

Organogénesis de *Jatropha curcas* a partir de plantas adultas: Estudio de fitohormonas y factores físico-químicos

Jatropha curcas organogenesis from adult plants: study of phytohormones and physicochemical factors

ANA GABRIELA COUTIÑO-CORTÉS¹, ISIDRO OVANDO-MEDINA¹, MARÍA DE LOURDES ADRIANO-ANAYA¹,
MIGUEL SALVADOR-FIGUEROA^{1*} Y SONIA RUIZ-GONZÁLEZ¹

¹Centro de Biociencias. Universidad Autónoma de Chiapas.

Carretera a Puerto Madero Km 2.0. Tapachula, Chiapas. México. Tel y Fax (962) 6427972

*Autor para correspondencia: Correo-e: msalvad@hotmail.com

RECIBIDO EL 14 DE MARZO DE 2013 / ACEPTADO EL 1 DE JULIO DE 2013

RESUMEN

Por la concentración de aceite de sus semillas, *Jatropha curcas* es una alternativa para la producción de biocombustibles. Una limitante para dicho fin, es la disponibilidad de material de alta calidad para la siembra en campo. Con el fin de aumentar la regeneración *in vitro*, el presente estudio evaluó la influencia de fitohormonas y factores físico-químicos en la organogénesis de *J. curcas* a partir de plantas adultas. Se utilizó un diseño factorial tipo Plackett-Burman de 12 tratamientos, con diez repeticiones cada uno, evaluando auxinas, citocininas, concentración de sacarosa, tipo de vitaminas, intensidad lumínica, pH y temperatura. Nueve tratamientos indujeron la brotación de yemas, aunque el tratamiento con mayor efecto sobre la organogénesis estuvo constituido con sacarosa 25 g·L⁻¹, ácido indolacético 1 μM, ácido 2,4-diclorofenoxiacético 1 μM, benzilaminopurina 10 μM, cinetina 10 μM, vitaminas de Gamborg, pH 6.0, a 28 °C y 1000 Lux (Tratamiento 1). El tratamiento con sacarosa 20 g·L⁻¹, ácido indolacético 1 μM, ácido 2,4-diclorofenoxiacético 1 μM, benzilaminopurina 10 μM, sulfato de adenina 10 μM, vitaminas de Murashige & Skoog, pH 5.5, a 28 °C y 3000 Lux (Tratamiento 4) y el tratamiento con sacarosa 20 g·L⁻¹, ácido 2,4-diclorofenoxiacético 1 μM, cinetina 10 μM, sulfato de adenina 10 μM, vitaminas Gamborg, pH 6, a 30 °C y 3000 Lux (Tratamiento 6) indujeron la mayor formación de callos. Estos resultados contribuyen al desarrollo de protocolos de organogénesis en *J. curcas*.

Palabras clave: *Jatropha*, Biocombustibles, Cultivo *in vitro*, Auxinas, Citocininas.

INTRODUCCIÓN

Jatropha curcas L., conocida como “piñón” en el sureste de nuestro país, es probablemente originaria de México y Centroamérica (Martínez, 2007; Ovando-Medina et al., 2011). Debido a la cantidad y composición de aceite que acumulan sus semillas, dicha planta se ha considerado una alternativa para la producción de biodiesel (Sujatha et al., 2005; Rajore and Batra, 2005; Fairless, 2007). Por lo anterior, en diversos foros se ha discutido la posibilidad de establecer plantaciones extensivas alrededor del mundo (Ranwah et al., 2009). Entre las diversas limitantes para lograr tal objetivo, la disponibilidad de material de siembra de alta calidad (limitada variabilidad

ABSTRACT

Jatropha curcas is an alternative for biofuel production, due to the concentration of oil in its seeds. One limitation for this purpose, is the availability of high quality material for planting in the field. In order to increase the *in vitro* regeneration, this study evaluated the influence of plant hormones and physicochemical factors on the organogenesis of *J. curcas* using mature plants. We used a Plackett-Burman factorial design of 12 treatments, with 10 replicates each, evaluating auxins, cytokinines, sucrose concentration, type of vitamins, light intensity, pH and temperature were measured. Nine treatments induced sprouting, although the treatment with greater effect on organogenesis consisted of sucrose 25 g·L⁻¹, 1 μM indoleacetic acid, 1 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic, 10 μM benzylaminopurine, 10 μM kinetin, Gamborg vitamins, pH 6.0, at 28 °C and 1000 Lux (Treatment 1). Treatment with sucrose 20 g·L⁻¹, 1 μM indoleacetic acid, 1 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic, 10 μM benzylaminopurine, 10 μM adenine sulfate, Murashige & Skoog vitamins, pH 5.5, at 28 °C and 3000 Lux (Treatment 4), and treatment with 20 g·L⁻¹, sucrose, 1 μM acid 2,4-dichlorophenoxyacetic, 10 μM kinetin, 10 μM adenine sulfate, Gamborg vitamins, pH 6, at 30 °C and 3000 Lux (Treatment 6) induced the highest callus formation. These results contribute to the development of protocols of *J. curcas* organogenesis.

Keywords: *Jatropha*, biofuels, *in vitro* culture, auxins, cytokinines.

en los caracteres productivos, libre de plagas y enfermedades, entre otras consideraciones), es una de las más importantes.

La propagación convencional de *J. curcas* se realiza mediante semillas y estacas (Toral et al., 2008). La primera opción tiene el inconveniente de la variabilidad genética resultante de la polinización cruzada (Lobo-Arias y Medina-Cano, 2009). La segunda requiere de suficientes plantas “madre”, lo que es dependiente de tiempo y de área de cultivo, aunque se asegura la clonalidad. La alternativa más atractiva es la micropropagación (Ovando-Medina, 2005; Ferrer-Dubois et al., 2007).

La organogénesis en *J. curcas* ha sido poco estudiada y se considera que no existen procedimientos estandarizados, eficientes y repetibles para su propagación *in vitro* (Singh and Shetty, 2012). En este proceso se han empleado

tanto explantes de plántulas germinadas *in vitro* y de plantas jóvenes, como segmentos de tallo (Wei et al., 2004), yemas axilares (Rajore and Batra, 2005), hojas de plántulas (Ranwah et al., 2009) y segmentos de raíz (Chan et al., 2009). En todos esos trabajos se ha evaluado el papel de las auxinas (ácido indol-3-butírico o AIB y ácido indol-3-acético o AIA) y las citocininas (bencil amino purina BAP y cinetina KIN) a diferentes concentraciones, y factores físico-químicos (concentración de carbohidratos, pH y T), empleando como base el medio MS (Murashige and Skoog, 1962), sin embargo la respuesta organogénica ha sido limitada, por lo que es necesario seguir estudiando el efecto de las hormonas y los componentes del medio sobre la respuesta de los explantes.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia de la interacción de fitohormonas y de factores físico-químicos en la organogénesis de *J. curcas* a partir de plantas adultas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizó la accesión de *J. curcas* MAP-08 (Sánchez-Gutiérrez, 2011), la cual forma parte del Banco de *Jatropha* del Centro de Biociencias (CenBio) de la Universidad Autónoma de Chiapas, ubicado en el municipio de Tapachula, Chiapas; México (14.4976 N, 92.4774 O, 58 msnm, temperatura promedio anual de 30.7 °C, humedad media anual de 80%, precipitación pluvial promedio de 2,600 mm). Al momento del estudio la planta contaba con cuatro años de edad.

Preparación de la planta madre, selección y obtención de explantes

Cuatro meses antes de la selección y obtención de los explantes la planta madre se cercó para evitar la interacción con los insectos. Para ello se construyó alrededor de la planta una jaula de 3 x 3 x 3 m y se cubrió con malla tul (0.5 mm de luz). La planta fue asperjada con los fungicidas Carbendex® al 1% (Metil benzimidazol-2-il-carbamato al 50%) y Previcur® al 1.73% (Propamocarb clorhidrato al 64%), cada 48 h, una semana previa a la obtención de los explantes. Los tejidos seleccionados fueron nudos jóvenes conteniendo

una yema axilar, los cuales se cortaron, colocaron en hielo y se trasladaron al laboratorio.

Desinfección de tejidos

La desinfección del material colectado se realizó mediante la técnica de Toalá (2012), con algunas modificaciones. El proceso se llevó a cabo en dos fases, fuera y dentro del área estéril. Fuera del área estéril, los explantes se lavaron con agua corriente y jabón líquido comercial, después se dejaron en solución de cloro (0.6% de cloro libre) con jabón líquido comercial por 50 min y se enjuagaron con agua destilada. Dentro del área estéril se dejaron por 20 min en solución de cloro (0.9% de cloro libre) con 5 gotas de Tween 60® y se lavaron con agua destilada estéril. Posteriormente se dejaron en etanol a 70° por 1 min y finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril.

Evaluación de factores físicos y químicos en la respuesta de explantes

Para determinar el efecto de los factores físico-químicos en la respuesta de los explantes (organogénesis, callogénesis y oxidación) se estableció un diseño factorial truncado de Plackett-Burman de 11 factores, con dos niveles (cualitativos o cuantitativos), totalizando 12 tratamientos con 10 repeticiones cada uno. Los explantes fueron sembrados en medio de cultivo preparado con sales minerales de MS, según los tratamientos establecidos con base en la interacción de fitohormonas y factores físico-químicos (Cuadro 1). Las fitohormonas evaluadas fueron auxinas: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) a las concentraciones de 0 y 1 µM; y citoquininas: cinetina (KIN), 6-bencil aminopurina (BAP) y sulfato de adenina (SAd) a las concentraciones de 0 y 10 µM. Respecto a los factores físico-químicos se evaluó la concentración de sacarosa (20 y 25 g L⁻¹), vitaminas (Gamborg y MS), luz (1,000 y 3,000 lux), pH (5.6 y 7) y temperatura (28 y 32 °C).

Seguimiento histológico de explantes

Para conocer el origen del tejido calloso se hicieron análisis histológicos de los explantes a los 10 y 20 días después de la siembra. Para esto se siguió el procedimiento de Molist et al. (2011).

Cuadro 1. Matriz de Plackett-Burman con tratamientos establecidos con base en la interacción de factores físico-químicos para inducir organogénesis en *Jatropha curcas* L.

TRATAMIENTO	FACTORES																		
	SACAROSA (g.L ⁻¹)		AIA (μM)	ANA (μM)	2,4-D (μM)	BAP (μM)	KIN (μM)	SAd (μM)	VITAMINAS	LUZ (Lux)	pH	T (°C)							
	20	25	0	1	0	1	0	10	0	10	0	10	MS	Gamborg	1000	3000	5.5	6	28
1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1							
2	-1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1							
3	1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1							
4	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1							
5	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	-1							
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	1	1							
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	1							
8	1	1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1							
9	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1							
10	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1							
11	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1							
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1							

1= concentración alta; -1= concentración baja. En el caso de las vitaminas, Gamborg se consideró como concentración baja y MS (Murashige-Skoog) como concentración alta. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); ácido indolacético (AIA); ácido naftalenacético (ANA); cinetina (KIN); 6-bencil aminopurina (BAP); sulfato de adenina (SAd).

VARIABLES DE RESPUESTA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La variable brotación, determinada como la neoformación de hojas (Montes-López y Rodríguez-de-la-O, 2001) se consideró como variable discreta y se evaluó mediante presencia (0) o ausencia (1); callogénesis: formación de masa celular indefinida, amorfa o desorganizada (Calva y Pérez, 2005), se evaluó como variable continua mediante una escala de 0 a 4, donde los extremos indican que no hubo respuesta (0) o que la totalidad de los explantes presentaron formación (4); oxidación, oscurecimiento del tejido vegetal (Bray et al., 2000), se evaluó como variable continua con base en una escala de 0 a 4 (cero a cuatro), donde cero indicó que no hubo oxidación de explante, 1 que 25% del explante presentó oxidación, 2 indicó que 50% del explante presentó oxidación, 3 que 75% del explante presentó oxidación y 4 que 100% del explante presentó necrosis u oscurecimiento total.

Las variables se evaluaron 20 días después de iniciados los tratamientos. Los datos de brotación, por ser variables discretas, se procesaron mediante análisis de *Chi* cuadrada para determinar la existencia de asociación entre la variable dependiente (brotación) y las variables independientes (factores físico-químicos). Además, se realizaron pruebas exactas de Fis-

her para conocer la respuesta individual a la brotación en cada tratamiento. Estos análisis se hicieron mediante el programa estadístico XLStat© versión 2012.

Para realizar el análisis estadístico de las variables de formación de callo y oxidación se transformaron los datos mediante la ecuación $\sqrt{(x+1)}$.

Las variables de callogénesis y oxidación, por ser variables continuas, se procesaron mediante análisis de varianza de Plackett-Burman. Se obtuvo el diagrama de Pareto con los efectos estandarizados de cada factor físico-químico evaluado. Para estos análisis se usó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI© VERSIÓN 16.2.04. Además, se hizo ANOVA y comparación de medias (Tukey $\alpha = 0.05$) para conocer el efecto de los tratamientos; estos análisis se hicieron mediante el programa estadístico XLStat© versión 2012.

RESULTADOS

Inducción a la organogénesis

Se encontró que en nueve de los 12 tratamientos evaluados se indujo a los explantes a la primera etapa de la organogénesis, es decir, el brote de yemas axilares con neo-formación de tallos y hojas. El análisis estadístico de la can-

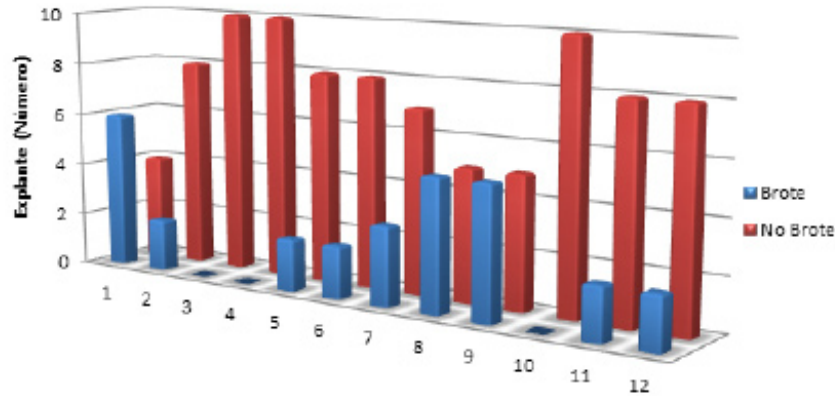


Figura 1. Cantidad de explantes de *Jatropha curcas*, con brote y sin brote, observada después de 20 días de cultivo *in vitro* bajo las condiciones de los diferentes tratamientos (Cuadro 1) empleados en este trabajo (n= 10).

cantidad de explantes con brote (Figura 1) mostró que la organogénesis depende del medio de cultivo ($X^2= 24.5$, 11 g.l., $p = 0.011$). Para conocer los efectos puntuales de cada tratamiento se realizaron pruebas exactas de Fisher, mostrando que globalmente hay dependencia entre filas y columnas de la tabla de contingencia ($p = 0.006$) y que algunos tratamientos, en particular el tratamiento 1, tuvieron efecto significativo sobre la organogénesis (Cuadro 2). Algunos tratamientos tuvieron efecto significativo ($p < 0.05$), pero sin llegar a promover activamente la brotación de explantes (tratamientos 8 y 9).

Cuadro 2. Prueba exacta de Fisher del efecto de 12 tratamientos (respecto a factores físico-químicos del medio de cultivo) sobre la inducción de brotes en *Jatropha curcas* in vitro

Tratamiento	Brotación	No-brotación
1	>*	<*
2	<	>
3	<*	>
4	<*	>
5	<	>
6	<	>
7	>	<
8	>	<*
9	>	<*
10	<*	>
11	<	>
12	<	>

Los símbolos marcados con un asterisco indican efecto significativo [evitando (<) o promoviendo (>) la organogénesis] a nivel de $\alpha = 0.05$

Callogénesis

En la Figura 2 se muestra la respuesta de los explantes cultivados en el Tratamiento 1, donde se puede observar que además del brote también se induce la formación de callos (friables en la parte superior, y compactos en la base). La frecuencia de explantes de *J. curcas* con desarrollo de callo, con base en la escala de 0 a 4, se muestra en el Cuadro 3. El ANOVA de los resultados mostró diferencias significativas entre los tratamientos (g.l. = 1, $F = 10.09$, $p < 0.001$) y la comparación de medias

Cuadro 3. Frecuencia de explantes de *Jatropha curcas* con callo celular con base en una escala de 0 a 4, y comparación de medias de 12 tratamientos de factores físico-químicos del medio de cultivo

TRATAMIENTO	FRECUENCIA (ESCALA)					ÍNDICE DE FORMACIÓN DE CALLO*	
	0	1	2	3	4		
1	0	2	7	1	0	1.70	ab
2	0	6	4	0	0	1.54	abc
3	2	3	5	0	0	1.49	abc
4	1	1	4	4	0	1.73	a
5	1	6	3	0	0	1.47	abc
6	0	1	8	1	0	1.73	a
7	2	8	0	0	0	1.37	bcd
8	3	7	0	0	0	1.29	cde
9	7	3	0	0	0	1.12	de
10	1	6	3	0	0	1.47	abc
11	1	5	3	0	1	1.55	abc
12	9	1	0	0	0	1.04	e

*Para detalle ver Cuadro 1. **Los datos son medias de índices medidos en una escala de 0 a 4, donde 0 es ausencia de callo celular y 4 es abundante callo celular de explante. Letras diferentes indican diferencia estadística (Tukey $\alpha 0.05$).

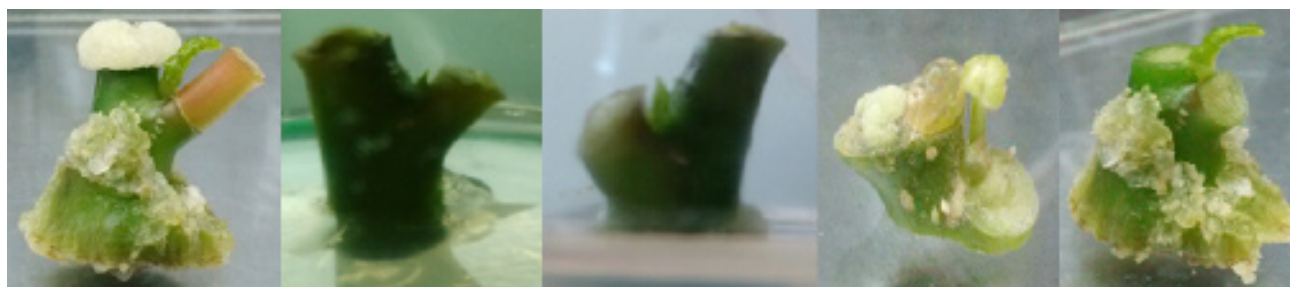


Figura 2. Formación de brote y callo de *Jatropha curcas* en el tratamiento 1 (Sacarosa 25 g.L, AIA, 2,4-D, BAP y KIN). Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); ácido indolacético (AIA); cinetina (KIN); 6-bencil aminopurina (BAP).

mostró que los tratamientos 4 y 6 produjeron mayor formación de callo, mientras que el tratamiento 12 produjo menor cantidad de callo.

El análisis del arreglo Plackett-Burman (Figura 3) mostró que la formación de callo en explantes de *J. curcas* estuvo influenciada por la auxina 2,4-D y por las citocininas BAP y KIN. Dicho efecto fue estadísticamente significativo ($p < 0.005$).

Respecto al tipo de callo formado, se encontró que los tratamientos 4 y 7 produjeron, preferentemente, del tipo compacto (Figura 4a), mientras que el resto de los tratamien-

tos dieron origen a callo friable (Figura 4b). El análisis histológico reveló que el callo inició su desarrollo 10 días después de la siembra a partir de la última capa de células organizadas del explante (Figura 5a). Asimismo, se encontró que después de 20 días de la siembra el tejido presentó diferenciación celular, ya que se formó tejido vascular de tipo xilema (Figura 5b).

Oxidación del tejido vegetal

En el Cuadro 4 se muestra la frecuencia de oxidación, en sus diferentes grados, de los explantes empleados en este trabajo 20 días des-

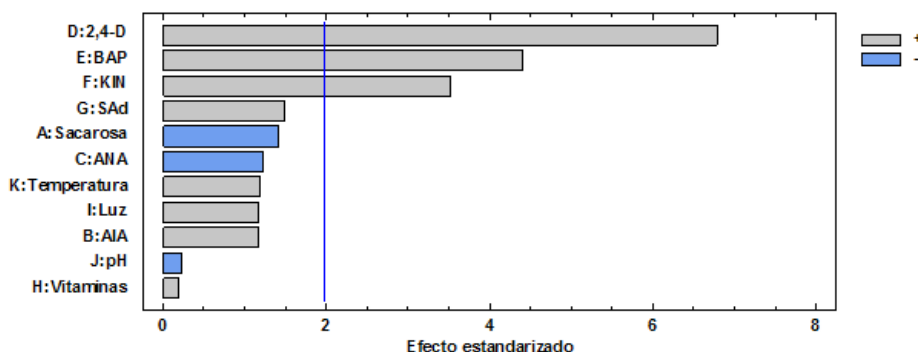


Figura 3. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados, derivado de un análisis de varianza de Plackett-Burman de 11 factores físico-químicos para la variable de callogénesis in vitro de *Jatropha curcas*. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); ácido indolacético (AIA); ácido naftalenacético (ANA); cinetina (KIN); 6-bencil aminopurina (BAP); sulfato de adenina (SAd).

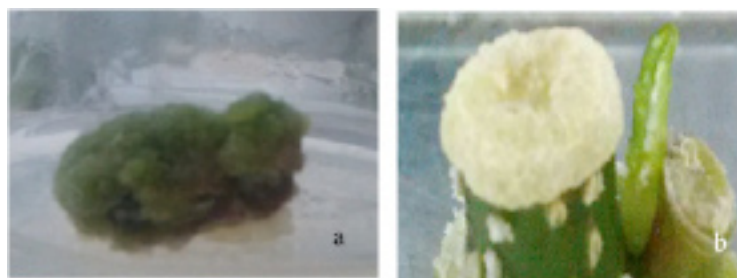


Figura 4. Formación de callo de *Jatropha curcas*, a) compacto en el tratamiento 4 (AIA, 2,4-D, BAP y SAd) y b) friable a partir de nudos jóvenes con una yema axilar en el tratamiento 1 (AIA, 2,4-D, BAP y KIN). Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); ácido indolacético (AIA); ácido naftalenacético (ANA); cinetina (KIN); 6-bencil aminopurina (BAP); sulfato de adenina (SAd).

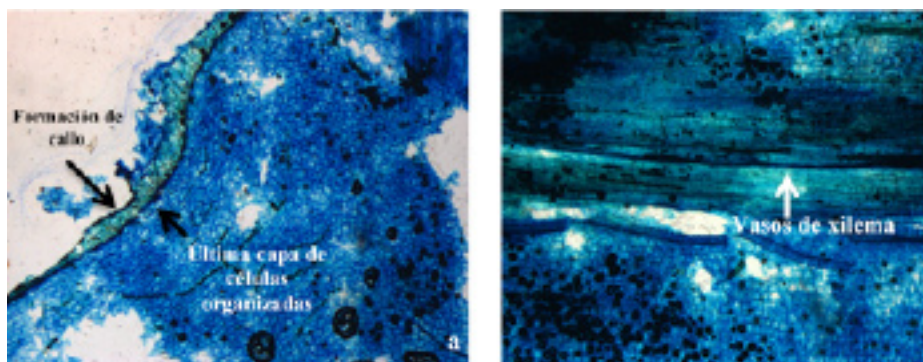


Figura 5. Tejido de explantes de *Jatropha curcas* con formación de callo: a) 10 días después de la siembra del explante se presentaron células organizadas; b) después de 20 días se encontraron vasos en el tejido de xilema.

pués de la siembra en los distintos tratamientos. Se puede observar que 90% de los explantes del tratamiento 12 mostraron algún nivel de oxidación, mientras que sólo 10% de los explantes de los tratamientos 6 y 7 mostraron tal condición. Asimismo, en los tratamientos 4, 5, 11 y 12 se observaron explantes con el máximo nivel de oxidación, mientras que en los tratamientos 2, 6, 7, 8 y 9 la oxidación de los tejidos fue del mínimo nivel. El ANOVA de los resultados mostró que las diferencias entre los tratamientos fue significativa ($gl = 1$, $F = 0.368$, $p = 0.0002$), principalmente por los resultados presentados en el tratamiento 12 (Cuadro 4), el cual fue colocado en un grupo diferente (Tukey $\alpha = 0.05$).

Cuadro 4. Frecuencia de explantes de *Jatropha curcas* oxidados con base en la escala de 0 a 4, y comparación de medias de 12 tratamientos de factores físico-químicos del medio de cultivo

TRATAMIENTO	FRECUENCIA (ESCALA)					ÍNDICE DE OXIDACIÓN*
	0	1	2	3	4	
1	8	1	1	0	0	1.11 b
2	4	6	0	0	0	1.25 ab
3	7	2	1	0	0	1.16 b
4	6	1	1	1	1	1.34 ab
5	3	6	0	0	1	1.37 ab
6	9	1	0	0	0	1.04 b
7	9	1	0	0	0	1.04 b
8	7	3	0	0	0	1.12 b
9	8	2	0	0	0	1.08 b
10	8	0	2	0	0	1.15 b
11	6	2	1	0	1	1.28 ab
12	1	3	4	0	2	1.69 a

*Para ver detalle ver Cuadro 1.

**Los datos son medias de índices medidos en una escala de 0 a 4, donde 0 es ausencia de oxidación y 4 es oxidación total de explante. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

En la Figura 6 se muestra el efecto estandarizado de las variables estudiadas en este trabajo sobre la frecuencia de oxidación del tejido de los explantes de *J. curcas*. Se puede observar que la disminución en la concentración de sacarosa, la disminución en la temperatura de cultivo y la ausencia de SAD indujeron la mayor frecuencia de oxidación. El efecto de las variables previamente mencionadas fue estadísticamente significativo ($p < 0.005$).

DISCUSIÓN

A pesar de que la organogénesis directa *in vitro* es un proceso fisiológico complejo, existen reportes de brotación *in vitro* mediante el uso de fitohormonas exógenas (Shrivastava and Benerjee, 2008; Maharana et al., 2011). En el presente estudio las fitohormonas y factores físico-químicos evaluados no sólo indujeron brotes a partir de las yemas meristemáticas axilares de plantas adultas de *J. curcas*, sino que también causaron la formación de callo.

En este trabajo se encontró la máxima brotación de yemas (6/10) con el tratamiento 1 (sacarosa 25 g.L⁻¹, AIA 1 µM, 2,4-D 1 µM, BAP 10 µM, KIN 10 µM, vitaminas de Gamborg, pH 6.0, 28 °C y 1,000 Lux). Los resultados fueron similares a lo reportado por Nogueira et al. (2011), quienes indican que el uso de citoquininas como BAP en combinación con bajas concentraciones de auxinas producen un mayor número de brotes. Ellos obtuvieron 53.91% de brotes bien definidos con BA a 1.5 mg.L⁻¹ y AIB a 0.05 mg.L⁻¹ en sales minerales de MS. Otro trabajo con resultados similares es el de

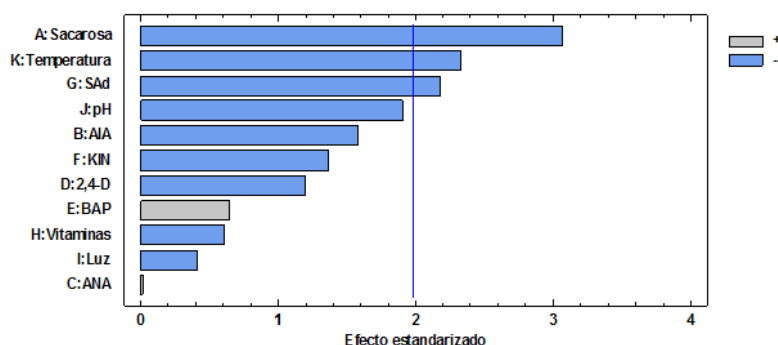


Figura 6. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados, derivado de un análisis de varianza de Plackett-Burman de 11 factores físico-químicos para la variable de oxidación in vitro de *Jatropha curcas*. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); ácido indolacético (AIA); ácido naftalenacético (ANA); cinetina (KIN); 6-bencil aminopurina (BAP); sulfato de adenina (SAd).

Rajore y Batra (2005), quienes reportan 90% de brotes de yemas de *J. curcas* mediante el uso de AIA a 0.5 mg.L^{-1} + SAd a 25 mg.L^{-1} + glutamina 100 mg.L^{-1} en sales minerales del medio MS. Sin embargo, en este estudio las vitaminas empleadas en el tratamiento 1 fueron las del medio Gamborg.

Otro estudio que coincide con lo encontrado en este trabajo, referente a que la relación citocinina/auxina debe ser alta, es el de Datta et al. (2007), quienes mencionan que la mejor respuesta de número de brotes por nudo se obtuvo en sales minerales del medio MS adicionado con $2.3 \text{ }\mu\text{M}$ de KIN, $27.8 \text{ }\mu\text{M}$ de SAd y $0.5 \text{ }\mu\text{M}$ de AIB. Asimismo, en el trabajo de Shukla et al. (2013) se obtuvieron brotes a partir de explantes de nudos de *J. curcas* entre los días 10-12 posterior a la siembra empleando sales minerales del medio MS suplementado con $22.2 \text{ }\mu\text{M}$ de BAP y $4.9 \text{ }\mu\text{M}$ de AIB. Otro ejemplo es el estudio de Wei et al. (2004), quienes obtuvieron 38% de brotes adventicios a partir de explantes de epicotilo, mediante la adición de AIB 0.1 mg.L^{-1} y BA 0.5 mg.L^{-1} en sales de MS.

Por el contrario, existen trabajos donde se emplea mayor concentración de auxina que de citoquinina. Un ejemplo es el trabajo de Shrivastava y Banerjee (2008), quienes reportaron 6.90 brotes por explante de *J. curcas* mediante el uso de BAP a 0.3 mg.L^{-1} en combinación con la auxina AIB a 1 mg.L^{-1} en sales minerales de MS.

Existen otras investigaciones que encuentran que no fue necesaria la interacción de fitohormonas para llevar a cabo la organogénesis

directa. El estudio de Maharana et al. (2011) reportó una mayor diferenciación de brotes de *J. curcas* con sales minerales del medio MS suplementado con $8 \text{ }\mu\text{M}$ de BAP a partir de explantes de nudo. En el trabajo de Kumar et al. (2010) se obtuvo 67.9% de inducción de brotes de *J. curcas* mediante el uso de la citocinina TDZ a $9.08 \text{ }\mu\text{M}$ y 5.92 brotes por explante de peciolos cotiledonares seis semanas después de la siembra.

Respecto a la producción de callo, se atribuyó principalmente a la presencia de auxinas en el medio de cultivo, en particular del 2,4-D, debido a que fomentan la división celular (Borges-García et al., 2009). En este trabajo los tratamientos 4 y 6 produjeron los mayores índices de callogénesis, ambos incluyen al 2,4-D. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Laguna et al. (2011), quienes encontraron que la mayor producción de callo se induce con 2,4-D a $107.41 \text{ }\mu\text{M}$. Asimismo, Cai et al. (2011) encontraron que si se usan embriones somáticos de *J. curcas* como explantes se induce callo celular embriogénico en presencia de 0.2 mg.L^{-1} de 2,4-D. También existe coincidencia con el trabajo de Soomro y Memon (2007), que indujeron callogénesis en explantes de hipocotilo de *J. curcas* en medio MS con 0.5 mg.L^{-1} de 2,4-D.

En otros estudios se ha demostrado que otras auxinas también inducen la callogénesis en *J. curcas*, como el realizado por Rajore y Batra (2005), que reportan la inducción de tejido indiferenciado en presencia de AIA a 0.5 mg.L^{-1} . Por otra parte, Wei et al. (2004) reportan 82 a 100% de formación de callo pro-

veniente de explantes de epicótilo mediante el uso de AIB ($0.5-1.5 \text{ mg.L}^{-1}$) en combinación con BA ($0.1-1.0 \text{ mg.L}^{-1}$).

Con relación al origen de las células indiferenciadas, lo encontrado en el presente trabajo coincide con lo informado por Nogueira et al. (2011), quienes obtuvieron formación de callo a partir de embriones cigóticos de *J. curcas*, indicando que el crecimiento inició en el borde del explante. Atribuyen el inicio de la callogénesis a los estímulos causados por las lesiones o daños provocados al momento de realizar el corte en el explante, de manera similar a la presente investigación (Figura 2). Existe coincidencia también en el origen histológico del callo, ya que observaron el desarrollo de callo a partir de las células organizadas en el borde de la región meristemática (Figura 5). Algo similar observaron Wei et al. (2004), quienes indican que la formación de callo se inició en la parte superior del explante, donde se llevó a cabo el corte del tejido.

Relacionado con el tratamiento de desinfección desarrollado en este trabajo de investigación, se encontró que si bien se disminuye la contaminación superficial se produce un alto porcentaje de explantes oxidados. La causa es la inmersión (dos veces) del explante en solución de cloro, así como el tiempo sumergido. Esto provoca un efecto fitotóxico, comenzando por la oxidación hasta llegar a la necrosis, similar a lo reportado en explantes de otras especies por Borges-García et al. (2009), Azofeifa (2009) y Sánchez-Cuevas y Salaverría (2004). Entre los problemas más importantes para la micropropagación de *J. curcas* está la oxidación de los explantes (Singh and Shetty, 2012), lo cual puede estar relacionado con la producción de sustancias de defensa por parte de la planta estimulado por las heridas del corte del tejido. Existen varios factores que contribuyen a la oxidación de explantes, entre los cuales está la fenolización que depende del estado fisiológico, principalmente con la edad ontogenética. Es posible que los explantes provenientes de plantas adultas, como los usados en el presente trabajo, presenten mayor tendencia a la oxidación. Esto ha sido estudiado por Nápoles et al. (2005) en explantes de yema de guayaba.

Los factores que afectan directamente a los explantes causando oxidación son concentración de sacarosa, ausencia de la citocinina SAd, pH y temperatura, todos en su nivel bajo (-1). A diferencia de lo encontrado en este trabajo, Lux-Endrich et al. (2000) informan que a mayores concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo mayor es el contenido de polifenoles presentes en los explantes. Por otra parte, Bhatia y Ashwath (2008) encontraron que durante el proceso de esterilización, la sacarosa se hidroliza a fructosa, lo cual se asocia a la presencia de 5-hidroximetil-2-furaldehído (HMF), que es una sustancia tóxica que conlleva oxidación de los explantes. En relación con la variable de temperatura, se obtuvo mayor oxidación a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$, similar a lo informado por Azofeifa (2009), quien cita que a temperaturas ligeramente menores a la normalmente empleada se reduce la actividad fenolasa. Por otra parte, el efecto y la relación de las fitohormonas con el oscurecimiento de los explantes no son consistentes debido a que un regulador que induce oscurecimiento en una especie, en otra no tiene el mismo efecto (Van-Staden et al., 2006). La presencia de la citocinina SAd evitó la oxidación, lo cual coincide con lo encontrado por Martínez (2012), quien obtuvo bajos porcentajes de oxidación mediante el tratamiento de explante de hoja adicionado con $88.77 \text{ } \mu\text{M}$ de BAP, en combinación con $53.70 \text{ } \mu\text{M}$ de ANA y PVP a 500 mg.L^{-1} , por lo que indica que es importante considerar el tipo de interacción o sinergia que los antioxidantes puedan tener con otros componentes químicos del medio.

CONCLUSIÓN

Se indujo la organogénesis usando como explantes yemas axilares aisladas de plantas adultas de *J. curcas*, siendo el tratamiento más eficiente el constituido por sacarosa 25 g.L^{-1} , ácido indolacético $1 \text{ } \mu\text{M}$, ácido 2,4-diclorofenoxiacético $1 \text{ } \mu\text{M}$, bencilaminopurina $10 \text{ } \mu\text{M}$, cinetina $10 \text{ } \mu\text{M}$, vitaminas de Gamborg, pH 6.0, a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y $1,000 \text{ Lux}$. No obstante, los neobrotes y los residuos del explante generaron callo, sobre todo en los tratamientos donde estuvo presente la auxina 2,4-D, el cual se formó a partir de la

última capa de células organizadas del explante. Se presentó oxidación parcial de los tejidos, dependiente de los factores físico-químicos, en particular de la sacarosa, la temperatura y el SA. Aunque los resultados contribuyen a la obtención de un protocolo para la micropropagación de *J. curcas* a partir de plantas adultas, es necesario realizar estudios adicionales para evaluar tipos de explante, concentraciones de las fitohormonas y condiciones de cultivo.

REFERENCIAS

- Azofeifa, A. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana* 20: 153-175.
- Bhatia, P.; Ashwath, N. (2008). Improving the quality of *in vitro* cultured shoots of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Red coat). *Biotechnol* 7: 188-193.
- Borges-García, M.; Estrada-Abel, E.; Pérez-Rodríguez, I.; Meneses-Rodríguez, S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Rev Colomb de Biotecnol* 11: 127-135.
- Cai, L.; Fu, L.; Ji, L. (2011). Regeneration of *Jatropha curcas* through efficient somatic embryogenesis and suspension culture. *GM Crops* 2: 110-117.
- Chan, S.T.; Ortega, R.F.; Rivera, L.J.; Fuentes, C. (2009). Embriogénesis somática de *Jatropha curcas*; una planta multipropósito con potencial para la producción de biodiesel. En: Memorias del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería "Acapulco 2009". Acapulco, México.
- Datta, M.M.; Mukherjee, P.; Ghosh, B.; Jha, T.B. (2007). *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). *Curr Sci India*, 93: 1438-1442.
- Fairless, D. (2007). Biofuel: The little shrub that could-maybe. *Nature* 449:652-655.
- Ferrer-Dubois, A.; Fung-Boix, Y.; Isaac-Alemán, E.; Novea-Colás, I. (2007). Micropropagación de café con campos magnéticos: una alternativa para la conservación de recursos fitogenéticos. *Ciencia en su PC* 1: 42-53.
- Kumar, N.; Anand, V.; Reddy, M. (2010). *In vitro* plant regeneration of Non-toxic *Jatropha curcas* L.: Direct shoot organogenesis from cotyledonary petiole explants. *J Crop Sci Biotech* 13: 189-194.
- Laguna, G.; Padilla, A.; Vacca, M.M.; Avilés, Z.; Bonomo, M.L.C. (2011). Inducción de calogénesis en distintos explantos de *Jatropha curcas*. II Seminario Internacional de *Jatropha curcas*. Argentina.
- Lobo-Arias, M.; Medina-Cano, C.I. (2009). Conservación de recursos genéticos de la agro-biodiversidad como apoyo al desarrollo de sistemas de producción sostenibles. *Rev Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 10: 33-42.
- Lux-Endrich, A.; Treutter, D.; Feucht, W. (2000). Influence of nutrients and carbohydrate supply in the phenol composition of apple shoot cultures. *Plant Cell Tiss Org* 60: 15-21.
- Maharana, S.; Mahato, V.; Behera, M.; Mishra, R.; Panigrahi, J. (2011). *In vitro* regeneration from node and evaluation of genetic fidelity through RAPD markers. *Indian J Biotechnol* 11: 280-287.
- Martínez, H.J. (2007). El piñón mexicano: una alternativa bioenergética para México. *Rev Dig Univ* 8: 1-10.
- Martínez, V.J.A. (2012). Efecto de reguladores de crecimiento, inhibidores de etileno y antioxidantes en la calogénesis *in vitro* de mangostán. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chiapas, México.
- Molist, P.; Pombal, M.; Megas, M. 2011. Atlas de Histología vegetal y animal. Técnicas Histológicas. Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud Facultad de Biología Universidad de Vigo.
- Montes-López, J.J.; Rodríguez-de-la-O, J.L. (2001). Establecimiento y brotación *in vitro* de yemas axilares y ápices de ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). *Rev Chapingo Horticultura* 7: 49-59.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-479.
- Nápoles, L.; Concepción, O.; Pérez, A.; Peralta, N.; Hernández, M.; Trujillo, R. (2005). Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.) relación entre el origen del explante y el contenido de compuesto fenólicos. *Cultivos tropicales* 26: 33-39.
- Nogueira, A.; Soares, A.; Ibrahim, A.; Campos, F. (2011). Analysis of organogenic competence of cotyledons of *Jatropha curcas* and their *in vitro* histological behavior. *Afr J Biotechnol* 10: 11249-11258.
- Ovando-Medina, I. (2005) Manual de cultivo tejidos vegetales para Ingenieros Biotecnólogos. Capítulo I. 12 pp. Publicado en línea <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Manual%20c%20in%20v.pdf>
- Ovando-Medina, I.; Espinosa-García, F.J.; Núñez-Farfán, J.; Salvador-Figueroa, M. (2011). Genetic variation in Mexican *Jatropha curcas* L. estimated with seed oil fatty acids. *J Oleo Sci* 60:301-311.
- Rajore, S.; Batra, A. (2005). Efficient plant Regeneration Via Shoot Tip Explant In *Jatropha curcas* L. *J Plant Biochem Biotech* 14:73-75.
- Ranwah, B.R.; Gupta, D.K.; Shah, M.A. (2009). Micropropagation of *Jatropha curcas* (L.). *Indian J Agr Res* 43: 269-273.
- Sánchez-Cuevas, M.; Salaverría, J.L. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo *in vitro* de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Revista UDO Agrícola* 4: 21-26.
- Sánchez-Gutiérrez, A.; Ovando-Medina, I.; Adriano-Anaya, L.; Espinosa-García, F.; Núñez-Farfán, J.; Salvador-Figueroa, M. (2011). Genetic diversity in *Jatropha curcas* populations in the State of Chiapas, Mexico. *Diversity* 3:641-659.
- Shrivastava, S.; Banerjee, M. (2008). *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Influence of additives. *Int J of Integr Biol* 3: 73-79.
- Shukla, P.; Makwana, V.; Bhatt, D.; Robin, P. (2013). Efficient method for direct and indirect organogenesis in biofuel crop *Jatropha curcas*. *Int J Pharm Bio Sci* 4:673-682.
- Singh, G.; Shetty, S. (2012). Evaluation *in vitro* rooting efficiency in the biodiesel plant, *Jatropha curcas*. *Biotechnol Bioinf Bioeng* 2: 591-596.
- Soomro, R.; Memon, R.A. (2007). Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas*. *Pak J Bot* 39: 2431-2441.
- Sujatha, M.; Makkar, H.P.S.; Becker, K. (2005). Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regul* 47: 83-90.
- Toalá, G.J.A. (2012). Efecto de auxinas y citoquininas en la organogénesis de *Jatropha curcas* L. en cultivo *in vitro*. Tesis de licenciatura. Universidad Tecnológica de la Selva. Ocosingo, Chiapas; México.
- Toral, O.C.; Iglesias, J.M.; Montes de Oca, S.; Sotolongo, J.A.; García, S.; Torsti, M. (2008). *Jatropha curcas* L., una especie arbórea con potencial energético en Cuba. *Pastos y Forrajes* 3: 191-207.
- Van-Staden, S.J.; Fennell, C.; Taylor, N. (2006). Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Scientia Horticulturae* 725: 55-62.
- Wei, Q.; Lu, W.; Liao, Y.; Pan, S.; Xu, Y.; Tang, L.; Chen, F. (2004). Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas*. *J Plant Physiol Mol Biol* 30: 475-478.