



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

EVALUACIÓN DE TRES VÍAS DE REGENERACIÓN IN VITRO DE DOS
CLONES PROMISORIOS DE PIÑÓN (*JATROPHA CURCAS L.*) DEL
BANCO DE GERMOPLASMA DEL INIAP

AUTOR

Alejandro Germán Navarro Hinojosa

AÑO

2020



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

**EVALUACIÓN DE TRES VÍAS DE REGENERACIÓN *IN VITRO* DE DOS
CLONES PROMISORIOS DE PIÑÓN (*JATROPHA CURCAS* L.) DEL BANCO
DE GERMOPLASMA DEL INIAP**

**Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología**

Profesor guía

PhD. Mauricio Andrés Racines Oliva

Autor

Alejandro Germán Navarro Hinojosa

2020

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Evaluación de tres vías de regeneración *in vitro* de dos clones promisorios de piñón (*Jatropha curcas* L.) del banco de germoplasma del INIAP, a través de reuniones periódicas con el estudiante Alejandro Germán Navarro Hinojosa, en el semestre 202010, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.




Mauricio Andrés Racines Oliva

Doctor of Bioscience Engineering

CI: 1710902162

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Evaluación de tres vías de regeneración *in vitro* de dos clones promisorios de Piñón (*Jatropha curcas* L.) del banco de germoplasma del INIAP, del estudiante Alejandro Germán Navarro Hinojosa, en el semestre 202010, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.



Fernando Xavier Rivas Romero

Máster Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

CI: 1718092701

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

A handwritten signature in blue ink, reading "Alejandro Germán Navarro Hinojosa", written over a horizontal line.

Alejandro Germán Navarro Hinojosa

CI: 1722314836

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres y a mi hermano por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí y en mis proyectos. Gracias por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante mi vida. Gracias a mi universidad, gracias por haberme permitido formarme en ella, gracias a todos mis maestros, que fueron los responsables de realizar su aporte, para que el día de hoy se viera reflejado en la culminación de mi carrera universitaria. También deseo agradecer al Departamento de Biotecnología del INIAP por permitirme y ayudarme a realizar esta investigación.

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación se lo dedico a mis Padres Cristóbal y Sanny, a mi hermano Álvaro, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí. A toda mi familia y amigos que siempre se mantuvieron pendientes de mí y de mi carrera universitaria.

La satisfacción radica en el esfuerzo, no en el logro. El esfuerzo total es una victoria completa (Mahatma Gandhi).

RESUMEN

El piñón (*Jatropha curcas* L.) es una planta perenne perteneciente a la familia Euphorbiaceae. Es originaria de Centroamérica y México, actualmente se cultiva en algunas zonas de Asia, África y América Latina. *J. curcas* ha despertado un gran interés científico debido a su extraordinaria capacidad para adaptarse a climas semiáridos, su alta resistencia a sequías y a suelos salinos. Además, las semillas que produce el piñón poseen un alto contenido de aceites vegetales no comestibles. Estos aceites pueden ser usados para la producción de combustibles sintéticos como el biodiesel. En Ecuador el piñón se siembra mediante técnicas tradicionales, por medio de estacas o semillas, siendo estas vías insuficientes para la generación masiva de plantas y por consiguiente la producción de biodiesel. Debido a la deficiente propagación y la falta de conocimiento sobre la diversidad genética de esta especie, se ha condicionado la posibilidad de generar materiales mejorados, por lo que todavía no se conoce una variedad de piñón altamente productiva. En esta investigación se evaluó tres vías de regeneración de cultivos *in vitro* de dos clones promisorios de *J. curcas* del INIAP: CP041 y CP052. El ensayo consistió en cultivar muestras de hojas y peciolo de estos genotipos en diferentes medios de cultivo diseñados para inducir la formación de callos, embriones somáticos y órganos adventicios. Los resultados mostraron que el genotipo Cp052 cultivado en el medio MICJ-2, el cual está suplementado con IAA y BAP, fue tratamiento más óptimo para inducir la formación de callos y brotes adventicios. Por otro lado, los resultados obtenidos del protocolo de embriogénesis somática muestran que esta vía de regeneración fue poco eficiente. Finalmente, las muestras del genotipo Cp041 cultivadas en MIBJ-2 el cual contenía sulfato de cobre, IBA y TDZ mostraron ser el tratamiento más óptimo para la inducción de organogénesis adventicia directa.

PALABRAS CLAVE: Callogénesis, embriogénesis somática, *Jatropha curcas* L., cultivo de tejidos, organogénesis adventicia

ABSTRACT

The pine nut (*Jatropha curcas* L.) is a perennial plant belonging to the family Euphorbiaceae. It is native to Central America and Mexico, currently grown in some areas of Asia, Africa and Latin America. *J. curcas* has aroused great scientific interest due to its extraordinary capacity for semi-arid climates, its high resistance to droughts and saline soils. In addition, the seeds that produce the pine nut contain a high content of inedible vegetable oils. These oils can be used for the production of synthetic fuels such as biodiesel. In Ecuador, the pine nut is sown by traditional techniques, by means of stakes or seeds, these routes being insufficient for the massive generation of plants and through the production of biodiesel. Due to the poor propagation and lack of knowledge about the genetic diversity of this species, the possibility of generating improved materials has been conditioned, so that a highly productive pine nut variety is not yet known. In this investigation, three in vitro culture regeneration pathways of two promising clones of *J. curcas* of INIAP were evaluated: CP041 and CP052. The test consists of growing samples of leaves and petioles of these genotypes in different culture media to induce the formation of calluses, somatic embryos and adventitious organs. The results that the Cp052 genotype cultivates in the MICJ-2 medium, which is supplemented with IAA and BAP, the most optimal treatment to induce the formation of calluses and adventitious buds. On the other hand, the results obtained from the somatic embryogenesis phase show that this regeneration path was inefficient. Finally, samples of the Cp041 genotype are grown in MIBJ-2 which contained copper sulfate, IBA and TDZ and are the most optimal treatment for induction of direct adventitious organogénesis.

KEYWORDS: Callogenesis, somatic embryogenesis, *Jatropha curcas* L., tissue culture, organogenesis

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	2
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. General.....	3
1.3.2. Específicos.....	4
1.4. Justificación de la investigación.....	4
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Taxonomía y descripción botánica.....	6
2.2. Regeneración de tejidos vegetales in vitro de <i>Jatropha curcas</i>	7
3. PROCEDIMIENTOS.....	9
3.1. Obtención del material vegetal.....	9
3.2. Diseño experimental.....	9
3.2.1. Protocolo de callogénesis de <i>J. curcas</i>	9
3.2.2. Protocolo de embriogénesis somática directa de <i>J. curcas</i>	12
3.2.3. Protocolo de organogénesis directa de <i>J. curcas</i>	14
3.3. Fase de introducción del material vegetal.....	15
3.4. Cultivo de los explantes.....	16
3.5. Análisis estadístico.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
4.1. Resultados.....	18
4.1.1. Protocolo de callogénesis de <i>J. curcas</i>	18
4.1.1.1. Medio de inducción de callos de <i>J. curcas</i> 1 (MICJ-1).....	20
4.1.1.2. Medio de inducción de callos de <i>J. curcas</i> 2 (MICJ-2).....	21
4.1.1.3. Medio de inducción de callos de <i>J. curcas</i> 3 (MICJ-3).....	23
4.1.1.4. Medio de inducción de callos de <i>J. curcas</i> 4 (MICJ-4).....	25
4.1.1.5. Análisis estadístico.....	26
4.1.2. Protocolo de embriogénesis somática de <i>J. curcas</i>	28

4.1.2.1. Medio de inducción de embriones somáticos de <i>J. curcas</i> 1 (MIEJ-1).....	30
4.1.2.2. Medio de inducción de embriones somáticos de <i>J. curcas</i> 2 (MIEJ-2)	30
4.1.2.3. Medio de inducción de embriones somáticos de <i>J. curcas</i> 3 (MIEJ-3)	31
4.1.3. Protocolo de organogénesis directa de <i>J. curcas</i>	32
4.1.3.1. Medio de inducción de brotes adventicios de <i>J. curcas</i> 1 (MIBJ-1).....	34
4.1.3.2. Medio de inducción de brotes adventicios de <i>J. curcas</i> 2 (MIBJ-2).....	35
4.1.3.3. Análisis estadístico.....	36
4.1.4. Maduración de los brotes adventicios de <i>J. curcas</i>	38
4.2. Discusión.....	39
4.2.1. Callogénesis.....	40
4.2.2. Embriogénesis somática	41
4.2.3. Organogénesis directa.....	42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
REFERENCIAS.	46
ANEXOS.....	53

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Jatropha curcas L. es un arbusto perenne que pertenece a la familia Euphorbiaceae y comúnmente es conocido como “Piñón” (Mariod et al., 2017). Es originaria de Centroamérica y México, aunque actualmente este arbusto es sembrado en muchos países de Asia, África y América Latina, gracias a su singular capacidad para adaptarse a climas semiáridos, a su alta resistencia a sequías y a suelos salinos (Heller, 1996). Comúnmente el piñón es sembrado como cerca para delimitar territorio, contener al ganado, controlar la erosión del suelo, como leña o incluso se lo utiliza como agente terapéutico en cierto casos (A. Kumar and Sharma, 2008). El piñón produce frutos durante todo el año, los cuales contiene tres semillas que son de color blanco, cubiertas por una testa oscura, de forma elipsoidal, de 2 cm de largo y un peso aproximado de 0,65 gramos. Cada semilla está compuesta por un 40 a 60% de aceites vegetales como los ácidos palmítico, esteárico, linoléico, oléico, etc (Mariod et al., 2017). Estos aceites vegetales pueden ser usados para la producción de biocombustibles (Castellar Ortega et al., 2014). Estos combustibles son derivados de biomasa por lo que se los considera como un recurso renovable, ya que los cultivos se cosechan específicamente con ese propósito (Maciel, 2009). Otro aspecto importante es que esta fuente de energía no genera un aumento neto de CO₂ en la atmósfera, debido a que las emisiones resultantes de su combustión son empleadas en su proceso de fotosíntesis (Nanda et al., 2018).

Cerca del final de la década de 1990 algunos países de Centroamérica iniciaron el cultivo de *piñón* para la producción de biocombustibles. A partir del año 2005 el cultivo de piñón se extendió por algunos países de Asia, África y América. Sin embargo los resultados obtenidos de estos proyectos no han sido tan favorables

como para comercializar aceite de piñón debido a problemas como la falta de conocimiento sobre el cultivo de piñón, condiciones climáticas poco favorables o metodologías de propagación poco eficientes (Castro Gonzáles, 2016). En países como Brasil, Cuba, Colombia, México y Ecuador se han realizado investigaciones con piñón desde el 2008 con el objetivo de generar biocombustibles sin comprometer la seguridad alimentaria, como al utilizar aceite de palma con este mismo fin (Mejía et al., 2015). En Ecuador, en el 2008 el Ministerio de Electricidad y Energía Renovable (MEER) impulsó la producción de aceite puro de piñón con el fin de convertirlo en biodiesel y utilizarlo para la generación de energía eléctrica en la isla Floreana de las Islas Galápagos (EFEverde, 2018). El aceite fue obtenido de semillas de piñón recolectadas en la provincia de Manabí (EFEverde, 2018). Sin embargo, la cantidad actual de aceite vegetal que se produce en el país es insuficiente para cubrir la demanda energética de las islas Galápagos (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2019).

En estudios realizados por Mejía y colaboradores (2015) en la Estación Experimental Portoviejo del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) se identificaron ciertas líneas de piñón por un alto rendimiento de producción de semilla y alto contenido de aceite vegetal, las cuales fueron CP041 alcanzando un rendimiento de 604,58 gramos de semillas por planta con un 53% de aceite por semilla. De igual manera el genotipo CP052 mostró un alto rendimiento al producir 423,76 gramos de semillas por planta con un 40% de aceite por semilla (Mejía et al., 2015).

1.2. Planteamiento del problema

Una planta de *J. curcas* puede producir entre uno a dos kilogramos de semillas por año desde los 2 años de edad, aunque este rendimiento puede aumentar

con los años de la planta. Sin embargo la producción de frutos es incierta (una o dos veces al año) lo que lo hace un cultivo insostenible (Mukherjee et al., 2011). En Ecuador y en otros países el cultivo de piñón se realiza de forma convencional, es decir por medio de estacas o a partir de semillas, limitando la generación masiva de plantas y por consiguiente la producción de biodiesel (Mejía et al., 2015). Las plantas obtenidas a partir de semillas son más resistentes y tienen una mayor longevidad que las plantas provenientes de estacas. Estas plantas de piñón comienzan a producir fruto desde los seis meses, aunque con un bajo rendimiento el cual se estabiliza a partir del segundo año. Cultivar por medio de estacas genera plantas con una menor resistencia a enfermedades y a sequias, además de una menor longevidad (Díaz et al., 2015). Investigaciones realizadas en Sudáfrica, India, Brasil y Nicaragua indican que la productividad del cultivo de piñón es muy baja para ser comercializada (Mukherjee et al., 2011). Debido a estas metodologías de propagación deficientes y a la falta de conocimiento sobre la diversidad genética de esta especie, se ha limitado la posibilidad de generar materiales mejorados genéticamente que puedan ser explotados comercialmente para la producción de biodiesel (Basha and Sujatha, 2007).

1.3. Objetivos

1.3.1. General

- Evaluar y estandarizar tres vías de regeneración *in vitro* de dos clones promisorios de piñón (*Jatropha curcas* L.) del INIAP

1.3.2. Específicos

- Estandarizar un protocolo para la inducción de organogénesis indirecta de callos a partir de hojas y peciolo de dos clones promisorios de piñón.
- Validar un procedimiento para la obtención de embriones somáticos a partir de hojas y peciolo de dos clones promisorios de piñón.
- Estandarizar un método para la obtención de brotes adventicios a partir de hojas y peciolo de dos clones promisorios de piñón.

1.4. Justificación de la investigación

Las técnicas de cultivo in vitro de tejidos vegetales constituyen una alternativa que permitirá obtener un gran número de plantas clonales con características uniformes (Garg et al., 2011). Dentro de las técnicas de cultivo de tejidos están: la organogénesis indirecta, la embriogénesis somática y la generación de brotes adventicios (Deepak et al., 2019). Estas técnicas permiten mejorar, mediante la inducción de mutaciones, la calidad y cantidad del producto que contiene cierta especie vegetal (Loyola and Ochoa Neftalí, 2016). Estas técnicas se basan en la capacidad de totipotencia que tienen las células vegetales y que, por medio de la manipulación de las condiciones de cultivo y la acción de fitorreguladores, las células pueden cambiar su patrón de expresión de tejido adulto a una expresión de genes de estado embrionario (Zheng Liu et al., 2018).

En el año 2007 Jha y colaboradores emplearon la técnica de embriogénesis somática con éxito para regenerar plantas de *Jatropha curcas* L. La inducción de embriones somáticos se realizó en un medio Murashige and Skoog (MS) con diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (IBA) y kinetina (Kin). Los investigadores demostraron que la mejor combinación para la inducción de

embriones somáticos de *Jatropha curcas* L. fue de 1.0 μM IBA y 2.3 μM Kin. Por su uso, tanto para la propagación masiva como para el mejoramiento genético, las tecnologías de biotecnología vegetal se han aplicado en varios cultivos (Bermúdez-Carabaloso et al., 2016). La inducción de mutaciones en estas estructuras primarias es un método que aumenta la posibilidad de generar mutantes sólidos en lugar de plantas quiméricas (Gutiérrez M. et al., 2003). Por lo que, es importante establecer una metodología para la generación de embriones somáticos y brotes adventicios de los genotipos de *Jatropha curcas* L., estructuras a las cuales se les podrá, en el futuro, inducir mutaciones usando herramientas como la radiación, para generar plantas con mejores rendimientos en producción de semilla y contenido de aceite vegetal.

2. MARCO TEÓRICO

Jatropha curcas L es un arbusto multipropósito que se ha extendido más allá de su lugar de origen gracias a sus llamativas características como: alta resistencia a la sequía, adaptación a climas áridos y suelos salinos (Basha and Sujatha, 2007). Además, la semilla que esta planta produce, contiene aceites vegetales útiles para la fabricación de biocombustibles y otros derivados como: fármacos, cosméticos, pesticidas, entre otros (Leela et al., 2011). Presenta un rápido crecimiento, se adapta a diferentes condiciones agroclimáticas y crece en suelos con pH no inferior a 4,5 (Divakara et al., 2010). Se desarrolla muy bien en tierras fértiles, incluso puede crecer en tierras arenosas y salinas, con cascajo o piedra ya que, esta planta mejora la fertilidad del suelo con su propia materia orgánica de desecho (Achten et al., 2010). Debido a estas características, este arbusto es usado para controlar la erosión del suelo, como cerca viva para controlar el ganado (A. Kumar and Sharma, 2008).

2.1. Taxonomía y descripción botánica

Jatropha curcas L. pertenece a la familia Euphorbiaceae (Heller, 1996). En la tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica de *J. curcas* L.

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de Jatropha curcas L.

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliopsida
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Euphorbiales
Familia	Euphorbiaceae
Género	<i>Jatropha</i>
Especie	<i>J. curcas</i>
Nombre común	Piñón

Nota: Clasificación taxonómica de Jatropha curcas L. (Heller, 1996)

J. curcas es un arbusto perenne que puede alcanzar desde los cinco metros de altura e inclusive hasta ocho metros bajo condiciones favorables. Su tronco es recto, de madera blanda y sus ramas crecen de manera articulada. Las hojas son de un color verde brillante, se forman de tres a cinco lóbulos acuminados poco profundos. La hoja crece de forma alterna opuesta con un filotaxis espiral, alcanza hasta quince centímetros de longitud y cae durante la temporada seca (Rousset et al., 2008). La floración ocurre durante todo el año en zonas de humedad permanente y temperaturas cálidas, generando un racimo de frutos drupáceos elipsoidales. Cada uno de estos frutos mide entre cuatro a cinco 5

centímetros de largo y entre tres a cuatro centímetros de ancho. Inicialmente los frutos son verdes y luego de un periodo de desarrollo y madurez de aproximadamente 60 días, la fruta toma un color amarillo (Zamarripa and Solís, 2013). Cada fruto contiene normalmente tres semillas ovoides, que pueden medir hasta tres centímetros de largo y entre uno y dos centímetros de ancho (Divakara et al., 2010). Las semillas que *J. curcas* produce tienen un alto contenido de aceite vegetal no comestible, que varía entre 35% a 55% (p/p) dependiendo del genotipo. Este aceite se puede utilizar en la elaboración de biocombustibles (Leela et al., 2011).

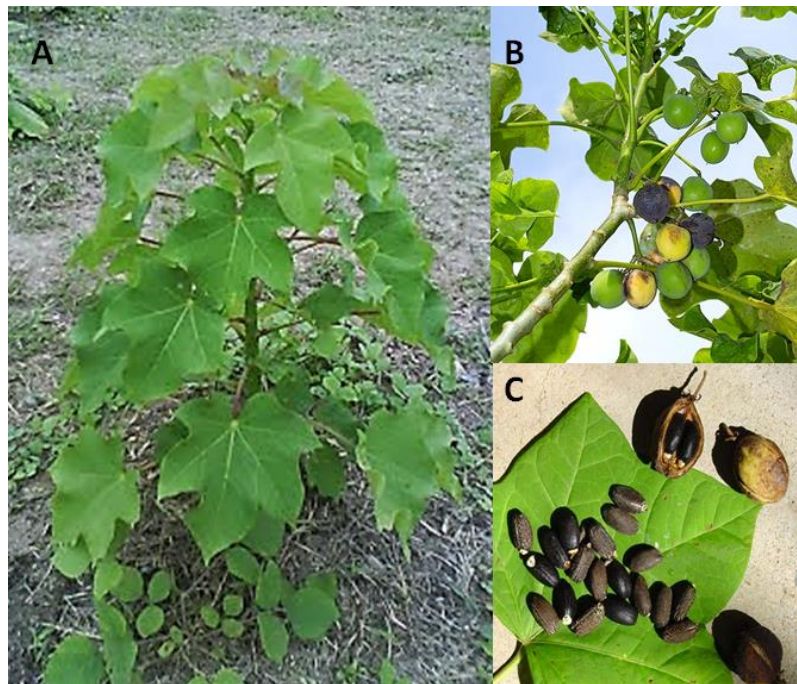


Figura 1. A) Planta de *Jatropha curcas*; B) Frutos de *J. Curcas*; C) Semillas de *J. curcas*

2.2. Regeneración de tejidos vegetales in vitro de *Jatropha curcas*

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales son una herramienta de biotecnología que permiten inducir la formación de células, tejidos u órganos *in vitro*, bajo condiciones ambientales controladas y asépticas (Bhojwani and

Dantu, 2013). Entre algunas de estas técnicas de cultivo de tejidos están la embriogénesis somática, la organogénesis directa y la organogénesis indirecta (Schum and Dohm, 2003). Estas técnicas se basan en la notable plasticidad de las células vegetales para la diferenciación celular, capacidad conocida como totipotencia, lo que quiere decir que todas las células vegetales, independientemente de su función o posición en la planta, contienen una copia integral del material genético. Por lo tanto, cada célula tiene el potencial para regenerar una nueva planta completamente funcional (Sugimoto et al., 2019). El trabajo *in vitro* permite mantener un control relativo sobre los procesos bioquímicos, morfológicos y fisiológicos que suceden en los tejidos vegetales (Anis and Ahmad, 2016). Este control se puede lograr alterando condiciones como pH, luz, temperatura, composición del medio de cultivo, los nutrientes y reguladores del crecimiento. También hay que tomar en cuenta el estado fisiológico del tejido vegetal, la fuente y el tamaño del explante (Anis and Ahmad, 2016). Es así que en algunas investigaciones como las de (Soomro y Asma Memon, 2007; (Singh et al., 2014; Jha et al., 2007; Elsayh S. A. A.; Sarhan, 2015; Chan et al., 2009), se ha estudiado la regeneración de callos a partir de tejidos de piñón. Un callo celular es una acumulación de células somáticas no diferenciadas (Bhojwani and Dantu, 2013). La inducción de estas estructuras se hizo cultivando explantes de *J. curcas* como discos de tejido foliar y peciolo en medios de cultivo MS suplementados con citoquininas como la kinetina y el 6-bencilaminopurina (BAP). La formación de embriones somáticos se puede lograr cultivando tejido vegetal o callos previamente establecidos en medios de cultivo con diferentes concentraciones 6-benzylaminopurine (BAP), ácido indolacético (IAA), ácido giberélico (AG₃) y kinetina. Esta vía de regeneración de tejidos ha sido probada con éxito en distintas investigaciones (Jha et al., 2007; Garg et al., 2011; Medipally et al., 2014; Chan et al., 2009). Otro mecanismo por el cual se pueden regenerar plantas *in vitro* es mediante la organogénesis directa o indirecta. Estos órganos adventicios, que pueden ser brotes o raíces y se originan a partir de los nuevos meristemos formados por las células que alguna vez estuvieron diferenciadas (Schum y Dohm, 2003). En investigaciones realizadas por (Sujatha y Mukta, 1996; Sujatha et al., 2005; Deore y Johnson,

2008; Khurana-Kaul et al., 2010; N. Kumar et al., 2011; Nunes et al., 2013; Attaya et al., 2012) se logró obtener brotes adventicios a partir de diferentes tejidos de *J. curcas* como hojas, peciolo, hipocótilo, entre otros. Estos explantes fueron cultivados en medios de cultivo suplementados con distintas concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento como el ácido indolbutírico (IBA), 6-bencilaminopurina (BAP), thidiazuron (TDZ).

3. PROCEDIMIENTOS

3.1. Obtención del material vegetal

Las hojas y peciolo se tomaron de las plantas de *J. curcas* correspondientes a los genotipos CP052 y CP041, que se encuentran en crecimiento a 28° C en el invernadero de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

3.2. Diseño experimental

La presente investigación constó de tres técnicas experimentales; inducción de callos, embriogénesis somática y organogénesis directa, para las cuales se utilizó el tejido foliar y los peciolo de los clones de *J. curcas*: CP041 y CP052.

3.2.1. Protocolo de callogénesis de *J. curcas*

Para el protocolo de inducción de callos se implementó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de 2x4x2. Los factores en estudio se detallan en la tabla 2.

Tabla 2.

Factores en estudio para el protocolo de inducción de callos de J. curcas

Genotipo (g)	Medio de cultivo (m)*	Explante (e)
g1= CP052	m1= MICJ-1	e1= hoja
	m2= MICJ-2	
g2= CP041	m3= MICJ-3	e2= peciolo
	m4= MICJ-4	

Nota: MICJ= Medio de Inducción de Callos de *J. curcas*

* la formulación de los medios de cultivo se detalla en el anexo 1

La unidad experimental estuvo conformada por una caja Petri de 60 x 15 mm, que contenía 15 ml de medio de cultivo con tres explantes de acuerdo a cada tratamiento establecido, con un total de cinco unidades experimentales por tratamiento. Los tratamientos descritos en la tabla 3, muestran la interacción de los tres factores en estudio anteriormente descritos (g; m; e).

Tabla 3.

Tratamientos para el protocolo de inducción de callos de J. curcas

Tratamiento	Código	Descripción
1	g1m1e1	Cp052 + m1+hoja
2	g1m1e2	Cp052 + m1+ peciolo
3	g1m2e1	Cp052 + m2+ hoja
4	g1m2e2	Cp052 + m2+ peciolo
5	g1m3e1	Cp052 + m3+ hoja
6	g1m3e2	Cp052 + m3+ peciolo
7	g1m4e1	Cp052 + m4+ hoja
8	g1m4e2	Cp052 + m4+ peciolo
9	g2m1e1	Cp041 + m1 + hoja
10	g2m1e2	Cp041 + m1 + peciolo
11	g2m2e1	Cp041 + m2 + hoja
12	g2m2e2	Cp041 + m2 + peciolo
13	g2m3e1	Cp041 + m3 + hoja
14	g2m3e2	Cp041 + m3 + peciolo
15	g2m4e1	Cp041 + m4 + hoja
16	g2m4e2	Cp041 + m4 + peciolo

Como variable de respuesta se evaluó el número de órganos adventicios generados por cada tratamiento.

Adicionalmente, se analizaron variables cualitativas como: Tiempo de apareamiento de los callos, el tipo de callos (Embriogénico, Organogénico o No Morfogénico), la consistencia y el color del callo, medidas en porcentajes.

3.2.2. Protocolo de embriogénesis somática directa de *J. curcas*

Para el protocolo de embriogénesis somática se implementó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de 2x3x2. Los factores en estudio se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4.

Factores en estudio para el protocolo de inducción de embriones somáticos de J. curcas

Genotipo (g)	Medio de cultivo (m)*	Explante (e)
g1= CP052	m1= MIEJ-1	e1= hoja
g2= CP041	m2= MIEJ-2	e2= peciolo
	m3= MIEJ-3	

Nota: MIEJ= Medio de Inducción de Embriones de *J. curcas*

* la formulación de los medios de cultivo se detalla en el anexo 2

La unidad experimental estuvo conformada por una caja Petri de 60 x 15 mm, que contenía 15 ml de medio de cultivo con tres explantes de acuerdo a cada tratamiento establecido, con un total de cinco unidades experimentales por tratamiento. En la Tabla 5 se encuentran descritos los tratamientos muestran la interacción de los tres factores de estudio anteriormente descritos (g; m; e) para el protocolo de embriogénesis somática.

Tabla 5.

Tratamientos para el protocolo de embriogénesis de J. curcas

Tratamiento	Código	Descripción
1	g1m1e1	Cp052 + m1 + hoja
2	g1m1e2	Cp052 + m1 + peciolo
3	g1m2e1	Cp052 + m2 + hoja
4	g1m2e2	Cp052 + m2 + peciolo
5	g1m3e1	Cp052 + m3 + hoja
6	g1m3e2	Cp052 + m3 + peciolo
7	g2m1e1	Cp041 + m1 + hoja
8	g2m1e2	Cp041 + m1 + peciolo
9	g2m2e1	Cp041 + m2 + hoja
10	g2m2e2	Cp041 + m2 + peciolo
11	g2m3e1	Cp041 + m3 + hoja
12	g2m3e2	Cp041 + m3 + peciolo

Como variable de respuesta se evaluó el número de embriones somáticos generados por cada tratamiento.

Adicionalmente, se analizaron variables cualitativas como: Tiempo de apareamiento de embriones, el estadio del embrión (globular, corazón, torpedo o cotiledonar) y el origen (directo, indirecto), medidas en porcentajes.

3.2.3. Protocolo de organogénesis directa de *J. curcas*

Para el protocolo de organogénesis directa se implementó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial de 2x2x2. Los factores en estudio se detallan en la tabla 6.

Tabla 6.

Factores en estudio para el protocolo de inducción de brotes adventicios de J. curcas

Genotipo (g)	Medio de cultivo (m)*	Explante (e)
g1= CP052	m1= MIBJ-1	e1= hoja
g2= CP041	m2= MIBJ-2	e2= peciolo

Nota: MIBJ= Medio de Inducción de Brotes adventicios de *J. curcas*

* la formulación de los medios de cultivo se detalla en el anexo 3

La unidad experimental estuvo conformada por una caja Petri de 60 x 15 mm, que contenía 15 ml de medio de cultivo con tres explantes de acuerdo a cada tratamiento establecido, con un total de cinco unidades experimentales por tratamiento. Los tratamientos descritos en la tabla 7, muestran la interacción de los tres factores de estudio anteriormente descritos (g; m; e).

Tabla 7.

Tratamientos para el protocolo de inducción de brotes adventicios de J. curcas

Tratamiento	Código	Descripción
1	g1m1e1	Cp052 + m1 + hoja
2	g1m1e2	Cp052 + m1 + peciolo
3	g1m2e1	Cp052 + m2 + hoja
4	g1m2e2	Cp052 + m2 + peciolo
5	g2m1e1	Cp041 + m1 + hoja
6	g2m312	Cp041 + m1 + peciolo
7	g2m2e1	Cp041 + m2 + hoja
8	g2m2e2	Cp041 + m2 + peciolo

Como variable de respuesta se evaluó el número de brotes adventicios generados por cada tratamiento.

Adicionalmente se registró el tiempo de apareamiento de los brotes y el tipo de órgano que formaron (Hoja, Tallo o Raíz), medidas en porcentajes.

3.3. Fase de introducción del material vegetal

Las hojas y peciolo recolectados para todos los protocolos ensayados en esta investigación, fueron lavados con agua y jabón, retirando impurezas de su superficie. A continuación, se aplicó un tratamiento antifúngico de 1 mL de Carbendazim (Agripac) en 100 mL de agua en agitación durante 5 minutos en vortex Orbit™ a 70 rpm. Posteriormente, dentro de cámara de flujo, se realizaron cinco lavados con agua estéril para remover excesos del fungicida. Luego las muestras fueron sumergidas en una solución de 90 ml de agua con 10 mL de

hipoclorito de sodio (Clorex 5%) y cinco gotas de TWEEN 20 (SIGMA ALDRICH) durante 10 min en agitación. Finalmente, se realizaron tres lavados con agua estéril (Jha et al., 2007).

3.4. Cultivo de los explantes

Utilizando material completamente esterilizado, se cortaron pequeños trozos de las hojas a nivel de la nervadura principal (1 cm) y de los peciolo (1 cm). Por separado, estos explantes fueron cultivados en los diferentes medios diseñados para cada protocolo de la investigación, los cuales se detallan en los anexos 1 al 3. Estos tratamientos fueron colocados en un cuarto de cultivo con las siguientes condiciones:

- Temperatura promedio: $20\pm 2^{\circ}\text{C}$
- Fotoperiodo: 16 horas de luz; 8 horas de oscuridad
- Intensidad de luz: $42\text{-}48 \text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$
- Humedad relativa: 40%

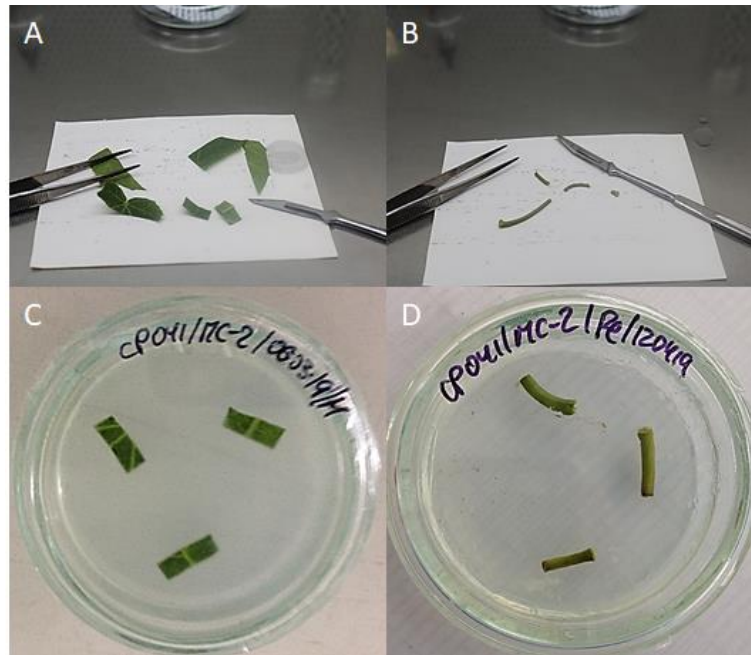


Figura 2. Corte de los explantes para cultivo. A) Hojas. B) Peciolos. C) Unidad experimental con 3 explantes de hoja. D) Unidad experimental con 3 explantes de peciolo.

Todos los tratamientos fueron monitoreados semanalmente, durante 8 semanas. Cada dos semanas se realizó la renovación del medio de cultivo de cada tratamiento.

Los brotes adventicios obtenidos durante los protocolos 1 y 3 (o. indirecta y o. directa) fueron trasplantados a un medio para inducir su desarrollo y elongación, MEBJ-1 que se detalla en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..** El segundo protocolo no mostró la formación de embriones somáticos por lo que no se pudo continuar a una fase de maduración.

3.5. Análisis estadístico

Primero se realizó una prueba Shapiro Wilk con el número de órganos adventicios y el número embriones somáticos obtenidos durante los 3 protocolos de esta

investigación, para saber si los datos registrados mantenían una distribución homogénea. Al conocer que los datos registrados no mantenían una distribución normal se realizó la prueba Kruskal Wallis (KW) para comprobar si existen diferencias significativas entre los factores (g; m; e) y entre los tratamientos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Protocolo de callogénesis de *J. curcas*

A continuación, se describen los resultados del efecto que causó cada medio de cultivo sobre el tejido vegetal de los genotipos CP041 y Cp052 de *J. curcas*. En la tabla 8 se muestran los porcentajes de las variables cualitativas registradas en cada tratamiento durante este ensayo.

Tabla 8.

Porcentajes de las variables registradas durante el protocolo de callogénesis de J. curcas

Genotipo	Medio	Explante	Tratamiento	Callo	Consistencia/color			Tipo de callo		
					Compacto/verde	Frágil/blanco	Emb.	Org.	No Mor.	
Cp052	MICJ-1	H	1	100%	100%	100%	0%	0%	100%	
		Pe	2	80%	20%	80%	0%	0%	100%	
	MICJ-2	H	3	100%	100%	100%	0%	100%	0%	
		Pe	4	100%	80%	100%	0%	20%	80%	
	MICJ-3	H	5	80%	0%	80%	0%	0%	100%	
		Pe	6	40%	0%	40%	0%	0%	100%	
	MICJ-4	H	7	100%	100%	80%	0%	40%	60%	
		Pe	8	60%	0%	60%	0%	0%	100%	
	MICJ-1	H	9	0%	0%	0%	0%	0%	0%	
			10	0%	0%	0%	0%	0%		
		H	11	100%	100%	80%	0%	40%	60%	
			12	100%	40%	100%	0%	0%	100%	
MICJ-3	H	13	60%	0%	60%	0%	0%	100%		
	Pe	14	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
MICJ-4	H	15	80%	0%	80%	0%	0%	100%		
	Pe	16	40%	0%	40%	0%	0%	100%		

4.1.1.1. Medio de inducción de callos de *J. curcas* 1 (MICJ-1)

El tejido vegetal del genotipo CP052 cultivado en el medio MICJ-1, correspondiente al tratamiento 1 mostró desarrollo de callos desde la primera semana. Inicialmente los callos eran de color blanco-amarillento y de textura frágil. Al cabo de cuatro semanas, el 100% de las observaciones de los explantes de hoja presentaban callos de color verde y de consistencia compacta, como se puede observar en la figura 3A. En cuanto al tratamiento 2 correspondiente a los peciolos, el 80% de observaciones generó callos de color verde y compacto hasta la semana 4, como se observa en la Figura 3B. A partir de la quinta semana los explantes y los callos se oxidaron.

Por otro lado los explantes del genotipo CP041 cultivados en el medio MICJ-1, correspondientes a los tratamientos 9 y 10, presentaron formación de callos de color blanco y consistencia frágil en la segunda semana, sin embargo, todo el tejido vegetal y los callos formados se oxidaron desde la cuarta semana como se puede ver en la figura 3 C-D.

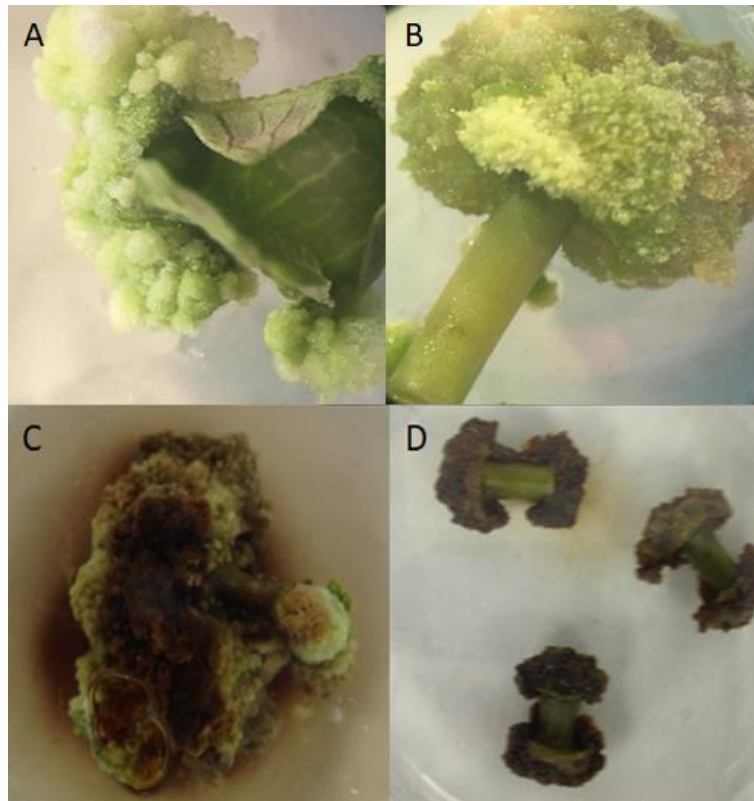


Figura 3. A) Formación de callos a partir de tejido foliar del genotipo Cp052 en MICJ-1; B) Formación de callos a partir de peciolo del genotipo Cp052 en MICJ-1; C) Callos a partir de hoja del genotipo Cp041 en proceso de oxidación en MICJ-1; D) Oxidación de callos a partir de peciolo del genotipo Cp041 en MICJ-1

4.1.1.2. Medio de inducción de callos de *J. curcas* 2 (MICJ-2)

Las hojas y peciolo del genotipo Cp052 se adaptaron mejor al medio MICJ-2. Los explantes formaron callos desde la primera semana, el cual era de color blanco y de textura frágil. Al cabo de la tercera semana los callos tomaron un color verde con una consistencia compacta. Estos callos siguieron aumentando su volumen hasta la octava semana de observación, tiempo en el que el 100% de los tratamientos 3 y 4 presentaron callos. En la sexta semana el 100% de los callos de estos tratamientos mostraron la formación de órganos adventicios.

Estos brotes que inicialmente eran de forma globular, dieron lugar a la formación de pequeñas hojas, como se puede observar en la Figura 4.

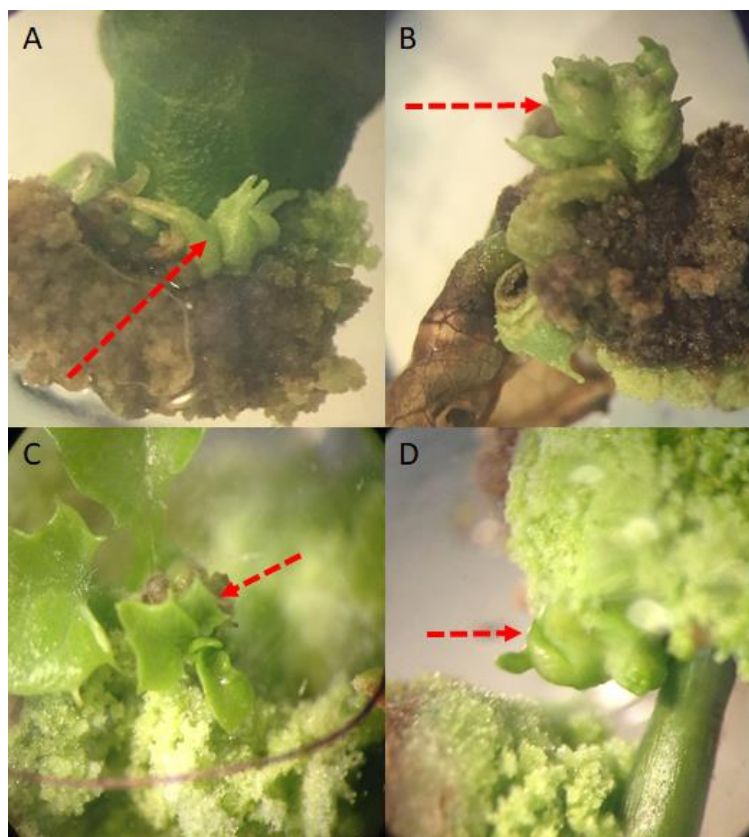


Figura 4. A-C) Formación de brotes adventicios en el tejido foliar del genotipo Cp052 en MICJ-2; D) Brote adventicio formándose a partir del callo de peciolo del genotipo Cp052 en MICJ-2. Las flechas rojas señalan a los brotes adventicios.

En cuanto al tejido vegetal del genotipo Cp041 cultivado en el medio MICJ-2, presentó formación de callos desde la primera semana, todas de las observaciones del tratamiento 11 formaron callos de color verde y de consistencia compacta en la quinta semana. Los tratamientos correspondientes a los explantes de peciolo apenas mostraron aproximadamente un 40%

formación de callos verde/compacto. En la séptima semana se pudo observar que ese aproximado el 40% de callos obtenidos de hojas produjeron brotes adventicios, los que se pueden observar en la Figura 5.

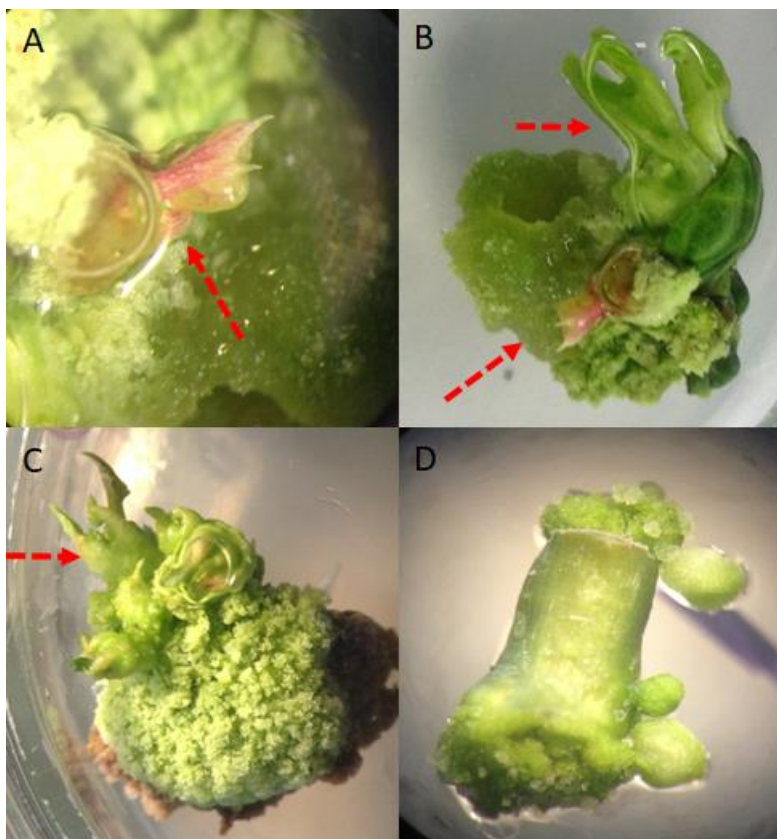


Figura 5. A-C) Brotes adventicios del genotipo Cp041 obtenidos en el MICJ-2; D) Explante de peciolo del genotipo Cp041 en MICJ-2. Las flechas rojas señalan a los órganos adventicios.

4.1.1.3. Medio de inducción de callos de *J. curcas* 3 (MICJ-3)

El tejido vegetal del genotipo Cp052 cultivado en el medio MICJ-3 mostró desarrollo de callos desde la primera semana. Inicialmente los callos eran de color blanco y de textura frágil. En la cuarta semana, el 80% de las observaciones del tratamiento 5 y el 40% de 6 presentaban este mismo tipo de

callo. Luego de la quinta semana de desarrollo, los explantes y los callos se oxidaron como se muestra en la Figura 6 A-B.

Los explantes del genotipo Cp041 cultivados en el medio MICJ-3, presentaron formación de callos desde la primera semana, en la tercera semana el 60% del tratamiento 13 y el 80% de 14 formaron callos de color blanco y consistencia frágil. Sin embargo, todo el tejido vegetal y los callos formados se oxidaron en la cuarta semana como se puede observar en la Figura 6 C-D.

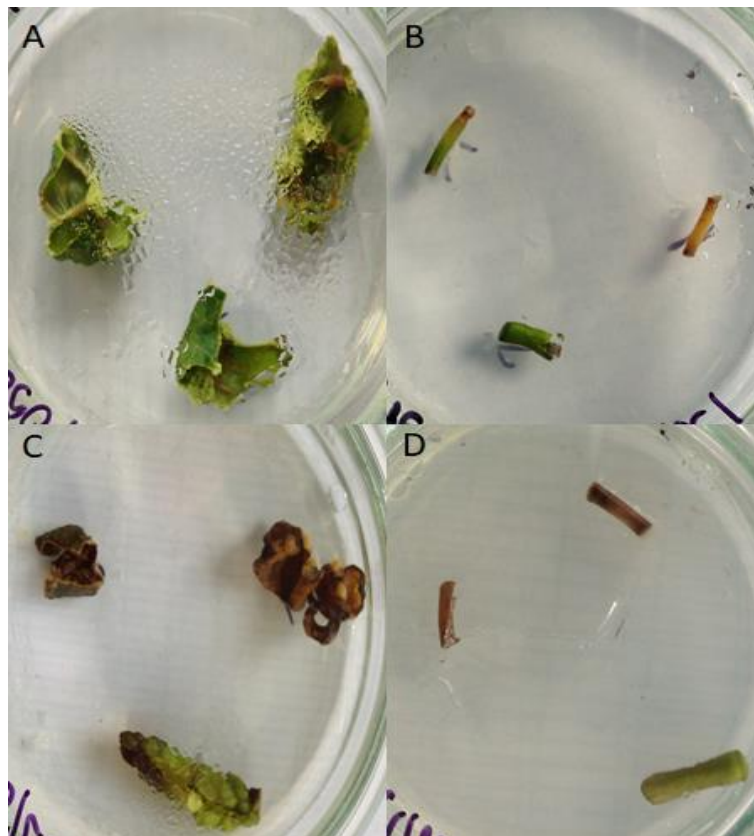


Figura 6. A-B) Explantes de hoja y peciolo del genotipo Cp052 cultivados en el MICJ-3; B) Hojas y peciolos del genotipo Cp041 cultivados en el MICJ-3;

4.1.1.4. Medio de inducción de callos de *J. curcas* 4 (MICJ-4)

El medio MICJ-4 indujo la formación de callos en los explantes de hoja y peciolo del genotipo Cp052 desde la primera semana de observación. El 100% de las observaciones del tratamiento 7 presentaron callos de color verde y de consistencia compacta, al cabo de la tercera semana. En la quinta semana, el 40% de estos ensayos formaron brotes adventicios, como se pueden ver en la Figura 7A. Estos brotes se siguieron desarrollando en un medio de cultivo para inducir elongación anexo 4. Los tratamientos 15 y 16 correspondientes al tejido foliar y peciolo del genotipo Cp041 cultivados en el medio MICJ-4, mostraron la formación de callos desde la primera semana. Los callos eran de color blanco y de textura frágil, como se puede ver en la Figura 7 C-D. Estos se mantuvieron hasta la quinta semana, luego el tejido vegetal y los callos se oxidaron.

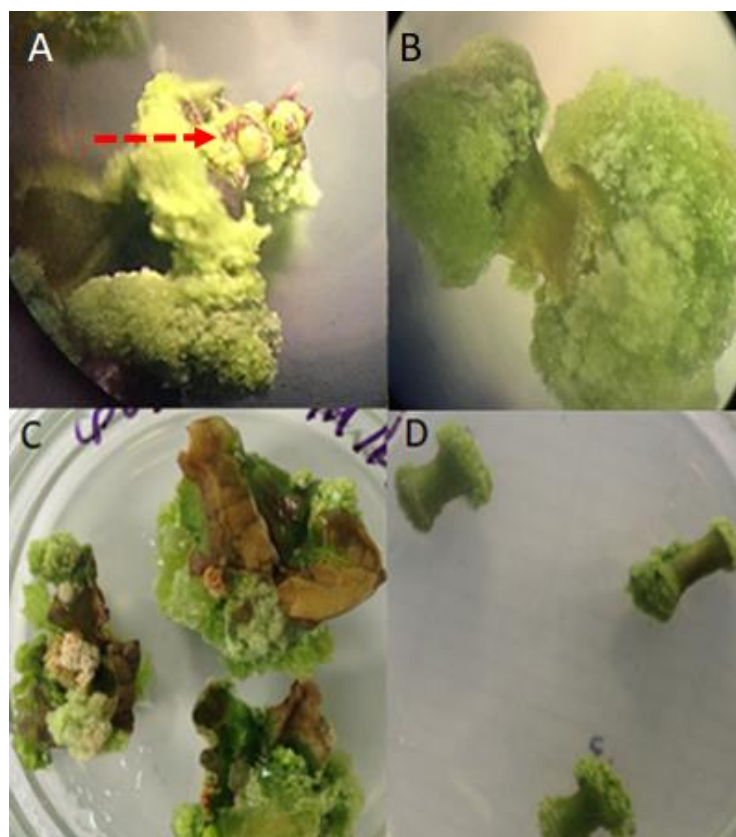


Figura 7. A) La flecha roja señala a los órganos adventicios obtenidos en el MICJ-4 a partir de explante de hoja del genotipo Cp052; B) Peciolo del genotipo Cp052 en MICJ-4 C-D) Explantes de hoja y peciolo del genotipo Cp041 en MICJ-4

4.1.1.5. Análisis estadístico

Los resultados de la prueba KW que se muestra en la tabla 9, indican que existen diferencias significativas entre ambos genotipos ($p \leq 0.05$), por lo que se puede interpretar que el genotipo CP052 tiene una mayor capacidad organogénica que el genotipo Cp041.

Tabla 8.

Prueba de KW realizada con el número de brotes adventicios obtenidos a partir de callos. Análisis entre genotipos.

Prueba de Kruskal Wallis						
Factor	Variable	N	Medias	D. E.	H	p
Genotipo Cp052	Número brotes	40	1,05	2,54	2,55	0,0101*
Genotipo Cp041	Número brotes	40	0,05	0,22		

En la Tabla 9 se observan los resultados de la prueba KW para los medios de cultivo. Con un valor $p \leq 0.05$ se puede interpretar que existen diferencias altamente significativas entre la capacidad de los medios de cultivo para inducir la formación de órganos adventicios. Según estos resultados, el medio MICJ-2 fue el más óptimo de los ensayados para inducir la formación de callos y brotes adventicios. El medio estuvo compuesto por concentraciones iguales de citoquininas y auxinas (3 ppm de IAA y BAP). El medio MICJ-4 también indujo la formación de órganos adventicios, el cual estuvo compuesto por dos citoquininas (1 ppm de BAP y 1 ppm kinetina). Los demás medios de cultivo no indujeron ningún tipo de organogénesis.

Tabla 9.

Prueba de KW realizada con el número de brotes adventicios obtenidos a partir de callos. Análisis entre medios de cultivo

Prueba de Kruskal Wallis						
Factor	Variable	N	Medias	D. E.	H	p
MICJ-1	Número brotes	20	0,00	0,00	7,98	0,0001***
MICJ-2	Número brotes	20	1,75	3,26		
MICJ-3	Número brotes	20	0,00	0,00		
MICJ-4	Número brotes	20	0,45	1,28		

Los resultados obtenidos de la prueba de KW para el tipo de tejido que se muestran en la *Tabla 10*, indican que si existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los explantes y su capacidad para generar brotes. Según este ensayo el tejido foliar tiende a producir más brotes adventicios que los peciolo.

Tabla 10.

Prueba de KW realizada con el número de brotes adventicios obtenidos a partir de callos. Análisis entre explantes.

Prueba de Kruskal Wallis						
Factor	Variable	N	Medias	D. E.	H	p
Hoja	Número brotes	40	1,05	2,54	2,55	0,0101*
Peciolo	Número brotes	40	0,05	0,22		

El análisis de interacción entre los tres factores que se muestra en la *Tabla 11*, demuestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos sin distinción de factores ($p \leq 0.05$). La información de la prueba de KW indica que el tratamiento 3, correspondiente al tejido foliar del genotipo Cp052, cultivado en el

medio MICJ-2, fue el más óptimo para inducir la formación de brotes adventicios a partir de callos.

Tabla 11.

Prueba de KW realizada con el número de brotes adventicios obtenidos a partir de callos. Análisis de interacción entre los tres factores.

Prueba de Kruskal Wallis; Interacción entre factores			
Tratamiento	Medias	H	p
3	6,20	20.67	0.0001***
7	1,80		
11	0,40		
4	0,40		

Nota: Los tratamientos que no se muestran en la tabla fueron omitidos por falta de datos

4.1.2. Protocolo de embriogénesis somática de *J. curcas*

A continuación, se describen los resultados del efecto que causó cada medio de cultivo sobre el tejido vegetal de los genotipos CP041 y Cp052 de *J. curcas*. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran los porcentajes de las variables cualitativas registradas en cada tratamiento durante este ensayo.

4.1.2.1. Medio de inducción de embriones somáticos de *J. curcas* 1 (MIEJ-1)

Al finalizar el ensayo, el medio MIEJ-1 no indujo la formación de embriones somáticos en ninguno de los tratamientos. Este medio de cultivo provocó la formación de callos en algunos de los explantes, y otros simplemente se oxidaron durante el tiempo de evaluación, como se puede observar en la Figura 8.

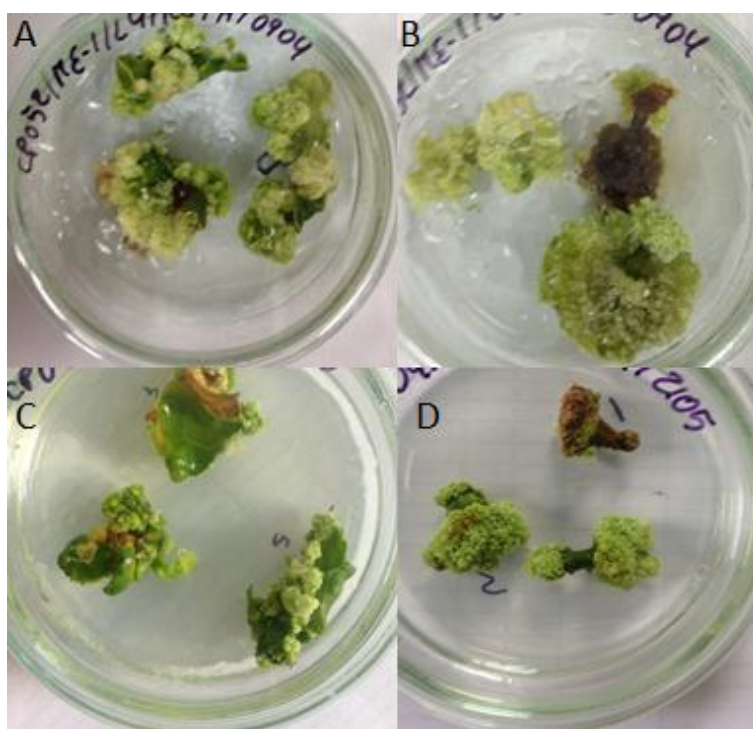


Figura 8. A-B) Hojas y peciolo del genotipo Cp052 cultivado en MIEJ-1 con formación de callo; C-D) Hojas y peciolo del genotipo Cp041 cultivado en MIEJ-1 con formación de callo

4.1.2.2. Medio de inducción de embriones somáticos de *J. curcas* 2 (MIEJ-2)

El tejido vegetal de ambos genotipos, no mostraron la formación de embriones somáticos durante las 8 semanas de evaluación bajo el efecto del MIEJ-2, sin embargo, este medio de cultivo indujo la formación de callos en ciertos explantes

como se puede ver en la Figura 9. Los porcentajes de las variables cualitativas registradas en este protocolo de la investigación se muestran en la tabla 13.

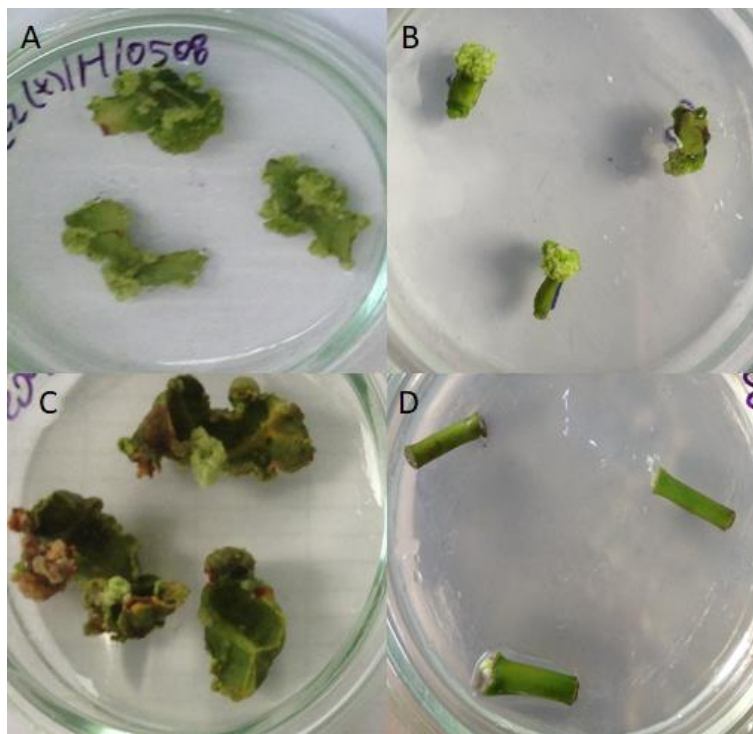


Figura 9. A-B) Explantes de hojas y peciolo del genotipo Cp052 cultivado en MIEJ-2 con formación de callo cultivados en MIEJ-2; C-D) Explantes de hojas y peciolo del genotipo Cp041 cultivado en MIEJ-2 con formación de callo cultivados en MIEJ-2

4.1.2.3. Medio de inducción de embriones somáticos de *J. curcas* 3 (MIEJ-3)

Las hojas y peciolo de los dos genotipos cultivados en el medio MIEJ-3 no mostraron la formación de embriones somáticos durante los ensayos, aunque este medio de cultivo indujo la formación de callos en ciertos explantes como se puede ver en la figura 10. Los porcentajes de las variables cualitativas registradas en este protocolo de la investigación se muestran en la tabla 13.

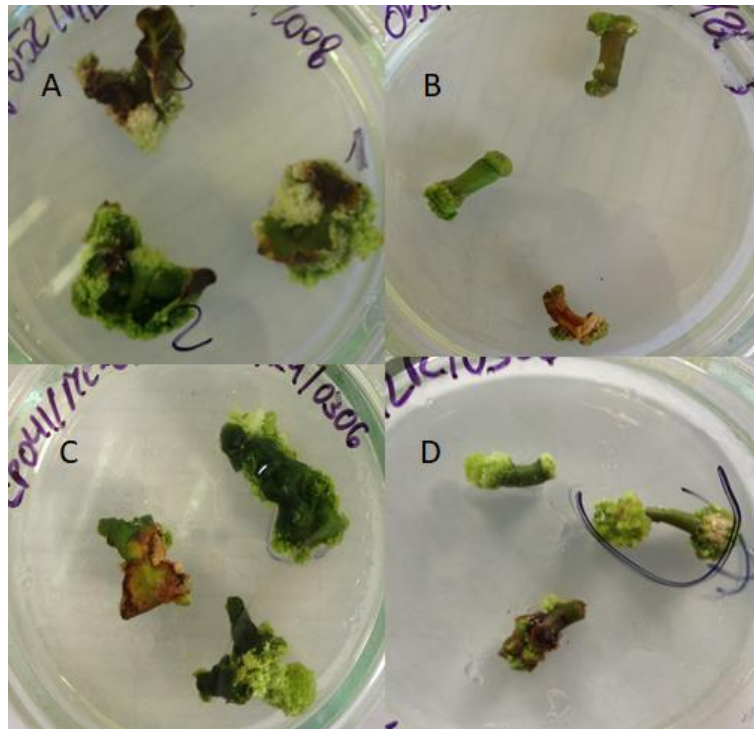


Figura 10. A-B) Hojas y peciolo del genotipo Cp052 cultivado en MIEJ-3 con formación de callo; C-D) Hojas y peciolo del genotipo Cp041 cultivado en MIEJ-3 con formación de callo

4.1.3. Protocolo de organogénesis directa de *J. curcas*

A continuación, se describen los resultados del efecto que causó cada medio de cultivo sobre el tejido vegetal de los genotipos CP041 y Cp052 de *J. curcas*. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran los porcentajes de las variables cualitativas registradas en cada tratamiento durante este ensayo.

Tabla 14.

Porcentajes de las variables cualitativas registradas del protocolo de organogénesis adventicia de J. curcas

Genotipo	Medio	Explante	Tratamiento	Brote	Directo	Indirecto	Tipo de órgano		
							Hoja	Tallo	Raíz
Cp052	MIBJ-1	H	1	60%	20%	40%	60%	0%	0%
		Pe	2	20%	20%	0%	20%	0%	0%
	MIBJ-2	H	3	80%	80%	0%	80%	0%	0%
		Pe	4	100%	100%	0%	100%	0%	0%
Cp041	MIBJ-1	H	5	20%	20%	0%	20%	0%	0%
		Pe	6	20%	20%	0%	20%	0%	0%
	MIBJ-2	H	7	100%	100%	40%	100%	0%	0%
		Pe	8	60%	60%	0%	60%	0%	0%

4.1.3.1. Medio de inducción de brotes adventicios de *J. curcas* 1 (MIBJ-1)

El tejido vegetal del genotipo Cp052 cultivado en el medio MIBJ-1, mostró morfogénesis a partir de la sexta semana. El 60% de las observaciones de los tratamientos 1 y 2, formaron brotes adventicios a manera de hoja como se puede ver en la Figura 11 A-D. En cuanto a las hojas y peciolo del genotipo Cp041 cultivados en el medio MIBJ-1, solo el 20% de estas mostraron el desarrollo de brotes a partir de la séptima semana. En la Figura 11 E-F, se puede observar la formación de brotes adventicios, en la superficie del explante de hoja y peciolo respectivamente.

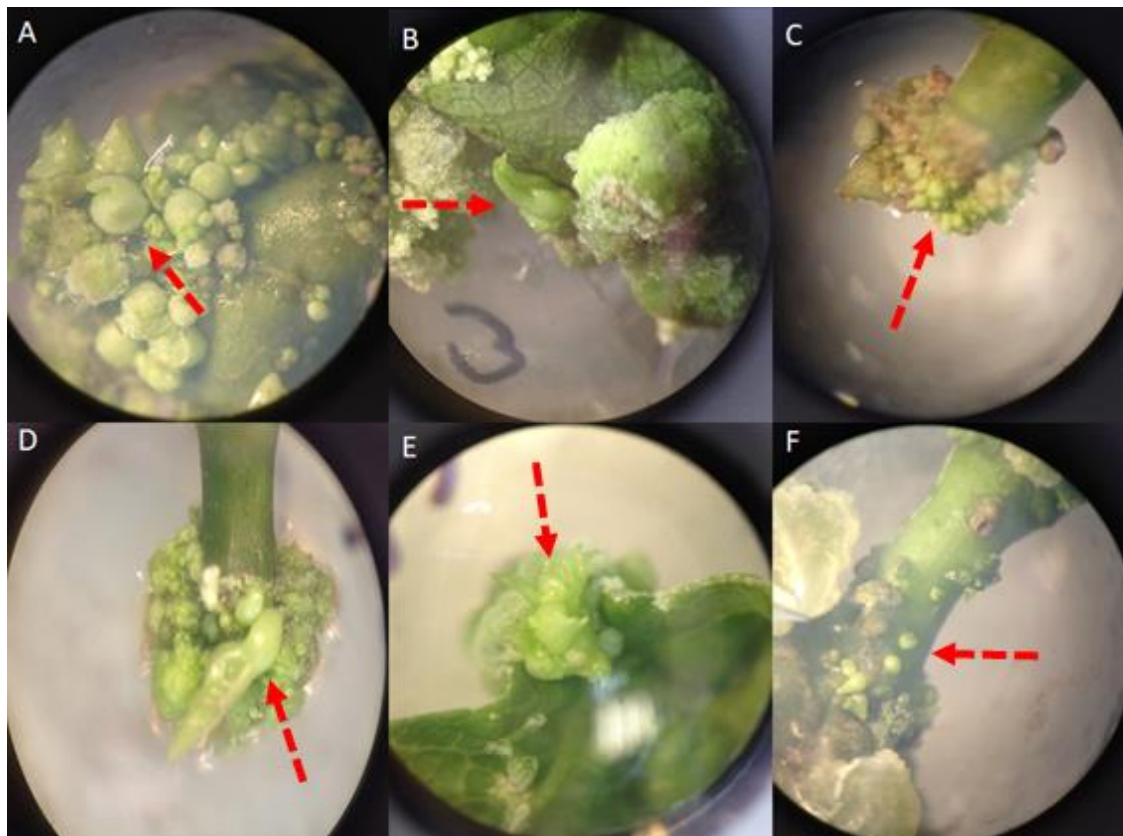


Figura 11. A-B) Brotes adventicios sobre el tejido foliar del genotipo Cp052 en el MIBJ-1; C-D) Brotes adventicios formados a partir de explantes de peciolo del genotipo Cp052 en el MIBJ-1; E) Órganos adventicios formándose a partir del explante de hoja del genotipo Cp041 en MIBJ-1; F) Órganos adventicios formándose sobre el peciolo del genotipo Cp041 en MIBJ-1. La flecha roja señala los brotes adventicios en desarrollo.

4.1.3.2. Medio de inducción de brotes adventicios de *J. curcas* 2 (MIBJ-2)

El medio de cultivo MIBJ-2 indujo la formación de brotes adventicios en los explantes cultivados de hojas y peciolo del genotipo Cp052, a partir de la sexta semana de observación, donde el 80% de los explantes de hojas y el 100% de los peciolo desarrollaron brotes de forma directa como se puede observar en la Figura 12 (A; B; D; E). las flechas rojas indican. Los tratamientos 7 y 8, correspondientes a hojas y peciolo del genotipo Cp041, desarrollaron brotes adventicios a partir de la séptima semana bajo el efecto de este medio de cultivo, obteniendo un 100 % y un 60% respectivamente de formación de brotes, como se puede ver en la Figura 12 C; F.

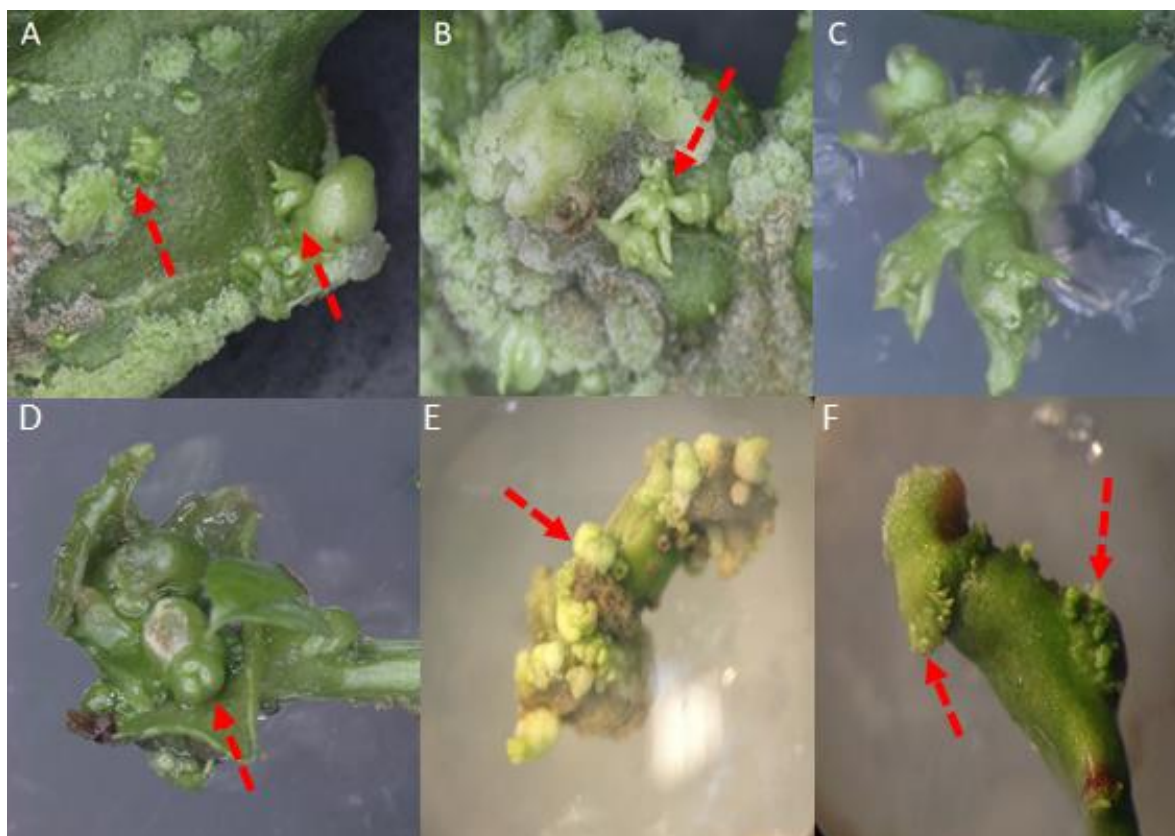


Figura 12. A-B) Formación de brotes adventicios a partir de hojas del genotipo Cp052 en el MIBJ-2; C) Brotes adventicios formados a partir de hojas del

genotipo Cp041 en el MIBJ-2; D-E) Formación de brotes adventicios a partir de explantes de peciolo del genotipo Cp052 en el MIBJ-2; Brotes adventicios formados a partir de explantes de peciolo del genotipo Cp041 en el MIBJ-2. Las flechas rojas señalan a los órganos adventicios en desarrollo

4.1.3.3. Análisis estadístico

A continuación, se encuentran los resultados obtenidos de la prueba de Kruskal Wallis, la prueba indica que no existen diferencias significativas entre genotipos ($p > 0,05$), como se puede observar en la tabla 15. Este resultado indica que ambos genotipos tienen el potencial para generar órganos adventicios.

Tabla 12.

Prueba de KW realizada con el número de brotes adventicios. Análisis entre genotipos.

Prueba de Kruskal Wallis						
Factor	Variable	N	Medias	D. E.	H	p
Genotipo Cp052	Número brotes	20	5,15	4,53	0,87	0,331 ^{n.s.}
Genotipo Cp041	Número brotes	20	4,70	6,79		

En la Tabla 13 se muestran los resultados de la prueba de KW para los medios de cultivo, la información indica que existen diferencias significativas entre los medios de cultivo ($p \leq 0,05$). El mejor medio de cultivo para inducir brotes adventicios fue el MIBJ-2.

Tabla 13.

Prueba de KW realizada con el número de brotes adventicios. Análisis entre medios de cultivo.

Prueba de Kruskal Wallis						
Factor	Variable	N	Medias	D. E.	H	p
MIBJ-1	Número brotes	20	1,75	3,13	12,65	0,0002***
MIBJ-2	Número brotes	20	8,10	5,98		

Los resultados de la prueba de KW para explantes que se muestra en la *Tabla 14*, indica que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la potencial de ambos explantes para regenerar brotes adventicios.

Tabla 14.

Prueba de KW realizada con el número de brotes adventicios. Análisis entre explantes.

Prueba de Kruskal Wallis						
Factor	Variable	N	Medias	D. E.	H	p
Hoja	Número brotes	20	6,65	6,55	2,55	0,0964 ^{n.s.}
Pecíolo	Número brotes	20	3,20	4,20		

Los resultados de la prueba KW que se muestran en la *Tabla 15*, indican que existen diferencias significativas entre los tratamientos sin distinción de factores. El tratamiento 7, que corresponde a las hojas del genotipo Cp041 cultivadas en MIBJ-2, resulta ser el tratamiento más óptimo para la inducción de organogénesis adventicia. Este medio de cultivo está suplementado con sulfato de cobre, IBA y TDZ.

Tabla 15.

Prueba de KW realizada con el número de brotes adventicios. Análisis interacción entre los tres factores.

Prueba de Kruskal Wallis; Interacción entre factores

Tratamiento	Medias	H	p
7	14,20	22,32	0,001**
4	9,40		
3	6,40		
1	4,40		
8	2,40		
5	1,60		
6	0,60		
2	0,40		

4.1.4. Maduración de los brotes adventicios de *J. curcas*

Todos los brotes adventicios formados durante los protocolos I y III fueron separados de su tejido inicial y subcultivados en el medio MEBJ-1(anexo 4), como se ve en la Figura 13 A-B. En la Figura 13 C-F se pueden observar los brotes adventicios en desarrollo con un tallo más definido y la formación de hojas.

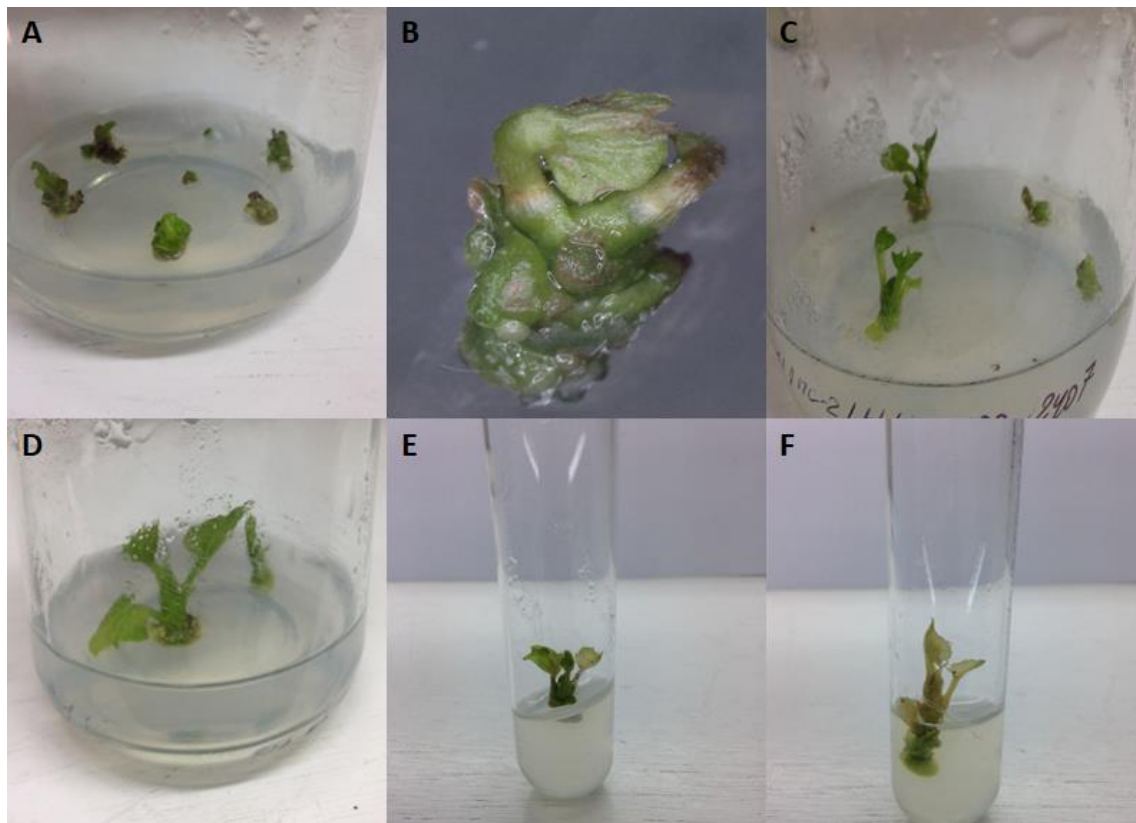


Figura 13 A-B) se muestran brotes adventicios individualizados en el MEBJ-1; C-D) se observan brotes con 3 o 4 hojas verdaderas y una longitud de alrededor de 1 cm, luego de 4 meses; E-F) brotes de *J. curcas* en medio de elongación.

4.2. Discusión

Los resultados obtenidos de esta investigación indican que el tejido de plantas de ambos genotipos de *Jatropha curcas* tienen la capacidad de generar callos y órganos adventicios bajo el efecto de ciertos reguladores de crecimiento. Los análisis estadísticos mostraron que el genotipo Cp052 presentó una mayor capacidad organogénica. Esto coincide con lo reportado por Aguilar (2013), demostró en su investigación que el genotipo CP052 es capaz de producir brotes adventicios, bajo el efecto de medios de cultivo suplementados con distintas concentraciones de auxinas y citoquininas. Los resultados obtenidos de esta

investigación mostraron que el tejido foliar se adapta de mejor manera a los medios de cultivo *in vitro*, que los explantes de peciolo. Según Schum y Dohm (2003), la desdiferenciación celular es estimulada por heridas en el tejido, debido a que se producen alteraciones endógenas de las fitohormonas. El tejido foliar utilizado en esta investigación sufrió muchos más cortes que los peciolos, esto puede ser una razón por la cual existen diferencias significativas entre ellos. Por otra parte, la superficie de los explantes de hojas mantenían más contacto con el medio de cultivo lo que permitía una mayor acción de los fitorreguladores sobre el tejido (Bhojwani et al., 2013).

4.2.1. Callogénesis

Los procesos que son inducidos por las fitohormonas son muy variados, dependiendo de la concentración de ellas pueden inducirse tanto eventos favorables como negativos (Tran and Pal, 2014). Jha y colaboradores (2007) cultivaron explantes de hoja de *J. curcas* en medios de cultivo suplementados con algunas concentraciones de kinetina. Los autores reportaron que el medio de cultivo que contenía 9,3 uM de kinetina fue el mejor tratamiento de su ensayo, ya que el 60% de sus observaciones produjo callos al cabo de cuatro semanas. Freire, (2009) utiliza un medio modificado de Jha et al., (2007) para cultivar peciolos de plantas de *J. curcas*. En su investigación se reporta que el medio de cultivo más propicio para generar callos fue el que estuvo suplementado con 2 ppm de IAA y 3,8 ppm de BAP. Chan y colaboradores, (2009) ensayaron diferentes explantes de *J. curcas* en un medio de cultivo que contenía dos tipos de citoquininas: BAP y Kinetina, ellos reportan la formación de callos y a partir de estos la aparición de embriones somáticos. Esto no concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación, pues los tratamientos muestran la formación de órganos adventicios bajo el efecto del MICJ-4 en lugar de embriones somáticos. Elsayh y colaboradores (2015) reportaron que un balance igual de auxinas y citoquininas, induce a la formación de callos y órganos adventicios. Los investigadores cultivaron hojas de *J. curcas* en un medio de cultivo suplementado con iguales concentraciones de BAP e IAA y obtuvieron

callos organogénicos. Los cuatro medios de cultivo ensayados en esta etapa de la investigación tenían al menos una citoquinina en su composición y como resultado fueron capaces de producir callos. Bhojwani and Dantu, (2013) y Tran and Pal, (2014) dicen que concentraciones relativamente altas de citoquininas en medios de cultivo generan multiplicación celular con poca diferenciación. Moyo et al., (2018) y colaboradores realizaron la aplicación de citoquininas exógenas en un cultivo in vitro de *Amelanchier alnifolia Nutt* (fresa de junio) y en sus resultados se observó un aumento notable en el contenido total de IAA endógeno en todos los cultivos, lo que estimuló una alta proliferación de brotes. Los resultados observados durante esta investigación podrían indicar que el tejido de *J. curcas* es capaz de producir brotes adventicios cuando el balance entre auxinas y citoquininas es alterado. Esto podría explicar la actividad organogénica de los medios MICJ-2 y 4, pues la alta concentración de IAA exógeno aplicado en el medio MICJ-2 pudo influir en los tratamientos generando la formación de brotes adventicios. Por otro lado, la presencia de un alto contenido de citoquininas (BAP y Kin) en el medio MICJ-4 probablemente condujo a la producción de IAA endógeno, lo que derivó en la formación de órganos adventicios. Sin embargo hacen falta más pruebas para demostrar esta hipótesis.

4.2.2. Embriogénesis somática

Durante este ensayo no se obtuvieron los resultados esperados. Ninguno de los tratamientos indujo la formación de embriones somáticos. Jha y colaboradores, (2007) obtuvieron mejores resultados al utilizar una combinación de similar de fitohormonas, pero como explante inicial callos previamente establecidos en un medio de cultivo diferente. En su investigación reportan que el 80% de sus tratamientos generaron embriones somáticos en 4 semanas. Este resultado podría deberse a que las células no diferenciadas de los callos responden de manera más efectiva a la acción de las fitohormonas, a diferencia del tejido vegetal como las hojas y peciolo que contienen células diferenciadas. Por lo

que se puede inferir que es necesario primero un proceso de desdiferenciación celular previo a la inducción de embriogénesis (Méndez-Hernández et al., 2019).

4.2.3. Organogénesis directa

Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron que el tejido vegetal de ambos genotipos es capaz de producir órganos adventicios, bajo el efecto de reguladores de crecimiento como: BAP, IAA, IBA, TDZ y sulfato de cobre en las diferentes concentraciones y combinaciones ensayadas. Nunes y colaboradores, (2013) reportaron en su investigación que el medio de cultivo con concentraciones mayores de BAP versus IAA indujo a la formación de brotes adventicios de plantas de *J. curcas*. Evidentemente mayores concentraciones de citoquininas que de auxinas promueven la formación de estas estructuras, pero en menor concentración que en la callogénesis. Haque et al. (2018) menciona que una disminución en la concentración de fitoreguladores conduce a los explantes hacia la vía organogénica. Evidentemente los medios evaluados durante este protocolo tienen una concentración mucho más baja de estos reguladores en comparación con el protocolo de callogénesis, lo que posiblemente indujo la organogénesis directa sobre los explantes. Attaya y colaboradores (2012), evaluaron diferentes concentraciones de BAP, IBA y TDZ y lograron inducir la formación de brotes adventicios. Los autores indican que la fitohormona TDZ es capaz de inducir la regeneración de brotes adventicios mejor que citoquininas y auxinas. El thidiazuron es una fitohormona sintética utilizada en cultivo de tejidos, es un compuesto similar a la citoquinina, ampliamente utilizada en cultivo de tejidos para promover la proliferación y regeneración de brotes (Dinani et al., 2018). Ha sido ensayada con éxito para la generación de órganos adventicios en plantas como fresa, arándanos, frejol entre otros (Méndez-Hernández et al., 2019). Evidentemente la adición del TDZ a los medios de cultivo durante la etapa de organogénesis directa de esta investigación indujo una mayor producción de brotes adventicios, en contraste con el primer medio

ensayado, el cual contenía niveles bajos de BAP e IAA que sin embargo también indujo la organogénesis en los explantes de *J. curcas*

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los tratamientos evaluados tienden a producir callos a partir de la primera semana de introducción del material vegetal. Sin embargo, las rutas y el desarrollo que los callos toman difieren entre tratamientos, siendo el MICJ-2 el mejor medio para inducir la formación de callos organogénicos sobre el tejido foliar de los genotipos CP052 y CP041, debido a que este medio de cultivo mantiene un balance de hormonas favorable para la proliferación de callos.

Los medios de cultivo utilizados durante el segundo protocolo de esta investigación no indujeron la formación de embriones somáticos de ninguno de los genotipos ensayados. Este resultado pudo deberse a que el tejido vegetal cultivado no fue el adecuado. En otras investigaciones se utilizaron callos previamente establecidos antes de inducir la embriogénesis somática. La acción de los fitoreguladores sobre los callos, estructuras que poseen células desdiferenciadas, es más efectiva. A diferencia de esta investigación en la que el tejido maduro no se vio afectado por las hormonas ensayadas.

El protocolo de generación de brotes adventicios dio como resultado que el MIBJ-2 es el mejor medio para inducir la formación de brotes adventicios en ambos genotipos, debido al óptimo balance entre los reguladores de crecimiento IBA y TDZ.

Recomendaciones

Se recomienda utilizar el tejido foliar y los peciolo de preferencia jóvenes, ya que muestran una mejor adaptación a las condiciones *in vitro*.

Durante el ensayo con *J. curcas* L. existió contaminación en los medios de cultivo debido a una bacteria endógena, *Bacillus licheniformis*. La estrategia utilizada fue diseñar medios de cultivo añadiéndoles 0.5 ppm de penicilina. Además, se realizó un tratamiento a las plantas del invernadero con una solución antibacteriana (SCPH= 6ml/l; Agrigem= 2g/l; 10 ml de etanol; 10 ml jabón).

REFERENCIAS

- Achten, W. M. J., Nielsen, L. R., Aerts, R., Lengkeek, A. G., Kjær, E. D., Trabucco, A., Hansen, J. K., Maes, W. H., Graudal, L., Akinnifesi, F. K., and Muys, B. (2010). Towards domestication of *Jatropha curcas*. *Biofuels*, 1(1), 91–107. Recuperado el 15 de noviembre del 2019 de <https://doi.org/10.4155/bfs.09.4>
- Anis, M., and Ahmad, N. (2016). Plant tissue culture: Propagation, conservation and crop improvement. In *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. Springer Singapore. Recuperado el 30 de diciembre del 2019 de <https://doi.org/10.1007/978-981-10-1917-3>
- Attaya, A. S., Geelen, D., and Belal, A. E. F. H. (2012). Progress in *Jatropha curcas* tissue culture. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 6(1), 6–13.
- Basha, S. D., and Sujatha, M. (2007). Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica*, 156(3), 375–386. Recuperado el 04 de febrero del 2020 de <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9387-5>
- Bermúdez-Caraballosa, I., Rodríguez, M., Reyes, M., Gómez-Kosky, R., Chong-Pérez, B., and Rivero, L. (2016). Mutagénesis in vitro en suspensiones celulares embriogénicas de banano cv. Grande naine (*Musa AAA*). *Bioteconología Vegetal*, 16(2). Recuperado el 03 de julio del 2019 de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/515>
- Bhojwani, S. S., and Dantu, P. K. (2013). Plant tissue culture: An introductory text. In *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer India. Recuperado el 30 de diciembre del 2019 de <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>
- Castellar Ortega, G. C., Angulo Mercado, E. R., and Cardozo Arrieta, B. M.

(2014). *Transesterificación de aceites vegetales empleando catalizadores heterogéneos* *Transesterification vegetable oils using heterogeneous catalysts* (Vol. 12). Recuperado el 10 de junio del 2019 de <http://www.scielo.org.co/pdf/prosp/v12n2/v12n2a10.pdf>

Castro Gonzáles, N. F. (2016). International experiences with the cultivation of *Jatropha curcas* for biodiesel production. *Energy*, 112, 1245–1258. Recuperado el 12 de noviembre del 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.energy.2016.06.073>

Chan, T., Ortega, F., and Rivera, J. (2009). *EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE Jatropha curcas L., UNA PLANTA MULTIPROPÓSITO CON POTENCIAL PARA LA PRODUCCIÓN DE BIODIESEL*. Recuperado el 26 de junio del 2019 de https://smbb.mx/congresos/smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_II/CII-18.pdf

Deepak, K. V., Johnny subakar ivin, J., Sathiya Narayanan, G., Prakash, M., Murugan, S., and Anandan, R. (2019). Efficient plant regeneration and histological evaluations of regenerants through organogenesis and somatic embryogenesis in *Spermacoce hispida* L.—An underutilized medicinally important plant. *Industrial Crops and Products*, 134, 292–302. Recuperado el 27 de junio del 2019 de <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2019.03.067>

Deore, A. C., and Johnson, T. S. (2008). High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports*, 2(1), 7–11. Recuperado el 11 de febrero del 2020 de <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0042-y>

Díaz, V., Iracheta, L., Solís, J. L., Basulto, J., Rico, H., and Gonzáles, A. (2015). *EL CULTIVO DEL PIÑÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES*. Recuperado el 04 de febrero del 2020 de www.INIFAP.GOB.MX

Dinani, E. T., Shukla, M. R., Turi, C. E., Sullivan, J. A., and Saxena, P. K. (2018). Thidiazuron: Modulator of Morphogenesis In Vitro. In *Thidiazuron: From*

- Urea Derivative to Plant Growth Regulator* (pp. 1–36). Springer Singapore. Recuperado el 05 de enero del 2020 de https://doi.org/10.1007/978-981-10-8004-3_1
- Divakara, B. N., Upadhyaya, H. D., Wani, S. P., and Gowda, C. L. L. (2010). Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. *Applied Energy*, 87(3), 732–742. Recuperado el 28 de noviembre del 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.07.013>
- EFEverde. (2018). *Las islas Galápagos prueba aceite de piñón para reemplazar al diesel*. Recuperado el 10 de junio del 2019 de <https://www.efeverde.com/noticias/islas-galapagos-aceite-pinon-diesel/>
- Elsayh S. A. A.; Sarhan, A. Z. . A. S. S. R. A. O. and E.-S. H. (2015). *In vitro genetic improvement of Jatropha curcas L using gamma ray to induce salinity tolerance*. 12(5), 46–53.
- Freire, D. (2009). *Establecimiento de embriogénesis somática y caracterización histológica embrionaria de piñón (Jatropha Curcas) a partir de pecíolo*. Recuperado el 26 de junio del 2019 de <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/981>
- Garg, P., Khatri, P., and Gandhi, D. (2011). Imperial Journal of Pharmacognosy and Natural Products. *Micro*, 1(June), 6–13.
- Gutiérrez M., A., Santacruz R., F., Cabrera P., J., and Rodríguez G., B. (2003). Mejoramiento genético vegetal in vitro. In *e-Gnosis* (Issue 1). Universidad de Guadalajara. Recuperado el 26 de junio del 2019 de <http://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=73000104>
- Haque, S. M., Chakraborty, A., and Ghosh, B. (2018). Callus mediated shoot organogenesis and regeneration of cytologically stable plants of *Ledebouria revoluta*: An ethnomedicinal plant with promising antimicrobial potency. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 645–651. Recuperado el 04 de febrero del 2020 de

<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.05.002>

Heller, J. (Joachim). (1996). *Physic nut, Jatropha curcas L.* IPGRI.

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2019). *54000 Lts. de Aceite Vegetal Puro de Piñón Llegan a Galápagos | Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.* Recuperado el 26 de junio del 2019 de <http://www.iica.int/es/prensa/noticias/54000-lts-de-aceite-vegetal-puro-de-piñon-llegan-galapagos>

Jha, T. baran, Mukherjee, P., and Datta, M. M. (2007). Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnology Reports*, 1(3), 135–140. Recuperado el 16 de mayo del 2019 de <https://doi.org/10.1007/s11816-007-0027-2>

Khurana-Kaul, V., Kachhwaha, S., and Kothari, S. L. (2010). Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium. *Biologia Plantarum*, 54(2), 369–372. Recuperado el 04 de febrero del 2020 de <https://doi.org/10.1007/s10535-010-0066-3>

Kumar, A., and Sharma, S. (2008). An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Industrial Crops and Products*, 28(1), 1–10. Recuperado el 11 de noviembre del 2019 de <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2008.01.001>

Kumar, N., Vijay Anand, K. G., and Reddy, M. P. (2011). In vitro regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas*. *Industrial Crops and Products*, 33(1), 146–151. Recuperado el 04 de febrero del 2020 de <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.09.013>

Leela, T., Naresh, B., Srikanth Reddy, M., Madhusudhan, N. C., and Cherku, P. D. (2011). Morphological, physico-chemical and micropropagation studies in *Jatropha curcas* L. and RAPD analysis of the regenerants. *Applied Energy*, 88(6), 2071–2079. Recuperado el 26 de noviembre del 2019 de

<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.080>

Loyola, V., and Ochoa Neftalí. (2016). *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Recuperado el 27 de junio del 2019 de <https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0>

Maciel, C. Á. (2009). *Biocombustibles: desarrollo histórico-tecnológico, mercados actuales y comercio internacional*. Recuperado el 10 de junio del 2019 de <http://www.economia.unam.mx/publicaciones/econinforma/pdfs/359/04carlsalvarez.pdf>

Mariod, A. A., Saeed Mirghani, M. E., and Hussein, I. (2017). *Jatropha curcas L. Seed Oil. Unconventional Oilseeds and Oil Sources, 2009, 199–207*. Recuperado el 15 de noviembre del 2019 de <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809435-8.00031-7>

Medipally, S. R., Naresh, B., Manoj Kumar, S., Yusoff, F. M., and Devi, P. (2014). Somatic Embryogenesis from Leaf and Shoot tip Explants of *Jatropha curcas L.* *Indian Journal of Science and Technology*, 7(11), 974–6846. Recuperado el 04 de febrero del 2020 de www.indjst.org

Mejía, N., Mendoza, H., López, J., Cedeño, L., and Ponce, W. (2015). Initial yield of piñón (*Jatropha curcas L.*) lines under two methods of sowing. *Nº, 15, 46–56*. Recuperado el 27 de junio del 2019 de <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/4813/1/INIAPEEPR2015n15p46.pdf>

Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-La-Peña, C., and Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling overview of plant somatic embryogenesis. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. Recuperado el 04 de febrero del 2020 de <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>

- Moyo, M., Aremu, A. O., Plačková, L., Plíhalová, L., Pěnčík, A., Novák, O., Holub, J., Doležal, K., and Staden, J. Van. (2018). Deciphering the growth pattern and phytohormonal content in Saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia*) in response to in vitro cytokinin application. *New Biotechnology*, 42, 85–94. Recuperado el 04 de febrero del 2020 de <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.02.001>
- Mukherjee, P., Varshney, A., Johnson, T. S., and Jha, T. B. (2011). *Jatropha curcas*: A review on biotechnological status and challenges. *Plant Biotechnology Reports*, 5(3), 197–215. Recuperado el 15 de mayo del 2019 de <https://doi.org/10.1007/s11816-011-0175-2>
- Nanda, S., Rana, R., Sarangi, P. K., Dalai, A. K., and Kozinski, J. A. (2018). A Broad Introduction to First-, Second-, and Third-Generation Biofuels. In *Recent Advancements in Biofuels and Bioenergy Utilization* (pp. 1–25). Springer Singapore. Recuperado el 15 de mayo del 2019 de https://doi.org/10.1007/978-981-13-1307-3_1
- Nunes, C. F., Santos, D. N., Pasqual, M., Teixeira Valente, T. C., Limade Oliveira, A. C., Alves, E., and Setotaw, T. A. (2013). Morphogenesis and regeneration of adventitious shoots in *Jatropha curcas* L. *Australian Journal of Crop Science*, 7(10), 1511–1519.
- Rousset, P., Carli, M., Coelho Costa, F., and Silva, O. (2008). Guía técnica para la utilización energética de los aceites vegetales. Recuperado el 04 de febrero del 2020 de www.cirad.fr
- Schum, A., and Dohm, A. (2003). CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE | In Vitro Regeneration Techniques. In *Encyclopedia of Rose Science* (pp. 76–90). Elsevier. Recuperado el 12 de enero del 2020 de <https://doi.org/10.1016/b0-12-227620-5/00103-8>
- Singh, A., Jani, K., Sagervanishi, A., and Agrawal, P. K. (2014). High-Frequency Regeneration by Abscisic Acid (ABA) from Petiole Callus of *Jatropha curcas*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 50(5), 638–645.

Recuperado el 04 de febrero del 2020 de <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9628-y>

Soomro, R., and Asma Memon, R. (2007). ESTABLISHMENT OF CALLUS AND SUSPENSION CULTURE IN JATROPHA CURCAS. In *Pak. J. Bot* (Vol. 39, Issue 7).

Sugimoto, K., Temman, H., Kadokura, S., and Matsunaga, S. (2019). To regenerate or not to regenerate: factors that drive plant regeneration. *Current Opinion in Plant Biology*, 47, 138–150. Recuperado el 02 de diciembre del 2019 de <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.12.002>

Sujatha, M., Makkar, H. P. S., and Becker, K. (2005). Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regulation*, 47(1), 83–90. Recuperado el 04 de febrero del 2020 de <https://doi.org/10.1007/s10725-005-0859-0>

Sujatha, M., and Mukta, N. (1996). Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44(2), 135–141. Recuperado el 04 de febrero del 2020 de <https://doi.org/10.1007/BF00048191>

Tran, L. P., and Pal, S. (2014). *Lam-Son PhannTrann· SikanderrPal Editors Phytohormones: A Window to Metabolism, Signaling and Biotechnological Applications*.

Zamarripa, A., and Solís, J. L. (2013). *Jatropha curcas* L. *Alternativa Bioenergética en Mexico*. Recuperado el 07 de julio del 2019 de <https://www.researchgate.net/publication/294873398>

Zheng Liu, Xiao-Xia Ge, Wen-Ming Qiu, Jian-Mei Long, Hui-Hui Jia, Wei Yang, Manjul Dutt, Xiao-Meng Wu, and Wen-Wu Guo. (2018). Overexpression of the CsFUS3 gene encoding a B3 transcription factor promotes somatic embryogenesis in Citrus. *Plant Science*, 277, 121–131. Recuperado el 07 de junio del 2019 de <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2018.10.015>

ANEXOS

Anexo 1.

Tabla de la composición de los medios de cultivo utilizados en la inducción de callos de *J. curcas*

Medio de inducción de callos de <i>Jatropha curcas</i> L.				
	Medio de cultivo; autor			
Componentes	MICJ-1 (Jha et al., 2007)	MICJ-2 (Elsayh y Sarhan, 2015)	MICJ-3 (Modificado de Jha (2007))	MICJ-4 (Chan et al., 2009)
Sales MS	4,3 g/L	4,3 g/L	4,3 g/L	4,3 g/L
Sacarosa	30 g/L	30 g/L	80 g/L	30 g/L
6-benzylaminopurine (BAP)		3 ppm	3,8 ppm	1 ppm
Ácido indolacético (IAA)		3 ppm	2 ppm	
Kinetina	2 ppm			1 ppm
Agar	7,5 g/L	7,5 g/L	6 g/L	6 g/L
pH	5,7	5,7	5,7	5,7

Anexo 2.

Tabla de la composición de los medios de cultivo utilizados en la inducción de embriones somáticos

Medio de inducción de embriones somáticos <i>Jatropha curcas</i> L.			
	Medio de cultivo; autor		
Componentes	MIEJ-1 (Modificado de Jha (2007))	MIEJ-2 (Jha et al., 2007)	MIEJ-3 (Garg et al., 2011)
Sales MS	2,15 g/L	2,15 g/L	4,3 g/L
Sacarosa	30 g/L	30 g/L	30 g/L
Sulfato de adenina		1,84 ppm	
6-benzylaminopurine (BAP)	0,8 ppm		1,5 ppm
Ácido indolacético (IAA)	0,1 ppm		
Ácido indolbutírico (IBA)		0,203 ppm	0,05 ppm
Kinetina		0,23 ppm	
Ag-3			0,5 ppm
Agar	5,5 g/L	7 g/L	7,5 g/L
pH	5,7	5,7	5,7

Anexo 3.

Tabla de la composición de los medios de cultivo utilizados en la inducción de brotes adventicios

Medio de inducción de brotes adventicios de <i>Jatropha curcas</i> L.		
	Medio de cultivo; autor	
Componentes	MIBJ-1 (Nunes et al., 2013)	MIBJ-2 (Attaya et al., 2012)
Sales MS	2,15 g/L	4,3 g/L
Sacarosa	30 g/L	30 g/L
Sulfato de cobre		0,15 ppm
6-benzylaminopurine (BAP)	0,9 ppm	
Ácido indolacético (IAA)	0,49 ppm	
Ácido indolbutírico (IBA)		0,2 ppm
Thidiazuron (TDZ)		0,2 ppm
Agar	7,5 g/L	7,5 g/L
pH	5,7	5,7

Anexo 4.

Tabla de la composición del medio de cultivo utilizado para la elongación de los brotes adventicios obtenidos durante la investigación

Medio de elongación de brotes adventicios de <i>Jatropha curcas</i> L.	
	Medio de cultivo; autor
Componentes	MEBJ-1 (Garg et al., 2011)
Sales MS	4,3 g/L
Sacarosa	30 g/L
6-benzylaminopurine (BAP)	0,5 ppm
Ácido indolacético (IAA)	1 ppm
Agar	7,5 g/L
pH	5,7

