



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“DISEÑO Y DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA
LA MICROPROPAGACIÓN DE *Jatropha curcas* L.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA

P R E S E N T A

VERÓNICA BALTAZAR GARCÍA

ING. TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES



CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno
Baltazar
García
Verónica
56198116
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
305026167
2. Datos del tutor
M. en C.
Teresa de Jesús
Olivera
Flores
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Josefina
Herrera
Santoyo
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Florencia Tiberia Aucán
García
Campusano
5. Datos del sinodal 3
M. en C.
Rosa María
Fonseca
Juárez
6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Beatriz
Zúñiga
Ruiz
7. Datos del trabajo escrito
Diseño y desarrollo de un protocolo para la micropropagación de *Jatropha curcas* L.
77 p
2015

Diseño y desarrollo de un protocolo para la micropropagación de *Jatropha curcas* L.

Verónica Baltazar García



Verónica Baltazar García

Diseño y desarrollo de un
protocolo para la
micropropagación de *Jatropha*
curcas L.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS- BIOLOGÍA

TESIS

Contenido

Índice de figuras	2
Índice de tablas	3
Índice de cuadros	3
Abreviaturas	4
Resumen	5
Introducción	6
Antecedentes	8
1.1 Aspectos generales de <i>Jatropha curcas</i> L.	8
1.1.1 Clasificación taxonómica	8
1.1.2 Descripción botánica	8
1.1.3 Origen y distribución (en México y el mundo)	10
1.1.4 Condiciones climáticas de crecimiento	12
1.1.5 Usos	12
1.2 Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)	13
1.2.1 Aplicaciones del CTV y sus ventajas	14
1.2.2 Establecimiento de cultivos	14
1.2.3 Vías regenerativas bajo condiciones in vitro	15
1.2.4 Regeneración in vitro de <i>Jatropha curcas</i> L.	17
1.3 Biocombustibles	19
1.3.1 Clasificación	19
1.3.2 Especies vegetales utilizadas para producir biodiesel	20
1.3.3 <i>Jatropha curcas</i> una nueva alternativa	20
Objetivos	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
Materiales y métodos	23
3.1 Ruta crítica	23
3.2 Lugar donde se realizó el trabajo de investigación	24
3.3 Material biológico	24
3.3.1 Preparación de medios de cultivo	26
3.4 Condiciones de incubación	26
3.5 Establecimiento de cultivos in vitro de <i>Jatropha curcas</i> L.	26
3.5.1 Selección del explante	27
3.5.2 Desinfección del explante	27
3.5.3 Disección del material vegetal	28
3.5.4 Siembra de explantes	28
3.6 Proliferación y mantenimiento de cultivos de organogénesis y embriogénesis somática.	30

Contenido

3.7	Regeneración de plántulas.	30
3.8	Enraizamiento.	31
	Resultados	33
4.1	Germinación	33
4.2	Desinfección y disección del material vegetal	34
4.3	Siembra de explantes. Inducción y proliferación	35
4.4	Regeneración de plántulas	51
4.5	Enraizamiento	51
	Análisis de resultados	53
	Conclusiones	64
	Bibliografía	65
	Anexos	69
	Anexo 1. Soluciones Concentradas	70
	Anexo 2. Datos estadísticos	73

Índice de figuras

FIGURA 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L. (TORAL ET AL., 2008).	8
FIGURA 2. HOJAS SIMPLES Y EN FORMA DE CORAZÓN DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L.	9
FIGURA 3. FILOTAXIS ESPIRAL DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L.	9
FIGURA 4. SEMILLAS ESCARIFICADAS DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L.	9
FIGURA 5. FRUTO DRUPÁCEO CON SEMILLAS DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L.	9
FIGURA 6. DISTRIBUCIÓN DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L. EN MÉXICO (HERRERA ET AL., 2001)	10
FIGURA 7. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA MUNDIAL Y CENTRO DE ORIGEN DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L. (HELLER, 1996)	11
FIGURA 8. RUTA CRÍTICA PARA LA REGENERACIÓN DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L.	23
FIGURA 9. PROCEDIMIENTO DEL PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN DE SEMILLAS.	25
FIGURA 10. PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO DE DESINFECCIÓN DE EXPLANTES.	27
FIGURA 11. GERMINACIÓN EN INVERNADERO Y GERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L. RESULTADO DE LA GERMINACIÓN, EN DONDE SE OBSERVA LA DIFERENCIA EN EL TAMAÑO DEL TALLO Y HOJAS DESPUÉS DE UN MES A PARTIR DE SU SIEMBRA..	34
FIGURA 13. CALLO VERDE Y FRIABLE DEL MEDIO JE-4	35
FIGURA 14 OXIDACIÓN TOTAL DE CULTIVOS DEL MEDIO JE-4	36
FIGURA 15. CALLO ORIGINADO EN EL MEDIO JO-1.....	36
FIGURA 16. CALLO ORIGINADO EN MEDIO JE-4.	36
FIGURA 17. A),B) Y C) ORIGEN Y DESARROLLO DE BROTES EN EL MEDIO JO-3. D) DESARROLLO DE BROTES EN MEDIO JO-1.	37
FIGURA 18. FORMACIÓN DIRECTA DE BROTE EN MEDIO JE-4 A PARTIR DE EXPLANTE DE HOJA.	38
FIGURA 19. CULTIVO CONTAMINADO POR BACTERIA.	38
FIGURA 20. PLANTA REGENERADA DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L. A PARTIR DEL MEDIO JO-3.	51
FIGURA 21. PLANTA REGENERADA DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L. CON RAÍZ A PARTIR DEL MEDIO JO-3.....	51
FIGURA 22. CURVA MODELO QUE REPRESENTA EL CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO (BHOJWANI, S. AND RAZDAN, M., 1996).....	62

Índice de tablas

TABLA 1. DATOS ESTADÍSTICOS PARA LA PRUEBA T DE STUDENT PARA PORCENTAJE DE CALLO Y OXIDACIÓN.	48
TABLA 2. RESULTADOS DE PRUEBA T DE STUDENT PARA EL PORCENTAJE DE CALLO Y LA OXIDACIÓN.	49
TABLA 3. DATOS ESTADÍSTICOS PARA REALIZAR LA PRUEBA T DE STUDENT PARA EL PARÁMETRO NÚMERO DE BROTES PROMEDIO POR EXPLANTE.	49
TABLA 4. RESULTADOS DE LA PRUEBA T DE STUDENT PARA EL PARÁMETRO NÚMERO DE BROTES POR EXPLANTE.	50

Índice de cuadros

CUADRO 1. TRABAJOS PREVIOS DE LA REGENERACIÓN DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L.	19
CUADRO 2. . MEDIOS DE CULTIVO PROBADOS EN DIFERENTES ETAPAS DE LA REGENERACIÓN DE <i>JATROPHA CURCAS</i> L.	32
CUADRO 3. RESULTADOS SOBRESALIENTES DE LOS ENSAYOS REALIZADOS.	50

Abreviaturas

2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
Ac.	Ácido
AIA	Ácido indol-3-acético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido 1-naftalenacético
BA	6-Bencilaminopurina
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
EDTA	Ácido etilendiamina tetra-acético
Kn	Cinetina (6-furfurilaminopurina)
MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog, 1962.
PVP	Polivinilpirrolidona

Resumen

El sector de la energía se ha posicionado como un área de prioridad ya que su consumo está fuertemente unido al progreso económico de todos los países. Sin embargo, el rápido incremento en su costo y el reconocimiento de la condición finita de las reservas de los combustibles fósiles, ha hecho que aumente el interés mundial en los recursos de energía renovable. En este sentido, las propiedades de *Jatropha curcas* L. la han destacado, ya que se adapta muy bien a áreas marginales semiáridas, es resistente a la sequía, vive en suelos pobres en nutrientes, no compite por suelos que presenten mejores oportunidades de uso y su aceite puede ser procesado para su uso como sustituto del diesel (biodiesel). El Cultivo de Tejidos Vegetales es una herramienta biotecnológica que permite el cultivo y manipulación de células, tejidos y órganos vegetales de los cuales se pueden regenerar plantas completas. Esta herramienta genera ventajas como la clonación, conservación, mejoramiento genético y producción de compuestos vegetales. El Cultivo de Tejidos Vegetales brinda la posibilidad de una propagación masiva de la planta deseada, con características previamente seleccionadas, en un tiempo reducido y libres de patógenos, ventajas que determinan su aplicación exitosa para la producción de biodiesel a partir del aceite extraído de las semillas de *Jatropha curcas* L. En el presente trabajo se realizó mediante Cultivo de Tejidos Vegetales la inducción de las vías morfogénicas de organogénesis y embriogénesis somática. Se probaron diferentes medios de cultivo y diferentes explantes de los cuales el mejor medio de cultivo fue el JO-3 compuesto por sales MS adicionado con vitaminas R2 y BA (6-bencilaminopurina) como regulador de crecimiento (Cuadro 1). En el medio JO-3 el explante que mostró los mejores resultados fue el de la región basal de hoja de 1 cm², ya que la proliferación de callo y de brotes fue mayor, además la regeneración de plantas fue a partir de estos brotes. La vía morfogénica que presentó mejores resultados fue la organogénesis.

Introducción

El sector de la energía a partir de combustible fósil constituye un área de prioridad para todas las naciones, pues es un hecho que su consumo ha estado unido al progreso económico, político y social de la humanidad. Sin embargo, el rápido incremento en su costo y el reconocimiento de la condición finita de las reservas de los combustibles fósiles, ha hecho que aumente grandemente el interés mundial en los recursos de energía renovable (Torral et al., 2008). Esto ha influido en las tendencias de la biotecnología vegetal, resultando en intentos de usar células y tejidos vegetales para el mejoramiento y rápida propagación de plantas productoras de aceite con posibilidad de aplicación para combustibles (Totik Sri Mariani, 2006).

La especie *Jatropha curcas* L. es miembro de la familia Euphorbiaceae, crece en climas tropicales y semitropicales, en altitudes que van desde 5 a 1000 msnm, se desarrolla en suelos pobres y arenosos. Se considera que su centro de origen es México y Centroamérica. Se distribuye en la República Mexicana a lo largo de la vertiente del Golfo, vertiente del Pacífico y en la Península de Yucatán (Schmook y Sánchez, 2000).

En algunas localidades de México se conoce como "piñón" o "piñoncillo". La semilla contiene un importante contenido de proteína (25-30%) y grasa (55-60%). Esta planta es considerada tóxica pues se ha encontrado en la semilla la presencia de ésteres de forbol (Herrera et al., 2001).

J. curcas es una especie que potencialmente constituye una fuente de energía alternativa. Semillas con cáscara contienen de 55 a 60% de aceite que puede ser usado para la elaboración de biodiesel a través de un proceso químico llamado transesterificación y aplicarse en motores para diesel (Ismidianty y Rachmi, 2010).

Varias especies vegetales pueden ser procesadas para proporcionar un sustituto al combustible diesel, *J. curcas* es una de ellas, y posee propiedades que le confieren ventajas sobre otros cultivos:

- Es altamente resistente a la sequía.
- No desplaza otros cultivos importantes para la alimentación humana.
- No compete por tierras que presentan mejores oportunidades para otros usos (Torral et al., 2008).

La propagación de *J. curcas* L. de manera tradicional se realiza mediante esquejes, este método tiene algunas limitaciones en cuanto a las condiciones necesarias para una plantación, ya que, sólo funciona en suelos fértiles y con suministro de agua permanente (Franken y Nielsen, 2009). El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) ofrece ventajas ante los métodos tradicionales de propagación,

una de las más destacables es la de regenerar plantas completas a partir de explantes, los cuales son fragmentos de tejido de cualquier planta viva. Esta ventaja tiene aplicaciones en la propagación masiva de plantas destinadas a diferentes fines (Dutta e Ibaraki, 2008).

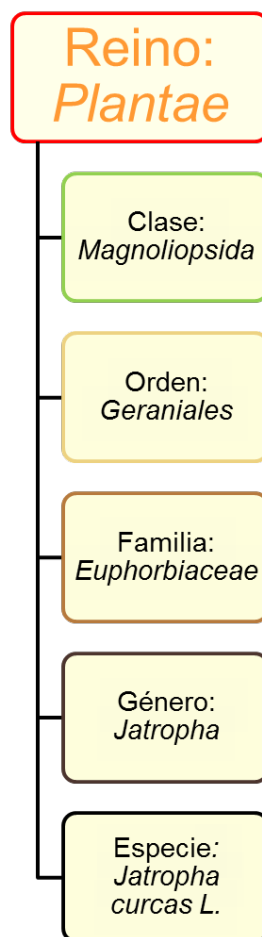
El CTV es una herramienta biotecnológica que comprende el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cultivos de células vegetales, tejidos y órganos bajo condiciones artificiales de ambiente, de nutrición y de asepsia (Ismidianty y Rachmi, 2010). El CTV está formado a su vez de múltiples técnicas mediante las cuales se puede ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos del tejido en estudio (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994).

En el presente trabajo se buscó determinar la ruta morfogénética más eficiente para la propagación *in vitro* de *Jatropha curcas* L. mediante la experimentación con diferentes medios de cultivo y explantes. Los resultados obtenidos buscan aportar la información necesaria para ser utilizado como referencia en trabajos posteriores con la especie *J. curcas*, especialmente en México, ya que se trabajó con una variedad mexicana.

1

Antecedentes

1.1 Aspectos generales de *Jatropha curcas* L.



1.1.1 Clasificación taxonómica

El género *Jatropha* L. pertenece al Reino *Plantae*, Subreino *Tracheobionta*, División *Magnoliophyta*, Clase *Magnoliopsida*, Subclase *Rosidae*, Orden *Geraniales*, Familia *Euphorbiaceae*, Subfamilia *Crotonoideae*, y fue determinado por Linneo incluyendo en él siete especies, dos de ellas hoy incluidas en el Género *Cnidoscolus*, una especie posteriormente segregada como tipo del género *Manihot* y otra especie hoy referida al género *Aleurites*; mientras que las tres especies linneanas restantes aún forman parte del género *Jatropha*: *J. gossypifolia*, *J. multifida* y *J. curcas* (Toral et al., 2008)(Figura 1).

1.1.2 Descripción botánica

J. curcas es un arbusto o pequeño árbol. Crece silvestre y en semicultivo. La especie fructifica hasta dos veces por año asociada a la temporada de lluvias. En la época de secas pierde sus hojas. Sus requerimientos en cuando a los suelos son mínimas por lo que puede vivir en suelos pobres y pedregosos (Schmook & Sánchez, 2000). En su fase adulta mide hasta 5 m de altura. La planta es monoica y posee flores unisexuales. La polinización es por insectos (Garg et al., 2011).

Figura 1. Clasificación taxonómica de *Jatropha curcas* L. (Toral et al., 2008).

ANTECEDENTES

Jatropha curcas L. presenta las siguientes características morfológicas (Toral et al., 2008):

Copa

Ancha e irregular, con fuste ramificado a poca altura.

Tallo

Es un cilindro verde, robusto, que produce ramas con savia láctea o rojiza viscosa.

Raíz

Generalmente se forman cinco raíces en los arbolillos, una central y cuatro periféricas.

Corteza

De color verde amarillenta, pálida y casi lisa, delgada como el papel. Corteza interna blanca con rayas rojas. Exuda una savia de sabor astringente.

Hojas

Simple, con peciolo largo. Son hojas anchamente ovadas, abiertamente cordadas en la base con cinco nervaduras; lámina acorazonada, de 7-32 cm de diámetro, con tres a cinco lóbulos, de margen entero, acuminados, poco profundos y grandes. El haz es verde; el envés verde claro, glabro o con tricomas finos (Figura 2). Filotaxis espiral (Figura 3).

Flores

Ubicadas en inflorescencias que se forman en las axilas de las hojas. Cada flor presenta diez estambres en el androceo, en dos espirales distintas de cinco cada uno. En el gineceo, tres estilos delgados y el estigma bifurcado. Son verdoso-amarillas y pubescentes. Los pétalos son de 6-7 mm de largo.



Figura 2. Hojas simples y en forma de corazón de *Jatropha curcas* L.

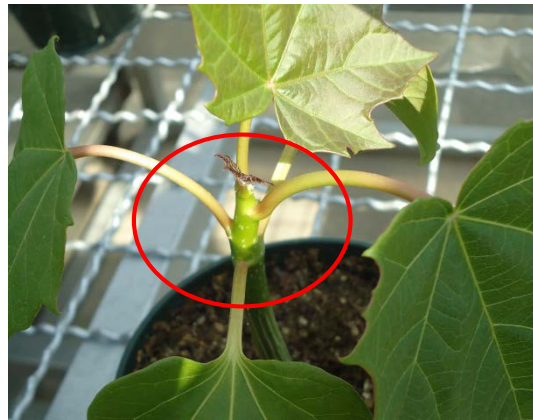


Figura 3. Filotaxis espiral de *Jatropha curcas* L.



Figura 4. Semillas escarificadas de *Jatropha curcas* L.



Figura 5. Fruto drupáceo con semillas de *Jatropha curcas* L.

Diversos autores coinciden en que su centro de origen es México y Centroamérica debido a investigaciones hechas a partir de herbarios localizados en diferentes países en donde se encontraron una mayor cantidad de ejemplares provenientes de México y diversos países de Centroamérica como Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá. Varios de los ejemplares también provenían del Caribe y en menor cantidad de Sudamérica (Heller, 1996). En la Figura 7 se muestra la distribución mundial de la especie *J. curcas* y su centro de origen.

Desde el Caribe, *Jatropha curcas* fue distribuida posiblemente por marineros portugueses a través de las Islas Cabo Verde y lo que hoy es Guinea Bissau hacia otras naciones de África y Asia. Actualmente es cultivada en la mayoría de los países tropicales y subtropicales (Garg et al., 2011).

Se han encontrado documentos en los que se menciona que el piñón ya se conocía antes del año 1810 en Cabo Verde y que su exportación comenzó en 1836 (Heller, 1996).



Figura 7. Distribución geográfica mundial y Centro de origen de *Jatropha curcas* L. (Heller, 1996)

1.1.4 Condiciones climáticas de crecimiento

J. curcas es una planta que pierde sus hojas en época de secas. Está adaptada a condiciones áridas y semiáridas (Heller, 1996), Münch (1986) reportó que el “piñón” pudo soportar años sin lluvia en Cabo Verde. Sin embargo, también crece exitosamente con altas precipitaciones (Heller, 1996).

Crece en climas tropicales y semitropicales (Schmook y Sánchez, 2000). La mayoría de las especies del género *Jatropha* se encuentran en áreas secas estacionales como pastizales de sabana o matorral espinoso (Heller, 1996).

La distribución actual del “piñón” muestra que la introducción ha sido más exitosa en regiones secas en los trópicos, con una precipitación media anual de entre 300 y 1000 mm.

El “piñón” se encuentra principalmente en altitudes que van desde 5 a 1000 msnm (Herrera *et al.*, 2001). Las áreas en donde han sido recolectados los ejemplares muestran temperaturas medias anuales por encima de los 20°C y hasta los 28°C (Heller, 1996).

Crece en suelos bien drenados, con una buena aireación y está bien adaptada a suelos pobres con un bajo contenido de nutrientes, suelos pedregosos, incluso puede vivir en cursos de arroyos secos y en laderas secas donde se propagan mediante semilla. En suelos gruesos o pesados la formación de raíces es reducida (Heller, 1996).

1.1.5 Usos

J. curcas es extensamente cultivada en los trópicos como cerco vivo, debido a que es fácilmente propagada con este propósito por esquejes y porque la especie no es consumida por el ganado, esto se puede encontrar en El Salvador, Guinea, Mali, Burkina Faso, México, entre otros (Pramanik, 2003).

En México se utiliza además de manera medicinal en afecciones de la piel y dolor, por lo que se consume como infusión. Además se reporta el consumo hojas jóvenes y las semillas tostadas, sirven como alimento en la región de Papantla, Veracruz (Herrera *et-al*, 2001).

En Cabo Verde el “piñón” fue plantado en zonas áridas para el control de la erosión del suelo y su madera llegó a utilizarse como material inflamable. En Madagascar es usada como planta soporte para la vainilla. En Nepal se ha utilizado en forma de biomasa fresca como abono en cultivos de arroz en los que ha aumentado el rendimiento en un 11% (Bahadur *et-al*, 2013).

En algunas regiones de Brasil se planta el piñón alrededor de las casa para protegerlas ante desgracias. En Usambara se utiliza para determinar la culpabilidad o la inocencia de algún acusado mediante la ingesta obligada del veneno del “piñón”, si el acusado vomita el veneno esto indica que es inocente, y si muere indica que era culpable (Pramanik, 2003).

Los extractos de cualquier parte del piñón muestran propiedades insecticidas, aunque se siguen haciendo pruebas antes de usarse para protección de cultivos (Pramanik, 2003).

Se fabrican jabones de manera tradicional utilizando el aceite de las semillas (Bahadur *et-al*, 2013).

Medicina

Preparaciones de la planta completa, incluyendo semillas, hojas y corteza, de manera fresca o cocida, son usadas en la medicina tradicional y con propósitos veterinarios. El aceite tiene una fuerte acción como purgante y es usado ampliamente para enfermedades de la piel y para mitigar el dolor como el causado por el reumatismo. La cocción de las hojas se usa contra la tos y como un antiséptico después del parto. En Nigeria las ramas se usan para masticarlas como un chicle (Bahadur *et al*, 2013).

La savia del tallo se utiliza para detener el sangrado de heridas. Nath y Dutta (1992) demostraron que la sanación de las heridas se debe a la curcaína, una enzima proteolítica aislada del látex. Kone-Bamba *et al.* (1987) demostraron los efectos coagulantes en el plasma sanguíneo.

Combustible diesel

Henning (1996) reportó el uso del aceite de *J. curcas* en motores en Segou, Mali durante la Segunda Guerra Mundial.

En Mali se ha demostrado que el aceite de *Jatropha curcas* L. es competitivo con el diesel importado, especialmente en áreas remotas donde el combustible no está disponible.

Puede utilizarse una mezcla de aceite vegetal (80%), petróleo (14%) y alcohol (6%) que puede utilizarse en todos los motores diesel, pero tendría sus limitaciones en áreas rurales debido a la falta de disposición de petróleo y alcohol (Heller, 1996).

1.2 Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)

El CTV es conocido también como propagación *in vitro* (del latín en vidrio) y se le nombra de esta manera porque se cultiva en recipientes de vidrio o plástico transparentes. La técnica consiste en cultivar fragmentos de tejidos vegetales con potencial de diferenciación en un medio de cultivo sintético provisto de un balance de nutrientes y hormonas (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994) bajo condiciones asépticas controladas que le brindan al cultivo un microambiente adecuado para cumplir los objetivos del estudio (Ismidianty y Rachmi, 2010).

El CTV es un método de propagación asexual, los individuos regenerados a partir de la planta madre son genéticamente idénticos entre ellos e idénticos a la planta madre (clones). Esto a diferencia de la propagación mediante semilla (sexual) en la que cada semilla tiene su propia información genética resultado de la combinación de material genético entre los progenitores, por lo que cada planta es un individuo único (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994).

El CTV comprende de diferentes técnicas como son:

- Cultivo de células
- Cultivo de anteras
- Cultivo de óvulos
- Cultivo de embriones
- Aislamiento y fusión de protoplastos
- Selección celular
- Suspensión de células

1.2.1 Aplicaciones del CTV y sus ventajas

El CTV puede utilizarse para distintos fines como: la micropropagación, el mejoramiento genético, la conservación de germoplasma y la obtención de plantas libres de virus y patógenos. En el presente trabajo se hizo uso de las ventajas que tiene en la micropropagación:

- Incremento del número de plantas por genotipo, es decir, en el método convencional de propagación asexual un esqueje da lugar a una planta, pero con el CTV un solo explante teóricamente puede dar lugar a una cantidad infinita de plantas.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Alta producción en el número de plantas es un espacio reducido y en un tiempo menor.
- Un mejor control sanitario en el material vegetal que se propaga.
- Facilidad en transportar el material vegetal de una ciudad o país a otro.
- Multiplicación rápida de poblaciones de plantas que cuentan con pocos individuos (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994).
- La producción de plantas genéticamente iguales que poseen una característica deseable, en ausencia de semillas y de los polinizadores necesarios para la producción de semillas.
- Producción de plantas a partir de semillas que presentan alguna dificultad para germinar y crecer (Ismidianty y Rachmi, 2010).

1.2.2 Establecimiento de cultivos

La interacción de los factores: tipo de explante, condiciones de asepsia, medios de cultivo y el microambiente de incubación, determinará la respuesta *in vitro*, debido a esto es necesario hacer consideraciones de cuáles son los objetivos de nuestra investigación que se pretenden alcanzar con el uso del CTV para poder determinar de manera específica el tipo de explante y el sistema de cultivo que serán utilizados (Roca y Mroginski, 1993).

Explante: llamado inóculo, es el órgano, tejido o fragmento de tejido o células que provienen del material vegetal que será la planta madre, para iniciar el cultivo *in vitro* (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994).

La selección del explante es el primer paso para el establecimiento de cultivos y depende de los objetivos perseguidos de la investigación y de la especie vegetal con la que se va a trabajar (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994) (Roca y Mroginski, 1993).

Suelen utilizarse ápices, hojas, raíces, cotiledones, anteras, e inclusive tejidos altamente especializados (Roca y Mroginski, 1993).

Normas de asepsia: Los hongos y las bacterias son los contaminantes más comunes en los cultivos, debido a que viven en cualquier lugar, de hecho, el medio de cultivo y las condiciones físicas les ofrecen un ambiente propicio para proliferar y pueden sintetizar metabolitos tóxicos para el explante e incluso competir por los nutrientes del medio de cultivo (Razdan, 2003).

Para evitar que los cultivos se contaminen se toman diferentes medidas de precaución: el trabajo y manipulación del material se debe hacer en ambientes asépticos, se esterilizan los medios de cultivo, se esteriliza el material con el que se va a manipular el material vegetal, y se sigue un protocolo de desinfección para la superficie de los explantes (Roca y Mroginski, 1993).

Medios de cultivo: son una mezcla de diferentes sustancias químicas sobre o dentro de los cuales se regula el crecimiento de los explantes, al igual que su diferenciación mediante un balance de nutrientes y hormonas (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994).

Los componentes y la preparación del medio de cultivo serán determinados por los objetivos que se persigan (Roca y Mroginski, 1993). De manera general sus componentes son: 1) nutrientes inorgánicos (macronutrientes y micronutrientes), 2) fuente de carbono, 3) suplementos orgánicos, 4) reguladores de crecimiento y 5) agente gelificante (en el caso de medios de cultivo sólidos y semisólidos) (Razdan, 2003).

El pH del medio de cultivo puede ser específico para cada planta, en general el pH va de un rango de 4.5 a 7.

Microambiente de incubación: la respuesta morfogénica puede ser alterada por la temperatura y por la calidad e intensidad de la luz, en general se recomienda que la iluminación sea con lámparas fluorescentes que brinden entre 1000 y 4000 lux de iluminación, en un fotoperiodo de 16/8 h y temperatura de 25 a 28°C (Roca y Mroginski, 1993).

Existen otros factores físicos bajo los que se encuentran los cultivos que son importantes, como el intercambio gaseoso, en el que comúnmente se trata de gases como el O₂, CO₂ y C₂H₄ y la humedad dentro del frasco, que se encuentra alrededor del 100% por lo que la planta no desarrolla sistemas de regulación hídrica (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994).

1.2.3 Vías regenerativas bajo condiciones *in vitro*

La embriogénesis somática y la organogénesis son dos procesos morfogénicos que se presentan en el cultivo *in vitro* de especies vegetales (Razdan, 2003).

Los factores que afectan la respuesta morfogénica son: 1) el genotipo, 2) las condiciones químicas del cultivo, 3) las condiciones físicas del cultivo y 4) el explante. El genotipo es un factor determinante en los procesos morfogénicos, desde la capacidad del explante para el establecimiento del cultivo hasta su capacidad de formar callo o para su diferenciación en nuevos órganos. Los medios de cultivo y las condiciones a las que serán sometidos los cultivos estarán determinados para cada situación en particular, debido a todos estos argumentos no se puede generalizar las metodologías o protocolos a seguir para cualquiera de las vías morfogénicas, aunque en general la respuesta morfogénica pasa por tres diferentes fases: fase de adquisición de la competencia, fase de inducción y fase de realización. En la primera fase, las células no responden al estímulo organogénico pero lo hacen en una fase de

desdiferenciación; en la segunda, las células son receptivas al estímulo morfogenético, por lo que hay una relación entre los reguladores de crecimiento y el órgano a desarrollar; y en la tercera, la célula sufre divisiones que resultarán en un órgano (Radice, 2004).

Organogénesis

La organogénesis se refiere a la formación de órganos en los explantes cultivados, ya sean raíces o brotes adventicios. La organogénesis puede ser directa cuando los órganos formados surgen a partir del explante, e indirecta cuando en el explante se origina callo y a partir de éste se da la formación de brotes adventicios (Razdan, 2003).

En la organogénesis, algunas células del explante comienzan a dividirse hasta formar un meristemoide, en este proceso la célula cambia su estado de diferenciación. El meristemoide posee las mismas características de una zona meristemática al estar compuesto por células pequeñas, isodiamétricas, de pared celular delgada, de varias vacuolas y de núcleo grande central. Cada meristemoide es capaz de desarrollarse y formar uno o más brotes adventicios (Roca y Mroginski, 1993).

El proceso por el cual se originan los meristemoides es llamado inducción, en el que una célula es inducida a dividirse a consecuencia de un gradiente de cambios cuantitativos en la disponibilidad de nutrientes y reguladores de crecimiento dentro del mismo explante y en el medio de cultivo (Tang y Newton, 2007).

Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es el proceso mediante el cual se originan embriones somáticos que, a diferencia de la embriogénesis cigótica, no son producto de unión de gametos sino que es un proceso asexual, a pesar de esto los embriones somáticos tienen, al igual que los embriones cigóticos, la capacidad de formar una nueva planta después de su germinación (Dutta e Ibaraki, 2008). Como resultado de la inducción se logra que la célula somática se convierta en una célula proembriogénica a partir de la cual se obtendrán los embriones somáticos (Mariani *et al.*, 2012).

La embriogénesis somática es posible bajo condiciones controladas de cultivo *in vitro*, pero también puede darse en la naturaleza, es conocida como apomixis (Asker y Jerling, 1992).

La embriogénesis somática puede ser directa, en donde los embriones somáticos se forman directamente sobre el explante o de manera indirecta, en donde hay una fase de formación de tejido calloso o una suspensión celular embriogénica a partir de los que hay una diferenciación hacia embriones somáticos (Radice, 2004).

1.2.4 Regeneración *in vitro* de *Jatropha curcas* L.

Se ha reportado la propagación *in vitro* de esta planta debido a que muchos investigadores han buscado una solución al problema de la producción de componentes químicos de interés que tiene *Jatropha curcas* L., varios de ellos de interés farmacológico, pero también los hay de interés alimentario y como una alternativa para la producción de biodiesel.

Datta *et al.* (1993) citado por Garg *et al.* (2011) lograron la propagación de *Jatropha curcas* L. a partir de plantas madre de 7 meses de edad. De éstas se tomaron explantes que consistieron en nodos. De los medios utilizados para iniciar los cultivos y que permitió la proliferación de los brotes fue el medio MS basal adicionado de 22 μM de BA y 55.6 μM de sulfato de adenina, en este medio se produjeron 6.2 \pm 0.56 brotes por explante con un longitud de 2 \pm 0.18 cm después de 4 a 6 semanas. Se transfirieron a un medio MS basal adicionado con 2.3 μM de Kn, 0.5 μM de AIB y 27.8 μM de sulfato de adenina por 4 semanas y así tanto el número de brotes como su longitud se vieron significativamente mayores, con 30.8 \pm 5.48 brotes por explante y de una longitud de 4.8 \pm 0.43 cm. Para el enraizamiento se utilizó un medio MS basal adicionado de 1 μM de AIB por 2 a 3 semanas y después de la elongación de las raíces ocurrió al transferirlas a un medio MS basal por 2 a 3 semanas, con una tasa de enraizamiento del 52%. Las plántulas de 12 a 16 semanas fueron aclimatizadas en suelo exitosamente con una tasa de aclimatización de 78%.

Li *et al.* (2007) reportaron la transformación genética de *Jatropha curcas* L. mediante *Agrobacterium tumefaciens* en la que se producen callos resistentes a fosfotricina después de 4 semanas en medio MS adicionado con 0.05 mg L⁻¹ AIB, 1.5 mg L⁻¹ BA, 1 mg L⁻¹ de fosfotricina y 500 mg L⁻¹ cefotaxima. El callo fue transferido a una medio MS adicionado de 1.5 mg L⁻¹ BA, 0.05 mg L⁻¹ AIB, 0.5mg L⁻¹ AG3, 1 mg L⁻¹ fosfotricina y 250 mg L⁻¹ cefotaxima, en donde la hubo una diferenciación a brotes de un 33% del callo. Los brotes resistentes fueron transferidos a un medio MS al 50% adicionado de 0.3 mg L⁻¹ AIB. El 13% de los explantes inoculados produjeron plantas después de aproximadamente 4 meses. Este procedimiento es muy útil tanto para la introducción de genes de interés en *J. curcas* como para el análisis molecular de la función de los genes (Cuadro 1).

Soomro y Memon (2007) han reportado el establecimiento de callos y cultivos en suspensión de *Jatropha curcas* L. a partir de explantes de hoja e hipocótilo de plantas de 4 días de edad en medios MS con distintas concentraciones de 2,4-D, BA, AG3 y leche de coco. El mejor crecimiento de callo fue en el medio con 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D sólo y con 2%v/v de leche de coco con el hipocótilo como explante, el callo creció de manera rápida de 7 a 30 días y posteriormente disminuyó su tasa de crecimiento. Este callo friable y de color verde fue utilizado para el establecimiento de cultivos en suspensión homogéneos y clorófilos. El máximo crecimiento se llevó a cabo en un medio con 0.5 mg L⁻¹ 2,4-D con un inóculo inicial de densidad celular del 1% (Cuadro 1).

Thepsamran *et al.* citado por Garg *et al.* (2011) reportan la multiplicación de brotes a partir de yemas axilares utilizadas como explantes en un medio MS adicionado con 2.22 micromolar de BA y 0.049 micromolar de AIB, el cual fue el medio con más proliferación de brotes, alrededor de 5.9 brotes por explante

transcurridas 6 semanas. Los brotes fueron transferidos a un medio MS con 2.6 micromolar de AIB y después de 5 semanas se pasaron a un medio MS sin reguladores de crecimiento.

Singh *et al.* citado por Garg *et al.* (2011) reportan un protocolo de regeneración utilizando segmentos de tallo de genotipos seleccionados de *Jatropha curcas* L. en donde la inducción se hizo en un medio de cultivo MS adicionado con 1 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ Kn, los brotes fueron transferidos a un medio MS adicionado con 0.5 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ AIA. Los brotes de 4 a 5 cm de largo fueron individualizados y cultivados en medio MS con diferentes concentraciones de AIB, el 40% de enraizamiento fue logrado en el medio con una concentración de 0.1 mg L⁻¹ AIB después de 5 semanas. Además se hizo el enraizamiento directo sumergiendo la parte basal de los brotes en medio MS con 0.1 mg L⁻¹ AIB y una matriz de alginato de sodio al 3.5%, colocadas en bolsas de polietileno con sustrato estéril, agua destilada y fungicida, en donde se alcanzó un 65% de enraizamiento en tres semanas. Las plantas fueron transferidas a un invernadero con un 92% de establecimiento.

Mariani *et al.* (2012) reportan el primer artículo sobre embriogénesis somática directa en *J. curcas* en el cual toman como explante el hipocótilo y se coloca en medio MS basal adicionado con combinaciones de 2,4-D (9 x 10⁻⁶ M, 1.35 x 10⁻⁵ M, 1.8 x 10⁻⁵ M) y BAP (0 M, 4.4 x 10⁻⁶ M) y Kn (0 M, 4.4 x 10⁻⁶ M), AIA (1.14 x 10⁻⁵ M, 1.71 x 10⁻⁵ M, 2.28 x 10⁻⁵ M) y BAP (0 M, 5.7 x 10⁻⁶ M). El callo embriogénico se transfiere a un medio de células en suspensión MS más 6.75 x 10⁻⁶ M de 2,4-D y 4.4 x 10⁻⁷ M de Kn. De este medio las células en suspensión se trasladaron a un medio MS más 1.35 x 10⁻⁵ M de 2,4-D y 4.4 x 10⁻⁷ M de Kn. Las células se subcultivaron en dos medios diferentes de inducción embriogénica antes de pasar al medio de germinación de embriones que estaba formado por MS más vitaminas Gamborg, 3 ppm de AG3 y 1 ppm de AIA, en el que la germinación de los embriones fue de 63.3% pero no hubo casi desarrollo de plántulas (Cuadro 1).

Tiran *et al.* (2010) utiliza un genotipo sobresaliente del cual se tomaron los explantes que consistieron en yemas apicales y axilares para obtener la propagación vía organogénesis y utilizando a la hoja como explante para la vía de la embriogénesis somática. Para la organogénesis se parte de las plantas resultado de la germinación de semillas, de éstas se toman las yemas apicales y axilares, se pasan por un método de desinfección con cloro al 10 o 15% y se cultivan en un medio MS más BAP (0.5mg L⁻¹), se subcultivan en el mismo medio para la multiplicación y elongación de los brotes, para el enraizamiento se colocan en un medio MS al 50% adicionado de AIB y se aclimatizaron. Para la vía de la embriogénesis somática se utilizaron las hojas como explante, se cortó la hoja en cuadros de 1 cm² y se desinfectaron con detergente y cloro, para la inducción de callo los explantes se cultivaron en medio MS adicionado con Kn (3mg L⁻¹) y AIB (3mg L⁻¹) y se incubaron en luz. Se transfirieron los callos a un medio MS más Kn y AIB, para la multiplicación y germinación de los embriones se pasan a un medio MS más Kn y AIB, posteriormente se pasa a la fase de aclimatización (Cuadro 1).

ANTECEDENTES

Cuadro 1. Trabajos previos de la Regeneración de *Jatropha curcas* L.

Explante	Medio de cultivo	Vía regenerativa	Referencia
Nodos axilares	MS + BA (1.0-4.0 mg L ⁻¹) + NA(0.25-2.0 mg L ⁻¹) + AIB(0.25-2.0 mg L ⁻¹)	Organogénesis directa.	Shrivastava y Banerjee, 2008.
Nodos axilares	MS+BA (22.2mg L ⁻¹) + Adenina(55.6 mg L ⁻¹)	Organogénesis indirecta	Manjari <i>et-al</i> , 2007.
Cotiledones	MS + BA (1.5 mg L ⁻¹) + AIB (0.05 mg L ⁻¹)	Organogénesis directa	Li <i>et-al</i> , 2007.
Epicótilos	MS + AIB (1.0 mg L ⁻¹) + BA (0.5 mg L ⁻¹)	Organogenesis directa e indirecta	Qin <i>et-al</i> , 2004.
Hipocótilos	MS+ BA (0.01 – 2.0 mg L ⁻¹) + AIB (0.5 – 1.0 mg L ⁻¹)	Organogénesis indirecta	Sujatha <i>et-al.</i> , 2000.
Nudos con yema axilar	MS+ AIA (1 μM) + 2,4-D (1 μM)+ BA (10 μM)+ Kin (10 μM)	Organogénesis indirecta	Coutiño-Cortés <i>et-al</i> , 2013.
Hipocótilo	MS+ 2,4-D (1.35×10 ⁻⁵ M)+ Kn (4.4×10 ⁻⁶ M)	Embriogénesis somática	Ismidianty y Rachmi, 2010
Hoja e hipocótilo	MS+ 2,4-D (0.5 mg L ⁻¹)+ leche de coco	Embriogénesis somática	Soomro y Memon, 2007
Hipocótilo	MS+ 2,4-D (9 x 10 ⁻⁶ M, 1.35 x 10 ⁻⁵ M, 1.8 x 10 ⁻⁵ M)+ BAP (0 M, 4.4 x 10 ⁻⁶ M) y Kn (0 M, 4.4 x 10 ⁻⁶ M).	Embriogénesis somática directa	Mariani <i>et-al</i> , 2012
Yemas axilares y apicales; hoja	MS+ BA(0.5 mgL ⁻¹)/ MS+ Kn (3mg L ⁻¹)+ AIB (2 mg L ⁻¹)	Organogénesis indirecta/embriogénesis somática indirecta	Tiran <i>et-al</i> , 2010

1.3 Biocombustibles

1.3.1 Clasificación

Llamamos combustible a cualquier material que es capaz de liberar energía una vez que se oxida de manera violenta con desprendimiento de calor poco a poco.

Existen diferentes tipos de combustibles: combustibles sólidos, combustibles fluidos, combustible fósil y biocombustibles.

Considerando a la biomasa como una fuente alternativa al combustible fósil, los materiales biológicos pueden utilizarse como combustible: los aceites vegetales, de girasol o soja; la remolacha azucarera y los cereales que producen bioetanol; los residuos orgánicos como el aceite de cocina usado, el estiércol y los residuos vegetales.

Los biocombustibles son aquellos combustibles obtenidos de una fuente biológica, de manera renovable a partir de restos orgánicos.

Los biocombustibles se clasifican en dos, de acuerdo al motor al que se aplican: para motores de gasolina se aplican los bioalcoholes y sus derivados; y

para los motores diesel, los aceites vegetales y sus derivados (Campos y Marcos, 2008).

Los biocarburantes son biocombustibles que pueden ser empleados en un motor de combustión interna, que proceden de materias primas vegetales, a través de transformaciones biológicas y físico-químicas. De los diferentes biocarburantes los más importantes desde el punto de vista económico son el bioetanol y el biodiesel. Estos combustibles pueden utilizarse en parte para sustituir costosas importaciones de petróleo por parte de países sin litoral (Heller, 1996).

Las ventajas ambientales del uso de los biocarburantes son: la reducción entre un 40% y un 80% de emisiones de dióxido de carbono con respecto a los combustibles convencionales. Además, no emiten dióxido de azufre ni partículas favoreciendo la disminución de la concentración de partículas en suspensión emitidas, de metales pesados, monóxido de carbono, de hidrocarburos aromáticos policíclicos y de compuestos orgánicos volátiles (Angulo *et al.*, 2008).

El Biodiesel es una mezcla de ésteres metílicos que se obtienen a partir de un proceso químico llamado transesterificación (Benjumea *et al.*, 2009).

1.3.2 Especies vegetales utilizadas para producir biodiesel

La producción de aceites vegetales se destina en su mayoría al sector alimentario, y sólo se destina una pequeña parte para otros usos no alimentarios como lo es la producción de glicerina, lubricantes y la producción de biodiesel. Para la producción de biodiesel el aceite de canola es la materia prima más utilizada, enseguida es el aceite de girasol, seguido por el aceite de soja y palma. Son pocas las especies vegetales utilizadas para la producción de aceite vegetal. Existe una problemática en el hecho de que el volumen de aceite necesario para la producción de biodiesel proviene del mismo cultivo destinado a fines alimentarios. Por tal motivo es que se deben usar materias primas distintas a las convencionales para que se destinen a la producción de biodiesel (Benjumea *et al.*, 2009).

Los aceites vegetales alternativos son aquellos que pueden brindar una mejor opción para destinarlos hacia la producción de biodiesel, algunas de las especies vegetales que poseen el aceite son la *Brassica carinata*, la *Cynara cardunculus*, *Camelina sativa*, *Crambe abyssinica* y *Jatropha curcas*. Estas especies no son comestibles lo cual es una ventaja para su uso como materia prima energética.

1.3.3 *Jatropha curcas* una nueva alternativa

En la búsqueda de especies vegetales que pueden ser procesadas para proporcionar un sustituto al combustible diesel, *Jatropha curcas* representa una nueva alternativa, ya que presenta una serie de ventajas que la han posicionado como una de las mejores opciones de cultivo destinado a la producción de biodiesel.

Características favorables:

- La toxicidad de la planta es percibida por los animales y no la consumen.
- Ésta planta está clasificada como una especie no invasora, por lo que el cultivo queda bien establecido.
- La semilla contiene un importante contenido de proteína (25-30%) y grasa (55-60%) (Herrera *et al.*, 2001). El aceite puede ser usado en motores para diesel cuando se adiciona al combustible diesel o (Ismidianty y Rachmi, 2010).
- Tiene altas tasas de rendimiento. El rendimiento por hectárea es de cinco toneladas de semilla, de las cuales dos toneladas son de aceite (Herrera *et al.*, 2001).
- Requiere solamente de una moderada cantidad de agua de lluvia y puede soportar largos periodos de sequía, ya que es altamente resistente, si se presentan condiciones de alta precipitación *J. curcas* se ve beneficiada y presenta un mayor crecimiento.
- Es un cultivo permanente, que una vez establecido puede durar por varias décadas, por lo que elimina las normales preparaciones anuales de semillas y siembra.
- Debido a su baja demanda en fertilidad del suelo, es ideal para reforestar áreas marginales, así permite el aprovechamiento de suelos no aptos para producción.
- No desplaza otros cultivos importantes para la alimentación humana (Toral *et al.*, 2008).
- Aprovechamiento de los subproductos derivados de la elaboración del biodiesel, como lo son la pasta residual rica en proteínas (Herrera *et al.*, 2001) y la glicerina que se forma como subproducto de la transesterificación (Benjumea *et al.*, 2009).

2

Objetivos

Objetivo general

- Determinar el proceso morfogénico más eficiente para la micropropagación de *Jatropha curcas* L.

Objetivos particulares

- Seleccionar las mejores condiciones para la germinación de semilla, tanto en condiciones *in vitro* y de invernadero.
- Seleccionar el mejor explante para la regeneración de *Jatropha curcas* L.
- Probar diferentes medios para inducir embriogénesis somática y organogénesis.

3

Materiales y métodos

3.1 Ruta crítica

Para realizar esta investigación se siguió la ruta crítica que se muestra en la Figura 8.

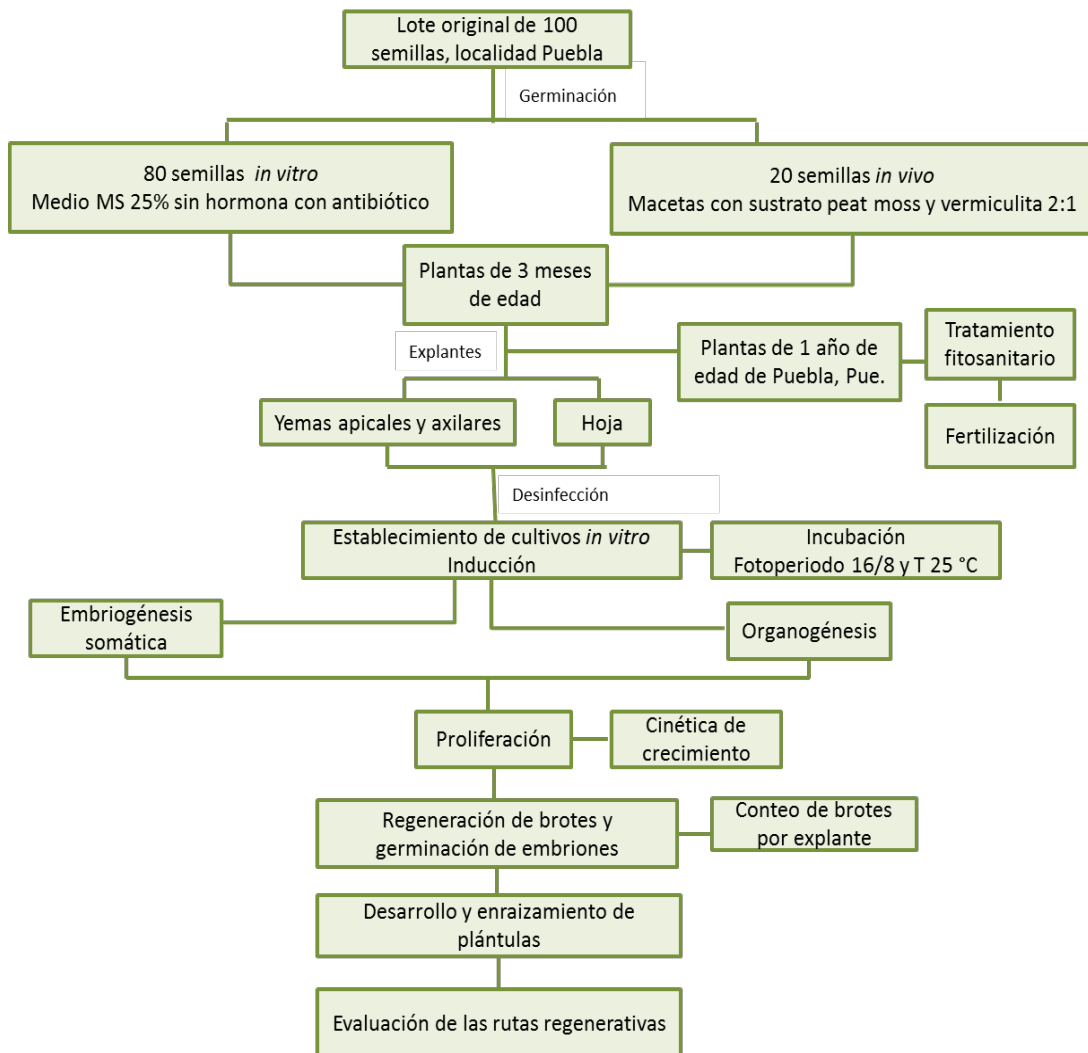


Figura 8. Ruta crítica para la regeneración de *Jatropha curcas* L.

3.2 Lugar donde se realizó el trabajo de investigación

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 116 de Cultivo de Tejidos Vegetales que pertenece al departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Maestra en Ciencias Teresa de Jesús Olivera Flores y formó parte de un proyecto de investigación en el que se trabajó con el Dr. Modesto Javier Cruz Gómez del laboratorio 122 del Edificio de Ingeniería Química de la Facultad de Química, quien nos otorgó el material biológico inicial.

3.3 Material biológico

Esta investigación se inició con 100 semillas de *Jatropha curcas* L. de origen Zacatlán, Puebla.

Se destinaron:

- 80 semillas para germinación *in vitro*.
- 20 semillas para germinación en condiciones de invernadero.

Las semillas destinadas a germinación *in vitro* fueron sometidas a un protocolo de desinfección que ya se había establecido para el proyecto, pues ya había trabajo previo. Para llevar a cabo el método de desinfección de semillas se utilizó:

- Alcohol al 70%
- Hipoclorito de sodio al 30%
- Tritón 100 (3 gotas por cada 250 ml)
- Microdyn (15 gotas por cada 250 ml)
- Benomil 4g L⁻¹
- Agrimycin 500[®] 4g L⁻¹
- H₂O desionizada estéril

Se siguió el procedimiento de la Figura 9, en donde la agitación mencionada en cada paso se realizó en una agitadora magnética y dentro de la campana de flujo laminar. Al finalizar el proceso de desinfección de las semillas, éstas fueron colocadas siguiendo su polaridad en frascos con medio para germinación previamente preparado y esterilizado, se colocaron de 3 a 4 semillas por cada frasco. La composición del medio de germinación fue: sales MS al 25%

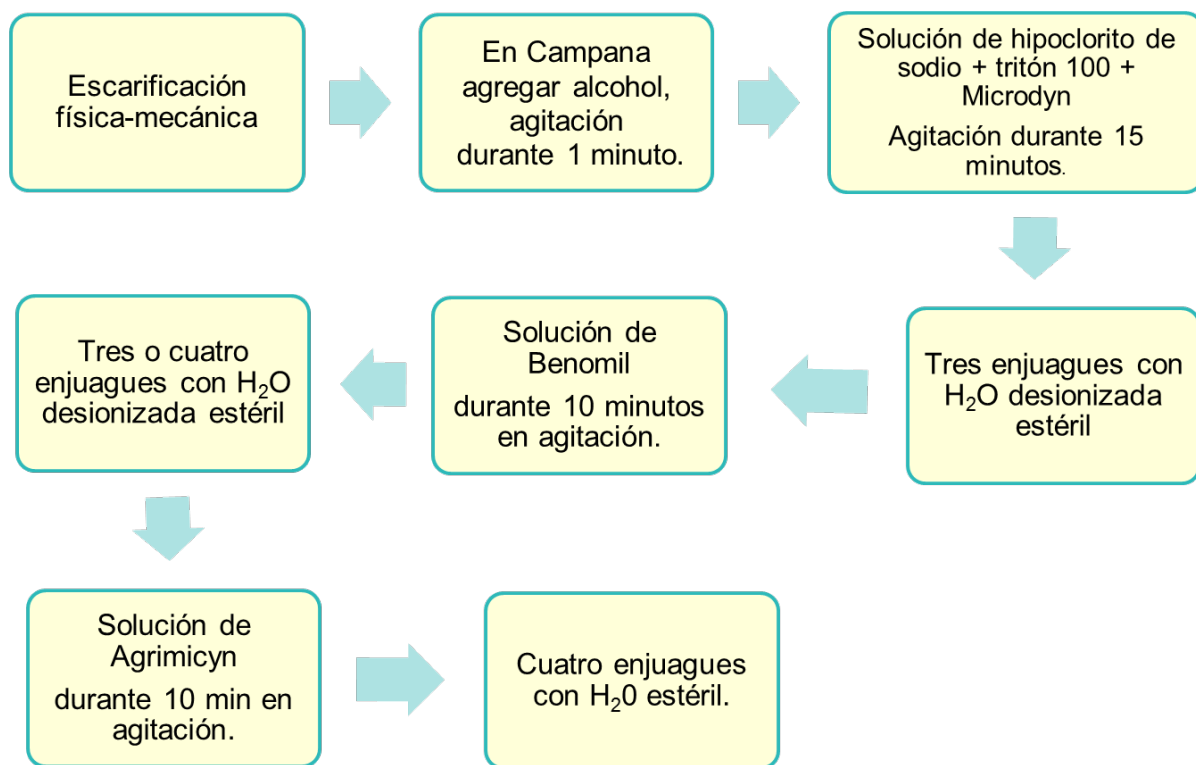


Figura 9. Procedimiento del protocolo de desinfección de semillas.

En cuanto a las semillas destinadas para su germinación en invernadero, se necesitaron los siguientes materiales:

- Semilleros limpios
- Sustrato peat moss y vermiculita en proporción 2:1
- Agua corriente.

Se hizo una observación e identificación de las partes de la semilla para colocarla en la polaridad correcta dentro de los semilleros. El sustrato fue depositado en los semilleros casi hasta el borde, las semillas fueron colocadas cuidadosamente casi en la superficie de los semilleros, sólo con un poco de sustrato sobre ellas para permitir el paso de luz solar. Fueron regadas con agua corriente tres veces a la semana o según la demanda de agua.

Las plantas obtenidas a partir de semillas que se utilizaron al inicio de esta investigación fueron insuficientes por lo que se compraron plantas de un año de edad de origen Puebla, que fueron puestas bajo condiciones de invernadero. Se fertilizaron mediante un riego semanal de una solución MS al 25% + BA 1mg L⁻¹ + vitaminas R2 al 100%. Las plantas fueron regadas tres veces por semana con agua corriente. Como una medida preventiva se les sometió a un tratamiento fitosanitario que consistió en la aspersion una vez por semana de Agrimycin 500® 4g L⁻¹ y Benomil 4g L⁻¹ durante un mes. Las plantas perdieron todas sus hojas por

tres razones: estas plantas de *J. curcas* fueron transportadas por carretera por lo cual llegaron un poco maltratadas, además sufrieron un periodo de adaptación climática, y por último el tratamiento fitosanitario. Así la fertilización continuó por un mes más y el tratamiento fitosanitario fue suspendido.

Las plantas obtenidas a partir de la germinación en condiciones de invernadero con tres meses de edad fueron las primeras donadoras de explantes. Posteriormente fueron las de 1 año de edad.

3.3.1 Preparación de medios de cultivo

Este trabajo de investigación continuó con el trabajo previo llevado a cabo en el laboratorio de CTV, por lo que se utilizaron los medios nutritivos que habían generado los mejores resultados: el medio JO-1 (MS+BA 3mg L⁻¹+ Adenina 2.5mg L⁻¹) para la vía organogénica y el medio JE-1 (N6+ 2,4-D 4mg L⁻¹) para la embriogénesis somática.

Además se utilizaron otros medios de cultivo basados en el artículo de Tiran *et al.* que son: el medio JO-2 (MS+ BA 0.5mg L⁻¹) y JE-4 (MS+ AIB 2mg L⁻¹+ Kin 3mg L⁻¹).

Y finalmente se utilizó una combinación de los medios que pertenecían a la misma vía morfogénica, es decir, se combinó el medio JO-1 con el medio JO-2 y se obtuvo el medio JO-3 (MS+BA 3 mg L⁻¹). Y los medios JE-1 y JE-4 se combinaron para dar lugar al medio JE-5 (MS+ 2,4-D 4mg L⁻¹).

Los medios de cultivo son denominados así en donde:

- J indica el nombre del género *Jatropha*
- O indica la vía morfogénica organogénesis.
- E indica la vía morfogénica embriogénesis somática.
-

En todos los medios nutritivos se utilizaron las sales del medio Murashi y Skoog (1962) (Anexo 1), excepto el medio denominado JE-1 en donde se utilizaron sales N6 (Anexo 1). Estos medios fueron adicionados con vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento, una fuente de carbono y un agente gelificante. La composición específica de cada medio durante las diferentes etapas de este trabajo se muestra en el Cuadro 2.

Los medios de cultivo fueron sometidos a una esterilización en autoclave vertical a 122 °C y a 1.22 Kg cm² durante 18 minutos.

3.4 Condiciones de incubación

Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones de incubación a 25±2 °C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

3.5 Establecimiento de cultivos *in vitro* de *Jatropha curcas* L.

El establecimiento de cultivos *in vitro* de cualquier especie parte de la previa investigación bibliográfica y del material vegetal con el que se cuente.

3.5.1 Selección del explante

Para evaluar el mejor explante para la regeneración de *J. curcas* se probaron dos tipos de explante. Los explantes seleccionados fueron hoja y yemas (apicales y axilares).

Los explantes fueron tomados cuando la planta de tres meses de edad tenía un mínimo de dos nudos de altura, en el caso de las plantas producto de la germinación de semilla en invernadero. Se tomaron de estas plantas las yemas axilares, aquellas que se encontraban por arriba del segundo nudo y las yemas apicales. En cuanto a los explantes de hojas se tomaron aquellas que a simple vista estuvieran sanas, es decir, sin ningún tipo de herida o de coloración amarilla.

Las plantas de origen Puebla, Puebla de igual manera fueron donadoras de explantes, estos explantes también consistieron en yemas axilares y hojas, las cuales se eligieron por su apariencia física saludable y aproximadamente de la parte media de la planta, es decir, no se eligieron tan cercanas a la yema apical ni tampoco a la parte basal de la planta.

3.5.2 Desinfección del explante

Ambos tipos de explantes fueron sometidos a un mismo método de desinfección. El método utilizado se basó en un método de desinfección de hojas de violeta africana, modificando el tiempo entre cada solución desinfectante debido a las diferencias entre las hojas. El método de desinfección requirió de:

- Solución jabonosa
- Etanol al 70%
- Hipoclorito de sodio al 8% v/v
- Ácido ascórbico 200 mg L⁻¹
- Ácido cítrico 200 mg L⁻¹
- Cefotaxima 125 mg L⁻¹

Se siguió el procedimiento de la Figura 10, en donde cada paso requiere de agitación suave, de manera manual dentro de la campana de flujo laminar. Para finalizar el método de desinfección se realizan enjuagues con agua desionizada estéril y una solución antioxidante que debe ser previamente preparada y esterilizada, la cual se compone de ácido ascórbico 200 mg L⁻¹ y ácido cítrico 200 mg L⁻¹, y cefotaxima 125 mg L⁻¹.

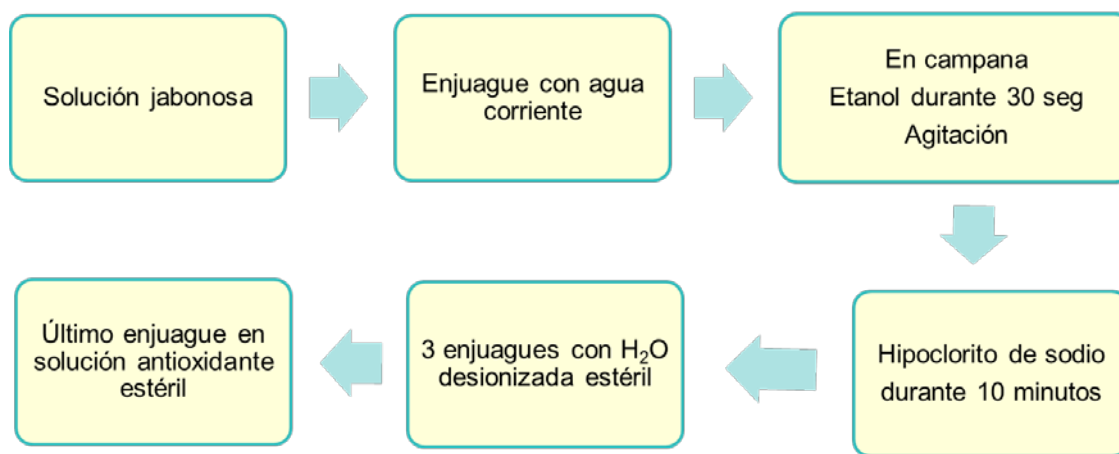


Figura 10. Procedimiento del método de desinfección de explantes.

3.5.3 Disección del material vegetal

Después del método de desinfección del material vegetal, éste se mantuvo dentro de la campana de flujo laminar inmersas en una solución antioxidante, permanecieron ahí durante el tiempo transcurrido entre el termino de la desinfección y la siembra de los explantes.

Dentro de la campana de flujo laminar se introdujeron los siguientes materiales ya estériles:

- Vidrios de 10 cm² aproximadamente
- Pinzas
- Bisturí del número 3 con navaja del número 11
- Frascos con medio de inducción
- Cajas Petri
- Tubo de ensayo con alcohol al 96%

Sobre los vidrios se colocaron de manera individual los órganos desinfectados, comenzando por las yemas apicales y axilares. De ellas se eliminaron solamente los excesos de tallo que tenían, con la finalidad de que sólo se sembraran las yemas, con precaución de no lastimarlas. El tamaño de estos explantes fue de aproximadamente 1.5 ó 2 cm de largo.

En cuanto a las hojas de igual manera se fueron colocando una a una sobre el vidrio con las pinzas. Con ayuda del bisturí se eliminó todo el margen de la hoja.

La hoja se seccionó en tres partes:

- Apical
- Media
- Basal

De cada una de esas partes se cortaron segmentos de 1cm² con y sin nervadura central. Estos segmentos fueron los explantes utilizados de hoja.

3.5.4 Siembra de explantes

Se realizaron 4 ensayos diferentes, cada uno basado en el resultado del anterior.

Las yemas apicales y axilares fueron sembradas individualmente en cada frasco con medio de cultivo. Se colocaron de manera que siguieran su polaridad y aproximadamente la mitad de la yema quedó inmersa en el medio de cultivo.

En cuanto a los explantes de hoja se sembraron tres por cada frasco con medio de cultivo. Los segmentos de 1cm² fueron colocados sobre el medio de cultivo, con el haz hacia arriba y el envés de la hoja en contacto con el medio de cultivo.

Primer ensayo con plantas obtenidas a partir de la germinación en invernadero.

Se utilizaron ambos tipos de explantes en los respectivos medios de cultivo de inducción (Cuadro 2), es decir, las yemas apicales y axilares en los medios de organogénesis y las hojas para los medios de embriogénesis somática. Los medios de cultivo de la vía organogénica contaron con 5 repeticiones cada uno y los de la vía embriogénica con 20 repeticiones cada uno.

Se realizó el subcultivo cada tres semanas.

Segundo ensayo con plantas obtenidas a partir de la germinación en invernadero.

Se utilizaron yemas apicales, y segmentos de hoja de 1 cm² y se sembraron en los correspondientes medios de inducción (Cuadro 2); las yemas en medios de inducción de organogénesis y las hojas en medios de inducción de embriogénesis somática. Los medios de cultivo de la vía organogénica contaron con 5 repeticiones cada uno y los de la vía embriogénica con 20 repeticiones cada uno.

El subcultivo se hizo cada dos semanas.

Tercer ensayo con plantas de origen Puebla de un año de edad.

Se utilizaron ambos tipos de explantes y se sembraron en los correspondientes medios de inducción (Cuadro 2). Los medios de cultivo de la vía organogénica contaron con 5 repeticiones cada uno y los de la vía embriogénica con 20 repeticiones cada uno.

El subcultivo se realizó cada dos semanas.

Cuarto ensayo con plantas de origen Puebla de un año de edad.

Se utilizaron como explantes únicamente los segmentos de hoja y se sembraron en los tres medios de inducción correspondientes a la vía regenerativa organogénesis (Cuadro 2). Cada medio de cultivo con el que se trabajó (JO-1, JO-2 y JO-3) tuvo un total de 20 repeticiones, es decir, 20 frascos con 3 explantes de hoja en cada uno.

Se realizó el subcultivo cada dos semanas.

Una vez llevada a cabo la inducción, se hicieron observaciones periódicas en las que se evaluaron los cambios que presentaban los explantes de hoja para cada medio. Las observaciones tuvieron como objetivo detectar el momento en el que la formación de callo aparece, la cantidad de callo medida en porcentaje, la cantidad de oxidación medida en porcentaje, determinar el número de brotes por explante, la longitud de los brotes y el peso fresco.

Una vez obtenido el callo se tomó 1g de callo por frasco, en total de 3 a 5 repeticiones para cada medio, se pesaron en balanza analítica cada semana para obtener una cinética de crecimiento, que posteriormente fue sometida a análisis estadísticos.

Cuando se contaba ya con brotes, éstos fueron contados y medidos cada semana para obtener el número de brotes por explante y la longitud que alcanzaron.

Para dar validez al conjunto de datos resultado de todas estas evaluaciones antes mencionadas se realizó la prueba estadística T de Student a

los datos de porcentaje de callo, porcentaje de oxidación y número de brotes por explante de cada medio de cultivo. La prueba estadística T de Student permite saber si hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos para poder identificar aquel que da mejores resultados.

3.6 Proliferación y mantenimiento de cultivos de organogénesis y embriogénesis somática.

Después de haber permanecido bajo inducción, tanto de la vía regenerativa de organogénesis como de embriogénesis somática, fueron transferidos a sus respectivos medios de proliferación (Cuadro 2), lo cual transcurrió hasta que se observó la aparición de brotes, que fue en aproximadamente 4 meses a partir de la siembra de los explantes.

Cada frasco contenía callo embriogénico y organogénico respectivamente, y en condiciones axénicas dentro de la campana de flujo laminar fueron cuidadosamente transferidos al nuevo medio. Al contenido de cada frasco se le eliminó el callo oxidado y aquellos restos de tejido madre que aún perduraban.

Se tuvo además extrema precaución para manipular el callo debido a la presencia de brotes. Aquellos frascos que contenían una cantidad alta de callo fueron divididos en dos o tres partes de tal manera que los nuevos frascos con medio de proliferación no estuvieran saturados.

En la etapa de proliferación se mantuvieron los subcultivos cada dos semanas. Permanecieron en estos medios de proliferación aproximadamente tres meses.

3.7 Regeneración de plántulas.

Después de transcurridos tres meses aproximadamente en los diferentes medios de proliferación (Cuadro 2) se transfirieron todos los cultivos de cada vía regenerativa a un mismo medio de Regeneración (MS+BA 0.5mg L⁻¹+AIA 0.5mg L⁻¹). Se decidió hacer este cambio de medio de cultivo debido a la presencia de brotes, pues éstos ya habían desarrollado pequeñas hojas.

Los cultivos se mantuvieron en este medio y se hicieron observaciones del callo y de los brotes, los cuales se evaluaron sólo bajo un criterio visual, acerca de su tamaño y desarrollo, aquellos que ya alcanzaban un mayor tamaño, grosor y tenían hojas definidas, fueron individualizados, es decir, se aislaron del callo del cual provenían.

Los callos con brotes en desarrollo permanecieron en el medio de Regeneración hasta que los brotes alcanzaran un mayor tamaño y pudieran ser individualizados. Y aquellos brotes ya individualizados se colocaron en frascos con medio de Enraizamiento MS+BA (6mg L⁻¹, 3mg L⁻¹)(Cuadro 2).

3.8 Enraizamiento.

Aquellos explantes que fueron individualizados y colocados en frascos con medio de regeneración (Cuadro 2) fueron evaluados basados en sus características físicas, y cuando se observó que ya habían alcanzado una mayor altura, grosor y número de hojas, fueron transferidos a un medio nuevo, el medio de enraizamiento.

Se siguió el siguiente procedimiento en condiciones axénicas y dentro de la campana de flujo laminar:

Las pequeñas plántulas, que antes se mencionaron como brotes desarrollados e individualizados, se sacaron de los frascos que tenían medio de cultivo de regeneración y fueron colocadas en un frasco con medio de cultivo líquido de enraizamiento (medio 1, Cuadro 2).

Las plántulas se dejaron en este medio líquido, dentro de campana, con el frasco cerrado, durante tres horas, con agitación manual periódica, cuidando que la base del tallo de las plántulas estuviera inmersa en el medio de cultivo.

Transcurridas las tres horas se sacaron del medio líquido de enraizamiento y se colocaron individualmente en frascos de vidrio medianos con taparosca que contenían medio sólido MS sin reguladores de crecimiento. Se hicieron subcultivos periódicos de cada dos semanas en el medio sólido durante tres meses.

Tras una evaluación de la presencia o ausencia de la formación de raíces en las plántulas regeneradas, se hizo una nueva estimulación a las plántulas que consistió en pasarlas al medio 2 de enraizamiento (Cuadro 2) durante una semana y posterior a ese tiempo transferirlas a medio MS sin reguladores de crecimiento. Se hicieron subcultivos periódicos cada dos semanas durante dos meses.

De igual manera se hicieron observaciones constantes para detectar la presencia de raíces en cada una de las plántulas. Se necesitó de otro estímulo para las plántulas, por lo que las plántulas fueron transferidas al medio 3 de enraizamiento (Cuadro 2) y transcurridas dos semanas en este medio se pasaron a medio MS sólido sin reguladores de crecimiento. Se hicieron subcultivos cada dos semanas durante dos meses.

Posterior a los dos meses de permanecer en medio MS sin reguladores de crecimiento las plántulas se pasaron al medio 4 de enraizamiento (Cuadro 2) para dar un estímulo final, en el medio 4 permanecieron una semana solamente y enseguida se pasaron a medio MS sin reguladores de crecimiento.

En cada uno de los cambios de medio de cultivo se hizo una evaluación basada solamente en la observación acerca de la presencia de raíces del número total de plántulas regeneradas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cuadro 2. . Medios de cultivo probados en diferentes etapas de la regeneración de *Jatropha curcas* L.

Vía regenerativa	INDUCCIÓN						PROLIFERACIÓN					
	Organogénesis			Embriogénesis			Organogénesis			Embriogénesis		
	JO-1	JO-2	JO-3	JE-1	JE-4	JE-5	JO-1	JO-2	JO-3	JE-1	JE-4	JE-5
Medio	yema	yema	yema	hoja	hoja	hoja						
Explante	yema	yema	yema	hoja	hoja	hoja						
Sales inorgánicas	MS 100%	MS 100%	MS 100%	N6 100%	MS 100%	MS 100%	MS 100% (MS 1 50%)	MS 100% (MS 1 50%)	MS 100% (MS 1 50%)	N6 100%	MS 100% (MS 1 50%)	MS 100% (MS 1 50%)
Vitaminas R2	100%	100%	100%		100%	100%	100%	100%	100%		100%	100%
Glicina		100%	100%		100%	100%		100%	100%		100%	100%
Cock 20				100%						100%		
Adenina	2.5 mg			1 mg			2.5 mg			1 mg		
Kinetina					3 mg							
BA	3 mg	0.5 mg	3 mg				3 mg	0.5 mg	2 mg		2 mg	0.3 mg
AIB					2 mg						1 mg	
AIA												
2,4-D				4 mg		4 mg				4 mg		2 mg
Glutamina	50 mg						50 mg					
Arginina	15 mg						15 mg					
L-prolina				2.76 g		2.76 g				2.76 g		2.76 g
Caseína				200 mg		200 mg				200 mg		200 mg
PVP	1 g			1 g	1 g	1 g	1 g			1 g	1 g	1 g
Cisteína												
Sacarosa	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g
Gelificante	Gellan 3.3 g	Gellan 3.3 g	Gellan 3.3 g	Gellan 3.3 g	Gellan 3.3 g	Gellan 3.3 g	Agar gell 8.5 g	Agar gell 8.5 g	Agar gell 8.5 g	Agar gell 8.5 g	Agar gell 8.5 g	Agar gell 8.5 g

Cuadro 2. Continuación

Vía regenerativa	REGENERACIÓN		ENRAIZAMIENTO			
	Organogénesis	Organogénesis				
	JR-1	1	2	3	4	
Medio						
Explante						
Sales inorgánicas	MS 100% (MS 1 50%)	MS 50%	MS 50%	MS 50%	MS 50%	
Vitaminas R2	100%					
Glicina	100%					
Cock 20						
Adenina						
Kinetina						
BA	0.5 mg					
AIB		6 mg	6 mg	3 mg	6 mg	
AIA	0.5 mg				3 mg	
2,4-D						
Glutamina						
Arginina						
L-prolina						
Caseína						
PVP	2 g					
Cisteína	25 mg					
Sacarosa	30 g	30 g	30 g	30 g	30 g	
Gelificante	Agar gell 8.5 g	ninguno	Gellan 3.3 g	Gellan 3.3 g	Gellan 3.3 g	

4

Resultados

4.1 Germinación

Las semillas destinadas a germinación *in vitro* fueron sometidas a un protocolo de desinfección. El protocolo de desinfección tuvo un 100% de efectividad, ya que ninguna semilla presentó contaminación por hongo o bacteria.

Las semillas bajo condiciones *in vitro* se sembraron siguiendo su polaridad en medio de cultivo MS al 25% con antibiótico (cefotaxima 125 mg L⁻¹) bajo condiciones de fotoperiodo. Un 50% de las semillas germinaron y el otro 50% no presentaron ningún efecto. Las plántulas obtenidas de la germinación presentaron un tamaño de tallo muy bajo, sólo de un par de centímetros, incluso algunas sólo presentaron la emergencia de raíz. Las semillas tardaron aproximadamente un mes en germinar. Debido a esta respuesta se cambiaron a medio MS 50% bajo condiciones de oscuridad, permanecieron en ese medio durante dos meses y no hubo diferencia en la respuesta antes presentada (Figura 11).

En cuanto a la germinación bajo condiciones de invernadero, se presentó un mayor porcentaje de germinación, el cual fue de un 80%. Las plántulas que se originaron presentaron un mayor tamaño tanto del tallo como de las hojas. Las semillas tardaron 13 días en germinar (Figura 11).



Figura 11. Germinación en invernadero y germinación *in vitro* de *Jatropha curcas* L. Resultado de la germinación, en donde se observa la diferencia en el tamaño del tallo y hojas después de un mes a partir de su siembra.

4.2 Desinfección y disección del material vegetal

En los dos primeros ensayos el protocolo de desinfección brindó los resultados esperados pues hubo una contaminación del 0% en donde las plantas permanecían en solución de hipoclorito de sodio al 8% un lapso variable de 7 a 10 minutos. En el tercer ensayo al tratarse de plantas donadoras de explantes diferentes se presentó contaminación en un 90% de los cultivos, por lo cual se decidió dejar el material vegetal por 10 minutos en la solución de hipoclorito al 8%. Así el método de desinfección que se muestra en la Figura 10 quedó establecido después del tercer ensayo.

Una vez establecidos los cultivos se observó que aquellos explantes que habían sufrido daño al cortarlos no respondían o tenían una baja respuesta en comparación con aquellos explantes sanos, esto en cuanto al engrosamiento que presentaban y la formación de callo.

De igual manera aquellos explantes de hoja que pasaban de la medida de 1 cm² no presentaban una buena respuesta debido a que el explante se hacía curvo en su parte media al momento en el que se comenzaba a engrosar, así únicamente los extremos del explante permanecían en contacto con el medio nutritivo y la respuesta fue favorable. Por el contrario, los explantes que eran más cercanos a la medida de 1 cm² mostraron un engrosamiento que precedió a la formación de callo. En cuanto a las yemas apicales y axilares las que eran menores a 1.5 cm no presentaron una buena respuesta, solamente se engrosaron pero no hubo generación de callo ni de brotes adventicios. Las yemas que si eran de la medida 1.5 o 2 cm si presentaron mayor respuesta, ya que hubo engrosamiento y posteriormente formación de callo.

4.3 Siembra de explantes. Inducción y proliferación

Primer ensayo

Las yemas axilares y apicales no mostraron respuesta sino hasta después de dos meses y medio después de haber establecido los cultivos. Se trataba de un callo friable y de coloración verde claro. Los callos se formaron principalmente a partir de yemas apicales, pero también de algunas de las yemas axilares. En el medio de cultivo JO-1 se presentó la formación de callo aún algunas semanas después, se trató de un callo verde, friable y poco proliferante. En el medio de cultivo JO-2 se generó un callo poco proliferante pero de coloración verde y friable. En cuando al medio de cultivo JO-3 éste presentó las mejores respuestas, ya que hubo formación de callo un poco más proliferante, era friable y de coloración verde (Figura 12). La mayor parte de las yemas eran axilares y no presentaron respuesta.

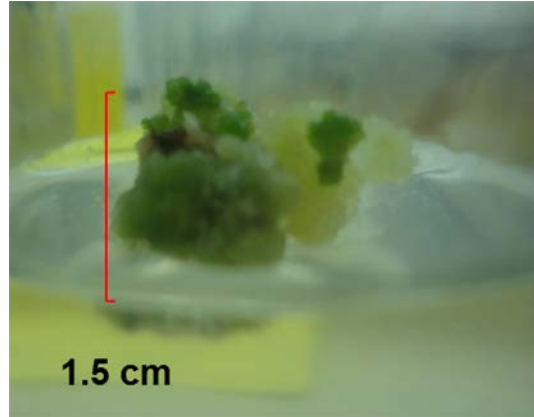


Figura 12 Callo verde y friable del medio JO-3

Se hicieron subcultivos periódicos cada tres semanas.

Los explantes de hoja comenzaron a formar callo 5 semanas después de establecer los cultivos. El callo proliferó bastante, se trataba de un callo verde y friable en general.

Los explantes de hoja en el medio JE-1 para el segundo subcultivo sólo mostraban un poco de engrosamiento. Algunos no presentaron respuesta debido a la oxidación que tuvieron. Al momento del tercer subcultivo los explantes mostraron una oxidación total y ninguna respuesta.

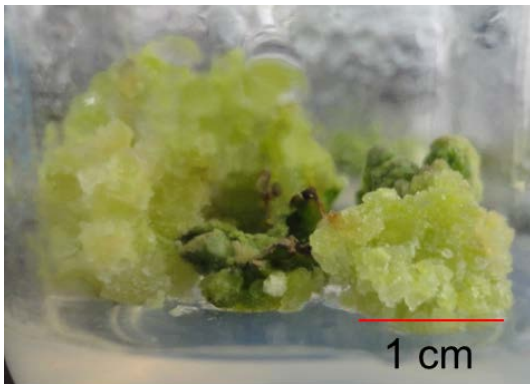


Figura 12. Callo verde y friable del medio JE-4

Los explantes de hoja en el medio JE-4 presentaron respuesta en cuanto a la formación de callo antes de llegar al segundo subcultivo, es decir, 5 semanas aproximadamente después del establecimiento de los cultivos. El callo era verde y friable y proliferaba bastante, tanto que no se notaba casi la presencia del explante al estar cubierto por el callo formado (Figura 13).

Los explantes de hoja en el medio JE-5 presentaron de igual manera producción de callo aproximadamente 5 semanas después de establecidos los cultivos. El callo no era tan proliferante como el de JE-4 pero si era verde y friable, de hecho mostraba algunas partes de callo blanquecinas que se tornaban amarillas.

Antes de llegar al tercer subcultivo aquellos callos provenientes de los medios JE-4 y JE-5 presentaron una alta oxidación, tal fue el daño que ésta causó que sólo se lograron recuperar algunos de los frascos. Aproximadamente un 90% de los callos se perdieron por oxidación total (Figura 14).

Debido a esta respuesta, se decidió realizar una segunda inducción pero con algunas modificaciones a los medios de cultivo que consistieron únicamente en agregar a los medios correspondientes a la vía embriogénica PVP 1g L^{-1} como se muestra en el cuadro 1. Además se planeó reducir el tiempo entre cada subcultivo, en vez de hacerlo cada tres semanas se planeó hacerlo cada dos semanas.

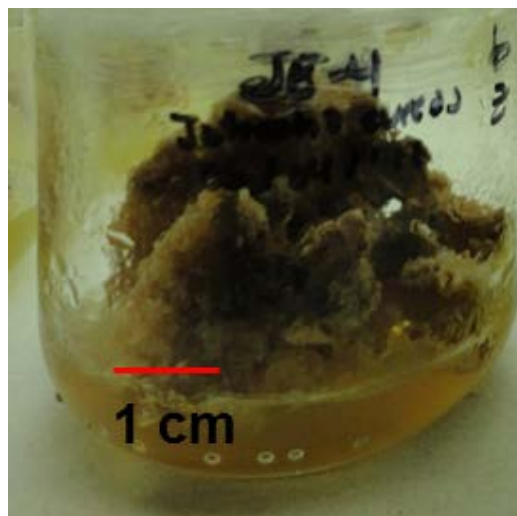


Figura 13 Oxidación total de cultivos del medio JE-4

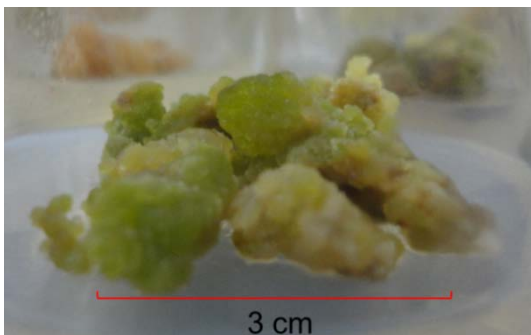


Figura 14. Callo originado en el medio JO-1.

El poco callo generado por el medio JO-2 se fue perdiendo por oxidación hasta que sólo se tenía material vegetal de los medios JO-1 y JO-3, el callo tenía una coloración verde, consistencia friable y proliferación lenta (Figura 15).

Segundo ensayo

Se utilizaron como explantes yemas apicales y segmentos de hoja de 1cm^2 para la vía organogénica y embriogénica respectivamente.

En cuanto a los explantes de hoja los medios JE-1 y JE-5 no habían generado ninguna respuesta a los dos meses de incubación, todo lo contrario del medio JE-4 que formó un callo verde intenso, friable y además con una proliferación acelerada (Figura 16).

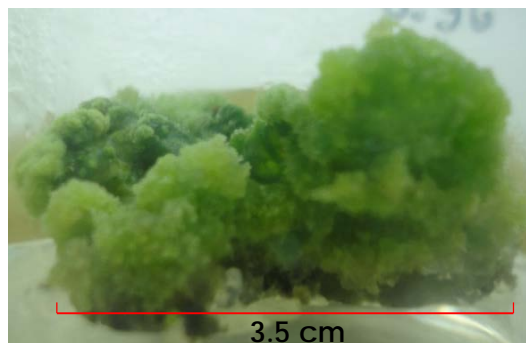


Figura 15. Callo originado en medio JE-4.

Las yemas apicales independientemente del medio en el que se encontraban generaron callo, el cual se observó aproximadamente dos meses después de haber establecido los cultivos. A partir del siguiente mes se comenzó a distinguir la formación de brotes (Figura 17).

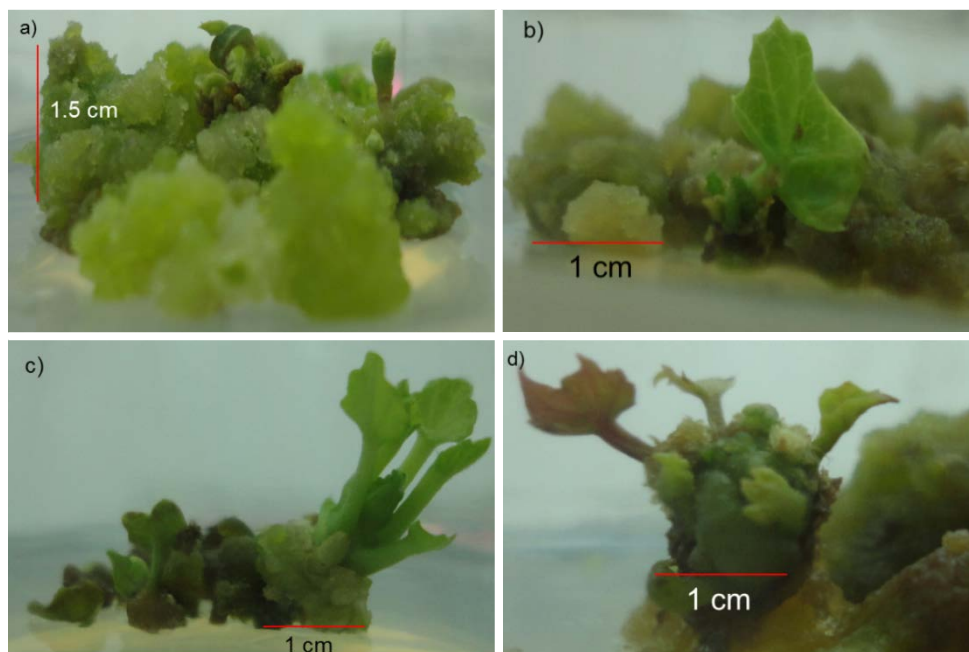


Figura 16. a), b) y c) Origen y desarrollo de brotes en el medio JO-3. d) Desarrollo de brotes en medio JO-1.

Se observó en todos los medios, tanto los correspondientes a la organogénesis como los de embriogénesis somática, una hiperhidratación, por lo cual los medios para los siguientes subcultivos fueron modificados, ya que, en un principio se utilizaba como agente gelificante Gelzan (3.3 g L^{-1}) y no fue favorable para los callos, por lo que se cambió el agente gelificante a Agar gell (8.5 g L^{-1}). Los subcultivos se hicieron cada dos semanas y hubo una reducción en la oxidación.

Tercer ensayo

Se utilizaron las yemas apicales y axilares y los segmentos de hoja como explantes para todos los medios de cultivo, es decir, los segmentos de hoja se cultivaron en los 6 diferentes medios de inducción, al igual que las yemas.

Durante el primer mes y medio a partir del establecimiento de los cultivos los explantes de hoja se engrosaron en los 6 medios de inducción y hubo un desarrollo de yemas preformadas en el medio JO-3.

A los dos meses y medio la formación de callo sucedió en las yemas cultivadas en el medio de cultivo JO-3, donde además se observó la formación de brotes y algunos de ellos comenzaban a desarrollarse. Las yemas en los otros medios de cultivo presentaron una alta oxidación, no hubo formación de callo.

Los explantes de hoja al mes y medio presentaron un engrosamiento general y en algunas zonas, sobre todo de la vena media, se formó callo, igualmente los bordes de los explantes formaron un poco de callo verde claro.

A los dos meses y medio, los cultivos de los medios JO-1, JE-1 y JE-5 no presentaron formación de callo ni brotes, y presentaron oxidación. Algunos explantes cultivados en el medio JO-2 presentaron formación de callo en el borde del explante y brotes en la vena media de la hoja, los cuales provenían directamente del explante.



Figura 17. Formación directa de brote en medio JE-4 a partir de explante de hoja.

Se observó una contaminación por bacteria en un 90% de los cultivos. A los medios de cultivo se le adicionó un antibiótico (Cefotaxima 125 mg L⁻¹).

La contaminación no desapareció por lo que los cultivos fueron muriendo, además de que siempre hubo oxidación que también contribuyó a la pérdida del material vegetal (Figura 19).



Figura 18. Cultivo contaminado por bacteria.

Cuarto ensayo

Se utilizaron únicamente los segmentos de hoja como explantes y se cultivaron en los medios para organogénesis, es decir, los medios JO-1, JO-2 y JO-3.

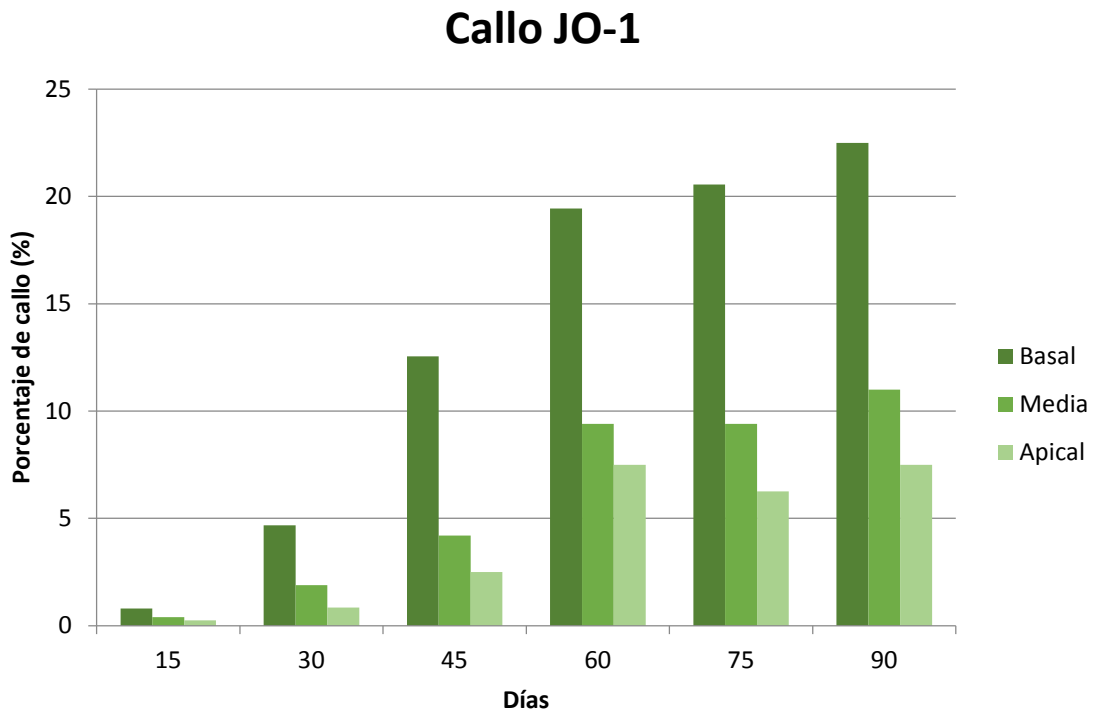
A partir de la siembra de los explantes se tomaron parámetros mediante la observación constante de los cultivos. Los parámetros medidos fueron: porcentaje de callo (Gráfica 1-3) y porcentaje de oxidación (Gráfica 4-6).

Al comparar las Gráficas 1-3 se determinó el medio de cultivo y la zona de hoja en donde hubo un mayor porcentaje de callo. A su vez, al comparar las Gráficas 4-6, se determinó la zona de hoja y el medio de cultivo en el que se presentó una menor oxidación. La Gráfica 7 muestra el mejor explante y el mejor medio de cultivo basados en los resultados de las Gráficas 1-6.

Para evaluar la respuesta del mejor explante en el mejor medio de cultivo, se realizó una cinética de crecimiento (Gráfica 8) y un conteo de número de brotes por gramo de callo (Gráfica 9), y se tomaron las medidas de los brotes (Gráfica 10).

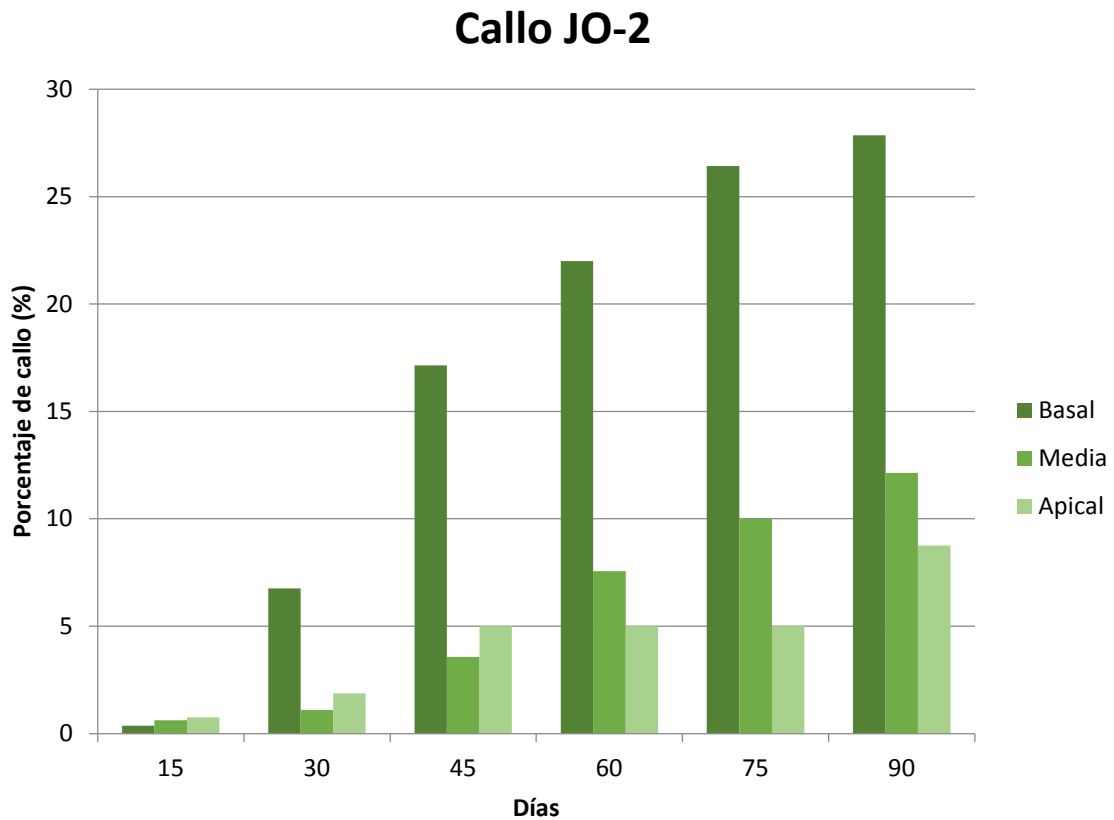
Las siguientes gráficas (Gráfica 1-3) muestran el porcentaje de callo que se obtuvo en cada uno de los medios para los tres diferentes explantes correspondientes a las zonas de la hoja.

La Gráfica 1 muestra el porcentaje de callo que fueron adquiriendo los explantes de cada una de las zonas de la hoja para el medio JO-1, en donde la toma de datos fue quincenal y donde claramente se observa que los explantes que pertenecen a la zona Basal de la hoja fueron los que más ganancia en porcentaje de callo presentaron, ya que alcanzaron un 32%, en comparación con los explantes de hoja de la parte media en donde sólo se alcanzó un 11% y de la parte apical en donde sólo alcanzaron un 7%. En cada una de las tomas de datos se observa que los explantes de la parte Basal de la hoja fueron los que presentaron un mayor porcentaje de callo.



Gráfica 1. Porcentaje de callo adquirido por los explantes de hoja en el medio de cultivo JO-1 a través del tiempo.

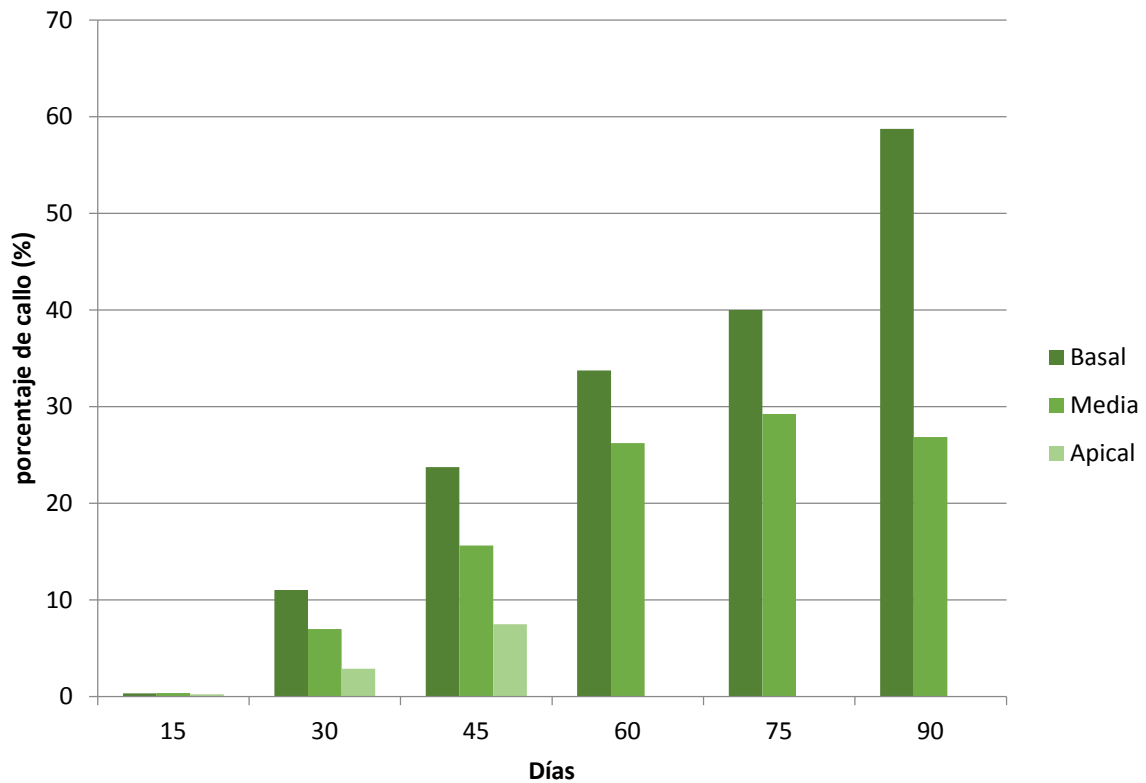
En la Gráfica 2 se muestra el porcentaje de callo que adquirieron los explantes de las diferentes zonas de la hoja al transcurso de las tomas de muestras que fue de manera quincenal para el medio JO-2. Así podemos observar que para la última toma de datos se observa que los explantes de la zona Basal ganaron un 23% aproximadamente de callo, para la zona Media los explantes alcanzaron un 12% y para la zona apical los explantes alcanzaron sólo un 7%. En cada una de las tomas de datos los explantes de la parte Basal de la hoja fueron los que tenían un mayor porcentaje de callo.



Gráfica 2. Porcentaje de callo adquirido por los explantes de hoja en el medio de cultivo JO-2 a través del tiempo.

La Gráfica 3 muestra la ganancia de porcentaje de callo que adquirieron los explantes de cada una de las zonas de la hoja para el medio JO-3, en donde observamos que para las primeras tomas de datos los explantes de la zona Basal de la hoja son los que adquieren un mayor porcentaje de callo, para el día 60 los explantes de la zona Apical se perdieron totalmente por oxidación y los explantes de la zona Basal y Media son similares en cuanto a la ganancia de porcentaje de callo. Para el día 90 los explantes de la parte Basal son los que alcanzan un mayor porcentaje de callo, alcanzando casi un 60%. En cuanto a la zona Media se alcanzó casi un 30% de callo, de hecho en el día 75 se puede observar un porcentaje mayor que a los 90 días debido a la oxidación que presentaron algunos explantes y que ocasionó la pérdida de callo.

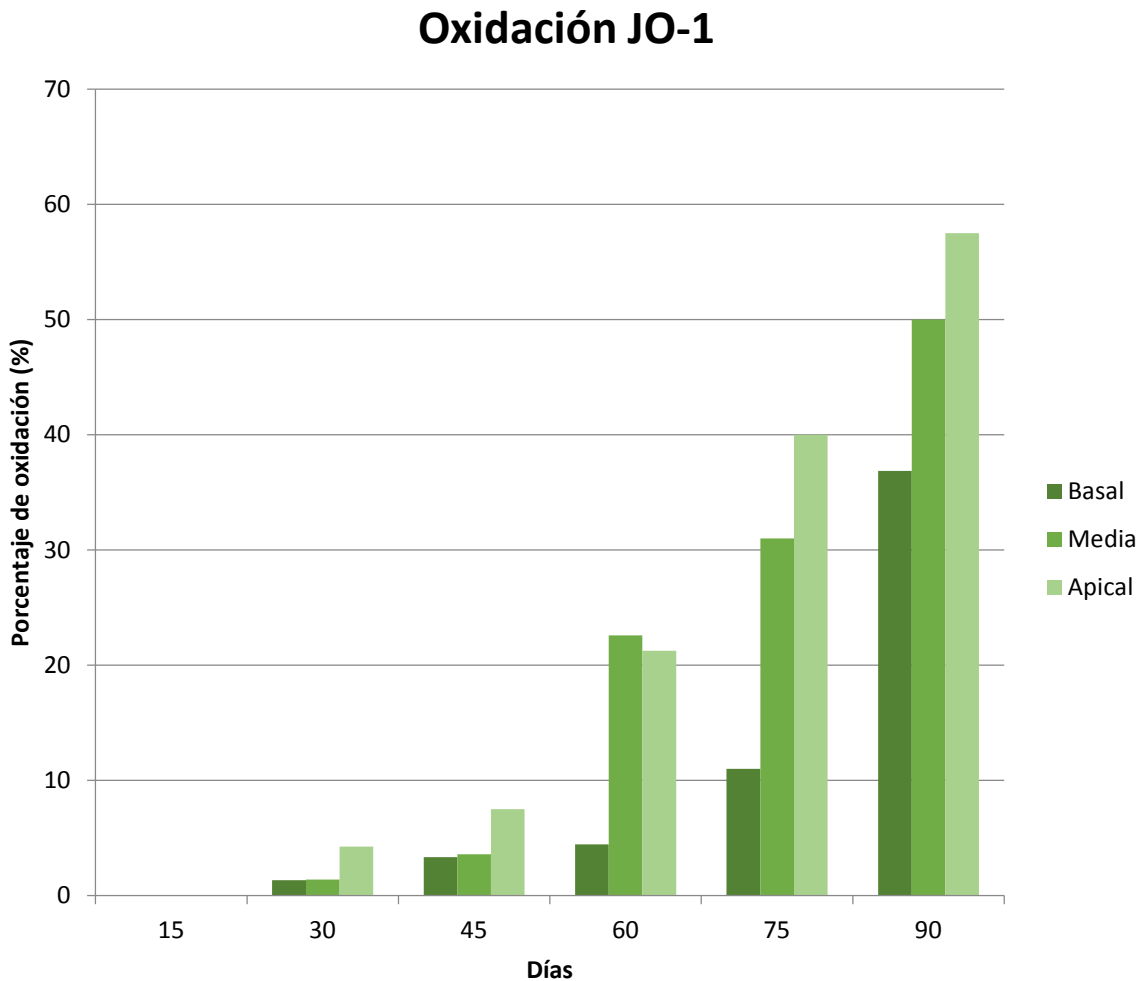
Callo JO-3



Gráfica 3. Porcentaje de callo adquirido por los explantes de hoja en el medio de cultivo JO-3 a través del tiempo.

Las siguientes gráficas (Gráfica 4-6) muestran el porcentaje de oxidación que presentaron los cultivos para cada medio utilizado en las tres diferentes zonas de la hoja.

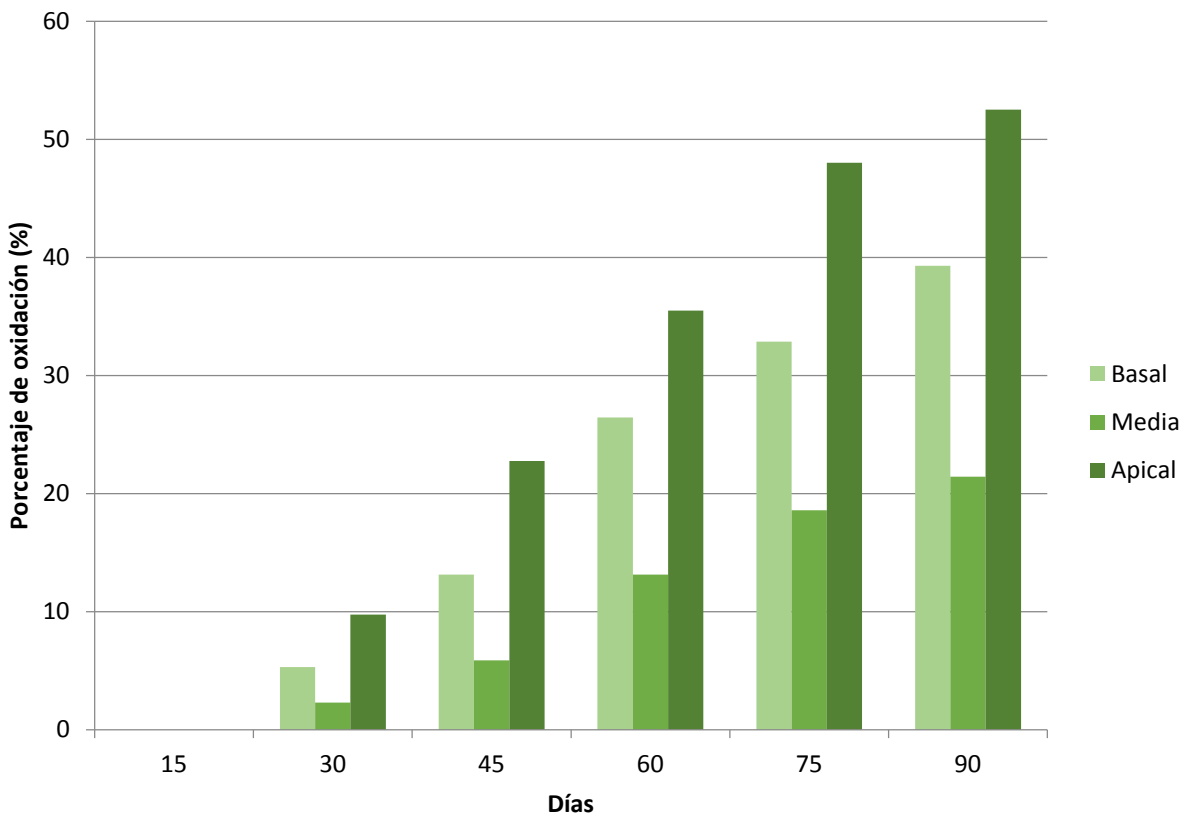
La Gráfica 4 muestra el porcentaje de oxidación que fueron adquiriendo los explantes de cada una de las zonas de la hoja para el medio JO-1 en el transcurso del tiempo. Los explantes fueron adquiriendo cada vez más un porcentaje de oxidación independientemente de la zona de la hoja a la que pertenecían, pero se logra observar que aquellos explantes de la zona Apical son aquellos que adquieren un mayor porcentaje de oxidación, seguido por los explantes de la zona Media y los de la zona Basal fueron los que presentaron menor porcentaje de oxidación. Para la última toma de datos los explantes de la zona Apical alcanzaron casi un 60% de oxidación.



Gráfica 4. Porcentaje de oxidación adquirido por los explantes de hoja en el medio de cultivo JO-1 a través del tiempo.

La Gráfica 5 muestra el porcentaje de oxidación que fueron adquiriendo los explantes de las diferentes zonas de la hoja a lo largo del tiempo. La parte Apical fue la que en cada una de las tomas de datos presentó un mayor porcentaje de oxidación, en la última toma de datos los explantes de esta zona alcanzaron un porcentaje mayor del 50%, seguido por la parte Basal. Los explantes de la zona Media fueron aquellos que presentaron un menor porcentaje de oxidación en cada una de las tomas de datos.

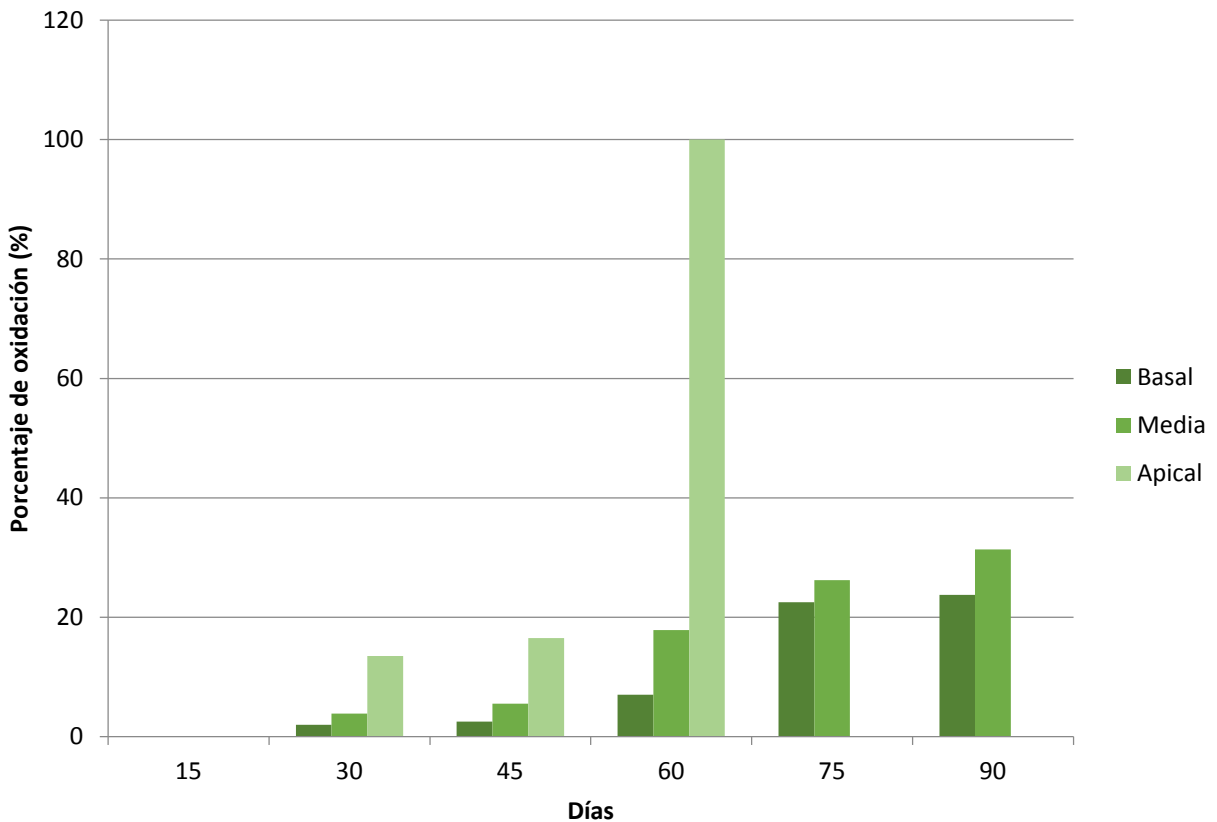
Oxidación JO-2



Gráfica 5. Porcentaje de oxidación adquirido por los explantes de hoja en el medio de cultivo JO-2 a través del tiempo.

La Gráfica 6 es el resultado de la toma de datos de manera quincenal que se hizo para determinar el porcentaje de oxidación que los explantes de todas las zonas de la hoja iban adquiriendo a lo largo del tiempo. Así podemos observar que los explantes de la zona Apical fueron aquellos que alcanzaron un punto máximo de porcentaje de oxidación en la toma de datos 4, alcanzando un 100% de oxidación, por lo que para la siguiente toma de datos ya no había explantes de esta zona vivos. Los explantes de la parte Media de la hoja fueron adquiriendo un porcentaje de oxidación que alcanzó para la última toma de datos un valor de 30%. Y por último los explantes de la zona Basal de la hoja fueron los que presentaron menor porcentaje de oxidación en todas las tomas de datos.

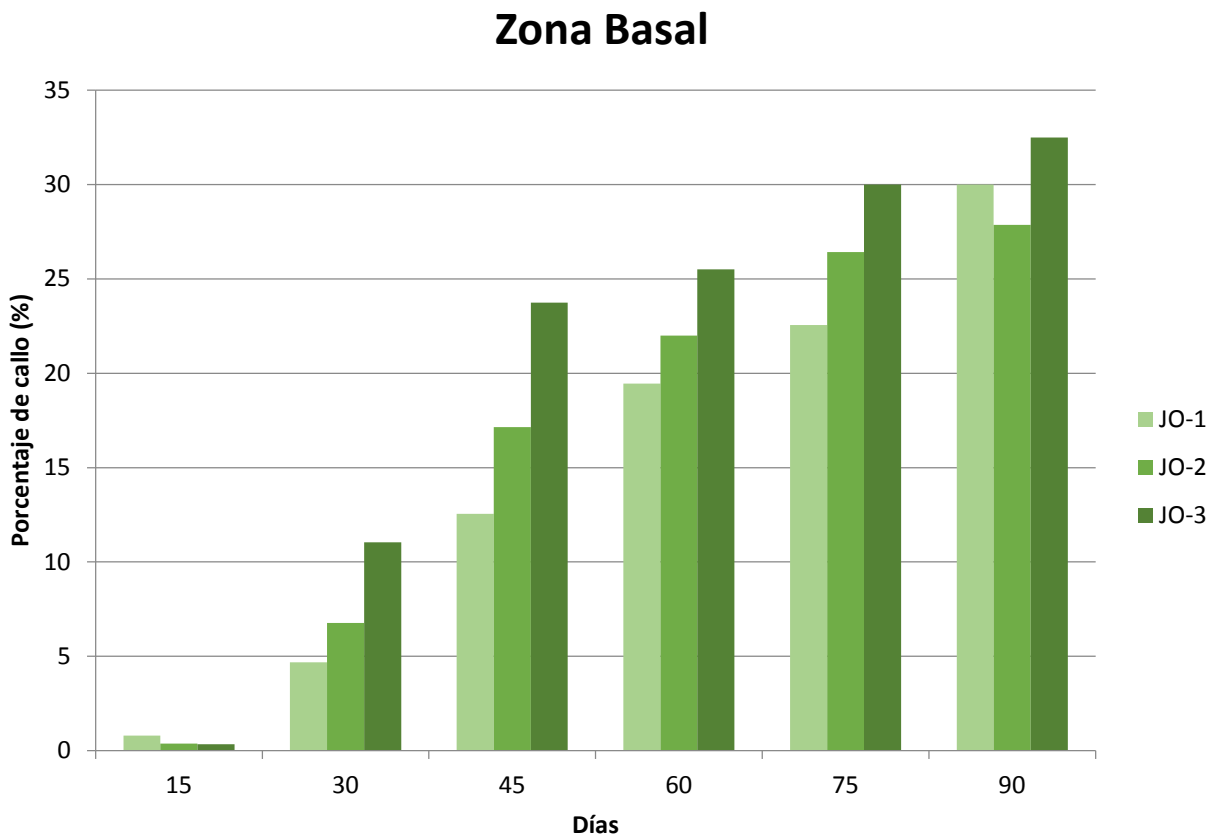
Oxidación JO-3



Gráfica 6. Porcentaje de oxidación adquirido por los explantes de hoja en el medio de cultivo JO-3 a través del tiempo.

En la Gráfica 7 se muestra el comportamiento que tuvo la parte Basal de la hoja en cada uno de los medios, así en la gráfica puede destacarse que los mejores explantes son los de la zona basal de la hoja, pero también muestra el comportamiento que tuvo bajo los diferentes medios de cultivo, y así se determina también el mejor medio de cultivo.

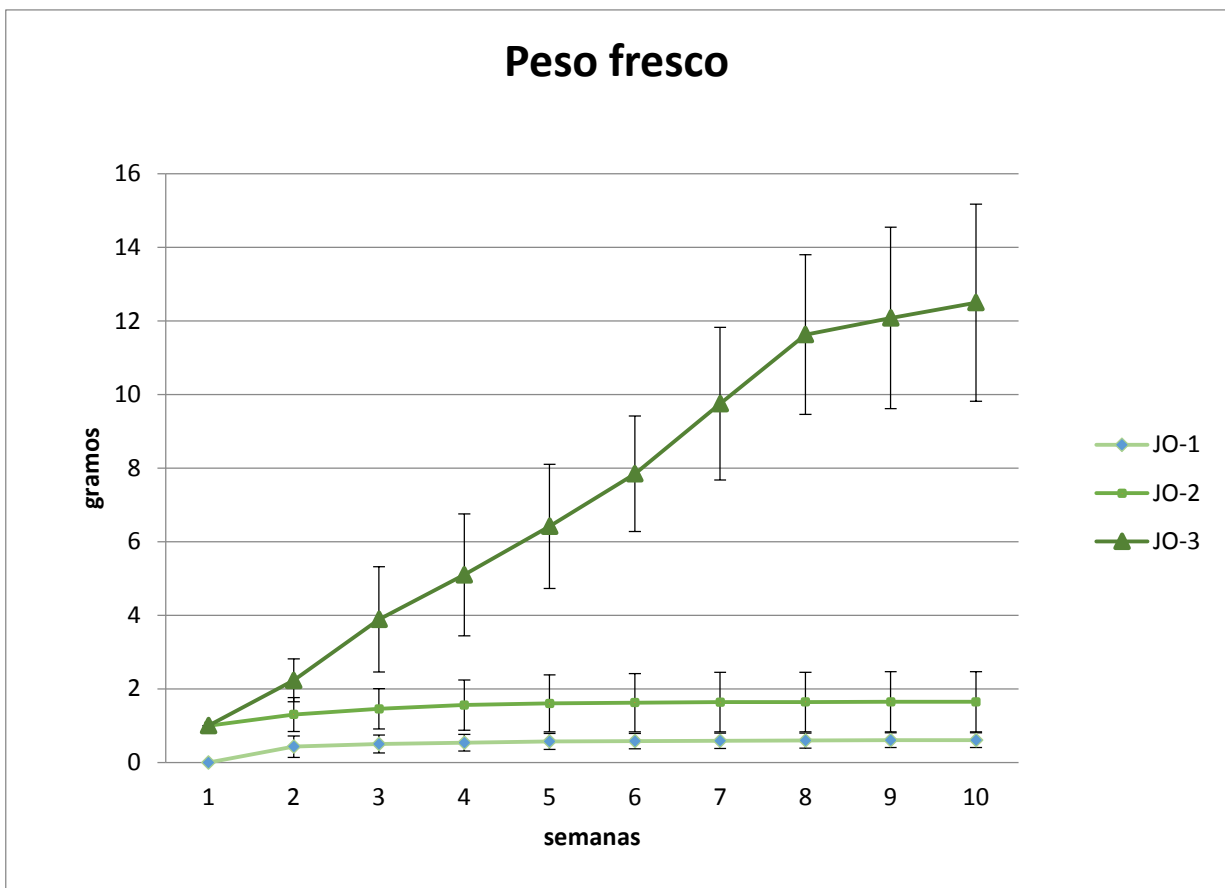
La Gráfica 7 es el resultado de la comparación del porcentaje de callo que fueron adquiriendo los explantes de la zona Basal de la hoja en cada uno de los medios de cultivo de la vía de la Organogénesis. En cada una de las tomas de datos se observa que va incrementando de manera significativa el porcentaje de callo. El medio de cultivo JO-3 es en el que los explantes alcanzaron un mayor porcentaje de callo en cada una de las tomas de datos, alcanzando para la última toma de datos un 33% de callo. El medio JO-2 muestra que los explantes fueron adquiriendo un porcentaje de oxidación muy proporcional en cuanto a la toma de datos, es decir, entre una toma y la otra no hubo una adquisición de callo abrupta. El medio JO-1 presentó en la mayoría de las tomas de datos un menor porcentaje de callo, pero para la última toma de datos si presentó una elevada adquisición de callo.



Gráfica 7. Porcentaje de callo adquirido a través del tiempo en explantes de hoja de zona basal en los diferentes medios de cultivo.

RESULTADOS

La Gráfica 8 muestra la ganancia de peso fresco medida en gramos en el transcurso de 10 semanas en las que se pesaron los callos que partieron de un peso inicial de 1 g con excepción del medio JO-1 en el que nunca se alcanzó el peso de 1 g. En cuanto a los callos del medio JO-3 se observa que cada semana incrementaron considerablemente su peso, comenzando con sólo un gramo éste medio alcanzó el peso de casi 13 g en promedio. En cuanto a los callos del medio JO-2 podemos observar que si incrementó un poco su peso para la última semana, pero no alcanzó los 2 g.

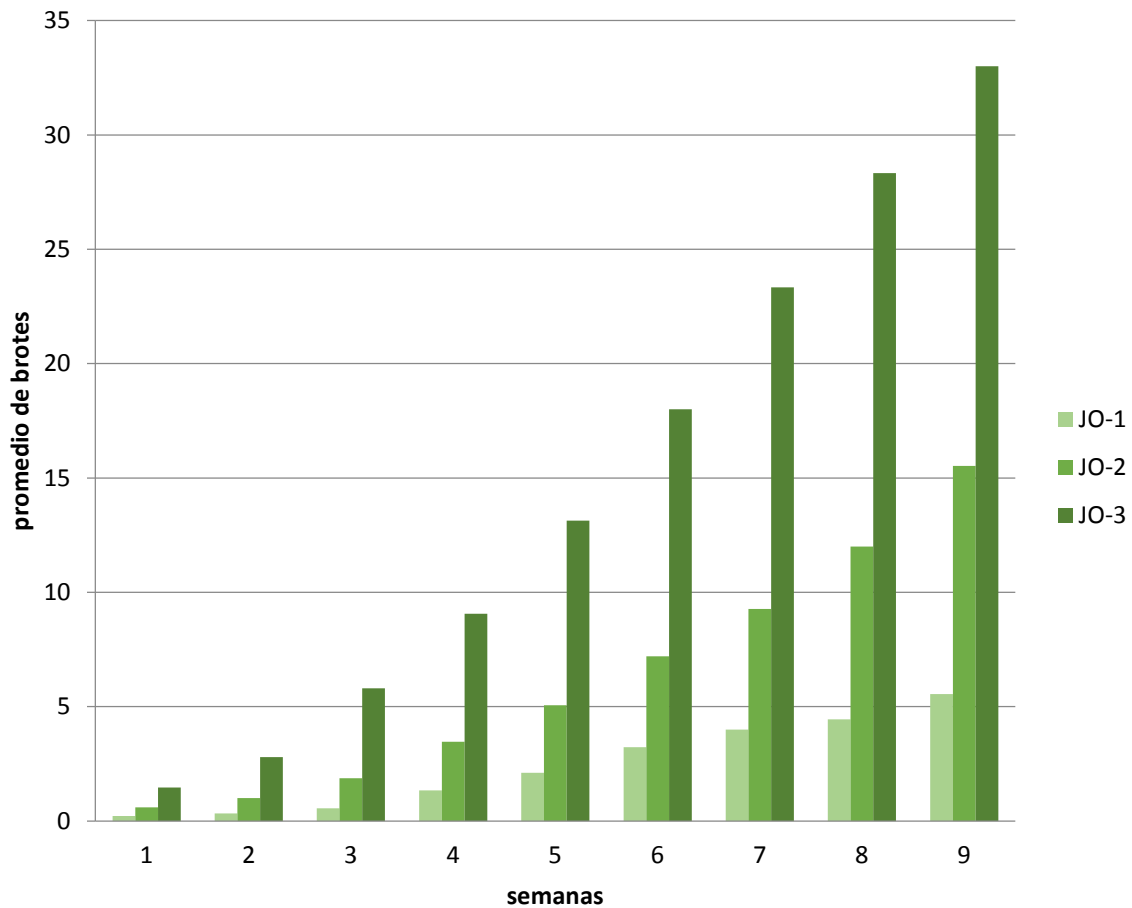


Gráfica 8. Cinética de crecimiento, peso en gramos adquiridos a través del tiempo en los diferentes medios de cultivo.

Para obtener la Gráfica 9. Número de brotes por explante, se contaron el número total de brotes y se dividió por el total de explantes, que en JO-1 fue de 9 y en JO-2 y JO-3 fue de 15.

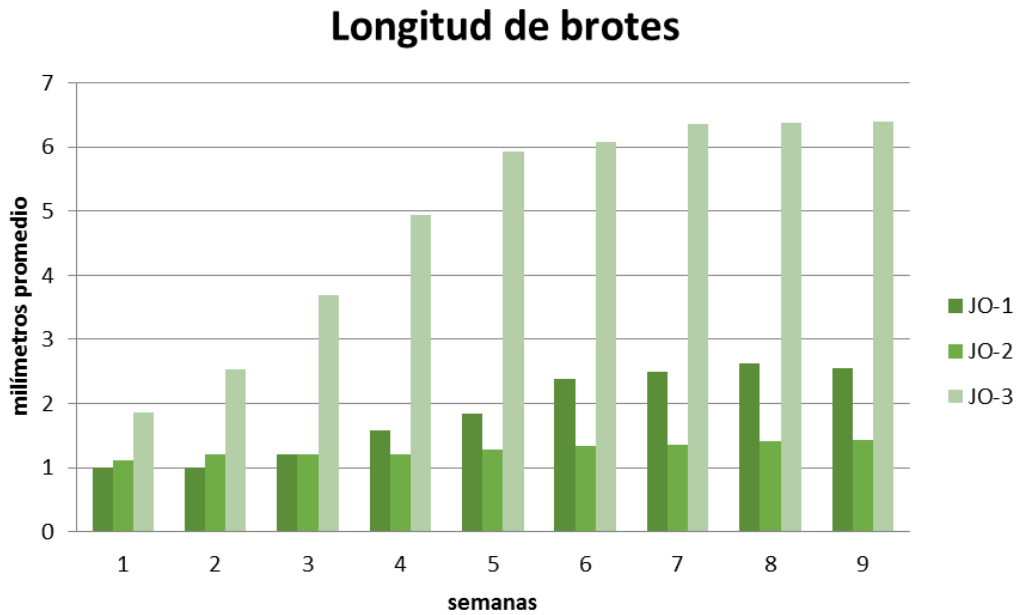
En la Gráfica 9 se observa que el promedio de brotes en los tres diferentes medios (JO-1, JO-2 y JO-3) en la primer semana es bastante bajo, lo cual va cambiando en el transcurso de las semanas, ya que se observa cómo de manera proporcional se va incrementando el promedio de brotes por explante. En cada semana se observa que el medio de cultivo en donde es mayor el promedio de brotes por explante es el medio JO-3, el cual recordemos es la combinación del medio JO-1 (que dio los mejores resultados al inicio del proyecto) y JO-2 (medio de cultivo que se obtuvo de la investigación bibliográfica). Y el medio de cultivo en el que siempre es más bajo el promedio de brotes por explante es el medio JO-1 en cada una de las semanas. En la última semana el medio JO-3 alcanza un número promedio de brotes de 33, en tanto que el medio JO-2 alcanza 15 y el medio JO-1 sólo alcanza 6, es bastante grande la diferencia.

Número de brotes por explante



Gráfica 9. Número de brotes promedio por explante a través del tiempo en los diferentes medios de cultivo.

En la Gráfica 10 se muestran los resultados que se obtuvieron a partir de medir cada uno de los brotes en cada semana transcurrida, esto por cada uno de los medios de cultivo. Claramente el medio JO-3 presenta los brotes con una mayor longitud en cada una de las semanas en las que se midieron, seguido por el medio de cultivo JO-1. La longitud de los brotes se muestra en milímetros y vemos cómo para la semana 9 los brotes en el medio JO-3 llegan a alcanzar un promedio de 6.5 mm, en el medio JO-1 alcanzan un promedio de 2.5 mm y en el medio JO-2 alcanzan el promedio de 1.5 mm.



Gráfica 10. Longitud de brotes a través del tiempo en los diferentes medios de cultivo.

La prueba estadística T de Student nos permite afirmar que hay diferencias significativas entre los diferentes medios de cultivo para los parámetros de porcentaje de callo, porcentaje de oxidación y número de brotes por explante.

Tabla 1. Datos estadísticos para la prueba T de Student para porcentaje de callo y oxidación.

No. Muestra	Medio	% Callo		% Oxidación	
		Promedio	Varianza	Promedio	Varianza
17	JO-1	15.5882353	218.382353	45.5882353	552.757353
18	JO-2	17.5	524.264706	31.6666667	455.882353
12	JO-3	37.5	641.727273	28.8333333	950.878788

A partir de los datos de la Tabla 1 resultado del conjunto de datos presentados en el Anexo 2, se realizó la Prueba T de Student para comparar cada uno de los medios de cultivo utilizados en este trabajo.

RESULTADOS

Tabla 2. Resultados de prueba T de Student para el porcentaje de callo y la oxidación.

Hipótesis	gl [(n1+n2)-2]	Valor de tablas		Callo (%)	Oxidación (%)
				Valor de T	Valor de T
Ho: JO-1=JO-2 Ha: JO-1≠JO-2	33	0.05	1.6924	0.29509	1.83049
		0.001	2.4448		
Ho: JO-2=JO-3 Ha: JO-2≠JO-3	28	0.05	1.7011	2.20055	0.27708
		0.001	2.4671		
Ho: JO-3=JO-1 Ha: JO-3≠JO-1	27	0.05	1.7033	2.69057	1.58492
		0.001	2.4727		

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de la comparación de medias que se realiza en la prueba T de Student. Así podemos enumerar los siguientes resultados en cuanto al porcentaje de callo:

- Entre JO-1 y JO-2. Se acepta la hipótesis nula (Ho) ya que el valor de T es menor al de tablas, por lo tanto entre JO-1 y JO-2 no hay diferencias.
- Entre JO-2 y JO-3. Se rechaza la hipótesis nula ya que el valor de T es mayor que el valor de tablas (α 0.05), por lo tanto entre JO-2 y JO-3 hay una diferencia significativa.
- Entre JO-3 y JO-1. Se rechaza la hipótesis nula ya que el valor de T es mayor al valor de tablas (α 0.001), por lo tanto entre JO-2 y JO-3 hay una diferencia altamente significativa.

En cuanto al porcentaje de oxidación:

- Entre JO-1 y JO-2. Se rechaza la hipótesis nula (Ho) ya que el valor de T es mayor al de tablas (α 0.05), por lo tanto entre JO-1 y JO-2 hay una diferencia significativa.
- Entre JO-2 y JO-3. Se acepta la hipótesis nula ya que el valor de T es menor que el de tablas, por lo tanto entre JO-2 y JO-3 no hay diferencias.
- Entre JO-3 y JO-1. Se acepta la hipótesis nula ya que el valor de T es menor que el de tablas, por lo tanto entre JO-3 y JO-1 no hay diferencias.

Para realizar la prueba T de Student en el conjunto de datos de número de brotes por explante para cada tratamiento, se realizó la Tabla 3 que es el resultado de los datos presentados en el Anexo 2.

Tabla 3. Datos estadísticos para realizar la prueba T de Student para el parámetro número de brotes promedio por explante.

No. Muestra	Medio	Promedio	Varianza
9	JO-1	5.55555556	15.0277778
15	JO-2	15.5333333	10.6952381
15	JO-3	33	19.8571429

RESULTADOS

Tabla 4. Resultados de la prueba T de Student para el parámetro Número de brotes por explante.

Hipótesis	gl [(n1+n2)-2]	Valor de tablas		Valor de T
Ho: JO-1=JO-2 Ha: JO-1≠JO-2	22	0.05	1.7171	6.46387
		0.001	2.5083	
Ho: JO-2=JO-3 Ha: JO-2≠JO-3	28	0.05	1.7011	12.23864
		0.001	2.4671	
Ho: JO-3=JO-1 Ha: JO-3≠JO-1	22	0.05	1.7171	15.86208
		0.001	2.5083	

La Tabla 4 presenta los resultados de la prueba T de Student a partir de los datos de la Tabla 3, para el parámetro número de brotes por explante. Se pueden enumerar los siguientes resultados:

- Entre JO-1 y JO-2. Se rechaza la hipótesis nula, ya que el valor de T es mayor al valor de tablas (α 0.001), por lo tanto entre JO-1 y JO-2 hay una diferencia altamente significativa.
- Entre JO-2 y JO-3. Se rechaza la hipótesis nula, ya que el valor de T es mayor al valor de tablas (α 0.001), por lo tanto entre JO-2 y JO-3 hay una diferencia altamente significativa.
- Entre JO-3 y JO-1. Se rechaza la hipótesis nula, ya que el valor de T es mayor al valor de tablas (α 0.001), por lo tanto entre JO-3 y JO-1 hay una diferencia altamente significativa.

El Cuadro 3 presenta los mejores resultados de cada uno de los cuatro diferentes ensayos reportados, en los que se puede observar que siempre destaca el medio JO-3 y el explante de zona basal de hoja.

Cuadro 3. Resultados sobresalientes de los ensayos realizados.

Ensayo	Organogénesis (tipo)	Explante	Medio de cultivo	Características del callo
1	X	Yemas apicales y axilares y hoja	JO-3	Friable, verde claro
2	Indirecta	Yemas apicales	JO-3 y JO-1	Verde intenso, proliferante y friable.
3	Directa	Yemas apicales y hoja	JO-3 y JE-4	Poco proliferante, casi nulo.
4	Indirecta	Hoja (zona basal)	JO-3	Verde intenso, friable, proliferante.

4.4 Regeneración de plántulas

Durante la inducción y la proliferación de cultivos se mantuvieron haciendo los subcultivos periódicos cada dos semanas, en cada uno de éstos se retiraba de manera cuidadosa las partes de callo que presentaran oxidación, esto sumado al cambio a medio fresco, originó que el callo y los brotes que se generaban se mantuvieran saludables.

Los callos y brotes permanecieron en estas etapas un periodo de 7 meses aproximadamente.

El desarrollo de estos brotes siguió y se observó un engrosamiento en el tallo y formación de más hojas, así los brotes se hicieron más grandes en cuanto a altura, grosor y número de hojas. Aquellos brotes que alcanzaron estas características fueron individualizados para pasar a la siguiente etapa, los cuales fueron 6 en total (Figura 20).



Figura 19. Planta regenerada de *Jatropha curcas* L. a partir del medio JO-3.

4.5 Enraizamiento

Para continuar con el desarrollo de los 6 brotes obtenidos en la inducción, proliferación y regeneración, éstos se transfirieron a un medio de cultivo de enraizamiento.

Los brotes desarrollados que se cambiaron al medio de cultivo líquido y posteriormente al medio de cultivo sólido de sales MS sin reguladores de crecimiento, no presentaron contaminación al pasar por este proceso, las condiciones axénicas fueron suficientes. La agitación manual bajo las que estuvieron durante tres horas en el medio líquido no provocó daños en los brotes, así que cuando se colocaron en el medio MS sin reguladores de crecimiento no tuvieron oxidación, ni pérdida de hojas, ni fracturas.

Al encontrarse los brotes en el medio MS sin reguladores de crecimiento y en condiciones de fotoperiodo de 16/8 durante tres meses, se presentó la formación de raíces en sólo una plántula, pero no se presentó formación de raíces en las demás plántulas, así que se sometieron a otro tratamiento (Figura 21).



Figura 20. Planta regenerada de *Jatropha curcas* L. con raíz a partir del medio JO-3.

RESULTADOS

Se colocaron en el medio 2 de enraizamiento durante una semana y se colocaron en medio MS sin reguladores de crecimiento de nuevo, donde permanecieron dos meses, con subcultivos periódicos, pero no hubo respuesta. Al someterse a un tercer tratamiento, en el medio 3 de enraizamiento tampoco hubo una respuesta favorable, al no encontrarse presencia de raíces en ninguna de las plántulas.

Así las plántulas se sometieron a un cuarto y último tratamiento, en el que se quedaron en el medio 4 de enraizamiento una semana y de nuevo se colocaron en medio MS sin reguladores de crecimiento. Al realizarse los subcultivos periódicos de cada dos semanas a medio fresco no se presentó la formación de raíces en las demás plántulas. Así al final de todos los tratamientos a los que fueron sometidas las plántulas se presentó la formación de raíces sólo en una de seis plántulas.

5

Análisis de resultados

La germinación de las semillas de *Jatropha curcas* L. se realizó de dos diferentes maneras, de un total de 100 semillas 20 fueron germinadas bajo condiciones de invernadero y 80 en condiciones *in vitro*.

La germinación de semillas de las diferentes especies comienza con la absorción de agua y termina cuando la radícula emerge (Herrera *et al*, 2006). En el caso de *J. curcas* Franken, Y.J. y Nielsen, F. (2009) reportaron que las semillas tienen un periodo de germinación de 10 días aproximadamente. En el caso del presente trabajo, al poner las semillas a germinar bajo condiciones de invernadero, emergieron su raíz y cotiledones después de 13 días a partir de su siembra, mientras que en las semillas bajo condiciones *in vitro* la germinación se observó a los 30 días a partir de su siembra.

Las semillas para su germinación tienen tres requerimientos ambientales esenciales, que son: agua, oxígeno y temperatura (Herrera *et al*, 2006). Cualquier alteración a estos factores puede afectar cualquiera de las etapas de la germinación de la semilla que puede traer como resultados la germinación nula o que el posterior desarrollo y crecimiento de la plántula sea deficiente. En el caso de las semillas germinadas bajo condiciones de invernadero los requerimientos ambientales antes mencionados permitieron que las semillas germinaran en el tiempo que la literatura lo indicaba y las plántulas alcanzaron un buen desarrollo y crecimiento, pero en las semillas bajo condiciones *in vitro* no se obtuvo un buen resultado a pesar de que las condiciones ambientales están controladas. Las condiciones de fotoperiodo *in vitro* (16/8) no son iguales que en el entorno natural en el que se encontraban las semillas de invernadero. La humedad relativa bajo condiciones *in vitro* es cercana al 100% y en el ambiente de invernadero es mucho más baja. En cuanto a la disponibilidad de oxígeno, en un ambiente *in vitro* es mucho menor el intercambio gaseoso que hay en los cultivos. Por último el protocolo de desinfección bajo el que se sometió a las semillas destinadas a germinación *in vitro* pudo haber sido muy agresivo, dañando así el embrión, ya que las semillas primero pasaron por una escarificación física que dejó al embrión sin la protección suficiente ante el protocolo de desinfección.

El método de desinfección del explante brindó los resultados esperados ya que en primer lugar se empleó una solución jabonosa que por su acción tensoactiva permitió eliminar polvo, sustancias que ese emplearon en el tratamiento fitosanitario, y cualquier otra partícula que se pudo disolver en el agua para luego ser eliminados mediante enjuagues.

Posteriormente se utilizó el etanol al 70% el cual actuó a nivel de membrana sobre los microorganismos y provocó cambios en la fluidez de ésta. Por su naturaleza anfifílica puede interactuar con moléculas polares, y por su naturaleza hidrofóbica puede interactuar con regiones hidrofóbicas de lípidos y proteínas, afectando el funcionamiento de éstas últimas como enzimas y canales e incluso desnaturalizándolas.

El tamaño de los explantes es de suma importancia pues en este trabajo determinaron la respuesta en cuanto a la formación de callo y brotes, ya que, aquellos de hoja mayores a 1 cm² no pudieron estar totalmente en contacto con el medio de cultivo, así su respuesta se vio limitada. Por otro lado, los explantes de yema que fueron menores a 1.5 cm dieron una respuesta nula, por lo que podemos pensar que al tomarlas de la planta donadora no se tomó completa, sino sólo una parte de la yema, lo cual pudo provocar la reducción en la tasa de proliferación característica de las células que forman parte de cualquier meristemo.

La inducción y proliferación estuvieron basadas en diferentes medios de cultivo, los cuales fueron evaluados por las respuestas presentadas en los explantes, aunque es importante recordar que la respuesta de éstos no sólo depende de la composición del medio de cultivo en el que se encuentra, sino de una serie de factores medio ambientales en los que la planta donadora de explantes está inmersa y de la propia información genética que porta el explante. A pesar de que el CTV puede crear una serie de condiciones artificiales de ambiente, nutrición y asepsia (Ismidianty and Rachmi, 2010), sólo ejercemos un control relativo sobre los procesos morfogenéticos, fisiológicos y bioquímicos (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994). Partiendo de esta idea es que se emplean más de un medio de cultivo para ambas vías morfogenéticas (Cuadro 2), ya que no podemos controlar al 100% la respuesta del explante, por estas mismas razones se trabajó con diferentes explantes, que fueron los de hoja y yemas apicales y axilares. A pesar de que los explantes provenían del mismo lote de plantas donadoras, de que todos pasaron por un proceso de desinfección idéntico y de que estuvieron manipulados bajo las mismas condiciones artificiales que nos permite crear el CTV, se muestran diferentes respuestas en los diferentes medios de cultivo (Gráficas 1-6).

Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994 nos hablan de que hay una interacción entre el tipo de explante, normas de asepsia, medios de cultivo y microambiente de incubación y en este trabajo podemos observar que en efecto, la interacción entre todos estos factores nos han brindado respuestas diferentes que podemos comparar y así determinar tanto la mejor vía de regeneración como el mejor explante y medio de cultivo, que son los objetivos de este trabajo (Gráfica 7).

De manera constante en los diferentes ensayos reportados destacan los mismos medios de cultivo que nos brindan los mejores resultados (JO-3) y se destaca el mejor explante (zona basal de hoja). En los primeros ensayos los

medios de cultivo y los explantes eran diferentes para cada vía regenerativa, pero después se probaron los diferentes explantes para todos los medios independientemente de la vía regenerativa a la que estaban destinados. Así se pudo determinar que el mejor medio de cultivo fue el medio de la vía organogénica JO-3 y el mejor explante fue la zona basal de hoja (Gráfica 7).

En cuanto al explante el que mostró los mejores resultados en los ensayos reportados fue el de hoja (zona basal), ya que, siempre presentó una alta proliferación en varios medios de cultivo, además de que presentó la formación de brotes que posteriormente se desarrollaron y formaron plántulas. La formación de brotes a partir de hoja fue de manera directa e indirecta en diferentes ensayos. Las yemas axilares y apicales a pesar de ser zonas meristemáticas que poseen células que se encuentran en constante división a una velocidad alta, no produjeron los resultados como los mostrados en hojas, ya que la proliferación de callo no fue tan alta como en hojas, además hubo una formación de brotes de manera indirecta y la mayoría de ellos no lograron desarrollarse, sólo unos cuantos comenzaban a mostrar la formación de hojas pero no aumentaron de longitud, grosor, ni número de hojas. La mayoría de las yemas no presentaban respuesta, debido posiblemente a que la disección por la que pasaron al ser extraídas de la planta madre fue agresivo y la zona meristemática no se encontraba completa sino fracturada. De ahí que la mejor opción para las siguientes inducciones fueron las hojas.

Los explantes de hoja que mejor respondieron en todos los ensayos fueron los pertenecientes a la zona basal. La zona basal de la hoja está unida al tallo mediante el peciolo y posee una mayor área de nervadura central. La nervadura central contiene los tejidos conductores xilema y floema primarios, que en hojas viejas son el resultado de la maduración del procambium (Dickison, 2000). Así podemos atribuir la respuesta tan favorable que tuvieron los explantes de hoja, y sobre todo los de la zona basal, pues contenían una mayor superficie con nervadura central, la cual contiene los tejidos conductores que a su vez son el resultado de la maduración de una zona meristemática en la que sus células se encuentran en constante división.

Otro aspecto al que podemos atribuir la respuesta de los explantes de hoja es el origen de éstas. Las hojas en angiospermas se originan como grupos de células a los costados del meristemo apical (Dickison, 2000), así encontramos de nuevo su ligadura con zonas meristemáticas en los que sus células tienen una mayor tasa de división y con la característica de ser totipotenciales. De hecho, una de las funciones más importantes que tiene el ápice es la formación de hojas.

La respuesta generada por ambos tipos de explantes fue la generación de brotes de manera directa en algunos ensayos y de manera indirecta en otros. La generación de brotes nos habla de que la respuesta pertenece a la vía organogénica. No todos los ensayos reportados en este trabajo muestran la formación de brotes, ya que influyeron distintas variables para obtener la formación de brotes, como el explante utilizado, la época del año en que se tomaron los explantes de la planta en condiciones de invernadero, el estado fisiológico de la planta, el tamaño de explante, el medio de cultivo utilizado, el propio genotipo de la planta, etc. La organogénesis depende de las diferencias en la actividad hormonal regional, es decir, que cada región de la planta tiene

una actividad hormonal diferente, y de eso depende la formación de órganos. La actividad hormonal provoca la activación y silenciamiento de genes que conducen aspectos específicos del desarrollo de órganos (Taiz and Zeiger, 2010).

Zonas específicas de acumulación de auxinas promueven la formación de hojas (Taiz and Zeiger, 2010). Así se puede inferir que las yemas apicales y axilares son zonas de acumulación de auxinas, así como la zona basal de la hoja, por su cercanía a la yema axilar, ya que como mencionamos anteriormente la yema apical tiene la importante función de formar hojas e incluso de la filotaxia, y a partir de las yemas axilares se desarrollan las hojas. Otros factores ambientales o mutaciones afectan el tamaño y forma del meristemo (Taiz and Zeiger, 2010). lo cual influye directamente en la formación de hojas, pero también en la respuesta obtenida en los ensayos reportados en éste trabajo, y que pueden dar la explicación a la respuesta variable que se obtuvo de éstos, ya que aunque los explantes de yema pertenecían a un mismo lote de plantas los resultados eran diferentes, al igual que si comparamos la respuesta obtenida entre lotes de plantas distintos.

Las auxinas son un factor clave que determina la filotaxia y formación de hojas. Los sitios de la formación de hojas están relacionados a los patrones del transporte polar de las auxinas (Taiz and Zeiger, 2010). Los patrones del transporte polar de auxinas es diferente en cada primordio foliar dependiendo de su edad, lo que nos sugiere que también es diferente en las hojas formadas dependiendo de su edad, lo cual también influyó en la respuesta obtenida en los diferentes ensayos realizados y reportados en este trabajo, y destaca la importancia de elegir el explante adecuado, lo cual se considera fue correcto en éste caso, ya que se eligieron hojas que no fueran demasiado jóvenes ni tampoco viejas, que presentaron una buena respuesta formando brotes que se desarrollaron y formaron plántulas.

Los artículos consultados para la previa búsqueda bibliográfica sobre la Regeneración de *J. curcas* utilizan una amplia variedad tanto de medios de cultivo como de explantes (Cuadro 1).

Shrivastava y Banerjee, 2008; Manjari *et-al*, 2007; y Coutiño-Cortés *et-al*, 2013, reportan el uso de nodos axilares para la inducción de la organogénesis. De igual manera se hizo en este trabajo, ya que utilizamos yemas apicales y axilares para la inducción de la misma vía regenerativa. Comparando sus resultados con los que se reportan en este trabajo se obtuvo la misma vía morfogénica que se buscaba de acuerdo a nuestros objetivos, es decir, se obtuvo la organogénesis indirecta, como lo reporta Manjari *et-al*, 2007 y Coutiño-Cortés *et-al*, 2013, además también se obtuvo la organogénesis directa, como lo reporta Shrivastava y Banerjee, 2008. Los medios de cultivo que utilizan estos autores se tratan de sales MS, además todos adicionan al medio BA en diferentes concentraciones y alguna auxina. En este trabajo se utilizan también las sales MS y se adiciona BA (3 mg L⁻¹), pero no se utiliza ninguna auxina.

Algunos otros autores como explantes los cotiledones (Li *et-al*, 2007) o epicótilos (Qin *et-al*, 2004) e hipocótilos (Sujatha *et-al*, 2000., Ismidianty y Rachmi, 2010., Soomro y Memon, 2007., y Mariani *et-al*, 2012) buscando tanto la vía organogénica como la embriogénesis somática, de hecho la mayor parte de autores que utilizan el hipocótilo es para inducir la vía de la embriogénesis

somática, pero en el caso de este trabajo se usan los explantes de hoja de 1cm² para esta vía. La vía de la embriogénesis somática no se pudo lograr en este trabajo con los explantes utilizados. Aquellos autores que reportan la organogénesis utilizan un medio de cultivo con sales MS adicionado con BA en cantidades más bajas que las utilizadas en este trabajo (3 mg L⁻¹).

Los autores que reportan la embriogénesis somática (Ismidianty y Rachmi, 2010; Soomro y Memon, 2007; y Mariani et-al, 2012) utilizan medios de cultivo con sales MS adicionados con 2,4-D en diferentes concentraciones, pero en este trabajo no resultó de manera satisfactoria este regulador de crecimiento, ya que fue de los medios probados (JE-1) el que brindó los resultados menos favorables en cuanto a la formación de callo. De hecho en este trabajo no se obtuvo un resultado favorable de la vía de la embriogénesis somática.

Soomro y Memon, 2007 y Tiran *et al.*, utilizan explantes de hoja para la inducción de la embriogénesis somática, al igual que se hizo en este trabajo, aunque no haya sido exitoso para este caso. Los medios de cultivo que utilizan son sales MS adicionados de 2,4-D y AIB respectivamente, estos dos diferentes reguladores de crecimiento fueron utilizados para este trabajo sin éxito en la inducción de la embriogénesis.

A diferencia de Tiran *et al.*, los cuales reportan el uso de hojas como explante para inducir la vía de la embriogénesis somática, nosotros lo hicimos ya en el último ensayo probando la hoja para la inducción de la vía organogénica, lo cual resultó bastante satisfactorio ya que se obtuvieron brotes que se desarrollaron hasta obtener plántulas. Al igual que ellos elegimos las yemas axilares y apicales para la inducción de la vía organogénica en los primeros ensayos y resultó satisfactoria al obtener de las yemas de manera indirecta brotes.

La mayor parte de la literatura que hace referencia a la regeneración de *J. curcas* reporta como resultados exitosos aquellos de la vía de la organogénesis, y de esta vía regenerativa comúnmente se reporta la que se obtiene de manera indirecta (Cuadro 1). Este trabajo de investigación reporta ambos tipos de organogénesis.

El uso de los explantes de hoja se encuentra reportado para la vía de la embriogénesis somática en los artículos consultados (Cuadro 1), en cambio en este trabajo, el explante de hoja fue el que brindó los mejores resultados para la vía organogénica.

Comparando la gran cantidad de investigaciones realizadas para la regeneración de *J. curcas* se puede observar que aunque se utiliza la misma especie (*Jatropha curcas* L.), los mismos explantes, y a veces los mismos medios de cultivo o muy parecidos las respuestas son muy distintas, ya que, el resultado depende de múltiples factores físicos, pero también dependen del genotipo que tiene cada planta de la que se obtienen los explantes, como en el caso de este trabajo en el que se probó uno de los medios de Tiran *et al.* para la vía organogénica (JO-2) y uno para la vía de embriogénesis somática (JE-4) (Cuadro 2) y el resultado fue totalmente diferente, ya que, el explante utilizado para la vía de la embriogénesis somática (hoja) fue bastante exitoso pero en los medios de cultivo para la vía organogénica. De hecho los medios utilizados de Tiran *et al.* no fueron los que generaron los resultados más exitosos, sino que una modificación

de éstos (JO-3)(Cuadro 2) fueron los que mostraron los resultados más favorables en cuanto a la formación de callo y brotes.

Como antes ya se ha mencionado los factores implicados en la respuesta de los ensayos antes presentados son muchos, pero se debe destacar el medio de cultivo, ya que es un factor determinante para cada ensayo. Los mejores medios de cultivo se fueron probando hasta determinar como el mejor medio el JO-3 como se puede apreciar en la Gráfica 7, del cual analizando su composición (Cuadro 2) se puede entender la respuesta presentada.

Todos los argumentos en los que se habla sobre el mejor medio de cultivo y el mejor explante están basados en el análisis estadístico mediante la prueba de T de Student que se realizó para ese conjunto de datos (Anexo 2). El análisis estadístico que se realizó a partir de la toma de datos como el porcentaje de callo, oxidación y número de brotes por explante nos permite afirmar que para este trabajo, el mejor medio de cultivo, es decir aquel que formó un callo prolifero, en el que hubo menor oxidación, y el que formó en el explante de hoja un mayor número de brotes fue el JO-3, ya que mostró diferencias significativas entre los otros medios de cultivo. Los resultados ya habían sido analizados anterioremente de manera cualitativa, mediante observaciones y mediante las gráficas presentadas, pero no fue hasta que se realizó la prueba estadística que se pudo afirmar con total certeza que el medio JO-3 tiene diferencias significativas y altamente significativas respecto a los otros medios de cultivos con los que se trabajó en cuanto a porcentaje de callo, y al número de brotes por explante.

La composición del medio de cultivo JO-3 (Cuadro 2) es uno de los múltiples factores que permitieron que se destacara en las diferentes inducciones realizadas. El medio contiene sales MS al 100% que le permitió brindar los micronutrientes y macronutrientes necesarios para la proliferación de callo y la aparición de brotes de manera directa e indirecta. En la composición del medio JO-3 también se encuentran la Glicina al 100%, la vitamina R2 al 100%, reguladores de crecimiento, sacarosa, agente gelificante, y agua, los cuales cumplen con funciones específicas en las plantas, o en este caso, en los explantes.

Las sales MS forman parte del medio de cultivo JO-3 que fue seleccionado como el mejor medio de cultivo a lo largo de todos los ensayos presentados en este trabajo, éstas contienen los elementos minerales esenciales que requieren las plantas y en este caso el explante.

Los elementos minerales esenciales se clasifican por su concentración relativa en la planta como macronutrientes y micronutrientes (Taiz and Zeiger, 2010), los cuales se encuentran en el medio de cultivo utilizado, ya que sin ellos puede haber anomalías en el crecimiento, desarrollo o reproducción de la planta.

Entre los macronutrientes podemos mencionar algunas de sus funciones y así se puede entender su importancia en el metabolismo de la planta. Muchos de los macronutrientes cumplen una función como cofactores de enzimas, es decir, su ausencia generaría la función nula o ineficiente de más de 40 enzimas diferentes. El nitrógeno (N) es constituyente de aminoácidos, ácidos nucleicos, amidas, proteínas, nucleótidos, coenzimas, etc. El fostato (P), componente del

azúcar fosfato, ácidos nucleicos, nucleótidos, fosfolípidos, etc. En cuanto a los micronutrientes, muchos de ellos cumplen una función en procesos fotosintéticos, en la formación de O₂ forman parte de citocromo, algunos son componentes de pared celular, otros son importantes para la función de algunas enzimas, algunos en la regeneración de fosfoenolpiruvato, etc. Sólo por mencionar algunos de los elementos esenciales, de las funciones tan importantes que cumplen y destacar que su presencia es indispensable en el medio de cultivo.

Otro componente del medio de cultivo son las vitaminas, en el caso de esta investigación se utilizaron las vitaminas B2. Las plantas las producen por sí mismas, pero en el caso de plantas en cultivos *in vitro* se le deben adicionar al medio, ya que aumentan la sobrevivencia de las plantas.

La composición del medio en la parte de reguladores de crecimiento es determinante en la respuesta que se desea obtener. En el CTV se utilizan auxinas y citocininas en balance para estimular la división celular y controlar la morfogénesis (Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994). En el caso de esta investigación el medio JO-3 que fue el que presentó una mejor respuesta sólo contiene BA (3 mg L⁻¹) en la inducción y proliferación. Se puede pensar que éste medio presentó los mejores resultados ya que el explante bajo tratamiento, es decir, la hoja basal con nervadura central, de manera endógena contiene una alta concentración de auxinas, por lo ya antes analizado en cuanto a su posición tan cercana a la yema axilar que es una zona meristemática, por el origen de la nervadura central del procambium, ya que en las zonas meristemáticas se sintetizan las auxinas, y basados además en el argumento de que en zonas de acumulación de auxinas se originan las hojas. Así ya sólo con la adición de BA (3 mg.L⁻¹) resultó muy favorable, pues como se menciona en la introducción un balance entre las auxinas y citocininas determina la respuesta de los explantes, entre otros factores. De hecho dos reguladores de crecimiento pueden actuar de manera sinérgica o antagonista en ciertas circunstancias, ya que un regulador de crecimiento puede afectar la biosíntesis o metabolismo de otro, y eso también depende de los niveles de éstos de manera endógena en la planta.

BA es un regulador de crecimiento que pertenece a las citocininas que derivan de adeninas y es sintético. La importancia de esta citocinina es que estimula la síntesis de proteínas y participa en el ciclo celular, incluso en el órgano al que se aplica se convierte en un receptor de aminoácidos que migran hacia él. El BA además puede participar en la activación de la síntesis de RNA, síntesis de proteínas y en la actividad de algunas enzimas (Radice, 2004).

Las citocininas adicionadas al medio de cultivo superan la dominancia apical y liberan de la latencia a las yemas axilares. Estimulan la formación de brotes, por tal motivo se utiliza en el CTV para la inducción de la organogénesis. En el caso de esta investigación se utilizó para la inducción de la organogénesis, por lo que se adicionó al medio de cultivo BA. Los brotes obtenidos se presentaron tanto de forma directa como indirecta.

Además de todo lo antes mencionado es importante la adición de las citocininas al medio de cultivo, ya que aunque la planta de manera endógena posee concentraciones de citocininas, los órganos aislados o explantes en condiciones *in vitro* en ocasiones son incapaces de sintetizar suficiente

concentración para mantener el crecimiento. Incluso algunos callos son dependientes de la citocinina para poder llevar a cabo la división celular.

El uso de BA, una citocinina sintética, es bastante común en el cultivo de tejidos vegetales, ya que tienen una gran estabilidad. Las condiciones de fotoperiodo (16/8 h) bajo el que se encontraron los cultivos de todos los ensayos reportados, también afectó la respuesta de éstos, ya que la acción de las citocininas son dependientes de luz.

El medio JO-3 (Cuadro 2) está adicionado con sacarosa, la cual juega un papel como fuente de carbono, sustituyendo el carbono de la atmósfera fijado por las plantas de manera natural en un ambiente *ex vitro*, ya que las plantas en condiciones *in vitro* se presenta una actividad fotosintética muy baja o incluso nula. También juega un papel importante en la osmoregulación del medio al no dejar las moléculas de agua tan disponibles.

Por último los medios de cultivo utilizados (Cuadro 2) tenían un componente del medio llamado agente gelificante (excepto el medio 1 de enraizamiento). El agente gelificante en un inicio se trataba de Gelzan, pero al observarse en los callos y posteriormente en los brotes un poco desarrollados, un fenómeno de hiperhidratación se decidió cambiar de agente gelificante. La hiperhidratación ocurre en los cultivos *in vitro* y se detectó en el callo y brotes como una turgencia, en la que hay mucho contenido de agua dentro de las células, lo que puede ocurrir como consecuencia de esto es un fenómeno de vitrificación en la que el agua dentro de las células se congela, formando cristales, los cuales rompen las membranas celulares y generan como consecuencia la muerte celular. Para evitar esta serie de problemas, se hizo el cambio de agente gelificante, se eligió el Agar gell, el cual en comparación con el Gelzan, posee un potencial osmótico mayor, así la disposición del agua en el medio de cultivo fue más baja. El fenómeno de hiperhidratación pudo haber ocurrido también por el genotipo de la planta, ya que *J. curcas* es una planta que en estado natural puede vivir en suelos con alta desecación, y puede sobrevivir a largos periodos de sequía, incluso puede vivir en zonas marginales semiáridas (Torral et al., 2008), ya que está mejor adaptada a condiciones áridas o semiáridas (Heller, 1996). Incluso algunos autores mencionan que en cultivo tradicional *J. curcas* L. es intolerante a la humedad permanente (Franken y Nielsen, 2009).

Es interesante observar los mejores resultados en un medio de cultivo sin tantos componentes como aminoácidos, combinación de más reguladores de crecimiento, cocteles, o preparaciones naturales complejas (por ejemplo el agua de coco), y tiene mucho sentido, ya que la planta en su entorno natural, crece en suelos muy pobres en nutrientes, suelos que ya formaron parte de un cultivo anterior, suelos que fueron utilizados incluso en potreros (Schmook y Sánchez, 2000).

El primer ensayo mostró una oxidación total en los callos de la vía embriogénica, pero en general la oxidación se presentó no sólo en la inducción, sino también en la proliferación, regeneración y enraizamiento. Fu et al, 2014. realizaron un estudio en el que midieron el contenido de fenoles en extractos de diferentes partes de la planta y se encontraron en altas concentraciones.

De esta manera, la oxidación presente en los ensayos con *J. curcas* L. que se presentan en esta tesis, la podemos atribuir al alto contenido de fenoles que la

propia planta produce y secreta al medio de cultivo, el cual en muchas ocasiones se tornaba café o casi negro (Figura 14) (Gráficas 4-6), además del estrés que pudieron sufrir los explantes en el momento de la disección y la desinfección.

Los problemas de oxidación que se presentaron en el primer ensayo conllevaron a la modificación del medio de cultivo en el que se agregó el PVP a los medios de cultivo de la vía de embriogénesis somática. Además de seguirse utilizando en el medio de regeneración JR-1 (Cuadro 2), ya que también en esa etapa se presentaron problemas de oxidación en los brotes en desarrollo. SE adicionó también cisteína (Cys).

La adición al medio de cultivo del PVP y cisteína se deben a que tienen una acción antioxidante. El PVP (polivinylpirrolidona) es un polímero soluble en agua formado por monómeros de N-vinylpirrolidona, el cual tiene muchos usos a escala industrial, pero adicionado al medio de cultivo actúa como un adsorbente de polifenoles que pueden causar la desactivación de algunas proteínas. En cuanto a la cisteína (Cys) se trata de un aminoácido no esencial azufrado, y tiene una acción antioxidante, ya que tiene un efecto desintoxicante sobre los explantes, evitando el deterioro causado por las toxinas.

El medio de cultivo JR-1 (Cuadro 2) presenta en su composición BA (0.5 mg L⁻¹) y se adiciona la auxina AIA (0.5 mg L⁻¹), lo cual se hizo debido a que se buscaba que los brotes que ya habían sido producto de la inducción y proliferación se desarrollaran, para lo cual los efectos de la citocinina de estimular la división celular y la diferenciación de brotes ya no es necesaria para esta etapa, sino que ahora los brotes que ya se han diferenciado es necesario que se desarrollen hasta formar la plántula, además las citocininas en altas concentraciones pueden contrarrestar los efectos de las auxinas.

Dicho esto se adicionó la auxina AIA con la finalidad de que los brotes se elongaran, tanto el tallo, los entrenudos, y las hojas, ya que el AIA estimula la elongación celular, el crecimiento de brotes y por último estimula el desarrollo de raíces.

El AIA es la auxina más utilizada, es natural, y tiene efecto en la pared celular, ya que incrementa su extensibilidad, además es importante en la diferenciación del xilema y floema, lo que también se busca para el desarrollo de brotes para obtener una plántula funcional.

En la etapa de enraizamiento las citocininas son totalmente omitidas, ya que como se mencionó antes, las citocininas en concentraciones altas pueden contrarrestar los efectos de las auxinas, así pueden inhibir o retrasar la formación de raíces y contrarrestar totalmente la acción de las auxinas para promover la iniciación de raíces. Las auxinas se aumentaron en concentración en la etapa de enraizamiento, en el caso de los medios de enraizamiento empleados (Cuadro 2) en estos ensayos (1, 2, 3 y 4) se utilizaron concentraciones altas de auxina AIB (6 mg L⁻¹) en medio líquido (medio 1) y posteriormente en medios sólidos (medios 2, 3 y 4) por poco tiempo, sólo se les dio un estímulo fuerte para posteriormente colocarse en un medio MS sin hormona y que este cambio provocara el desarrollo de raíces para obtener una planta completa.

A pesar de haberse hecho esto la respuesta presentada no fue satisfactoria, ya que sólo una de las plántulas presentó el desarrollo de raíces,

solamente una de seis plántulas desarrolló raíces. La respuesta generada pudo deberse a que los explantes y los brotes originados a partir de ellos, estuvieron sometidos por un periodo muy largo a concentraciones altas de BA, tanto en la inducción como proliferación, lo cual provocó una buena respuesta en cuanto a la formación y diferenciación de los brotes, pero no en la posterior formación de raíces, ya que como antes se mencionó las citocininas pueden inhibir la acción de las auxinas para promover la formación de raíces.

En la Gráfica 8. Peso fresco se encuentran los datos que son el resultado de la medición en gramos que se hizo del callo a lo largo de cada semana. En la Gráfica 9 se pretende analizar en cada medio de cultivo la ganancia que hay respecto al número de brotes promedio que poseen los explantes al paso de las semanas. La Gráfica 10 en cambio, es el resultado de las mediciones en longitud que se hicieron para cada uno de los brotes contados en la Gráfica 9, y se puede apreciar que los brotes van ganando milímetros en promedio al pasar las semanas.

La Gráfica 8, Gráfica 9 y Gráfica 10 muestran un comportamiento sigmoideal, que realmente coincide con el modelo de una curva de crecimiento para cualquier población, en donde el peso ganado en gramos cambia en función del tiempo; el número de brotes cambia en función del tiempo; y la longitud de los brotes aumenta en función del tiempo, respectivamente.

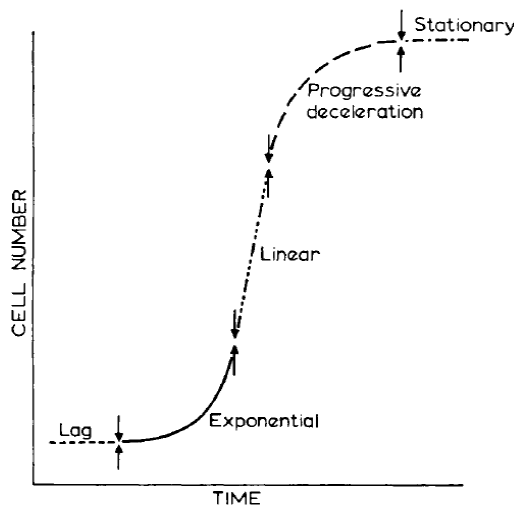


Figura 21. Curva modelo que representa el crecimiento en función del tiempo (Bhojwani y Razdan, 1996)

La curva modelo (Figura 22) y las Gráfica 8 nos indica al inicio una fase lag, la cual muestra el establecimiento del cultivo, comienza con una cantidad determinada de peso fresco, en este caso es 1g de callo en medio sólido. En esta fase que es de corta duración no hay crecimiento celular, sino hasta que comienza la fase exponencial. La fase exponencial en un inicio presenta una velocidad de crecimiento es lenta, es decir, el aumento de tamaño por unidad de tiempo, que puede deberse a la cantidad baja del número de células que están en constante división. Se le denomina fase exponencial ya que el número de células con capacidad de dividirse va aumentando de la siguiente manera: 1, 4, 8, 16, etc. En el caso de este trabajo se mide la ganancia de peso fresco en función del tiempo.

Le sigue la fase lineal, en la que a periodos iguales de tiempo, corresponden aumentos iguales en el crecimiento. La siguiente fase es la senescencia, en la que la velocidad de crecimiento va disminuyendo poco a poco conforme pasa el tiempo, en algunos casos se le llama fase de desaceleración y termina hasta que se detiene el crecimiento, en donde decimos que la curva llega a una etapa estacionaria, y ya no se presenta crecimiento alguno aunque la función tiempo siga. Y en la Gráfica 8 podemos observar que ya no hay un aumento de peso fresco aunque el callo sigue en contacto con

medio de cultivo, incluso aunque el medio de cultivo sea renovado en cada subcultivo y con nutrientes que siguen estimulando el crecimiento y división celular. Se debe tener en cuenta que las gráficas obtenidas en los experimentos no siempre presentan de manera notable las fases antes mencionadas, en ocasiones las fases no se distinguen fácilmente una de otra, aunque en general tienden a mostrar un comportamiento muy similar.

De igual manera que se explicó la curva modelo (Figura 22) con la Gráfica 8, el comportamiento en la Gráfica 9 y Gráfica 10 se ajusta también al modelo. En el caso de la Gráfica 9 podemos observar que en la fase lag se tiene una baja cantidad de brotes promedio por explante, no hay formación de nuevos brotes sino hasta la fase exponencial. En el caso de la Gráfica 10, en la fase lag no se muestra un crecimiento medido en milímetros, sino hasta la fase exponencial. La fase lag es de corta duración y no presenta cambios en las mediciones hechas para ambas gráficas.

Cuando comienza la fase exponencial y posteriormente la linear, ambas gráficas muestran un incremento en el número de brotes por medida de tiempo y un incremento en la longitud de los brotes medida en milímetros, respectivamente. Esto para cada uno de los medios de cultivo, que fueron renovados en cada subcultivo y que también permitieron que los explantes tomaran lo necesario para este fin, ya que se trata de medios de cultivo para inducción y proliferación que de hecho tienen la finalidad de incrementar estas respuestas.

En la fase estacionaria observamos que a medida que pasa el tiempo ya no hay cambios en nuestros parámetros a medir, primero ocurre progresivamente y después ya no hay nada de cambios aunque pase más tiempo. En el caso de la Gráfica 9 no es muy notable esta fase, pero se debe considerar que los casos reales en ocasiones no se comportan igual que el modelo, aunque se observa que los cambios en el número de brotes en las últimas semanas ya no sigue la misma velocidad, aunque siguen aumentando el número de brotes, no tiene la misma tasa que en las primeras semanas.

La Gráfica 10 muestra un comportamiento más parecido con la curva modelo, ya que, para las últimas mediciones se muestra, primero una desaceleración progresiva, pero posteriormente ya no hay cambios en el promedio de longitud de brotes en función del tiempo, y se logra visualizar mejor para el caso del medio JO-3.

La cinética de crecimiento no ha sido reportada por los autores de la bibliografía consultada de regeneración de *J. curcas* (Cuadro 1) por lo cual se destaca el presente trabajo, ya que tiene aplicaciones en temas como cultivos en suspensión pues para realizarlos es necesario tomar en cuenta en qué momento tomar el inóculo de callo. Los cultivos en suspensión además tienen múltiples aplicaciones, como la obtención de metabolitos secundarios, la selección de líneas celulares, para la proliferación y germinación de embriones somáticos, se ha pensado en utilizar cultivos en suspensión para la producción a larga escala de proteínas recombinantes de alta calidad (Ryu *et-al*, 2004) y muchas otras aplicaciones más. Tiene aplicaciones en seleccionar el momento en el que deben estar el callo para hacer transformación genética e introducir algún plásmido con un gen de interés (Dutta e Ibaraki, 2008).

6

Conclusiones

A continuación se presentan las conclusiones obtenidas del presente trabajo:

- Se realizó la germinación mediante dos vías, germinación *in vitro* y germinación *ex vitro* (condiciones de invernadero), siendo la germinación bajo condiciones de invernadero la óptima para obtener plantas donadoras de explantes. La germinación *in vitro* fue deficiente, debido a las condiciones de incubación y al método de desinfección.
- Los explantes utilizados fueron segmentos de hoja de 1 cm². Se probaron segmentos de hoja Basal, Media y Apical siendo los segmentos de hoja Basal los que mostraron el mejor resultado en cuanto a la formación de callo, de igual manera se obtuvo el menor porcentaje en oxidación en cada uno de los diferentes medios de cultivo y presentó formación de brotes.
- Se probaron seis medios de cultivo diferentes de los cuales se determinó de acuerdo a los resultados obtenidos que el mejor medio de cultivo es el JO-3.
- Se probaron diferentes medios de cultivo tanto para organogénesis como para embriogénesis, encontrándose que la ruta regenerativa más eficiente fue la de organogénesis, observándose tanto de manera directa como indirecta.

Bibliografía

- Abdelnour-Esquivel y Escalant, 1994. Conceptos básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. Orton-IIICA-CATIE. Costa Rica. 38 pp.
- Angulo, F., Nevado, A.J. y Tusalle de, X. 2008. Eco-combustible-FA. ECOFA: una solución viable. Mandala y Lápiz Cero. España. 160 pp.
- Asker, S. and Jerling, L. 1992. Apomixis in plants. CRC Press. USA.145 pp.
- Bahadur, B., Sujatha, M. and Carels, N. 2013.Jatropha, Challenges for a new energy crop. Springer. 300 pp.
- Benjumea, P., Agudelo, J. y Ríos L.A. 2009. Biodiesel: producción, calidad y caracterización. Universidad de Antioquia. Colombia. 152 pp.
- Bhojwani, S.S. and Razdan, M.K. 1996. Plant Tissue Culture: Theory and Practic, a Revised Edition. Elsevier. Netherlands. 767 pp.
- Campos, M.M. y Marcos, M.F. 2008. Los Biocombustibles. Mundi Prensa. México. 383 pp.
- Coutiño-Cortés, A., Ovando-Medina, I., Adriano-Anaya, M., Salvador-Figueroa, M. y Ruiz-González, S. 2013. Organogénesis de *Jatropha curcas* a partir de plantas adultas: Estudio de fitohormonas y factores físico-químicos. Quehacer Científico en Chiapas, 8(2): 3-11.
- Dickison, W. 2000. Integrative Plant Anatomy. Harcourt Academic Press. United States of América. 537 pp.
- Dutta, G.S. and Ibaraki, Y. 2008. Plant Tissue Culture Engineering. Springer. Netherlands. 480 pp.
- Franken, Y.J. y Nielsen, F. 2009. Establecimiento y manejo de plantaciones. 15-42 p. In: Fuels from Agriculture in Communal Technology. Manual de *Jatropha*, version en español.
- Garg, P., Khatri, P., and Gandhi, D. 2011. Plant Tissue Culture of *Jatropha curcas* L.: A Review. Imperial Journal of Pharmacognosy & Natural Products, 1 (1): 6-13.

- Heller, J (1996). Physic nut, *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 66 pp.
- Henning, R. 1996. Combating desertification – Fuel from *Jatropha* plants. In UNIDO Symposium of development and utilization of biomass energy resources in developing countries, Vienna, Dec. 1995. UNIDO, Environment and Energy Branch, Industrial Sectors and Environment Division, Viena Austria.
- Herrera, J., Alizaga, R., Guevara, E. y Jiménez, V. 2006. Germinación y crecimiento de la planta. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica. 113 pp.
- Herrera, M., Ortiz, D., Martínez, A. y Becker, K. 2001. El piñón mexicano (*Jatropha curcas* L.) una planta promisoría para la agricultura en México. Chapingo Serie Ingeniería Agropecuaria. 4 (2): 47-50.
- Ismidianty, D. and Rachmi, R. 2010. Fatty acid composition induced in somatic embryo of *Jatropha curcas* in bioreactor. Proceedings of the Third International on Mathematics and Natural Sciences. 158-172.
- Kone-Bamba, D., Y. Pelissier, Z.F. Ozoukou and D. Ouao. 1987. Etude de l'activité hémostatique de quinze plantas medicinales de la "Pharmacopée Traditionnelle Ivoirienne". Plant. Méd. Phytotér. 2(2):122-130.
- Li, M., Li, H., Jiang, H., Pan, X. y Wu, G. 2007. Establishment of an Agrobacterium-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. Springer Science+Business Media.
- Manjari, M., Mukherjee, P., Ghosh, B. and Baran, T. 2007. In vitro clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). Current science, 93(10): 1438-1442.
- Mariani, T.S., Zuirda, M. and Hiroshi, M. 2012. In Depth Study for Developing Efficient Direct Somatic Embryogenesis of *Jatropha Curcas* L.: Morphology and Ultrastructure. International Journal of Basic & Applied Sciences, 12 (6): 20 pp.
- Münch, E. 1986. Die Purgiernuß (*Jatropha curcas* L.). Botanik, Ökologie, Anbau. Diploma thesis. University Hohenheim, Stuttgart.
- Nath, L.K. and S.K. Dutta. 1992. Wound healing response of the proteolytic enzyme curcain. Indian J. Pharmacol. 24 (2):114-115.
- Pramanik, K. 2003. Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. Renew.Ener. 28:239-248.

- Qin, W., Wei-Da, L., Yi, L., Shu-Lin, Pan., Ying, X., Lin, T. and Fang, C. 2004. Plant Regeneration from Epicotyl Explant of *Jatropha curcas*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 30(4):475-478.
- Radice, S. 2004. Morfogénesis in vitro. In: Echenique V, Rubinstein C & Morginski L (eds) *Bioteconología y mejoramiento vegetal*. INTA. Buenos Aires, Argentina. (pp 27-33).
- Razdan, M.K. 2003. Introduction to plant tissue culture. Science Publishers, Inc. United States of America. 375 pp.
- Roca, W.M. and Mroginski, L.A. 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundametos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. 969 pp.
- Ryu, D., Lee, S.O. and Romani, R. 2004. Determination of Growth Rate for Plant Cell Cultures: Comparative Studies. *Biotechnology and Bionengineering*. 35: 3. 305-311 p.
- Schmook, B. y Sánchez, O. 2000. Usos y potencial de *Jatropha curcas*L. en la Península de Yucatán, México. *Foresta Veracruzana*. 2(2): 7-11.
- Shrivastava, S. and Banerjee, M. 2008. In vitro clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): influence of additives. *International Journal of Integrative Biology*, 3(1): 73-79.
- Soomro, R. and Memon, R.A. 2007. Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas*. *Pak.J. Bot.*, 39: 2431-2441.
- Sujatha, M., Sivaraj, N. y Satya, M. 2000. Biochemical and histological changes during in vitro organogenesis in *Jatropha integerrima*. *Biologia Plantarum*, 43(2):167-171.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. Plant physiology. Sinaur Associates Inc., Publishers. U.S.A. 782 pp.
- Tang, W. and Newton, R.J. 2007. Propagation via organogenesis in slash pine. In: Mohan, S. and Häggman, H. (Eds). *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer. Netherlands. 15-23 p.
- Tirán, R., Nugroho, Y.A., Muliani, L. and Touran-Mathius, N. 2010. Clonal mass propagation of *Jatropha curcas* through tissue culture technique. *Sinarmas agribusiness and food*.

BIBLIOGRAFÍA

- Toral, O., Iglesias, J., Montes de Oca, S., Sotolongo, J., García, S., y Torsti, M. 2008. Jatropha curcas L., una especie arbórea con potencial energético en Cuba. Pastos y Forrajes. 31(3): 191-207.

Anexos



Anexo 1. Soluciones Concentradas

SOLUCIONES CONCENTRADAS (100X) DEL MEDIO CONOCIDO
COMO MS (Murashigue & Skoog 1962)

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M. (g)	1L (g)
Solución I: NITRATOS			
Nitrato de Potasio	KNO_3	101.108	190
Nitrato de Amonio	NH_4NO_3	80.04	165
Solución II: SULFATOS			
Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.498	37
Sulfato de Manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	223.0618	2.23
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169.01	1.69
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287.54	0.86
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249.68	0.0025
Solución III: HALÓGENOS			
Cloruro de Calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147.02	44
	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	128.99	38.5
	CaCl_2	110.99	33.2
Yoduro de Potasio	KI	166.01	0.083
Cloruro de Cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	237.93	0.0025
Solución IV: FOSFATO, ÁCIDO BÓRICO, MOLIBDATO			
Fosfato de Potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	154.086	19.248
	KH_2PO_4	136.09	17
	K_2HPO_4	174.2	21.76
Ácido bórico	H_3BO_3	61.86	0.62
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241.95	0.025
Solución V: QUELANTES			
Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278.028	2.784
Na2EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2$	336.2	3.36
Na2EDTA.2H2O	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	372.3	3.724

SOLUCIONES CONCENTRADAS (100X) DEL MEDIO CONOCIDO
COMO N6 (CHU *et.al* 1972)

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M. (g)	1L (g)
Solución I: NITRATOS			
Nitrato de Potasio	KNO ₃	101.108	283
Sulfato de Amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	132.146	46.3
Solución II: SULFATOS			
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	246.498	18.5
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .4H ₂ O	223.0618	0.44
	MnSO ₄ .H ₂ O	169.01	0.332
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.54	0.15
Solución III: HALÓGENOS			
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	147.02	16.6
	CaCl ₂ .H ₂ O	128.99	14.56
	CaCl ₂	110.99	12.53
Yoduro de Potasio	KI	166.01	0.08
Solución IV: FOSFATO, ÁCIDO BÓRICO			
Fosfato de Potasio	KH ₂ PO ₄ .H ₂ O	154.086	45.14
	KH ₂ PO ₄	136.09	40
	K ₂ HPO ₄	174.2	51.04
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	61.86	0.16
Solución V: QUELANTES			
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	278.028	2.78
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂	336.2	3.365
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O	372.3	3.73

REGULADORES DE CRECIMIENTO Y COMPUESTOS ORGÁNICOS
Soluciones concentradas (100X), para preparar

COMPUESTO	FÓRMULA	P.M. (g)	100 ml (g)
Ácido indol-3-acético (AIA)	C ₁₀ H ₉ NO ₂	175.2	10
Ácido indol-3-butírico (AIB)	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂	203.2	10
Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221	10
6-Bencilaminopurina (BA)	C ₁₂ H ₁₁ N ₅	225.3	10
Cinetina (6-furfulaminopurina) (Kn)	C ₁₀ H ₉ N ₅ O	215.2	10
Ácido aminoacético (Glicina)	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	20
Hemisulfato (Adenina)	C ₅ H ₅ N ₆ 1/2HSO ₄	184.2	100

VITAMINAS

Soluciones concentradas (100X), para preparar

COMPUESTO	FÓRMULA	P.M. (g)	250 ml (mg)
Myoinositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.2	2.5 x 10 ³
Ac. Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.1	25
Piridoxina-HCl	C ₈ H ₁₁ NO ₃ ·HCl	205.6	25
Tiamina-HCl	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OSCl·HCl	337.3	50

Anexo 2. Datos estadísticos

Tabla A1. Porcentaje de callo y oxidación para el medio JO-1

Zona de la hoja	Día 13		Día 29		Día 47		Día 61		Día 67		Día 88	
	% callo	% oxidación	% callo	% oxidación	% callo	% oxidación	% callo	% oxidación	% callo	% oxidación	% callo	% oxidación
Basal	0.8	0	4.6777778	1.3333333	12.555556	3.33	19.444444	4.444444	20.555556	11	22.5	36.875
Media	0.4	0	1.89	1.4	4.2	3.6	9.4	22.6	9.4	31	11	50
Apical	0.25	0	0.8375	4.25	2.5	7.5	7.5	21.25	6.25	40	7.5	57.5
PROMEDIO	0.4833333	0	2.4684259	2.3277778	6.4185185	4.81	12.114815	16.098148	12.068519	27.333333	13.666667	48.125
Contaminación	0.05		0.05		0.1		0.1		0.1		0.15	

Tabla A2. Porcentaje de callo y oxidación para el medio JO-2

Zona de la hoja	Día 13		Día 29		Día 47		Día 61		Día 67		Día 88	
	% callo	% oxidación	% callo	% oxidación	% callo	% oxidación	% callo	% oxidación	% callo	% oxidación	% callo	% oxidación
Basal	0.38	0.00	6.76	5.29	17.14	13.14	22.00	26.43	26.43	32.86	27.86	39.29
Media	0.63	0.00	1.10	2.29	3.57	5.86	7.57	13.14	10.00	18.57	12.14	21.43
Apical	0.75	0.00	1.88	9.75	5.00	22.75	5.00	35.50	5.00	48.00	8.75	52.50
PROMEDIO	0.58	0.00	3.24	5.77	8.57	13.92	11.52	25.02	13.81	33.14	16.25	37.74
Contaminación	0.00		0.00		0.05		0.05		0.05		0.05	

Tabla A3. Porcentaje de callo y oxidación para el medio JO-3

Zona de la hoja	Día 13		Día 29		Día 47		Día 61		Día 67		Día 88	
	% callo	% oxidación	% callo	% oxidación	% callo	% oxidación	% callo	% oxidación	% callo	% oxidación	% callo	% oxidación
Basal	0.3333333	0	11.041667	2	23.75	2.5	33.75	7	40	22.5	58.75	23.75
Media	0.3888889	0	7.0069444	3.875	15.625	5.5	26.25	17.875	29.25	26.1975	26.875	31.375
Apical	0.25	0	2.875	13.5	7.5	16.5	0	100	0	0	0	0
PROMEDIO	0.3240741	0	6.974537	6.4583333	15.625	8.1666667	30	12.4375	34.625	24.34875	42.8125	27.5625
Contaminación	0.05		0.05		0.1		0.2		0.2		0.2	

Tabla A4. Promedios para obtener el número de brotes y longitud de brotes por semana

Medio	Parámetro	Semana									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
JO-1	No. Brotes ¹	0.0	0.22	0.33	0.56	1.33	2.11	3.22	4.00	4.44	5.56
	Longitud de brotes ² (mm)	0.0	1.00	1.00	1.20	1.58	1.84	2.38	2.50	2.63	2.56
JO-2	No. Brotes ¹	0.0	0.60	1.00	1.87	3.47	5.07	7.20	9.27	12.00	15.53
	Longitud de brotes ² (mm)	0.0	1.11	1.20	1.21	1.21	1.29	1.33	1.36	1.41	1.43
JO-3	No. Brotes ¹	0.0	1.47	2.80	5.80	9.07	13.13	18.00	23.33	28.33	33.00
	Longitud de brotes ² (mm)	0.0	1.86	2.52	3.69	4.95	5.94	6.09	6.37	6.37	6.39

¹ No. de brotes por explante= No. de brotes / 15 explantes

² Media de longitud de brotes= longitud total de brotes/ no. de brotes

Tabla A5. Ganancia de peso por semana para obtener curva de crecimiento.

Frasco	gramos por semana									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
JO-1										
JO-1 B	0.00	0.35	0.43	0.43	0.44	0.44	0.46	0.48	0.48	0.48
JO-1 M	0.00	0.75	0.78	0.80	0.82	0.82	0.83	0.83	0.84	0.84
JO-1 A	0.00	0.19	0.31	0.39	0.46	0.48	0.48	0.48	0.50	0.50
Media	0.00	0.43	0.51	0.54	0.57	0.58	0.59	0.60	0.61	0.61
Desviación Estándar	0.00	0.29	0.24	0.23	0.21	0.21	0.21	0.20	0.20	0.20
JO-2										
JO-2 B 1	1.00	1.24	1.31	1.32	1.32	1.32	1.34	1.34	1.34	1.34
JO-2 B 2	1.00	1.05	1.11	1.12	1.12	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13
JO-2 B 3	1.00	1.05	1.10	1.12	1.12	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13
JO-2 M 4	1.00	1.07	1.36	1.50	1.52	1.54	1.56	1.56	1.57	1.57
JO-2 M 5	1.00	2.11	2.42	2.75	2.96	3.01	3.05	3.06	3.08	3.08
Media	1.00	1.30	1.46	1.56	1.61	1.63	1.64	1.64	1.65	1.65
Desviación Estándar	0.00	0.46	0.55	0.68	0.77	0.79	0.81	0.81	0.82	0.82
JO-3										
JO-3 1	1.00	2.42	5.50	6.98	7.93	8.37	9.46	9.93	10.00	10.14
JO-3 2	1.00	2.78	4.12	5.80	7.42	9.16	11.74	12.68	12.93	13.68
JO-3 3	1.00	2.10	4.37	5.73	7.33	8.64	10.85	12.94	14.10	14.74
JO-3 4	1.00	1.29	1.59	2.66	3.87	5.16	6.35	8.76	8.97	9.13
JO-3 5	1.00	2.57	3.87	4.34	5.55	7.91	10.36	13.85	14.42	14.82
Media	1.00	2.23	3.89	5.10	6.42	7.85	9.75	11.63	12.08	12.50
Desviación Estándar	0.00	0.58	1.43	1.65	1.69	1.57	2.07	2.17	2.46	2.68

Tabla A6. Porcentaje de callo y oxidación en todas las repeticiones de cada medio de cultivo, necesarios para realizar la prueba T de Student.

JO-1	Repetición	%callo	%oxidación
JO-1 B	1	25	25
JO-1 B	2	55	15
JO-1 B	3	15	80
JO-1 B	4	15	35
JO-1 B	5	20	35
JO-1 B	6	10	50
JO-1 B	7	20	25
JO-1 B	8	20	30
JO-1 M	9	20	70
JO-1 M	10	0	65
JO-1 M	11	5	15
JO-1 M	12	30	30
JO-1 M	13	0	70
JO-1 A	14	0	60
JO-1 A	15	30	20
JO-1 A	16	0	80
JO-1 A	17	0	70
Promedio		15.5882353	45.5882353
Varianza		218.382353	552.757353
JO-2	Repetición	%callo	%oxidación
JO-2 B	1	25	20
JO-2 B	2	0	15
JO-2 B	3	30	20
JO-2 B	4	5	60
JO-2 B	5	90	25
JO-2 B	6	0	50
JO-2 B	7	45	40
JO-2 M	8	0	20
JO-2 M	9	30	30
JO-2 M	10	0	15
JO-2 M	11	20	5
JO-2 M	12	10	15
JO-2 M	13	25	40
JO-2 M	14	0	5
JO-2 A	15	0	90
JO-2 A	16	25	35
JO-2 A	17	0	35
JO-2 A	18	10	50
Promedio		17.5	31.6666667
Varianza		524.264706	455.882353
JO-3	Repetición	%callo	%oxidación
JO-3 B	1	70	40
JO-3 B	2	60	20
JO-3 B	3	55	15
JO-3 B	4	50	20
JO-3 M	5	35	5
JO-3 M	6	33	0
JO-3 M	7	59	5
JO-3 M	8	33	5
JO-3 M	9	55	6
JO-3 M	10	0	80
JO-3 M	11	0	70
JO-3 M	12	0	80
Promedio		37.5	28.8333333
Varianza		641.727273	950.878788

Tabla A7. Número de brotes por explante en todas las repeticiones de cada medio de cultivo, necesarios para realizar la prueba T de Student.

Medio	Explante	No. brotes
JO-1	1	10
	2	12
	3	8
JO-1	4	5
	5	4
	6	6
JO-1	7	3
	8	2
	9	0
Promedio		5.55555556
Varianza		15.0277778
JO-2	1	16
	2	17
	3	17
JO-2	4	19
	5	13
	6	15
JO-2	7	13
	8	10
	9	20
JO-2	10	15
	11	14
	12	12
JO-2	13	19
	14	21
	15	12
Promedio		15.5333333
Varianza		10.6952381
JO-3	1	36
	2	27
	3	33
JO-3	4	38
	5	25
	6	30
JO-3	7	38
	8	35
	9	33
JO-3	10	28
	11	36
	12	39
JO-3	13	37
	14	29
	15	31
Promedio		33
Varianza		19.8571429