Plantaciones Forestales Comerciales. [Online] (Actualizado Marzo 2009)
Disponible en:
http://74.125.155.132/search?q=cache:pe2ITEpUOkQJ:www.adrural.com/PDF/conafor/PLANTACIONES_COMERCIALES.pdf+conafor+plantaciones+forestales+comerciales+jatropha&cd=7&hl=es&ct=clink&gl=mx
[Acceso 20 Julio 2009]
- Dangue, V., D. Suthar y P. S. Reddy. (2006). Biodiesel through *Jatropha curcas* A Critical Analysis, in: Biodiesel Conference Towards Energy Independence – Focus on *Jatropha*, Singh, B; Swaminathan, R y Ponraj, V. Rashtrapati Bahwan, Nueva Delhi. 31 – 36.
- Datta, M.M., P. Mukherjee, B. Ghosh, y T.B. Jha. (2007). *In vitro* Clonal Propagation of Biodiesel Plant (*Jatropha curcas* L.). Current Science, 93 (10), 1438-1442.
- De La Vega-Lozano, J.A., 2006. *Jatropha curcas* L. Agroenergía. Consultor independiente Agro-proyectos. [Online] (Enero de 2008)
Disponible en: <http://3wmexico.com/images/jatropharesumen.pdf>
[Acceso 10 Abril 2009].
- De La Vega-Lozano, J.A., 2007. *Jatropha* Project – México. [Online] (Actualizado Enero 2007)
Disponible en: <http://www.sme-environment.org/docs/11719824102316.pdf> [Acceso 10 Julio 2009]

- Demandre, C., C. Serghini-Caíd, A.M. Justin, y P. Mazliak. (1989). Fatty acid desaturation in some plants of horticurtural interest: Pea, Spinach, Potato, etc. Biological role of plants lipids. P.A., Gruz y T., Kremmer, Ed. Plenum Press. New York & London. 3 – 12 pp.
- Deore, A y S. Johnson. (2008). High frequency plant regeneration of leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. Plant Biotechnology Reports, 2, 7 – 11.
- Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), 2009. Germplasm Resources Information Network (GRIN). [Online] (Actualizado Julio 2009) Disponible en: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?20692> [Acceso 14 Agosto 2009].
- Diario de Yucatán, 2009. Sembrarán 3,500 hectáreas de *Jatropha*. [Online] (Actualizado 21 de Enero de 2009) Disponible en: [http://www.yucatan.com.mx/noticia.asp?cx=11\\$1310000000\\$3999064&f=20090121](http://www.yucatan.com.mx/noticia.asp?cx=11$1310000000$3999064&f=20090121) [27 Julio 2009]
- Dwimahyani and Ishak, I. (2004). Induced mutation on *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) for improvement of agronomic characters variability. Centre of Research and Development of Isotopes and Radiation Technique, National Nuclear Energy Agency, Jakarta, Indonesia, 1 – 7.
- Effendi, Z., R. Ramli, A.J. Ghani, y Z. Yaakob. (2009). Development of *Jatropha curcas* Color Grading System for Ripeness Evaluation. European Journal of Scientific Research, 30 (4), 662 – 669.
- Euler, H. y D. Goritz. (2004). Case Study: "*Jatropha curcas*". Global Facilitation of Underutilized Species (GFU) & Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH. Frankfurt. 63 p.
- Francis, G., R. Edinger y K. Becker. (2005). A concept of simultaneous wasteland reclamation, fuel production and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. Natural Resources Forum, 29, 12 – 24.

- Gao, S., S. Ouyang, S. Wang, Y. Xu, L. Tang y F. Chen. (2008). Effects of salt stress on growth, antioxidant enzyme and phenylalaline-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedlings. *Plant Soil Environment*, 9, 374 – 381.
- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D.M. Reid y T.A. Thorpe. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cell Development Biology Plant*. 32; 272 – 289.
- George, E.F., M.A. Hall y G.J. De-Klerk. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. 1 The Background. Springer. Tercera edición. Holanda. 477 p.
- Gibson, L., 2009. SG Biofuels, Agrasun Advance in *Jatropha* Research. *Biomass Magazine*. [Online] (Actualizado Junio 2009)
 Disponible en: http://www.biomassmagazine.com/article.jsp?article_id=2914
 [Acceso 24 Agosto 2009].
- Gonhua, M. (1998). Effects of Cytokinins and Auxins on Cassava Shoot Organogenesis and Somatic Embryogenesis from Somatic Embryo Explants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 54, 1 – 7.
- González-Fernández, R., 2008. *Jatropha curcas* una planta excepcional: *Jatropha* y biocombustibles. [Online] (Actualizado el 20 de Enero de 2008) Disponible en: <http://rodrigogonzalezf.blogspot.com/2008/03/jatropha-curcas-una-planta-excepcional.html>
 [22 Abril 2009].
- Gómez-Hernández, T. 2009. INIFAIP, agente técnico para la formación de planta piloto de Biodiesel en Chiapas. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales (INIFAIP). [Online] (Actualizado 29 de Enero de 2009). Disponible en: http://www.inifap.gob.mx/quienes_somos/noticias_html/nota_biodiesel.htm
 [17 Julio 2009].
- Grimm, C. (1999). Evaluation of damage to physic nut (*Jatropha curcas*) by true bugs. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 92, 127 – 136.
- Hartmann, H.T y D.E. Kester. (2001). *Propagación de plantas, Principios y Prácticas*. Compañía Editorial Continental. Octava Reimpresión. México. 880 p.
- Heller, J., 1996. *Physic Nut – Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and the use of underutilized and neglected crops. International Plant Genetic Resources Institute. Roma. [Online] (Actualizado Marzo 2007)

- Disponible en: <http://www.ipgri.cgiar.org/publications/pdf/161.pdf>
 [Acceso 20 Abril 2009].
- Hirota, M., M. Suttajit, H. Suguri, Y. Endo, K. Shudo, V. Wongchai, E. Hecker y H. Fujiki. (1988). A New Tumor Promoter from the Seed Oil of *Jatropha curcas* L., an Intramolecular Diester of 12-Deoxo-16-hydroxyphorbol. *Cancer Research*, 48, 5800 – 5804.
- Henning, R.K., 2004. "The *Jatropha* System" – Economy and Dissemination Strategy Integrated Rural Development by Utilization of *Jatropha curcas* L. (JCL) as Raw Material and as Renewable Energy. [Online] (Actualizado 4 de Junio de 2004)
 Disponible en: <http://www.jatropha.de/documents/JCL-economy-strategy-renewables2004.pdf>
 [Acceso 16 Julio 2009]
- Henning, R.K., 2004. *Jatropha curcas* L in Africa. Global Facilitation Unit of Underutilized Species. [Online] (Actualizado 12 de Junio de 2004)
 Disponible en:
[http://www.underutilized-species.org/Documents/PUBLICATIONS/jatropha curcas africa.pdf](http://www.underutilized-species.org/Documents/PUBLICATIONS/jatropha_curcas_africa.pdf)
 [Acceso 16 Julio 2009].
- Huang, M.X., P. Hou, Q. Wei, Y. Xu y F. Chen. (2008). A ribosome inactivating protein (curcin2) from *Jatropha curcas* can reduce viral and fungal infection in transgenic tobacco. *Plant Growth Regulation*, 54, 115 – 123.
- Jankiewicz, L.S. (2003). Reguladores del Crecimiento, Desarrollo y Resistencia en Plantas Propiedades y Acción. Vol 1. México. Mundi Prensa. 483 p.
- Jha, T.B., P. Mukherjee, y M.M. Datta. (2007). Somatic Embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn, an Important Biofuel Plant. *Plant Biotechnology*, 1, 135-140.
- Jimmu, L., I.W. Nyakudya y C.A.T.Katsvanga. (2009). Establishment and Early Field Performance of *Jatropha curcas* L at Bindura University Farm, Zimbabwe. *Journal of Sustainable Development in Africa*, 10 (4), 445 – 469.
- Jongschaap, R.E.E., 2008. State of the art on breeding and genetic improvement of *Jatropha curcas* L. *Plant Research International Wageningen*. [Online] (Actualizado 7 de Diciembre de 2008)
 Consultado en: http://ec.europa.eu/research/agriculture/pdf/events/3jatropha_en.pdf

[Acceso 10 Julio 2009]

- Jongschaap, R.E.E., W.J., Corré, P.S. Bindraban y W.A. Brandenburg. (2007). Claims and Facts on *Jatropha curcas* L. Plant Research International Wageningen, 158, 1 – 42.
- Kaewpoo, M. y S. Te-chato. (2009). Influence of explant types and plant growth regulators on multiple shoot formation from *Jatropha curcas*. Science Asia, 35, 353 – 357.
- Kalimuthu, K., S. Paulsamy, R. Senthikulmar, y M. Sathya. (2007). *In vitro* Propagation of the Biodiesel Plant *Jatropha curcas* L. Plant Cell Tissue Culture and Biotechnology, 17 (2), 137-147.
- Kingsbury, K., 2007. After the Oil Crisis, a Food Crisis? Time Magazine. [Online] (Actualizado 16 Noviembre 2007).
 Disponible en: <http://www.time.com/time/business/article/0,8599,1684910,00.html>
 [Acceso 22 Julio 2009].
- Khurana-Kaul, K., S. Kachwaha y S.L. Kothari. (2010). Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response in thidiazuron and high copper contents in the medium. Biologia Plantarum, 54 (2), 369 – 372.
- Koprna, R., P. Nerusil, O. Kolovrat, V. Kucera y A. Khoutek. (2006). Estimation of Fatty Acid Content in Intact Seeds of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.) Lines using Near-Infrared Spectroscopy. Czech Journal of Genetic and Plant Breeding, 42 (4), 132 – 136.
- Kumar, S., S.Kumaria y T. Pramod. (2010). Efficient *In Vitro* Plant Regeneration Protocol from Leaf Explant of *Jatropha curcas* – A Promising Biofuel Plant. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 19 (2), 1 – 4.
- Kumar, N., S.N.D.V. Padimimarri, M. Kaur, G. Boricha y M.P. Reddy. (2008). Effects of NaCl on growth, ion accumulation, protein, proline contents and antioxidant enzymes activity in callus cultures of *Jatropha curcas*. Biologia, 63 (3), 378 – 382.
- Kumar, N. y M.P. Reddy. (2010). Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant. Annals of Applied Biology, 1, 1 – 9.
- Kumar, G.P., S.K. Yadav, S.K. Thawale, S.K. Singh y A.A. Juwarkar. (2008). Growth of *Jatropha curcas* on heavy metal contaminated soil amended with industrial wastes and *Azotobacter* – A greenhouse study. Bioresource Technology, 99, 2078 – 2082.

- Kureel, R.S. (2006). Prospects and Potential of *Jatropha Curcas* for Biodiesel Production, In: Biodiesel Conference Towards Energy Independence – Focus on *Jatropha*. Singh, B; Swaminathan, R y Ponraj, V. Rashtrapati Bhawan, New Dehli. pp. 43 – 74.
- Kywe, T.T. y M.M. Oo. (2009). Production of Biodiesel form *Jatropha* Oil (*Jatropha curcas*) in Pilot Plant. Proc. World Academy of Sciences, Engineering and Technology, 38, 481 – 487.
- Lakoh, K. y W.F. Peterson, 2008. Biodiesel Production: Focus on Palm Oil and *Jatropha*. Cornhusker Economics. Universidad de Lincoln Nebraska. [Online] (18 de Junio de 2008)
 Disponible en: <http://www.agecon.unl.edu/cornhuskereconomics.html>
 [20 de Marzo de 2010]
- Li, M., H. Li, H. Jinag, X. Pan y G. Wu. (2008). Establishment of an *Agrobacterium*-mediated Cotyledon Disc Transformation Method for *Jatropha curcas*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 92, 173 – 181.
- Little, E.L. Jr., R.O. Woodbury y F.H. Wadsworth. (1974). Trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. Agricultural Handbook. Vol 2. USDA, Washington, DC. 449p.
- Liu, H., Y.J. Liu, M.F. Yang y S.H. Shen. (2009). A Comparative Analysis of Embryo and Endosperm Proteome from Seeds of *Jatropha curcas*. Journal of Integrative Plant Biology, 1 – 8.
- Lopez-Hernández, D., L. Peñate-Alvariño, M. Daquinta-Gradaille, D. Piña-Morgado y M.L. Escalona-Morgado, 2008. Cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas*, L. (Euphorbiaceae). Resultados preliminares y estrategias futuras. [Online]
 Disponible en:
<http://www.cubasolar.cu/biblioteca/Ecosolar/Ecosolar21/HTML/articulo03.htm>
 [17 Julio 2009]
- Makkar, H.P.S., A.O. Aderibigbe y K. Becker. (1998). Comparative evaluation of non toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. Food Chemistry, 62 (2), 207 – 215.
- Mangkoedihardjo, S. (2008). *Jatropha curcas* L. for Phytoremediation of Lead and Cadmium polluted sites. World Applied Sciences Journal, 4 (4), 519 – 522.

- Mangkoedihardjo, S., R.Ratnawati y N. Alfanti. (2008). Phytoremediation of Hexavalent Chromium Polluted Soil Using *Pterocapus inidicus* and *Jatropha curcas* L. World of Applied Science Journal, 4 (3), 338 – 342.
- Márquez, D.A. y M.L. Campos. (2007). Storage and Pregerminatives treatments in *Jatropha curcas*: *in vivo* and *in vitro* germination. Fifth International Brazil-Japan Workshop on Biofuel, Environment and New Products from Biomass, 35, 1 – 7.
- Martinez-Herrera, J., A.L. Martinez-Ayala, H. Makkar, G. Francis y K. Becker. (2010). Agroclimatic Conditions, Chemical and Nutritional Characterization of Different Provenances of *Jatropha Curcas* L. from Mexico. European Journal of Scientific Research, 39 (3), 396 – 407.
- Martinez-Herrera, J., J. Siddhuraju, G. Francis, G. Dávila-Ortíz y K. Becker. (2006). Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. Food Chemistry, 96, 80 – 89.
- Martinez-Herrera, J., 2007. El Piñón Mexicano: una Alternativa Bioenergética para México. Revista Digital Universitaria. 8 (12): 1 – 10. [Online] (Actualizado Diciembre 2007) Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.8/num12/art88/int88.htm> [Acceso 8 Julio 2010].
- Martinez-Herrera, J; P. Siddhuraju, G. Francis, G. Dávila-Ortíz y K. Becker. (2006). Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. Food Chemistry, 96, 80 – 89.
- May, C.Y., M. Ngan, C.K. Weng, y Y. Basiron. (2005). Palm diesel: An option for greenhouse gas mitigation in the energy sector. Journal of Oil Palm Research, 17, 47 – 52.
- México Forestal, 2008. *Jatropha curcas*, el Motor del Bosque. Revista de la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). [Online] (Actualizado 20 Marzo 2008) Disponible en: http://www.mexicoforestal.gob.mx/nuestros_arboles.php?id=83 [Acceso 22 Mayo 2009].
- Milinsk, M.C., J.V. Visenteiner, C.A. Martin, A.A. Arias, M. Matsushita y N.E. De-Souza (2007). Proximate composition and fatty acid profile of Brazilian convencional and

- transgene soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivars. *EJEAFChe*, 6 (3), 1905 – 1911.
- Misra, P., N. Gupta, D.D. Toppo, V. Pandey, M.K. Mishra y R. Tuli. (2010). Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 100, 189 – 197.
- Mohd-Din, M., A. Rajanadu y B.S. Jalani. (2000). Performance of *Elais oleifera* from Panama, Costa Rica, Colombia, Honduras and Malaysia. *Journal of Oil Palm Research*, 12 (1), 71 – 80.
- Molina, M., C. Mena-Brito y R. Lacy-Tamayo. (2008). Aplicación del modelo de EBAMM para estimar el impacto ambiental y energético de la producción de bioetanol a partir de caña de azúcar en México desde la perspectiva de ciclo de vida. Centro Mario Molina para Estudios Estratégicos sobre Energía y Medio Ambiente, A.C. 1 – 10.
- Montes-Osorio, L., E.N. van Loo, R.E.E. Jongschaap, R.G.F. Visser y C. Azurdia, 2008. Global *Jatropha curcas* genetic diversity study and its application in breeding programs. *Plant Research International Wageningen*. [Online] (Actualizado el 10 de Junio de 2008)
 Disponible en: <http://www.pri.wur.nl/NR/rdonlyres/90AF26A1-47D5-4F2F-9E96-D413C2933685/70161/JatrophaWorld2008Global.pdf>
 [29 Julio 2009].
- Morales, R., 2009. Impulsa CONAFOR cultivo de *Jatropha* en Veracruz para biocombustible. *Imagen del Golfo*. [Online] (Actualizado el 21 de Enero de 2010)
 Disponible en: <http://www.imagendelgolfo.com.mx/resumen.php?id=87776>
 [22 Julio 2009].
- Nakashini, N., 2008. *Jatropha* shines as a non-food oil for biodiesel. *Reuters*. [Online] (Actualizado el 14 de Enero de 2008)
 Disponible en: <http://www.reuters.com/article/idUSHKG28600520080115>
 [Acceso 22 Marzo 2010].
- Padimarri, D.N.V.S., S. Singh, S.G. Mastan, J. Patel, J y M.P. Reddy. (2009). Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. *Molecular Biology Reports*, 36, 1357 – 1364.

- Perea, E., 2009. Sacan la *Jatropha* del olvido para producir biodiesel. Imagen Agropecuaria. [Online] (Acutlizado el 23 de Febrero de 2009)
 Disponible en:
http://www.imagenagropecuaria.com/articulos.php?id_art=669&id_sec=20
 [Acceso 20 Julio 2009].
- Pérez, M., 2010. México y Brasil aumentarán nexos en investigaciones de biocombustibles. La Jornada. [Online] (Actualizado el 5 de Octubre de 2010)
 Disponible en:
<http://www.jornada.unam.mx/2010/10/05/index.php?section=sociedad&article=038n2soc>
 [Acceso 26 Octubre 2010]
- Pérez, E.M., R. Ramírez-Malagón, H.G. Núñez-Palenius, y N. Ochoa-Alejo. (1999). Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 149 p.
- Perrin, Y., P. Dumas, L. Lardet y M.P Carron. (1999). Endogenous Cytokinins as Biochemical markers of Rubber-Tree (*Hevea brasiliensis*) Clone Rejuvenation. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 47, 239 – 245.
- Prabakaran, A.J. y M. Sujatha. (1999). *Jatropha tanjorensis* Ellis & Saroja, a Natural Interspecific Hybrid Occurring in Tamil Nadu, India. Genetic Resources and Crop Development, 46, 213 – 218.
- Purkayastha, J., T. Sugla, A. Paul, S.K. Solleti, P. Mazumdar, A. Basu, A. Mohommad, Z. Ahmed y L. Sahoo. (2010). Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. Biologia Plantarum, 54 (1), 13 – 20.
- Rajore, S. y A. Batra. (2005). Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. Plant Biochemistry and Biotechnology, 10, 73 – 75.
- Raju, A.J.S. y V. Ezradanam. (2007). Pollination ecology and fruiting behavior in a monoecious species, *Jatropha curcas* L (*Euphorbiaceae*). Current Science, 83 (11), 1395 – 1398.
- Rosenberg, C., 2009. Toxic *Jatropha* shrub fuels Mexico's biodiesel push. Reuters. [Online] (Actualizado 11 Marzo 2009).
 Disponible en:

http://www.reuters.com/article/idUSTRE52A0JB20090311?loomia_ow=t0:s0:a49:g43:r1:c1.000000:b30354696:z0

[Acceso 23 Julio 2010].

Salisbury, F.B. y C.W. Ross. (1992). *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company Inc. Belmont. 623 p.

Secretaría de Desarrollo Económico (Sedeco). 2010. Promueven plantación de *Jatropha curcas* en el estado de Michoacán. [Online] (Actualizado 20 de Enero 2010)

Disponible en:

http://sedeco.michoacan.gob.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=204&Itemid=171

[Acceso 7 Julio 2010].

Shrivastava, S. y M. Banerjee. (2008). *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Influence of additives. *International Journal of Integrative Biology*, 3 (1), 73 – 79.

Soontornchainaksaeng, P. y T. Jenjittikul. (2003). Karyology of *Jatropha* (Euphorbiaceae) in Thailand. *Thailand Forestry Bulletin (BOT)*, 31, 105 – 112.

Sotolongo-Pérez, J.A., P.A. Beatón-Delgado, A. Díaz-García, S. Montes-de-Oca-López, Y. Del-Valle-Atala y S. García-Pavón, 2008. Potencialidades energéticas y medioambientales del árbol *Jatropha curcas* L en las condiciones edafoclimáticas de la región semiárida de la provincia de Guantánamo. [Online]

Disponible en:

<http://www.cubasolar.cu/biblioteca/Ecosolar/Ecosolar18/HTML/articulo04.htm>

[Acceso 18 Julio 2009]

Sujatha, M., H.P.S. Makkar, y K. Becker. (2005). Shoot Bud Proliferation from Axillary Nodes and Leaf Sections of non toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regulators*, 47, 83 – 90.

Sujatha, M. y N. Mukta. (1996). Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 44, 135 – 141.

Sun, Q.B., F.L. Li, Y. Li, G.J. Wu, y X.J. Ge. (2008). SSR and AFLP Markers Reveal Low Genetic Diversity in the Biofuel Plant *Jatropha curcas* in China. *Crop Science*, 48, 1865 – 1871.

- Tang, M., J. Sun, Y. Liu, F. Chen y S. Shen. (2007). Isolation and functional characterization of the JcERF gene, a putative AP2/EREBP domain-containing transcription factor, in the woody oil plant *Jatropha curcas*. *Plant Molecular Biology*, 63, 419 – 428.
- Thepsamran, N., C. Thepsithar y A. Thongpukdee. (2006). *In vitro* multiple shoot induction of physic nut (*Jatropha curcas*). Department of Biology Silpakorn University Tahiland. 1 – 4.
- Thompson, G.A., K.J. Einspahr, S. Ho-Cho, T.C. Peeler y M.B Stephenson. (1989). Metabolic responses of plant cells to stress en *Biological role of plants lipids*. Gruz, P.A. y T. Kremmer (ed). Plenum Press. New York & London. 497 – 504 p.
- Torres, C.A., 2007. Ficha técnica de *Jatropha curcas*. Cultivos energéticos SRL & Cooperativa El Rosario Ltda. [Online] (Actualizado Mayo 2007)
 Disponible en:
http://www.elsitioagrícola.com/articulos/cultivosEnergéticos/JatrophaCurcas_FichaTécnica.pdf
 [Acceso 18 Mayo 2009]
- Trivedi, T., H. Gaudani, M. Gupta, N. Gupta, P. Patil, G. Gupta, V.K. Krishna y M.P. Reddy. (2009). Establishment of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Jatropha curcas* L. *International Journal of Agricultural Sciences*, 1 (2), 11 – 20.
- Valle-Gough, R.E. (2009). Morfogénesis *in vitro* de diferentes variedades de Tsikil-Té (*Jatropha curcas* L). Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Mérida. 53 p.
- Varshney, A. y T.S. Johnson. (2010). Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant. *Plant Biotechnology*. 4, 139 – 148.
- Volckaert, V., 2009. *Jatropha curcas*: beyond the myth of the miracle crop. D1 Olis pub. [Online] (Actualizado el 18 de Marzo de 2009)
 Disponible en: <http://www.ascension-publishing.com/BIZ/4ABVolckaert.pdf>
 [Acceso 20 Julio 2009]
- Wang, R., S. Yang, S. Yin, B. Song, P.S. Bhadury, W. Xue, S. Tao, Z. Jia, D. Liu y L. Gao. (2008). Development of solid base catalyst X/Y/MgO/g-Al₂O₃ for optimization of preparation of biodiesel from *Jatropha curcas* L. seed oil. *Frontiers of Chemical Engineering in China*, 2 (4) 468 – 472.

- Watt, J.M. y M.G. Breyer-Brandwijk. (1962). The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa. Segunda edición. E. & S. Livingstone Ltd. Edinburgh. 1457 p.
- Wei, Q., W.D. Lu, Y. Liao, S.H. Pan, Y. Xu, L. Tang y F. Chen. (2004). Plant Regeneration from Epicotyl Explant form *Jatropha curcas*. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 30 (4), 475 – 478.
- White, A., 2009. *Jatropha* plants. [Online] (Actualizado 17 de Junio de 2009). Disponible en: <http://www.andrewwhyte.com/jatropha-plants.htm> [Acceso 10 Julio 2009].
- Zhao, J.F; Song, W.L; Cheng, J y Zhang, C.X. (2009). Heterologous expression of a hydrogenase gene in *Enterobacter aerogenes* to enhance hydrogen gas production. W. J. Microbiology and Biotechnology, 1, 2 – 5.

CAPÍTULO I. GERMINACIÓN DE EMBRIONES CIGÓTICOS IN VITRO E

INDUCCIÓN DE EMBRIONES DE JAVALINA CARNIC.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha observado un aumento en la demanda de carne de cerdo en el mundo. Este aumento se debe a varios factores, entre ellos, el crecimiento de la población mundial y el aumento de la demanda de carne de cerdo en los países en desarrollo. En este contexto, la producción de carne de cerdo se ha convertido en una actividad económica importante para muchos países.

En la producción de carne de cerdo, la reproducción es un factor clave. En los últimos años, se ha observado un aumento en la demanda de carne de cerdo en el mundo. Este aumento se debe a varios factores, entre ellos, el crecimiento de la población mundial y el aumento de la demanda de carne de cerdo en los países en desarrollo. En este contexto, la producción de carne de cerdo se ha convertido en una actividad económica importante para muchos países.

En la producción de carne de cerdo, la reproducción es un factor clave. En los últimos años, se ha observado un aumento en la demanda de carne de cerdo en el mundo. Este aumento se debe a varios factores, entre ellos, el crecimiento de la población mundial y el aumento de la demanda de carne de cerdo en los países en desarrollo. En este contexto, la producción de carne de cerdo se ha convertido en una actividad económica importante para muchos países.

En la producción de carne de cerdo, la reproducción es un factor clave. En los últimos años, se ha observado un aumento en la demanda de carne de cerdo en el mundo. Este aumento se debe a varios factores, entre ellos, el crecimiento de la población mundial y el aumento de la demanda de carne de cerdo en los países en desarrollo. En este contexto, la producción de carne de cerdo se ha convertido en una actividad económica importante para muchos países.

CAPITULO II. GERMINACIÓN DE EMBRIONES CIGÓTICOS *in vitro* E INDUCCIÓN DE BROTES DE *Jatropha curcas*.

2.1 INTRODUCCIÓN

En *Jatropha curcas* existen pocos estudios donde se evalúe la germinación. Estudios realizados en cuanto a viabilidad se refiere realizados por Achten *et al.*, (2010) menciona que las semillas producidas autopolinización presentan una baja viabilidad comparadas con aquellas que se producen por polinización abierta.

En lo que a germinación *in vitro* se refiere, en un primer estudio se evaluaron factores físicos como: luz, humedad y temperatura (Márquez y Campos, 2007). Posteriormente se varió la concentración iónica del medio de cultivo (López-Hernández *et al.*, 2008). En ninguno estos estudios se evaluó el efecto del ácido giberélico (AG₃), el cual en otras especies ha mostrado ser beneficioso en la germinación (George *et al.*, 2008).

En lo referente a la formación de brotes vía meristemas, se han realizado varios estudios donde evaluaron diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en genotipos de India y China (Kaewpoo y Te-chato, 2009; Shrivastava y Banerjee, 2008; Datta *et al.*, 2007; Kalimuthu *et al.*, 2007; Thepsharam *et al.*, 2006; Rajore y Batra, 2005). A pesar de que estudios anteriores han mostrado resultados positivos al combinar varios reguladores, estudios realizados en genotipos de México (Sujatha *et al.*, 2005) y de India (Purkayastha *et al.*, 2010) presentan formación de brotes en presencia de un solo regulador.

Con los antecedentes anteriores en esta fase experimental se establecieron las condiciones de germinación de embriones cigóticos variando la composición del medio de cultivo y adicionando diferentes concentraciones de AG₃ para obtener el material base para estos estudios. De manera similar se evaluaron diferentes concentraciones de citocininas, (Benciladenina (BAP) y Tidiazurón (TDZ)), de forma individual para observar el efecto en la inducción de brotes.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 FUENTE DE MATERIAL VEGETAL

Para el presente estudio se utilizaron semillas procedentes recolectadas en el municipio de Tizimín en el estado de Yucatán. Los materiales utilizados son de genotipos no tóxicos identificados por los pobladores de la región, que utilizan las semillas como golosinas (comunicación personal).

Estos materiales fueron sembrados y cosechados en las instalaciones del CICY (Figura 2.1).

Las semillas se utilizaron como material base para diferentes procesos tales como: germinación, producción de brotes múltiples y en la inducción de diferentes procesos como es la organogénesis y embriogénesis somática.



Figura 2.1 Plantas cultivadas de *Jatropha curcas*: A) Plantas de *Jatropha curcas* cultivadas en campo y B) Planta de *Jatropha curcas* con frutos y semillas.

2.2.2 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

Las semillas de *Jatropha curcas* se sumergieron en agua destilada por 24 h para suavizar la testa, posteriormente se ejerció presión con pinzas para obtener el endospermo.

Una vez que se removió la testa y se obtuvo el endospermo se procedió a la asepsia en área estéril, las semillas sin testa se lavaron con etanol al 80% por 5 min, enjuagando 3 veces con agua destilada estéril, posteriormente se procedió a un lavado con hipoclorito de sodio comercial al 30% por 15 min, enjuagando 5 veces con agua destilada estéril.

2.2.3 AISLAMIENTO Y GERMINACIÓN DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE

Jatropha curcas

Para obtener los embriones cigóticos se hizo un corte longitudinal con bisturí, posteriormente se removió el embrión cigótico y se colocó de manera vertical en medio de cultivo MS suplementado con 30 g/l de sacarosa, 2.2 g/l de Gelrite. Los ensayos de germinación se hicieron en medio MS a la mitad de su concentración, a su concentración completa la cual se utilizó como testigo y adicionando 1.15 y 2.3 μM de ácido giberélico (AG_3). El pH se ajustó a 5.7 ± 1 con hidróxido de potasio (KOH) y ácido clorhídrico (HCl). Los embriones se colocaron en frascos de cultivo de vidrio con 20 ml de medio de cultivo y se incubaron en oscuridad continua por 10 días a 25 ± 1 °C. Una vez concluidos los días de incubación las plántulas se transfirieron a condiciones de fotoperiodo de 16 h luz por 5 días, para posteriormente ser transferidos a frascos de vidrio con 40 ml de medio de cultivo MS sin AG_3 .

Se realizaron 10 repeticiones donde se utilizaron 10 embriones cigóticos en cada repetición, con un total de 100 embriones cigóticos en un modelo completamente al azar.

2.2.4 INDUCCIÓN DE BROTES CON BAP Y TDZ

Se tomaron nudos con yemas axilares de plántulas cigóticas desarrolladas *in vitro* las cuales se cultivaron en 20 ml de medio MS adicionando de manera individual diferentes reguladores de crecimiento para inducir el desarrollo de yemas de *J. curcas* (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1 Tratamientos utilizados en la inducción de brotes de *J. curcas* a partir de nudos con yemas axilares.

| Reguladores | Concentraciones (μM) |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| Benciladenina (BAP) | 0 |
| | 5.5 |
| | 6.6 |
| | 7.7 |
| Tidiazurón (TDZ) | 0 |
| | 3.4 |
| | 4.5 |
| | 5.5 |

Los nudos que presentaban yemas axilares se cultivaron de manera horizontal sobre el medio; para cada uno de los tratamientos para producción de brotes múltiples se hicieron subcultivos cada cuatro semanas en el mismo tratamiento del que procedieron bajo condiciones de fotoperiodo de 16 h a una temperatura de 25 ± 1 °C.

2.2.5 EVALUACIÓN DE VARIABLES DE RESPUESTA

Para la germinación de embriones cigóticos de *J. curcas* las variables que se midieron fueron el tiempo de germinación y la frecuencia de germinación de cada tratamiento expresada en porcentaje.

En la inducción de brotes múltiples las variables que se midieron fue el porcentaje de respuesta en cada uno de los tratamientos, el número de brotes formados por explante, la longitud del tallo en los brotes formados y el tiempo de respuesta de los mismos.

Los resultados obtenidos se sometieron a un Análisis de Varianza (ANOVA) para detectar diferencias estadísticas entre medias mediante el método de Tukey con un nivel de confianza de 95%.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE *Jatropha curcas*

Los embriones cigóticos de *J. curcas* en los diferentes tratamientos mostraron desarrollo en todos los medios de germinación. Los mejores resultados, en tiempo y frecuencia de germinación, se dieron en medios donde se redujo la concentración del medio MS a la mitad de su fuerza iónica y cuando se adicionó AG_3 (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2 Respuesta de embriones cigóticos de *J. curcas* en diferentes medios de germinación con 10 días de incubación.

| Medio de germinación | Respuesta* (%) | Tiempo para alcanzar el máximo (días) |
|----------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| ½ MS | 67 ± 15 ^{ab} | 5 |
| MS | 40 ± 14 ^b | 9 |
| 1.15 µM AG_3 | 77 ± 6.5 ^a | 5 |
| 2.3 µM AG_3 | 87 ± 2.1 ^a | 5 |

*Promedio ± E.S. (n = 10 repeticiones p ≤ 0.05). Letras distintas indican diferencias estadísticas.

Las plántulas con cuatro semanas de cultivo formaron el primer par de hojas verdaderas (Figura 2.2 A), al transcurrir las ocho semanas de cultivo se pudo observar la expansión de estas hojas (Figura 2.2 B) después de dieciséis semanas de cultivo se obtuvieron plántulas con hasta cuatro pares de hojas verdaderas (Figura 2.2 C).

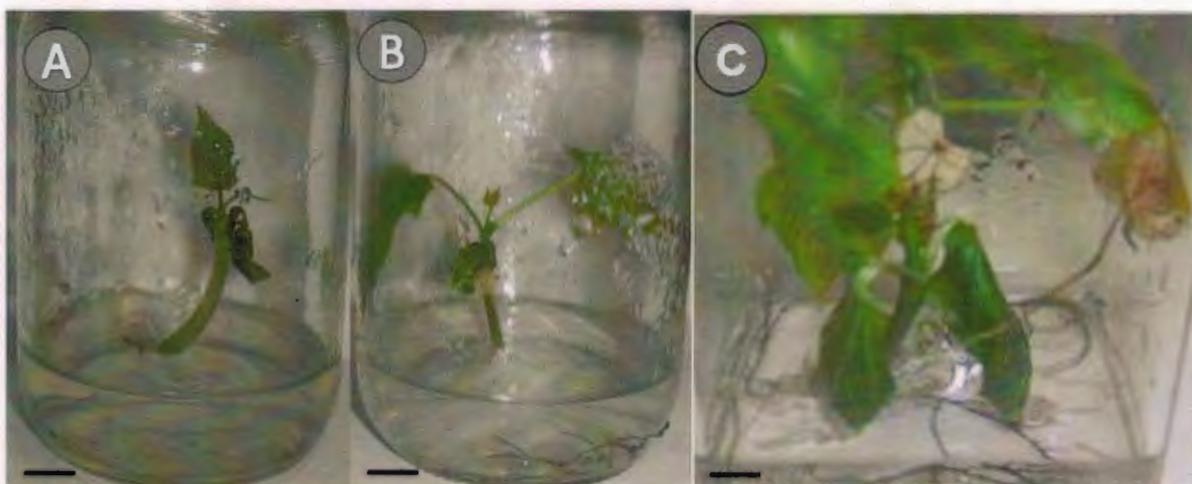


Figura 2.2 Plántulas de *Jatropha curcas* desarrolladas *in vitro* con: A) 4 semanas de cultivo y B) 8 semanas de cultivo y C) 16 semanas de cultivo. Barra: 1 cm de longitud.

La respuesta obtenida con medio MS a la mitad de su fuerza iónica puede deberse a diferentes factores una es la cantidad de nitratos en el medio MS, ya que en otras especies se ha estudiado que una cantidad reducida de nitratos es necesaria para el desarrollo de embriones cigóticos (George *et al.*, 2008). Estos resultados coinciden con lo observado estudios anteriores con genotipos de Cuba donde al disminuir la concentración de sales del medio MS se incrementó la germinación de semillas de esta especie (López-Hernández *et al.*, 2008).

Estos ensayos germinativos efectuados en embriones cigóticos se realizaron por que la viabilidad de semillas se reduce por diferentes razones: por efectos de depresión consanguínea en semillas producto de la autopolinización (Achte *et al.*, 2010; Raju y Ezradanam, 2007)) y la condiciones de almacenaje a 4 °C reducen en un 50 % la viabilidad en periodos menores a un año (Marqués y Campos, 2007)). Por estas razones es que se procedió al rescate de embriones de esta planta para los ensayos *in vitro*.

El procedimiento de asepsia reportado en este trabajo difiere de los anteriores trabajos de la literatura al no utilizar bactericidas, fungicidas y cloruro de mercurio (HgCl₂) (Purkayastha *et al.*, 2010; Deore y Johnson, 2008; Li *et al.*, 2008; Datta *et al.*, 2007; Kalimuthu *et al.*, 2007) en este trabajo solo se uso etanol y cloro comercial.

El porcentaje de germinación de los embriones cigóticos de *J. curcas* en medio adicionado con 2.3 μM AG₃ fue de 87% ± 2.1 el cual presenta una mejora a estudios anteriores donde se obtuvo un 77% ± 6.5 de germinación en medio con 1.15 μM AG₃ (Valle-Gough, 2009).

Resultados anteriores muestran que en medio con ½MS se obtiene hasta un 75% (López-Hernández *et al.*, 2008) u 80% (Marqués y Campos, 2007) de germinación pero con un porcentaje de contaminación del 45%.y 90% respectivamente.

2.3.2 INDUCCIÓN DE BROTES A PARTIR DE NUDOS CON YEMAS AXILARES

Las nudos de *J. curcas* de plántulas obtenidas *in vitro* se sometieron a diferentes tratamientos para la inducción de brotes como se muestra en el Cuadro 2.3.

Cuadro 2.3 Respuesta de nudos con yemas axilares de *J. curcas* en tratamientos con diferentes concentraciones de BAP.

| Tratamientos con BAP (μM) | No. de brotes/ Explante* | Respuesta (%) | Largo de tallo (cm)* |
|---|-----------------------------|------------------|-------------------------|
| 0 | SR | SR | SR |
| 5.5 | 5.6 ± 0.69^a | 100 | 0.53 ± 0.04^b |
| 6.6 | 6.1 ± 0.29^a | 100 | 1.11 ± 0.09^a |
| 7.7 | 6.0 ± 0.40^a | 100 | 0.63 ± 0.05^b |

*Promedio \pm E.S. SR: sin respuesta. (n = 10 repeticiones. $p \leq 0.05$). Letras distintas indican diferencias estadísticas.

En todos los medios la formación de brotes se observó a las dos semanas (Figura 2.3 A, 2.3 D y 2.3 G), a las cuatro semanas se observaron brotes de mayor tamaño (Figura 2.3 B, 2.3 E y 2.3 F). Finalmente a las ocho semanas de cultivo los brotes aumentaron tanto en número como en tamaño, el cual se midió en todos los explantes como un indicativo del grado de desarrollo de los brotes (Figura 2.3 C, 2.3 F y 2.3 I).

Durante este tiempo los explantes en los tratamientos con 6.6 μM de BAP tuvieron un mayor número de brotes con un mayor desarrollo a las ocho semanas esto reflejado en la longitud de los brotes y en que los brotes derivados de este tratamiento presentaban un tallo mas grueso con hojas mas anchas (Figura 2.3 F).

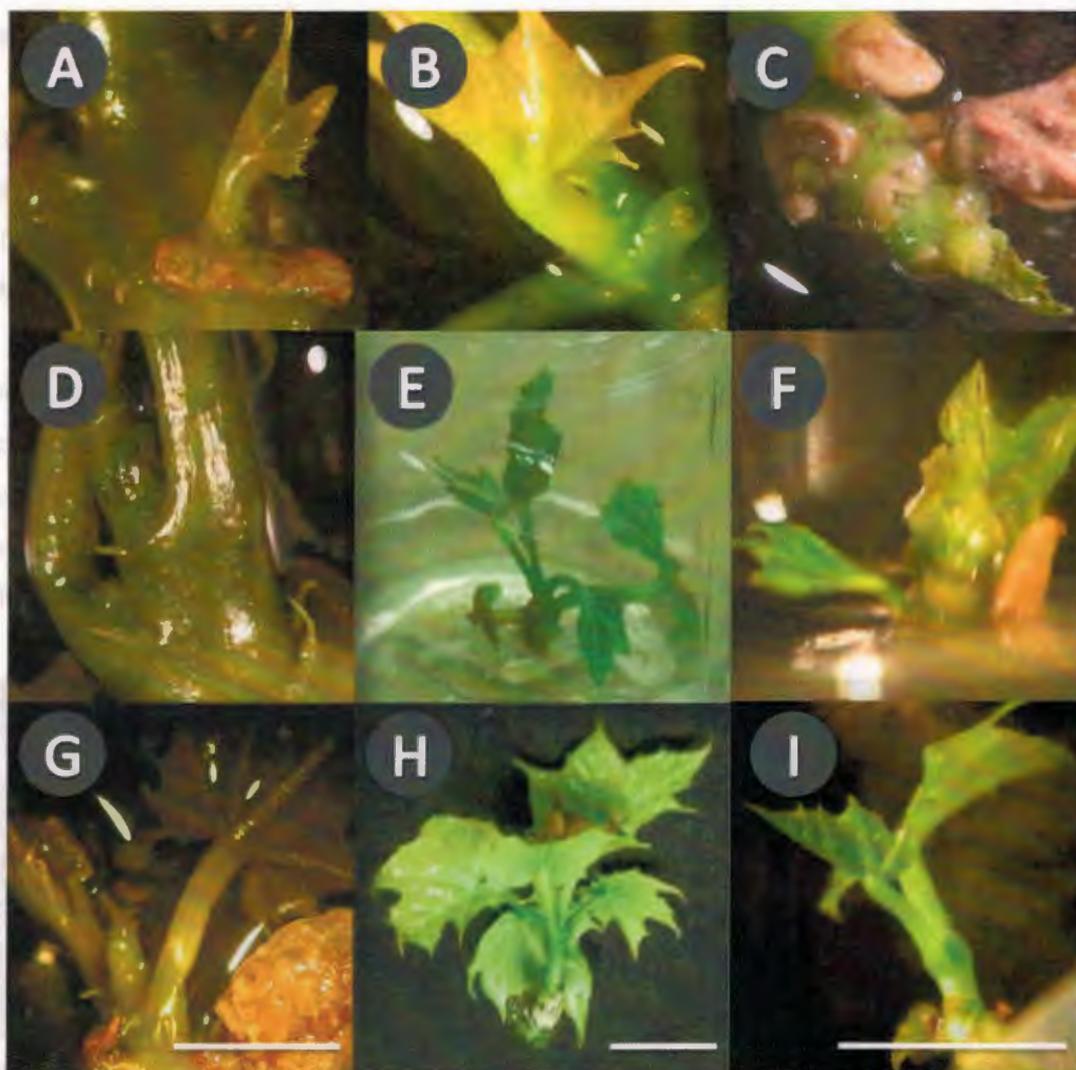


Figura 2.3 Respuesta de yemas axilares en nudos de *J. curcas* con 5.5 μM BAP: A) 2 semanas B) 4 semanas y C) 8 semanas. Yemas axilares con 6.6 μM BAP: D) 2 semanas, E) 4 semanas y F) 8 semanas. Yemas con axilares con 7.7 μM BAP: G) 2 semanas, H) 4 semanas e I) 8 semanas. Barra: 1 cm medido a las 8 semanas de cultivo.

El efecto inductor de la BAP se ha estudiado anteriormente, los resultados obtenidos son similares a estudios recientes (Purkayastha *et al.*, 2010; Sujatha *et al.*, 2005) con la diferencia en que nuestro reporte no se varía la cantidad de BAP en cada resiembra lo que permite observar el efecto de este regulador a lo largo del tiempo.

Estudios realizados en esta especie donde se utilizan combinaciones de BAP con otros reguladores de crecimiento han arrojado resultados menores en genotipos de Tailandia

(Rajore y Batra, 2005) o con porcentajes de inducción menores a los aquí reportados (Kaewpoo y Te-chato, 2009; Valle-Gough, 2009; Thepsharam *et al.*, 2006).

La diferencia entre porcentajes de inducción se puede deber a la procedencia del explante, estudios recientes comparan explantes de campo contra explantes de plantas *in vitro* y muestran que estos últimos presentan un mayor porcentaje de respuesta (Kumar y Reddy, 2010; Purkayastha *et al.*, 2010; Kaewpoo y Te-chato, 2009) esto debido al estado fisiológico previo de la planta (George *et al.*, 2008; Hartmann y Kester, 2001).

Una respuesta importante a las ocho semanas de cultivo fue que los tratamientos mostraron organogénesis directa en la base de los explantes donde se realizó el corte (Figura 2.4 A, 2.4 B y 2.4 C). Este tipo de respuesta no se había observado antes en tratamientos de donde se partía de meristemos axilares en presencia de este tipo de regulador adicionado de manera individual (Valle-Gough, 2009; Datta *et al.*, 2007; Sujatha *et al.*, 2005).



Figura 2.4 Organogénesis directa de *J. curcas* en la base de nudos con yemas axilares en medio MS adicionado con A) 5.5 μM BAP, B) 6.6 μM BAP y C) 7.7 μM de BAP.

Se trataron nudos con yemas axilares de *J. curcas* con diferentes concentraciones de TDZ como se muestra en el Cuadro 2.4.

Cuadro 2.4 Respuesta de nudos con yemas axilares de *J. curcas* en tratamientos con diferentes concentraciones de TDZ.

| Tratamientos con TDZ (μM) | No. de brotes/ Explante* | Respuesta (%) | Largo de tallo (cm)* |
|---|-----------------------------|------------------|-------------------------------|
| 0 | SR | SR | SR |
| 3.4 | 8.1 \pm 0.69 ^a | 100 | 0.68 \pm 0.09 ^b |
| 4.5 | 7.6 \pm 0.31 ^a | 100 | 1.45 \pm 0.28 ^a |
| 5.5 | 6.4 \pm 0.44 ^a | 100 | 0.85 \pm 0.19 ^{ab} |

*Promedio \pm E.S. SR: sin respuesta (n = 10 repeticiones. $p \leq 0.05$). Letras distintas indican diferencias estadísticas.

Durante la primera semana de cultivo se observó la formación de callo en la base de las yemas axilares, en estos tratamientos se observó el aumento en el diámetro de los explantes y un cambio en la coloración incrementando la intensidad. Al cumplirse dos semanas de cultivo se observó la formación inicial de brotes en todos los tratamientos (Figura 2.5 A, 2.5 B y 2.5 C).

A las cuatro semanas de cultivo los brotes inducidos en TDZ mostraron un aumento en el número de brotes en cada uno de los tratamientos (Figura 2.5 D, 2.5 E y 2.5 F). Los tratamientos con 4.5 μM de TDZ mostraron un mayor tamaño al ser comparados con los otros tratamientos con TDZ (Figura 2.5 E).

Al cumplirse ocho semanas de cultivo se observó que los brotes obtenidos con 4.5 μM TDZ mostraron hojas mas grandes y tallos mas gruesos (Figura 2.5 H) al compararse con otros explantes (Figura 2.5 G, y 2.5 I).

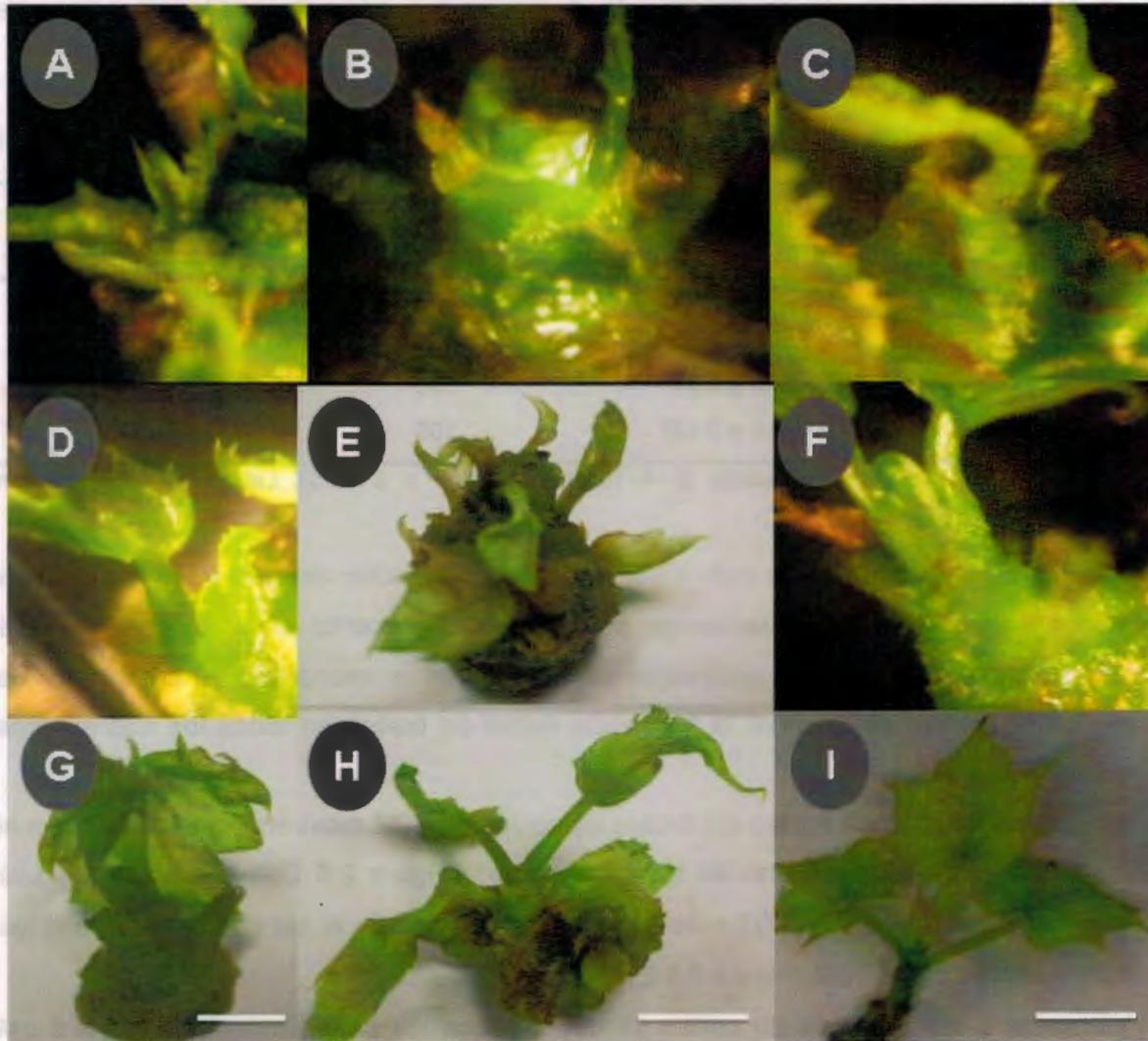


Figura 2.5 Formación inicial de brotes de *J. curcas* inducidos en presencia de TDZ con 2 semanas de cultivo: A) 3.4 μM TDZ, B) 4.5 μM TDZ y C) 5.5 μM TDZ. Formación de brotes a las 4 semanas de cultivo en: D) 3.4 μM TDZ, E) 4.5 μM TDZ y F) 5.5 μM TDZ. Brotes desarrollados con 8 semanas de cultivo G) 3.4 μM TDZ, H) 4.5 μM TDZ e I) 5.5 μM TDZ. Barra: 1 cm medida a las 48 semanas de cultivo.

En esta especie se ha inducido la formación de brotes con TDZ de manera individual (Sujatha *et al.*, 2005). Sin embargo, el efecto de este regulador no se evaluó por completo ya que se efectuaron subcultivos en medios con BAP obteniendo un número mayor de brotes que los aquí reportados.

En estudios mas recientes mencionan que la adición de TDZ a yemas axilares no tiene un efecto inductivo al ser combinado con otros reguladores de crecimiento (Datta *et al.*, 2007). Lo que sugiere que el genotipo estarían jugando un papel importante en la respuesta de esta especie a este regulador debido a que en este trabajo y en el estudio de Sujatha *et al.*, (2005) se obtienen respuestas positivas ante este regulador con genotipos de México.

Los resultados de este estudio con BAP y TDZ, no difieren substancialmente de otras metodologías de proliferación de brotes sin embargo, los resultados obtenidos igualan a estudios recientes en cuanto a inducción de brotes (Purkayastha *et al.*, 2010; Sujatha *et al.*, 2005) y mejoran el porcentaje de respuesta de estudios previos (Kaewpoo y Te-chato, 2009; Valle-Gough, 2009; Thepsharam *et al.*, 2006).

Se pudo observar que los tratamientos con TDZ tuvieron una respuesta dos veces más rápida que los tratamientos con BAP ya que los brotes obtenidos con este regulador se pudieron contabilizar hasta las ocho semanas de cultivo.

La metodología aquí reportada para la inducción de brotes hace uso de un solo tipo de regulador (BAP o TDZ) con un alto porcentaje de inducción. Esto hace más sencillo el manejo e instauración de esta metodología.

2.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achten, W.M.J., L.R. Nielsen, R. Aert, A.G. Lengkeek, E.D. Kjaer, A. Trabucco, J.K. Hansen, W. Maes, L. Graudal, F.K. Akinnifesi y B. Myus. (2010). Towards domestication of *Jatropha curcas*. *Biofuels*, 1 (1), 91 – 107.
- Datta, M.M., P. Mukherjee, B. Ghosh y T.B. Jha. (2007). *In vitro* Clonal Propagation of Biodiesel Plant (*Jatropha curcas* L.). *Current Science*, 93 (10), 1438-1442.
- Deore, A. y S. Johnson. (2008). High frequency plant regeneration of leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports*, 2, 7 – 11.
- George, E.F., M.A. Hall y G.J. De-Klerk. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. 1 The Background. Springer. Tercera edición. Holanda. 477 p.
- Hartmann, H.T. y D.E. Kester. (2001). *Propagación de plantas, Principios y Prácticas*. Compañía Editorial Continental. Octava Reimpresión. México. 880 p.
- Jha, T.B., P. Mukherjee y M.M. Datta. (2007). Somatic Embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn, an Important Biofuel Plant. *Plant Biotechnology Reports*, 1, 135-140.
- Kaewpoo, M. y S. Te-chato. (2009). Influence of explant types and plant growth regulators on multiple shoot formation from *Jatropha curcas*. *Science Asia*, 35, 353 – 357.
- Kalimuthu, K., S. Paulsamy, R. Senthikulmar y M. Sathya. (2007). *In vitro* Propagation of the Biodiesel Plant *Jatropha curcas* L. *Plant Cell Tissue Culture and Biotechnology*, 17 (2), 137-147.
- Li, M., H. Li, H. Jinag, X. Pan y G. Wu. (2008). Establishment of an *Agrobacterium*-mediated Cotyledon Disc Transformation Method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 92, 173 – 181.
- Lopez-Hernández, D., L. Peñate-Alvariño, M. Daquinta-Gradaille, D. Piña-Morgado y M.L. Escalona-Morgado, 2008. Cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas*, L. (Euphorbiaceae). Resultados preliminares y estrategias futuras. [Online]. Disponible en: <http://www.cubasolar.cu/biblioteca/Eccosolar/Ecosolar2.1/HTML/articulo03.htm> [17 Julio 2009]
- Márquez, D.A. y M.L. Campos. (2007). Storage and Pregerminatives treatments in *Jatropha curcas*: *in vivo* and *in vitro* germination. Fifth International Brazil-Japan Workshop on Biofuel, Environment and New Products from Biomass, 35, 1 – 7.

- Purkayastha, J., T. Sugla, A. Paul, S.K. Solleti, P. Mazumdar, A. Basu, A. Mohommad, Z. Ahmed y L. Sahoo. (2010). Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. *Biologia Plantarum*, 54 (1), 13 – 20.
- Rajore, S. y A. Batra. (2005). Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. *Plant Biochemistry and Biotechnology*, 10, 73 – 75.
- Raju, A.J.S. y V. Ezradanam. (2007). Pollination ecology and fruiting behavior in a monoecious species, *Jatropha curcas* L (*Euphorbiaceae*). *Current Science*, 83 (11), 1395 – 1398.
- Shrivastava, S. y M. Banerjee. (2008). *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Influence of additives. *International Journal of Integrative Biology*, 3 (1), 73 – 79.
- Sujatha, M., H.P.S. Makkar y K. Becker. (2005). Shoot Bud Proliferation from Axillary Nodes and Leaf Sections of non toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regulators*, 47, 83 – 90.
- Sujatha, M. y N. Mukta. (1996). Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 44, 135 – 141.
- Thepsamran, N., C. Thepsithar y A. Thongpukdee. (2006). *In vitro* multiple shoot induction of physic nut (*Jatropha curcas*). Department of Biology Silpakorn University. Tahiland. 1 – 4.
- Valle-Gough, R.E. (2009). Morfogénesis *in vitro* de diferentes variedades de Tsikil-Té (*Jatropha curcas* L). Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Mérida. 53 p.

CAPITULO III. ORGANOGÉNESIS Y EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE***Jatropha curcas*****3.1 INTRODUCCIÓN**

Procesos de organogénesis y embriogénesis somática se han efectuado en *J. curcas* para acelerar la mejora y para suplir la demanda futura de material vegetal con características deseables (Acthen *et al.*, 2010; Trivedi *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008).

Los procesos de organogénesis directa e indirecta se han inducido en explantes como: embriones cigóticos, hojas, peciolo, epicotilo y cotiledones. Los reguladores más utilizados han sido BAP de forma individual, en combinación con TDZ y diferentes auxinas (Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2010; Kumar y Reddy, 2010; Misra *et al.*, 2010; Varshney y Johnson, 2010, Valle-Gough, 2009; Deore y Johnson, 2008; Li *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2004).

Estudios donde se utiliza TDZ mencionan que este regulador tiene un efecto benéfico en la organogénesis, incrementando la frecuencia de este proceso e incluso siendo necesario para la inducción del mismo (Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2010; Deore y Johnson, 2008).

La embriogénesis somática directa se obtuvo por Kalimuthu *et al.*, (2007) utilizando BAP en cotiledones. En el mismo año un estudio realizado por Jha *et al.*, (2007) obtuvo embriogénesis somática indirecta con Kin en explantes hoja, la posterior disminución de la Kin y la adición de AIA produjo embriones somáticos en estados avanzados de desarrollo, con la posterior formación de embriones somáticos secundarios.

En otras especies la presencia de auxinas, especialmente el 2,4-D, son necesarias para la inducción de procesos de embriogénesis somática (George *et al.*, 2008; Hartmann y Kester, 2001).

En *J. curcas* hay pocos estudios donde se evalúe el efecto del 2,4-D. Lopez-Hernández *et al.*, 2008 reporta la formación de callo no morfogénico al utilizar 2,4-D de forma individual en hipocotilo, en ese mismo año Li *et al.*, 2008 publicó un estudio donde al utilizar concentraciones similares de BAP y 2,4-D en cotiledones los explantes no respondieron. Recientemente Misra *et al.*, 2010 reportan una organogénesis indirecta incipiente en tejido foliar utilizando 2,4-D y BAP este último a bajas concentraciones.

Tomando como base estudios previos de embriogénesis somática se utilizó Kin y BAP en concentraciones donde se obtuvo una mayor respuesta en este proceso. De manera

similar se propuso evaluar el sinergismo de estos reguladores con 2,4-D con diferentes concentraciones para la inducción de embriogénesis somática. De manera similar se utilizaron diferentes concentraciones de TDZ para evaluar el efecto de este regulador en la inducción de la organogénesis.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 EVALUACIÓN DE DIFERENTES EXPLANTES Y DIFERENTES REGULADORES SOBRE LA MORFOGÉNESIS *in vitro* DE *J. curcas*

Para la inducción morfogénica se tomaron 4 tipos de explantes: embriones cigóticos, cotiledones, tallos y hojas verdaderas de plántulas *in vitro*. Los embriones cigóticos se seccionaron en cuatro segmentos iguales los cuales se colocaron de manera horizontal sobre el medio de inducción. Los cotiledones y hojas se seccionaron en fragmentos de 1 cm² aproximadamente y se colocaron con la cara adaxial en contacto con el medio, en el caso de los tallos se seccionaron en fragmentos de 0.5 cm de largo colocándose de manera horizontal sobre el medio. Los explantes se sembraron en medio MS adicionado con auxinas y citocininas como se muestra en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1 Reguladores utilizados en la inducción de respuestas morfogénicas de *J. curcas* utilizando diferentes explantes.

| Medios morfogénicos | Reguladores de crecimiento (μM) | | | |
|------------------------|---|-------|-----|-----|
| | Kin | 2,4-D | BAP | TDZ |
| 1 | --- | --- | --- | --- |
| 2 | 9.3 | --- | --- | --- |
| 3 | 9.3 | 5.6 | --- | --- |
| 4 | 9.3 | 6.7 | --- | --- |
| 5 | 9.3 | 7.9 | --- | --- |
| 6 | --- | --- | 8.9 | --- |
| 7 | --- | 5.6 | 8.9 | --- |
| 8 | --- | 6.7 | 8.9 | --- |
| 9 | --- | 7.9 | 8.9 | --- |
| 10 | --- | --- | --- | 3.4 |
| 11 | --- | --- | --- | 4.4 |
| 12 | --- | --- | --- | 5.5 |

Los cultivos sometidos a diferentes tratamientos con los diferentes reguladores de crecimiento se subcultivaron cada cuatro semanas en el mismo medio de procedencia en condiciones de fotoperiodo de 16 h luz a una temperatura de 25 ± 1 °C.

Se colocaron un total de 30 explantes en frascos con 20 ml de medio de cultivo, a razón de 3 explantes por frasco con 10 repeticiones en un modelo completamente al azar.

3.2.2 ELONGACIÓN DE LOS BROTES FORMADOS

Los tejidos mostraron la proliferación de brotes u organogénesis directa e indirecta fueron sometidos a elongación en presencia de AG₃ en concentraciones de 0, 1.4, 2.8 y 4.2 μM en condiciones de fotoperiodo de 16 h luz y con resiembras cada cuatro semanas a una temperatura de 25 °C en la misma formulación de medio de elongación.

Se colocaron 60 explantes en frascos con 20 ml de medio, a razón de 3 explantes por frasco con 20 repeticiones en un modelo completamente al azar.

3.2.3 ENRAIZAMIENTO DE BROTES FORMADOS.

Los tratamientos de enraizamiento se efectuaron en medio MS a la mitad de su concentración, a su concentración completa y adicionado con 0.5 μM de ácido indolbutírico (AIB). Los subcultivos se realizaron cada cuatro semanas en el mismo medio de procedencia en condiciones de fotoperiodo de 16 h de luz y una temperatura de 25 ± 1 °C. Se colocaron 20 explantes en frascos con 20 ml de medio con un explante por frasco.

3.2.4 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

3.2.4.1 HISTOLOGÍA CON RESINAS PLÁSTICAS

Los tejidos donde se indujeron los diferentes procesos morfogénicos fueron analizadas como se describe a continuación. Las muestras se sumergieron durante 24-h en una solución de FAA (Anexos 1, Cuadro A 1.1) para que posteriormente se deshidrate el tejido en etanol como se muestra en la Cuadro 3.2.

Cuadro 3.2 Deshidratación de tejidos en etanol.

| Concentración de etanol (%) | Tiempo en vacío (min) | Tiempo sin vacío (min) |
|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 30 | 15 | 45 |
| 50 | 15 | 45 |
| 70 | 15 | 45 |
| 85 | 15 | 45 |
| 96 | 15 | 45 |
| 100 | 15 | 30 |
| 100 | 15 | 30 |
| 100 | 15 | 30 |

Una vez terminados los cambios la muestras de tejido se sumergieron en una solución de pre-preinfiltración por 24-h una vez transcurrido este tiempo estos tejidos se sumergieron en una solución de preinfiltración para la posterior inclusión de los tejidos en resinas plásticas (Anexos 1, Cuadro A 1.2).

Los tejidos se colocaron en una solución de inclusión y se colocaron en moldes vertiendo la solución sobre la muestra, seguido de esto, se colocaron adaptadores para microtomo procurando cubrir en su totalidad el adaptador. Las muestras se dejaron reposar por 72-h a temperatura ambiente para posteriormente desmontar y colocarlos en sílica por 5 días. Los cortes se realizaron en un microtomo de la marca Microm HM325 con cortes de 5 μm para posteriormente teñir los tejidos con Azul de Toluidina (Anexos 1, Tabla A 1.3).

3.3 EVALUACIÓN DE VARIABLES DE RESPUESTA

Las variables evaluadas en cada experimento fueron: tipo de respuesta, explantes que respondieron en cada tratamiento (%), número de brotes por explante, número de embriones somáticos formados por explante por tratamiento, longitud de los brotes, longitud de las raíces y tiempo de respuesta de los explantes en cada tratamiento.

Los datos recopilados fueron sometidos a un Análisis de Varianza (ANDEVA) para la detección de diferencias estadísticas. Se utilizó el método de Tukey con un nivel de confianza de 95 %, el software que se va utilizó para el análisis fue el SPSS No. 16.0.0.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 INDUCCIÓN DE LA MORFOGÉNESIS EN *Jatropha curcas*

3.4.1.1 EFECTO DE LA KIN Y 2,4-D SOBRE LA RESPUESTA DE DIFERENTES EXPLANTES

Los tratamientos adicionados con Kin de forma individual y en combinación con 2,4-D (Cuadro 3.3) mostraron a las cuatro semanas de cultivo la formación de callo en embriones cigóticos y en explantes de hoja, las características del callo variaron con la presencia de 2,4-D.

Cuadro 3.3 Respuesta a la formación de callos de diferentes tipos de explantes de *J. curcas* a 12 semanas de cultivo en presencia de Kin y 2,4-D.

| Tratamientos | Formación de callo (%) [*] | | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------|-------|---------------------------|
| | E.C | Cotiledón | Tallo | Hoja |
| Testigo | SR | SR | SR | SR |
| 9.3 μ M Kin | 100 ^a | SR | SR | 30 \pm 15 ^b |
| 9.3 μ M Kin + 5.6 μ M 2,4-D | 76 \pm 11 ^{ab} | SR | SR | 60 \pm 14 ^b |
| 9.3 μ M Kin + 6.7 μ M 2,4-D | 60 \pm 12 ^b | SR | SR | 70 \pm 10 ^{ab} |
| 9.3 μ M Kin + 7.9 μ M 2,4-D | 66 \pm 11 ^{ab} | SR | SR | 100 ^a |

^{*}Promedio \pm E.S. EC: embrión cigótico. SR: sin respuesta. (n = 10 repeticiones p \leq 0.05). Letras distintas indican diferencias estadísticas.

En tratamientos donde se agregó Kin en embriones cigóticos se obtuvo la formación de callo compacto y seminodular de color rojo a las cuatro semanas de cultivo (Figura 3.1 A). La presencia de este tipo de callo aumentó a las ocho (Figura 3.1 E) y doce semanas de cultivo (Figura 3.1 I).

Los tratamientos adicionados con 2,4-D mostraron la formación de callo de color verde y compacto a las cuatro semanas de cultivo (Figura 3.1 B, 3.1 C y 3.1 D). Se observó el incremento en la frecuencia de este tipo de callo a las ocho (Figura 3.1 F, 3.1 G y 3.1 H) y doce semanas de cultivo (Figura 3.1 J, 3.1 K y 3.1 L).

En todos los tratamientos los explantes no responsivos mostraron a las dos semanas de cultivo fenolización del medio de cultivo y la posterior necrosis de los mismos. Al cumplirse doce semanas de cultivo se observó una organogénesis incipiente en presencia de $9.3 \mu\text{M}$ Kin con $7.9 \mu\text{M}$ 2,4-D (Figura 3.1 L) la cual con el tiempo no proliferó y mostró necrosis.

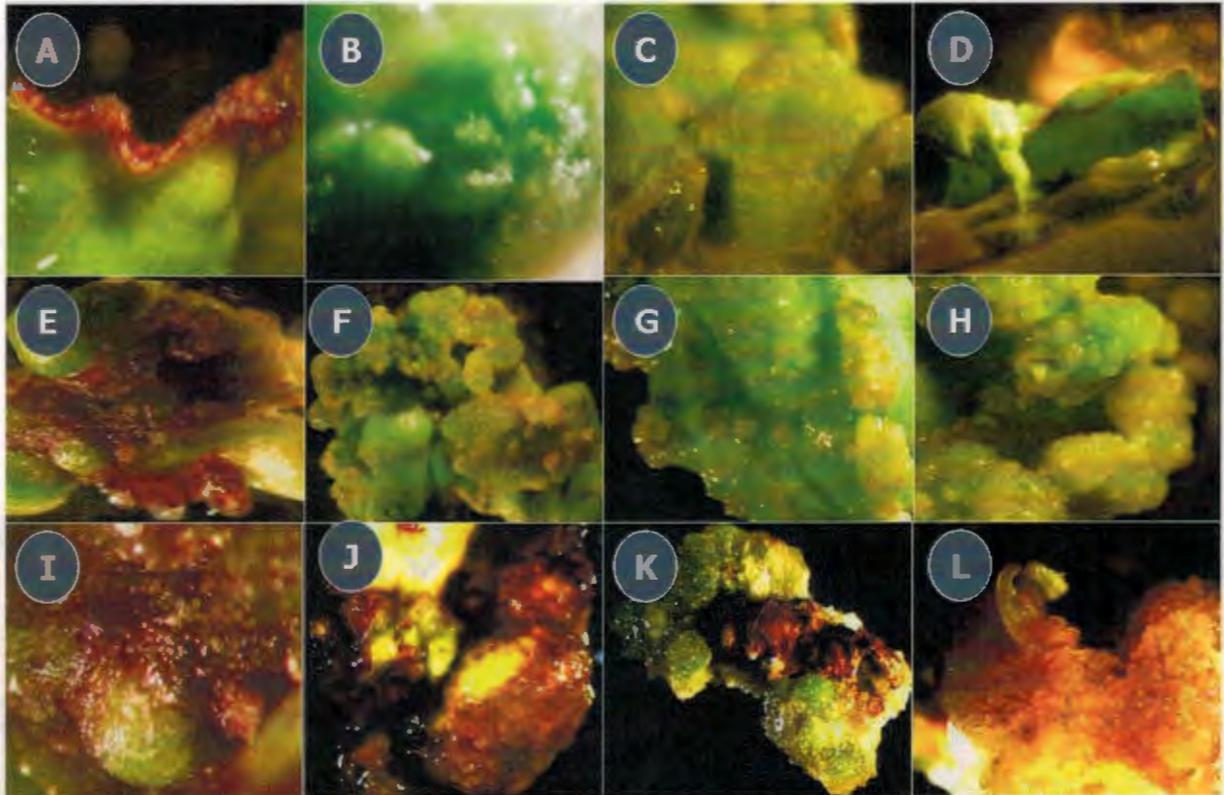


Figura 3.1 Explantes de embriones cigóticos de *J. curcas* con 4 semanas de cultivo: A) $9.3 \mu\text{M}$ Kin, B) $9.3 \mu\text{M}$ Kin + $5.6 \mu\text{M}$ 2,4-D, C) $9.3 \mu\text{M}$ Kin + $6.7 \mu\text{M}$ 2,4-D y D) $9.3 \mu\text{M}$ Kin + $7.9 \mu\text{M}$ 2,4-D. Embriones cigóticos con 8 semanas de cultivo: E) $9.3 \mu\text{M}$ Kin, F) $9.3 \mu\text{M}$ Kin + $5.6 \mu\text{M}$ 2,4-D, G) $9.3 \mu\text{M}$ Kin + $6.7 \mu\text{M}$ 2,4-D y H) $9.3 \mu\text{M}$ Kin + $7.9 \mu\text{M}$ 2,4-D. Embriones cigóticos con 12 semanas de cultivo: I) $9.3 \mu\text{M}$ Kin, J) $9.3 \mu\text{M}$ Kin + $5.6 \mu\text{M}$ 2,4-D, K) $9.3 \mu\text{M}$ Kin + $6.7 \mu\text{M}$ 2,4-D y L) $9.3 \mu\text{M}$ Kin + $7.9 \mu\text{M}$ 2,4-D.

Los tratamientos con Kin y de Kin con 2,4-D mostraron a las dos semanas la formación de callo en la periferia de los explantes en explantes de hojas tratadas. Tratamientos con Kin se mostraron una menor cantidad de callo y una mayor cantidad de explantes con necrosis que tratamientos con 2,4-D.

En explantes de hoja la adición individual de Kin mostró la formación de callo verde y compacto en la periferia del tejido con cuatro semanas de cultivo (Figura 3.2 A), este callo se tornó de una coloración roja a las ocho semanas de cultivo (Figura 3.2 E) y se incrementó la presencia del mismo al cumplirse doce semanas de cultivo (Figura 3.2 I) sin formar ningún tipo de estructura organogénica o embriogénica.

Los tratamientos adicionados con 2,4-D formaron callos de color verde pálido y de consistencia compacta a las cuatro semanas de cultivo (Figura 3.2 B, 3.2 C y 3.2 D), al cumplirse ocho semanas de cultivo el tejido calloso obtenido anteriormente aumentó su masas (Figura 3.2 F, 3.2 G y 3.2 H) con doce semanas de cultivo el callo se tornó de consistencia nodular en todos los tratamientos antes mencionados (Figura 3.2 I, 3.2 J y 3.2 K).

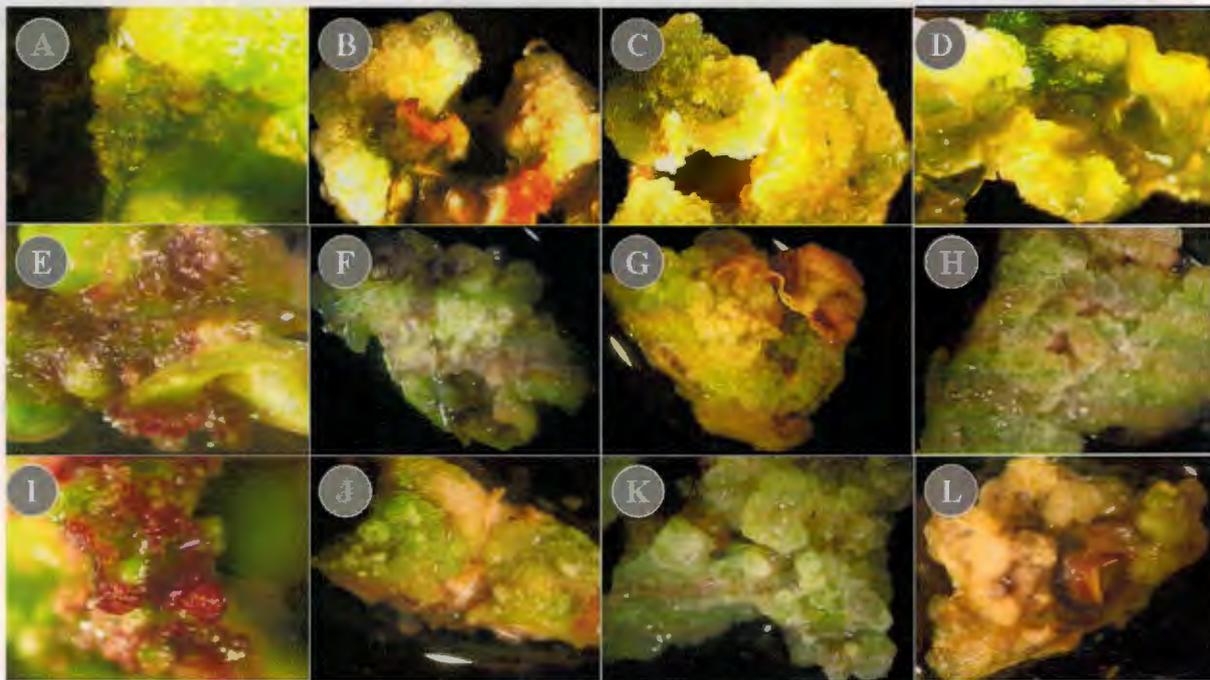


Figura 3.2 Respuesta de explantes de hoja de *J. curcas* con: 4 semanas de cultivo A) 9.3 μM Kin, B) 9.3 μM Kin + 5.6 μM 2,4-D, C) 9.3 μM Kin + 6.7 μM 2,4-D y D) 9.3 μM Kin + 7.9 μM 2,4-D. Explantes con 8 semanas de cultivo: E) 9.3 μM Kin, F) 9.3 μM Kin + 5.6 μM 2,4-D, G) 9.3 μM Kin + 6.7 μM 2,4-D, H) 9.3 μM Kin + 7.9 μM 2,4-D. Explantes con 12 semanas de cultivo: I) 9.3 μM Kin, J) 9.3 μM Kin + 5.6 μM 2,4-D, K) 9.3 μM Kin + 6.7 μM 2,4-D, L) 9.3 μM Kin + 7.9 μM 2,4-D.

La adición de Kin promueve la formación de callo de una tonalidad rojiza, este color puede deberse a la presencia de pigmentos en fases iniciales de desarrollo. Esta respuesta se ha reportado en híbridos de *Jatropha curcas*, donde este tipo de callo, promueve la formación de tejido organogénico (Prabakaran y Sujatha, 1999). De la misma manera la adición de Kin se ha reportado en la inducción de callos embriogénicos con estructuras preglobulares a las cuatro semanas de cultivo (Jha *et al.*, 2007).

En nuestros experimentos se obtuvo únicamente la presencia de callo en todos los tratamientos con Kin, el cual no se diferenció en ningún tipo de estructura organogénica o embriogénica.

Los diferentes tratamientos de Kin y 2,4-D influyeron en las características del callo formado. Los resultados obtenidos coinciden con reportes anteriores donde al agregarse este regulador, en concentraciones hasta seis veces mayores, no se reporta la formación de estructuras organogénicas o embriogénicas (Misra *et al.*, 2010; López-Hernández *et al.*, 2008).

3.4.1.2 EFECTO DEL BAP Y 2,4-D EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE DIFERENTES EXPLANTES

Los embriones cigóticos tratados con BAP de manera individual y con diferentes concentraciones de 2,4-D se enlistan en el Cuadro 3.4.

Cuadro 3.4 Respuesta morfológica de diferentes tipos de explantes de *J. curcas* en presencia de BAP y 2,4-D.

| Tratamiento | Tipo de respuesta* | | | | ESD/ Explante de hoja* |
|--|------------------------------------|-----------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | E.C | Cotiledón | Tallo | Hoja | |
| Testigo | SR | SR | SR | SR | SR |
| 8.9 μ M BAP | Callo (70 \pm 11 ^a) | SR | Callo (50 \pm 8.6 ^b) | Callo (100 ^a) | SR |
| 8.9 μ M BAP + 5.6 μ M 2,4-D | Callo (85 \pm 7.6 ^a) | SR | Callo (100 ^a) | ESD (100 ^a) | 12 \pm 1.5 ^a |
| 8.9 μ M BAP + 6.7 μ M 2,4-D | Callo(100 ^a) | SR | Callo (100 ^a) | ESD (100 ^a) | 18 \pm 1.9 ^a |
| 8.9 μ M BAP + 7.9 μ M 2,4-D | Callo (70 \pm 13 ^a) | SR | Callo (100 ^a) | ESD (100 ^a) | 17 \pm 2.3 ^a |

*Promedio \pm E.S. EC: embriones cigóticos. SR: sin respuesta. ESD: embriones somáticos directos. (n = 10 repeticiones. $p \leq 0.05$).

En embriones cigóticos de *J. curcas* se obtuvo la formación de callo con BAP a las cuatro semanas de cultivo (Figura 3.3 A), este callo fue de apariencia compacta y de color verde, al transcurrir las ocho semanas este callo adquirió una coloración rojiza (Figura 3.3 E). Al cumplirse doce semanas de cultivo se observó la formación de callo verde oscuro de consistencia seminodular (Figura 3.3 I). En ningún tratamiento con BAP utilizando embriones cigóticos se obtuvo la formación de tejido organogénico o embriogénico.

En el caso de tratamientos con BAP y 2,4-D la formación de callo se inició a las cuatro semanas en embriones cigóticos. El callo generado en tratamientos con 5.6 y 6.7 μ M 2,4-D era de color blanco de consistencia compacta con cuatro semanas de cultivo (Figura 3.3 B y 3.3 C). En tratamientos con 7.9 μ M 2,4-D se formó callo de color blanco con una consistencia semifríasil (Figura 3.3 D).

Al cumplirse ocho semanas de cultivo en todos los tratamientos con 2,4-D se formaron brotes indirectos de manera esporádica en los explantes (Figura 3.3 F, 3.3 G y 3.3 H), estos brotes no se desarrollaron y mostraron necrosis. A las doce semanas de cultivo aumentó la cantidad de callo formado anteriormente (Figura 3.3 J, 3.3 K y 3.3 L).

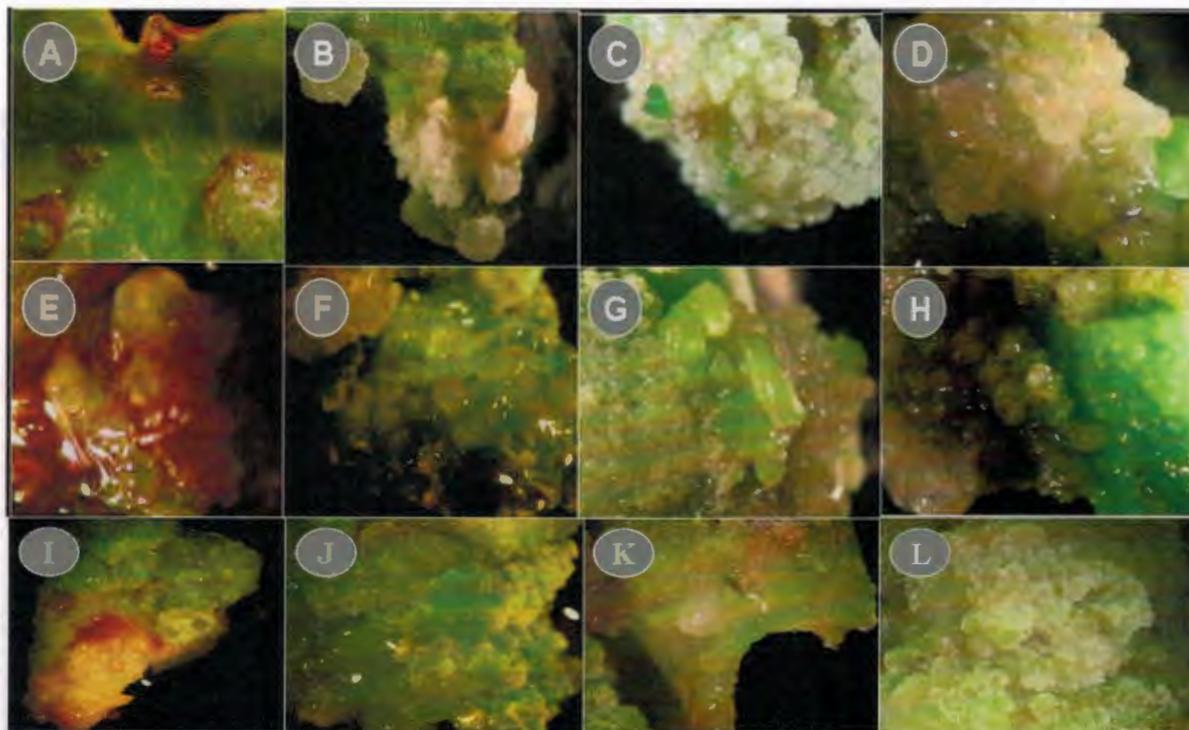


Figura 3.3 Respuesta de explantes de embriones cigóticos de *J. curcas* a las 4 semanas de cultivo con: A) 8.9 μM BAP, B) 8.9 μM BAP + 5.6 μM 2,4-D, C) 8.9 μM BAP + 6.7 μM 2,4-D y D) 8.9 μM BAP + 7.9 μM de 2,4-D. Explantes con 8 semanas de cultivo con: E) 8.9 μM BAP, F) 8.9 μM BAP + 5.6 μM de 2,4-D, G) 8.9 μM BAP + 6.7 μM de 2,4-D y H) 8.9 μM BAP + 7.9 μM de 2,4-D. Explantes con 12 semanas de cultivo con: I) 8.9 μM BAP, J) 8.9 μM BAP + 5.6 μM 2,4-D, K) 8.9 μM BAP + 6.7 μM 2,4-D y L) 8.9 μM BAP + 7.9 μM 2,4-D.

Los tratamientos con BAP y 24-D en tejido foliar de *J. curcas* mostraron la formación de estructuras que asemejaban embriones somáticos directos en la periferia del tejido en todos los tratamientos a las cuatro semanas de cultivo.

Los tratamientos con concentraciones de 5.6, 6.7 y 7.9 μM 2,4-D mostraron la formación de estructuras embrionarias en estadios globulares (Figura 3.4 A), acorazonados y torpedo (Figura 3.4 B y 3.4 C).



Figura 3.4 Estructuras embrionarias directas de *J. curcas* en tratamientos con A) 8.9 μM de BAP y 5.6 μM de 2,4-D; B) 8.9 μM de BAP y 6.7 μM de 2,4-D y C) 8.9 μM de BAP y 7.9 μM de 2,4-D. Con 4 semanas de cultivo.

Al transcurrir seis semanas de cultivo estas estructuras embrionarias mostraron estados más avanzados de desarrollo (Figura 3.5 A y 3.5 B). Al llegar a las ocho semanas de cultivo los embriones somáticos se tornaron de color verde con la formación de embriones secundarios globulares en este tejido (Figura 3.5 C).

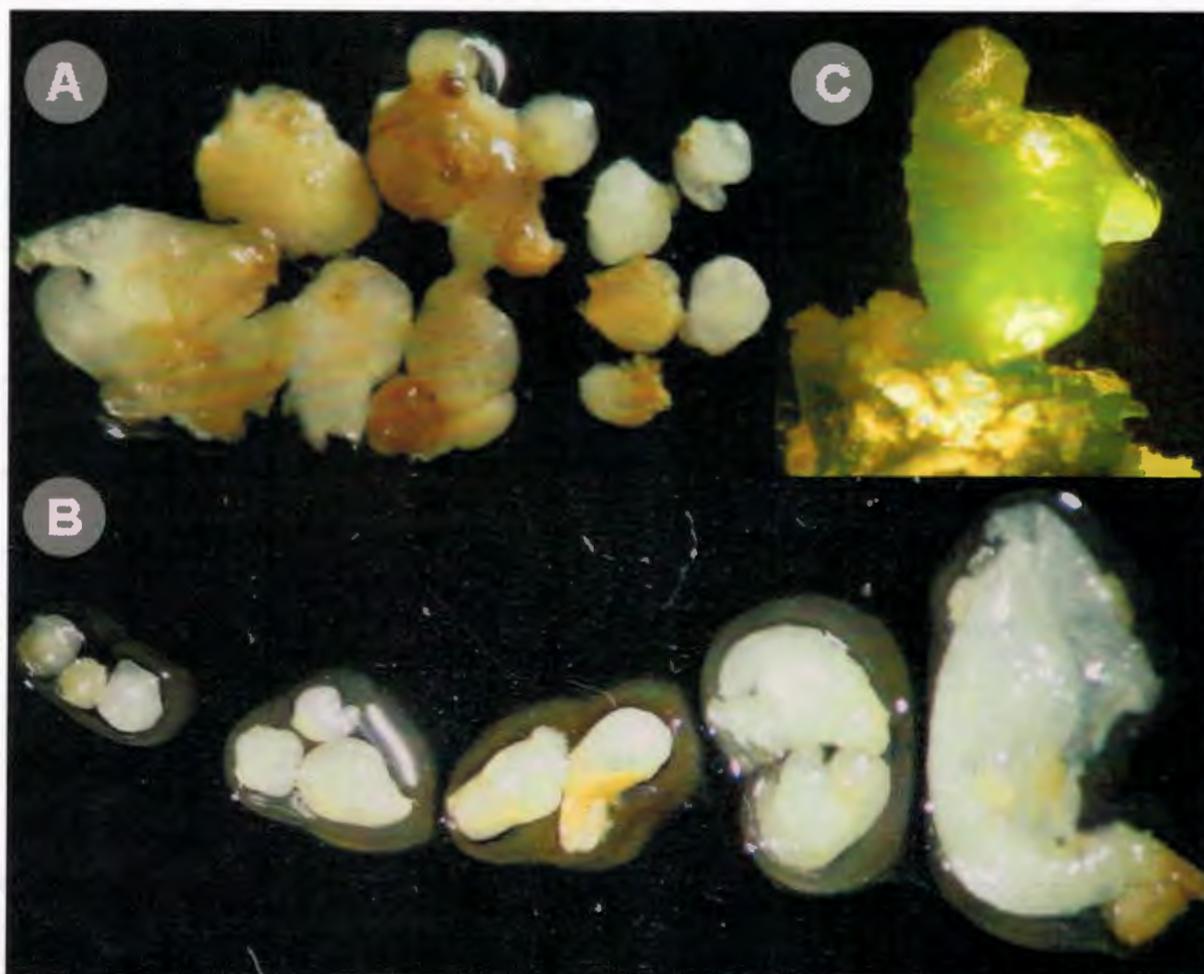


Figura 3.5 Desarrollo de embriones somáticos directos de *J. curcas*. A) Embriones somáticos con diferentes grados de desarrollo. B) Embriones somáticos ordenados de izquierda a derecha: embriones globulares, acorazonados, torpedos, cotiledonares y en conversión a planta con 6 semanas de cultivo. C) Embriogénesis somática secundaria a las 8 semanas de cultivo.

La adición individual de BAP difiere de estudios anteriores donde se obtienen procesos organogénicos indirectos en explantes de hoja (Kumar y Reddy, 2010; Kaewpoo y Te-chato, 2009; Sujatha *et al.*, 2005) y de embriogénesis somática directa en cotiledones (Kalimuthu *et al.*, 2007).

En otros estudios se observó que concentraciones de 8.9 μ M BAP promueven la formación de callo y disminuyen la frecuencia organogénica (Li *et al.*, 2008; Kalimuthu *et al.*, 2007). Cabe mencionar que a diferencia de estudios donde las respuestas organogénicas y embriogénicas se dan en cotiledones (Li *et al.*, 2008; Kalimuthu *et al.*, 2007), este explante no presentó respuesta en ninguno de los tratamientos.

Al combinar BAP y 2,4-D se obtuvo embriogénesis somática directa en explantes de hojas en concentraciones similares de 2,4-D donde se obtuvo una respuesta organogénica incipiente en hojas y cotiledones (Kumar y Reddy, 2010; Kaewpoo y Te-chato, 2009).

En el Cuadro 3.5 se comparan los resultados en la embriogénesis somática de *J. curcas* de estudios anteriores comparado con lo obtenido en este trabajo

Cuadro 3.5 Embriogénesis somática en *J. curcas*.

| Proceso | Explante | RCV | Respuesta (%) | ES/ explante | Tiempo (semanas) | Autores |
|---------|-----------|-------------|---------------|-----------------|------------------|--------------------------------|
| ESD | Cotiledón | BAP | 90 | 40 | 1 | Kalimuthu <i>et al.</i> , 2007 |
| | Hoja | BAP + 2,4-D | 100 | 18 | 8 | Valle-Gough, 2011 |
| ESI | Hoja | Kin | 45 | 58 | 16 | Jha <i>et al.</i> , 2007 |
| | | Kin + AIB | | | | |

RCV: regulador de crecimiento vegetal. **E.S:** embriones somáticos. **ESD:** embriogénesis somática directa. **ESI:** embriogénesis somática indirecta

El proceso de embriogénesis somática obtenido en este trabajo mejora ciertos aspectos el estudio de Jha *et al.*, (2007) al incrementarse dos veces el porcentaje de respuesta de los explantes y reducirse a la mitad el tiempo de producción de embriones somáticos. Sin embargo la eficiencia es tres veces menor a la obtenida en este trabajo.

Al comparar la embriogénesis somática directa reportada por Kalimuthu *et al.*, (2007) con la aquí obtenida el porcentaje de respuesta de los explantes es similar, con la diferencia que el proceso de Kalimuthu *et al.*, (2007) tiene un tiempo de respuesta ocho veces mayor y una eficiencia dos veces mayor a lo aquí reportado.

La diferencia en las frecuencia puede atribuirse al tipo de explante, estudios recientes indican que explantes generados de manera *in vitro* son mas responsivos que los procedentes de campo (Kaewpoo y Te-chato, 2009; Li *et al.*, 2008; Misra *et al.*, 2010).

Los segmentos de tallos de *J. curcas* con BAP no mostraron respuesta, a las cuatro semanas de cultivo los explantes se necrosaron.

Los tratamientos con 7.9 μM 2,4-D formaron callo de color rojo (Figura 3.6 C) en una mayor frecuencia que tratamientos con 5.6 μM 2,4-D (Figura 3.6 A) a las cuatro semanas de cultivo. En este mismo tiempo de cultivo en tratamientos con 6.7 μM 2,4-D se formó callo compacto de color blanco (Figura 3.6 B)

Al llegar a las seis semanas de cultivo, los explantes no desarrollaron ningún tipo de estructura y los explantes mostaron necrosis a las ocho semanas de siembra.

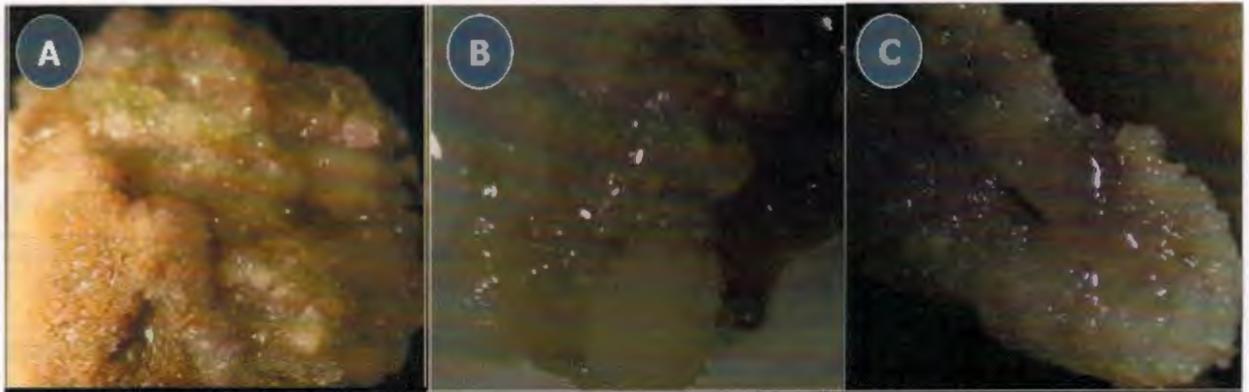


Figura 3.6 Segmentos de tallos de *J. curcas* con 8 semanas de cultivo: A) 8.9 μM BAP + 5.5 μM 2,4-D; B) 8.9 μM BAP + 6.7 μM 2,4-D y C) 8.9 μM BAP + 7.9 μM 2,4-D.

En estudios donde se usan hipocotilos y epicotilos de esta especie en presencia de BAP o en combinación con AIB se produce organogénesis indirecta (Kaewpoo y Te-chato, 2009; Valle-Gough, 2009; Wei *et al.*, 2004).

Sin embargo los tallos al ser cultivados en los tratamientos con BAP no reportaron ningún tipo de respuesta. Esto se puede deber a la edad del explante utilizado, a mayor edad de explante se reduce la capacidad morfogénica del mismo y se incrementa la formación de callo (Kaewpoo y Te-chato, 2009; Li *et al.*, 2008; Jha *et al.*, 2007; Kalimuthu *et al.*, 2007).

3.4.1.3 EFECTO DEL TDZ EN LA ORGANOGÉNESIS EN DIFERENTES EXPLANTES DE *J. curcas*

Los tratamientos en presencia de TDZ, se efectuaron tomando como explantes embriones cigóticos, cotiledones, hojas y tallos (Cuadro 3.6):

Cuadro 3.6 Respuesta de diferentes tipos de explantes con diferentes concentraciones de TDZ.

| Tratamientos TDZ (μM) | Tipo de respuesta (%) | | | | Brotos/ Explante responsivos* | | |
|---------------------------------------|--------------------------|-----------|-------|----------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | EC | Cotiledón | Tallo | Hoja | E.C | Cotiledó n | Hoja |
| Testigo | SR | SR | SR | SR | SR | SR | SR |
| 3.4 | OD (16) | OI (10) | SR | OD (100) | 14 \pm 3.1 ^b | 12 \pm 4.4 ^b | 28 \pm 1.3 ^a |
| 4.5 | OD (10) | OI (30) | SR | OI (100) | 17 \pm 4.1 ^b | 18 \pm 2.5 ^b | 22 \pm 1.4 ^a |
| 5.5 | OD (13) | OI (16) | SR | OI (100) | 10 \pm 3.1 ^b | 10 \pm 3.1 ^b | 24 \pm 1.4 ^a |

*Promedio \pm E.S. Letras distintas indican diferencias estadísticas. **SR:** sin respuesta. **EC:** Embrión cigótico. **OD:** Organogénesis directa. **OI:** Organogénesis indirecta. (n = 10 repeticiones. p \leq 0.05).

Los embriones cigóticos con cuatro semanas de cultivo mostraron necrosis en la mayoría de los explantes con TDZ. Los tratamientos con 3.4 μM TDZ mostraron expansión foliar (Figura 3.7 A) y la formación de tejido organogénico de forma directa en los tratamientos con 4.5 y 5.5 μM TDZ (Figura 3.7 B y 3.7 C). Los explantes a las ocho semanas de incrementó la cantidad de tejido organogénico en todos lo tratamientos con TDZ (Figura 3.7 D, 3.7 E y 3.7 F).

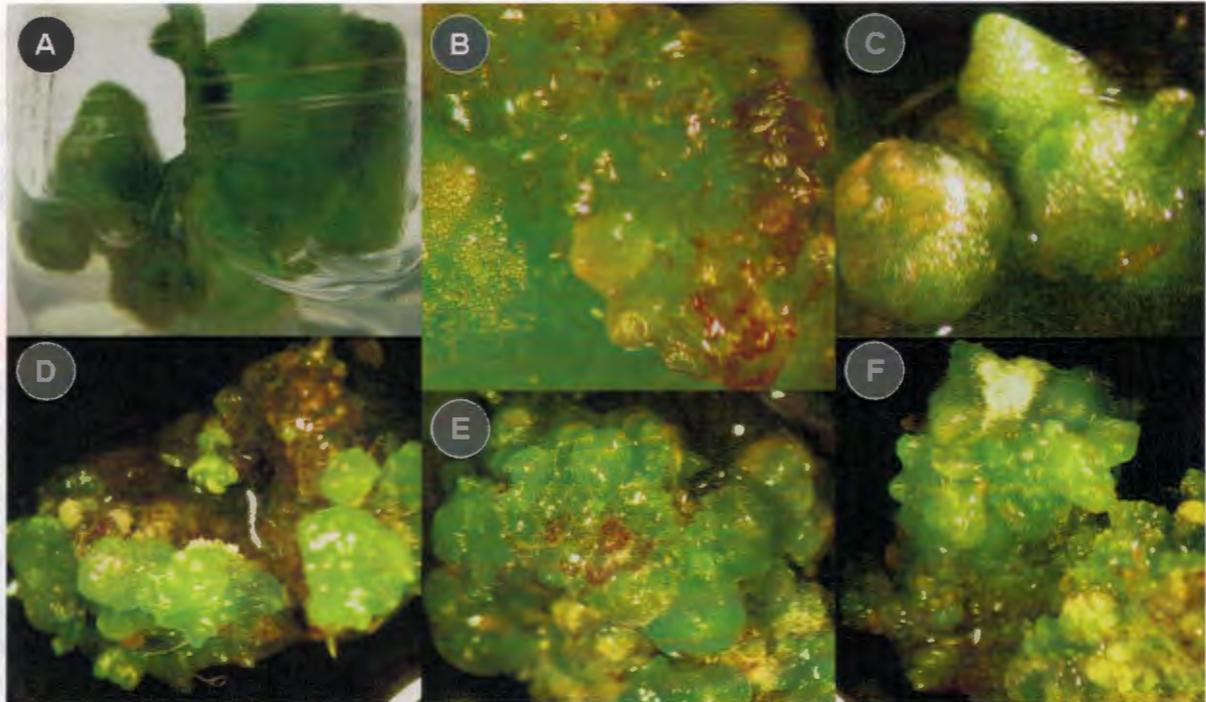


Figura 3.7 Respuesta de embriones cigóticos con diferentes concentraciones de TDZ. A) 3.4 μM TDZ, B) 4.5 μM TDZ y C) 5.5 μM TDZ con 4 semanas de cultivo. Respuesta de embriones cigóticos con 8 semanas de cultivo D) 3.4 μM TDZ, E) 4.5 μM TDZ y F) 5.5 μM TDZ.

Los cotiledones a las cuatro semanas de cultivo en medios con TDZ mostraron fenolización y necrosis en la mayor parte de los explantes. Todos los tratamientos donde se utilizó 3.4 – 4.5 μM TDZ mostraron organogénesis indirecta (Figura 3.8 A, 3.8 B y 3.8 C). Al cumplirse ocho semanas de cultivo se observó un aumento en la formación de órganos indirectos (Figura 3.8 D, 3.8 E y 3.8 F).

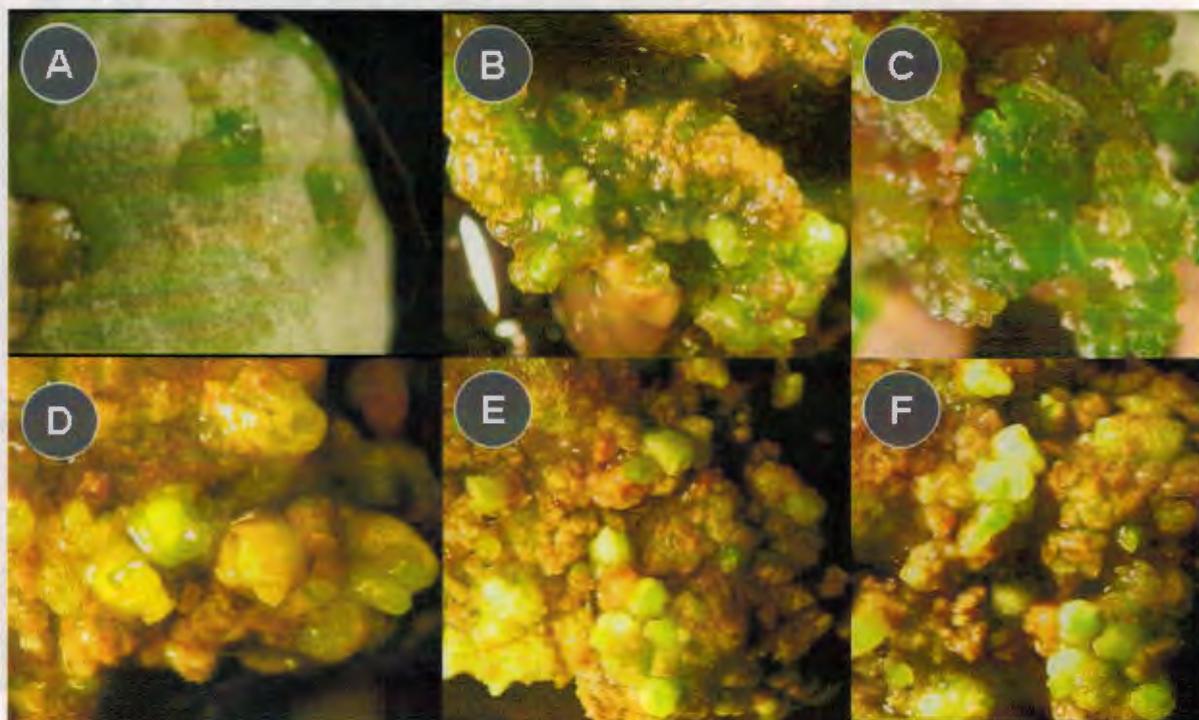


Figura 3.8 Respuesta de cotiledones con diferentes concentraciones de TDZ. A) 3.4 μM TDZ, B) 4.5 μM TDZ y C) 5.5 μM TDZ, con 4 semanas de cultivo Organogénesis indirecta con 8 semanas de cultivo D) 3.4 μM TDZ, E) 4.5 μM TDZ y F) 5.5 μM TDZ.

Los resultados en embriones cigóticos y cotiledones se resumen en el Cuadro 3.7, donde se pueden observar diferencias contrastantes al compararse con estudios anteriores.

Cuadro. 3.7 Inducción de procesos organogénicos en diferentes explantes de *J. curcas*.

| Proceso | Explante | RCV | Respuesta (%) | Brotos/explantes responsivos | Referencias |
|---------|-----------|---------------------------|---------------|------------------------------|--------------------------|
| OI | ECI | BAP + AIB | 90 | 10 | Varshney y Jhonson, 2010 |
| | ECM | TDZ | 16 | 14 | Valle-Gough, 2011 |
| | Cotiledón | BAP+ AIB +AG ₃ | 94 | NR | Li <i>et al.</i> , 2008 |
| OD | Cotiledón | TDZ | 30 | 18 | Valle-Gough, 2011 |

ECI: embrión cigótico inmaduro. **ECM:** embrión cigótico maduro. **OD:** organogénesis directa. **OI:** organogénesis indirecta

Los tratamientos con TDZ en embriones cigóticos muestran un aumento del treinta por ciento en el número de brotes obtenidos. Sin embargo, la respuesta de los explantes es cinco veces menor que estudios anteriores (Varshney y Jhonson, 2010). Esto es atribuible a la edad del explante, el estudio realizado por Varshney y Jhonson. (2010) menciona que al utilizar embriones cigóticos maduros estos no presentaban la formación de tejido organogénico indirecto y había un incremento de explantes no respnsivos.

En cotiledones el porcentaje de respuesta fue tres veces menor a lo reportado anteriormente, con la diferencia en que en este reporte la respuesta organogénica se induce con combinaciones de auxinas, citocininas y giberelinas no reportando el número de brotes obtenidos en cada explante (Li *et al.*, 2008).

En explantes de hoja durante las primeras dos semanas de cultivo se observó la expansión de los explantes en tratamientos con TDZ (4.5 y 5.5 μM) junto con la formación de tejido calloso en la periferia del tejido.

Explantes con cuatro semanas de cultivo mostraron la formación de tejido organogénico en la periferia de las hojas en todos los tratamientos con TDZ. El proceso de organogénesis se dio de manera directa en tratamientos con 3.4 μM TDZ (Figura 3.9 A) e indirecta con 4.5 – 5.5 μM TDZ (Figura 3.9 B y 3.9 C).

Los brotes en cada uno de los tratamientos con TDZ aumentaron en número y en tamaño a las ocho semanas de cultivo (Figura 3.9 D, 3.9 E y 3.9 F). Al cumplirse doce semanas de cultivo todos los tratamientos mostraron una cantidad mayor de brotes con una mayor longitud (Figura 3.9 G, 3.9 H y 3.9 I). Los brotes obtenidos en esta fase se transfirieron a tratamientos de elongación.

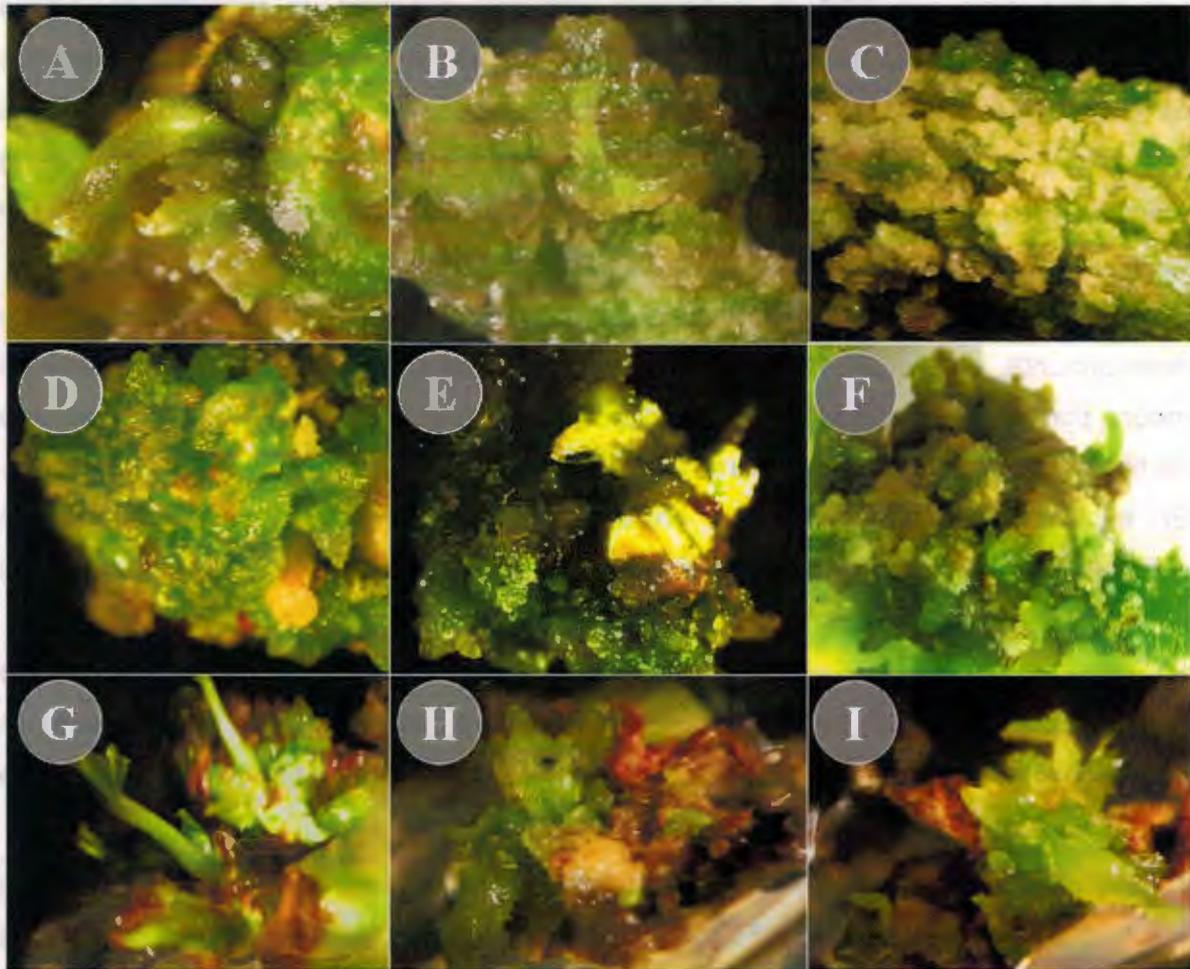


Figura 3.9 Organogénesis en tejido foliar de *J. curcas*. Organogénesis directa con $3.4 \mu\text{M}$ TDZ con A) 4 semanas, D) 8 semanas G) 12 semanas de cultivo. Organogénesis indirecta con $4.5 \mu\text{M}$ TDZ con B) 4 semanas, E) 8 semanas, H) 12 semanas de cultivo. Organogénesis indirecta con $5.5 \mu\text{M}$ TDZ con C) 4 semanas, F) 8 semanas, I) 12 semanas de cultivo.

En explantes de hoja se ha reportado la inducción de procesos de organogénesis directa e indirecta, estos estudios hacen uso de TDZ en combinación con otros reguladores de crecimiento (Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Deore y Johnson, 2008). Reportes recientes muestran una mayor respuesta en tratamientos donde se utiliza TDZ, que en los que no se utiliza, mostrando un efecto benéfico en la organogénesis de esta especie (Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Kumar y Reddy, 2010; Kumar *et al.*, 2010).

Los resultados de los estudios mencionados anteriormente son menores a los aquí reportados, tanto en porcentaje de inducción de este proceso como en el número de

órganos generados (Kumar y Reddy, 2010; Kumar *et al.*, 2010; Sujatha *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2004)

En los procesos de organogénesis obtenidos en este trabajo, la concentración de TDZ influyó en el tipo de respuesta en tratamientos con 3.4 μM TDZ se indujo la organogénesis de forma directa mientras que tratamientos con 4.5 y 5.5 μM TDZ indujeron la organogénesis indirecta. Esta respuesta se había observado en estudios recientes mostrando que a concentraciones altas de TDZ se incrementa la formación de callo con una reducción en el número de brotes (Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Deore y Johnson, 2008).

En el Cuadro 3.8 se resumen los resultados obtenidos en este reporte en explantes de hoja y en estudios previos realizados en la inducción de procesos organogénicos.

Cuadro 3.8 Organogénesis directa e indirecta en explantes de hojas en *J. curcas*.

| Proceso | RCV | Respuesta (%) | Brotos/ explante | Referencia |
|---------|---|---------------|---------------------|-----------------------------------|
| OD | TDZ + AIB | 88 | 18 | Khurana-Kaul <i>et al.</i> , 2010 |
| | TDZ | 100 | 28 | Valle-Gough, 2011 |
| OI | TDZ + Kin + AIB, BAP + KIN + AIA + AG ₃ | 53 | 11 | Deore y Jhonson, 2008 |
| | TDZ | 100 | 22 | Valle-Gough, 2011 |

RCV: reguladores de crecimiento vegetal. **OD:** organogénesis directa. **OI:** organogénesis indirecta

En el proceso de organogénesis directa se logró mejorar la tasa de multiplicación del proceso en un sesenta y cinco por ciento con respecto al estudio publicado por Khurana-Kaul *et al.*, (2010) con la diferencia que en nuestro caso solo se utilizó TDZ a lo largo del proceso. Los resultados obtenidos en la organogénesis indirecta, mejoran estudios previos al incrementar el porcentaje de respuesta el doble y obteniendo dos veces más brotes por explante que lo reportado por Deore y Jhonson, (2008).

3.4.1.4 ELONGACIÓN DE BROTES EN PRESENCIA DE AG₃

Los brotes obtenidos a través de los diferentes experimentos se transfirieron a medio de elongación con diferentes concentraciones de AG₃ (Cuadro 3.9).

Cuadro 3.9 Tratamientos de elongación en brotes de *J. curcas*.

| Medio de elongación | Respuesta* | Longitud de tallo* |
|----------------------|------------------------|---------------------------|
| AG ₃ (μM) | (%) | (cm) |
| 0 | 31 ± 6.9 ^D | 0.67 ± 0.1 ^D |
| 1.4 | 50 ± 7.2 ^{ab} | 0.92 ± 0.5 ^D |
| 2.8 | 73 ± 7.1 ^a | 1.35 ± 0.1 ^a |
| 4.2 | 30 ± 6.9 ^b | 0.416 ± 0.41 ^C |

*Promedio ± E.S. (n = 20 repeticiones. p ≤ 0.05). Letras distintas indican diferencias estadísticas.

La elongación de brotes se produjo a las cuatro semanas de cultivo, los tratamientos en los que se observó una mayor respuesta fueron los adicionados con 2.8 μM AG₃ (Figura 3.10 C), los tratamientos testigo y con 1.4 – 4.2 μM AG₃ mostraron un menor porcentaje de respuesta. A las ocho semanas de cultivo los tratamientos con 2.8 μM AG₃ (Figura 3.10 G) mostraron una mayor longitus y porcentaje de respuesta al compararse con el tratamiento testigo y los tratamientos con 1.4 -4.2 μM AG₃ (Figura 3.10 E, 3.10 F y 3.10 H)

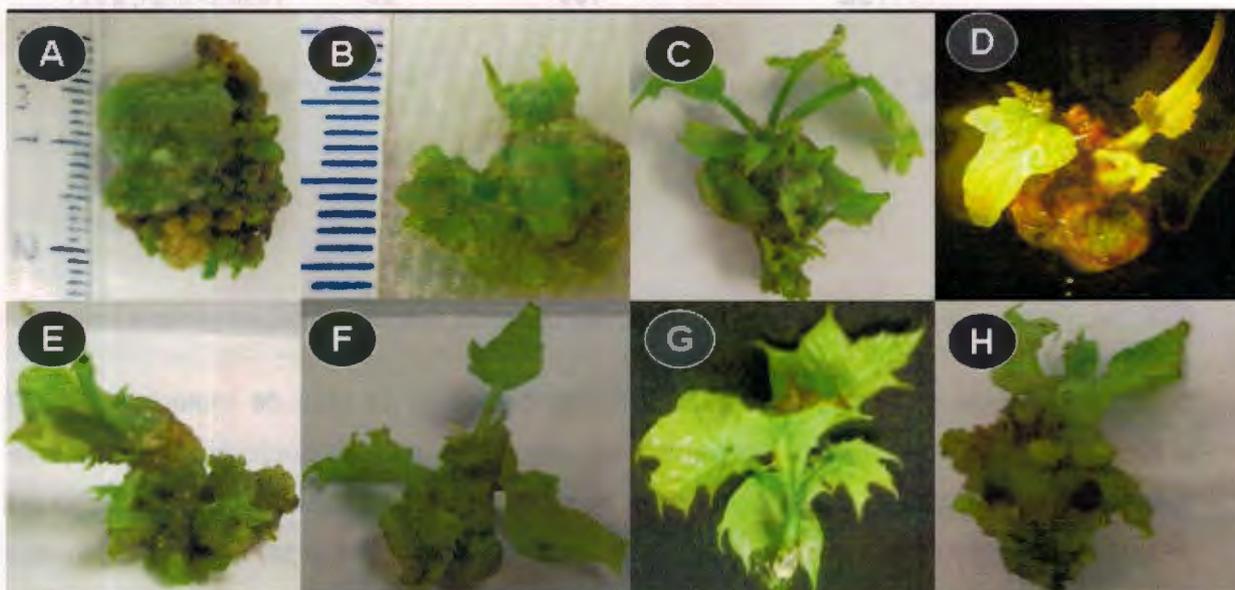


Figura 3.10 Elongación de brotes de *J. curcas* con 4 semanas de cultivo A) Testigo, B) 1.4 μM AG₃, C) 2.8 μM AG₃ y D) 4.2 μM AG₃. Elongación con 8 semanas de cultivo E) Testigo, F) 1.4 μM AG₃, G) 2.8 μM AG₃ y H) 4.2 μM AG₃.

Estudios previos en la elongación de brotes hacen uso de una combinación de citocininas y auxinas estas últimas en concentraciones altas, con resultados positivos (Kumar y Reddy, 2010).

En cuanto al efecto del AG₃ para elongación estudios previos revelan que la adición incrementa el desarrollo de brotes, sin embargo estos estudios son escasos y la mayoría utilizan este regulador en combinación con citocininas (Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Deore y Jhonson, 2008; Li *et al.*, 2008).

Los resultados obtenidos en estudios previos revelan que la adición individual de AG₃ influye en la elongación de brotes de *J. curcas* (Purkayastha *et al.*, 2010). En este estudio cantidades bajas de este regulador muestran un alto porcentaje de respuesta el cual disminuye al incrementar la concentración de AG₃ (Cuadro 3.10).

Cuadro 3.10 Tratamientos de elongación de brotes en presencia de ácido giberélico (AG₃).

| Tratamientos con AG ₃ (μM) | Explantos elongados (%) | Referencia |
|---|----------------------------|----------------------------------|
| 0 | 18 | Purkayastha <i>et al.</i> , 2010 |
| 0.1 | 59 | |
| 0.5 | 98 | |
| 1.0 | 62 | |
| 2.5 | 45 | |
| 5.0 | 38 | |
| 0 | 31 | Valle-Gough, 2011 |
| 1.4 | 50 | |
| 2.8 | 73 | |
| 4.2 | 30 | |

Los resultados obtenidos difieren de lo reportado por Purkayastha *et al.*, (2010), con un porcentaje de elongación de hasta el noventa y ocho por ciento en concentraciones seis veces menores de AG₃ comparado con tratamientos de 2.8 μM AG₃ donde se obtiene un setenta y tres por ciento de brotes elongados.

La diferencia en la respuesta puede radicar en el genotipo, debido a que la sensibilidad ante este regulador puede cambiar entre variedades de la misma especie (George *et al.*,

2008). Sin embargo, se observa la tendencia general que a cantidades mayores de 2.5 μM AG₃ resultan inhibitorias para el crecimiento de esta planta.

El tiempo de elongación coincide con la literatura donde se usa este regulador en combinación con auxinas y citocininas (Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Purkayastha *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008). En estos estudios la longitud de los brotes es mayor a la reportada en este trabajo, mostrando que el AG₃ influye significativamente en el desarrollo de brotes y que la interacción de este regulador con cantidades bajas de auxinas y citocininas son las que producen un mayor grado de elongación (Khurana-Kaul *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2008; Kalimuthu *et al.*, 2007).

3.4.1.5 ENRAIZAMIENTO DE BROTES

Los brotes en enraizamiento no mostraron formación de raíces a las cuatro semanas de cultivo (Cuadro 3.11), al cumplirse ocho semanas de siembra todos los explantes mostraron fenolización y necrosis.

Cuadro 3.11 Respuesta de brotes de *J. curcas* en diferentes medio de enraizamiento.

| Medio de enraizamiento | Explantes con respuesta (%) |
|------------------------|-----------------------------|
| ½ MS | SR |
| MS | SR |
| 0.5 μM AIB | SR |

Promedio \pm E.S. SR: Sin respuesta. (n= 20 repeticiones $p \leq 0.05$).

Los tratamientos de enraizamiento en nuestros experimentos difieren de estudios anteriores donde obtienen una alta frecuencia de enraizamiento con medio MS, MS reducido a la mitad y con AIB (Kumar *et al.*, 2010; Purkayastha *et al.*, 2010; Deore y Jhonson, 2008; Li *et al.*, 2008; Rajore y Batra, 2005). En nuestro caso no se obtuvo la formación de raíces en ninguno de los tratamientos utilizados. Esta diferencia en la respuesta se le puede atribuir al genotipo de la planta además la información relativa a la morfogénesis en genotipos no tóxicos de México no reportando eventos exitosos de enraizamiento.

3.5 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

3.5.1 HISTOLOGÍA DE BROTES ADVENTICIOS INDIRECTOS

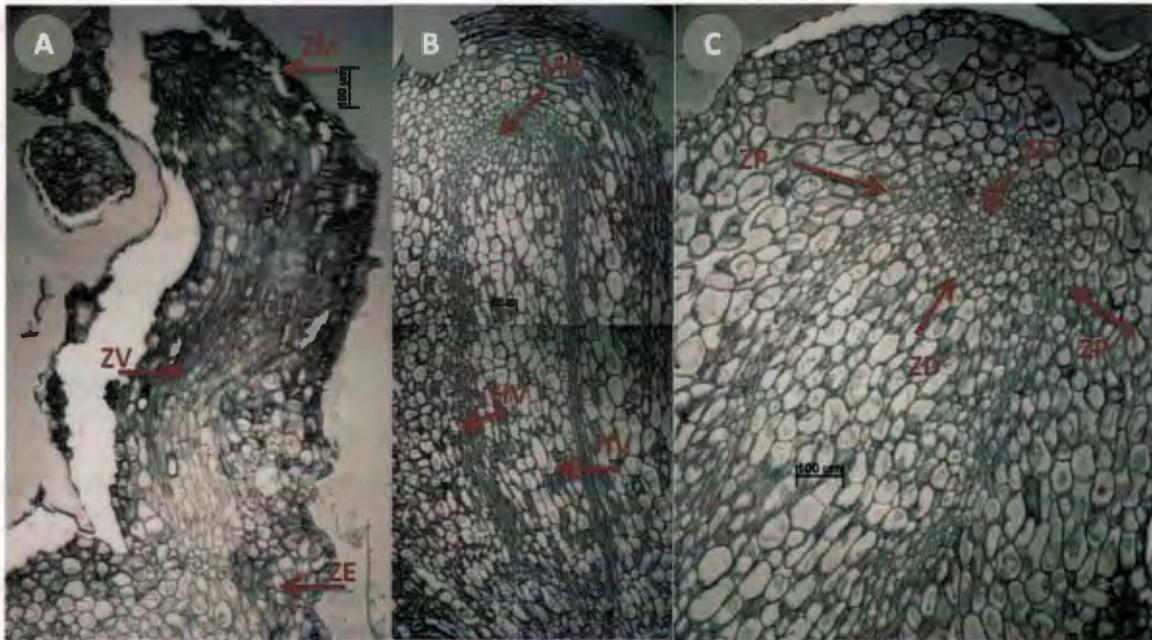


Figura 3.11 Histología de la organogénesis indirecta de *J. curcas*. A) Formación de tejido organogénico (SE: Sección del explante; ZV: Zona vascular y ZM: Zona meristemática apical), B) Acercamiento a estructura organogénica (HV: Haces vasculares y MA: Meristemo apical) C) Acercamiento a la sección del meristemo apical (ZC: Zona central, ZP: Zona periférica y ZD: Zona de división).

El proceso de organogénesis obtenido con TDZ mostró la formación de estructuras organogénicas a partir de callo, se pueden observar los haces vasculares en los brotes formados, la conexión con el tejido materno y el meristemo apical (Figura 3.11 A).

En un acercamiento observamos los haces vasculares y la zona del meristemo apical completamente formada (Figura 3.11 B). El meristemo muestra las tres capas de tejido características: zona central, zona periférica y zona de división (Figura 3.11 C).

3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achten, W.M.J., L.R. Nielsen, R. Aert, A.G. Lengkeek, E.D. Kjaer, A. Trabucco, J.K. Hansen, W. Maes, L. Graudal, F.K. Akinnifesi y B. Myus. (2010). Towards domestication of *Jatropha curcas*. *Biofuels*, 1 (1), 91 – 107.
- Datta, M.M., P. Mukherjee, B. Ghosh y T.B. Jha. (2007). *In vitro* Clonal Propagation of Biodiesel Plant (*Jatropha curcas* L.). *Current Science*, 93 (10), 1438-1442.
- Deore, A. y S. Johnson. (2008). High frequency plant regeneration of leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports*, 2, 7 – 11.
- George, E.F; M.A. Hall y G.J. De-Klerk. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. 1 The Background. Springer. Tercera edición. Holanda. 477 p.
- Hartmann, H.T. y D.E. Kester. (2001). *Propagación de plantas, Principios y Prácticas*. Compañía Editorial Continental. Octava Reimpresión. México. 880 p.
- Jha, T.B., P. Mukherjee y M.M. Datta. (2007). Somatic Embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn, an Important Biofuel Plant. *Plant Biotechnology Reports*, 1, 135-140.
- Kaewpoo, M. y S. Te-chato. (2009). Influence of explant types and plant growth regulators on multiple shoot formation from *Jatropha curcas*. *Science Asia*, 35, 353 – 357.
- Kalimuthu, K., S. Paulsamy, R. Senthikulmar y M. Sathya. (2007). *In vitro* Propagation of the Biodiesel Plant *Jatropha curcas* L. *Plant Cell Tissue Culture and Biotechnology*, 17 (2), 137-147.
- Khurana-Kaul, K., S. Kachwaha y S.L. Kothari. (2010). Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium. *Biologia Plantarum*, 54 (2), 369 – 372.
- Kumar, S., S. Kumaria y T. Pramod. (2010). Efficient *In Vitro* Plant Regeneration Protocol from Leaf Explant of *Jatropha curcas* – A Promising Biofuel Plant. *Journal of Plant Biochemistry and biotechnology*. 19 (2), 1 – 4.
- Kumar, N. y M.P. Reddy. (2010). Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant. *Annals of Applied Biology*, 1, 1 – 9.
- Li, M., H. Li, H. Jinag, X. Pan y G. Wu. (2008). Establishment of an *Agrobacterium*-mediated Cotyledon Disc Transformation Method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 92, 173 – 181.

- Lopez-Hernández, D., L. Peñate-Alvariño, M. Daquinta-Gradaille, D. Piña-Morgado y M.L. Escalona-Morgado, 2008. Cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas*, L. (Euphorbiaceae). Resultados preliminares y estrategias futuras. [Online].
 Disponible en:
<http://www.cubasolar.cu/biblioteca/Ecosolar/Ecosolar21/HTML/articulo03.htm>
 [17 Julio 2009]
- Misra, P., N. Gupta, D.D. Toppo, V. Pandey, M.K. Mishra y R. Tuli. (2010). Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 100, 189 – 197.
- Molina, M., C. Mena-Brito y R. Lacy-Tamayo. (2008). Aplicación del modelo de EBAMM para estimar el impacto ambiental y energético de la producción de bioetanol a partir de caña de azúcar en México desde la perspectiva de ciclo de vida. Centro Mario Molina para Estudios Estratégicos sobre Energía y Medio Ambiente, A.C. 1 – 10.
- Pérez, E.M., R. Ramírez-Malagón, H.G. Núñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo. (1999). Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 149 p.
- Prabakaran, A.J. y M. Sujatha. (1999). *Jatropha tanjorensis* Ellis & Saroja, a Natural Interspecific Hybrid Occurring in Tamil Nadu, India. *Genetic Resources and Crop Development*, 46, 213 – 218.
- Purkayastha, J., T. Sugla, A. Paul, S.K. Solleti, P. Mazumdar, A. Basu, A. Mohommad, Z. Ahmed y L. Sahoo. (2010). Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. *Biologia Plantarum*, 54 (1), 13 – 20.
- Rajore, S. y A. Batra. (2005). Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. *Plant Biochemistry and Biotechnology*, 10, 73 – 75.
- Shrivastava, S. y M. Banerjee. (2008). *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Influence of additives. *International Journal of Integrative Biology*, 3 (1), 73 – 79.
- Sujatha, M., H.P.S. Makkar y K. Becker. (2005). Shoot Bud Proliferation from Axillary Nodes and Leaf Sections of non toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regulators*, 47, 83 – 90.

- Thepsamran, N., C. Thepsithar y A. Thongpukdee. (2006). *In vitro* multiple shoot induction of physic nut (*Jatropha curcas*). Department of Biology Silpakorn Univ. Tahiland. 1 – 4.
- Trivedi, T., H. Gaudani, M. Gupta, N. Gupta, P. Patil, G. Gupta, V.K. Krishna y M.P. Reddy. (2009). Establishment of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Jatropha curcas* L. International Journal of Agricultural Sciences, 1 (2), 11 – 20.
- Valle-Gough, R.E. (2009). Morfogénesis *in vitro* de diferentes variedades de Tsikil-Té (*Jatropha curcas* L). Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Mérida. 53 p.
- Varshney, A. y T.S. Johnson. (2010). Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant. Plant Biorechnol. Rep. 4, 139 – 148.
- Wei, Q., W.D. Lu, Y. Liao, S.H. Pan, Y. Xu, L. Tang y F. Chen. (2004). Plant Regeneration from Epicotyl Explant form *Jatropha curcas*. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 30 (4), 475 – 478.

CAPITULO IV. DISCUSIÓN GENERAL

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

La generación de plantas de diferentes genotipos de *Jatropha curcas* ha sido estudiada por diversos autores quienes han utilizado TDZ combinado con otras auxinas y citocininas (Khurna-Kaul et al., 2010; Varshney y Jhonson, 2010; Deore y Jhonson, 2008). Los resultados en este estudio muestran que el medio adicionado únicamente con TDZ permite la inducción de la organogénesis directa e indirecta, en función de la concentración de este regulador, obteniéndose una mayor eficiencia comparada con otros estudios previos realizados en esta especie. En este protocolo se emplearon como explantes hojas de plantas asépticas, en presencia de 3.4 μM TDZ obteniéndose un promedio de 28 brotes por explante. La elongación se logró con 2.8 μM AG₃. Estos resultados permiten recomendar este protocolo para la propagación *in vitro* de *J. curcas* especialmente de aquellos materiales genéticos que resulten promisorios o hayan sido identificados como plantas elite durante la selección en campo.

4.2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Deore, A. y S. Johnson. (2008). High frequency plant regeneration of leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports*, 2, 7 – 11.
- Khurana-Kaul, V., S. Kachwaha y S.L. Kothari. (2010). Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response in thidiazuron and high copper contents in the medium. *Biologia Plantarum*, 54 (2), 369 – 372.
- Varshney, A. y T.S. Johnson. (2010). Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports*, 4, 139 – 148.

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES

- La germinación de embriones cigóticos de *J. curcas* aumentó de manera significativa con respecto al testigo al reducir la concentración de sales en el medio MS en un 50 % y al adicionar AG₃ (1.15 y 2.3 μM).
- Se indujeron brotes múltiples de mayor longitud en concentraciones de 6.6 μM BAP y 4.5 μM TDZ. Los tratamientos con TDZ fueron los que mostraron un mayor número de brotes desarrollados en un menor tiempo que en tratamientos con BAP.
- Los tratamientos con Kin y 2,4-D dieron la formación de callo en todos los explantes utilizados. En los tratamientos con BAP y 2,4-D se dio la formación de callo en embrión cigótico y tallo.
- Cuando se utilizó tejido foliar con BAP y 2,4-D se obtuvo la formación de embriones somáticos directos en todos los tratamientos, no difiriendo la respuesta entre tratamientos.
- Se obtuvo organogénesis directa e indirecta en presencia de TDZ, esto en función del tipo de explante y de la concentración de este regulador. El explante con mayor respuesta fue tejido foliar. Los embriones cigóticos y cotiledones mostraron una frecuencia de respuesta organogénica muy baja.
- La adición de AG₃ a los brotes promueve la elongación de manera significativa siendo la mejor concentración la de 2.8 μM AG₃ donde se obtuvo una mayor longitud. Tratamientos con concentraciones mayores a 2.8 μM AG₃ fueron inhibitorios para la elongación de los brotes.

5.2 PERSPECTIVAS

- Establecer las condiciones de enraizamiento en los procesos de organogénesis directa obtenidos en este estudio.
- Desarrollar métodos de escalamiento a inmersión temporal (BioMint) de los procesos de germinación, inducción de brotes múltiples, organogénesis y embriogénesis somática de *J. curcas*, lo que permitirá incrementar las tasas de multiplicación y conversión a plantas de los sistemas de regeneración *in vitro* de la especie, establecidos en este estudio.

ANEXOS

ANEXOS 1. FORMULACIONES PARA HISTOLOGIA

Cuadro A 1.1 Formulación para solución FAA.

| Compuesto | Volumen |
|-----------------------|----------------|
| Agua | 350 ml |
| Alcohol etílico (95%) | 500 ml |
| Formaldehído (40%) | 100 ml |
| Ácido acético glacial | 50 ml |
| Total | 1000 ml |

Cuadro A 1.2 Formulación de soluciones de infiltración e inclusión en resina.

| Solución | Composición | Volumen |
|---------------------|--|---------|
| Pre-preinfiltración | 50 ml de n-Butoxietanol + 50 ml de etanol absoluto | 100 ml |
| Preinfiltración | 100 ml de n-Butoxietanol + 0.9 g de Benzoilperóxido | 50 ml |
| Inclusión | 98 ml de solución de preinfiltración + 2 ml de N-N Dimetil-Anilina | 100 ml |

Cuadro A 1.3 Formulación de soluciones para tinción.

| Solución | Composición | Volumen |
|-------------------|---|---------|
| Azul de Toluidina | Acetato de sodio 0.2 M, pH = 5.3 + 0.5 g de Azul de Toluidina | 1000 ml |