



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Evaluación del potencial morfogénico de
diferentes explantes para la regeneración *in vitro*
de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

DIANA VÁZQUEZ GONZÁLEZ

Directora de Tesis:
M. en C. Ma. TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES

Asesor Interno:
Biól. Juan Romero Arredondo



Cultivo de
tejidos vegetales

México 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.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica por el financiamiento otorgado a esta investigación a través de la etapa 2 del proyecto IN106909 “Estrategia para la producción de biocombustibles de segunda generación y de productos químicos de alto valor agregado a partir de *Jatropha curcas*”, bajo la dirección del Dr. M. Javier Cruz Gómez

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo Vegetales del conjunto E del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM. La dirección estuvo a cargo de la M. en C. Ma. Teresa de Jesús Olivera Flores.

La parte correspondiente a la recolecta del material vegetal, se realizó con el apoyo del CENVyTT de Rosamorada, Nayarit; bajo la dirección del M. en C. Antonio López Escobedo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a la vida por mi existencia y tener la fortuna de experimentar y aprender en esta gran aventura que es la vida misma.

A la UNAM, por darme la oportunidad de pertenecer a ella, por ser cuna del grandioso conocimiento que aporta al desarrollo de mi México, por darme una educación universal que me ha permitido tener una visión distinta.

A la FES-Zaragoza que me despertó la inquietud por siempre adquirir conocimiento en cualquier rincón de ella a través de mis maravillosos profesores; por cobijarme en sus instalaciones y permitirme tener un sin fin de experiencias y aventuras; por haberme formado como Bióloga.

Al Dr. M. Javier Cruz Gómez, por hacerme participe de su proyecto y su apoyo.

Al Laboratorio 116, Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Química, UNAM, dirigido por la M. en C. María Teresa de Jesús Olivera Flores, por abrirme sus puertas, brindarme la oportunidad de aprender y demostrar mis conocimientos, por siempre mantener una retroalimentación de ideas, por permitirme estar en un ambiente de compañerismo, de cooperación y apoyo.

A la Bióloga María de Jesús Villalobos, por siempre brindarme de su tiempo, por su paciencia y su enseñanza en el asesoramiento técnico del presente estudio.

Al CENVyTT de Rosamorada Nayarit, por el apoyo proporcionado para las recolectas del material vegetal. Y por siempre tener un grato recibimiento y amabilidad de todo el personal durante mis estancias.

Al M. en C. Antonio López Escobedo, director del CENVyTT de Rosamorada por las facilidades otorgadas. Por permitirme conocer un poco del gran ser humano que es, por permitirme admirar su ferviente lucha por el crecimiento del centro y sobre todo por hacerme ver que la humildad es de grandes.

Al Ingeniero Agrónomo Zootecnista Israel Carrillo Sánchez, por siempre tener la disposición de acompañarme a las recolectas, compartirme de su conocimiento y hacer más amena y afortunada mi estancia en el CENVyTT.

Al M. en B. R. A. Mario Teteltitla Silvestre, por su asesoría en la realización del análisis estadístico.

A Jesús Salgado Vázquez, fotógrafo profesional por las fotografías del cultivo de tejidos.

Un agradecimiento muy especial a Mayte: una guerrera, por transmitirme el amor al cultivo de tejidos, pues esa paz que irradia al trabajar junto a ella en campana, me atrapó. Gracias por todo el aprendizaje, por las oportunidades, por escucharme, por compartir, por enseñarme el significado de un líder y por sus tantas palabras de aliento, las llevo conmigo siempre en mi corazón. Le agradezco infinitamente por ser parte importante de mi formación profesional y personal. GRACIAS POR TANTO Y TANTO.

A Nína (†):

Por cuidarme, protegerme y darme su amor.

Por cultivar en mí corazón la humildad, la nobleza y la verdad.

Por enseñarme qué es la fortaleza y la virtud, día a día con su ejemplo.

Por darme raíces

A mi mamá por su enorme apoyo, por tratar de entenderme, por respetar mis ideologías, por sostenerse siempre de pie en este difícil camino, por mostrarme que se debe tener valor en esta vida y por enseñarme la responsabilidad y la entrega en lo profesional. Te amo y admiro mucho Má y te agradezco infinitamente que me hayas dado el regalo más hermoso: ¡La vida!

A mi hermano Omar porque ha sido otro regalo maravilloso que la vida me mandó, por ser un motor en mi vida, porque siempre me llena de sonrisas y muchas satisfacciones, porque hemos crecido de la mano y porque ha sido un placer verte crecer. Te amo Chacales.

A mi primo Humberto porque siempre me contagia de sus ganas de vivir y sus ganas de emprender nuevas cosas día a día. Bombón, eres una de las personas que admiro, siempre que me siento caer te recuerdo y me das fuerza. Te amo.

A mis primos que a lo largo de los años me han llenado de risas, y me han enseñado el significado de la hermandad y la amistad.

A mis tíos: Juanita, Licha, Nena, Gela, Rocío, Saúl, César, Lola, Lety, Fortino, Consuelo, Pofirio (†), Gustavo, Lourdes e Hilario por ser mi familia, por siempre brindarme su ayuda y permitirme aprender de cada uno. Llevo un poco de ustedes siempre conmigo en el corazón.

A Sandra y Jessi, por siempre ser mis cómplices, por escuchar mis loqueras, por preocuparse por mí y por su apoyo en todo momento. No pude encontrar mejores amigas para compartir tantos momentos de risas y lágrimas. ¡Gracias por todo!

A mis grandes compañeros de aventuras: Carapia, Licha, Osvaldo, Jaqui, Eva, Roberto, Marcela, Alberto, Diana, Mony, Bety, Adriana, Nadia, Cedillo, Erika, Gabo, Chucho, Carlitos (†), Jazmín, Marianita, Yibb, Alfredo, Saraí, Sulfato, Sergio, Diego, Javo, Gary, Ximena, Jatnael, Harumy, Pily e Irving. Gracias por hacerme esta travesía mas amena. Es un placer compartir la vida con ustedes.

A Rocío Carreto, una mujer muy especial que admiro profundamente, porque me ha enseñado la belleza del corazón con sus palabras y acciones. Gracias por siempre estar para mí y ser parte esencial de mí, pues siempre me has ayudado a poner la última pieza del rompecabezas.

A Margarita Jaramillo por encaminarme en mi búsqueda, por formar parte fundamental de mi crecimiento, por sus sabias palabras, por transmitirme su ciencia, por enseñarme con su guía a darle el verdadero valor y el significado adecuado a lo que realmente es importante para mí y sobre todo, por ayudarme a vencer mis miedos. ¡Gracias Maestra!

**El misterio es la cosa más bonita que podemos experimentar.
Es la fuente de todo arte y ciencia verdadera.**

A. Einstein

ÍNDICE

	Págs.
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	8
1. <i>Jatropha curcas</i> L.	9
1.1 Clasificación taxonómica	9
1.2 Descripción botánica y/o morfológica	9
1.2.1 Hojas	10
1.2.2 Venación	10
1.2.3 Inflorescencias	11
1.2.4 Flores	11
1.2.5 Frutos	12
1.3 Centro de origen y distribución geográfica	13
1.4 Usos	14
1.4.1 Función antibiótica	14
1.4.2 Función antitumoral y anticancerígena	15
1.4.3 Materia prima para productos industriales.	16
1.4.3.1 Pesticida y fungicida	16
1.4.4 Recuperación de suelos	16
1.4.5 Protección ambiental	16
1.5 Cultivo	17
1.6 <i>Jatropha</i> como fuente de biodiesel	18
1.6.1 Algunos de sus derivados	21
1.7 Importancia de la especie	21
2. Cultivo de tejidos vegetales para la clonación y micropropagación de especies sobresalientes	22
2.1 Factores que influyen en el cultivo <i>in vitro</i>	24
2.1.1 Material Vegetal	24
2.1.1.1 Plantas donadoras de material vegetal	24
2.1.2 Factores químicos	25
2.1.2.1 Carbohidratos	25
2.1.2.2 Sales inorgánicas	25
2.1.2.3 Aditivos: vitaminas y aminoácidos	26
2.1.2.4 Reguladores de crecimiento	26
2.2 Organogénesis	28
2.2.1 Organogénesis directa	28
2.2.2 Organogénesis indirecta	28
2.3 Inconvenientes durante la micropropagación	28
2.3.1 Procesos oxidativos en el cultivo <i>in vitro</i> y alternativas para contrarrestarlos	28

2.4 Regeneración <i>in vitro</i> de <i>Jatropha curcas</i>	30
JUSTIFICACIÓN	32
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Ruta crítica	35
2. Material biológico	36
2.1 Recolecta	36
3. Aspectos generales	37
3.1 Preparación de medios de cultivo	37
3.2 Condiciones de incubación	37
4. Fase 1: Tratamientos de desinfección y siembra de explantes	38
5. Fase 2: Germinación <i>in vitro</i>	40
6. Fase 3: Inducción de la organogénesis	41
7. Fase 4: Regeneración (multiplicación de brotes)	43
8. Fase 5: Crecimiento, desarrollo y enraizamiento	44
9. Fase 6: Transplante <i>ex vitro</i>	45
10. Análisis estadístico	45
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	
1. Fase 1: Tratamientos de desinfección	47
a. Semillas maduras	47
b. Botones florales	48
2. Fase 2: Germinación <i>in vitro</i>	49
a. Desarrollo del eje embrionario.	49
b. Embrión verde	50
c. Formación de yema apical	51
d. Aparición de la primera hoja verdadera	52
e. Longitud del tallo	53
f. Desarrollo del sistema radical	54
g. Porcentaje de germinación	55
3. Fase 3: Inducción de la organogénesis	56
a. Inducción de callo en hoja y tallo	57
4. Fase 4: Regeneración (multiplicación de brotes)	62
a. Obtención de brotes en callo proveniente de hoja y tallo	62
b. Oxidación	65
5. Fase 5: Crecimiento, desarrollo y enraizamiento	68
a. Primera etapa	68
b. Segunda etapa	69
c. Tercera etapa	69
d. Cuarta etapa	70
6. Fase 6: Transplante <i>ex vitro</i>	72

DISCUSIÓN	
1. Fase 1: Tratamientos de desinfección	75
2. Fase 2: Germinación <i>in vitro</i>	77
3. Fase 3: Inducción de la organogénesis	79
a. Establecimiento de callo (inducción y proliferación)	79
4. Fase 4: Regeneración: multiplicación de brotes	82
a. Oxidación	83
5. Fase 5: Crecimiento, desarrollo y enraizamiento	85
a. Primera etapa	86
b. Segunda y tercera etapa	86
c. Cuarta etapa	87
6. Fase 6: Transplante <i>ex vitro</i>	87
PROTOCÓLO PARA LA REGENERACIÓN <i>in vitro</i> DE <i>Jatropah curcas</i> L.	89
CONCLUSIONES	91
ANEXOS	93
BIBLIOGRAFÍA	101

ABREVIATURAS

Ác.	Ácido
AIB (IBA)	Ácido indol-3-butírico
BA (BAP)	6-bencilaminopurina (6-benciladenina)
B5	Medio Cultivo de Gamborg et al., 1968
CA	Carbón Activado
CENVyTT	Centro de Valoración y Transferencia Tecnológica
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados
CO ₂	Dióxido de carbono
CTV	Cultivo de Tejidos Vegetales
°C	Grados Celcius
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
kcal	Kilocaloría
kg	Kilogramos
L	litro
meq	Miliequivalentes
mm	Milímetros
mM	Milimolares
MS	Medio Cultivo de Murashige y Skoog, 1962
μM	Micromolares
POP	Polifenol Oxidasa (enzima)
ppm	Partes por millón
PVP	Polivinilpirrolidona
RIP	Ribosome Inactivating Protein
ROS	Especies de Oxígeno Reactivo
Sol.	Solución
T	Tratamiento
U L ⁻¹	Unidades por litro (concentración de Nistanita)
Vit.	Vitamina
¹ O ²	Oxígeno singulete
• Medios de Cultivo	
MS-1	Medio MS al 50%
MS-2	Medio MS al 25%
JO-0	Medio MS modificado para inducción y proliferación de callo
JO-1	Medio MS modificado para inducción y proliferación de callo
JO1-B5	Medio B5 modificado para inducción y proliferación de callo
JR-1	Medio MS modificado para regeneración de brotes
JR1-a	Medio MS modificado para regeneración de brotes
JR1-B5	Medio B5 modificado para regeneración de brotes
JE-1	Medio MS modificado para enraizamiento
JE1-B5	Medio B5 modificado para enraizamiento
JE-2	Medio MS modificado para enraizamiento
JE2-B5	Medio B5 modificado para enraizamiento
JE-3	Medio MS modificado para enraizamiento
JE3-B5	Medio B5 modificado para enraizamiento

Jatropha curcas es una planta arbustiva perteneciente a la familia *Euphorbiaceae*, originaria de México y Centroamérica. En diferentes países se ha utilizado en cercas vivas, para control de la erosión del suelo, en la medicina tradicional y veterinaria. El cultivo de esta planta en los últimos años ha sido una importante alternativa para la producción de biodiesel, ya que presenta un alto rendimiento de aceite a partir de las semillas. Además, se caracteriza por su fácil adaptabilidad a diferentes tipos de suelos y su baja exigencia en nutrientes y agua. Las técnicas de propagación convencional promueven variabilidad en la producción, siendo necesario la aplicación de métodos más eficientes, por lo que la propagación *in vitro* propone ser una alternativa para clonar y multiplicar masivamente esta especie.

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la capacidad morfogenética de diferentes explantes de *Jatropha curcas* para establecer un protocolo para su regeneración *in vitro* y aclimatización *ex vitro*, a partir de semillas maduras e inflorescencias recolectadas en el estado de Nayarit, México; variedad que no ha sido estudiada.

Se llevo a cabo en 6 fases: la primera fue la desinfección del material vegetal inicial, el cual fue sometido a diferentes agentes desinfectantes en diferentes concentraciones y a diferentes tiempos, resultando las semillas las más exitosas pues se logró una asepsia al 100%, a diferencia de las inflorescencias que no se consiguió su desinfección.

La segunda fase consistió en la germinación de las semillas maduras ya desinfectadas en dos medios nutrimentales MS (Murasighe y Skoog, 1962) modificados en la concentración de las sales minerales, MS-1 (50%) y MS-2 (25%) evaluando durante 40 días 6 parámetros: 1.Desarrollo del eje embrionario, 2.Embrión , 3.Formación de yema apical, 4.Aparición de la primera hoja verdadera, 5.Longitud de tallo, 6.Desarrollo del sistema radical, logrando una germinación del 25 y 95%, respectivamente.

La tercera fase fue la inducción a la organogénesis, la cual se basó en la inducción y proliferación de callo a partir de hojas y tallos (explantes provenientes de la germinación *in vitro*), cultivados en 3 medios nutrimentales modificados en su composición mineral: JO-0 con sales MS al 100% + 3mg.L⁻¹ de Ácido indol-3-butírico (AIB), JO-1 con sales MS al 50% + 0.3mg.L⁻¹ y JO1-B5 con sales B5 al 100% + 0.3mg.L⁻¹, adicionados con la misma concentración de 6-benciladenina (BA): 3mg.L⁻¹, para así determinar el mejor explante y medio de cultivo, siendo hoja en JO-0 quien produjo una mayor cantidad de callo (100%) durante 8 meses.

En la cuarta fase se tomó el callo proliferado de ambos explantes para determinar cuál era el idóneo y qué medio propició el origen de los brotes y su multiplicación a lo largo de 90 días; para ello se formularon 3 medios de cultivo con la única diferencia en la cantidad de minerales, JR-1 con sales MS al 100%, JR1-a con MS al 50% y JR1-B5 con sales B5 al 100% añadiendo 1mg.L⁻¹ de 6-benciladenina (BA) a cada uno. Debido a que en esta fase se presentó un alto índice de oxidación que provocó la pérdida de brotes, se utilizó Polivinilpirrolidona (PVP) y Carbón activado (1mg.L⁻¹ para ambos casos) para también evaluar el agente antioxidante más eficiente; la mejor respuesta se logró con el callo proveniente de hoja en el medio JR1-a con 8 brotes por frasco de callo adicionado con Carbón activado.

El propósito de la quinta fase fue lograr el crecimiento, desarrollo y enraizamiento de los 98 brotes obtenidos de la fase anterior, por lo que se tuvo que efectuar en 4 etapas; en la primera los brotes fueron sembrados en los medios JE-1 (sales MS al 50%) y JE1-B5 (sales B5 al 100%) suplementados con 3mg.L⁻¹ de Ácido indol-3-butírico (AIB) resultando una proliferación de callo alrededor de la base de los brotes limitando su desarrollo y provocando la completa oxidación del 70 % de ellos, por tanto los brotes se sometieron a un pulso en medios líquidos (JE-2 y JE2-B5) con 6mg.L⁻¹ de Ácido indol-3-butírico (AIB), como parte de la segunda etapa para dar paso a

una tercera que consistió en la siembra del material vegetal en los medios JE-3 (sales MS al 50%) y JE3-B5 (sales B5 al 100%), sin reguladores de crecimiento donde se consiguió que el 100% de los brotes lograron su enraizamiento y buen desarrollo en un lapso de 28 días. Para favorecer la sobrevivencia de las plantas, en la quinta etapa se realizó una pre-aclimatación con sustrato estéril en las mismas condiciones de fotoperíodo que los cultivos *in vitro* alcanzando resultados alentadores, ya que durante los dos meses que duró esta etapa se logró un 88% de sobrevivencia.

La última fase: transplante *ex vitro*, las plantas se mantuvieron durante 5 meses en invernadero, logrando un 70% de porcentaje de aclimatización.

La presente investigación culminó con una propuesta de un protocolo para la regeneración *in vitro* de *Jatropha curcas*; además los resultados obtenidos en la metodología podrían ser aprovechados por productores como una herramienta para mayor producción, obteniendo beneficios económicos; así como de estudio por parte de genetistas e industrias farmacéuticas.

Es bien sabido que nuestro planeta se encuentra viviendo una crisis ambiental, de la cual el ser humano es en gran parte responsable debido a su ambición creciente y desenfrenada, afectando directamente nuestra calidad de vida. Además el avance en el conocimiento científico, ha permitido un desarrollo extraordinario de la tecnología, pero al utilizarla se gastan indebidamente los recursos naturales, y los procesos realizados por la industria, así como las actividades que realizamos cotidianamente, tienen como consecuencia la emisión desmesurada de contaminantes a la atmósfera, afectando a muchísimas especies animales y vegetales, irrumpiendo así en el ciclo natural de la vida. Actualmente se ha tomado más conciencia de esta situación y en muchos países ya se toman medidas para encontrar soluciones al problema. Es imposible revertir en pocos años lo que se ha provocado a lo largo de varias décadas, si se toma en cuenta además la sobrepoblación y la creciente demanda energética, pero no es inaccesible realizar acciones que disminuyan, en conjunto, gran parte de las consecuencias negativas para el planeta.

El alto precio de los hidrocarburos, la disponibilidad limitada de estos recursos y los daños ambientales provocados por su explotación, comercialización y uso, son los principales inconvenientes que resaltan la importancia de buscar alternativas en la obtención de energía renovable y amigable con el ambiente (Anderson, 2006). Actualmente se considera que la biomasa posee un gran potencial en la obtención de biocombustibles (Perlack *et al.*, 2005).

Los cultivos de especies oleaginosas son consideradas como la mejor opción para la producción de biodiesel (Sarlin *et al.*, 2006). Algunas de las más cultivadas en América son la colza (*Brassica napus*), el girasol (*Helianthus annuus*), la soya (*Glycine max*), la palma aceitera (*Elaeis guineensis*) y el piñón (*Jatropha curcas*). De las cuales, la especie *Jatropha curcas* se destaca notoriamente, teniendo la atención de investigadores, productores y empresarios, debido a sus características fisiológicas, agronómicas, ambientales y de producción para la industria cosmetológica principalmente (Castro *et al.*, 2007).

El cultivo de *Jatropha curcas*, se ha convertido en una interesante alternativa de producción de biodiesel, no sólo debido a su gran rendimiento de aceite a partir de semillas, sino también a las características propias de esta especie que la hacen aún más llamativa (Heller, 1996). El piñón se adapta a un gran rango de tipos de suelo, pueden crecer en tierras áridas, semiáridas, cascajosas, arenosas, salinas e incluso crecen en tierra pedregosa. Además los niveles de nutrientes y de agua de los suelos donde crece el piñón suelen ser bajos (Kumar y Sharma, 2006; Achten *et al.*, 2008; King *et al.*, 2009).

Al ser *Jatropha curcas* un cultivo viable en suelos marginales, permite detener la erosión de los mismos, y debido a que estos terrenos no son utilizados por otros cultivos, *Jatropha curcas* no presenta una amenaza para la seguridad alimentaria. Otra de las ventajas que tiene el cultivo de piñón es la producción de frutos desde el primer año. A los cinco años se estabiliza y continúa así durante 25-50 años, produciendo frutos de buena calidad (Kumar y Sharma, 2006).

Además de producir biodiesel, el cultivo de *Jatropha curcas*, puede originar otros subproductos de valor comercial, utilizando de esta forma los desechos y desperdicios que pudieran causar problemas ambientales por acumulación.

Las especies de *Jatropha* tienen una polinización cruzada, lo que le permite un alto grado de variación genética, ofreciendo así, amplias posibilidades para analizar y seleccionar características deseadas en los cultivos (Gohil y Pandya, 2008). Sin embargo se hace necesario seleccionar los individuos sobresalientes en cuanto a producción de aceite y clonarlos para poder lograr su domesticación y establecer las condiciones agronómicas óptimas para establecerlo como un cultivo. El cultivo de tejidos vegetales resulta una opción idónea ya que ha sido desde varias décadas una herramienta biotecnológica que ha permitido la clonación y multiplicación a gran escala de varias especies con un interés comercial; el caso de *Jatropha curcas* no ha sido la excepción, por consiguiente la micropropagación es uno de los métodos tecnológicos más eficientes para masificar la producción de esta especie, puesto que permite el desarrollo de un gran número de plantas con el genotipo de interés, por tanto las plantas generadas presentan igual potencial que las plantas madres (Yan, 2009). Además se tiene mayor cantidad de plantas en un espacio reducido en menor tiempo, también se tiene mayor control de sanidad del material que se propaga, por consiguiente plantas más sanas. Asimismo se puede transportar material *in vitro* de un país a otro (Prada, 2012).

Varios autores a nivel mundial han analizado la capacidad regenerativa de *J. curcas* a partir de los diferentes órganos de esta planta, encontrando diferencias significativas de acuerdo a la variedad de esta especie, por lo que esta investigación tuvo como objetivo evaluar la capacidad morfogenética de diferentes explantes para establecer un protocolo de regeneración *in vitro* por organogénesis, y su aclimatación *ex vitro*, a partir de semillas e inflorescencias recolectadas en el estado de Nayarit, variedad escasamente conocida.

1. *Jatropha curcas* L.

1.1 Clasificación taxonómica

La clasificación según Cronquist (1988) y las denominaciones inferiores como: subfamilia, tribu y subtribu fueron propuesto por Webster (1979).

Reino:	Plantae
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Euphorbiales
Familia:	Euphorbiaceae
Subfamilia:	Crotonoideae
Tribu:	Joannesieae
Subtribu:	Jatrophiinae
Género:	<i>Jatropha</i>
Subgénero:	<i>Curcas</i>
Especie:	<i>Jatropha curcas</i> L.

1.2 Descripción botánica y/o morfológica

El piñón o *Jatropha curcas* es un árbol pequeño de tipo arbustivo, de corteza suave y color verde gris, que al corte exuda un látex blanquecino (Vendiola y Idlao, 2006). Normalmente crece de tres a cinco metros, pero puede alcanzar los 10 metros bajo condiciones favorables (Aguhob, 2006).

Es una especie resistente a sequías y muchas de sus partes son utilizadas en la medicina tradicional, sin embargo, sus semillas son tóxicas para los humanos y muchos animales. Esta planta presenta un crecimiento articulado, con discontinuidad morfológica desde la base. Su dormancia es inducida por fluctuaciones de las precipitaciones, temperatura y luz (Heller, 1996).

El tronco de una planta adulta mide aproximadamente 20 centímetros de diámetro, su xilema es poco resistente y su médula desarrollada; su floema encierra canales comprimidos, que se prolongan hasta las raíces, por donde circula el látex, el cual al secarse toma una coloración café con aspecto de resina. Las ramas son distribuidas y largas, y presentan cicatrices que se forman por la caída de las hojas. El tronco y las ramas son recubiertas por una corteza serosa, que al secarse se desprende en láminas finas (Nunes *et al.*, 2009). Normalmente su sistema radicular consta de una raíz central y cuatro periféricas en plantas obtenidas de la germinación de semillas. La raíz central no se forma usualmente en la propagación vegetativa a partir de estacas (Heller, 1996).

1.2.1 Hojas

Son alternas con una filotaxia en espiral, la forma singular del limbo es ovada o redondo-ovada levemente 3 a 5 o 7 lobado y en algunas ocasiones simplemente sinuado ondulado o no lobada cuya base es cordada o algunas veces truncada y glabrescente en el envés como se muestra en la figura 1 (Standley, 1923; Standley y Steyermark, 1949; McBride, 1951; Webster y Burch, 1968; Heller, 1996). El tamaño del limbo varía de 6 -35 cm de largo y 9 -15 cm de ancho; pecíolo de 8 -15 cm de largo, glabros (Standley, 1923; Standley y Steyermark, 1949; Mc Bride, 1951; Webster y Burch, 1968; Stevens et al., 2001).

1.2.2 Venación

Es uniforme y se caracteriza por ser palmatinervio con 7 venas mayores o con (3) 5 a 7 venas; con estípulas deciduas u obsoletas no evidentes sobre hojas maduras como se puede apreciar en la figura 1 (Webster y Burch, 1968; Dehgan y Webster, 1979).

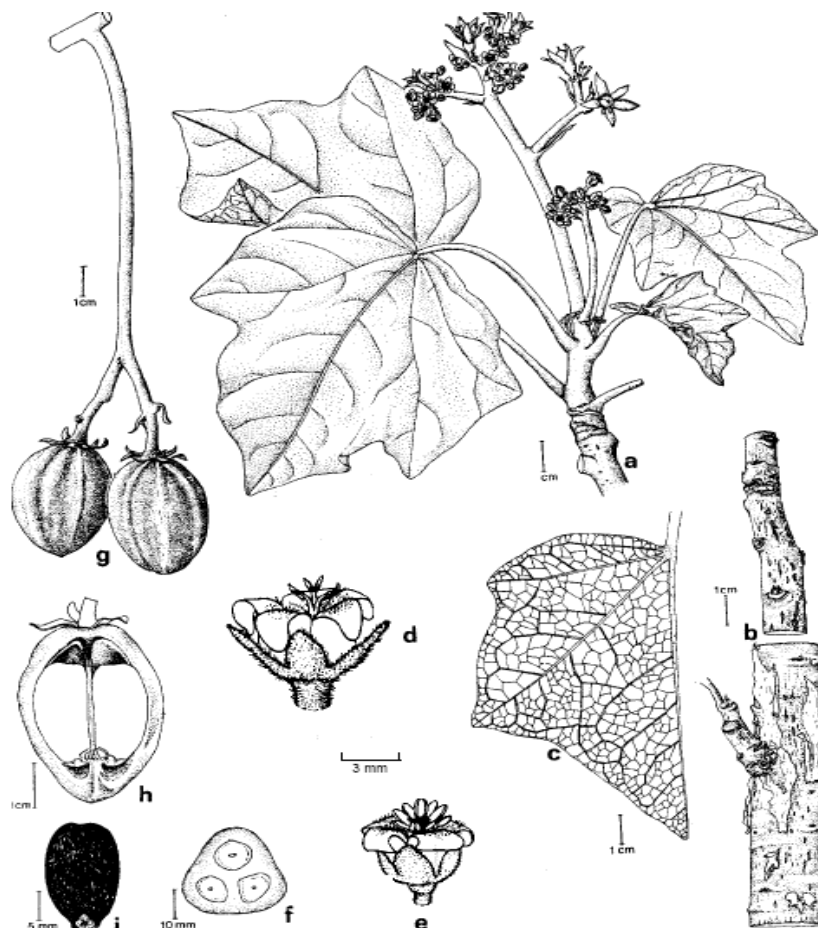


Figura 1. Representación botánica de *Jatropha curcas* L. **a.**Rama florífera. **b.**Tallo. **c.**Venación de la hoja. **d.**Flor femenina. **e.**Flor masculina. **f.**Corte transversal del fruto inmaduro. **g.**Frutos. **h.**Corte long. del fruto. **i.**Semilla. (Heller, 1996).

1.2.3 Inflorescencias

Es un dicasio terminal, que consta de dos ramas laterales cimosas que sólo producen flores estaminales y la principal termina en una flor pistilada; son densos, largamente pedunculados, glabrescentes de 10-25 cm de largo (Standley y Steyermark, 1949; Dehgan y Webster, 1975; Stevens *et al.*, 2001) (véase fig. 2).



Figura 2. Inflorescencia de *Jatropha curcas* L.

1.2.4 Flores

Son unisexuales y en ocasiones hermafroditas (Heller, 1996). En las flores masculinas los pedicelos son de 1-5 mm de largo; sépalos 5 lobados, elíptico, entero (no glandular), escasamente imbricado de 2,8-3,5 mm de largo; pétalos 5 segmentos disecados, oblongo-ovado, elipsoides de 5-6 mm de largo, de color verde amarillo, internamente piloso; estambres 10 (8), ordenados en 2 verticilos, los 5 exteriores libres y los 5 interiores connados, los filamentos de 2,2-3,7 mm largo, antera elíptica de 1-1,6 mm de largo, pistiloide ausente (Standley y Steyermark, 1949; McBride, 1951; Webster y Burch, 1968; Burger y Huft, 1995).

Las flores femeninas tienen pedicelos de 5-9 mm de largo; sépalos 5 lobados, oblongo lanceolado, foliáceos, enteros, de 7-9 mm de largo, pétalos oblongo-ovados de 5-8 mm de largo, de color verde amarillo, densamente piloso por adentro; posee ovario glabro, los tres estilos delgados de 1,5 mm están connados cerca a los 2/3 partes de su total, continuando hacia una masiva bifurcación del estigma (Standley y Steyermark, 1949; Burger y Huft, 1995).

La polinización de las flores del piñón se da gracias a la intervención de los insectos; posiblemente en su mayoría por mariposas. En condiciones de invernadero, la polinización debe hacerse de forma manual (Heller, 1996). La floración en la planta de piñón puede presentarse entre el primer y segundo año en condiciones muy favorables, pero normalmente toma más tiempo (tres años). La producción de semilla se estabiliza a partir del cuarto o quinto año. Al parecer la formación de flores está relacionada con el periodo de

lluvias. Puede florecer nuevamente después de producir frutos cuando las condiciones permanecen favorables por otros 90 días, pero después de esta segunda floración, la planta no florece nuevamente, sino que se desarrolla vegetativamente (De la Vega, 2008).

1.2.5 Frutos

Son triloculares, elipsoide, sub-drupáceo, el exocarpo permanece carnoso hasta que la semilla madura y finalmente se separa en 3 partes (dehiscentes); los frutos son de 2,5-3,5 cm largo y 2-2,5 cm de ancho (Dehgan y Webster, 1979) y en algunas ocasiones el fruto puede llegar a medir hasta 4 cm (McBride, 1951). Cada cápsula posee de 2-3 semillas negruzcas, oblongo elipsoide de cerca de 2 cm, con líneas negras conspicuas y prominentemente reticulada, también posee una carúncula pequeña (Standley, 1923; McBride, 1951; Webster y Burch, 1968), Makkar *et al.*, (2008) encontraron cápsulas con 1, 2, 3 hasta con 4 semillas.

La semilla de piñón es relativamente grande, de tegumento quebradizo, y estructura resinosa (Figura 3). Arruda y colaboradores (2004) describen que debajo de la envoltura de la semilla existe una película blanca que recubre la almendra. El albumen es blanco, oleaginoso y contiene un embrión provisto de dos cotiledones achatados (Figura 3)(Citado por Lopes *et al.*, 2007).

De acuerdo a Barroso y colaboradores (1999), todas las euforbiáceas tienen endospermos carnosos y ricos en reservas oleaginosas (Citado por Nunes *et al.*, 2009). De aquí la importancia de esta especie, considerada promisoría, según Arruda y colaboradores (2004), por su elevado contenido de aceite (25 a 40%), superior a las oleaginosas utilizadas en el mercado de biocombustibles (Citado por Nunes *et al.*, 2008, p. 9). Según Silveira (1934), cada semilla contiene de 27,9 a 37,33% de aceite, aunque la almendra contiene de 5,5 a 7% de humedad y de 52,54 a 61,72% de aceite (Citado por Lopes *et al.*, 2007).

Las semillas maduran luego de que la cápsula cambia de color verde a amarillo aproximadamente de dos a cuatro meses luego de la fertilización (Vendiola y Idlao, 2006). En la parte superior posee una prominencia carnuda, la carúncula, que se encuentra próxima a la micrópila (Figura 3). Cuando la semilla está seca, la carúncula tiene una extremidad cónica con dos lóculos escasamente visibles. Las dimensiones de las semillas cuando están secas son aproximadamente: 1.3 a 1.7 centímetros de largo y 0.5 a 1.5 centímetros de ancho (Nunes *et al.*, 2009).

Los cotiledones del embrión son muy largos pero con un espesor mínimo, foliáceos y funcionan como órganos de reserva, siendo una particularidad encontrada en el albumen o endospermo alrededor del embrión. El contorno de los cotiledones es ovalado, con nervaduras marcadas y un eje hipocótilo – radícula de forma cilíndrica y recta (Figura 1 d y e) (Nunes *et al.*, 2009). Genéticamente el piñón es una especie diploide, con $2n = 22$ cromosomas (Heller, 1996).

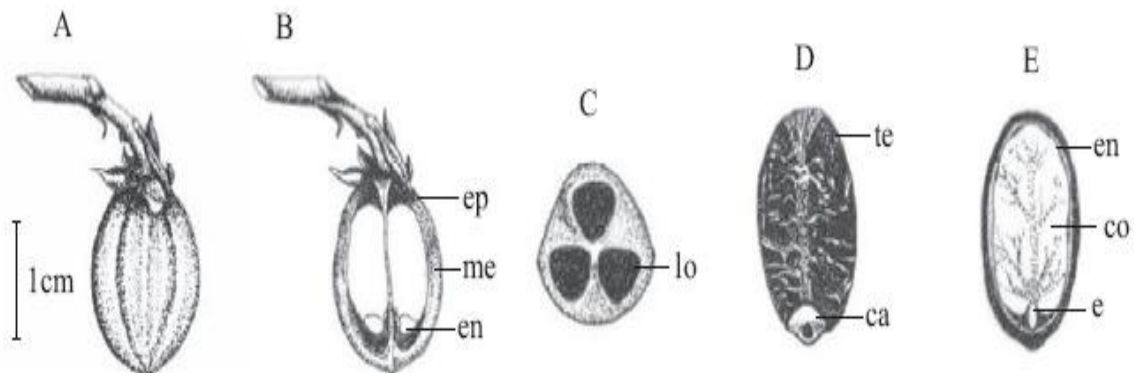


Figura 3. Aspectos morfológicos del fruto y semilla de *Jatropha curcas*. A. Detalle del fruto, B. Corte longitudinal del fruto (en: endocarpo; ep: epicarpo; me, mesocarpo), C. Corte transversal del fruto (lo: lóculos), D. Detalle de la semilla (ca: carúncula, te, tegumento), E. Detalle de la semilla mostrando el embrión (en: endosperma, co: cotiledón, e: eje embrionario). (Nunes *et al.*, 2009).

1.3 Centro de origen y distribución geográfica

El piñón es una planta perenne nativa de los trópicos americanos. Su distribución se extiende a través de toda América tropical y otras regiones tropicales y subtropicales en el mundo (Figura 4). Se lo puede encontrar principalmente en países como Filipinas, Tailandia, Birmania, Indonesia, Malasia, India, China, Japón, Jamaica, Puerto Rico, Madagascar, Argentina, Venezuela entre otros (Aguhob, 2006).

Muchos son los científicos que por años han tratado de hallar el origen de la *Jatropha*, sin embargo, sigue siendo un tema de mucha controversia, ya que las investigaciones realizadas aún son escasas para sustentar sus hipótesis.

Las primeras investigaciones y recolecciones documentadas hace 60 años sostienen que las colecciones se hicieron en la flora “natural” de las Américas, en diferentes formas de vegetación como: bosque húmedo, bosque seco tropical, bosque seco y espinoso. Wilbur (1954) cita: “Es sin duda parte de la flora de México y probablemente de Centro y Norte de América, antes de la llegada de Cortés y después estuvo completamente restringido a México”. Según otras fuentes, el piñón parece que es nativa de Centroamérica, así como de México, donde se encuentra de forma silvestre en los bosques de la región costeras (Aponte, 1978). Heller (1996) afirma que es altamente probable que el centro del origen del piñón esté en México y América Central (Figura 4), ya que no se lo ha encontrado, en las formas de vegetación mencionadas, en África y Asia, y sólo se lo encuentra en forma de cultivos.

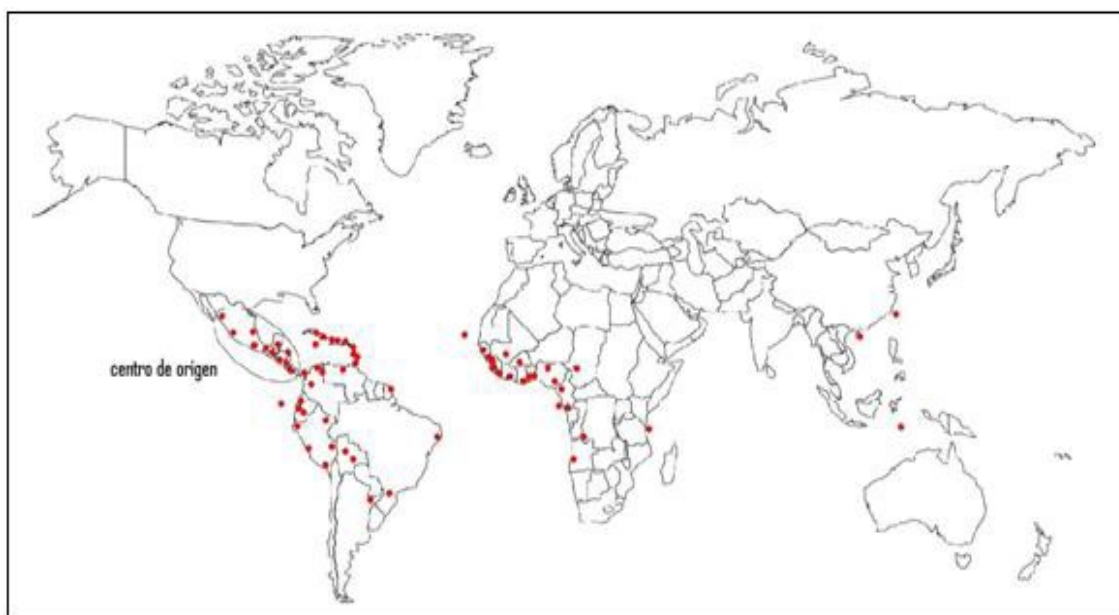


Fig. 4. Distribución mundial de *Jatropha curcas* y centros de diversidad propuestos por Munch en 1986. (Tomado de Heller, 1996).

Sin embargo, el verdadero centro de origen de esta especie, todavía tiene que ser encontrado, explorando, indagando, reuniendo y evaluando la información ya documentada, así como la obtención de nuevas investigaciones sustentadas con tecnologías recientes. Por ello es necesario estudiar la diversidad genética de las poblaciones de la *Jatropha*, a través de estudios fenotípicos (técnicas moleculares), permitiendo así, el buen análisis y diagnóstico.

La distribución actual de la especie refleja que su introducción ha sido más exitosa en regiones secas de los trópicos con precipitaciones anuales de 300 a 1000 milímetros (Joker y Jepsen, 2003).

1.4 Usos

A lo largo de la historia, el ser humano ha descubierto en los recursos que la naturaleza le ofrece, la utilización de plantas con propósitos medicinales. *Jatropha curcas* no ha sido la excepción, aprovechando así las hojas frescas y secas, la savia o látex y las semillas, atribuyendo al alivio y combate a diversos padecimientos.



Fig. 5. Savia o látex, segregada por las hojas de *Jatropha curcas* L.

1.4.1 Función antibiótica

La savia o látex (Figura 5), es la parte de la planta que posee actividad antibiótica mejor documentada. Se ha probado su eficacia frente a levaduras patógenas (*Candida albicans*), bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*), hongos (*Mycrosporium canis*) y diversos virus. Su utilidad se limita a la aplicación exterior, tópica, que se hace de

estos materiales vegetales, para tratar infecciones cutáneas de muy diverso origen (Gómez-Pompa *et al.*, 2009). A esta misma actividad se refieren los estudios que comprueban su efectividad como desparasitante y como insecticida. Los reportes son numerosos y explican el uso que la planta tiene en diversos países para tratar padecimientos infecciosos o destruir plagas de los más diversos orígenes (Gómez-Pompa *et al.*, 2009).

Se ha reportado que también es eficaz en el tratamiento de hidropesía, ciática y parálisis. La droga obtenida de *Jatropha curcas* denominada "Dravanti", que tiene un sabor picante y astringente, ha presentado propiedades antihelmínticas; este fármaco trabaja como un limpiador de todas las impurezas en el sistema digestivo. El jugo de las hojas es usado para inflamaciones de la lengua en bebés y también se usa para curar la sarna, eczema y la tiña de la piel (Shrivastava y Banerjee, 2008).



Fig. 6. Sangregado, desprendido de los árboles de *Jatropha curcas* L., en Rosamorada, Nayarit.

Una actividad muy recurrida por los pobladores de del Ejido de Providencia, Rosamorada, Nayarit, es la extracción del látex de las ramas de los árboles, desprendiendo el sangregado (denominado así por su peculiar exudado de color rojo como se muestra en la figura 6; utilizado para eliminar el herpes labial, únicamente aplicándolo en la zona afectada inmediatamente que se obtiene el látex.

1.4.2. Función antitumoral y anticancerígena

Las semillas de muchas plantas contienen proteínas que son capaces de inactivar el ribosoma de las células cancerosas, (compuestos llamados RIP: Ribosome Inactivating Protein), lo que los convierte en moléculas ideales para formar parte de los nuevos medicamentos anti-cáncer que se encuentran en desarrollo (Gómez-Pompa *et al.*, 2009). Una proteína de este tipo fue aislada de las semillas tóxicas de *Jatropha curcas*, por Felke (1914), quien la denominó como "curcina" (Lin *et al.*, 2003). La investigación sobre la curcina lleva muchos años y tiene diversos enfoques, ha sido demostrada su utilidad en modelos de investigación en animales y en estudios con células de cáncer en cultivo. Los estudios más recientes sobre la curcina obtenida de *Jatropha curcas* L., han sido realizados en la India y en China y confirman la utilidad de esta sustancia en el tratamiento de tumores cancerosos, explicando su efecto como una acción sobre la enzima N-glicosidasa de las células cancerosas, disminuyendo la formación de los tumores y evitando la proliferación del cáncer (Lin *et al.*, 2003; Meng-Jun *et al.*, 2006).

1.4.3 Materia prima para productos industriales

El aceite de las semillas es utilizado como materia prima en muchos países para la manufactura de velas, jabón y barniz. También se utiliza en lámparas de aceite, en estufas como combustible en lugar de queroseno, y sustituto del diesel. Las hojas, raíces y corteza pueden ser utilizadas en la industria de la tinta. El color negro azulado puede ser producido de la corteza y de las raíces se obtiene el amarillo (Aguhob, 2006).

1.4.3.1 Pesticida y fungicida

El extracto de las semillas del piñón, que contiene ésteres de forbol, se ha utilizado en el control de varias plagas, en muchos casos con éxito. Debido a que se encuentra en una fase experimental, no puede ser utilizado en el campo por los agricultores todavía. Otros ensayos experimentales presentan una actividad molusquicida (pesticidas para controlar moluscos), muy pronunciada (Heller, 1996). Debido a que esta especie contiene sustancias cianofóricas en las hojas, corteza, raíces y frutos, se las utiliza para fabricar fungicidas contra chinches (Aguhob, 2006).

1.4.4 Recuperación de suelos

Las planta de piñón, por sus características de resistencia a las sequías y bajos requerimientos en la cantidad de agua, tiene un uso potencial en la recuperación de suelos erosionados (Heller, 1996); además sus cultivos pueden darse en suelos improductivos y desgastados, para aprovechar los pocos recursos con los que cuenta ese tipo de suelo y propiciar un rendimiento integral.

En Madagascar se usa el piñón como una planta de soporte en plantaciones de vainilla (Heller, 1996), también se la usa para dar sombra a plantaciones de café, aunque su mayor utilización está en la conformación de cercas vivas. Con un enfoque integral, la torta, que se obtiene de las semillas luego de la extracción de aceite, es rica en nitrógeno, fósforo y potasio, y se la puede usar para la fertilización y acondicionamiento del suelo (Aguhob, 2006).

1.4.5 Protección ambiental

La captura de carbono en plantaciones de piñón, así como en otros tipos de plantaciones, ocurre únicamente durante el desarrollo de las plantas hasta llegar su estado de madurez. Es en troncos y ramas donde el carbono queda almacenado. La cantidad de carbono (CO₂) que el árbol captura, consiste sólo en el pequeño incremento anual que se presenta en la madera del árbol multiplicado por la biomasa del árbol que contiene carbono. De 40 a 50% de la biomasa de un árbol (madera: materia seca) es carbono. Es necesario conservar los árboles para evitar que el carbono (CO₂) contenido en ellos se emita a la atmósfera (De la Vega, 2008).

1.5 Cultivo

La propagación se realiza mediante semillas y/o esquejes (estacas) en invernadero. Las semillas para siembra deben ser obtenidas de plantas que han mostrando altas tasas de producción de semillas. El almacenamiento de las mismas no deberá exceder de 10 a 15 meses, supervisando la calidad de las semillas durante ese tiempo (De la Vega, 2008).

La germinación en las semillas tiene una duración de 15 días, y puede comenzar incluso a partir del tercero al quinto días. El porcentaje de germinación oscila entre el 60 y 90%. La plántulas se desarrollan durante 3 meses en invernadero, y se transplantan al campo cuando tiene una altura entre 40 y 50 cm (De la Vega, 2008).

La distancia de siembra depende del sistema de cultivo, como monocultivo lo ideal es de 2 x 2 m, mientras que en asociación se debe dejar más espacio entre calles desde 3 x 2 m a 4 x 2 m. Se sugiere podar, despuntando las plantas cuando tengan de 40 a 50 cm de altura, luego hacer lo mismo en los brotes que se generan, de tal manera que las plantas de un año tengan 12 a 15 ramas. A partir del segundo año se realizan podas de sanidad y para el incremento de ramas productivas. La producción puede alcanzar entre 1 y 10 t/ha, dependiendo de la edad de las plantas, zona de cultivo y uso de riego (INIAP, 2008).

Esta especie habita en regiones con un promedio anual de precipitación de 300-1000 mm, y altitudes de 0 a 1500 m; crecen y se desarrollan a una temperatura promedio anual por encima de los 20°C y por debajo de los 28°C (Heller, 1996). Esta planta tolera heladas de baja intensidad y duración corta aunque pueden disminuir el rendimiento hasta un 25%. Soporta largos períodos de sequía, desprendiéndose de sus hojas para reducir la evapotranspiración (Münch y Kieffer, 1986).

Este arbusto sobrevive y crece en suelos salinos, arenosos y rocosos, marginales y erosionados, de tierras que ya no sirven para la actividad agrícola, porque han sido agotadas por la misma agricultura (Jones y Miller, 1992). Para su cultivo deben ser arenosos, ventilados, bien drenados, pH entre 5 y 7, fertilidad media a escasa y con profundidad mínima de 60 centímetros (De la Vega, 2008). Si bien son suelos de muy baja reserva de nutrientes y fertilidad natural, al fertilizarlos pueden ser altamente productivos (Falasca, 2007), y puede realizarse mediante aplicación de estiércol en cantidad de 0.25 a 2 Kg por plántula y 150 gramos de superfosfato seguidos de 20 gramos de urea después de 30 días. La aplicación del nitrógeno (urea) y fósforo (superfosfato) propicia la floración. Estas cantidades no son definitivas, sino que varían en función del análisis, propiedades y fertilidad de los suelos. La producción de frutos y semillas en los árboles de *Jatropha* puede comenzar a partir del segundo o tercer años en condiciones favorables, y se estabiliza a partir del cuarto o quinto años. (De la Vega, 2008).

Se ha determinado la existencia de 30 posibles artrópodos fitófagos, entre los que se destacan los acaros *Polyphagotarsonemus latus* y *Tetranychus urticae*; diversidad de chicharritas, así como chinches *Pachycoris sp.* y *Leptoglossus sp.* Adicionalmente se han encontrado 20 especies de enemigos naturales de estas plagas. En general, en plantas silvestres, los artrópodos no son problema fitosanitario, pero en monocultivo pudieran serlo. Una de las potenciales plagas es el ácaro blanco *P. latus* que destruye severamente los brotes del piñon (INIAP, 2008).

La captura de carbono en plantaciones de *Jatropha*, así como en otros tipos de plantaciones, ocurre únicamente durante el desarrollo de las plantas hasta llegar hasta su estado de madurez. Es en troncos y ramas donde el carbono queda almacenado. La cantidad de carbono (CO₂) que el árbol captura, consiste sólo en el pequeño incremento anual que se presenta en la madera del árbol multiplicado por la biomasa de árbol que contiene carbono (De la Vega, 2008).

1.6 *Jatropha* como fuente de biodiesel

Se denomina Biodiesel al producto resultante de la reacción química entre los ácidos grasos, principalmente de los aceites vegetales y alcoholes como el metanol o el etanol. El biodiesel sustituye como combustible limpio y renovable a los derivados del petróleo, concretamente al diesel con ventajas ecológicas reduciendo la emisión de gases de invernadero (Montiel y Ximhai, 2010).

El biodiesel fue el primer combustible en ser usado cuando Rudolf Diesel presentó su motor en Augsburg, Alemania el 10 de Agosto de 1893. Por esta razón, se ha declarado este día como el Día Internacional del Biodiesel. En la Exposición Mundial de París en 1900, Diesel presentó un motor funcionando con aceite de maní. Siendo un visionario; Él vaticinó que "el uso de los aceites vegetales puede parecer insignificante hoy, pero estos aceites se pueden volver, en el transcurso del tiempo, tan importantes como los productos del petróleo y la brea del presente" (Calvo, 2006).

El biodiesel puede producirse a partir de una gran variedad de cultivos oleaginosos, de grasas animales y de aceites y grasas recicladas (Montiel y Ximhai, 2010). Debido a su gran facilidad de cultivo, y a su contenido de aceite, *J. curcas* ha ganado mucha importancia para la producción de biodiesel, por ello recientemente muchos grupos se han enfocado al estudio de nuevos métodos para el cultivo y mejoramiento genético de *J. curcas*. El aceite de *Jatropha c.* puede ser utilizado directamente en motores de diesel y mezclándolo con metanol pero también se han evaluado y optimizado métodos de transesterificación industrial del aceite de la semilla para su uso como biocombustible a escala industrial. La evaluación económica ha mostrado que la producción de biodiesel de *Jatropha* es muy rentable pues los subproductos que se generan también tienen un valor monetario, tal es el ejemplo de la glicerina (Kumar y Sharma, 2006).

El uso de *Jatropha curcas* para la producción de biocombustibles ha sido impulsado principalmente en la India gracias a la visión e interés que ha mostrado su gobierno para utilizar esta planta. En 2006 el presidente Adbul Kalam mencionó que de los 60 millones de hectáreas de tierras marginales que posee la India, 30 millones podrían ser destinados a la siembra de *J. curcas*. Desde ese año en varios estados de la India se han distribuido plantas sin cargo alguno para pequeños agricultores, promoviendo la inversión privada en plantaciones de *Jatropha* y poniendo en marcha plantas de procesamiento de biodiesel. Actualmente se estima que entre 500,000 y 600,000 hectáreas de *Jatropha* se encuentran creciendo en este país (ISIS, 2007).

En la India el estado de Chhattisgarh tiene el mejor programa de biodiesel a partir de *Jatropha*. Se han repartido más de 380 millones de semillas entre agricultores, suficientes para cubrir un área de 150,000 ha, y también se otorgaron 80 prensas de aceite a varios

organismos de gobierno de ciertas villas, garantizando la compra de la semilla en aproximadamente \$0.16 US por kilogramo. Varias micro-refinerías locales se han esparcido a través del estado para proveer biodiesel para tractores, bombas de irrigación, jeeps y generadores de energía en las villas, incluso los motores de los trenes en este país, ya están utilizando el aceite de *Jatropha* mezclado con el diesel teniendo un funcionamiento óptimo (ISIS, 2007).

India no es el único país que ha sabido explotar la planta, en China hay 2 millones de hectáreas de cultivos de *Jatropha*, y existen planes para plantar 11 millones adicionales en los estados del sur. Birmania también tiene planes para plantar millones de hectáreas, y las Filipinas, y varios países africanos han iniciado también plantaciones a larga escala. Existen 200,000 hectáreas de *Jatropha* en Malawi y 15,000 en Zambia, casi todas bajo contratos formales o acuerdos con la compañía inglesa D1-Oils (ISIS, 2007).

Mediante cromatografía de gases se ha determinado la composición de los ácidos grasos encontrados en el aceite de piñón, luego de una metilesterificación: ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2). El promedio del contenido de los ácidos grasos saturados es bajo: 15,38% de ácido palmítico y 6,24% de ácido esteárico; en cambio el contenido de los ácidos grasos insaturados es alto: 40,23% de ácido oleico y 36,32% de linoleico. Dependiendo del origen, las cantidades de ácido oleico y linoleico pueden ser mayores (Heller, 1996). En la tabla 1 y 2, se presenta una comparación entre las propiedades y especificaciones estándar del aceite de piñón y del diesel fósil.

Tabla 1. Comparación de las propiedades y especificaciones estándar de aceite de *Jatropha curcas* y diesel fósil (Aguhob, 2006).

Especificación	Especificación estandar del aceite de piñón	Especificación del diesel
Gravedad específica	0,9186	0,82 / 0,84
Punto de inflamación	240/110°C	50°C
Carbono residual	0,64	0,15 o menos
Valor de octano	51,0	>50,0
Punto de destilación	295°C	350°C
Viscosidad cinemática	50,73 cs	>2,7 cs
Porcentaje de azufre	0,13	1,2% o menos
Valor calorífico	9,470 kcal/kg	10,170 kcal/kg
Punto de escurrimiento	8°C	10°C
Color	4,0	4 o menos

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas de *Jatropha curcas* y diesel (Aguhob, 2006).

Propiedad	<i>Jatropha curcas</i>	Diesel
Viscosidad (cp) (30 °C)	5,51	3,6
Gravedad específica	0,917/0,923 (0,881)	0,841/0,85
Punto de solidificación	2,0	0,14
Valor de cetano	51,0	47,8 a 59
Punto de inflamación (°C)	110/340	80
Carbono residual (%)	0,64	<0,05 a <0,15
Destilación (°C)	284 a 295	<350 a <370
Azufre (%)	0,13 a 0,16	<1,0 a 1,2
Valor de ácido	1,0 a 38,2	-
Valor de saponificación	188 a 198	-

Valor de iodo	90,8 a 112,5	-
Índice de refracción (30 °C)	1,47	-

El especial interés que se muestra en el cultivo de piñón se debe especialmente a que puede ser usado potencialmente en la producción de aceite en zonas marginales semiáridas, sin competir con la producción de alimentos para consumo humano; además este combustible puede ser usado parcialmente para sustituir el costo en las importaciones de aceite para países sin salida al mar. Para la producción de biodiesel se debe someter el aceite a un proceso de transesterificación, que involucra el uso de metanol, que es compuesto un químico tóxico e inflamable. Para esto se requiere de equipos mixtos que sean a prueba de explosiones, lo cual no siempre está al alcance de países subdesarrollados (Heller, 1996).

En general, parecería que las bases tecnológicas no presentan problemas que no puedan ser resueltos. Los análisis económicos han demostrado que el combustible de piñón puede competir con el combustible de diesel fósil. Existen diferentes proyectos que involucran al piñón como un cultivo para resolver problemas energéticos en varios países, y se ha estudiado a fondo la sustentabilidad y los muchos beneficios que acarrea poner en marcha este tipo de cultivo. Entre estos proyectos se resumen en tabla No 3.

Tabla No. 3. Proyectos para la obtención de bioenergéticos con *Jatropha curcas*

PROYECTO	AUTORES	PAÍS
Propagación generativa de <i>Jatropha curcas</i> L. en Kalahari Sand.	Jepsen, Henning y Nyathi, 2003	Sudáfrica
" <i>Jatropha curcas</i> L. su expansión agrícola para la producción de aceites vegetales con fines de comercialización energética.	OCTAGON S.A. de C.V. Biocombustibles, 2006	Guatemala
Posibilidades de éxito de <i>Jatropha curcas</i> L. en Argentina.	Falasca y Ulberich, 2006	Argentina
Propagación de piñón (<i>Jatropha curcas</i>) en la isla Leyte.	Feike <i>et al.</i> , 2007	Philipinas
Desarrollo de tecnología para la producción sustentable de piñón (<i>Jatropha spp</i>) como alternativa para obtener bioenergéticos e incrementar los índices de desarrollo de los agricultores.	Salvador <i>et al.</i> , 2007	México

En México, las metas para la producción de biodiesel son de cultivar más de 100 mil hectáreas de cultivos de *Jatropha* en Yucatán, Chiapas, Michoacán, Veracruz y potencialmente en Sinaloa. Chiapas se ha convertido en el primer estado del continente que usa biodiesel en transporte urbano, consolidando la primera empresa transportista mixta que utiliza al 100 por ciento Biodiesel, además en esta entidad se encuentra la primera planta en México que cuenta con doble tecnología de punta para producir 20 mil litros de biodiesel B100 biodegradable al día, también tiene establecidas 10 mil has de *Jatropha*(generando ingresos de 16 mil pesos al año por hectárea),con un potencial de producir hasta 12 mil litros de biodiesel al día en una planta, contando con 11 viveros que producen 21 millones de plantas de *Jatropha* (Instituto de Comunicación Social de Estado de Chiapas, 2010).

La producción de bioenergéticos a escala comercial puede ser factible en México cuando se realicen acciones integrales que deben incluir aspectos técnicos, económicos y medioambientales, de concertación con el sector agrario y agroindustrial así como un esfuerzo importante en investigación y desarrollo tecnológico (Montiel y Ximahi, 2010).

1.6.1 Algunos derivados

Luego de la extracción del aceite de piñón, se obtiene una pasta o torta que puede ser utilizada en la alimentación de animales; de acuerdo a la variedad que se utilice, esta torta puede ser tóxica, y debe someterse primero a un proceso de detoxificación con etanol o éter etílico para ser apto para el consumo. Con la cascarilla de los frutos se puede producir biogás (70% metano) en reactores anaeróbicos; lo mismo se puede realizar con la torta resultante de la extracción de aceite, además esta torta se puede fermentar ya que contiene un hongo identificado como *Rhizopus oryzae* que puede incrementar la producción de aceite ya que produce un amplio espectro de enzimas hidrolíticas. Además la harina de las semillas también puede servir como suplemento proteínico para el ganado (De la Vega, 2008).

1.7 Importancia de la especie

La principal importancia del piñón radica en la utilización del aceite extraído de su semilla, según el Proyecto ERGAL (2008), este aceite puede ser utilizado directamente como combustible, no así otros aceites vegetales derivados de cultivos como soya, higuera y algodón, que necesariamente tienen que ser transformados a biocombustibles para poder ser utilizados, esto es debido a que estos tipos de aceites tienen un contenido elevado de ácidos grasos poli-insaturados y otros compuestos químicos que representan problemas de combustión en los motores (Muñoz y Jiménez, 2009).

Otro punto a favor, es que el biodiesel de piñón contiene más oxígeno, con altos valores de cetano, incrementando la calidad de la combustión, es limpio, no tóxico, amigable con el ambiente y económico; conjuntamente con esto, su costo de producción es bajo. Esta puede ser una buena plantación para una eco restauración en todos los tipos de suelos poco fértiles (Jha *et al.*, 2007).

Se pueden citar muchos impactos positivos que se obtienen al cultivar el piñón, y están enmarcados dentro del desarrollo económico, social y medioambiental, entre los que se destacan:

- Generación de empleos en comunidades rurales.
- Beneficios para inversionistas y productores.
- Productores en comunidades rurales aseguran ingreso adicional duradero.
- Uso de terrenos improductivos.
- Obtención de bonos de carbono y certificados de reducción de emisiones de CO₂.
- Se evita la utilización de alimentos para elaboración de biocombustibles.
- Se participa en programas y mecanismos relacionados con energía limpia.
- Promoción de la sustentabilidad en el medio rural.
- Captura de CO₂ atmosférico.

- No se interviene en el ciclo del carbono.
- Se evita la desertificación, la deforestación y degradación en los suelos.
- Se favorece la bio-diversidad y conservación ecológica en zonas marginales.
- Reducción en el uso de energía fósil primaria.
- Disminución de las emisiones de CO₂ (gas de efecto invernadero) (De la Vega, 2008).

Para que se pueda poner en marcha proyectos relacionados a cultivos energéticos de piñón se debe tener en cuenta la necesidad de identificar plantas élite con excelentes características en cuanto al tiempo de fructificación, vida útil, calidad y cantidad de aceite en las semillas, resistencia a enfermedades y sequías, entre otras; para poder obtener los mejores resultados. Esta identificación se la puede llevar a cabo mediante largos procesos de selección fenotípica de plantas madres; o acudir a herramientas de última generación como la biología y genética molecular, que permitirían identificar los genes que proveen las características deseadas para que en el futuro se pueda ensamblar una planta élite en producción.

Mediante las técnicas de cultivo *in vitro* se puede establecer una multiplicación en masa de clones de la planta élite escogida, con lo cual se conseguiría un cultivo en campo muy uniforme, de características y rendimientos excelentes, en lo que se refiere a la producción y productividad deseada.

2. Cultivo de tejidos vegetales para la clonación y micropropagación de especies sobresalientes

El Cultivo de tejidos vegetales es una rama de la biotecnología que consiste en cultivar asépticamente *in vitro*: células, protoplastos, embriones, tejidos, órganos, etc., en condiciones controladas (medio nutritivo, luz, temperatura, pH, reguladores de crecimiento), para dirigir sus respuestas morfogénicas y biosintéticas de las células (George y Sherrington, 1984; Chávez, 1993), pudiendo lograr una gran variedad de objetivos, entre ellos: almacenamiento o conservación de germoplasma, nuevos métodos de hibridación y/o mejoramiento, investigación básica, propagación, erradicación o recuperación de plantas libres de patógenos, entre otros (George y Sherrington, 1984). Estos se logra mediante la adición de reguladores de crecimiento, los cuales estimulan la proliferación de plantas completas gracias a la totipotencialidad inherente de las células vegetales (Dodds y Roberts, 1982).

El cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos de plantas es una de las ramas de la biotecnología de la que México y otros países del Tercer Mundo podían obtener grandes beneficios a corto y largo plazo (Robert y Loyola 1985).

La producción de sustancias naturales, importadas a un elevado costo, o de compuestos de importancia farmacéutica, obtenidos con baja eficiencia de plantas silvestres, son las líneas principales que podrían ser explotadas. Las plantas seleccionadas deben, por lo tanto ser aquellas que sean difíciles de cultivar en el campo, que den rendimientos bajos que hagan incosteable su cultivo o que no produzcan suficiente materia prima para las necesidades industriales (Robert y Loyola, 1985).

Actualmente, una herramienta de la ciencia que en un futuro cercano parecería evitar la sobreexplotación de los recursos naturales, es la Biotecnología Vegetal, a través del Cultivo de Tejidos Vegetales, esta técnica, que agrupa diversas metodologías como biotransformación, células inmobilizadas e inducción vía elicitores biológicos, podría incluso en algunos casos aumentar la producción de los metabolitos en un tiempo menor (Misawa, 1994).

Los sistemas de propagación *in vitro* permiten reproducir grandes cantidades de plantas a partir de pocos explantes; reducen la necesidad de alterar áreas naturales para obtener material vegetal que sirva de “planta madre”; disminuye la mortalidad de las plántulas en las primeras fases del desarrollo y permite obtener plantas libres de patógenos así como un ciclo de cultivo relativamente corto (Galván, 2005).

La ventaja mayor de esta técnica es poder producir a partir de un explante de una variedad o especie un número teóricamente indefinido de plantas de esta misma variedad o especie (Abdelnour, 1994).

La micropogración consta de 5 etapas o fases (George y Sherrington, 1984; Fay, 1993; Hartman et al., 1997., Lynch, 1999).

- Fase 0: Preparativa. La calidad de las plantas donadoras desde el punto de vista sanitario, fisiológico, genético y fenotípico, es importante para que el desarrollo de la micropropagación sea eficiente y repetible. Esta fase permite seleccionar la planta madre o donante que se encuentre en las mejores condiciones para evitar contaminación de los cultivos. Para maximizar la diversidad genética de las plantas producidas se puede optar por la utilización de semillas germinadas *in vitro*. Así mismo, plantas que provengan del campo deberán someterse a un programa fitosanitario y de fertilización con la finalidad de eliminar todas fuente de contaminación y lograr que la planta donadora se encuentre en condiciones óptimas de nutrición.

- Fase 1: Establecimiento. Consiste en la selección y desinfección del explante para lograr el establecimiento aséptico de cultivos de órganos, tejidos o células en medio nutritivos. Generalmente los explantes se toman de plantas jóvenes o de zonas de crecimiento activas. Para la eliminación de organismos contaminantes, tales como hongos, levaduras o bacterias, los explantes son desinfectados superficialmente con sustancias desinfectantes, las más utilizadas son el hipoclorito de Sodio (NaOCl), alcohol etílico (C₂H₅OH), hipoclorito de calcio (Ca(ClO)₂) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), entre otras. Conjuntamente con los desinfectantes se pueden añadir agentes surfactantes como el Tween 20 u 80 y tritón 100 con la finalidad de reducir la tensión superficial y eliminar las burbujas de aire que se forman en la superficie de cavidades del explante para que los agentes desinfectantes puedan penetrar y eliminar la mayor parte de los contaminantes.

- Fase 2: Multiplicación. Consiste en colocar los explantes en un medio de inducción, dichos medios generalmente contienen reguladores de crecimiento, los cuales serán en gran medida los responsables de inducir una vía morfogénica. El medio basal propuesto por Murashige y Skoog (1962) es el que se reporta con mayor frecuencia para la propagación *in vitro* de muchas especies de plantas, sin embargo existen otras formulaciones también útiles como son medio N6, B5, SH, etc. En esta etapa es necesaria la presencia de auxinas y/o citocininas en el medio de cultivo. Con lo que se logra un nuevo balance en las concentraciones de citocininas y auxinas endógenas que dependerán del tipo del explante seleccionado y de la especie que se trabaje.
- Fase 3: Elongación y enraizamiento. En esta etapa los brotes obtenidos de la fase dos son transferidos a medio sin reguladores de crecimiento o a medio con auxinas para inducir la formación de raíces. El desarrollo de raíces es importante ya que les permitirán comenzar la absorción de nutrimentos al transplantarse sobre un sustrato en condiciones *ex vitro*.
- Fase 4: Aclimatización. Aquí se da el cambio de la condición heterotrófica o mixotrófica de las plantas a una autotrófica y el paso gradual a condiciones *ex vitro*. Las plantas pueden parecer normales, sin embargo, a menudo presentan modificaciones en su estructura o metabolismo tales como tasas reducidas en la fotosíntesis, una cutícula delgada y una apertura estomática anormal, lo que la hace susceptible a la deshidratación. Por esta razón es importante realizar al cambio gradual de un ambiente húmedo a otro más seco y con mayor intensidad luminosa.

2.1 Factores que influyen en el cultivo *in vitro*

Diversos agentes influyen para que un determinado cultivo de explantes tenga éxito en el establecimiento y posterior desarrollo normal de plantas *in vitro*. Dentro de estos factores se tiene principalmente: el material vegetal, factores físicos y químicos, y la variación somaclonal.

2.1.1 Material vegetal

2.1.1.1 Plantas donadoras de material vegetal

Es muy importante obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado (Castillo, 2004):

La parte de la planta que se va a introducir *in vitro* influirá mucho a la hora de la desinfección y establecimiento, y en el tipo de propagación que se vaya a realizar. Por ejemplo, la desinfección es mucho más sencilla si se trata de hojas, peciolo o entrenudos, por tratarse de tejidos relativamente lisos; en contraste, la contaminación se vuelve mucho más persistente en yemas axilares y apicales, y en tejidos con tricomas, debido a la dificultad que tiene el desinfectante para ingresar en estos lugares.

El tamaño del explante es otro aspecto que se debe tener en cuenta para el establecimiento de los cultivos; cuanto más grande sea, mayores son las posibilidades de obtener proliferación callosa, aunque ello trae aparejadas mayores probabilidades de heterogeneidad y de contaminación con microorganismos. Existe un tamaño mínimo del explante, variable según el material vegetal, por debajo del cual no se obtienen proliferación callosa u otras respuestas deseables (Roca y Mroginski, 1993).

Para una obtención rápida de una estructura callosa será muy importante escoger hojas o peciolo como explantes, ya que son tejidos jóvenes y muy propensos a un incremento en la división celular.

En lo que tiene que ver al estado fisiológico, este tiene un fuerte efecto sobre la división celular y la regeneración *in vitro*. Aunque con muy pocas excepciones, en general los fragmentos de plantas en estado vegetativo, regeneran *in vitro* con más facilidad que los fragmentos de plantas en estado generativo; dentro de este caso, las yemas (especialmente de árboles y arbustos), que se encuentran todavía en estado de reposo (final de otoño o principio del invierno), son más difíciles de cultivar *in vitro* que las que proceden de plantas que ya no están durmientes (Tomado de Pierik, 1990).

2.1.2 Factores Químicos

2.1.2.1 Carbohidratos

El azúcar es un componente muy importante en cualquier medio nutritivo ya que los tejidos verdes no son suficientemente autótrofos *in vitro*. También la concentración del CO₂ en el tubo de ensayo puede ser un factor limitante para la fotosíntesis, y en la práctica es muy difícil y caro suministrar el anhídrido carbónico. Generalmente el azúcar se usa en una concentración de 1 a 5% de sacarosa, ya que este azúcar se sintetiza y se transporta de forma natural por las plantas. También se puede utilizar glucosa y fructosa. La concentración utilizada depende mucho del tipo y edad del material vegetal; por ejemplo embriones muy jóvenes requieren concentraciones de azúcar relativamente altas (Pierik, 1990).

2.1.2.2 Sales inorgánicas

Los nutrientes inorgánicos son elementos minerales, que basados en sus concentraciones de uso se clasifican en dos grupos: macroelementos, que se utilizan en concentraciones milimolares (mM), y microelementos, que se utilizan en concentraciones micromolares (μM).

En la siguiente lista, se resumen los macro y microelementos utilizados en cultivo *in vitro*, la forma en que se encuentran en los medios nutritivos y las concentraciones necesarias (Evans et al., 2003).

MACROELEMENTOS	CONCENTRACIÓN	MICROELEMENTOS	CONCENTRACIÓN
Nitrógeno (NO ₃ ⁻) (NH ₄ ⁺)	20 - 40 mM	Cobalto	0,1 uM
Azufre (SO ₄ ⁻)	1 - 3 mM	Cobre	0,1 uM
Fósforo (PO ₄ ⁻)	1 - 3 mM	Manganeso	5 - 30 uM
Calcio	1 - 3 mM	Molibdeno	0,1 uM
Magnesio	1 - 3 mM	Zinc	5 - 30 uM
Potasio	20 - 30 mM		

2.1.2.3. Aditivos: vitaminas y aminoácidos

La adición de vitaminas no es esencial para la célula vegetal y el cultivo de tejidos, aunque la vitamina B1 (tiamina) es considerada benéfica para cultivos de algunas especies. Sin embargo, biotina, ácido pantoténico, ácido nicotínico (niacina), piridoxina (piridoxol, vitamina B6), ácido fólico, ácido ascórbico (vitamina C) y tocoferol (vitamina E) son añadidos a algunos medios. (Evans *et al.*, 2003).

Los aminoácidos son usados como fuente de nitrógeno orgánico; la L-glutamina es el más usado; aunque también se pueden utilizar la asparagina y la adenina; esta última es más soluble como sulfato y suele usarse en la propagación vegetativa, para estimular la formación de vástagos adventicios (Pierik, 1990).

2.1.2.4. Reguladores de crecimiento

Son por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en algún lugar diferente a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. Estos compuestos, son conocidos como hormonas vegetales. Aparte de estos productos naturales, se han desarrollado también otros de tipo sintético, que tienen una actividad semejante a la de los primeros. Al conjunto de estos productos sintéticos, junto con las hormonas, se denomina reguladores de crecimiento vegetal, y son los responsables, en primer lugar, de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza. También determinan el crecimiento relativo de todos los órganos de la planta (Pierik, 1990).

El crecimiento de la plantas *in vitro* y su morfogénesis son regulados por la interacción de los reguladores adicionados al medio de cultivo (exógenos) y los producidos de manera endógena (Razdan, 2003; Gaspar *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 2003).

- Auxinas

Se sintetizan en las yemas, en las hojas jóvenes, en los frutos así como en el embrión, en una planta completa. Tienen múltiples papeles en el CTV, de acuerdo a su estructura química, su concentración y el tipo de explante. Las auxinas causan una producción de callo y raíces, así como el crecimiento de tallos. Generalmente promueven la elongación celular, la división celular en el cambium, mantienen la dominancia apical, estimulan la formación y el alargamiento de las raíces así como la síntesis de la pared celular. Junto con las citocininas estimulan la diferenciación del floema y xilema. Adicionalmente una alta concentración de una auxina exógena puede inducir embriogénesis somática. La función esencial de las auxinas y las citocininas es para reprogramar las células somáticas que previamente han sido determinadas en el estadio de diferenciación. La reprogramación causa una desdiferenciación y después una rediferenciación, a un nuevo camino de desarrollo de la planta. Una célula que ha sido destinada para desarrollar una parte de la hoja, por ejemplo, pudiera convertirse en embriones somáticos. En condiciones *in vitro* altas concentraciones de auxinas exógenas pueden ser tóxicas, en gran parte porque éstas estimulan la producción de etileno que provoca la inhibición del crecimiento (Trigiano y Gray, 2004; Gaspar *et al.*, Evans *et al.*, 2003).

En el CTV, la acción de las auxinas depende de la concentración y otras hormonas presentes en el medio, cambios de concentración pueden cambiar el tipo de crecimiento, como la concentración para la estimulación de la raíz puede derivar a la inducción de callo. En este aspecto, cada sistema de cultivo de tejidos es único, y los efectos de diferentes concentraciones de auxinas y otras hormonas debe de ser probado individualmente y solamente hasta cierto punto de los resultados pueden transferirse a otros cultivos (George *et al.*, 2008).

- Citocininas

En una planta completa se sintetizan de manera endógena, en zonas meristemáticas de las raíces y en los embriones. Promueven la división y expansión celular, rompen la dominancia apical y contraen el letargo, esta estimulación puede formar brotes apicales del meristemo y subsecuentemente brotes adventicios. En condiciones *in vitro* la división celular promovida por las citocininas produce una diferenciación en el callo. Generalmente, altas concentraciones de citocininas bloquean el desarrollo de la raíz. Altas concentraciones de citocininas pueden causar brotes muy pequeños. Los cuales no se desarrollan completamente. (Trigiano y Gray, 2004; Gaspar *et al.*, 1996; Haberer y Kieber, 2002).

El crecimiento y la organogénesis *in vitro* están altamente ligadas con las sustancias endógenas de crecimiento y las sustancias análogas de crecimiento añadidas al medio. A menudo es necesario formar diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento para un *cultivo in vitro* de acuerdo a las especies o variedades de plantas, el origen del explante, el tipo de cultivo y otros constituyentes en el medio. Un balance entre los reguladores de crecimiento auxinas y citocininas, es con frecuencia el más utilizado para la formación de brotes adventicios y raíces. Las interacciones encontradas son frecuentemente complejas y más de una combinación de las dos sustancias probablemente producirá un mejor resultado (Pollard y Walter, 1990).

2.2 Organogénesis

El crecimiento organizado de un tejido u órgano, contribuye en la creación o mantenimiento de una estructura definida. Ocurre cuando los órganos de crecimiento de las plantas, meristemos apicales de brotes o raíces, primordios foliares, flores jóvenes o frutos, son transferidos a un cultivo y continúan su crecimiento preservando su estructura. El crecimiento es organizado y además ocurre cuando los órganos o tejidos son inducidos. Esto ocurre en el cultivo *in vitro*, directamente sobre el órgano, un tejido (explante) o durante el cultivo previo de tejidos indiferenciados. El proceso de la nueva formación del órgano es llamado Organogénesis (George *et al.*, 2008).

La organogénesis es la base fundamental de la multiplicación vegetativa o formación de nuevos meristemos y con ello la producción mundial de plantas *in vitro* (Vasil, 1994).

Los procesos organogénicos se pueden dividir en Organogénesis directa y Organogénesis indirecta (George y Sherrington, 1984; George, 1993).

2.2.1 Organogénesis Directa

En la organogénesis directa, el surgimiento de los brotes adventicios se logra directamente del explante sin pasar por la fase de callo, se pueden utilizar como explantes embriones, hojas, bulbos, tallos, rizomas, raíces y tubérculos, siendo los promotores de la organogénesis directa altas concentraciones de citocininas y bajas y nulas de auxinas, sin embargo, las concentraciones endógenas de hormonas inducen también esta regeneración tanto *in vitro* como *ex vitro* (George, 1993).

2.2.2. Organogénesis Indirecta

En la organogénesis indirecta, los brotes regenerados se desarrollan a partir de la formación de callo en el explante y son el resultado de la interacción del medio de cultivo, reguladores de crecimiento, del genotipo, del explante así como su estado fisiológico y edad del mismo (George, 1993); los promotores de la formación de callo, generalmente son altas concentraciones de auxinas y bajas o nulas en citocininas (George, 1993). Los brotes regenerados vía organogénesis indirecta, se logran después de que en el callo las células han sido redeterminadas en las nuevas divisiones celulares que les ocurren y así adquieren capacidad organogénica, las células forman una estructura unipolar que puede ser un nuevo brote, un embrión o bien en una raíz (Sharp *et al.*, 1980).

2.3 Inconvenientes durante la Micropropagación

2.3.1. Procesos oxidativos en el cultivo *in vitro* y alternativas para contrarrestarlos

La oxidación de los tejidos es un fenómeno que se presenta en el cultivo *in vitro*. Cuando un tejido es seccionado, los bordes o sitios de corte se tornan café-negro, oxidándose en pocos minutos u horas ocasionado por la presencia de fenoles y quinonas, varios de éstos compuestos son fitotóxicos y ocasionan la muerte del tejido celular si no son liberados. La presencia de dichos compuestos, está condicionada a una serie de factores como pueden ser: la edad fisiológica del explante (tejidos jóvenes contienen menores cantidades de compuestos fenólicos), el tamaño del área dañada por el corte y por el contenido natural de ellas (Collin y Edwards, 1998).

Cuando un tejido es seccionado para su siembra *in vitro* se facilita la reacción entre las enzimas oxidativas como la polifenoloxidasas, las peroxidasas, las tripsinas y sus sustratos, por ejemplo la tirosina o hidroxifenoles como el ácido clorogénico que se encuentra en diferentes compartimentos de la célula, la cual al ser seccionada libera su contenido, poniendo en contacto estas sustancias y provocando la oxidación (George y Sherrington, 1984). La toxicidad de los fenoles se debe probablemente a que se enlazan con las proteínas a las cuales en caso extremo pueden llegar a polimerizar y oxidar para formar compuestos melánicos (George y Sherrington, 1984). Generalmente la oxidación trae como consecuencia el crecimiento reducido y la muerte eventual de los tejidos cultivados (Bonga y Von Anderkas, 1992).

Existen algunos métodos para reducir el efecto de compuestos fenólicos producidos por los cortes en los explantes, entre los cuales se encuentran:

- a) Adición de compuestos antioxidantes al medio de cultivo: El carbón activado y/o el PVP (polivinil-pirrolidona), son dos agentes antioxidantes que puede ser adicionados al medio, adsorbiendo los compuestos fenólicos y reduciendo el ennegrecimiento de los tejidos, aunque tiene una desventaja, también puede adsorber algunos reguladores de crecimiento (Collin y Edwards, 1998).

Una práctica muy común es la adsorción con carbón activado, el cual captura las sustancias tóxicas que son liberadas en el medio por los explantes, sin embargo los reguladores pueden también ser adsorbidos y en consecuencia el medio de cultivo debe ser cambiado con frecuencia (George y Sherrington, 1984).

- b) Subcultivos frecuentes: Una de las adiciones más utilizadas para contrarrestar la oxidación de los tejidos son los subcultivos frecuentes. Las transferencias de medios de cultivo a intervalos frecuentes de tiempo evitan la acumulación de las sustancias tóxicas, además de que las partes necrosadas del tejido pueden removerse antes de que afecten al tejido sano (Bonga Y Von Aderkas, 1992).

- c) Incubación de los explantes es sus etapas iniciales con luz reducidas: La exposición de los cultivos a luz incrementa la actividad de las enzimas oxidativas y por tanto la biosíntesis de los compuestos fenólicos responsables de la muerte de los tejidos. Para reducir o prevenir la oxidación, los cultivos se pueden mantener en oscuridad por 14 días o más, antes de ser transferidos a baja intensidad luminosa (George y Sherrington, 1984).

2.4 Regeneración *in vitro* de *Jatropha curcas*

En los últimos años ha habido un redescubrimiento de las bondades y los usos de esta especie, razón por la cual, *Jatropha curcas*, L., se encuentra actualmente en el centro de atención de las investigaciones de micropropagación que se desarrollan a nivel mundial.

Muy pocas investigaciones se han realizado en el campo del cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas*, L. a pesar de ser este un género que comprende una amplia gama de especies de arbustos y árboles. La gran mayoría de estos estudios estuvieron confinados a la especie *Jatropha panduraefolia* y limitados al cultivo de endospermo (Johri y Bhojwani, 1965; Johri y Srivastava, 1973; Srivastava y Johri, 1974), hasta que más recientemente otros autores incursionaron en la propagación *in vitro* de *Jatropha integerrima* (Sujatha y Dhingra, 1993). En 1996, Sujatha y Mukta lograron la morfogénesis y la regeneración de plantas de la especie

Aunque existen resultados sobre la micropropagación de *J. curcas* y la producción de brotes a partir del cultivo de ápices, yemas axilares y a través de la regeneración directa o indirecta de brotes. La literatura muestra pocas evidencias de protocolos completos para la regeneración *in vitro* de brotes y su enraizamiento. Además, la información referente a la recuperación de plantas durante la aclimatización es escasa. Por lo tanto, en esta investigación se buscó mejorar las condiciones de cultivo que favorezcan el desarrollo longitudinal de los brotes producidos a partir de la organogénesis indirecta de fragmentos de hojas de *J. curcas*. Asimismo, se profundizará en el estudio de las condiciones de cultivo que permitan favorecer la inducción y desarrollo de raíces y la sobrevivencia de las plantas durante la aclimatización.

En la tabla 4 se hace una recopilación y comparación cronológica de los diferentes autores que han indagado en el cultivo *in vitro* de algunos géneros de *Jatropha*, evaluando la respuesta morfogenética; siendo éstos primeros estudios la base para emprender la búsqueda de la regeneración *in vitro* de *J. curcas*.

Tabla 4. Recopilación cronológica de diversos autores en el cultivo in vitro de algunos géneros de *Jatropha*, evaluando sus respuestas morfo genéticas.

ESPECIE	EXPLANTE	TIPO DE RESPUESTA MORFOGENÉTICA	MEDIO USADO (mgL ⁻¹)	FRECUENCIA DE MORFOGÉNESIS	REFERENCIA
<i>J. panduraefolia</i>	Endospermo completo con embrión	Excesiva proliferación de endospermo y diferenciación de tejido vascular	2,4-D+Kn+YE	-----	Johri y Bhojwani, 1965
<i>J. panduraefolia</i>	Semilla madura	Proliferación de endospermo produciendo cada vez mayor y abundante callo, presentando diferenciación celular.	2,4-D+Kn+YE	-----	Srivastava, 1973
<i>J. panduraefolia</i>	Subcultivo de callos de endospermo	Diferenciación de raíces y brotes con una alta frecuencia. ANA promovió la formación de raíces, mientras que la Kn favoreció la formación de brotes. (CH en ambos casos fue funcional)	NAA+Kn+CH	-----	Srivastava y Johri, 1974
<i>J. glandulifera</i>	Hoja	Callo	2,4-D 0.5+Kn1.0	-----	Reddy et al., 1986
<i>J. integerrima</i>	Hoja	Callo	AIA 0.5+Kn1.0	-----	Reddy et al., 1986
<i>J. podagrica</i>	Hoja	Callo	ANA0.5+Kn1.0	-----	Reddy et al., 1986
<i>J. curcas</i>	Hoja	Callo	2,4-D 0.5+Kn1.0	-----	Reddy et al., 1986
<i>J. curcas</i>	Hoja, hipocotilo, pecíolo	Regeneración mediante organogénesis directa y por medio de callos (organogénesis indirecta)	BA 0.5+ AIB1.0	Hoja-100% con 10.7 brotes por explante Hipocotilo-62% con 7.0 brotes por explantes Pecíolo-67% con 2.7 brotes por explante	Sujatha y Dhingra, 1993
<i>J. tanjorensis</i>	Hoja	Organogénesis. Botes	BA 0.5-10.0+AIB1.0	75% con 8.0 brotes por hoja	Prabakaran y Sujatha, 1999
<i>J. integerrima</i>	Hipocotilo, tallo, pedúnculo, hoja	Organogénesis. Botes	BA 0.5-2.0+AIB1.0	100% con innumerables brotes por explante	Sujatha y Reddy, 2000
<i>J. curcas</i>	Hoja	Embriogénesis somática	BA 3.0+AIA3.0	-----	Sardana et al., 2000
<i>J. curcas</i> x <i>J. integerrima</i> (híbrido)	Hoja	Organogénesis (obtención de brotes)	BA 0.5-5.0 +AIB1.0	71.2% de regeneración de brotes	Sujatha y Prabakaran, 2003
<i>J. curcas</i>	Nodos axilares Secciones de hojas	Múltiples brotes	TDZ 0.5-1.0+BA2.0-10.0+AIB1.0	100% proliferación de brotes- 79% regeneración de brotes	Sujatha et al., 2005
<i>J. curcas</i>	Hoja	Embriogénesis somática indirecta	Kn2.0 Kn0.5+AIB 0.2 Kn0.5+AIB0.2+ adenina sulfatada 5.0	56.0%	Jha et al., 2007
<i>J. curcas</i>	Hojas provenientes de plantas jóvenes y de plantas maduras	Obtención de brotes Organogénesis directa	TDZ 0.5+BA 0.5+ AIB 0.1	53.5%	Deore y Johnson, 2008
<i>J. curcas</i>	Cotiledones	Organogénesis Brotes	BA 1.5+ AIB 0.05+ AG3 0.5	33-38% brotes regenerados	Li et al., 2008
<i>J. curcas</i>	Pecíolos	Embriogénesis somática indirecta	BA 3.8 + AIA 2.0+ 250 Glutamina+ 3.0AG3	-----	Freire et al., 2009
<i>J. curcas</i>		Organogénesis directa	Sales B5 + BA 1.0 +1.0 Kn + 2.0 ANA	6.6 brotes por explante	Warakagoda y Subasinghe, 2009
<i>J. curcas</i>	Tallos	Organogénesis	BA 1.0 + Kn 1.0	10-15 brotes por explante 65.3 % brotes regenerados	Achten et al., 2010
<i>J. curcas</i>	Meristemos	Organogénesis directa	BA 2.0+ 0.75 AIB+20.0 Adenina Sulfatada	13.16 brotes por explante	Pramila et al., 2010

BA – benciladenina; CH – caseína hidrolizada; 2,4-D – Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético-; AG3 –ácido giberelico; AIA – ácido indoleacético; AIB – ácido indolebutírico
Kn – kinetina; ANA – ácido naftaleneacético; TDZ – tidiazuron; YE – extracto de levadura.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la creciente demanda de cultivos energéticos encaminados a la producción de biodiesel, y sabiendo las ventajas que tiene *Jatropha curcas* sobre otros cultivos, los cuales compiten con el sector alimenticio y, por el alto contenido de aceite en sus semillas, se han desarrollado investigaciones en micropropagación *in vitro*, donde la mayoría de estos trabajos, se han realizado en la India y Tailandia, utilizando variedades de Asia y África, destacando que éstas variedades cultivadas son diferentes a las que se pueden encontrar en nuestro país, debido a la deriva génica y a las condiciones del suelo, teniendo esta especie la capacidad de recuperación de suelos erosionados e improductivos que se encuentran olvidados. Por ello, es necesario el diseño de un protocolo para la propagación *in vitro* de individuos seleccionados de *Jatropha curcas* L. del país, por su alto contenido de aceite que permitirá que en un futuro, se puedan establecer plantaciones comerciales en donde los individuos tengan una alta producción homogénea y permanente en nuestro país.

HIPÓTESIS

Las plantas desarrollan diferentes procesos morfogenéticos en cada etapa de su desarrollo, estos procesos están determinados por las interacciones de diferentes factores, el cultivo de tejidos tiene la capacidad de potencializar estos procesos morfogenéticos a través del manejo de factores como reguladores de crecimiento, nutrientes, compuestos orgánicos, entre otros, por lo cual la utilización de diferentes órganos de *Jatropha curcas* modulados por distintos factores permitirá la expresión de estos procesos morfogenéticos (totipotencialidad).

OBJETIVOS

General

- Evaluar la capacidad regenerativa por organogénesis de diferentes explantes de *Jatropha curcas* L., estableciendo un protocolo a través de tratamientos de desinfección, obtención, multiplicación y enraizamiento de brotes *in vitro*, y su aclimatización *ex vitro*, a partir de semillas e inflorescencias, con el propósito de una propagación masiva de plantas élite (semillas con alto contenido de aceite).

Particulares

- Determinar el método de desinfección para semillas e inflorescencias de *Jatropha curcas*.
- Evaluar el mejor medio nutritivo para la germinación de las semillas y su desarrollo primario.
- Determinar los mejores medios nutritivos para el establecimiento de callo, inducción y multiplicación de brotes y finalmente enraizamiento (desarrollo y crecimiento).
- Seleccionar el mejor explante para la regeneración de *Jatropha curcas*.
- Establecer la organogénesis.
- Establecer bajo condiciones *ex vitro* y de invernadero plántulas regeneradas bajo condiciones *in vitro*.

1.- Ruta crítica

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de C.T.V. del Depto. de Bioquímica de la Facultad de Química. La ruta crítica que se siguió se describe en la fig. 7.

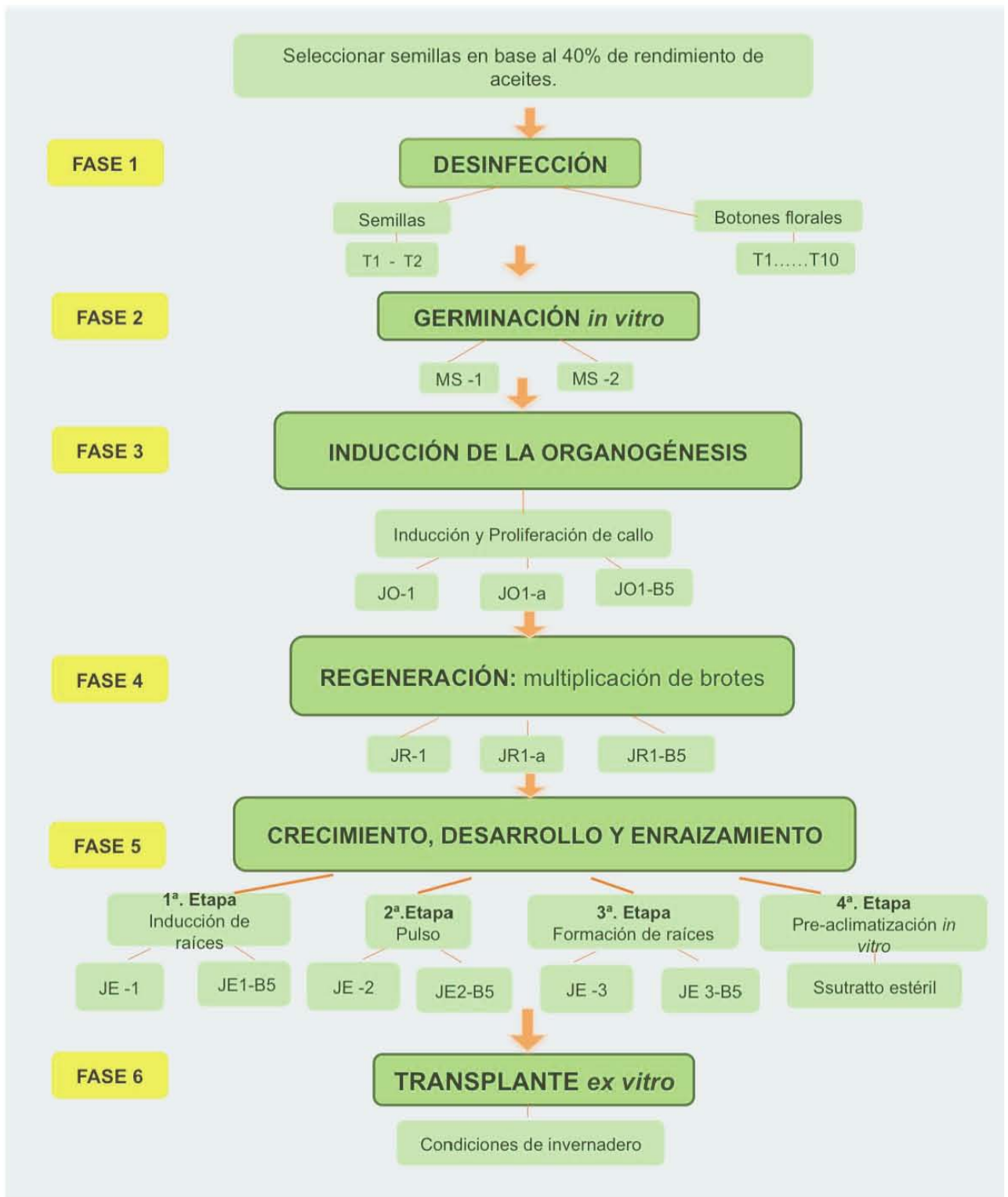


Fig. 7. Ruta crítica para la obtención de cultivos *in vitro* de *Jatropha curcas* L.

T= Tratamiento JO-1, JO1-a, JR-1. JR1-a, JE-1, JE-2 y JE-3, son medios MS (Murasighe y Skoog, 1962) modificados. JO1-B5, JR1-B5, JE1-B5, JE2-B5 y JE3-B5, son medios B5 (Gamborg *et al.*, 1968) modificados. La numeración representa los diferentes tratamientos experimentales que se probaron en cada fase.

2. Material biológico

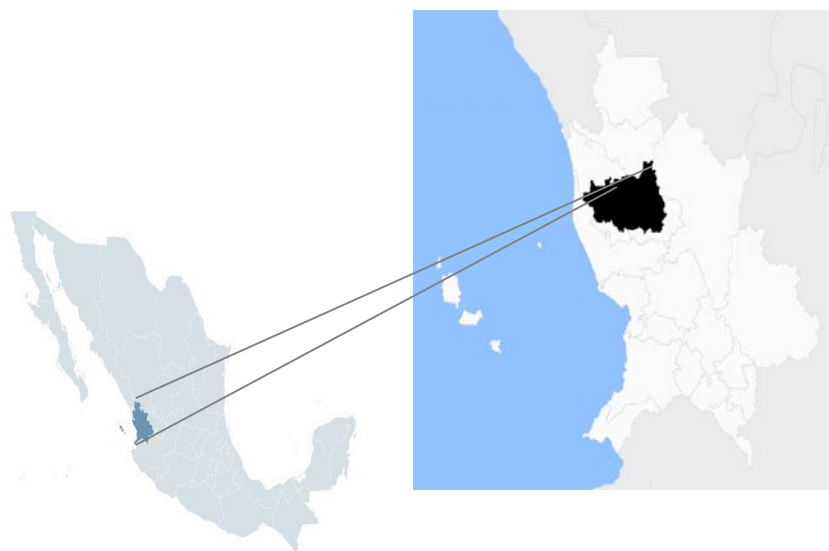
El material biológico fue recolectado en el poblado de Rosa Morada, Nayarit, de árboles elit (seleccionados por el contenido de aceites de sus frutos).

Las semillas fueron proporcionadas por el equipo del Dr. Javier M. Cruz Gómez del laboratorio 122, del conjunto E, de la Facultad de Química UNAM, después de haber sido elegidas por un mayor porcentaje de aceite .

2.1 Recolecta

Ubicación

El Municipio de Rosamorada, el cual se encuentra ubicado al Norte del Estado de Nayarit en las coordenadas extremas: latitud norte del paralelo 21° 50' al 22° 20' y del meridiano 104° 56' al 105° 38' de longitud oeste. Limita al norte con los municipios de Tecuala y Acaponeta, al oriente con el municipio de El Nayar, al sur con los municipios de Ruiz y Tuxpan y al occidente con el municipio de Santiago Ixcuintla (Ver mapa 1).



Mapa 1. Localización del Municipio de Rosamorada, Nayarit.



Fig. 8. Colecta de inflorescencias en el ejido de Providencia, Nayarit.

Las semillas maduras se colectaron en Julio del 2009 y los botones florales en Agosto-Septiembre del 2011, en el ejido de providencia (Ver figura 8).

3. Aspectos Generales

3.1 Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas (Tabla 1 y 2 del anexo). Las sales minerales utilizadas fueron del medios MS (Murasighe y Skoog, 1962) en diferentes concentraciones para la germinación de semillas, así como para la inducción de la organogénesis, así mismo se utilizaron sales B5 (Gamborg *et al.*, 1968) para éste último. A todos los medios se les adicionó 3% de sacarosa, reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones, vitaminas y aminoácidos, el pH se ajustó a 5.7 con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N o ácido clorhídrico (HCl) 1 N según fuera el caso. Los medios se esterilizaron por calor húmedo en autoclave vertical a una temperatura de 121°C y a una presión de 1.2 Kg/cm² durante 18 min.

Cuando se requirió, a los medios de cultivo se les adicionó antibiótico (Cefotaxima[®] 250 mg L⁻¹) y/o Fungicida (Nistatina 50 000 U L⁻¹), los cuales se agregaron a los medios después de haber sido esterilizados y enfriados a una temperatura aproximada de 40°C dentro de una campana de flujo laminar, manteniéndolo en agitación para posteriormente servirlo a razón de 20 mL en tubos de ensaye y/o 30 mL en frascos de alimento infantil (Gerber[®]).

Se probaron diferentes medios de cultivo, los cuales se describirán posteriormente en los ensayos.

3.2 Condiciones de incubación

Todos los cultivos *in vitro* se mantuvieron en un cuarto con ambiente controlado, bajo fotoperíodo de 16 h luz / 8 h oscuridad a una temperatura de 25 ± 2 °C y se subcultivaron a medio fresco cada 15 días.



Fig. No.9. Diversos cultivos *in vitro* de *Jatropha c.* en fotoperíodo de luz, realizados en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Química, Conjunto E, UNAM.

4. FASE 1: Tratamientos de desinfección y siembra de explantes

Tratamientos de desinfección

Se probaron 12 diferentes tratamientos de desinfección: 2 para semillas (T1 y T2) y 10 para botones florales (T1'-T10), modificando la concentración y tiempo de las sustancias desinfectantes: la siembra tuvo variación en el medio con antibiótico, cabe mencionar que los tratamientos fueron probados uno a uno, consecutivamente, al observar la deficiencia que tenía cada uno de ellos, se probó otro al cual se le adicionaron nuevos agentes desinfectantes estériles y/o variando el tiempo de exposición, como se describe en la tabla No. 5. Todo este proceso se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar.

Para el caso de las semillas en el medio MS-1, se escarificaron mecánicamente y posteriormente se sometió al tratamiento. En cuanto a las inflorescencias (botones florales), inmediatamente después de realizada la recolecta en campo, el material biológico, se roció con una solución de Benomil® 5g.L⁻¹ y Agrimicín 500® 5g.L⁻¹ estériles, se envolvieron en Sanitas® y se metieron en bolsas con cierre hermético (Ziploc®) para su traslado al Laboratorio de la UNAM. Las diferencias entre los métodos de desinfección que se aplicaron a los botones florales, consistieron esencialmente en una variación en los tiempos de exposición y concentración de los agentes desinfectantes (tabla No.5).

La efectividad de los métodos de desinfección realizados consecutivamente, se determinó a través de porcentajes de contaminación, oxidación y sobrevivencia de los explantes.

Tabla5. Tratamientos de desinfección para semillas y botones florales de *Jatropha curcas* L.

AGENTE DESINFECTANTE	EXPLANTES											
	SEMILLAS		BOTONES FLORALES									
	T1	T2	T1'	T2'	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Detergente común	10'		10'		10'		10'	10'	10'	10'	10'	10'
Etanol 70%	1'		1'		1'	1'	1'	1'	1'	1'	1'	1'
H ₂ SO ₄ concentrado		50ml/ 55'										
Hipoclorito de sodio				20% 20'							5% 12h	2% 2h
Sol. Hipoclorito de sodio al 5% + Detergente común				24 h								
Sol. Hipoclorito de sodio al 15% + Tritón 100 (3gotas/250ml) + Microdyn® (5ml/250ml)	15'		15'		15'	15'	15'	15'	15'	15'	15'	15'
Vanish® 2g/L ⁻¹					15'	15'	15'	15'	15'	15'		
Benomil® 4g/L ⁻¹	20'		20'		40'	15'	45'	1.5h	3h	24h	40'	40'
Agrimicín 500® 4g/L ⁻¹	20'		20'	20'	40'	15'	45'	1.5h	3h	15'	40'	40'
AGENTES ADICIONADOS A LOS MEDIOS DE CULTIVO PARA MITIGAR EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS												
Cefotaxima® 250 mgL ⁻¹	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Nistatina® 50 000 U L ⁻¹						✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

T: tratamiento
H: horas
' : minutos

Siembra de los diferentes explantes

Después de realizar la desinfección, se obtuvieron los explantes como se describe a continuación.

- Semillas: Se sembraron 40 semillas, una por cada tubo de ensaye y en un segundo ensayo, se sembraron 40, 3 por cada frasco.
- Hojas y tallos: Una vez que las semillas germinaron en condiciones *in vitro* (siguiente punto), se obtuvieron los tallos y hojas para la inducción de organogénesis indirecta. A las hojas, se les eliminó el borde y se cortaron segmentos de 1cm² dejando la nervadura central, se sembraron 3 fracciones del explante por cada uno de los 30 frasco, colocándolos con el envés en contacto con el medio nutritivo. Los tallos se seccionaron de forma transversal en fragmentos de 1 cm², y se depositaron de 3 de éstos en cada frasco.
- Botones Florales: Se dividieron de acuerdo a su tamaño en 3: chicos (0.2 - 0.3mm), medianos (0.3 – 0.5mm) y grandes (0.5 – 0.77mm), sembrando de 4 a 6 de ellas en cada uno de los 40 frascos.

5. FASE 2: Germinación *in vitro*

Ya realizada la desinfección, se sembraron 40 semillas maduras por cada medio, una semilla por cada tubo de ensaye con medio MS a la mitad de sales (MS-1), y en el caso del medio MS conteniendo un cuarto de sales (MS-2), se sembraron 3 semillas por frasco. La especificación de los medios se muestra en la tabla No. 6.

Tabla 6. Composición de los medios de cultivo probados para germinación de semillas de *Jatropha c.*

Medios de cultivo para 1 litro de medio		
Componente	Medio MS-1	Medio MS-2
Sales MS (Murasighe y Skoog, 1962)	50%	25%
*Vitamina R2	10ml/100%	
Glicina	1 mg	
Sacarosa	30 g	
Gelzan®	3.3 g	
Cefotaxima	250 mg	

*Ver tabla 4 del anexo

Los parámetros de evaluación para la germinación fueron los siguientes:

1. Desarrollo del eje embrionario: Se registró el día en que se empezó a desarrollar el eje embrionario, el cual involucra hipocótilo y radícula.
2. Embrión con coloración verde: Se registró el tiempo en el que el embrión se coloreó completamente de verde, debido a la diferenciación de los cloroplastos.
3. Formación de yema apical: Se registró el día en que aparece la yema apical en la bifurcación existente entre las dos hojas cotiledonares.
4. Aparición de la primera hoja verdadera: Se registró el día en que aparece la primera hoja verdadera, a partir del desarrollo de la yema apical.
5. Longitud del tallo: Se midió la longitud del tallo de la plántula (en centímetros), desde la base, que está en contacto con el medio, hasta la bifurcación de las hojas cotiledonares, a los 30 días de la siembra.
6. Desarrollo del sistema radical: Se evaluó el tamaño del sistema radical de las plántulas a los 30 días de la siembra, estableciendo una escala de valores de cero a tres (Véase tabla No.7), ya que es muy difícil la medición de las raíces, debido a que tienden a crecer y enrollarse en la base del frasco de cultivo. El valor de cero (0) significa un desarrollo nulo y el valor de tres (3) significa un desarrollo abundante.

Tabla No. 7. Escala establecida para evaluar el desarrollo del sistema radical.

Parámetro	Sistema radical
0	Ausencia de raíces
1	Raíces cortas
2	Raíces medianas
3	Raíces largas

Finalmente, se realizó la comparación general en porcentajes, del número de semillas que presentaron las 6 variables evaluadas, en los dos medios experimentales.

6. FASE 3: Inducción de la Organogénesis

El objetivo de esta etapa fue seleccionar el medio y el explante óptimo para la proliferación de callo.

- **Inducción y proliferación de callo.**

Se probó la eficiencia de la inducción y proliferación de callos en tres diferentes medios de cultivo JO-0, JO-1 y JO1-B5, que consistieron en medios nutritivos MS (Musasighe y Skoog, 1962) Y B5 (Gamborg *et al.*, 1968), con variación en la concentración de auxinas y citocininas, como se indica en la tabla No.8.

Tabla 8. Composición de los medios experimentales para inducción de callo y obtención de brotes de *Jatropha c.*, empleando hojas y tallos como explantes.

Componentes para 1 litro de medio			
Medios	JO-0 CONTROL	JO-1	JO1-B5
Componentes			
NUTRIMENTOS MINERALES	Sales MS (Murasighe y Skoog, 1962)		Sales B5 (Gamborg <i>et al.</i> , 1968)
COMPUESTOS ORGÁNICOS	L-glutamina 25 mg L-arginina 50 mg Adenina sulfatada 2.5 mg Sacarosa 30%		
VITAMINAS	*Vit. R2 10mL/100%		
AGENTES GELIFICANTES	Gelzan® 3.3 g		
FITORREGULADORES	BA 3 mg AIB 3 mg	BA 3 mg AIB 0.3 mg	BA 3 mg AIB 0.3 mg
OTROS COMPONENTES	Sol. ÁC. Cítrico/ ÁC. Ascórbico 200mg	PVP 1 g	

*Ver tabla 4 del anexo.

La elección de los medios dependió de los ya probados previamente en investigaciones realizadas en el laboratorio de CTV.

Se comenzó probando 2 explantes, considerando diferentes tipos celulares: hoja verdadera y tallo, provenientes de la germinación *in vitro*, en el medio JO-0; a este medio se le hicieron modificaciones, del cual derivaron el JO-1 y JO1-B5.

Para poder identificar el medio y el explante que presentó mayor proliferación de callo, se hicieron observaciones periódicas, donde se evaluó la formación de callo, apariencia y cambios de estructuras, todos estos se registraron en porcentajes, donde el 100% fue el callo formado de los 3 segmentos de los explantes (tallo y hoja), y conforme el callo iba aumentando de volumen con respecto al área del frasco, se fue evaluando el porcentaje; de ahí que se pudo elegir a la hoja como el explante más exitoso en cuanto a la proliferación de callo.

El material biológico se subcultivó cada 15 días durante 8 meses y medio, en los 3 medios de cultivo.

7. FASE 4: Regeneración: multiplicación de brotes.

Una vez que proliferó el callo de la fase anterior, se pasaron a 3 medios nutritivos para inducir diferenciación y multiplicación de pequeños brotes durante 14 semanas más. La finalidad de sembrar los brotes en los tres medios fue evaluar los medios y seleccionar aquél que propiciara el mayor desarrollo de brotes con una menor oxidación.

La diferencia de los medios probados, radicó en la cantidad de las sales orgánicas MS (Murasighe y Skoog, 1962), al 100% en JR-1 y al 50% en JR-1a; y sales B5 (Gamborg et al, 1968) al 100% en el medio JR-1 y también el uso de antioxidantes como el PVP y carbón activado. Los componentes de dichos medios se describen en la tabla No. 9.

Tabla 9. Composición de los medios para la proliferación de brotes de *Jatropha c.*

Componentes para 1 litro de medio						
Medios	JR-1 CONTROL		JR-1a		JR1-B5	
Componentes						
NUTRIMENTOS MINERALES	Sales MS (Murasighe y Skoog, 1962)		Sales MS 50% (Murasighe y Skoog, 1962)		Sales B5 (Gamborg et al., 1968)	
COMPUESTOS ORGÁNICOS	L-glutamina 25 mg L-arginina 50 mg Adenina sulfatada 2.5 mg Sacarosa 30%					
VITAMINAS	*Vit. R2 10mL/100%					
AGENTES GELIFICANTES	Gelzan® 3.3 g					
FITORREGULADORES	BA 1 mg					
OTROS COMPONENTES	PVP 1g	Carbón activado 1g	PVP 1g	Carbón Activado 1g	PVP 1g	Carbón activado 1g

*Ver tabla 4 del anexo.

8. FASE 5: Crecimiento, desarrollo y enraizamiento

La inducción del desarrollo, crecimiento y enraizamiento de los brotes se realizó en tres etapas, probando dos medios de cultivo en cada una, variando solamente las sales inorgánicas (MS y B5). En la primera etapa se utilizó como regulador de crecimiento para estimular el enraizamiento al AIB a razón de 3 mg.L⁻¹. Estos brotes se mantuvieron durante 1 mes bajo condiciones de fotoperíodo y temperatura como se describió anteriormente. Al cabo de la incubación, en la segunda etapa se pasaron a medios líquidos para dar un pulso con el mismo regulador de crecimiento pero a una concentración de 6 mg.L⁻¹ en medios líquidos durante 3 horas. Finalmente en la tercera etapa, los brotes se sembraron en medios sin reguladores de crecimiento a lo largo de 28 días (Tabla10).

Tabla 10. Composición de los medios experimentales para la obtención de plántulas de *Jatropha c.*

Medios de cultivo para 1 litro de medio						
	1ra. etapa		2da. etapa		3ra. etapa	
Medios	JE-1 Control	JE1-B5	JE-2	JE2-B5	JE-3	JE3-B5
Componentes						
NUTRIMENTOS MINERALES	Sales MS 50% (Murasighe y Skoog, 1962)	Sales B5 (Gamborg et al., 1968)	Sales MS 50% (Murasighe y Skoog, 1962)	Sales B5 (Gamborg et al., 1968)	Sales MS 50% (Murasighe y Skoog, 1962)	Sales B5 (Gamborg et al., 1968)
COMPUESTOS ORGÁNICOS	L-glutamina 25 mg L-arginina 50 mg Adenina Sulfatada 2.5 mg Sacarosa 30%					
VITAMINAS	*Vit. R2 10mL/100%					
AGENTES GELIFICANTES	Gelzan® 3.3 g				Gelzan® 3.3 g	
FITORREGULADORES	AIB 3 mg		AIB 6 mg.			
OTROS COMPONENTES	PVP 1g.					

*Ver tabla 4 del anexo.

4ta. Etapa: Preaclimatación.

Las plántulas obtenidas de este ensayo (ya con raíces), se sometieron a una preaclimatización subcultivándolas en la campana de flujo laminar a frascos de 10 cm de longitud x 5 cm de diámetro y posteriormente de 18cm de longitud x 8cm de diámetro con sustrato orgánico estéril (Ecosustrato®) y se mantuvieron en incubación, bajo las mismas condiciones que los cultivos *in vitro*, durante 2 meses. A los 30 días los frascos fueron destapados de la siguiente manera:

- De los 30 a 50 días de incubación se destaparon los frascos pequeños durante 2 horas diarias, regándose con una solución estéril de Benomil® (fungicida) 5 g.L⁻¹ y agua desionizada también estéril.
- De los 51 a 60 días de incubación, las plantas se subcultivaron a los frascos grandes y se destaparon durante 12 horas diariamente para facilitar el pase *ex vitro*, manteniendo su riego con agua desionizada estéril.

9. FASE 6: TRANSPLANTE *ex vitro*

Las plantas se traspasaron a macetas de 14cm de longitud x 9cm de diámetro, conteniendo el mismo sustrato que los frascos y manteniéndolas bajo condiciones de invernadero. Las plantas se regaron cada 2 días durante un mes y posteriormente cuando lo requerían. Se fertilizaron cumplido el primer mes y posteriormente se llevó a cabo otra fertilización a los 3 meses. Se utilizaron sales inorgánicas del MS (Murasighe y Skoog, 1962) a una concentración del 50% para la fertilización. Esta fase se llevo a cabo en el invernadero de la Facultad de Química, conjunto E, UNAM.

10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para explicar la eficiencia de cada medio nutrimental se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), efectuando una prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer con una $P < 0.05$, que muestra la diferencia entre los medios empleados en cada fase. Se utilizó el paquete estadístico NCSS 2007.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

1. FASE 1: Tratamientos de desinfección

Como ya se indicó, en esta etapa se evaluó el efecto de los métodos de desinfección para semillas y botones florales. Los métodos consistieron en la combinación de diferentes agentes, a diferentes concentraciones y tiempos.

a. Semillas maduras

Se probaron dos tratamientos diferentes: T1 y T2 (Véase tabla No. 3 y Fig. 6 y 7), utilizando 40 semillas por cada uno. Los resultados obtenidos durante esta etapa indicaron que ambos tratamientos son eficientes, ya que la contaminación fue del 0%.

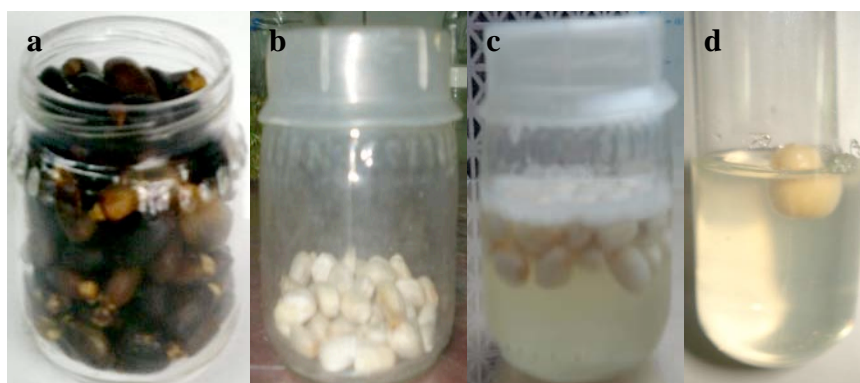


Fig. No. 9. Tratamiento 1 de desinfección. **a.** Semillas de *Jatropha c.* **b.** Escarificación mecánica. **c.** Semillas sumergidas en detergente comercial. **d.** Semillas desinfectadas sembradas en medio MS-1.

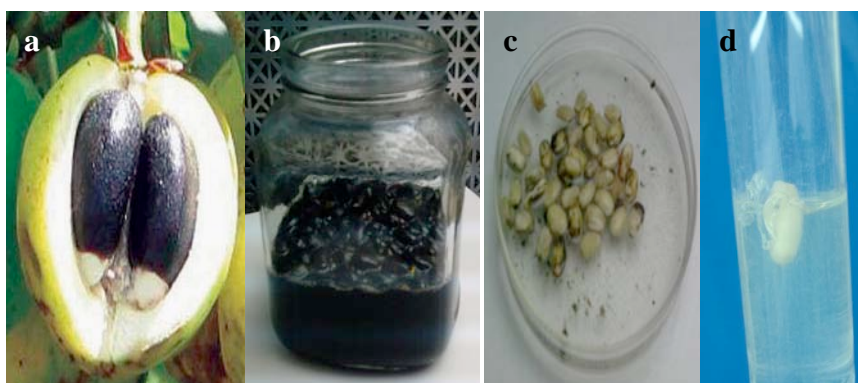


Fig. No. 10. Tratamiento 2 de desinfección. **a.** Fruto de *Jatropha c.* **b.** Semillas sumergidas en H_2SO_4 concentrado. **c.** Escarificación. **d.** Semillas desinfectadas sembradas en medio MS-1.

b. Botones florales.

Los botones florales se sometieron a 10 diferentes tratamientos encontrándose que en ninguno se logró la desinfección total, ya que fue imposible eliminar la inoculación de los hongos, sin embargo, en los tratamientos 9 y 10, se disminuyó hasta un 80% y se pudieron eliminar completamente las bacterias. A pesar de que la contaminación por estos agentes se estaba controlando, los últimos seis tratamientos mostraron una oxidación severa y, para mitigar se probó la exposición a diferentes antioxidantes: Sol. ác. cítrico/ác. Ascórbico (200mgL^{-1}) y PVP(1g.), lográndose la disminución hasta en un 30% en el caso del tratamiento no. 8 el cual presentó el mayor porcentaje de oxidación, hasta un 30%, respecto al tratamiento número 8 que presentó el mayor porcentaje, es decir un 70% en ambos casos. El tratamiento No. 10 resultó el de mayor éxito, presentando menores porcentajes en todos los casos. Los resultados se presentan en la tabla No. 12.

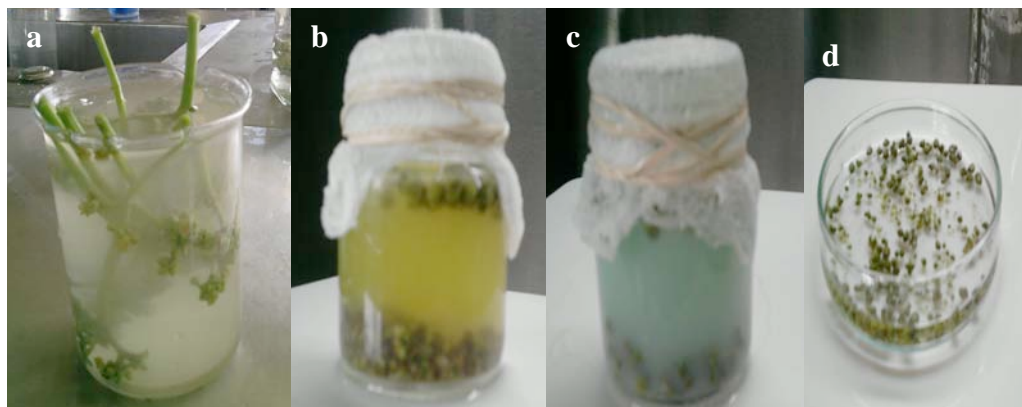


Fig. No. 11. Tratamiento No. 10 de desinfección (Botones florales). **a.** Inflorescencias de *J. curcas* recién colectadas. **b.** Botones florales sumergidos en Benomil. **c.** Botones florales en solución de Agrimycin. **d)** Botones florales de *J. curcas* desinfectados.

Tabla 12. Resultados de los diferentes tratamientos de desinfección de botones florales de *Jatropha curcas* L.

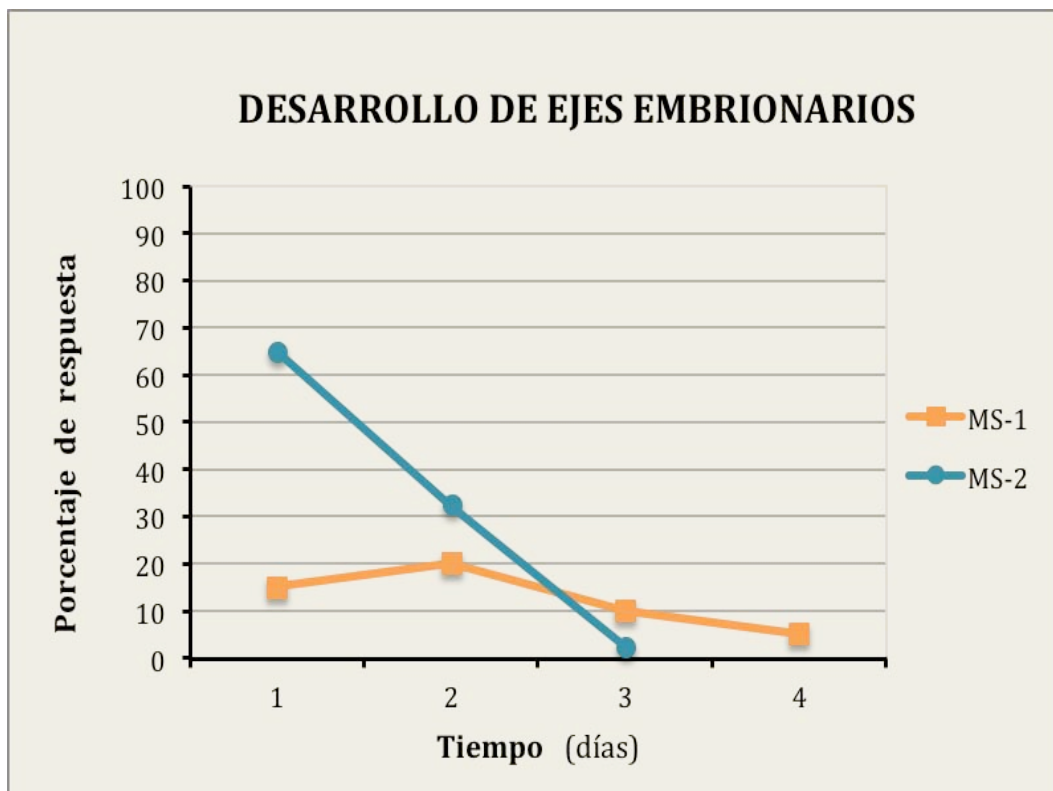
Observaciones	TRATAMIENTOS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
% contaminación por hongo	100	100	90	90	70	60	40	30	20	20
% contaminación por bacteria	100	70	60	70	30	10	10	10	0	0
% oxidación	0	0	40	50	60	60	60	70	60	40

2. FASE 2: Germinación in vitro

Esta etapa tuvo la finalidad de encontrar el medio de cultivo idóneo que favoreciera la germinación de las semillas.

a. Desarrollo del eje embrionario.

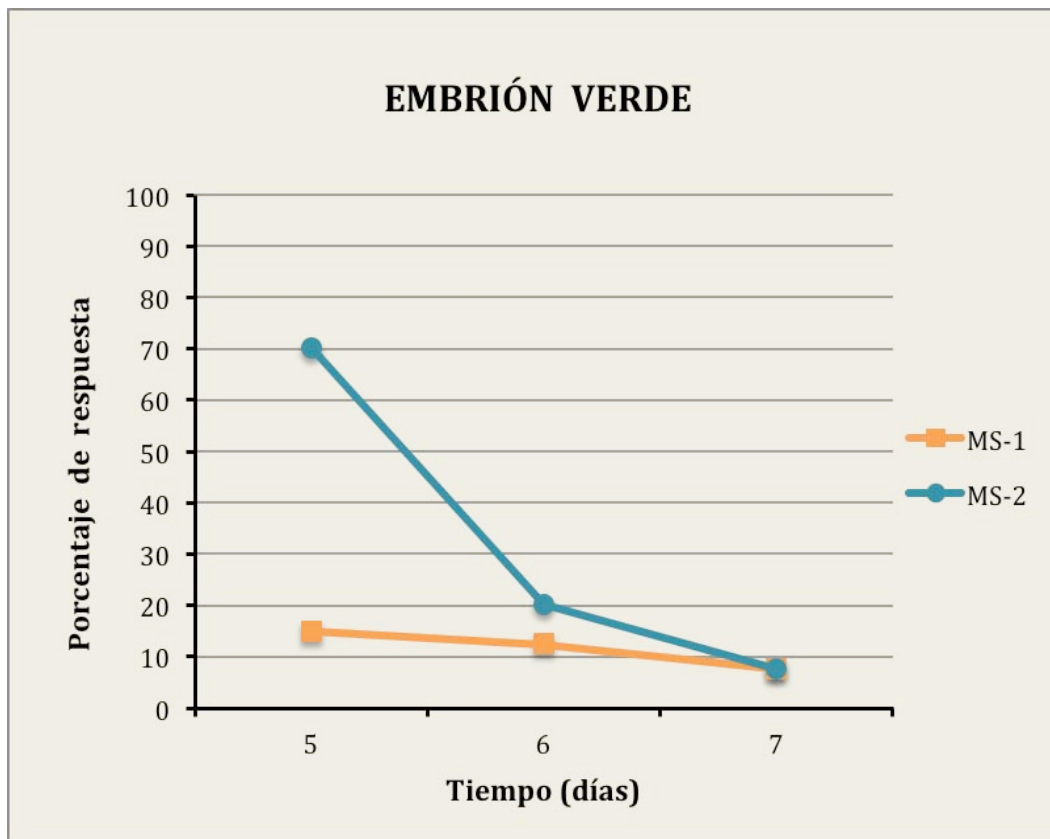
Se evaluó el porcentaje de semillas que desarrollaron ejes embrionarios, presentando estructuras como el hipocótilo y radícula durante los primeros 5 días que se indujo la germinación, pues en este período es cuando ocurrió este evento. Comparando los puntos de mayor porcentaje en ambos medios, se observó que en el día dos el medio MS-2 presenta un porcentaje de respuesta del 65% y del 32.5% para el MS-1 en el día 3, como se puede apreciar en la gráfica No. 1; por lo tanto se determinó que el medio MS-2 es el mejor en este parámetro, ya que se observó mayor desarrollo de ejes embrionarios y en menor tiempo.



Gráfica No. 1. Porcentajes de desarrollo de los ejes embrionarios, comparando los dos medios de cultivo (MS-1, MS-2) durante 5 días.

b. Embrión verde.

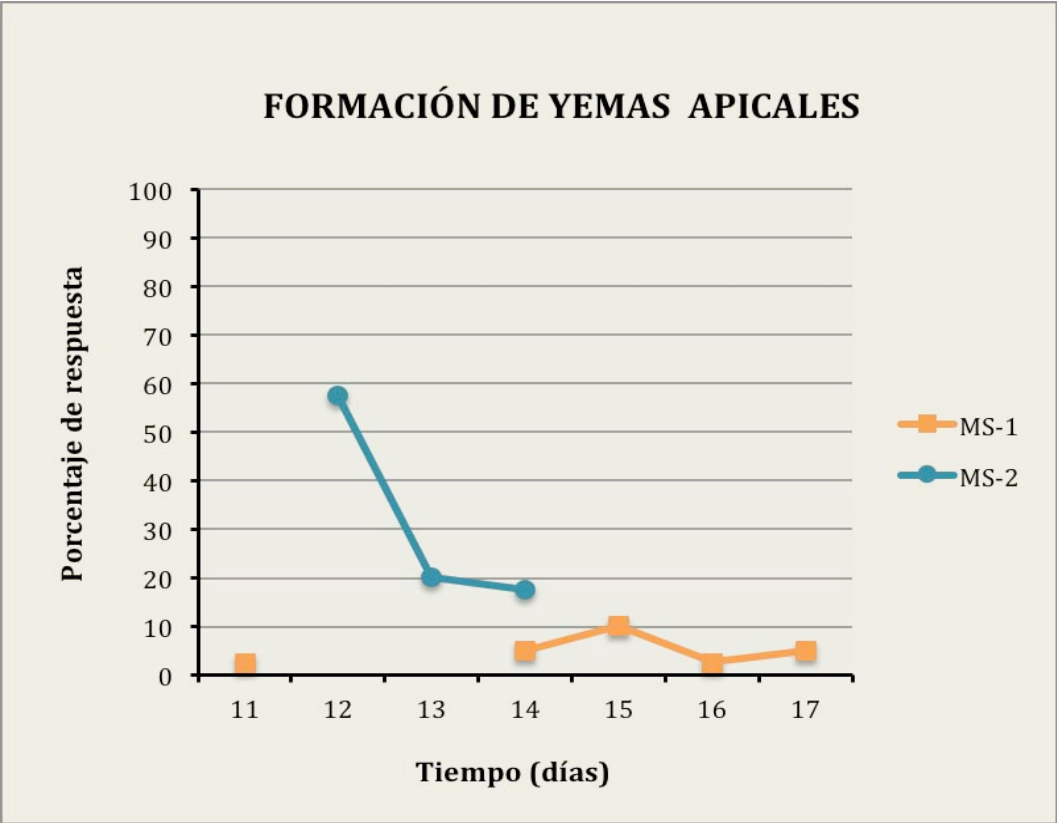
Del día 5 al día 7 transcurrida la inducción de la germinación, se evaluó el porcentaje de semillas que presentaron un embrión completamente verde. Como se puede observar en la gráfica No. 2, en el día 5 se alcanzó el mayor porcentaje de respuesta en ambos medios, sin embargo en el MS-1 se obtuvo un 15 % y en el MS-2 75%, por tanto determinamos que el mejor medio es el MS-2 para este parámetro.



Gráfica No. 2. Porcentajes de embriones con coloración verde en los medios: MS-1 y MS-2 durante 7 días.

c. Formación de yema apical.

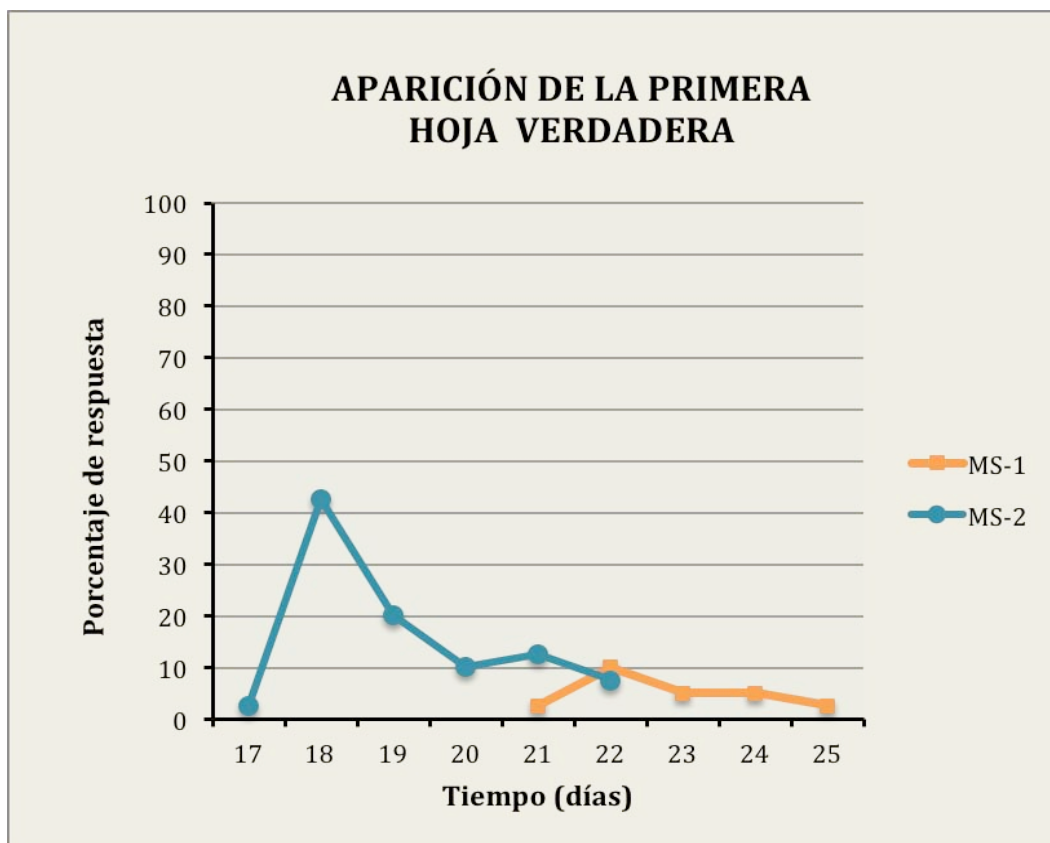
Se evaluó el porcentaje de formación de yemas apicales del día 11 al 17, período en el cual ocurrió este evento. Comparando los porcentajes más altos en ambos medios de cultivo, se observó que en el día 12 el medio MS-2 presenta un porcentaje del 57.5%, mientras que para el MS-1 es del 10% en el día 15, por tanto el medio MS-2 es el que presenta mayor porcentaje de yemas apicales y es el idóneo en este parámetro, como se pueden apreciar en la gráfica No. 3.



Gráfica No. 3. Porcentajes de formación de yemas apicales, en los medios: MS-1 y MS-2, durante 17 días.

d. Aparición de la primera hoja verdadera.

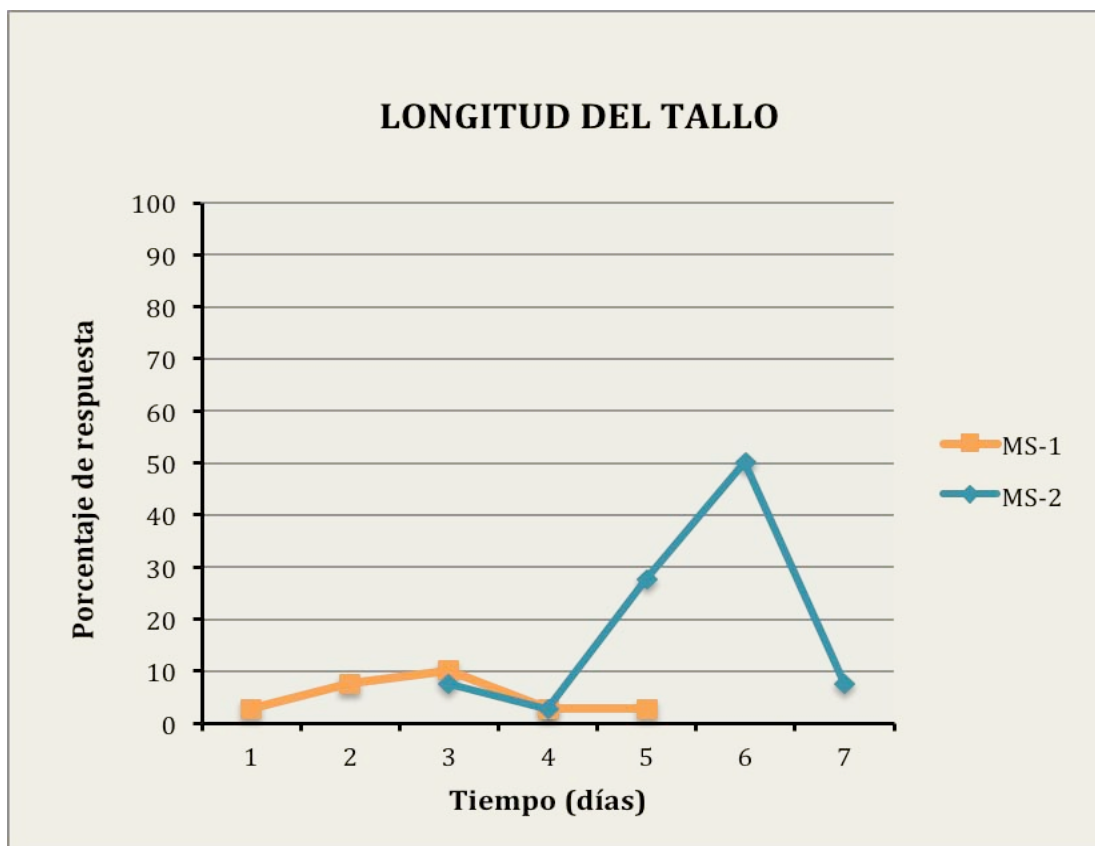
Los resultados que se muestran en la grafica No. 4 nos permiten determinar que el medio MS-2 es el mejor para el desarrollo de la primera hoja verdadera, considerando que el mayor porcentaje se dió en este medio, alcanzando un 42.5 % en el día 18 iniciada la inducción de la germinación y para el caso del MS-1 su máximo porcentaje fue de un 10% hasta el día 22.



Gráfica No. 4. Porcentajes de aparición de la primera hoja verdadera, en los medios MS-1 y MS-2, durante 25 días.

e. Longitud del tallo.

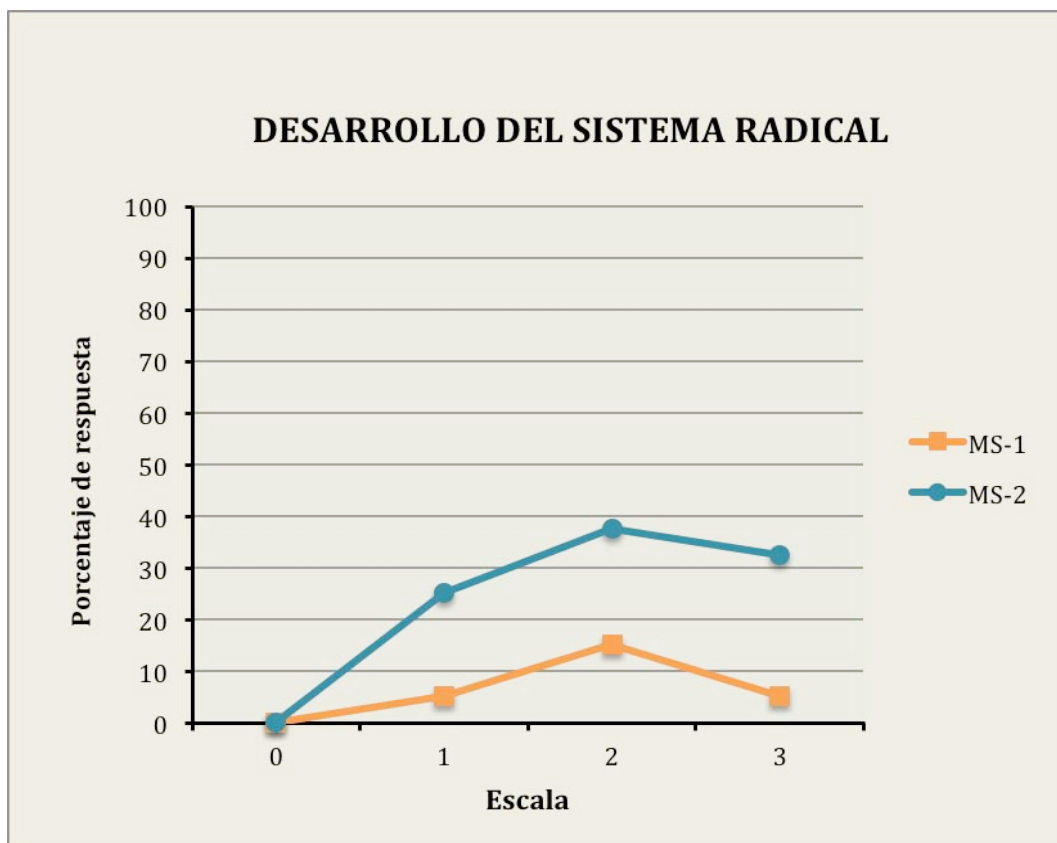
Este parámetro se evaluó a los 30 días de iniciada la inducción de la germinación; se midió la longitud de los tallos de las plántulas en centímetros y se obtuvieron los porcentajes que se presentan en la gráfica No. 5, por consiguiente se determinó que en esta etapa el medio MS-2 favoreció el desarrollo de tallos mas largos, pues un 50% alcanzó hasta 7 cm de longitud, y en MS-1 solo el 10% logró 4cm, siendo estos sus mayores porcentajes en cada caso.



Gráfica No. 5. Porcentajes de la longitud de tallos en centímetros, a los 30 días de inducir la germinación, en los medios MS-1 y MS-2.

f. Desarrollo del sistema radical.

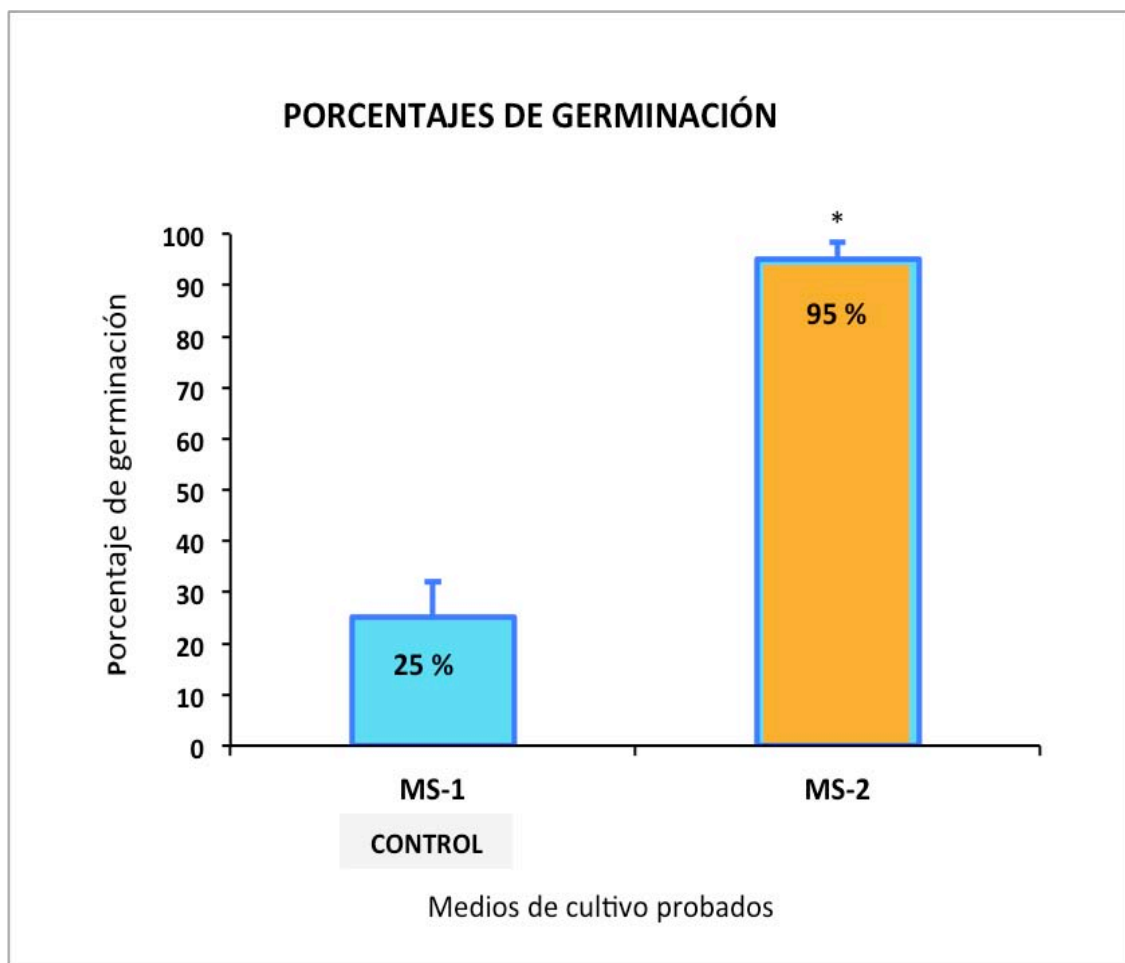
A los 30 días de iniciada la inducción de la germinación, se evaluó el porcentaje del desarrollo de las raíces de las plántulas, tomando como valores 0: Ausencia de raíces, 1: raíces cortas, 2: raíces medianas y 3: raíces largas. En la gráfica No. 6 se muestran los porcentajes obtenidos, donde se puede apreciar que todas las plántulas presentan raíces y en ambos medios las raíces medianas son mas abundantes , sin embargo hay diferencias en cuanto a los porcentajes, dado que en el medio MS-1 alcanzó un 15% y el MS-2 un 37.5%, de manera que este último es el mejor medio para esta etapa.



Gráfica No. 6. Porcentaje del desarrollo de yemas apicales, en los medios: MS-1 y MS-2, durante 17 días.

g. Porcentaje de germinación a los 30 días de siembra.

En la gráfica No.7 se presentan los porcentajes de germinación obtenidos mediante la evaluación de los 6 parámetros anteriores en ambos medios de cultivo; los cuales presentan diferencias entre ellos, como lo demuestra la prueba de Tuckey-Kramer (véase tablas 7 a 12 del anexo), puesto que en el medio MS-1 fue de 25%, es decir solo germinaron 10 semillas de 40 y en MS-2 germinaron 38 de 40, alcanzando un 95% de germinación; por consiguiente se determinó que el medio MS-2 es el medio adecuado que favorece la germinación.



Gráfica No. 7. Porcentajes de germinación de semillas de *Jatropha curcas* en los medios MS-1 y MS-2 a los 30 días de siembra. *Diferencias estadísticamente significativas.

También es importante destacar que hubo diferencias relevantes en las estructuras de las plántulas desarrolladas durante la germinación, mismas que se observaron con la evaluación de los seis parámetros anteriores, dado que en el medio MS-2 se mostró una mayor vigorosidad de ellas, así como un mayor crecimiento del tallo y raíces, y la formación de un mayor número de hojas verdaderas a diferencia del MS-1, como se puede apreciar en la figura No. 12



Fig. No. 12. Germinación de semillas de *Jatropha c.* en los dos medios probados a los 30 días. **a.**MS-1. **b.**MS-2.

FASE 3: Inducción de la Organogénesis

Esta etapa tuvo la finalidad de determinar el medio de cultivo y tipo de explante que favoreciera la inducción de callo y la formación de brotes.

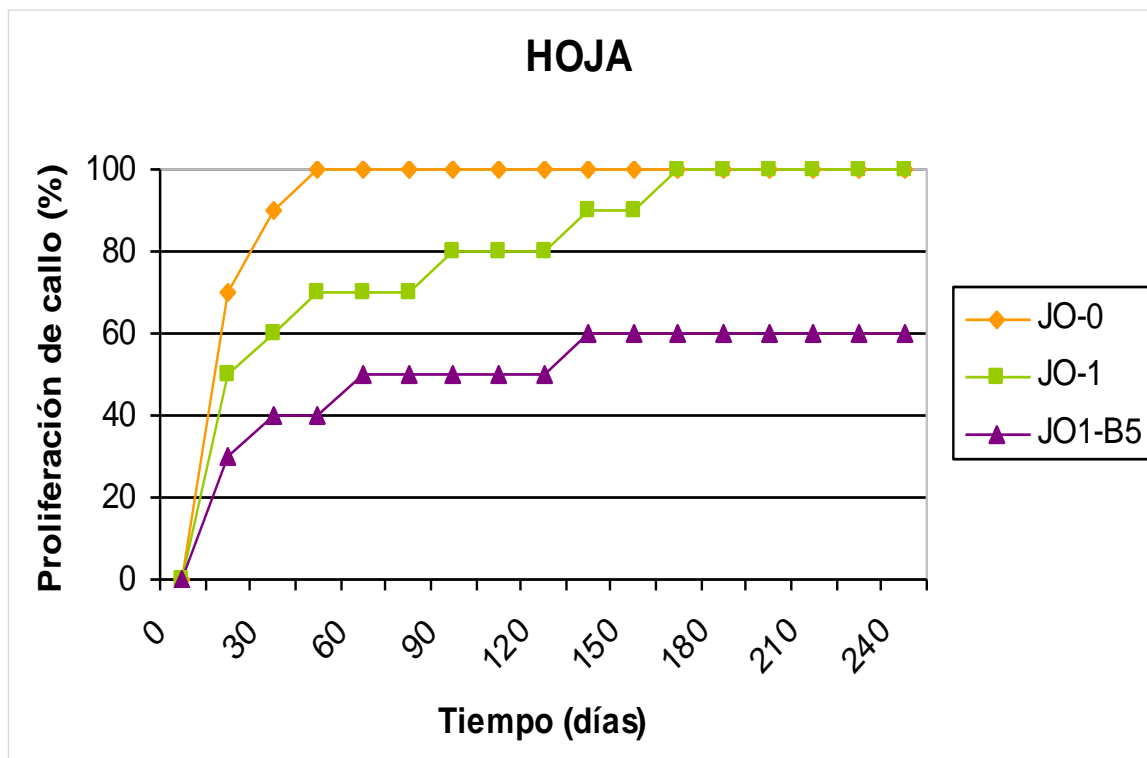
En este ensayo se probaron tres medios, variando la concentración de sales orgánicas y reguladores de crecimiento: JO-O, JO-1 Y JO1-B5 (véase tabla 8) y dos explantes diferentes: hoja verdadera y tallo.

Los resultados obtenidos al probar los tres medios de cultivo con los dos explantes, se evaluaron tomando en cuenta la proliferación de callo (%) a través del tiempo (días), hasta la aparición de pequeños brotes.

a. Inducción y proliferación de callo en hoja y tallo

Hoja

Se observó que la mayor proliferación se presenta en el medio JO-O a partir de los 15 días después de la siembra, manteniendo este mismo comportamiento hasta alcanzar una producción de callo al 100% en 45 días, para el medio JO-1 el 100% de callo se obtuvo a los 165 días y en el caso del medio JO1-B5 el mayor porcentaje que alcanza de callo es de 60% a los 135 días. Los resultados se pueden apreciar en la gráfica 8.



Gráfica No. 8. Inducción y Proliferación de callo para hoja en tres medios nutritivos: (JO-0, JO-1 y JO1-B5), a los 240 días.

Como se puede notar, los tres medios de cultivo producen callo, sin embargo, al realizar las observaciones del estado físico del callo, se pudo detectar que el medio JO-0 tuvo un alto porcentaje de proliferación, seguido del JO-1, los cuales presentaron un callo friable de color verde brillante en comparación con el callo proveniente del medio JO1-B5, que produjo menor cantidad, con una consistencia compacta con una coloración verde menos brillante, tal como se muestra en la figura No. 11.

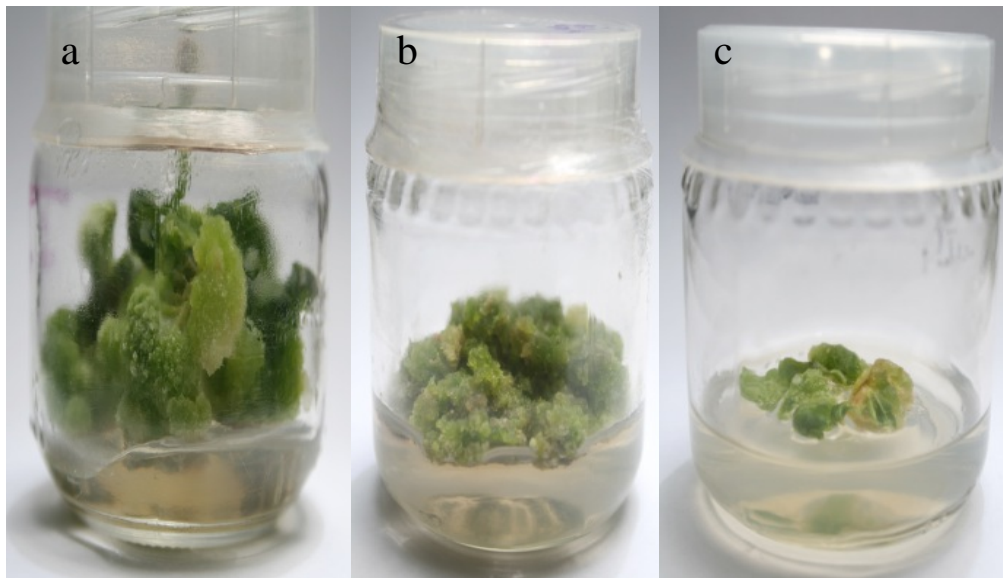
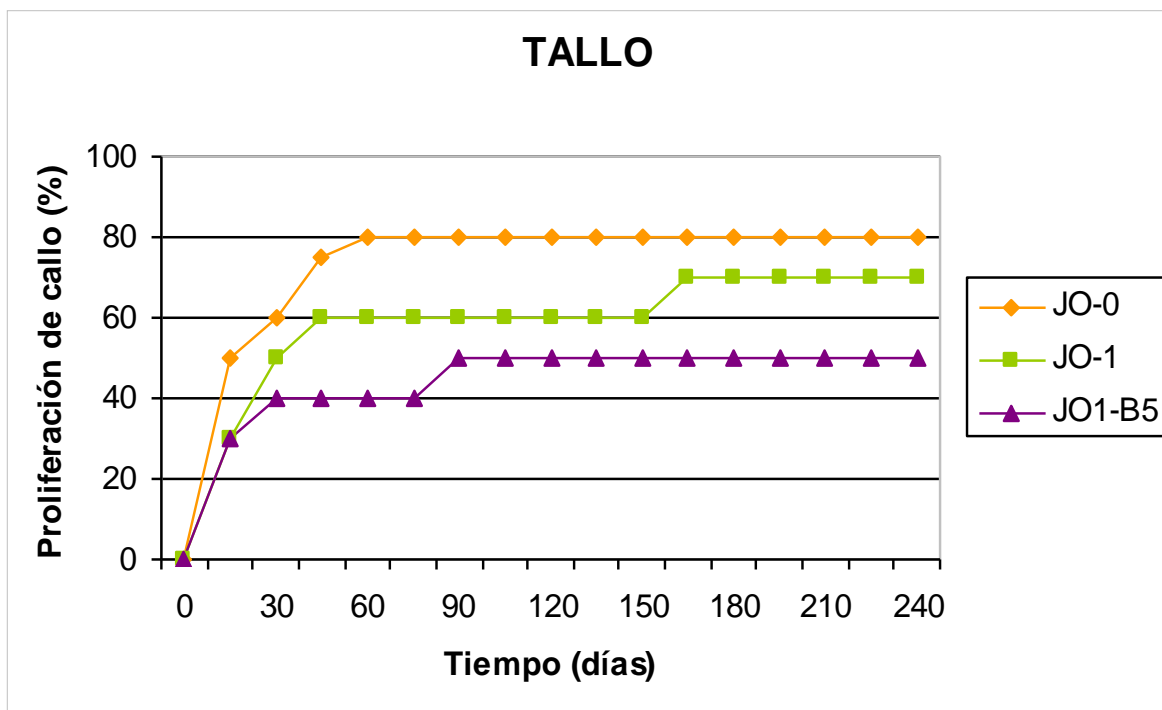


Fig. No. 11
 Proliferación de callo de hoja en diferentes medios, a los 60 días de siembra.
a. JO-0. **b.** JO-1. **c.** JO1-B5.

Tallo

Para el caso del explante tallo en el medio JO-0, a partir del día 60 de siembra hasta el día 165, muestra una proliferación de callo mayor que en el resto de los medios, obteniendo hasta un 80% de callo; el medio JO-1 presenta menos producción, seguido del medio JO1-B5 que presentó la proliferación más baja en el mismo período, como puede observar en la gráfica 9.



Gráfica No. 9. Inducción y proliferación de callo para tallo en tres diferentes medios nutritivos; JO-0, JO-1 y JO1-B5, a los 240 días.

En el tallo, los tres medios también producen callo, presentando diferencias significativas tanto en la proliferación, consistencia y color; ya que en JO-0 el desarrollo del callo fue abundante y friable, mostrando una coloración verde con partes blancas. Para JO-1, la producción de callo fue en menor cantidad, verde con mayores fracciones blanquesillas. Finalmente el medio JO1-B5, fue el que presentó menor proliferación de callo, con características particulares como que la mayor proporción es de color blanco y el resto verde, siendo un callo muy compacto (Ver Fig. No. 12).

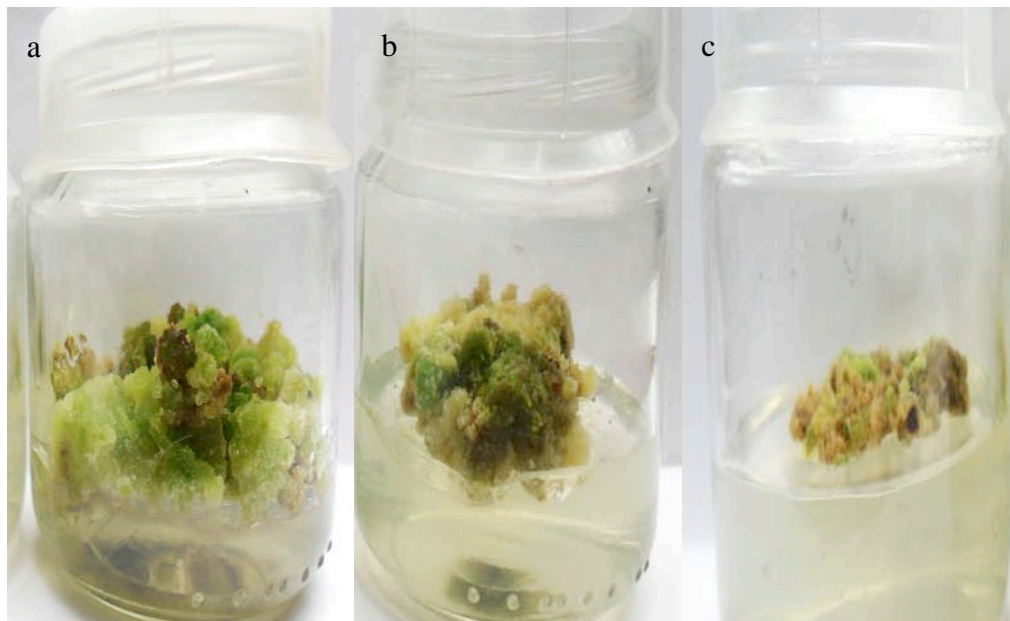
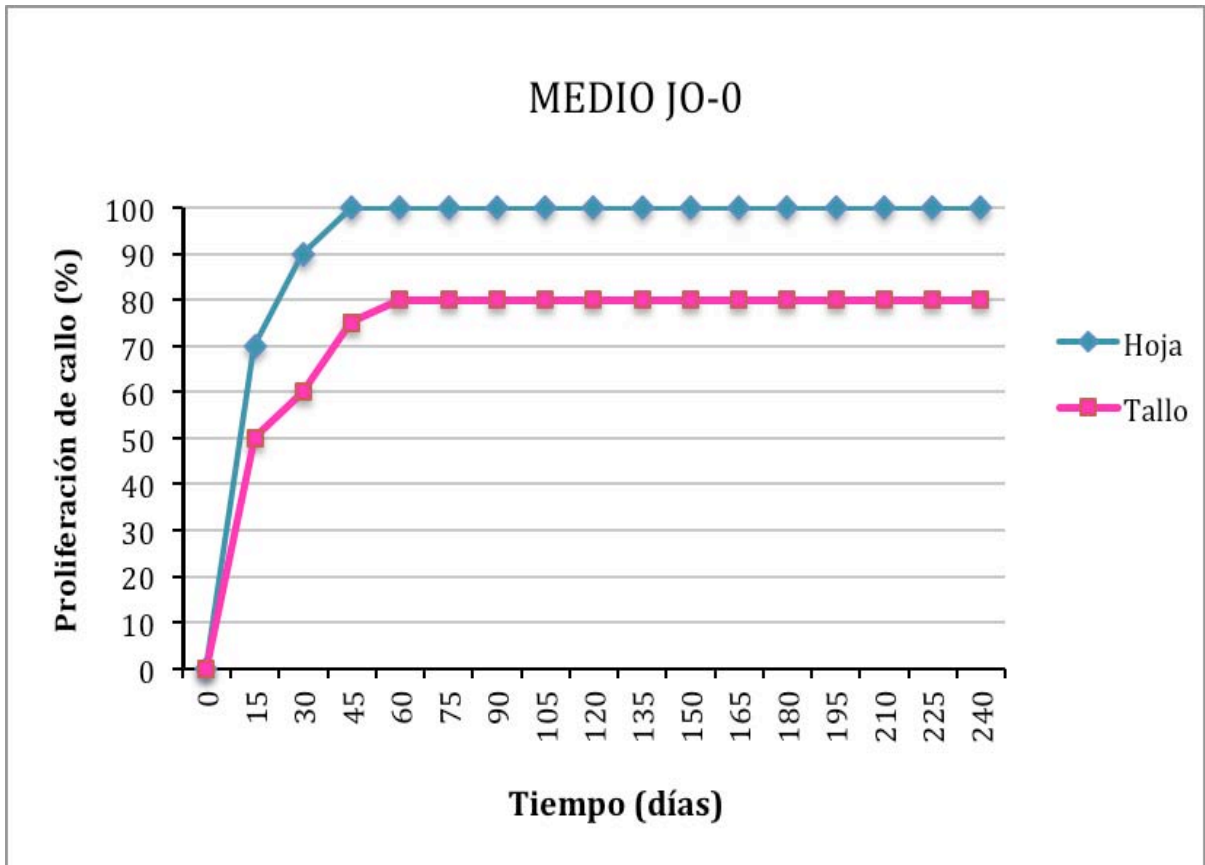


Fig. No. 12
Proliferación de callo, proveniente de tallos en diferentes medios a los 45 días de siembra.
a.JO-0.
b.JO-1
c.JO1-B5

Para ambos explantes el mejor medio de cultivo para la inducción y proliferación de callo fue el medio JO-0 (véase tabla 8). En la gráfica 10 se realiza la comparación de los porcentajes entre hoja y tallo durante 240 días (8 meses), donde se puede observar que el crecimiento del callo es similar, pues a los 60 días alcanzan su máxima proliferación como se puede observar en la figura No. 10, manteniéndose así hasta el último día de toma de datos.



Gráfica No. 10. Porcentajes de proliferación de callo en hoja y tallo en el medio nutritivo JO-0 a los 240 días

En la siguiente figura se muestra la comparación de la formación de callo en hoja (a) y en tallo (b) proliferados en el medio JO-0, quien mostró los mejores resultados para ambos explantes.

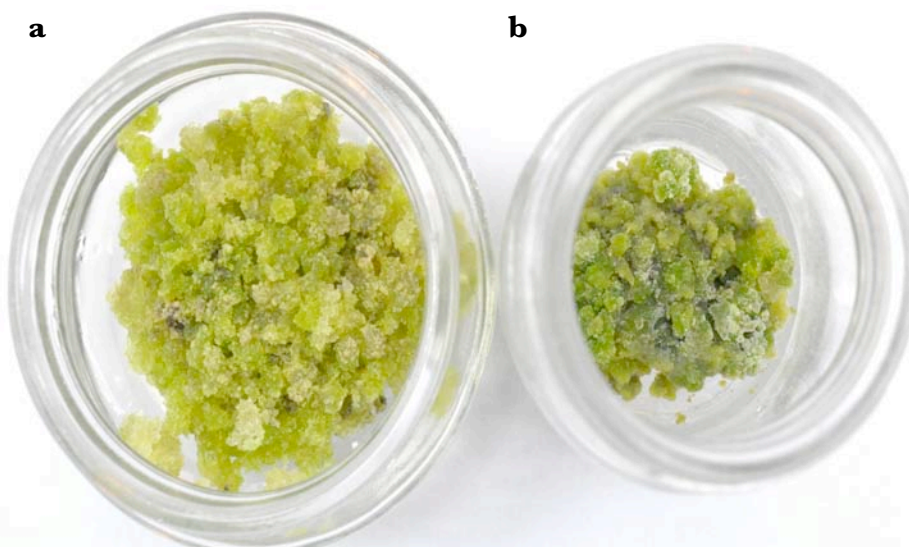
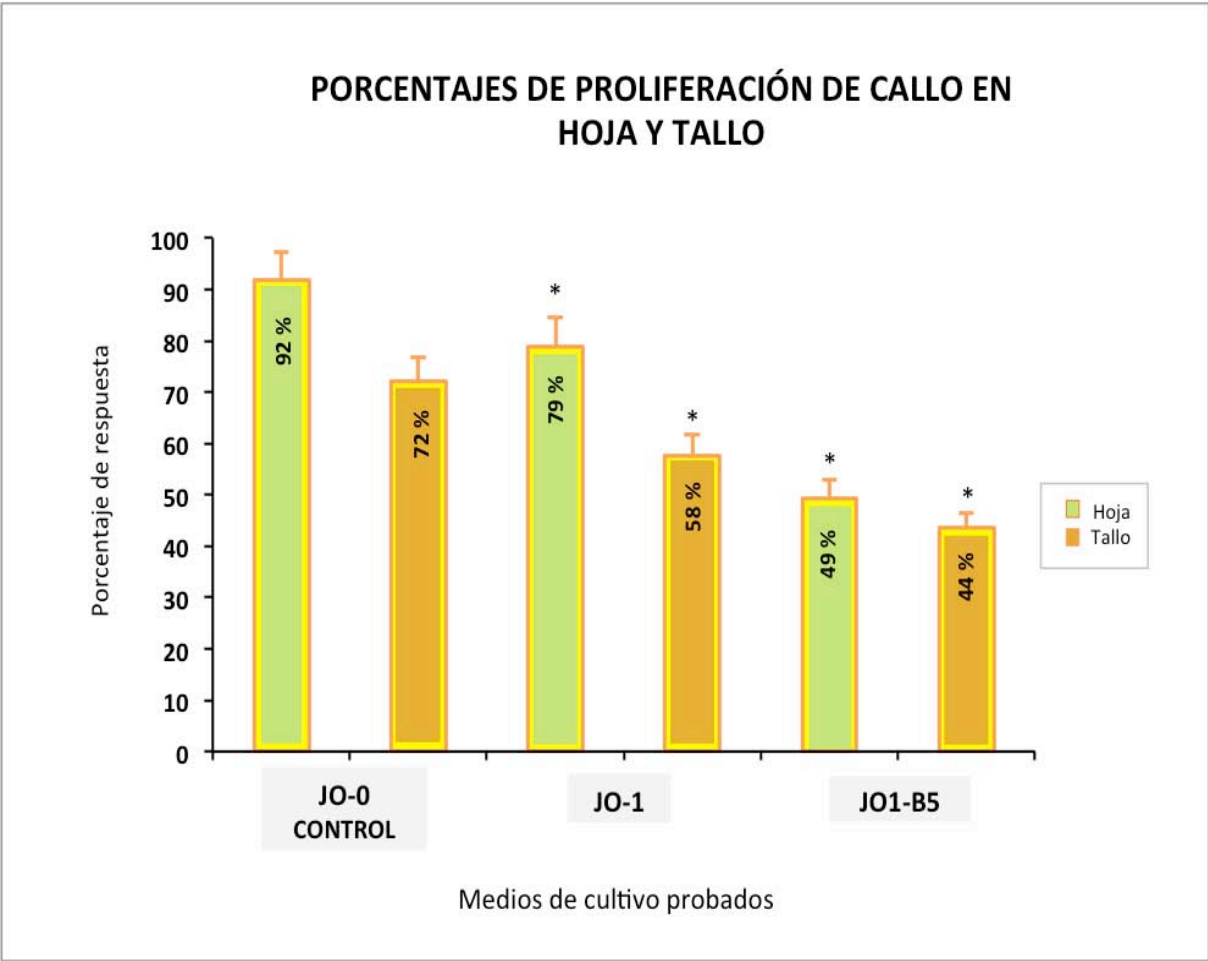


Fig. No. 13. Comparación de la proliferación de callo en el medio de cultivo JO-0 en los dos explantes probados, **a.**Hoja. **b.**Tallo, a los 60 días.

En la gráfica No. 11 se aprecia una comparación de los porcentajes de proliferación de callo en hoja y tallo, obtenidos en los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos a lo largo de 8 meses, los cuales presentan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tuckey-Kramer (véase tablas 13 y 14 del anexo). El mejor resultado lo presenta el explante hoja cultivada en el medio JO-0 alcanzando un 92%



Gráfica No.14. Porcentajes de control de oxidación para brotes provenientes de hoja y tallo, comparando el efecto antioxidante con PVP y Carbón activado a los 60 y 90 días, respectivamente. *Diferencias estadísticamente significativas.

4. FASE 4: Regeneración: multiplicación de brotes

a. Obtención de brotes en callo proveniente de hoja y tallo.

En esta fase se evaluó el tiempo en el que comienza la primera aparición de brotes y que medio fue el mas eficaz.

Los callos empleados para la regeneración, provenían de la fase anterior y se seleccionaron los que presentaron mejor calidad.

Una vez que los callos fueron sembrados en esta fase para su regeneración, en los agregados de callo comenzaron a observarse la presencia de estructuras diferentes a las células de callo, puesto que se identificaron los primordios foliares, siendo el medio JR1-a (véase tabla 9) el que propició las primeras formaciones tanto en callo de hoja, como callo de tallo, transcurridos los 4 y 10 días respectivamente, como se pueden observar en la fig. No. 14.

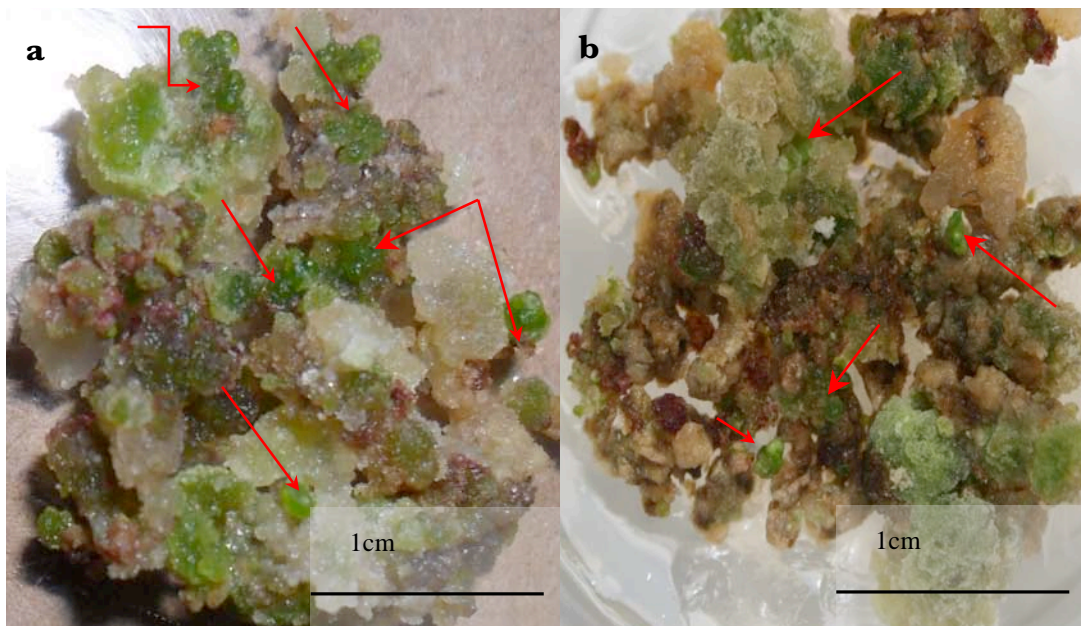
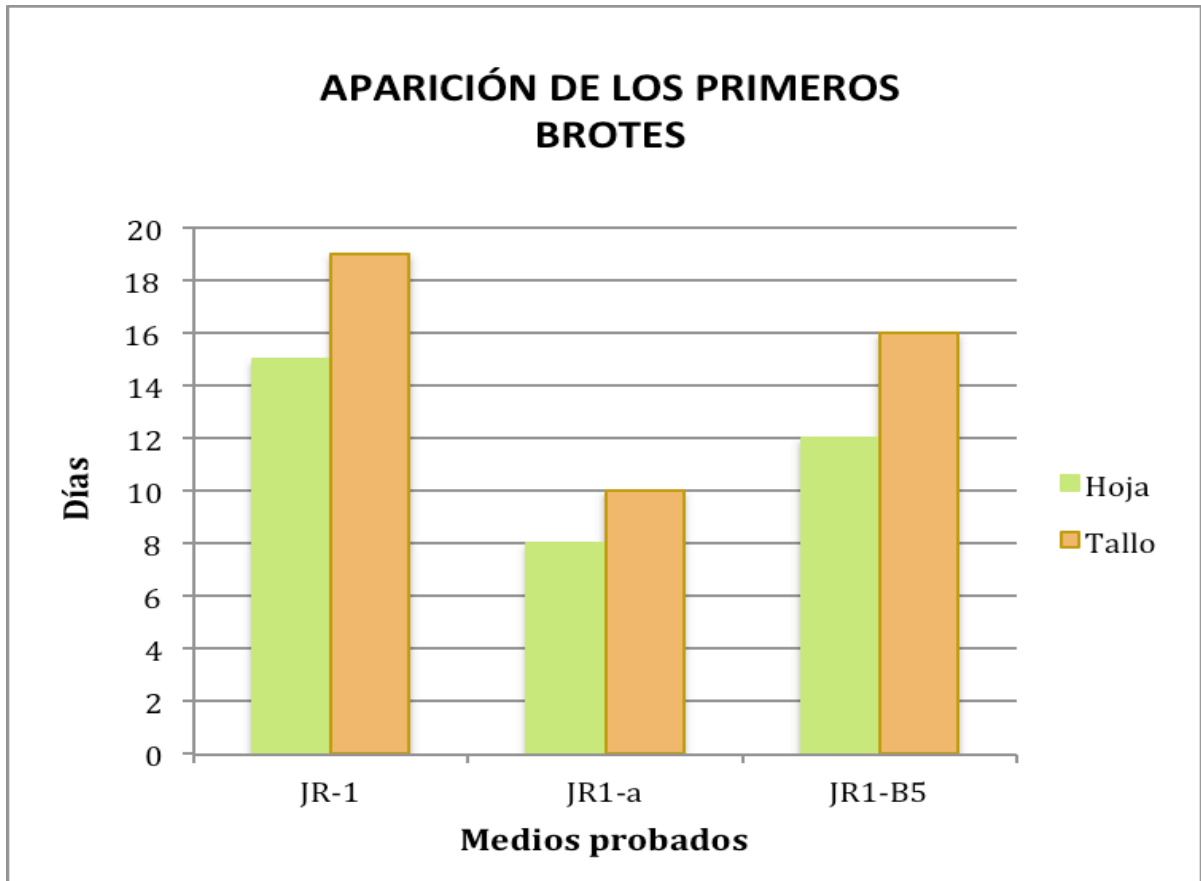


Fig. No 14. Formación de los primordios foliares en medio JR1-a en callo proveniente de: **a.** Hoja, a los 4 días. **b.** Tallo a los 7 días.

Como se muestra en la gráfica No. 12, el callo proveniente de hoja presenta los primeros brotes en el medio JR1-a en el día 8 después de su siembra, posteriormente en el medio JR1-B5 en el día 12 y finalmente para JR-1 en el día 15. Para el caso del callo de tallo, se observa que en el medio JR1-a, se presentan los primeros brotes en el día 19, en el caso del medio JR-1 en el día 10, y finalmente para JO1-B5 en el día 16.



Gráfica No. 12. Aparición de los primeros brotes en los tres diferentes medios nutritivos JR-1, JR1-a, JR1-B5, para los dos explantes probados (hoja y tallo).

En la siguiente figura se muestra la formación de los primeros brotes en callo de hoja (a) y tallo (b) a los 8 y 10 días respectivamente, cultivados en medio JR-1 quien mostró los mejores resultados para ambos explantes.

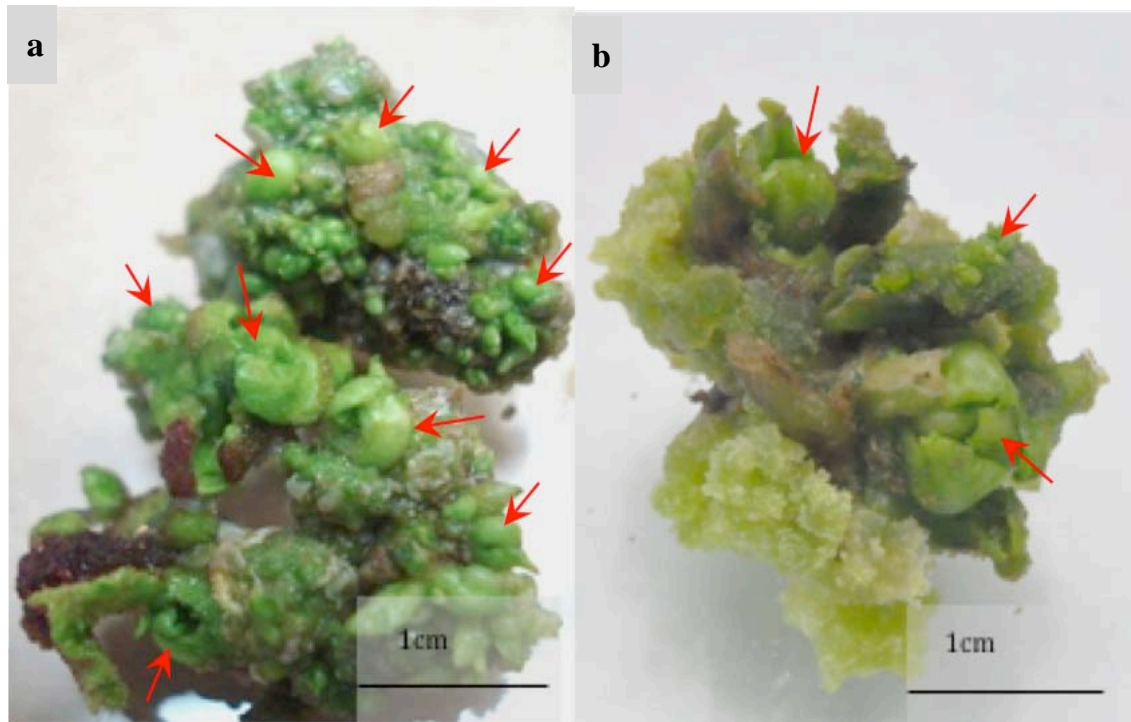
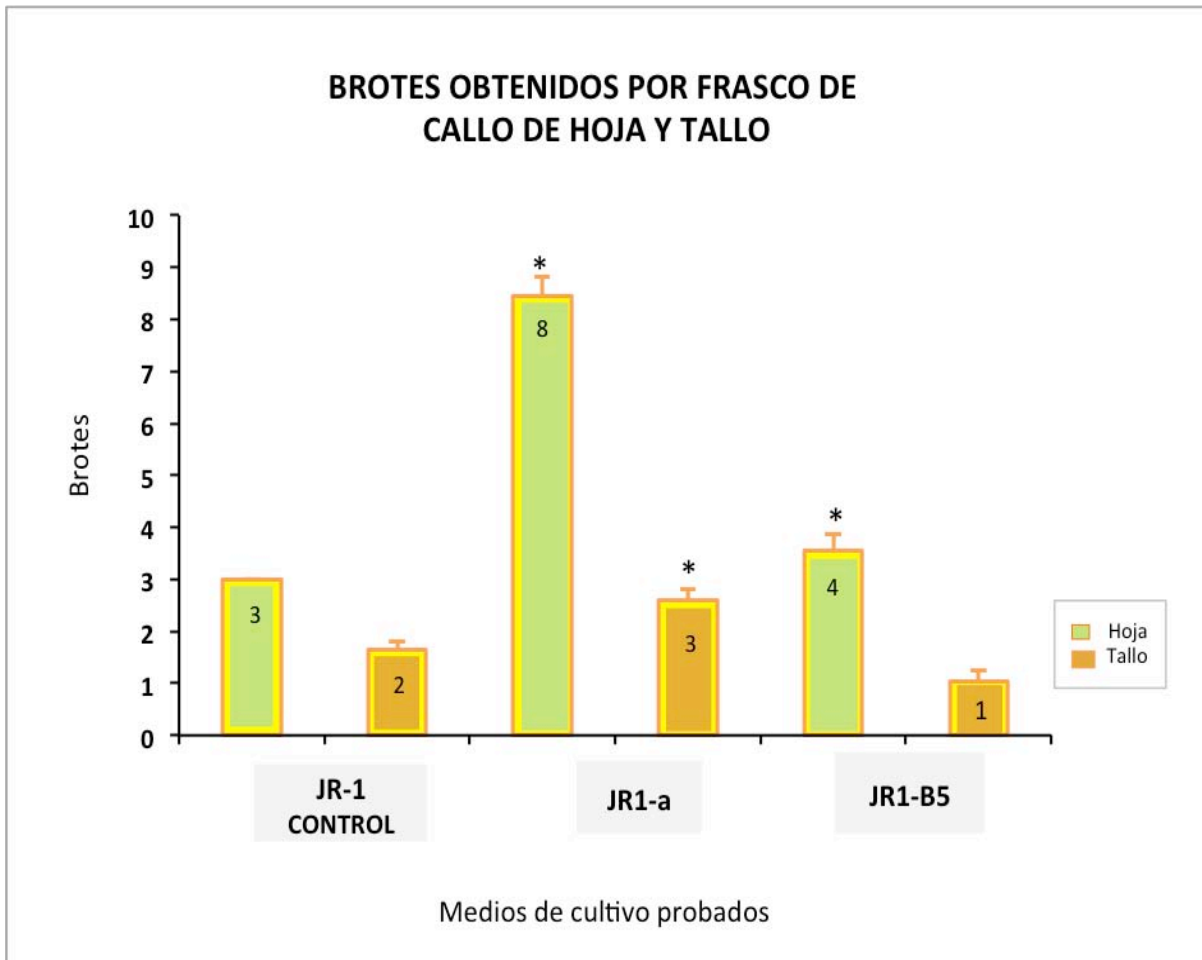


Fig. No 15. Aparición de los primeros brotes en el medio de cultivo JR1-a en callo proveniente de: **a.** Hoja a los 8 días y **b.** Tallo a los 10 días.

Para obtener el número de brotes, se realizaron 20 repeticiones por cada tratamiento, es decir, se sembró callo de hoja y tallo en 20 frascos pequeños con un diámetro de 7cm de longitud x 3.5cm de diámetro. A los 30 días de siembra se registró el número de brotes por frasco que alcanzaban una longitud de 1 a 2 cm, y se calculó el promedio para cada tratamiento tanto en callos de hoja como de tallo.

El mayor número de brotes se produjo en callo de hoja cultivado en JR1-a; por lo que se determinó que el medio JR1-a propició una mayor multiplicación de brotes para hoja y tallo como lo demuestra la prueba de Tuckey-Kramer (véase tablas 13-18 del anexo), que hace evidente las diferencias entre los medios de cultivo para ambos explantes; puesto que en hoja se produjeron un promedio de $8.45 = 8$ brotes por repetición y para tallo un promedio de $2.6 = 3$ brotes por repetición, estos resultados se pueden observar en la gráfica No. 13. Cabe destacar que en este período se comienza a hacer evidente la oxidación de callo y brotes para ambos explantes (véase figura No. 16 a y b).

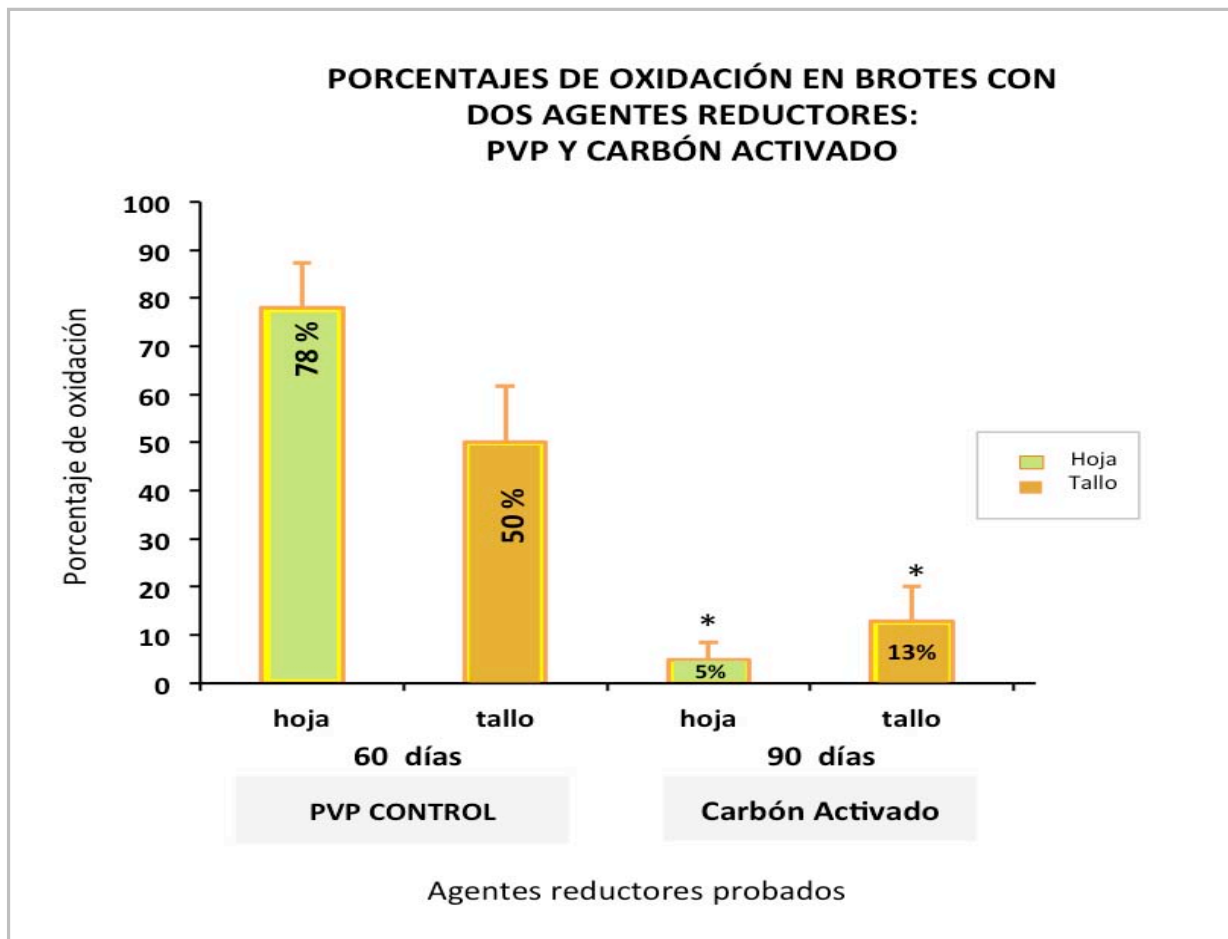


Gráfica No.13. Número de brotes obtenidos por frasco de callo en hoja y tallo, a los 30 días de siembra. *Diferencias estadísticamente significativas.

b. Oxidación.

Uno de los inconvenientes que se presentó en esta fase fue la oxidación. Un problema excesivamente drástico ya que limitó la multiplicación de los brotes y propició su mortandad, considerando que en tan solo 1 mes (del día 30 al 60 de siembra), se perdió el 78% de brotes provenientes de callo de hoja y para tallo el 50%, usando como antioxidante el PVP (Polivinilpirrolidona) para ambos casos. Posteriormente durante 1 mes mas (del día 60 al 90 de siembra), se usó carbón activado debido a que no se pudo combatir la oxidación con el agente anterior, teniendo resultados más satisfactorios ya que los brotes provenientes de ambos explantes presentaron una menor oxidación, un 5% y 22% para hoja y tallo respectivamente, dichos resultados se pueden apreciar en la gráfica 14 y la fig. No. 16; por lo tanto se puede determinar que el mejor agente reductor para prevenir y/o controlar la oxidación es el carbón activado confirmado con la prueba de Tucke-Kramer (véase tabla 15-18 del anexo).

Los porcentajes se obtuvieron promediando el número de brotes obtenidos en los 3 medios de cultivo tanto para callo de hoja y tallo.



Gráfica No.14. Porcentajes de control de oxidación para brotes provenientes de hoja y tallo, comparando el efecto antioxidante con PVP y Carbón activado a los 60 y 90 días, respectivamente. *Diferencias estadísticamente significativas.

En la siguiente imagen se observa el control de oxidación en brotes de *Jatropha curcas* en medio JR1-a, y los agentes empleados para combatirla, comparando resultados en callo de hoja y tallo. Figura 16 a para hoja y figura 16 b para tallo, se ve la formación de los brotes sobre agregados de callo de apariencia compacta que comienzan a oxidarse a los 30 días, donde destaca la presencia de mayor oxidación en tallo. Figura 16 c y d, se muestran brotes ya individualizados de 1 y 2 cm de longitud a los 60 días de siembra, provenientes de callo de hoja y tallo respectivamente, donde se utilizó como agente antioxidante al PVP, el cual no fue efectivo pues se hace evidente que la oxidación sigue invadiendo a todos los explantes hasta provocar su muerte. En la Figura 16 e y f, a los 75 días de cultivados, se observa la respuesta favorable de los brotes de hoja (e) y tallo (f), en medios suplementados con carbón activado, ya que se puede apreciar que la oxidación desaparece por completo y los brotes de 2 cm continúan con su desarrollo presentado tallos ya formados y algunas hojas completas, cabe mencionar que se tuvo una mayor cantidad de brotes en los provenientes del explante hoja. Figura 16 g y h, muestra a los brotes de callo de hoja (g) y tallo (h) de 3 cm a los 90 días de siembra

desarrollándose favorablemente, puesto que se observan vigorosos con un buen crecimiento y la formación de todas las hojas completas, por tanto se determinó que el carbón activado es el agente idóneo para combatir la oxidación.

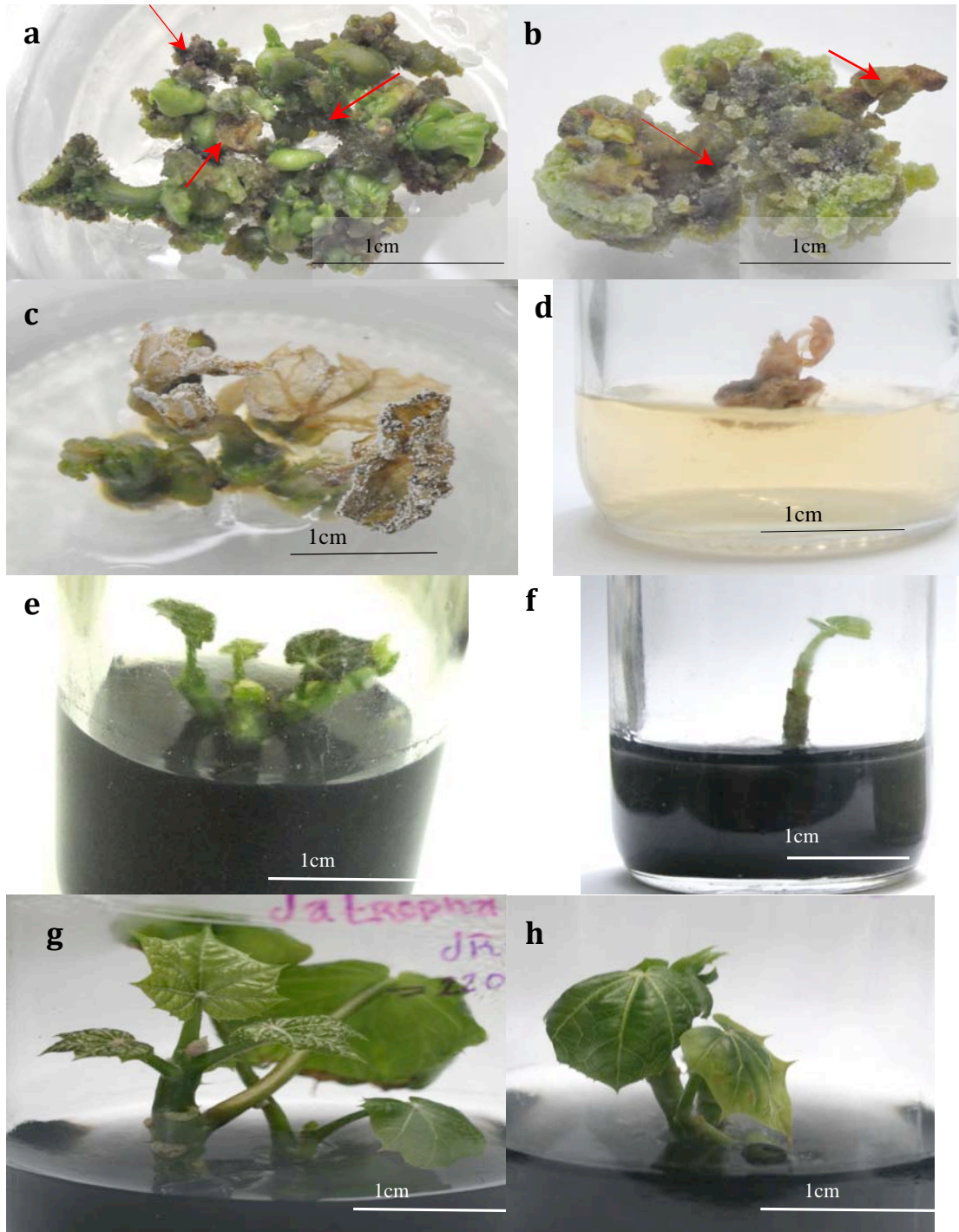


Fig. No. 16. Control de oxidación en brotes de *J. Curcas* cultivados en medio JR1-a. **a.** y **b.** A los 30 días comienza la oxidación en callo y brotes de hoja y tallo respectivamente. **c.** En hoja y **d.** En tallo, medios de cultivo adicionados con PVP a los 60 días. **e.** En hoja y **f.** En tallo, medios suplementados con carbón activado a los 75 días. **g.** y **h.** A los 90 días desarrollo de brotes.

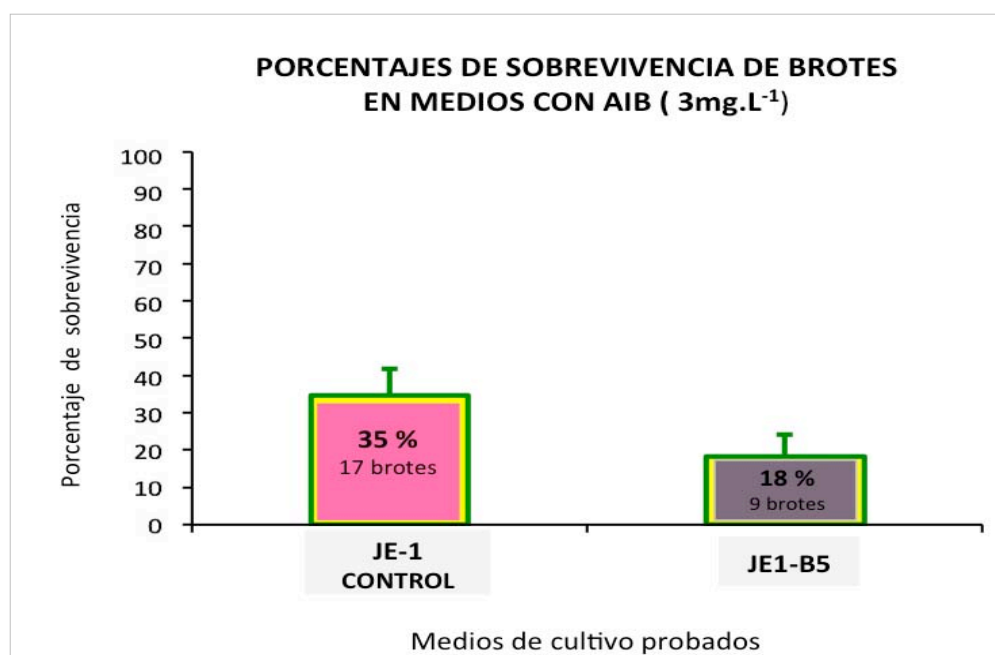
FASE 5: Crecimiento, desarrollo y enraizamiento.

Debido a que en la fase anterior la pérdida del material vegetal fue considerable, se decidió dividir los brotes que continuaban vivos en dos grupos: 1) los brotes regenerados en los tres medios de cultivo de callo de hoja, y 2) los brotes regenerados en los tres medios de cultivo de callo de tallo. En total se obtuvieron 98 brotes listos para su desarrollo, estos se sometieron a 4 etapas para lograr plántulas completas. Se evaluó el número de individuos que sobrevivieron en cada fase, desde la inducción para la formación de raíces, el pase a sustrato estéril y una pre-aclimatización antes del trasplante ex vitro.

a. Primera etapa:

En esta primera etapa los 98 brotes de 3 cm de longitud aproximadamente, se sembraron en dos medios: 49 en JE-1 y 49 en JE1-B5, siendo la única diferencia la composición de los nutrimentos minerales (véase tabla 10), ya que ambos se suplementaron con la auxina AIB con el objetivo de formar raíces.

A los 30 días de cultivados los brotes, alcanzaron una longitud de 4 cm, y se observó una pérdida por oxidación del material vegetal, donde el porcentaje de sobrevivencia fue mayor en el medio JE-1 con un 34.69% (17 individuos) y para el JE1-B5 tan solo del 18.36% (9 individuos), dichos resultados se pueden observar en la gráfica No. 15; sin embargo la prueba de Tuckey-Kramer expone que no hay diferencias entre los medios de cultivo, esto debido a que el valor de la media es similar para ambos: 74 para JE-1 y 61 para JE1-B5 como se aprecia en la tabla 19 del anexo.



Gráfica No.15. Porcentaje de sobrevivencia de brotes cultivados en dos medios de nutritivos suplementados con 3mg L⁻¹ de AIB para su enraizamiento a los 30 días. *Diferencias estadísticamente significativas.

Los brotes que sobrevivieron no lograron su crecimiento, contrariamente a lo que se esperaba sus hojas comenzaron a caer y ocurrió un evento muy particular, alrededor del brote comenzó a proliferar un poco de callo, limitando así su desarrollo como se puede apreciar en la fig 17.

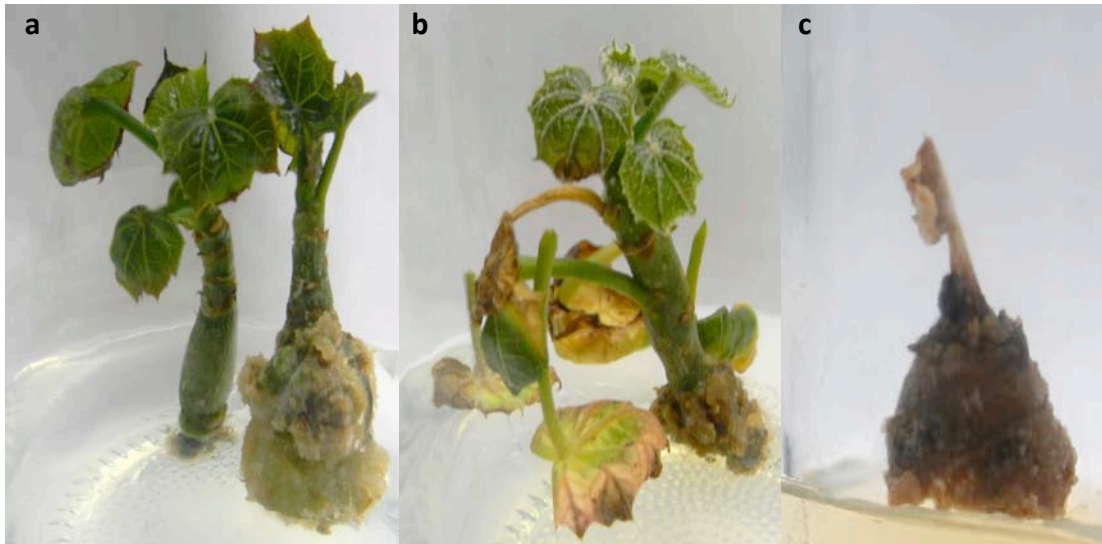


Fig. No. 17. Primera etapa del crecimiento y enraizamiento. Brotes de *J. curcas* sembrados en medio JE-1 **a)** Proliferación de callo alrededor del brote de 4 cm a los 10 días de cultivados. **b)** A los 18 días, las hojas se oxidan y comienzan a caer. **c)** Muerte a los 30 días.

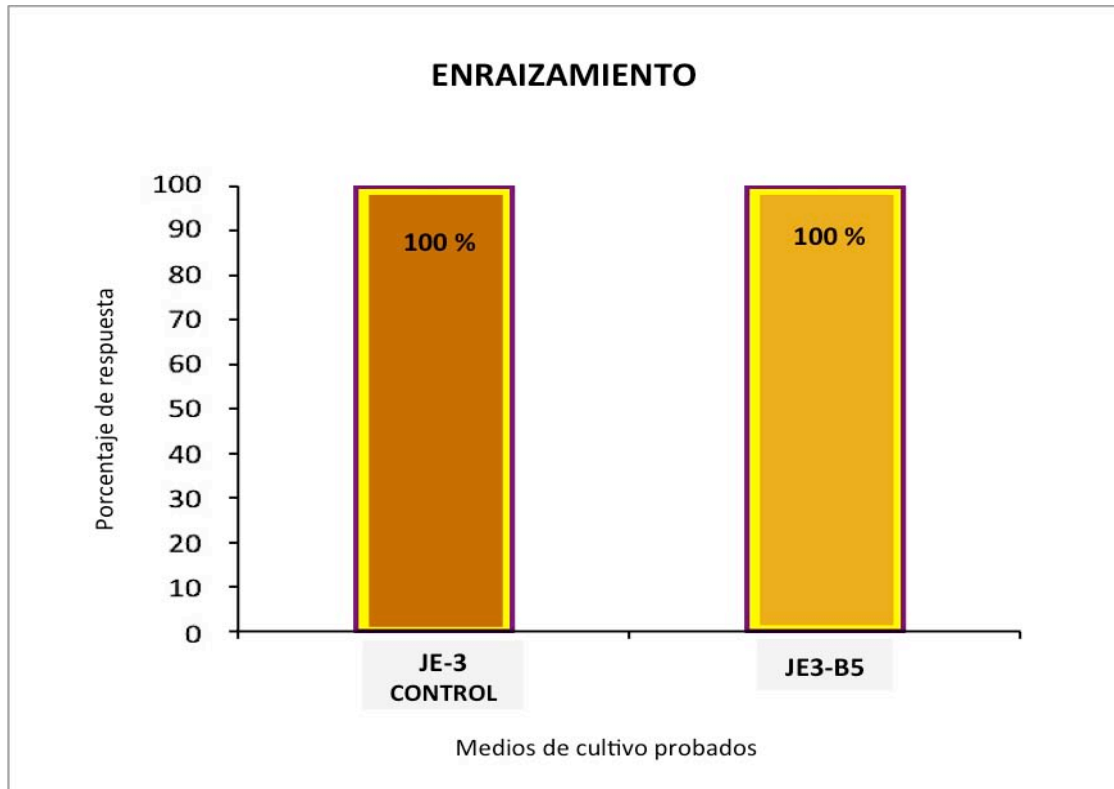
b. Segunda etapa:

Debido a que la primera etapa no fue exitosa por los resultados antes mostrados, se dió paso a una segunda, donde la estrategia fue provocar un pulso con la misma auxina AIB en una solución al doble de concentración que la etapa anterior (6 mg.L^{-1}) y manteniendo el resto de la composición nutrimental de los medios, ahora líquidos: JE-2 y JE2-B5, dejando sumergidos los 26 individuos de 4 cm, durante 3 horas en condiciones estériles (fig. 18b).

Antes de someter los brotes al pulso, se les retiró la formación de callo con ayuda del bisturí en la campana de flujo laminar.

c. Tercera etapa:

Una vez pasado el tiempo del pulso, inmediatamente se sembraron en dos medios de cultivo libres de reguladores de crecimiento, 17 brotes en JE-3 y 9 en JE3-B5. En la gráfica No. 16 se puede apreciar que ambos medios de cultivo propiciaron la formación de raíces, sin tener diferencias estadísticas como lo demuestra la prueba de Tuckey-Kramen (véase tabla 20 del anexo); sin embargo JE-3 resultó el más eficiente por ser el medio de cultivo donde se presentan en menor tiempo la presencia de raíces y en una mayor cantidad de brotes, quienes alcanzan una longitud de 4.5 cm (Ver Fig. No. 18c).



Gráfica No. 16. Número de brotes enraizados en dos medios nutritivos: JE-3 y JE3-B5, sin adición de reguladores de crecimiento a los 28 días.

d. Cuarta etapa:

Con la finalidad de facilitar el pase *ex vitro* y obtener el mayor número de plantas aclimatizadas en condiciones de invernadero, las 26 plantas de 4.5 cm aproximadamente, ya con raíces, se sometieron a una pre-aclimatización en condiciones *in vitro*.

Durante el primer mes murieron 3 plantas, debido a que apareció una pequeña formación de hongo que invadió sus raíces y no se pudo detener su contaminación, a pesar de que se regaron constantemente con una solución estéril de Benomil® (fungicida) 5 g.L⁻¹. En este tiempo las plantas lograron crecer entre 6 y 6.5 cm y algunas de sus hojas cayeron, sin embargo se pudo apreciar la brotación de nuevas hojas (véase figura 18 d).

En este último período (del día 51 al 60), las 23 plantas ya presentaron una adaptación, pues alcanzaron un crecimiento de 8 a 10 cm de longitud, por lo que fue necesario subcultivar las plantas en frascos de 18 cm de longitud x 8 cm de diámetro conteniendo el mismo sustrato estéril para seguir propiciando su crecimiento como se puede apreciar en la figura 18d. Es importante mencionar que en la pre aclimatización no hubo diferencias en el desarrollo y crecimiento de las plantas provenientes de los dos diferentes medios.

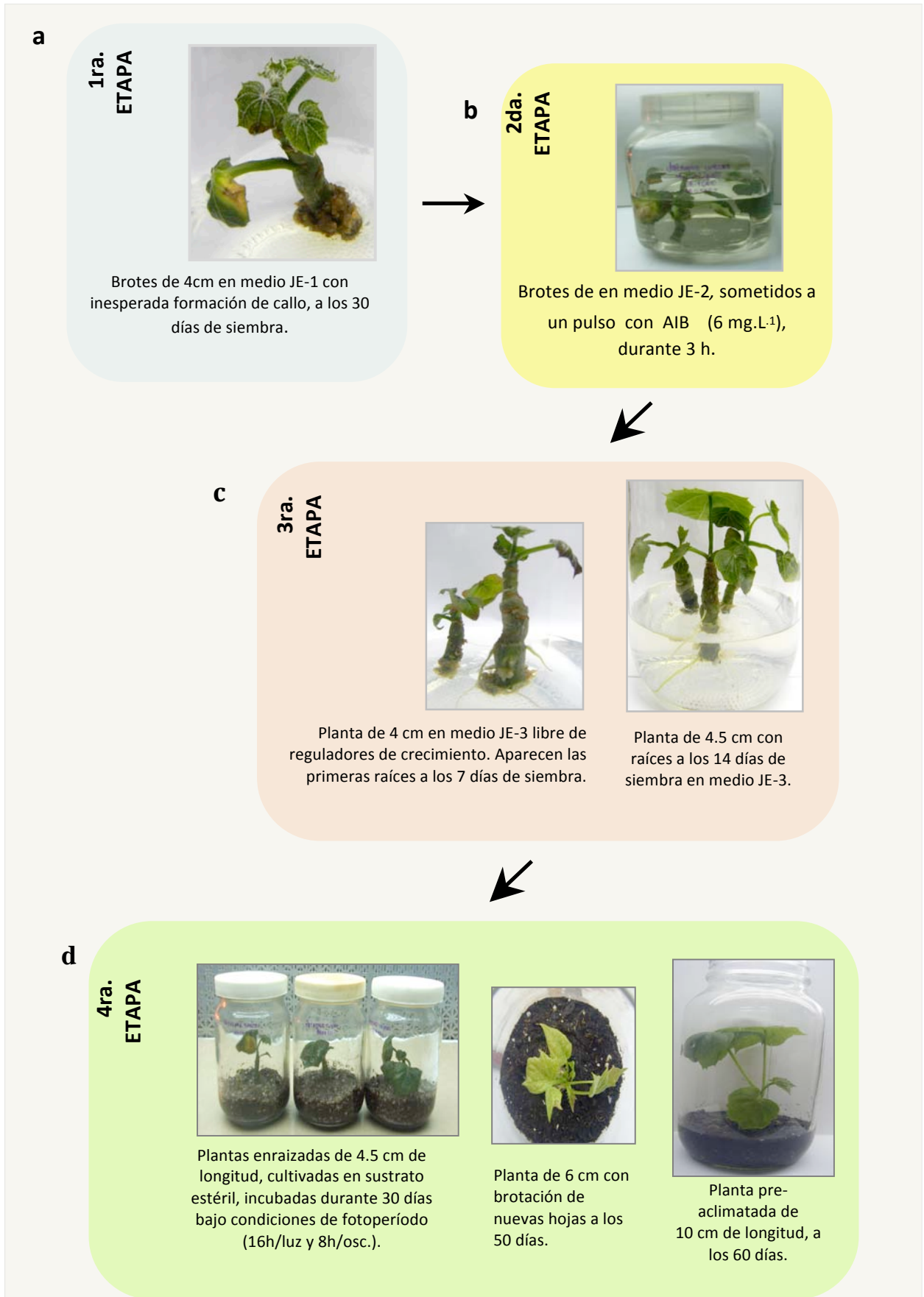


Fig. No. 18. Crecimiento, desarrollo y enraizamiento de brotes de *J. curca*. **a)** Proliferación de callo alrededor del brote. **b)** Pulso con AIB. **c)** Enraizamiento. **d)** Pre-aclimatización.

6. FASE 6:TRANSPLANTE *ex vitro*

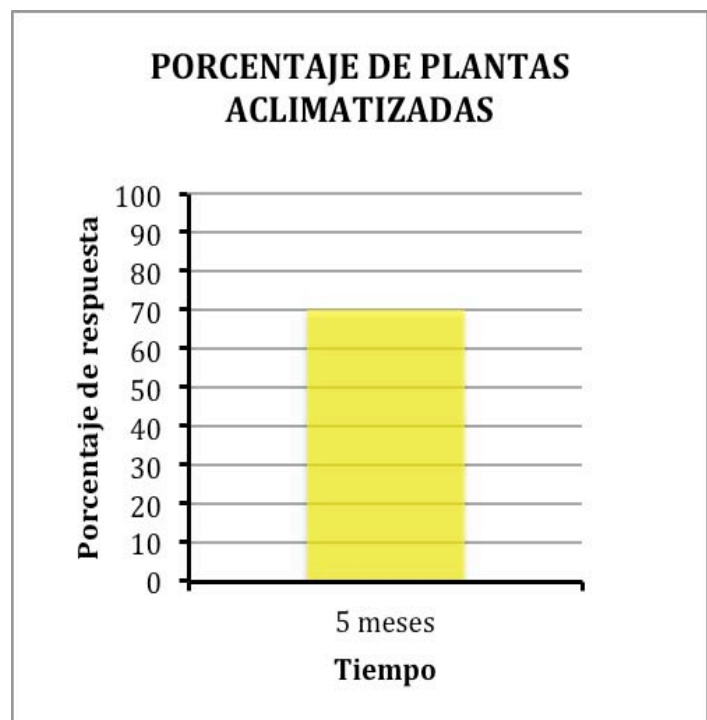
Para efectuar el transplante *ex vitro* se emplearon plántulas pre-aclimatizadas de 8 a 10 cm de longitud, con la formación de al menos una raíz adventicia de 3 a 4 cm de longitud.

Las plantas se sacaron de los frascos con ayuda de una pinza larga estéril y se sembraron las 23 plantas en cada maceta y se mantuvieron en condiciones de invernadero.

Una vez que se realizó el transplante *ex vitro*, las plantas comenzaron a presentar una deshidratación, por lo que durante el primer mes se regaron cada 2 días. Este primer mes fue crucial para las plantas, pues al someterlas al ambiente natural del invernadero comenzaron a debilitarse y en algunos casos sus hojas se marchitaron hasta provocar la muerte de toda la planta, pues no lograron sobrevivir 7 plantas en este primer mes como se puede apreciar en la figura 19 a.

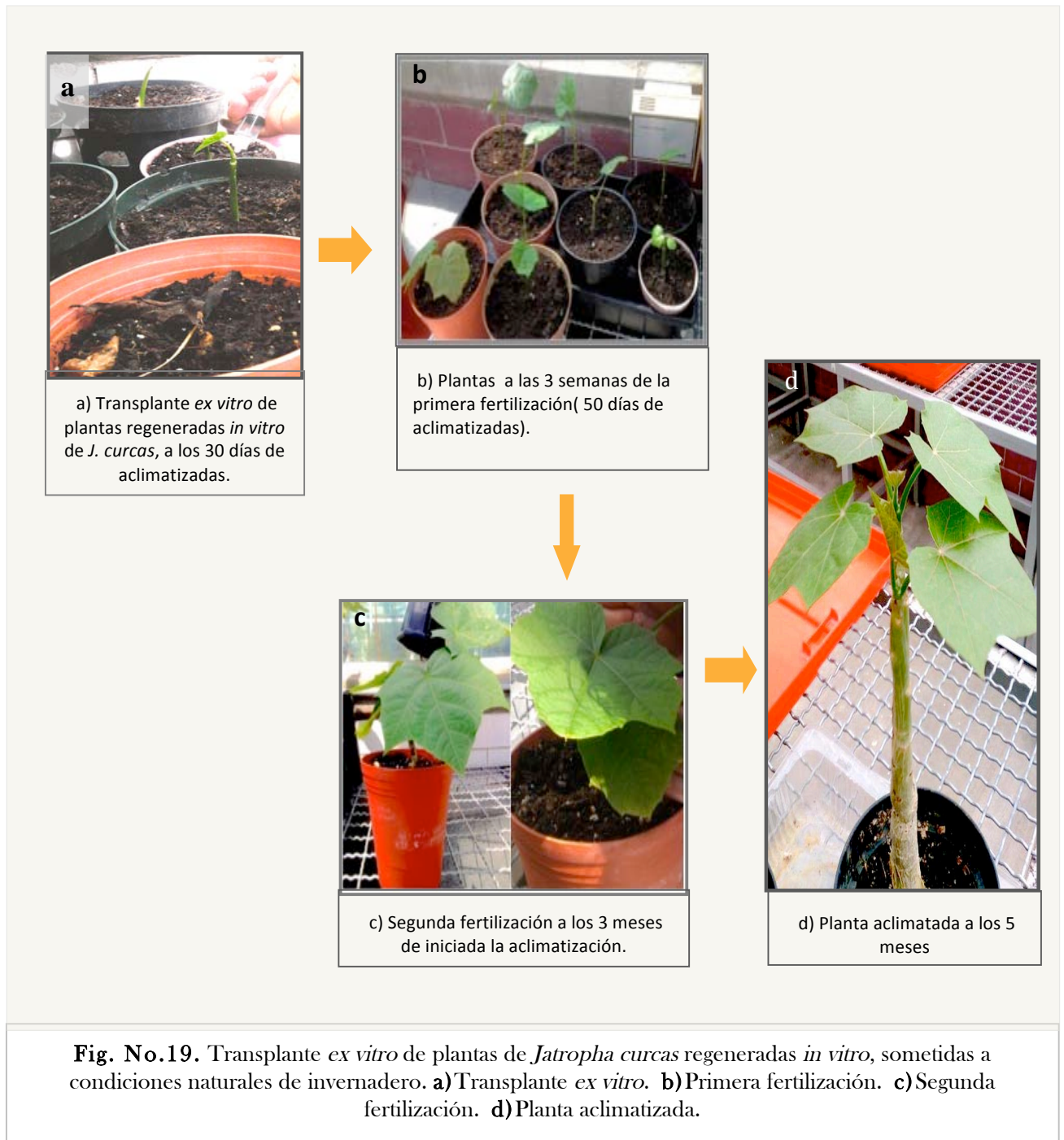
Cumplido el primer mes se realizó una primera fertilización utilizando sales inorgánicas MS (Murasighe y Skoog, 1962) a una concentración del 50%, con la finalidad de promover el desarrollo y crecimiento de las plantas, pues se encontraban delicadas y con muy pocas hojas, sin embargo se observó un tallo fuerte y el nacimiento de brotes funcionales. Esta fertilización favoreció rápidamente a la evolución de la planta puesto que en tan solo 3 semanas de fertilizadas se percibieron vigorosas (véase figura No. 19 b), y lograron sobrevivir. A los 3 meses de iniciada la aclimatización se realizó una segunda fertilización utilizando la misma concentración de sales que en la primera (véase figura 19 c),

Se tomó como parámetro para evaluar la adaptación de las plantas en condiciones *in vivo* un tiempo 5 de meses, observando su desarrollo y las plantas que en este lapso de tiempo lograron sobrevivir se consideraron aclimatizadas. Las plantas adaptadas mostraron un buen crecimiento, puesto que alcanzaron una longitud entre 18cm y 22cm como se aprecia en la figura No. 19 d. Finalmente el porcentaje de aclimatización fue del 70% como se observa en la gráfica No.17.



Gráfica No.17. Porcentaje de plantas *in vitro* aclimatizadas bajo condiciones de invernadero, a los 5 meses.

En la siguiente figura se muestra la aclimatización de las plantas de *Jatropha curcas*, durante 5 meses en condiciones de invernadero de la Facultad de Química en el conjunto E, UNAM.



1. FASE 1: Tratamientos de desinfección

El paso inicial para un proceso de regeneración *in vitro* es obtener un cultivo aséptico del material vegetal (George y Sherrington, 1984), por lo que de acuerdo con Ramírez-Malagon *et al.*, (2007), la combinación de diferentes productos para la desinfección, tales como el uso de hipoclorito de calcio e hipoclorito de sodio y fungicidas proveen un confiable sistema de desinfección.

En el trabajo realizado por Nunes (2007), en la desinfección de las semillas de *Jatropha* se utilizó etanol al 70% durante 30 segundos así como hipoclorito de sodio al 1% durante 15 minutos, en este trabajo no se reporta los tipos de agentes infectantes, aunque se menciona que obtuvieron un 40% de plantas. En otro trabajo similar (López *et al.*, 2007), se utilizó una concentración de 0,5% de hipoclorito de calcio por 5, 10 y 15 minutos, sin embargo hubo una contaminación del 45%. En el presente trabajo, las semillas fueron sometidas a etanol al 70% por 1 min en combinación con una solución de hipoclorito de sodio al 15% más tritón 100 y Microdyn® por 15 minutos y 2 agentes más (Benomil y Agrimicin), nombrado como T1 y T2, donde únicamente se utilizó H₂SO₄ concentrado, obteniendo resultados bastante alentadores y confiables, pues en ninguno de los casos se presentó contaminación en las semillas.

Sin embargo aunque son confiables estos sistemas no siempre se logra obtener el 100% de asepsia en los cultivos, ya sea por la manipulación de los tejidos, la concentración y/o el tiempo de desinfección inadecuados, la morfología de la planta. Ya que la desinfección llevada a cabo para las inflorescencias de *Jatropha curcas*, resultó ser un proceso bastante largo, y con enormes dificultades para eliminar los patógenos (bacterias y hongos), provenientes del interior de cada botón floral, así como su complicación desde la recolecta de este material biológico hasta su traslado a las instalaciones de la UNAM, que proporcionaron que estos agentes se intensificaran durante el viaje, además de que el tejido vegetal también se dañó y no fue tan resistente al tratamiento T1 y T2 (véase tabla 5), y no se tuvo éxito en la desinfección en ninguno. Es importante mencionar que no existe bibliografía donde se reporte la desinfección de las inflorescencias. Debido a estos inconvenientes se decidió aplicar los tratamientos inmediatamente que se recolectaron, en el laboratorio del CENVyTT Nayarit. De acuerdo con los resultados obtenidos, el mejor tratamiento de desinfección para botones florales fue el T10, aunque no se obtuvo al 100%, se demostró que a menor concentración y mayor tiempo de exposición a los agentes químicos como el hipoclorito de sodio, Benomil® y Agrimicin®, así como la adición de un antibiótico (Cefotaxima®), un antifúngico (Nistatina) y antioxidante (Sol. de ác. cítrico/ác. ascórbico y PVP) al medio de cultivo y finalmente descartar soluciones de detergentes comerciales que ocasionaron la oxidación y necrosis del tejido vegetal, permitieron la completa y considerable eliminación de bacterias y hongos, respectivamente.

Como ya se mencionó previamente, lo anterior se debe a factores físicos y químicos tales como la agitación, adición de los agentes desinfectantes, adición de antibióticos y antioxidantes, tanto en el proceso de desinfección como en el medio de cultivo, tienen efectos determinantes e intensos en todas las funcionalidades de los microorganismos.

Alvarado (1988), advierte que los contaminantes más frecuentes en el cultivo *in vitro* son hongos filamentosos y bacterias. Muchos de éstos no provocan daños a las plantas en campo, sin embargo, se convierten en patógenos en condiciones *in vitro*, como ocurrió en los botones florales de *Jatropha curcas*. A diferencia de los hongos filamentosos y las levaduras, las bacterias no producen crecimiento visible sobre el medio o síntomas en la planta, si no hasta tiempo después de que fueron introducidas; en los botones florales, tanto hongos como bacterias se expresaron entre los 3 a 5 días, después de la siembra en el medio de cultivo.

George y Sherrington (1984), recomiendan que antes de la desinfección, se debe realizar un lavado con agua, eliminar la capa más externa, para facilitar la entrada de las soluciones químicas, razón por la cual se realizó la escarificación mecánica de las semillas en los tratamientos 1 y 2, obteniendo una exitosa eliminación de patógenos. Estos mismos autores también refieren que la imbibición en etanol como aséptico elimina el aire y disuelve la capa epicuticular de los tejidos, ejerciendo un efecto en efecto en la permeabilidad, desorganizando la posición ordenada de lípidos y proteínas que componen las membranas y alteran la función de éstas, lográndose la inhibición de la actividad de muchos organismos, aún cuando no se eliminan totalmente, por ello se tiene que recurrir a agentes desinfectantes. En el caso de las semillas y los botones florales tratados en este trabajo, el baño de etanol al 70% por 1 minuto fue idóneo para desorganizar las capas de lípidos y permitir el contacto con del resto de los agentes químicos.

El hipoclorito de sodio (NaClO_2 20%, 5% y 2%), se utilizó como agente desinfectante, ya que actúa sobre proteínas y ácidos nucleicos, eliminando hongos, bacterias y esporas (www.microbiologia.com.ar); este agente se empleó únicamente para los botones florales en diferentes concentraciones y a diferentes tiempos, con la finalidad de evitar la contaminación. Se realizó una solución, adicionando al hipoclorito de sodio plata coloidal Microdyn® (10 gotas en 25 ml. de agua), el cual contiene partículas que permanecen suspendidas, que al reaccionar con grupos SH de las proteínas funcionales y estructurales de las células bacterianas, inhiben la respiración, logrando así matar a las bacterias (www.mantra.com.ar y www.healthfraud.org). También se agregó el Tween 20® (agente surfactante), con una concentración de 20 gotas en 250 ml de agua, el cual actuó en la disminución de la tensión superficial, permitiendo la penetración de las otras sustancias desinfectantes, eliminando las ceras de las plantas (George y Sherrington 1984; Pierik, 1990 y Uribe, 1998). En los tratamientos realizados en este trabajo se demostró que gracias a esta combinación, se eliminaron la mayoría de microorganismos (semillas), aunque no en su totalidad (botones florales).

Para lograr la asepsia total, algunos autores recomiendan el uso de bactericidas y fungicidas, en tiempos prolongados. George y Sherrington (1984), emplean desinfectantes útiles en la eliminación de patógenos elaborados a base de bactericidas, como es el caso de Agri-mycin 500®, el cual está compuesto por antibióticos como sulfato de estreptomina, clorhidrato de oxitetraciclina y sulfato tribásico de cobre monohidratado, siendo muy importantes para eliminación de dichas bacterias; en este estudio se probó en la misma concentración (4g L^{-1}), aunque por diferentes tiempos. Se observó que en el tratamiento 9 y 10, al aumentar el tiempo de exposición, disminuyó la presencia de bacterias.

Alvarado (1998), reporta que la desinfección superficial produce la destrucción de organismos saprófitos y esporas superficiales en las capas más externas del material vegetal, pero que no

elimina infecciones dentro de los tejidos, los cuales son llamados infecciones sistemáticas. Para combatir este problema se utilizó Benomil®, fungicida sistémico y cuyo ingrediente activo es el benomil de amplio espectro, no tóxico para plantas, que actúa sobre una gran variedad de hongos, como: Ascomycetos, Deuteromycetos y Basidiomycetos. Es un inhibidor eficaz en la división de celular de los hongos; actúa interfiriendo en la síntesis del ADN, la mitosis y el mecanismo de transmisión de mensajes genéticos del ADN y ARN, pero también actúa sobre tubos germinativos de esporas, distorsionándolos e inhibiendo el crecimiento, genera una fina capa protectora que impide la germinación de nuevas esporas (De Liñan, 1997; www.uc.org.com, www.colinagro.com).

Alvarado (1998), también asegura que un gran número de bacterias causan infecciones sistémicas en las plantas, las cuales están presentes entre las células y son difíciles de detectar; que la presencia de estos patógenos pueden dar como resultado un crecimiento lento y una alteración morfogénica. Las bacterias están asociadas a los tejidos de las plantas, muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y quedan protegidos de los agentes químicos como lo explican; generalmente no se eliminan con procedimientos de desinfección superficial ya que requieren de medidas adicionales como la incorporación de uno o más antibióticos, ya sea en el proceso de desinfección o en los medios de cultivo, quimioterapia y/o termoterapia.

En el presente proyecto se recurrió al detergente comercial Vanish®, que contiene como ingrediente activo al peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual actúa provocando la pérdida de la función de las proteínas bacterianas, además ataca la membrana celular el ADN y otros componentes teniendo todo ello como consecuencia la muerte celular (Arandal, 2009).

La incorporación de un antibiótico al método de desinfección o como suplemento al medio de cultivo es también una práctica muy común que permite la eliminación de bacterias tanto superficiales como sistémicas, es por ello que en el presente trabajo se recurrió a la utilización de Cefotaxima (250 mg.L⁻¹), el cual es un antibiótico que inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana (www.vademecum.es).

Lo anterior, explica el hecho de que los dos tratamientos a las semillas lograron una desinfección total, sin embargo, en las inflorescencias no se logró completamente la eliminación de los agentes patógenos debido, posiblemente, a la presencia de varios tipos de hongos y/o bacterias en concentraciones altas, lo cual dificultó la asepsia total de dicho explante.

2. FASE 2: Germinación *in vitro*

Diversos trabajos de investigación se han iniciado con explantes provenientes de semillas germinadas *in vitro*. Quienes trabajan con tejidos adultos de plantas provenientes del campo, señalan que el porcentaje de contaminación es alto (Sánchez, 2001); es por ello que en el presente trabajo se optó por realizar la germinación *in vitro* con la finalidad de obtener hojas y tallos libres de patógenos.

Durante esta fase, se evaluaron 6 variables que permitieron entender cuáles eran los factores determinantes en la germinación y el subsecuente desarrollo primario de las plantas, estos dos eventos fisiológicos fueron de suma importancia ya que fue deseable contar con plantas que expresaran sus mejores características, pues de ellas se obtuvieron los explantes. Estas variables se evaluaron en semillas germinadas en dos diferentes medios de cultivo: MS-1 y MS-2, conteniendo 50% y 25% de las sales minerales del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) respectivamente, sin embargo la capacidad de germinación y desarrollo de plántulas, fue del 25% en MS-1 y del 95.5% en MS-2, por lo tanto el medio que favoreció una mayor germinación de semillas fue el MS-2, debido a que el potencial osmótico fue mayor con una concentración baja de sales, estando más disponible el agua del medio de cultivo.

Cuando las semillas se someten a condiciones adecuadas de humedad y temperatura germinan y producen una plántula. En muchas especies las semillas tienen un escaso contenido de agua, lo que las hace más resistentes a las temperaturas extremas, como es el caso de *J. curcas*. Por ello, para que puedan germinar han de absorber antes una cantidad suficiente de agua para que el embrión salga de su estado de latencia y entre en actividad. La disponibilidad de agua dependerá del potencial osmótico del medio. El potencial osmótico es uno de los componentes del potencial de agua y su determinación se basa principalmente en el cambio de las propiedades físicas y químicas de ésta, por la presencia de solutos (sales de las soluciones) (Larqué-Saavedra y Trejo, 1990). Pierik (1990) y Cardenas y Villegas (2002), señalan que la concentración total de las sales de un medio de cultivo determina el potencial osmótico, por tanto, la presencia de solutos osmóticamente activos en baja concentración propicia la germinación.

Aún cuando el medio elegido contenía tan sólo el 25% de las sales recomendadas por Murashige y Skoog (1962) los nutrientes fueron suficientes para lograr una germinación y un buen desarrollo de las plántulas. En esta fase se utilizó sacarosa como fuente de carbono, glicina como fuente de aminoácidos, y un cóctel de vitaminas (Vit. R2). Todos estos nutrientes son esenciales en la germinación y desarrollo de plántulas como lo señalan Pierik, 1990; Evans *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2008. El medio, es un medio rico en nitrógeno, es por ello que Jacques (1988) menciona que el nitrógeno está presente en forma de amonio (NH_4^+), útil para formación de proteínas y ácidos nucleicos, estrechamente relacionados con la formación de tejidos. De acuerdo a Nunes y colaboradores (2008); los embriones maduros de piñón no necesitan de concentraciones altas de nutrientes, ya que en este estado de maduración, el embrión también aprovecha las reservas nutricionales de los cotiledones. Esto se corrobora con los resultados obtenidos, ya que las mejores respuestas fueron encontradas con concentraciones bajas de los nutrientes minerales.

En los parámetros evaluados para la germinación y el desarrollo inicial de las plantas de *Jatropha curcas*, se realizaron observaciones en cada etapa, así, se verificó que el eje embrionario (hipocótilo y radícula), es el primero en desarrollarse, luego el embrión empieza a hacer funcionar el mecanismo para volverse fotosintético, hasta volverse completamente verde y tenga lugar el desarrollo de la yema apical para dar paso a la formación de la primera hoja verdadera.

La longitud del tallo y el desarrollo del sistema radical evaluados a los 30 días de la siembra, mostraron un crecimiento acelerado dado que, estas estructuras se observaron a los 7 días de iniciada la siembra. Dichas observaciones se confirman con el estudio de morfología externa de frutos, semillas y plántulas de piñón, realizado por Nunes y colaboradores (2009).

3. FASE 3: Inducción de la Organogénesis

a. Establecimiento de callo (inducción-proliferación)

El crecimiento celular es un proceso controlado por los reguladores de crecimiento, los cuales juegan un papel importante, a nivel de órgano, tejido y célula (Esau, 1985). El callo se considera un tejido cicatricial homogéneo o heterogéneo desorganizado, formado por una masa de células vegetales tumorales con actividad mitótica constante debido a que estas crecen de manera descontrolada (Voet, 2004), y normalmente se obtiene de un tejido vegetal que está sometido a un estrés como una herida, exposición a reguladores de crecimiento. En el presente trabajo, los explantes de *Jatropha curcas* respondieron favorablemente al formar callo, esta producción de células es la manifestación de las interacciones que se establecen entre los medios nutritivos, suplementados con reguladores de crecimiento, con las condiciones fisiológicas y bioquímicas endógenas de los explantes.

Los explantes recién cultivados para generar callo son muy sensibles, de manera que el éxito (mayor cantidad de callo y su velocidad de crecimiento), o el fracaso de todo el proceso dependen de su adaptación *in vitro* ante los cambios anatómicos y fisiológicos, la nueva dependencia a los componentes de los medios de cultivo y el origen del tejido. En el caso de los tejidos probados en *Jatropha curcas* (hoja y tallo), lograron la inducción de callo, el cual proliferó y logró la formación de brotes; así como lo han demostrado algunos autores como Kathal, *et al.*, (1988 y 1994); Dirks y Buggenum (1989); Liborio, *et al.* (2001) y Rhimi, *et al.*, (2006), quienes han logrado la formación de callo a partir de cualquier órgano vegetal, ya sea hoja, tallo, raíz, nudo, peciolo y cotiledones, y no sólo la formación de callo, en algunos casos, como lo demostró Liborio, *et al.*, (2001) y Rhimi, *et al.*, (2006) sino también la regeneración de brotes; es por esto que la respuesta celular a la formación de callo depende de muchos factores, como son el origen del tejido, las condiciones fisiológicas y bioquímicas de los tejidos, la composición de los medios nutritivos y las condiciones ambientales, entre otras (Barba, 1994a).

Uno de los objetivos planteados en este trabajo fue seleccionar el mejor explante para la proliferación de callo, para lo cual se probaron 3 diferentes medios: JO-0, JO-1 y JO1-B5 (véase tabla 8), y se evaluó la respuesta de los mismos en base a la producción final del callo. El cultivo de hojas y tallos de *Jatropha curcas*, son órganos diferenciados, que permitieron la obtención de callo mediante la desdiferenciación de sus células. En las gráficas 14 y 15, se observó que los tres medios de cultivo influyeron de forma similar en la producción de callo, y que la respuesta depende en gran medida del tipo de explante que se utilice, ya que al analizar los porcentajes de callo por explante, se observa que la hoja presenta mayor proliferación de callo.

El callo obtenido del explante hoja presentó una mayor velocidad de crecimiento, esto puede deberse principalmente a la composición celular de la hoja, más que por la composición de los medios, en cuanto a macro y micro elementos, vitaminas y reguladores de crecimiento. Resultados similares en *J. curcas* fueron reportados por Staubmann et al., 1999; Rajore y Batra, 2005; Shrivastava y Banerjee, 2008; Kumar y Reddy, 2010 y Nunes et al., 2013.

Los callos generados a partir de segmentos de tallos presentaron una proliferación menor en contraste con las hojas que presentaron una proliferación continua y acelerada de callo debido a que en las hojas las células probablemente tienen mayor zonas meristemáticas marginales, y los tallos presentan un área meristemática menor, en ambos tipos de tejidos se presenta como paso inicial para la formación de callo, la desdiferenciación celular, sin embargo en las hojas se tiene una mayor cantidad de células meristemáticas, las cuales tienen la capacidad de dividirse aceleradamente (Barba, 1994a).

Barba (1994a), García-Campusano (2003) y Schwarz y Beauty, (2000) han descrito al callo, como estructuras organizadas de 6 o más células, originadas a partir de divisiones periclinares y luego anticlinales de una sola célula inicial. Algunos callos son masas celulares íntimamente unidas como los cultivados en JO1-B5, mientras que otras forman tejidos esponjosos con una gran cantidad de espacios intercelulares como es el caso del medio JO-O y JO-1, estas observaciones son también reportadas por Barba, 1994a y Bonilla, 1999.

Una de las características de los callos de *Jatropha curcas*, por los cuales se clasificaron, fue por su color, variando desde el verde muy brillante, hasta el color amarillo-verdoso o solo amarillo que manifiesta su oxidación. Barba (1994a), señala que la coloración del tejido de callo varía, aun derivando de la misma especie, se pueden presentar callos que carecen de pigmentación mientras que otros pueden ser de diferentes tonos de verde, amarillo, café o rojo. El tipo y grado de pigmentación está influenciado por factores nutricionales y ambientales y se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos y antocianinas.

En el desarrollo de esta fase del presente trabajo, se observó que la desdiferenciación y la rediferenciación de las células de los explantes tiene que ver mucho con la composición anatómica de éstos, por lo que la composición celular de cada explante fue tomada en cuenta, principalmente a nivel meristemático. Por lo general, los meristemas se caracterizan por presentar células pequeñas, esencialmente isodiamétricas con membranas delgadas, sin una clara vacuolización, grueso núcleo central con nucléolo frecuentemente voluminoso y mitocondrias numerosas. Las plantas poseen variedad de meristemas como son: primarios, secundarios, intercalares, foliares o marginales, todos contribuyendo a la construcción de la arquitectura de la planta. En el caso de *Jatropha curcas*, se observó que hoja y tallo tienen la capacidad de formar callo, debido a que tienen zonas meristemáticas capaces de diferenciarse.

Las hojas poseen un tipo de meristemo foliar y le permite la morfogénesis de la hoja y cesa cuando la hoja ha alcanzado su forma y dimensiones definidas (Esau, 1985; Mauseth, 1988 y Margara 1988). Además en las regiones meristemáticas de las hojas también se acumulan altas concentraciones de auxinas que ayudan en la diferenciación y alargamiento celular provocados por la absorción de agua debido a que la pared celular disminuye su grosor y resistencia, esto también ayuda para que se dé la mitosis.

García (2002) señala que las auxinas se encuentran abundantes en las células de hojas jóvenes, más tarde comienzan a aparecer las citocininas, encargadas de la multiplicación de las células que incrementa la capacidad para crecimiento pero solo la mitad de las células hijas experimentan alargamiento y es entonces que la absorción de agua provoca alargamiento de la célula; cuando esto ocurre, la pared celular se engrosa por el depósito de polisacáridos (Jacques, 1988; Mejía y Espinoza, 2003; García 2002; Lee y Lee 2003).

Otro factor importante para la inducción y proliferación de los callos, además de la anatomía, son los medios de cultivo, los cuales fueron importantes para su formación; Margara (1988), comenta que la nutrición mineral *in vitro* depende de elementos proporcionados por el explante que pueden ser reguladores de crecimiento endógenos y a la vez de los aportados en la solución nutritiva. Algunas masas de tejidos pueden brotar en medios principalmente ricos en N, como es el de los medios JO-0 y JO-1, siendo el primero, el medio idóneo para un mayor porcentaje de proliferación de callo, los cuales tienen como base las sales del medio MS (Musasighe y Skoog, 1962), el cual ha demostrado una acción estimulante sobre la organogénesis. El medio está caracterizado por un contenido fuerte de nitrógeno: 60 meq/L, del cual $\frac{1}{3}$ está aportado en forma reducida (NH_4^+) y por una concentración igualmente elevada de potasio (20 meq/L). A diferencia del medio JO1B-5, conformado por las sales minerales del medio B5 (Gamborg, et al., 1968) que tuvo un menor porcentaje de producción de callo puesto que su contenido de nitrógeno es escaso: 32 meq/L, del cual $\frac{1}{16}$ en forma reducida NH_4^+ , pero si se caracteriza por tener una alta concentración de potasio 30 meq/L.

La actividad fisiológica de las plantas está mediada por reguladores de crecimiento, que ejercen efectos en el desarrollo y diferenciación que hace posible que los tejidos vegetales cultivados *in vitro* tengan al capacidad de formar callo como sucedió en *J. curcas*, por esta razón otro factor determinante son los reguladores de crecimiento exógenos para la activación meristemática como ha mencionado Jacques (1988) y Sánchez (2001).

Las auxinas y citocininas, AIB y BA, respectivamente son importantes en la generación de callo, así como la relación auxina-citocinina *in vitro* es indispensable para la división de células meristemáticas, por lo que en el presente trabajo se buscó la concentración óptima, de la auxina como de la citocinina, tomando en cuenta las interacciones sinérgicas que presentan, las interacciones entre los reguladores de crecimiento son la base para explicar procesos fisiológicos, entre los que se incluye la regulación de la división celular.

Para que pueda tener lugar la división celular debe ocurrir la síntesis de ADN, la mitosis y la citocinesis en las cuales la presencia de citocinina en altas concentraciones es necesaria para que ocurra según reportado por Barba en 1994a; la inducción y proliferación de callo con altas tasas de crecimiento se presentó en el medio JO-0, se logró gracias a la combinación de auxina-citocinina empleada, 3 mg.L⁻¹ de AIB y 3 mg.L⁻¹ de BA, presentando una alta actividad mitótica, a diferencia de los otros dos medios también probados (JO-1 y JO1-B5).

Resultados similares fueron obtenidos por Tejedor, (2010); Deore y Johnson., (2008); Misra *et al.*, (2010); Mukherjee *et al.*, (2011) y Khurana-Kaul *et al.*, (2010).

Acosta *et al*, en el 2000, reportan que las auxinas, como el AIB y las citocininas como el BA, empleadas en los tres medios de cultivo se encuentran en el citoplasma de las células en forma de anión, actúan de modo diverso en el crecimiento por alargamiento celular, incrementando el contenido osmótico de la célula y la permeabilidad al agua que es transportada a las vacuolas, vesículas del retículo endoplasmático o al aparato de Golgi, así como a organelos como los cloroplastos por medio de proteínas transportadoras, aumentan la síntesis de ARN, originando proteínas específicas que provocan el aumento de la plasticidad de la pared celular, trae como consecuencia su extensión y con ello un incremento por alargamiento, lo que explica como actuaron estos fitoreguladores en las células de callo de *J. curcas*.

4. FASE 4: Regeneración (multiplicación de brotes)

La proliferación más notable de callo de *J. curcas* se localiza en zonas meristemáticas de las hojas. La formación de estas secciones proliferantes se da gracias a que conforme la tasa de división desciende, el plano de división del tejido se altera dando inicio a la actividad meristemática y así inicia la formación de nódulos que dará origen a brotes como lo describe Razdan (2003), Villavicencio (2002) y Margara (1988), lo que explica que el explante hoja propició la formación de un mayor número de brotes.

Se formularon 3 medios de cultivo: JR-1 conteniendo el 100% de las sales MS, JR-1a con el 50% de sales MS y JR1-B5 con el 100% de sales minerales B5 (véase tabla 9), para la inducción de brotes, los cuales varían en las concentraciones de sales minerales, especialmente en la fuente de nitrógeno, así mismo se ha demostrado que las concentraciones de los minerales afectan también la capacidad morfogénica del explante.

Nunes *et al.*, 2013, confirman la importancia en las variaciones en la concentración de nitrógeno y otros componentes esenciales del medio MS, concluyendo que el nitrógeno está influenciado significativamente en la inducción de brotes, dado que la mejor respuesta (7 brotes por explante de hoja) resultó en ausencia de KNO_3 , con el aumento de porcentajes de NH_4NO_3 ; sin embargo también mencionan que un exceso de nitrógeno y potasio en el medio nutricional pueden ser tóxicos y reducir significativamente el número de brotes. En la presente investigación se obtuvieron resultados similares y también se tomó en cuenta las cantidades de nitratos presentes en los medios nutricionales, de ahí que se tomó de referencia el trabajo de Nunes y colaboradores para explicar el efecto de JR1-a, que fue el medio con el mejor rendimiento en el número de formación de brotes para ambos explantes (hoja y tallo), obteniendo 8 brotes por frasco de callo de hoja y 3 para callo de tallo (véase gráfica 20); considerando que este medio es el que contenía una menor cantidad de KNO_3 y en general en su fuente de nitrógeno en comparación con JR-1 y JR1-B5.

En cuanto a la composición de las sales minerales contenidas en los 3 medios de cultivo, el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) presenta altas concentraciones de nitratos, potasio y amonio; y el medio B5 se caracteriza por su alto contenido de nitrato de potasio (Huang y Murashige, 1977; Dixon, 1985).

Al igual que García-Campusano en el 2003, con las observaciones realizadas en esta investigación, se pudo probar que la formación de brotes durante el cultivo *in vitro*, son procesos en los que intervienen factores tanto intrínsecos, como extrínsecos, estableciéndose, por tanto interacciones entre eventos bioquímicos, fisiológicos, siendo éstos modulados por los reguladores de crecimiento, a los que fueron expuestas las hojas durante el cultivo. Barba (1994b), comenta que la inducción *in vitro* de órganos se da en presencia de citocininas como el BA (Bencilaminopurina), ya que este regulador de crecimiento está encaminado a la estimulación de la morfogénesis a la división celular y formación de brotes. En este trabajo se utilizó una concentración de 1mgL^{-1} de BA en los tres diferentes medios de cultivo, propiciando así la formación de brotes. Este resultado se asemeja al de diversos autores que señalan que una concentración baja de BA favorece la producción de brotes. Ndiaye *et al.*, (2006); y Koonal *et al.*, (2011), señalan que la concentración óptima de BA para la inducción de brotes es la de 1mgL^{-1} , asimismo Sujatha y colaboradores (2005) también encontraron que concentraciones bajas de BA (0.5 y 1 mg L^{-1}) favorecen un mayor número de brotes de *Jatropha curcas*.

Como ya se mencionó, el explante hoja cultivado en el medio JR1-a presentó los mejores resultados puesto que se obtuvo 8 brotes por frasco de callo de hoja (véase gráfica 20); es conveniente destacar que en este estudio se logró un mayor número de brotes de *Jatropha curcas* a diferencia de otros autores que también utilizaron la misma citocinina BA como: Sujatha *et al.*, (2005) obtuvieron 2.3 brotes por nudo, Tejedor (2010) y Koonal *et al.* (2011) lograron la formación de 4 brotes por explante de hoja. Estos datos indican que posiblemente el genotipo también juega un rol importante en el número de brotes producidos durante la multiplicación (Samson *et al.* 2011).

Otros factores que deben tenerse en cuenta son componentes orgánicos, por lo que fue muy importante el uso de aditivos como adenina sulfatada, L-glutamina y sacarosa, para obtener buenos resultados en esta etapa, ya que, como lo mencionan Rajore y Batra (2005) y Shrivastava y Banerjee (2008), la adenina sulfatada presenta un efecto sinérgico con otras citoquininas, la L-glutamina previene la caída de hojas en los múltiples brotes obtenidos y la sacarosa como principal fuente de carbono. Por estas razones Datta y colaboradores (2007) y, Ndiaye y colaboradores (2006) también han utilizado estos aditivos en sus trabajos.

a. Oxidación

Después del período de inducción, los brotes formados empezaron a incrementar su tamaño, por lo que a los 30 días de desarrollados, los brotes mostraron un ensanchamiento y elongación dando por consiguiente, la formación de hojas, asemejando a los tallos de la planta madre. Sin embargo, aunque hubo este desarrollo en la mayoría de los brotes regenerados, presentaron una gran oxidación, lo cual ocasionó una disminución de hasta un 70% en el número de brotes. La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (POP) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Amiont *et al.*, 1996, Bray *et al.*, 2000). La mayoría de radicales libres se producen a partir del metabolismo del oxígeno y se les llama especies de oxígeno reactivo o intermedios de oxígeno reactivo (ROS). Estas son formas parcialmente reducidas del oxígeno atmosférico y típicamente resultan de la excitación del O_2 para formar el oxígeno singlete

(1O_2) o también mediante la transferencia de uno, dos o tres electrones al O_2 para formar el radical súper óxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el radical hidroxilo (OH^-) respectivamente. En las células vegetales, éstos se forman constantemente durante las reacciones redox de varias vías metabólicas; la incompleta reducción del oxígeno o de la oxidación del agua en el cloroplasto o la mitocondria, en la cadena de transferencia de electrones tanto de la fotosíntesis como de la respiración, en la β - oxidación de los ácidos grasos, oxidación del glicolato, del NADPH, oxalato y de las xantinas (Bray *et al.*, 2000; Mittler, 2002; Turrens, 2003; Apel y Hirt, 2004). Los ROS también se pueden generar en otros organelos celulares, como los peroxisomas y los lisosomas, a consecuencia de los cortes realizados en los explantes (Karp 1998). Adicionalmente, el O_2^- puede reaccionar con el óxido nítrico para formar su radical (NO). Este y otras formas oxidantes del óxido nítrico; dióxido de nitrógeno (NO_2), peróxido nítrico ($ONOO^-$), nitrosil catión (NO^+), reciben en conjunto el nombre de especies reactivas de nitrógeno (RNS). El estrés ocasionado por ROS se le conoce como estrés oxidativo y el originado por RNS como estrés nitrosativo (Turrens, 2003, Valderrama *et al.*, 2007).

De acuerdo a George (1993), Tabiyeh *et al.*,(2006); Van Staden *et al.*, (2006); y Abdelwahd *et al.*, (2008), en cultivo de tejidos *in vitro*, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, volumen y calidad del frasco de cultivo, así como la composición del medio de cultivo, como fue el caso de *Jatropha curcas* en el presente trabajo, ya que los resultados mostrados en esta fase, en el medio JR1-a (50% de sales MS) se mantuvieron un mayor número de brotes sin oxidación por su menor contenido de nitratos a diferencia de los medios JR-1 (100% de sales MS) Y JR1-B5 (100% de sales B5), (véase tabla 9; y tabla 1 y 2 del anexo). Huang y Murashige (1977) y Dixon (1985) realizaron estudios comparativos de la composición salina de varios medios comerciales de cultivo de tejidos vegetales, destacando que el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) presenta altas concentraciones de nitrato, potasio y amonio; y el medio B5 (Gamborg *et al.*, 1968) se caracteriza por una alta concentración de nitrato de potasio, por esta razón se consideró que la oxidación fue provocada por los elevados contenidos de nitratos en los medios de cultivo JR-1 y JR1-B5, provocando estrés nitrosativo.

El oscurecimiento de tejidos ha resultado más pronunciado en un tipo de medio de cultivo que en otro, lo que implica que el mismo puede ser causado por el uso inapropiado de alguno de los nutrimentos empleados en el medio. Con frecuencia el oscurecimiento es menor en un medio diluido (George,1996, Cassells y Curry 2001). En la literatura consultada, se pudo observar que hay 3 modificaciones que frecuentemente se emplean en los medios nutrimentales para combatir la oxidación: 1. Uso de medios de cultivo bajo en sales, 2. Diluir las concentraciones de N y K, y en su fuente, 3. Dilución general de las sales del medio de cultivo; de ahí que el medio JR1-a que contenía la mitad de sales minerales del MS, siempre presentó los mejores resultados durante toda esta fase, permitiendo a un mayor número de brotes de ambos explantes lograran iniciar su desarrollo en comparación con JR-1 y JR1-B5 que contenían las sales minerales MS y B5 completas, respectivamente.

Sin embargo esta modificación en la composición nutrimental no fue suficiente para eliminar la oxidación, por consiguiente para combatirla se utilizó como estrategia adicionar a los medios nutrimentales dos adsorbentes como agentes antioxidantes que fueron: Polivinilpirrolidona (PVP®) y carbón activado. En términos generales, un agente antioxidante es un compuesto que inhibe o demora la oxidación de un sustrato propenso al fenómeno. La descomposición,

formación o prevención de los ROS (especies de oxígeno reactivo) y/o RNS (especies de nitrógeno reactivo), son los posibles mecanismos de su acción. De esa forma evitan las reacciones en cascada de los radicales libres (Matkowski, 2008).

Los antioxidantes incluyen agentes reductores, los cuales pueden remover oxígenos de moléculas e incluso de compuestos que actúan con mecanismos alternativos, tales como capturadores o desactivadores de iones; reaccionando con intermediarios en el equilibrio redox o en la catálisis de transporte de electrones (George 1996, Shao *et al.* 2008).

El PVP es una poliamida, esta sustancia fue inicialmente utilizada como adsorbente en la técnica de separación por cromatografía de sustancias ácida aromáticas, aldehídos y fenoles. Para el caso de los fenoles, estos son adsorbidos a través de uniones hidrógeno, previniendo su oxidación y polimerización (George 1996). Algunos autores como Amin y Jaiswal, 1988; Gannoun *et al.*, 1995 y Figueiredo *et al.* 2001, refieren que el PVP ha sido utilizado para la prevención del oscurecimiento de los tejidos. Contrario a las referencias anteriores, D' Silva y D' Souza, 1993; Huang *et al.*, 2002; Mengyun y Jingmin, 2004; Ogita, 2005 y Azofeifa, 2007; aluden que la adición de PVP al medio de cultivo no favoreció al control de la oxidación; misma situación a la que se enfrentó en el presente trabajo donde se utilizó este agente a una concentración de 1g l^{-1} (véase gráfica 21 y figura No. 16), por lo cual se decidió seleccionar al carbón activado (CA), como un nuevo agente antioxidante a evaluar. Bon *et al.*, 1988; Seneviratne y Wijesekara, 1996; y Aliyu, 2005, señalan que mediante la adición de CA al medio de cultivo es posible remover compuestos fenólicos. Evitando o disminuyendo el deterioro del explante. Este fue el caso de *J. curcas*, puesto que logró erradicar por completo la oxidación permitiendo el crecimiento de los brotes (véase gráfica 21 y figura No. 16).

El efecto benéfico del CA se atribuye a su capacidad para remover sustancias inhibitorias o tóxicas del medio de cultivo que son producidas durante el autoclaveado del medio o liberadas por el explante. Dentro de las sustancias producidas durante el autoclaveado se ha reportado la presencia del 5-(hidroximetil)-2-furaldehído (HMF). Este es un compuesto inhibitorio, formado por hidrólisis de la sacarosa durante el proceso de autoclaveado. Otras sustancias son removidas por el mismo explante, por ejemplo, las quinonas. (Ebert *et al.*, 1993; Petersen *et al.*, 1999; Bhatia y Ashwath 2008). Por consecuencia, el medio JR1-a en combinación con CA a una concentración de 1g l^{-1} es la combinación adecuada para eliminar por completo la oxidación de brotes como se muestra en la figura No. 16 e, f, g y h.

5. FASE 5: Crecimiento, desarrollo y enrizamiento.

Para que los brotes tuvieran un buen crecimiento y una posibilidad de tener un desarrollo en el suelo, se buscó la formación de raíces. Esta formación se realizó en 4 etapas y se logró el 100% de enraizamiento.

a. Primera etapa.

Acosta *et al.*, (2000) y Barba (1994b), reportan que la inducción de raíces es un proceso complejo que consta de dos etapas: la formación de primordios de raíz a partir de ciertas células susceptibles y el crecimiento de éstas. Ambas etapas requieren auxina, aunque las necesidades de cada una son diferentes y dependen de la especie; para *Jatropha curcas* durante el desarrollo de esta fase, se probó en una primera etapa la inducción de raíces en dos medios sólidos: JE-1 (sales MS) y JE1-B5 (sales B5) suplementados con AIB (Ácido Indol Butírico) 3mg L^{-1} durante 1 mes, pero los brotes presentaron una proliferación de callo en la base como se muestra en la figura 17, un evento inesperado y poco afortunado pues se perdió hasta un 70% del material vegetal como se muestra en la gráfica No. 26. Diversos autores como Tejedor, (2010); Misra *et al.*, (2010); Mukherjee *et al.*, (2011) y Khurana-Kaul, (2010); han reportado que si se desea inducir callo es necesaria el AIB en bajas concentraciones, pero si se aumenta la cantidad de esta auxina se incrementa la producción de callo, con lo cual se explica esta formación de tejido calloso, pues no era necesaria esa cantidad de AIB y/o mantener por tanto tiempo (1 mes) ese estímulo.

b. Segunda y tercera etapa.

En la segunda etapa los brotes se sometieron a un pulso en medios líquidos: JE-2 (sales MS) y JE2-B5 (sales B5) suplementados con AIB a una concentración de 6mg L^{-1} (véase tabla 10) durante 3 horas e inmediatamente se subcultivaron en medios sólidos JE-3 (sales MS al 50%) y JE3-B5 (sales B5) sin ningún regulador de crecimiento como parte de la tercera etapa. Al utilizar reguladores inicialmente para el crecimiento y formación de órganos, después de algún tiempo de cultivados, necesitan menos aportación de dichos reguladores o prescindir de ellos, que fue el caso de *J. curcas* en esta tercera etapa, estimulando un cambio en la actividad genética, impulsando la formación de raíces como lo explica Pierik (1990) y George y Sherington (1984). Se tuvo una buena respuesta pues ambos medios favorecieron la formación de raíces alcanzando el 100% de enraizamiento (véase figura No. 18 y gráfica 28); de manera que se puede inferir que para su formación tampoco es necesaria una alta cantidad de sales minerales, puesto que en los medios formulados la concentración de sales es baja JE-3 (50% de sales MS) y JE3-B5 (sales B5), conformados por 30 y 32 meq/L de N, respectivamente (Margara, 1988); sin embargo el JE-3 resultó el mas eficiente ya que un día antes se desarrollaron las raíces

Trabajos con resultados similares como los de Datta *et al.* (2007) y Koona *et al.* (2011) lograron enraizamientos de *J. curcas* del 52 y 54 % respectivamente, con solo 0.2 mgL^{-1} de la misma auxina en brotes. Del mismo modo Deore y Johnson (2008) y Sudhakar (2008) mencionan el 80% de enraizamiento utilizando una baja concentración de AIB (0.1 mg L^{-1}). García-Campusano (2003), afirma que las auxinas influyen en la expansión celular, en la acidificación de la pared celular, en el inicio de la mitosis (al inducir la replicación de ADN) y en la organización de los meristemas, para dar lugar ya sea a tejido desorganizado (callo) o a órganos definidos, como raíces además promueve la diferenciación vascular. El AIB es un factor esencial en la promoción del crecimiento de primordios radiculares, por lo que se puede entender el efecto que tuvo esta auxina en la formación de raíces.

c. Cuarta etapa.

A pesar del gran número de publicaciones relacionadas con la micropropagación de *J. curcas*, utilizando todo tipo de explantes y procedimientos (Sujatha y Mukta 1996, Qin *et al.*, 2004; Rajore y Batra, 2005; Deore y Johnson, 2008; Shrivastava y Banerjee, 2008; Kumar *et al.*, 2010; entre otros), son pocos los estudios que han documentado la aclimatación exitosa de las plantas (Kumar *et al.*, 2011) y la transferencia a suelo (Deore y Jhonson, 2008); por esta razón se llevó a cabo una pre-aclimatación *in vitro* de las plantas enraizadas de *J. curcas*.

La aclimatización de las plántulas producidas *in vitro* a condiciones de invernadero o campo es esencial, porque hay una diferencia abismal entre ambos entornos. Los procedimientos de aclimatización eficientes proporcionan a las plantas las condiciones óptimas para obtener una elevada tasa de supervivencia, crecimiento y su exitoso establecimiento en condiciones de campo. Por las características fisiológicas y anatómicas de las plantas propagadas *in vitro* necesitan aclimatizarse gradualmente al nuevo ambiente en el que van a crecer después de salir del laboratorio y los frascos donde fueron micropropagadas (Hazarika, 2006); es por ello que en la presente investigación se realizó la pre-aclimatización durante 2 meses en frascos con sustrato estéril, bajo las mismas condiciones de fotoperíodo que los cultivos *in vitro*, y poco a poco se fueron destapando los frascos.

Las estrategias que resultan satisfactorias se enfocan a la reducción paulatina de humedad relativa, el incremento controlado de un mayor nivel de luz, la activación de las plantas regeneradas *in vitro* para cambiar su crecimiento mixotrópico a autotrófico y ambiente aséptico (Hazarika, 2006); de ahí que la pre-aclimatización a la que fueron sometidas las plantas de *J. curcas* mostraron resultados bastante alentadores pues de las 26 plantas únicamente 2 no consiguieron adaptarse y lograron un crecimiento entre 8 y 10 cm (véase figura 18d).

FASE 6: TRANSPLANTE *ex vitro*

La supervivencia de las planta *in vitro*, regeneradas durante el período de adaptación, depende fundamentalmente de las peculiaridades fisiológicas, estructurales y anatómicas que las plántulas presentan producto del desarrollo *in vitro*, el cual permite una elevada humedad relativa en el interior de los frascos, baja intensidad luminosa, bajo intercambio gaseoso, abundante disponibilidad de nutrientes y carbono, y una pequeña variación de temperatura en un rango considerado óptimo para el cultivo (Preece y Sutter, 1991; Teixeira *et al.*, 1995; Aloísio, 1997). Entre los principales problemas que presentan las plantas *in vitro* se encuentran: ineficiencia fotosintética, debido a los bajos contenidos de pigmentos del aparato fotosintético y el desarrollo de cloroplastos con granas desorganizadas (Preece y Sutter, 1991); capacidad reducida de formar cutículas cerosas (Amar *et al.*, 1995), estomas poco funcionales debido ala alteración en la forma de las células oclusivas (Ziv, 1991; Diez y Gil, 1999); ineficiencia de los tejidos de sustento debido a la reducida presencia de colénquima y esclerénquima (Preece y Sutter, 1991; Framton *et al.*, 1998); absorción y transporte de agua ineficiente, debido a una conexión vascular incompleta o deficiente entre la raíz y el brote.

Durante las primeras dos semanas después del trasplante, es necesario controlar adecuadamente los factores ambientales y prácticamente se requiere simular las condiciones, para evitar el exceso de transpiración de las jóvenes plantas, hasta que éstas logren un adecuado desarrollo de estomas y cutícula, es necesario mantener una alta humedad relativa (Ziv, 1991; Sánchez, 2000); lo que justifica que en este lapso de tiempo murieron 7 plantas, a pesar de que se tuvo sumo cuidado en mantenerlas en riego constante en el invernadero. El control de la intensidad de la luz en esta fase es también importante ya que las plantas provienen de un ambiente con intensidad baja, por o tanto ésta se debe regular para evitar la fotoinhibición del aparato fotosintético (Agramonte *et al.*, 1998).

En el caso de *J. curcas*, es muy escasa la literatura que reporta satisfactoriamente el trasplante *ex vitro*, sin embargo autores como Gopale y Zunjarrao (2013), y Deore y Johnson, (2008) lograron un 85 y 80% de aclimatación de plantas respectivamente. No obstante, los resultados obtenidos en este estudio aunque están por debajo de lo reportado por estos autores también resultan provechosos pues el porcentaje de sobrevivencia fue del 73% como se puede apreciar en la gráfica 28 y figura No.19, alcanzando una longitud entre 18 y 22 cm a los 5 meses de aclimatizadas en el invernadero.

**PROTOCOLO PARA LA
REGENERACIÓN**

in vitro de *Jatropha curcas* L.

En la siguiente imagen se muestra el protocolo sugerido por esta investigación para la regeneración *in vitro* y transplante *ex vitro* de *Jatropha curcas* L., tomando los mejores resultados, omitiendo pasos y tiempos que resultaron poco favorables.

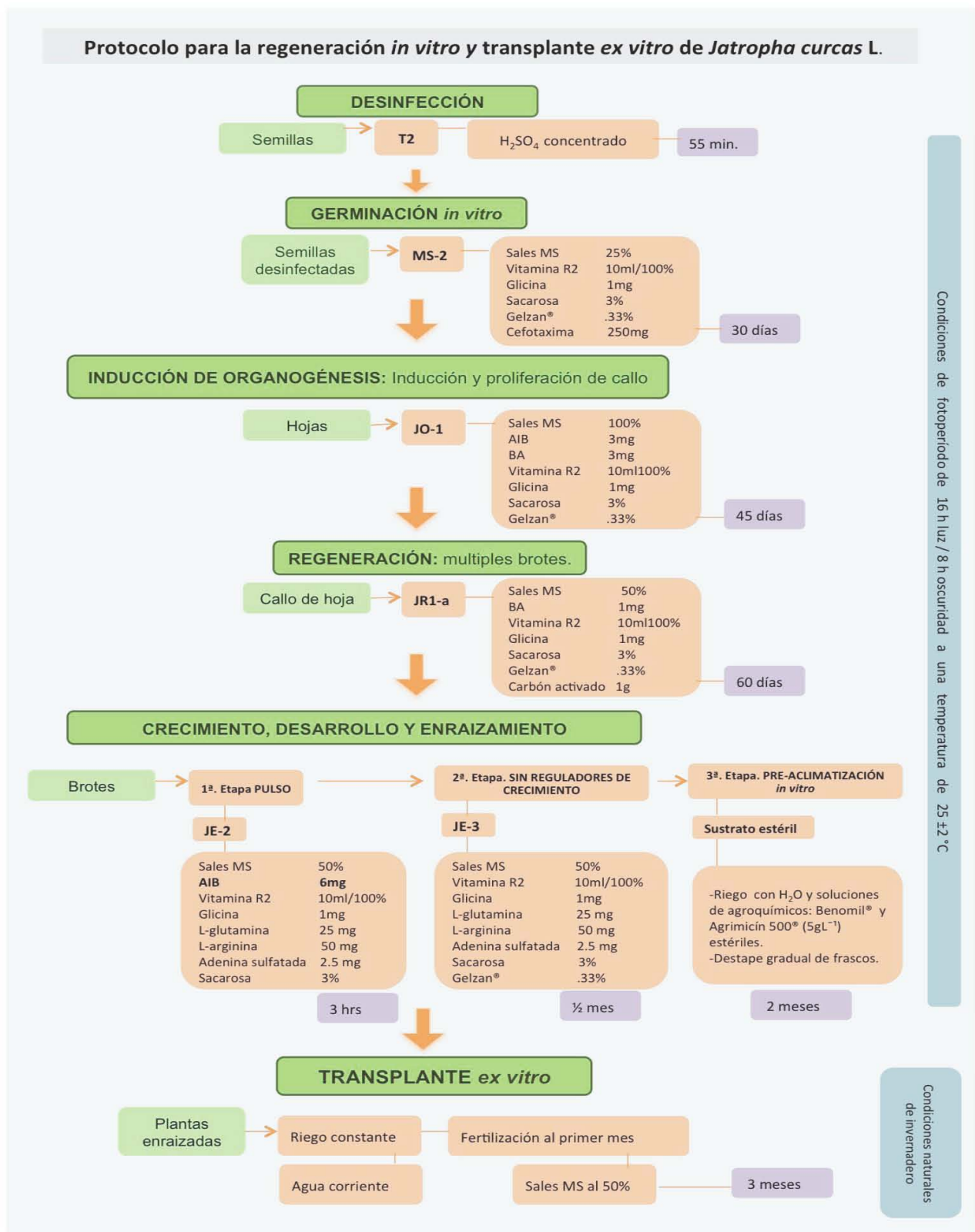


Fig. No. 20. Protocolo sugerido por la presente investigación, para la regeneración *in vitro* y transplante *ex vitro* de *Jatropha curcas* L., de la variedad de Rosa Morada, Nararit; México.

- Los tratamientos de desinfección para semillas: T1 y T2, permitieron el establecimiento aséptico del 100% de los explantes hoja y tallo.
- El medio MS-2, presentó el mayor porcentaje de germinación (95%), y fomentó el desarrollo primario de la plántula.
- El explante hoja resultó ser el mejor explante, ya que produjo una mayor formación de callo y originó un mayor número de regenerantes.
- El medio JO-0, mostró una mayor proliferación de callo.
- JR1-a fue el medio que propició la multiplicación de mas brotes.
- El carbón activado, fue el agente idóneo para combatir la oxidación de los múltiples brotes y permitió su subsecuente desarrollo.
- El proceso de enraizamiento se logró sometiendo a los brotes a un pulso de AIB.
- La pre-aclimatización *in vitro* facilitó la sobrevivencia *ex vitro* de las plantas.
- El porcentaje de sobrevivencia de las plantas aclimatizadas en condiciones de invernadero, fue del 70%.
- Con esta investigación se logró obtener un protocolo para la obtención y multiplicación de plantas de *Jatropha curcas* de la variedad de Rosamorada, Nayarit.
- Gracias a esta investigación se logró caracterizar el cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas* L. proveniente del estado de Nayarit, México y proporcionar las bases para realizar más estudios y utilizarlo como un modelo biológico.

SOLUCIONES CONCENTRADAS DE MACRO Y MICROELEMENTOS

Tabla 1 . SALES DEL MEDIO DE CULTIVO CONOCIDO COMO MS (Murashigue y Skoog, 1962).

NOMBRE DEL COMPUUESTO	FÓRMULA	1 L (g)	P.M. (g)	CANTIDADES PARA 1L	
				MASA (mg)	MOLES(Mm)
SOLUCIÓN I: NITRATOS					
Nitrato de Potasio	KNO ₃	190	101.108	1900	18.792
Sulfato de Amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	165	80.04	1650	20.615
SOLUCIÓN II: SULFATOS					
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	37	246.498	370	1.501
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .H ₂ O	1.69	169.01	16.9	0.0999
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.860	287.54	8.6	0.0299
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0025	249.68	25x10 ⁻³	0.1x10 ⁻³
SOLUCIÓN III: HALÓGENOS					
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	44.0	147.02	440	2.993
Cloruro de Potasio	KI	0.083	166.01	0.83	4.999
Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0025	237.93	25x10 ⁻³	0.105x10 ⁻³
SOLUCIÓN IV: FOSFATO, AC. BÓRICO, MOLIBDENO					
Fosfato de Potasio monobásico	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	17.0	136.09	170	1.249
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	0.620	61.86	6.2	0.1002
Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025	241.95	250x10 ⁻³	1.03x10 ⁻³
SOLUCIÓN IV: QUELANTES					
Sulfato Ferroso	FeSO ₄	2.784	278.028	27.8	0.0999
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O	3.724	372.30	37.3	0.1002

**Tabla 2. SALES DEL MEDIO DE CULTIVO CONOCIDO
COMO B5 (Gamborg *et al.*, 1968).**

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	1L (g)	P.M. (g)	CANTIDADES PARA 1L MASA (mg) MOLES(Mm)	
SOLUCIÓN I: NITRATOS					
Nitrato de Potasio	KNO ₃	250	101.108	2500	24.726
Sulfato de Amonio	(NH ₄) ₂ SO ₄	13.4	132.146	134	1.014
SOLUCIÓN II: SULFATOS					
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O	25	246.498	250	1.014
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ .H ₂ O	1	169.01	10	0.059
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.20	287.54	2.0	6.95x10 ⁻³
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0025	249.68	25x10 ⁻³	1.001x10 ⁻⁴
SOLUCIÓN III: HALÓGENOS					
Cloruro de Calcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	15	147.02	150	0.020
Cloruro de Potasio	KI	0.075	166.01	0.75	4.518x10 ⁻³
Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0025	237.93	25x10 ⁻³	1.050x10 ⁻⁴
SOLUCIÓN IV: FOSFATO, AC. BÓRICO, MOLIBDENO					
Fosfato de Sodio	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	15	138.02	150	1.087
Ácido Bórico	H ₃ BO ₃	0.3	61.68	3.0	0.048
Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.025	241.95	250x10 ⁻³	1.033x10 ⁻³
SOLUCIÓN IV: QUELANTES					
Sulfato Ferroso	FeSO ₄	2.81	278.21	28.1	Sequestrene 330Fe (FeDTPA)
Na ₂ EDTA	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ Na ₂ .2H ₂ O	3.74	372.30	37.4	0.0753

Tabla 3. COMPUESTOS ORGÁNICOS .
CONCENTRACIÓN DE SOLUCIONES CONCENTRADAS DE FITOHORMONAS,
ADENINA Y GLICINA.

NOMBRE DEL COMPUESTO	ABREVIATURA	FÓRMULA	P.M. (g)	100ml (g)
COMPUESTOS ORGÁNICOS				
FITOHORMONAS				
Auxinas				
Ácido indol-3-butírico	AIB	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂	203.2	10
Cinetinas				
6-Bencilaminopurina	BAP	C ₁₂ H ₁₁ N ₅	225.3	10
OTROS COMPUESTOS ORGÁNICOS				
(6-aminopurina) Hemisulfato	Adenina	C ₅ H ₅ N ₆ 1/2H ₂ O	184.2	100
Ácido amonoacético.	Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	20

Tabla 4. SOLUCIONES CONCENTRADAS DEL CÓCTEL DE VITAMINAS CONOCIDO
COMO R2.

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	PM (g)	CANTIDADES PARA 1L L		100ml (g)
			MASA (mg)	MOLES(Mm)	
Vitaminas R2 (MS modificado)					
Myoinositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.2	100	0.555	1
Ác. Nicotínico	C ₆ H ₅ NO ₂	123.1	0.5	4.062	0.01
Piridoxina hidrochloride	C ₈ H ₁₁ NO ₃ . HCl	205.6	0.5	2.432	0.01
Tiamina hidrochloride	C ₈ H ₁₇ N ₄ O ₄ Cl . HCl	337.3	1	2.95	0.02

Tabla 5. FUENTE DE CARBONO

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M. (g)	CANTIDADES PARA 1L (g)
Sacarosa comercial	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.31	30

Tabla 6. SOLUCIONES PARA AJUSTAR pH

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	P.M. (g)	CANTIDADES PARA 1L		100ml
			MASA (mg)	MOLES(Mm)	
Soluciones para ajustar el pH del medio					
Hidróxido de Sodio	NaOH	40	1N=40 g.l ⁻¹	1M=40 g.l ⁻¹	4.0g
Ácido clorhídrico	HCl	36.46	1N=83.5 g.l ⁻¹	1M=36.46 g.l ⁻¹	8.35ml

ANÁLISIS ESTADÍSTICO. Prueba de comparación múltiple Tuckey Kramer.

Estadística descriptiva para las 6 variables evaluadas en Fase 2: Germinación *in vitro*.

Tabla7. Desarrollo de eje embrionario

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=58 MSE=0.4814655 Critical Value=2.8309

Group	Count	Mean	Different From Groups
MS-2	39	12.5641	MS-1
MS-1	10	14.9	MS-2

Tabla 8. Embrión verde

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=51 MSE=0.4574804 Critical Value=2.8392

Group	Count	Mean	Different From Groups
MS-1	40	2.375	MS-1
MS-2	20	3.15	MS-2

Tabla 9. Desarrollo de Yema Apical

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=47 MSE=1.07425 Critical Value=2.8450

Group	Count	Mean	Different From Groups
MS-2	39	5.358974	MS-1
MS-1	14	5.785714	MS-2

Tabla 10. Aparición de la primera hoja verdadera

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=46 MSE=1.851716 Critical Value=2.8467

Group	Count	Mean	Different From Groups
MS-1	10	3.8	MS-2
MS-2	38	6.5	MS-1

Tabla 11. Longitud de tallo

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=46 MSE=1.023913 Critical Value=2.8467

Group	Count	Mean	Different From Groups
MS-2	38	19.10526	MS-1
MS-1	10	22.8	MS-2

Tabla 12. Sistema radical

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=46 MSE=0.5818078 Critical Value=2.8467

Group	Count	Mean	Different From Groups
MS-1	10	2	
MS-2	38	2.078947	

Estadística descriptiva para la Fase 3: Inducción de la organogénesis**Tabla 13. Inducción y proliferación de callo en hoja.**

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=47 MSE=517.3967 Critical Value=3.4226

Group	Count	Mean	Different From Groups
JO1-B5	17	78.82353	JO-0, JO-1
JO-0	17	91.76471	JO1-B5
JO-1	17	49.41177	JO1-B5

Tabla 14. Inducción y proliferación de callo en tallo.

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=47 MSE=305.2566 Critical Value=3.4226

Group	Count	Mean	Different From Groups
JO-1	17	57.64706	JO1-B5
JO-0	17	72.05882	JO1-B5
JO1-B5	17	43.52941	JO-0, JO-1

Estadística descriptiva para la Fase 4: Regeneración: multiplicación de brotes.**Tabla 15. Brotes provenientes de hoja a los 60 días en medios suplementados con PVP**

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=47 MSE=3.746245 Critical Value=3.4226

Group	Count	Mean	Different From Groups
JR-1	17	3.107843	JR1-B5 , JR1-a
JR1-B5	17	6.421568	JR1-a, JR-1
JR1-a	17	8.411765	JR1-a , JR1-B5

Tabla 16. Brotes provenientes de tallo a los 60 días en medios suplementados con PVP.

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=47 MSE=0.9116488 Critical Value=3.4226

Group	Count	Mean	Different From Groups
JR-1	17	1.296296	JR1-a
JR1-B5	17	1.997821	
JR1-a	17	2.470588	JR1-a

Tabla 17. Brotes provenientes de hoja a los 90 días suplementados con Carbón Activado

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=47 MSE=0.4182543 Critical Value=3.4226

Group	Count	Mean	Different From Groups
JR-1	17	0.4008715	JR1-B5 , JR1-a
JR1-B5	17	1.599128	JR-1
JR1-a	17	2.058824	JR-1

Tabla 18. Brotes provenientes de tallo a los 90 días suplementados con Carbón Activado

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=47 MSE=0.670827 Critical Value=3.4226

Group	Count	Mean	Different From Groups
JR-1	17	0.5217865	JR1-a
JR1-B5	17	1.007625	
JR1-a	17	1.411765	JR-1

Estadística descriptiva para la Fase 5: Crecimiento, desarrollo y enraizamiento.

Tabla 19. Primera etapa. Supervivencia de brotes en medios con AIB (3mg.L⁻¹)

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=6 MSE=1027.333 Critical Value=3.4605

Group	Count	Mean	Different FromGroups
JE-1	4	61	
JE1-B5	4	74	

Tabla 20. Tercera etapa. Enraizamiento

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=6 MSE=529.9583 Critical Value=3.4605

Group	Count	Mean	Different FromGroups
JE-3	4	24.75	
JE3-B5	4	25.5	

- Abdelnour, A. 1994. Crioconservación de plantas. Estado actual de la investigación en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. Vol. 23, N° 2. 205-21 p.
- Abdelwahd, R; Hakam, N; Labhilili, M; UduPa, S. (2008). Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantl et regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology* 7: 997-1002 pp.
- Achten, W.; Verchot, L.; Franken, Y.; Mathijs, E.; Singh, V.; Aerts, R.; y Muys, B. (2010). *Jatropha* bio-diesel produccion and use. *Biomass and Bioenergy* 32, 1063-1084 pp.
- Acosta, E., J. Sánchez y M. Bañon. (2000). Auxinas. En: Azcón-Bieto. J. y M. Talón (Eds). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill. España. Pp. 305-323.
- Agramonte, D.F.; Jiménez, M.A. y Dita A. (1998). *Aclimatización en Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Editorial Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. 400 pp.
- Aguhob E. (2006). Tubang-bakod (*Jatropha curcas* L.). Research information series on ecosystems, [Electronic Version], 18 pp.
- Aliyu, O. (2005). Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: an appraisal. *African Journal of Biotechnology* 4: 1485-1489.
- Alvarado , Y. (1998). Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Pérez, J. (Ed). *Propagación y Mejora Genética por plantas de Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. Pp. 48-66.
- Amin, M.; Jaiswal, V. (1988). Micropropagation as anaid to rapid cloning of aguava cultivar. *Scientia Horticultura*. 36: 89-95 pp.
- Amiot, M.; Forget, F.; Goupy, P. (1996). Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and none-nzymatic derived products. *Herba Poloni-ca*- 42: 237-247 pp.
- Anderson, K. (2006). European Renewable Energy Review. World Bioenergy 2006. Conference & Exhibition on Biomasa for Energy. Touch Briefings.
- Apel, K. y Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of Plant Biology* 55: 373-399 pp.
- Aponte, C. H. (1978). Estudio de *Jatropho curcas* L. como recurso biótico. Tesis. Universidad Veracruzana, Xalapa-Enríquez. Veracruz, México. 70p.

- Arandal, M. A. (2009). Producción de células transformadas genéticamente estables de *Taxus globosa*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Azofeifa, A. (2007). Desarrollo de Metodologías para la caracterización de materiales promisorios de Jocote (*Spondias purpurea* L.) por medio de marcadores moleculares, para el rescate de embriones y para el cultivo de yemas *in vitro*. Tesis Mag. Sc., Sistema de estudios de Posgrado, Universidad de Costa Rica. 134 pp.
- Barba, A. (1994a). Cultivo de callos. En: Hurtado, D. y M. Merino (Eds). Cultivo de Tejido Vegetales. Trillas. México. Pp. 93-100.
- Barba, A. (1994b). Reguladores del crecimiento vegetal. En: Hurtado, D. y M. Merino (Eds). Cultivo de Tejido Vegetales. Trillas. México. Pp. 93-100.
- Bhatia, P. y Ashwath, N. (2008). Improving the quality of *in vitro* cultured shoots of tomato (*Lycopersicon esculentum* mill. Cv. Red coat.). *Biotechnology* 7: 188-193 pp.
- Bhojwani, S. S. y M. K. Razdan. (1983). Plant tissue culture: Theory and practice. Elsevier Science Publisher.
- Bray, E; Bailey-Serres, J; Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. *In: Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. eds. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. p. 1158-1203 pp.*
- Bon, M; Gendraud, M y Franclet, A. (1988). Roles of phenolic compounds on micropropagation of juvenile and mature clones of *Sequoiadendron giganteum*: influence of activated charcoal. *Scientia Horticultura. E 34: 283-291 pp.*
- Bonga J. M. y P. Von Aderkars. (1992). *In vitro* culture of trees. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 236 pp.
- Bonilla, G. (1999). Diferenciación de brotes adventicios de Caoba. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 75 pp.
- Burger, W. y Huft, M. (1995). "Flora costarricensis: Family #113: Euphorbiaceae". *Fieldiana: Botany . Field Museum of Natural History: USA. 165 pp.*
- Calvo, B. E. (2006). Biocombustibles de plantas para producción de biodiesel. *Rev. Soc. Quím. Perú. Vol. 72 (1): 44 -48.*
- Cassells, A. y Curry, R. (2001). Oxidative Stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant cell, Tissue and organ culture. E 64: 145-157 pp.*

- Castillo, A. 2004. Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. 8p.
- Castro, P., Coello, J. y Castillo, L. (2007). Opciones para la producción y uso del biodiesel en el Perú. Soluciones prácticas-ITDG. Clasificación SATIS. Descriptores OCDE. Serie libros 51. 1-78 pp.
- Chávez, V. (1993). Embriogénesis somática a partir de folíolos jóvenes de plantas maduras de *Ceratozamia Mexicana* var. robusta (Miq) Dyer (Zamiaceae) especie en peligro de extinción. Tesis de Doctorado en Ciencias, Facultad de Ciencias. UNAM. 148 pp.
- Collin, H. A. and S. Edwards. (1998). *Plant Cell Culture*. Bios Scientific Publisher Limited. Guildford, United Kingdom.
- Cronquist, J. A. (1988). *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. 2nd ed. Bronx, NY: New York Botanical Garden. 555 pp.
- Datta M. M., Mukherjee P., Ghosh B., y Jha T. B. (2007). In vitro clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). *Current Science*, [Electronic Version], 93, 1438 – 1442 pp.
- D' silva, I y D' souza, L. (1993). Controlling contamination and browning of *in vitro* culture-s of cashew. *Journal of Plantation Crops* 21: 22-29 pp.
- De la Vega, L. J.A. (2008). *Jatropha Curcas* L. Agro-Energía. 3-5 pp.
- Dehgan, B. y G. L. Webster (1975). Morphology and infrageneric relationships of the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). *University of California Publications in Botany*, vol 74.
- De Liñan, C. (1997). *Farmacología Vegetal*. Ediciones Agrotécnica, S. F. España. 1196 pp.
- Deore, A. C. y Johnson, T. S. (2008). High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: An important biodiesel plant, *Plant Biotech Rep*, 10-15 pp.
- Diez, J. y Gil, L. (1999). Culturing of cell tissues within the Spanish breeding programme against Dutchelm disease. In: *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. 307-311 pp.
- Dirks, R. y M. Buggenum (1989). *In vitro* plant regeneration from leaf and cotyledon explants of *Cucumis melo* L. *Plant Cell Reports*. 7: 626-627.

- Dixon, R. A. (1985). *Plant Cell Culture: A Practical Approach*. IRL Press Ltd. Oxford. UK.
- Doods J. H. y L. W. Roberts (1982). *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press. New York.
- Ebert, A; Taylor, F. y Blake, J. (1993). Changes of 6 benzylaminopurine and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in presence of activated charcoal. *Plant cell, Tissue and organ culture* 33: 157-162 pp.
- Esau. K. (1985). *Anatomía vegetal*. Omega. Barcelona. 779 pp.
- Evans, D. E., J. O. Coleman y A. Kears. (2003). *Plant cell culture*. Scientific Publishers. USA. 194 p.
- Falasca, S. y Ulberich A. (2007). Posibilidades de éxito de *Jatropha curcas* L en Argentina., (4) 2-3 pp.
- Fay, M. M. (1993). In what situation in vitro culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation*. (3): 176-183.
- Feike, T; Mueller, J. y Claupein, W. (2008). Examining germination rates of seeds of physic nut (*Jatropha curcas* L.) from Philippines and Viet Nam. Tropentag conference on: Competition for resources in a changing world: new drive for rural development. 24p.
- Figueiredo, S. F.L; Albarello, N; Viana, V. R. C. (2001). Micropropagation of *Rollinia mucosa* (JacQ.) BaiLL. *In vitro cellular and Development Biology Plant* 37: 471-475 pp.
- Frampton, L. J.; Amerson H. V.; Leach, G. N. (1998). Tissue culture method affects *ex vitro*, growth and development of loblolly pine. *New Forests* 16: 125-138 pp.
- Freire L. M.S; Bicudo, T. C; Rosenhaim, R; Sinfronio, F. S. M; Botelho, J. R; Filho, J. R.C; Santos, I. M. G; Fernandes, V. J; Filho, N. R. A. y Souza, A. G. (2009). Thermal investigation of oil and biodiesel from *Jatropha curcas* L, *J Therm Anal Calorim*. 1029-1033pp.
- Galván, T. A., (2005). Micropropagatin de *Neoxbamuina tetezco* (Cacteceae) del Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, con fines de conservación ex situ. Tesis de Licenciatura (Biología). Universidad Nacional Autónoma de México. Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Iztacala.
- Gamborg O. L., Miller R. A. Y Ojima K. (1968) Nutrient requeriments of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*. 50: 148-151.

- Gannoun, S; Lionakis, S; Gerasopoulos, D; Kaska, N; Kuden, A; Ferguson, L; Michailides, T. (1995). Aspects of *in vitro* culture of *Pistacia terebinthus* and *P. vera*. Acta Horticultura. E 419: 201-206 pp.
- García-Campusano, F. (2003). Ontogenia de brotes adventicios mediante el cultivo in vitro de embriones maduros de *Pseudotsuga macrolepis*, Fluos. Tesis de maestría en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias. UNAM. 88p.
- García, M. J. J. (2002). Influencia de la aplicación de los reguladores de crecimiento sobre la plasticidad fenotípica del *Pinus pseudostrobus* Lindl. (Pinaceae). Tesis de Doctorado en Ciencias: Área Ciencias Agrícolas y Forestales. Universidad de Colima, México. 126p.
- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. Reid and T. Thorpe. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. (32): 272-289.
- George, E. (1993). Plant propagation by tissue culture; Part 1. The technology. 2 ed. Exegetics Limited. England. 574 p.
- George, E. F. y P. D. Sherrington. (1984). Plant propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory Commercial Laboratories. Exegetics Limited, United Kingdom. 709p.
- George, E., M. Hall and G. De Klerk. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture. Vol. 1. Thre Background. 3rd edicion. Springer. Netherlands. Pp 34-36.
- Gohil, R. y Pandya, J. (2008). Genetic diversity assessment in physic nut (*Jatropha curcas* L.). Internacional Journal of Plant Produccion 2(4), 321-326 pp.
- Gómez-Pompa, A; Marín, A. I; Campo, G. J; Domínguez, L. H; Cano, A. L; Segura, J. L; Cuéllar, M. M; Fernández, S. J; Sánchez, S. O; Lozoya, Xavier. (2009). La xuta se come... Universidad Veracruzana. Direccion General Editorial. México 1^a Edición. Pp 71.
- Gopale, K.D. y Zunjarrao, R.S. (2013). *In Vitro* Culture of *Jatropha Curcas* L: A Biofuel Plant. International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology 16(2), 46-54 pp.
- Haberer, G. y J. Kieber. (2002). Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. Plant Physiology. (128): 354-362.
- Hartman, H. T; D. E. Kester; F. T. Davies y R. L. Geneve. (1997). Plant propagation: Principles and Practices. Prentice Hall. USA. Pp 216-176.

- Hazarika, B. N. (2006). Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108: 105–120 pp.
- Heller, J. (1996). Physic nut, *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use underutilized and neglected crops. 1. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy. 66 p.
- Henning, Reinhard K. (2004), “The Jatropha System”. Integrated Rural Development by Utilisation of *Jatropha curcas* L. (JCL) as Raw Material and as Renewable Energy. Studientag Möglichkeiten und Grenzen erneuerbarer Energien in Tanzania- Erfahrungen in der Partnerschaftsarbeit. Hamburg, Germany, Published by Tanzania-network.
- Huang L. y Murashige T (1977). Plant tissue culture media: major constituents; their preparation and some applications. *Tissue Cult. Assoc. Man.* 3: 539-545 pp.
- Huang, L. C; Lee, YL; Huang, BL; Kuo, CI; shaw, JF. (2002). High polyphenol oxidase activity and low titratable activity in browning bamboo tissue culture. *In Vitro cellular and Developmental Biology Plant* 38: 358–365 pp.
- INIAP (2008). El piñon (*Jatropha curcas* L) una alternativa de cultivo para zonas marginales secas. Estación Experimental: E.E. Portoviejo. Programa de Piñón. 2p.
- Instituto de Comunicación Social de Estado de Chiapas, (2010). www.icosochiapas.gob.mx
- ISIS. (Institute of Science in Society). (2007). *Jatropha Biodiesel Fever in India*.
- Jacques, R. L. Jr. (1988). The potato beetles. The genus *Leptinotarsa* in North America (Coleoptera: Chrysomelidae). *Flora & fauna handbook*. No. 3. E. J. Brill. NewYork.
- Jepsen, k . J; Henning, K. R. y Nyathi B. (2003). Generative Propagation of *Jatropha curcas* L. on Kalahari Sand. *Environment Africa*.Jha, T. 18p.
- Mukherjee, P. y Datta, M. (2007). Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnol Rep., India.* 1:135-140
- Johri, B. M. y Bhojwani, S. S. (1965). Growth responses of mature endosperm in cultures. *Nature* 208: Pp 1345-1347.
- Joker D. y Jepsen J. (2003). *Jatropha curcas* L. Seed leaflet No. 83. Danida Forest Seed Centre. Dinamarca.

- Jones N. y Miller J.H. (1992). *Jatropha curcas*: a multipurpose species for problematic sites. World Bank, Washington DC, USA, ASTAG Technical Papers - Land Resources. 1: 12.
- Karp, G. (1998). Biología celular y molecular. Traducido por Dr. J. Pérez. UNAM. McGraw-Hill Interamericana. México D.F., México. 746 p.
- Kathal, R., S. Bathangar y S. Bhojwani. (1988). Regeneration of plants from leaf explants of *Cucumis melo* cv. Pusa Sharbati. *Plant Cell Reports*. 7:449-451.
- Kathal, R., S. Bathangar y S. Bhojwani. (1994). Plant regeneration from the callus derived from root explants or *Cucumis melo* L. cv. Pusa sharbati. *Plant Sci*. 96: 137-142.
- Khurana-Kaul, V., S. Kachhwaha, S. L. Kothari. (2010). Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in medium. *Biologia plantarum* 54(2):369-372.
- King, a., He, W., Cuevas, J., Freudenberger, M. Ramiamanana, D. y Graham, I. (2009). Potencial of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. *Journal of Experimental Botany*, 60, 2897-2905 pp.
- Koon, S; Kondeti, S; Doulatbhadh, M; Pinnamaneni, R. (2011). *In vitro* clonal propagation of *Jatropha curcas* (L.) using nodal explant and assessment of genetic fidelity through RAPD markers. *Current Biotica, India*, 5(1): 1-16 pp.
- Kumar, A. y Shama, S. (2006). An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Industrial Crops and Products* 1 (28), 1-10 pp.
- Kumar, N; Anand, V. K. G y Reddy, M. P. (2011). *In vitro* regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas*. *Ind Crop Prod* 33: 146-151 pp.
- Kumar, N. y Reddy, M. P. (2010). Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant. *Ann Appl Biol* 156: 367– 375 pp.
- Kumar, N; Vijay K. G. y Reddy M. P. (2010). Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodiesel plant. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 917–924 pp.
- Larqué-Saavedra A. C. y Trejo, L. (1990). *El Agua en las Plantas*. Edit. Trillas. México. 88 p.
- Lee, Y. I. y N. Lee. 2003. Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 39:475-479.

- Li, M; Li, H; Jiang, H; Pan, X. y Wu, G. (2008). Establishment of an Agrobacterium- mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 92: 173-181.
- Liborio, C., B. Januzzi, S. Stefano y A. Martinelli. (2001). In vitro morphogenesis of *Cucumis melo* var, *indorus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 65: 81-89.
- Lin, J; Yan F; Tang, L; Chen, F. (2003). Antitumor effects of curcin from seeds of *Jatropha curcas*. *Acta Pharmacol Sin* 24(3); 241-246 pp. China.
- Lynch, P. (1999). Tissue culture techniques in vitro plant conservation. En: Benson E. (Ed.). *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor and Francis. United Kingdom. Pp 41-62.
- Lopes N., Teixeira T., Ribeiro L., Silva N., Neto H. y Melo M. (2007). Prospecção familiar: características fenotípicas do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) na Bacia do Riachão Norte de Minas Gerais. *Revista brasileira de agroecologia*, 2(2), 227 -231. Brasil.
- López D., Peñate L., Daquinta M., Pina D., y Escalona M. (2007). Cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas*, L. (Euphorbiaceae). Resultados preliminares y estrategias futuras. *Ecosolar*, 21(3).
- Matkowski, A. (2008). Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants a review. *Biotechnology advances* 26: 548-560 pp.
- Mauseth, J. (1998). *Plant Anatomy*. The Benjamín/Cummings Publishing Company. INC. USA. 560 pp.
- Margara, J. (1988). Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemas y la organogénesis. Ediciones Mundi- Prensa. España. 230 pp.
- Makkar, H.P.S.; J. Martínez-Herrera y K. Becker. (2008). Variations in Seed Number per Fruit, Seed Physical Parameters and Contents of Oil, Protein and Phorbol Ester in Toxican Non-Toxic Genotypes of *Jatropha curcas*. *Journal of Plant Sciences*, vol. 3, no 3, 260-265 pp.
- McBride, Francis F. (1951). Flora of Peru. Botanical Series. *Field Museum of Natural History*. Vol XIII, part III A, Number 1. Publication 680, 160-161 pp.
- Mejía, M. J. y Espinosa, F. A. (Comps). (2003). *Plantas Nativas de México con Potencial Ornamental*. UACH. México.
- Meng-Jun, L; Xin-Yu, Y; Wei-Xin, L; Ying, Xu; Ping, Huang; Fang, Y. y Fang C. (2006). Expression, Purification and Anti-tumor Activity of Curcin. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. Vol. 38. Pp 663–668.

- Mengyun, S. y Jingmin, J. (2004). A study on techniques of inducing callus and controlling browning of stem segments of *Parakmeria lotongensis*. Forest research 17: 757-762 pp.
- Misra, P; Gupta, N; Toppo, D. D; Pandey, V; Mishra, M. K; y Tuli, R. (2010). Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. Plant Cell, tissue and Organ Culture 100: 189-197.
- Misawa, M. (1994). Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome Italy.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science .7: 405-410 pp.
- Montiel M. J. y Ximhai, R. M. (2010). Potencial y riesgo ambiental de los bioenergéticos en México. Universidad Autónoma Indígena de México. El Fuerte, Sinaloa. Vol. 6, Número 1, 57-62 pp.
- Mukherjee, P., A. Varshney, T. Sudhakar, T. Baran. (2011). *Jatropha curcas*: a review on biotechnological status and challenges. Plant Biotechnology Reports 5: 197-215 pp.
- Münch, E. y Kiefer, J. (1986). Die Purgiernuss (*Jatropha curcas* L.); Diploma thesis, University of Hohenheim. Pp 277.
- Muñoz, M. y Jiménez, E. (2009). Caracterización morfológica de cuatro ecotipos de piñón (*Jatropha curcas*) asociados con teca (*Tectona grandis*). 8 p.
- Murashigue, T. Y F. Skoog. (1962). A revised medium from rapid growth and bioassays whit tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. (15): 427-429.
- Ndiaye S., Diallo B., Diop M., Diatta M., Sacor A., Nguer M. y Diouf M. (2006). *Jatropha curcas*: seed germination and propagation methods. Institut Sénégalais de Recherches Agricoles, Laboratoire National des Recherches sur les Productions Végétales, Route des Hydrocarbures, Bel-Air, Dakar, Senegal: Author.
- Nunes, L. (2007). Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Brasil, 78 p.
- Nunes C., Pasqual M., dos Santos D., Custódio T. y Gomes A. (2008). Diferentes suplementos no cultivo in vitro de embriões de pinhão-mansão. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 43(1), 9 – 14. Brasil.

- Nunes C., Dos Santos D., Pasqual M. Teixeira T. (2009). Morfologia externa de frutos, sementes e plântulas de pinhao-manso. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 44(2), 207 – 210 pp. Brasil.
- Nunes, F. C.; Dalilhia Nazaré dos Santos, Moacir Pasqual, Thaís Cainã Teixeira Valente, Ana Catarina Lima de Oliveira, Eduardo Alves, Tesfahun Alemu Setotaw (2013). Morphogenesis and regeneration of adventitious shoots in *Jatropha curcas* L. Australian Journal Crop Science: 1511-1519 pp.
- OCTAGON S.A. de C.V. Biocombustibles. (2006). “*Jatropha curcas* L. su expansión agrícola para la producción de aceites vegetales con fines de comercialización energética. Alianza en Energía y Ambiente con Centroamérica. Guatemala. 22p.
- Ogita, S. (2005). Callus and cell suspension culture of bamboo plant, *Phyllostachys nigra*. Plant Biotechnology 22: 119–125 pp.
- Pérez, M. E. (1999). Introducción al cultivo de tejidos vegetales, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México. 179 p.
- Perlack, R., Wright, L., Turhollow, A., Graham, R., Strockes, B., y Erbach D. (2005). Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: The technical feasibility of a billion-ton annual supply. Oak Ridge National Laboratory. Tennessee. U.S. Department of Energy. ORNL/TN-2005/66
- Petersen, K; Hansen, J. y Krogstrup, P. (1999). Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus xogiformis* Honda “Giganteus”. Plant cell, Tissue and organ culture. 58: 189-197 pp.
- Pierik, R. L. M. (1990). Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores. Edic. Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.
- Pollard, J. y J. Walker. (1990). Methods in Molecular Biology, Plant and Tissue Culture. Humana Press. New Jersey. USA. (6): 150-160.
- Prabakaran, A. J. y Sujatha, M. (1999). *Jatropha tanjorensis* Ellis y Saroja: a natural interspecific hybrid occurring in Tamil Nadu, India. Genet Resour Crop Evol 46:213-218.
- Prada, J.A. (2012). Regeneración de plantas vía organogénesis y crioconservación de *Jatropha curcas* L. 67-68 pp.
- Pramila, S; Neeraj, K; Shubham, O; Mohommad, A. y Zakwan, Ahmed. *In vitro* Plant Regeneration from Microshoot in *Jatropha curcas*. International Journal of Agriculture and Food Science Technology. 2010; 1 (1): 63-72.

- Preece, J. E. y Sutter, E.G. (1991). Aclimatización de micropropagada planta a la invernadero y campo. In: Debergh P. C., Zimmerman, R. H. Micropropagation technology and application. Editorial Dordrecht Kluwer Academic Press. 71-93 pp.
- Proyecto ERGAL. (2008). Estudio de Factibilidad: Sustitución de combustibles fósiles por biocombustibles en la generación de energía eléctrica en la Isla Floreana. Ecuador. 134p.
- Qin, W; Wei-Da, L; Yi, L; Shu-Lin, P; Ying, XU; Lin, T; Fang, C. (2004). Plant Regeneration from epicotyl explants of *Jatropha curcas*. J Plant Physiol Mol Biol. 30:475-478.
- Razdan, M. K. (2003). Introduction to plant tissue culture. 2^a ed. Enfield. New Hampshire. USA. Pp. 233-244.
- Rajore, S. y Batra, A. (2005). Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas*. J Plant Biochem Biot 14: 73-75 pp.
- Ramírez-Malagon, R; I. Aguilar-Ramírez; A. Borodanenko; L. Pérez-Moreno; J. L. Barrera-Guerra; H. G. Nuñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo. (2007). In vitro propagation of ten threatened species of Mammillaria (Cactaceae). In vitro Cell Developmental Biology-Plant. (43): 660-665.
- Reddy, K. R. K; Rao, G. P. y Bahadur, B. (1986). Efficiency of callus induction from leaf explants in four species of *Jatropha* L. J Swamy Bot Cl: 3:179-186.
- Rhimi, A; N. Ben y M. Boussaid. (2006). Plant regeneration via somatic embryogenesis from *in vitro* tissue culture in two Tunisian *Cucumis melo* cultivars Maazoun and Beji. Plant Cell Tissue Org. Cult. 84: 239-243.
- Robert, M. y V. Loyola. (1985). El cultivo de tejidos vegetales en México. En: Robert, M. L. y Loyola, V. M. (compiladores). El cultivo de tejidos vegetales en México. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., CONACYT. 167p.
- Roca, W. y Mroginski, L. (1993). Cultivo de tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Colombia: CIAT.
- Salvador, F. M., Ovando, M. I; Adriano, A. Ma.L.; Ruíz G. S; y Vázquez O. A. (2009). Desarrollo de tecnología para la producción sustentable de piñón (*Jatropha spp*) como alternativa para obtener bionergéticos e incrementar los índices de desarrollo de los agricultores: Bioenergía para el desarrollo de Chiapas. Biotecnología agropecuaria y biodiversidad en Chiapas. Folleto Técnico No. 2. Colegio de Biotecnólogos/Universidad Autónoma de Chiapas. México. 23pp.

- Samson, M; Mergear, G; Baudoin, J; Toussaint, A. 2011. Culture *in vitro* de *Jatropha curcas* L. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 15(4) 657-574
- Sánchez, C. (2001). Comparación de la respuesta morfogénica in vitro de cuatro diferentes poblaciones de *Picea chihuahuana* Martínez, especie mexicana endémica en peligro de extinción. Tesis de maestría, División de Estudios de posgrado de la Facultad de Ciencias, UNAM, 85 p.
- Sánchez, O. (2000). Micropropagación de algunas leñosas nativas. Editorial Trama. Universidad de Concepción, Chile. 322p.
- Sardana, J; Batra, A; Ali DJ. (2000). The use of somatic embryogenesis and applications in plant breeding. Euphytica 81:93-107.
- Sarlin, R., Sharma, M., Sinharay, S. y Malhotra, R. (2006). Jatropha-Palm biodiesel blends: An optimum mix for Asia. Fuel 86. 1365-1371 pp.
- Schwarz, O. y R. Beauty. (2000). Chapter 14. Organogenesis. En: Trigiano R. y D. Gray (Eds.). Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press. USA. Pp. 125-137.
- Seneviratne, P. y Wijesekara, G. (1996). The problem of phenolic exudates in *in vitro* culture of mature *Hevea brasiliensis*. Journal of Plantation Crop 24: 54-62 pp.
- Shao, H B; Chu, L Y; Shao, Ma; Cheruth, A. y Mi, H. M. (2008). Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. C.R. Biologies 331: 433-441 pp.
- Sharp W. R., M.R. Sondhal, L.S. Caldas y S.B. Maraffa. (1980). The physiology of asexual embriogénesis. Hort. Rev. 2:268-310.
- Srivastava, P. S. (1971). In vitro induction of triploid roots and shoots from mature endosperm of *Jatropha panduraefolia*. Z Pflanzenphysiol 66:93-96.
- Srivastava, P. S. y Johri, B. M. (1974). Morphogenesis in mature endosperm cultures of *Jatropha panduraefolia*. Beitr Biol Pflanz 50:255-268.
- Shrivastava, S. y Banerjee, M. (2008). In vitro clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Influence of additives. Int J Integr Biol. 3: 73-79 pp.
- Standley, Paul C. (1923). Trees and Shrubs of Mexico. *Contrib. U.S. Nature Herb.* vol.3, p. 634-642 pp.
- Standley, P. C. y Steyermark, J. A. (1949). Flora of Guatemala. *Fieldiana Botany.* vol. 24, no 6, 126-130 pp.

- Staubmann R., Ncube I., Gubitz G. M., Steiner W. y Read J. S. (1999). Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. Seeds J Biotechnol 75: 117-126 pp.
- Stevens, W. D., Ulloa C.; Pool A. y Montiel O. M. (2001). Flora de Nicaragua, 3 vols. St. Louis Missouri Botanical Garden Press.
- Sujatha, M., Makkar, H. P., y Becker, K. (2005). Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non toxic *Jatropha curcas* L. Plant Growth Regulation, 47, 83 – 90 pp.
- Sujatha, M. y Dhingra, M. (1993) Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerrima*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 35: 293-296.
- Sujatha, M. y Mukta, N. (1996) Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 44: 135-141.
- Sujatha, M. y Prabakaran AJ (2003) Characterization and utilization of Indian *Jatropha*. Indian J. Plant Genet. Resour. 10: 123-128.
- Sujatha, M. y Reddy, T. P. (2000). Morphogenic responses of *Jatropha integerrima* explants to cytokinins. Biologia (Bratis) 55:99-104.
- Tabiyeh, D; Bernard, F; Shacker, H. (2006). Investigation of glutathione, salicylic acid and AG3 effects on browning in *pistacia vera* shoot tips culture. Acta Horticultura -e- 726: 201-204 pp.
- Tejedor, B. 2010. Micropropagación de *Jatropha curcas* L. Trabajo final de carrera, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. 72 p.
- Trigiano, R. y Gray, D. (2004). Plant development and biotechnology. CRC Press USA.
- Uribe, L. I. (1998). Influencia de distintos antioxidantes sobre brotación y crecimiento *in vitro* de Ceiba (*Ceiba petandra* L. Gaerth). Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Valderrama, R; Corpas, F; Carreras, A; Fernández Ocaña-, A; Chaki, M; Luque, F; Gómez Rodríguez, M; Colmene Rovarea, P; De-l río, L; Ba-rroso, J. (2007). Nitrosative stress in plants. FeBs Letters 581: 453-461 pp.
- Van Staden, J; Fennell, C; Taylor, N. (2006). Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. Acta Horticultura. E 725: 55-62 pp.
- Vasil. I. K. (1994). Automation of plant propagation. Plant Cell Tissue Organ Culture. 39: 105-108.

- Vendiola E. y Ildao A. (2006). Tubang – bakod (*Jatropha curcas*): The crop of the future. Department of Environmental and Natural Resources, Region IV A – Calabarzon.
- Villavicencio, L. (2002). Optimización y caracterización fisiológica y bioquímica de cultivos en suspensión de células de maíz (*Zea mays*, L. raza chalqueño). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Voet, D. (2004). Bioquímica. *Ediciones Omega S. A.* Barcelona.
- Warakagoda, P. S. y Subasinghe, S. (2009). *In vitro* culture establishment and shoot proliferation of *Jatropha curcas* L. Tropical Agricultural Research y Extension 12(2). 4p.
- Webster, G. L. (1975). Conspectus of a New Classification of the Euphorbiaceae. *Taxon.*, vol. 24, no 5/6, p. 593-601 pp.
- Webster, G. L. y Burch, D. (1968). Part VI Family 97. EUPHORBIACEAE. En: Woodson, Robert E. and Schery, Robert W. Flora of Panamá. *Annals of the Missouri Botanical Garden.*, vol. 54, no 1, 211-350 pp.
- Wilbur, R.L. (1954). A synopsis of *Jatropha*, subsection *Eucurcas*, with the description of two new species from Mexico. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, vol.70, 92-101 pp.
- Yan F.Y. (2009). Manual de *Jatropha curcas*: Establecimiento y Manejo de plantaciones. 12p.
- Ziv, M. (1991). Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plant. En: Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. 1991. Micropropagation: Technology and application. Editorial Dordrecht, Kluwer Academic, 49-69 pp.

Páginas de internet:

- www.colinagro.com
- www.healthfraud.org
- www.icosochiapas.gob.mx
- www.microbiologia.com.ar
- www.mantra.com.ar
- www.uc.org.com
- www.vademecum.es