

**Morfogénesis de *Jatropha curcas* var. ALJC01,  
optimización de la inducción de organogénesis  
adventicia por MSR y análisis de la estabilidad  
genética en clonas con ocho resiembras *in vitro***

## **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA  
CON OPCIÓN TERMINAL EN BIOTECNOLOGÍA  
AGROALIMENTARIA**

**PRESENTA**

**M. en C. Gilbert José Herrera Cool**

**Directora:** Dra. Guadalupe López Puc

**Co-directora:** Dra. Ingrid Mayanin Rodríguez Buenfil

**Asesora:** Dra. Lourdes Georgina Iglesias Andreu

**Asesor:** Dr. João Loureiro

Mérida, Yucatán, México, Agosto de 2019

Guadalajara, Jalisco a 1 de julio de 2019

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO  
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO  
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.  
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del estudiante **Gilbert José Herrera Cool**, una vez leída y revisada la Tesis titulada "MORFOGÉNESIS DE *Jatropha curcas* var. ALJC01, OPTIMIZACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE ORGANOGÉNESIS ADVENTICIA POR MSR Y ANÁLISIS DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA EN CLONAS CON OCHO RESIEMBRAS *in vitro*" aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el estudiante para aspirar al grado de Doctor en Ciencias en Innovación Biotecnológica con opción terminal en Biotecnología Agroalimentaria durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente el uno del mes de julio del año dos mil diecinueve.



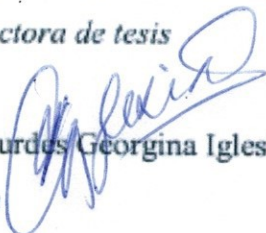
Dra. Guadalupe López Puc

*Directora de tesis*



Dra. Ingrid Mayanin-Rodríguez Buenfil

*Co-directora de tesis*



Dra. Lourdes Georgina Iglesias Andreu

*Asesora*

*João Loureiro*

Dr. João Loureiro

*Asesor*

## **JUNTA DIRECTIVA**

### **Título**

**Morfogénesis de *Jatropha curcas* var. ALJC01, optimización de la inducción de organogénesis adventicia por MSR y análisis de la estabilidad genética en clones con ocho resiembras *in vitro***

**Presenta:** M. en C. Gilbert José Herrera Cool

### **Junta directiva:**

**Directora:** Dra. Guadalupe López Puc

**Co-directora:** Dra. Ingrid Mayanin Rodríguez Buenfil

**Asesora:** Dra. Lourdes Georgina Iglesias Andreu

**Asesor:** Dr. João Loureiro

## **AGRADECIMIENTOS**

---

---

### **AGRADECIMIENTOS**

Al centro de Investigación y Asistencia y Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) subsede Sureste y Zapopan, por haberme permitido estudiar y trabajar en sus instalaciones con sus equipos, así como el apoyo de manera directa e indirecta de todos y cada uno de los investigadores y personal de administración y posgrado de la institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo de la beca número 218511 que me permitió realizar mis estudios de doctorado.

A la Dra. Guadalupe López Puc por el apoyo incondicional, los buenos deseos, conocimiento, consejos y aliento durante la realización de los estudios de posgrado que me permitieron terminar con éxito el doctorado.

A la Dra. Ingrid Mayanin Rodríguez Buenfil, por el apoyo, consejos, conocimiento e inspiración para superarme como investigador.

A la Dra. Lourdes Georgina Iglesias Andreu de la Universidad Veracruzana por sus revisiones, correcciones, sugerencias y apoyo en la realización del trabajo de investigación.

Al Dr. João Loureiro por haberme aceptado a desarrollar una estancia de investigación en el Departamento de Ciências da Vida en la Universidad de Coímbra, Portugal y sobre todo por el apoyo brindado en todo momento.

Al Dr. Alberto Uc Vázquez quien me brindó apoyo, consejo y amistad durante mi formación en el posgrado.

A cada uno de mis compañeros de la Universidad de Coímbra Mariana Neves, Inês Mota, Daniela Tavares, João Martins y Andrei quienes estuvieron conmigo en todo momento apoyándome durante la estancia en la universidad.

A mis amigos de generación de posgrado que se han graduado y los que están por graduarse por los momentos tan agradables que compartimos.

Al personal de servicios generales, seguridad e higiene por brindar las condiciones cómodas de las instalaciones para poder realizar sin problemas mis actividades en CIATEJ Subsede Sureste, sobre todo a mis amigos Víctor Peña May e Ildefonso Euan Cool quienes me motivaban a seguir adelante y por las pláticas tan agradables que pasamos.

## DEDICATORIAS

---

---

### DEDICATORIAS

A Dios por brindarme la oportunidad de concluir mis estudios de posgrado y sobre todo por poner a las personas indicadas en su momento durante toda mi vida para llegar hasta donde estoy en estos momentos.

A mi Familia Madre María Francisca del Socorro Cool García, hermanos Jesús, Alicia y sobrinos Emmanuel y Lizbeth Karelly quienes de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

A mi directora de tesis la Dra. Lupita quien fue una excelente directora, guía, compañera, amiga, pero sobre todo excelente ser humano de quien aprendí tanto a nivel profesional como personal.

A todo mi comité Dra. Ingrid, Dra. Lourdes y Dr. João, quienes gracias a su valioso apoyo, conocimientos y consejos fue posible la realización de la presente tesis.

A mi amigo y compañero el Dr. Alberto Uc Vázquez quien me apoyó y dio consejo cuando lo necesitaba tanto personal como profesional.

A mi segunda familia Favian, Leticia y el pequeño Matías por el apoyo y cariño desmedido que me brindaron en muchas ocasiones.

Finalmente, dedico éste trabajo a cada amigo y amiga que ha estado conmigo en esta batalla de la vida, siendo familia, creciendo, llorando, riendo, viviendo, apoyándonos cuando más lo necesitamos y extendiendo nuestras manos en momentos difíciles, quienes escapan de mi mente en este momento y que en algún momento de la vida tuve el privilegio de conocer.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

---

---

## I. ÍNDICE DE CONTENIDO

-JUNTA DIRECTIVA.....	I
-AGRADECIMIENTOS.....	II
-DEDICATORIAS.....	III
I. ÍNDICE DE CONTENIDO.....	IV
II. ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS.....	VII
III. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	X
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES.....	6
3.1. Generalidades Taxonómicas, morfológicas y ecológicas de <i>J. curcas</i> .....	6
3.2. Problemática mundial e importancia de <i>J. curcas</i> como cultivo energético.....	7
3.3. El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) como técnica para la micropropagación.....	8
3.4. Organogénesis <i>in vitro</i> .....	9
3.4.1. Factores que influyen en la organogénesis.....	10
3.4.1.1. El explante.....	10
3.4.1.2. El medio de cultivo basal.....	11
3.4.1.3. Componentes principales del medio de cultivo.....	11
3.4.1.4. Los Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV).....	13
3.4.1.5. Aditivos orgánicos.....	15
3.5. Optimización de la inducción de brotes mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR).....	16
3.6. Variación somaclonal (VS).....	17
3.6.1. Variación somaclonal en plantas cultivadas <i>in vitro</i> .....	18
3.7. Citometría de flujo.....	19
3.7.1. Estandarización del protocolo de citometría de flujo.....	20
3.7.1.1. Tampones utilizados para la estimación del contenido de ADN nuclear.....	20
3.7.1.2. Fluorocromos.....	22
3.7.1.3. Muestra estándar.....	24
3.7.2. Aplicaciones de la Citometría de Flujo (CF) en plantas.....	25

## ÍNDICE DE CONTENIDO

---

---

3.8. Marcadores moleculares para detección de polimorfismos.....	27
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>29</b>
<b>5. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>31</b>
<b>6. HIPÓTESIS.....</b>	<b>32</b>
<b>7. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
7.1. Objetivo general.....	33
7.2. Objetivos específicos.....	33
<b>8. METODOLOGÍA.....</b>	<b>34</b>
8.1. Obtención y establecimiento del material vegetal de <i>J. curcas</i> .....	34
8.2. Inducción del proceso de morfogénesis en <i>J. curcas</i> .....	35
8.3. Elongación de brotes adventicios.....	36
8.4. Enraizamiento.....	38
8.5. Aclimatación.....	39
8.6. Optimización de la inducción de brotes <i>in vitro</i> de <i>J. curcas</i> .....	39
8.6.1. Establecimiento de cultivos asépticos de <i>J. curcas</i> .....	39
8.6.2. Inducción de calogénesis y brotes adventicios en explantes de <i>J. curcas</i> .....	39
8.6.3. Diseño central compuesto (DCC).....	41
8.6.4. Establecimiento del experimento para los términos rotables.....	41
8.6.5. Validación de resultados.....	42
8.7. Citometría de flujo.....	43
8.7.1. Establecimiento de protocolo para estimación de contenido de ADN en plantas madre.....	43
8.7.2. Estimación del contenido de ADN de 1 hasta 8 resiembras.....	44
8.8. Fidelidad genética en clonas de <i>J. curcas</i> .....	44
8.8.1. Extracción de ADN de explantes de <i>J. curcas</i> .....	44
8.8.2. Amplificación de DAMD mediante PCR.....	46
8.8.3. Electroforesis.....	46
8.8.4. Interpretación del perfil de bandeo.....	46
<b>9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
9.1. Establecimiento del material vegetal e inducción de brotes adventicios.....	48
9.2. Elongación de brotes adventicios.....	51

## ÍNDICE DE CONTENIDO

---

---

9.3. Enraizamiento de plántulas de <i>J. curcas</i> obtenidas <i>in vitro</i> .....	54
9.4. Aclimatación de plántulas de <i>J. curcas</i> .....	57
9.5. Optimización de la inducción de brotes adventicios de <i>J. curcas</i> por MSR.....	58
9.5.1. Diseño factorial $3^3$ y Diseño central compuesto $2^2$ con cuatro puntos centrales.....	58
9.5.2. Ajuste al modelo cuadrático y análisis de superficie de respuesta.....	59
9.5.3. Validación de resultados.....	62
9.6. Estimación del contenido de ADN nuclear en <i>J. curcas</i> .....	62
9.6.1. Estimación en plantas madre.....	62
9.6.2. Estimación de ADN de uno hasta ocho resiembras <i>in vitro</i> .....	63
9.7. Detección de polimorfismos genético con marcadores DAMD.....	65
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	68
<b>11. PERSPECTIVAS/RECOMENDACIONES</b> .....	70
<b>12. REFERENCIAS</b> .....	71
<b>13. ANEXOS</b> .....	92



## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

---

---

### II. ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

#### Cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Taxonomía de <i>J. curcas</i> .....	6
<b>Cuadro 2.</b> Tipos de explante, método de regeneración, medios de cultivo y reguladores de crecimiento vegetal utilizados en micropropagación de <i>J. curcas</i> .....	10
<b>Cuadro 3.</b> Tiempo de inducción, Número de brotes por explante y medio más reguladores de crecimiento vegetal en organogénesis de brotes en <i>J. curcas</i> .....	17
<b>Cuadro 4.</b> Tampones de aislamiento nuclear más utilizados en citometría de flujo en plantas.....	21
<b>Cuadro 5.</b> Fluorocromos comúnmente utilizados en citometría de flujo y espectro de emisión dependiendo del tipo de laser usado.....	22
<b>Cuadro 6.</b> Mecanismos de acción de fluorocromos utilizados en citometría de flujo.....	23
<b>Cuadro 7.</b> Principales estándares de referencia para la estimación del contenido de ADN nuclear en unidades absolutas en plantas.....	24
<b>Cuadro 8.</b> Marcadores DAMD utilizados para detección de polimorfismo genético en <i>J. curcas</i> .....	28
<b>Cuadro 9.</b> Diseño experimental propuesto para la inducción de brotes de <i>J. curcas</i> .....	35
<b>Cuadro 10.</b> Diseño experimental propuesto para la elongación de brotes de <i>J. curcas</i> ...	37
<b>Cuadro 11.</b> Diseño experimental propuesto para el enraizamiento de brotes de <i>J. curcas</i> usando la auxina AIB.....	38
<b>Cuadro 12.</b> Diseño factorial 3 <sup>3</sup> para la inducción de brotes adventicios en explantes de <i>J. curcas</i> . .....	40
<b>Cuadro 13.</b> Diseño central compuesto en la inducción de brotes adventicios de <i>J. curcas</i> .....	41
<b>Cuadro 14.</b> Diseño experimental para puntos rotables en optimización de la inducción de brotes adventicios en <i>J. curcas</i> .....	42
<b>Cuadro 15.</b> Peso promedio final y número promedio de brotes obtenidos en explantes de <i>J. curcas</i> a los 45 días de cultivo.....	48

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

---

<b>Cuadro 16.</b> Desarrollo de brotes adventicios de <i>J. curcas</i> : crecimiento del tallo en cm, número de hojas y número de brotes.....	52
<b>Cuadro 17.</b> Porcentaje de organogénesis, número y longitud de raíces obtenidas en plántulas de <i>J. curcas in vitro</i> .....	55
<b>Cuadro 18.</b> Porcentaje de error obtenido de acuerdo con lo teórico y práctico para la inducción de brotes adventicios.....	62
<b>Cuadro 19.</b> Promedios de los picos de los histogramas en explantes de <i>Zea mays</i> y explantes de <i>J. curcas</i> ; contenido de ADN estimado de uno hasta ocho resiembras <i>in vitro</i> .....	64
<b>Cuadro 20.</b> Porcentaje de bandas polimórficas generadas con cinco iniciadores DAMD utilizados para amplificación por PCR.....	66
<b>Figuras</b>	
<b>Figura 1.</b> Aplicaciones del cultivo de tejidos y células vegetales.....	8
<b>Figura 2.</b> Respuestas generadas a la relación de la adición auxinas y citocininas típicamente requerida para crecimiento y morfogénesis.....	14
<b>Figura 3.</b> Respuesta celular a cambios moleculares generados por el ambiente <i>in vitro</i> en el cultivo de tejidos vegetales.....	18
<b>Figura 4.</b> Componentes principales de un citómetro de flujo.....	20
<b>Figura 5.</b> Etapas seguidas en el establecimiento aséptico de embriones de <i>J. curcas</i> .....	34
<b>Figura 6.</b> Proceso seguido para evaluar por citometría de flujo muestras de hojas de <i>J. curcas</i> . a) muestras de hojas estándar, <i>Bellis perennis</i> y <i>J. curcas</i> , b) fragmentación de las muestras y colocado en tampón WPB, c) filtrado de las muestras, d) aplicación del yoduro de propidio, e) colocado de la muestra en el citómetro de flujo, f) toma de lecturas y análisis de los resultados.....	43
<b>Figura 7.</b> Proceso de extracción de ADN utilizado en explantes de <i>J. curcas</i> .....	45
<b>Figura 8.</b> Inducción de brotes adventicios de <i>J. curcas</i> . a) callogénesis, b) desarrollo del brote a los 30 días de cultivo y c) desarrollo de plántula a los 45 días de cultivo.....	49
<b>Figura 9.</b> Interacciones de los factores principales en organogénesis de brotes adventicios de <i>J. curcas</i> . a) interacción de 2ip con AIA, b) interacción de 2ip con SAd, c) interacción de AIA con SAd.....	51
<b>Figura 10.</b> Brotes desarrollados de <i>J. curcas</i> a los 45 días de cultivo.....	53

## ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

<b>Figura 11.</b> Diagrama de Pareto para el desarrollo de brotes adventicios de <i>J. curcas</i> a los 45 días de cultivo.....	54
<b>Figura 12.</b> Raíces adventicias desarrolladas en plántulas <i>in vitro</i> de <i>J. curcas</i> a los 45 días de cultivo.....	55
<b>Figura 13.</b> desarrollo de plántulas aclimatadas de <i>J. curcas</i> , a) 45 días después de la aclimatación, b) 90 días después de la aclimatación.....	58
<b>Figura 14.</b> Diagramas de Pareto para el efecto de los factores 2ip, AIA y SAd en la inducción de brotes adventicios de <i>J. curcas</i> ; a) diagrama para el diseño factorial 3 <sup>3</sup> y b) diagrama para el diseño central compuesto 2 <sup>2</sup> con cuatro puntos centrales.....	59
<b>Figura 15.</b> Superficie de respuesta generada para la optimización de la inducción de brotes de <i>J. curcas</i> . a) superficie de punto máximo, b) gráfico de contornos.....	61
<b>Figura 16.</b> Histograma con promedios en G0/G1 para <i>J. curcas</i> variedad ALJC01 (RN1) y <i>Bellis perennis</i> L (RN2).....	62
<b>Figura 17.</b> Histogramas obtenidos en citometría de flujo de explantes de <i>J. curcas</i> provenientes de 1 a 8 resiembras. a-h) primera hasta la octava resiembra <i>in vitro</i> .....	63
<b>Figura 18.</b> Bandas detectadas en electroforesis de <i>J. curcas</i> con 5 iniciadores DAMD (JJ336, HVR, M13, HVA y HBV). MM: marcador molecular de 1 Kb, PM: planta madre <i>in vivo</i> , C: plántula clona <i>in vitro</i> . ....	65
<b>Anexos</b>	
<b>Anexo 1.</b> Análisis de varianza.....	92
<b>Anexo 2.</b> Soluciones utilizadas en electroforesis.....	96
<b>Anexo 3.</b> Matrices generadas con el análisis de la electroforesis con 5 iniciadores DAMD.....	97
<b>Anexo 4.</b> Costo de proceso de micropropagación por organogénesis indirecta de <i>J. curcas</i> .....	98
<b>Anexo 5.</b> Constancias de cursos impartidos.....	100
<b>Anexo 6.</b> Constancia de estancia en el extranjero.....	105
<b>Anexo 7.</b> Constancias de participación en congresos.....	106
<b>Anexo 8.</b> Publicaciones en revistas científicas y notas periodísticas.....	108
<b>Anexo 9.</b> Capítulos de libro publicados.....	113

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

### III. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Símbolo	Definición
°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
μM	Micromolar
μmol	Micromol
2,4D	2,4-diclorofenoxiacético
2C	Cantidad en pg de ADN contenido dentro de un núcleo diploide
2ip	6- (γ, γ-dimetilalilamino) purina
7-AAD	7 aminoactinomicina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ALJC01	variedad de <i>Jatropha curcas</i> registrada como ALJC01
ANA	Ácido naftalenacético
APC	Aloficocianina
ARN	Ácido ribonucleico
B	Boro
BA	Brote adventicio
BAP	Bencilaminopurina
C	Carbono
Ca	Calcio
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Nitrato de calcio tetrahidratado
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CF	Citometría de flujo
CH	Caseína hidrolizada
CIATEJ	Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
Cl	Cloro

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

---

<b>cm</b>	Centímetros
<b>CONACYT</b>	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
<b>CTV</b>	Cultivo de tejidos vegetales
<b>Cu</b>	Cobre
<b>DAMD</b>	Amplificación de regiones mini satélite de ADN (por sus siglas en ingles amplification of minisatellite-region of DNA)
<b>DAP</b>	Diámetro a la altura del pecho
<b>DAPI</b>	4', 6-diamidino-2-fenilindol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>FAD</b>	Flavín adenín dinucleotido
<b>Fe</b>	Hierro
<b>FITC</b>	Fluoresceína-5-isotiocianato
<b>FSC</b>	Dispersión frontal (por sus siglas en inglés forward scattering)
<b>g/L</b>	Gramos por litro
<b>G0</b>	Intervalo 0 (por sus siglas en ingles Gap 0)
<b>G1</b>	Intervalo 1 (por sus siglas en ingles Gap 1)
<b>G2</b>	Intervalo 2 (por sus siglas en ingles Gap 2)
<b>G1</b>	Grados libertad
<b>Gln</b>	L-Glutamina
<b>H</b>	Hidrogeno
<b>HR</b>	Humedad relativa
<b>IP</b>	Ioduro de propidio
<b>K</b>	Potasio
<b>KCl</b>	Cloruro de potasio
<b>Kin</b>	Kinetina
<b>KNO<sub>3</sub></b>	Nitrato de potasio
<b>LB01</b>	Tampón de lisis 01 (por su siglas en ingles lysis buffer)
<b>LED</b>	Diodo emisor de luz (por sus siglas en ingles light-emitting diode)
<b>Mg</b>	Magnesio
<b>mg</b>	Miligramos

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>Mg SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	Sulfato de magnesio heptahidratado
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O</b>	Fosfato de sodio hidratado
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de potasio
<b>mM</b>	Milimol
<b>min</b>	Minutos
<b>mm</b>	Milímetros
<b>Mn</b>	Manganeso
<b>Mo</b>	Molibdeno
<b>MOPS</b>	Ácido 3- (N-morfolino) propanosulfónico
<b>MS</b>	Medio basal Murashige y Skoog (1962)
<b>msnm</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>MSR</b>	Metodología de superficie de respuesta
<b>N</b>	Nitrógeno
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>Ni</b>	Níquel
<b>O</b>	Oxígeno
<b>OD</b>	Organogénesis directa
<b>OI</b>	Organogénesis indirecta
<b>P</b>	Fósforo
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PerCP / Cy5.5</b>	Tinte 5.5 proteína de cianina piperidin clorofila
<b>Höchst 3342</b>	2'-[4-etoxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5'-bi-1Hbenzimidazole trihidrato de trihidrocloruro
<b>pg</b>	Picogramos
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>Phl</b>	Floroglucinol
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>RN1</b>	Número de intervalo uno (por sus siglas en inglés range number 1)
<b>RN2</b>	Número de intervalo dos (por sus siglas en inglés range number 2)
<b>RCV</b>	Reguladores de crecimiento vegetal
<b>R-PE (PE)</b>	Ficoeritrina

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

---

<b>S</b>	Azufre
<b>s</b>	Segundos
<b>SAd</b>	Sulfato de adenina
<b>SAGARPA</b>	Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural y pesca
<b>SSC</b>	Dispersión lateral (por sus siglas en inglés side scattering)
<b>TAE</b>	Tris, acetato y EDTA
<b>TDZ</b>	Tidiazuron
<b>Tris</b>	Trisaminometano
<b>Tris.MgCl<sub>2</sub></b>	Trisaminometano cloruro de magnesio
<b>v/v</b>	Volumen sobre volumen
<b>VS</b>	Variación somaclonal
<b>w/v</b>	Peso sobre volumen ( por sus siglas en ingles weight/volume)
<b>WPB</b>	Tampón para plantas leñosas (por sus siglas en inglés woody plant buffer)
<b>Zn</b>	Zinc

### 1. RESUMEN

*Jatropha curcas* L. es un cultivo energético de segunda generación, que produce aproximadamente el 40% del aceite en sus semillas, que puede transformarse en biodiesel por transesterificación. El cultivo *in vitro* es una herramienta valiosa para la multiplicación y conservación de variedades de plantas de élite. En el caso de *J. curcas*, existen varios informes sobre la micropropagación de la especie, pero con baja reproducibilidad, probablemente debido al comportamiento de los diferentes genotipos. El objetivo de este estudio fue inducir la organogénesis *in vitro* de *J. curcas*, maximizar el proceso de formación de brotes adventicios por la metodología de superficie de respuesta (MSR), estimar la estabilidad del contenido de ADN nuclear durante ocho generaciones de resiembras *in vitro* mediante citometría de flujo y verificar la fidelidad genética de planta madre con la novena generación clonal. Para la morfogénesis *in vitro*, se obtuvo organogénesis adventicia de brotes de *J. curcas* en un medio MS al 75% (w/v) con 110.25  $\mu\text{M}$  de 6- ( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilamino) purina (2ip), 1.27  $\mu\text{M}$  de ácido indolacético (AIA) y 369.21  $\mu\text{M}$  de sulfato de adenina (SAd), en esas condiciones, se obtuvieron hasta  $18.50 \pm 0.7$  brotes por explante. El desarrollo de los brotes se obtuvo en medio MS 100% (w/v) suplementado con 4.44  $\mu\text{M}$  de bencilaminopurina (BAP), 1.0  $\mu\text{M}$  de AIA y 543  $\mu\text{M}$  de SAd elongando hasta  $1.67 \pm 0.76$  cm. La organogénesis de raíces promedio fue de  $13.6 \pm 2.51$  raíces en un medio de MS 50% (w/v) suplementado con 14.7  $\mu\text{M}$  de ácido indolbutírico (IBA). Una vez obtenida la inducción de brotes adventicios, se realizó una optimización de los mismos utilizando la metodología de superficie de respuesta, para ello, se realizó un ensayo para inducir la organogénesis de brotes utilizando los RCV 2ip y AIA. Posteriormente, se efectuó un diseño central compuesto  $2^2$  con cuatro puntos centrales y un diseño experimental conocido como términos rotatables. Finalmente, se analizaron los datos para obtener el modelo de segundo orden y los gráficos de superficie. La inducción máxima de brotes adventicios obtenidos fue de 21 brotes por explante de hoja en el tratamiento formulado con el medio de cultivo Murashige y Skoog al 75% (w/v) de fuerza iónica adicionado con 83.3  $\mu\text{M}$  de 2ip y 1.3  $\mu\text{M}$  de AIA. La estabilidad genética de los clones de uno a ocho resiembras fue comprobada por citometría de flujo. Esta varió de  $0.80 \pm 0.12$  a  $1.07 \pm 0.23$  pg de ADN nuclear. De igual forma mediante el uso de marcadores DAMD se constató la presencia de 54 a 87% de bandas polimórficas en las clonas con ocho resiembras. Estos resultados indican la existencia de importante variación



## **RESUMEN**

---

---

somaclonal generada con el protocolo de micropropagación establecido, esto indica que el protocolo mi micropropagación no podría ser utilizado para obtener el 100% de clonas fieles a la planta madre, sin embargo, en especies alógamas como esta en la que hay un poco de variación, contribuiría a que no haya depresión consanguínea y presente adecuada plasticidad para enfrentarse a factores bióticos y abióticos estresantes.

## INTRODUCCIÓN

---

---

### 2. INTRODUCCIÓN

En el comienzo de la década de 1980 se detectaron problemas de cambio climático, alteraciones atmosféricas como la lluvia ácida y el agujero en la capa de ozono, debido a esto se creó la “Comisión Mundial para el Ambiente y el Desarrollo” (informe Bruntland), el cual detonó varias políticas que fueron confrontadas por los gobiernos, debido al riesgo del desarrollo económico (Mitchell *et al.*, 1996; Beder, 2006).

Por otro lado la sequía inexplicable ocurrida en Estados Unidos en 1988, generó leyes ambientales en Canadá y el rechazo del informe Bruntland por la Unión Soviética, formando así el “Panel Intergubernamental de Cambio Climático”, enfocando metas para la reducción de emisión de gases invernadero (GHG`s) que se materializaron en acciones políticas en la cumbre de Río de Janeiro (Mitchell *et al.*, 1996) y en la posterior firma del protocolo de Kyoto en 2005 (Grover, 2008).

Bajo este marco surgen nuevas estrategias políticas que buscan impulsar el desarrollo económico tratando de depender menos de los fósiles. Como ejemplo, el reporte del Banco Mundial para la perspectiva energética en Europa Oriental y la Región Asia Central, recomendaron reformas gubernamentales a favor de un aumento en la eficiencia del uso de energéticos en el sector público, el diseño de medios alternativos de transporte, así como informar a la sociedad de formas de ahorro de energía (Sharma, 2010).

En el 2006, la Federación Europea de Agencias y Regiones para la Energía y el Ambiente (FEDARENE, por sus siglas en inglés), plantearon acciones a favor del uso de las energías renovables con cultivos energéticos de segunda generación, teniendo como ideología un desarrollo sustentable relacionado a la protección ambiental, creación de empleos y crecimiento económico. Un cultivo energético de segunda generación, cuyo uso puede contribuir a generar energías renovables es *Jatropha curcas*, considerada originaria de México y Centro América (Navarro *et al.*, 2016), tolerante a la sequía con buena adaptación a varias condiciones edafoclimáticas (Divakara *et al.*, 2010); de gran importancia debido a que las semillas contienen hasta un 40% de aceite apropiado para transformar en biodiesel por transesterificación (Li *et al.*,

## INTRODUCCIÓN

---

---

2016; Soares *et al.*, 2016); este cultivo a su vez puede ser utilizado en la recuperación de áreas degradadas por la explotación minera y deforestadas por uso de suelos (Dias *et al.*, 2012; Carels, 2013; Sabandar, *et al.*, 2013), además, al látex translúcido que exuda se le atribuyen usos medicinales (Bahadur *et al.*, 2012; Sabandar, *et al.*, 2013).

*Jatropha curcas* es un cultivo que fue promocionado en México para la reforestación en el programa proárbol de la CONAFOR (Maserá *et al.*, 2011) y para la obtención de biodiesel; varios inversionistas y políticos han estado interesados en la producción de biodiesel, la reducción de impactos ambientales y el fortalecimiento socioeconómico (Divakara *et al.*, 2010). En Yucatán se prevé plantar 30,000 hectáreas para producir 4 millones de litros diarios de biocombustibles y así disminuir el consumo de combustibles fósiles de 10 al 15% y evitar la generación de dióxido de carbono (Yucatan.com.mx, 2017).

Para cubrir la demanda antes mencionada, la propagación a través de las semillas es ampliamente utilizada, pero no es favorable debido a la pérdida de homogeneidad del genotipo (Daud *et al.*, 2013); por otra parte, la propagación masiva a través de estacas, es estacional, el rendimiento de semillas es bajo, las plantas tienen menor resistencia a sequía, enfermedades y no forman una raíz pivotante (Sujatha *et al.*, 2005; Datta *et al.*, 2007).

Una opción para cubrir la demanda de material vegetal de variedades elite, es a través de técnicas de multiplicación masiva de plantas (Panghal *et al.*, 2012) y protocolos eficientes y reproducibles de morfogénesis. En este contexto hay reportes de organogénesis en *J. curcas* (Liu *et al.*, 2015; Verma y Verma, 2015; Ali *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016), sin embargo, presentan baja reproducibilidad, lo que conlleva un reto obtener un protocolo eficiente y reproducible para la especie.

Una de las problemáticas que presentan los trabajos de micropropagación es la generación de VS (Larkin y Scowcroft, 1981). En *J. curcas* se ha evaluado la VS mediante diversos marcadores moleculares (Dahab *et al.*, 2017). Sin embargo, no se cuenta con suficiente información sobre el análisis de la fidelidad genética mediante citometría de flujo, por ello se propuso en el presente

## INTRODUCCIÓN

---

---

trabajo establecer un protocolo para la micropropagación de *J. curcas* variedad ALJC01 y la evaluación de la fidelidad genética del material micropropagado.

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

---

---

### 3. MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

#### 3.1. Generalidades Taxonómicas, morfológicas y ecológicas de *J. curcas*

La taxonomía de *J. curcas* (Cuadro 1) fue determinado por Linneo (1753-1754), dos de ellas hoy incluidas en *Cnidocolus*, una especie posteriormente segregada al género *Manihot* y otra especie hoy referida al género *Aleurites*; mientras que las tres especies restantes aún forman parte del género: *J. gossypifolia*, *J. multifida* y *J. curcas* (Font, 2003).

Cuadro 1. Taxonomía de *J. curcas* (<https://www.tropicos.org>)

Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Tracheobionta</i>
División:	<i>Embryophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Rosidae</i>
Orden:	<i>Malpighiales</i>
Familia:	<i>Euphorbiaceae</i>
Subfamilia:	<i>Crotonoideae</i>
Tribu:	<i>Jatrophaeae</i>
Género:	<i>Jatropha</i>
Especie:	<i>Jatropha curcas</i> L.

*J. curcas* es un arbusto, caducifolio de 2-3 metros de altura, diámetro a la altura de pecho (DAP) de hasta 20 cm, fuste ramificado a poca altura, copa ancha e irregular, los tallos crecen con una discontinuidad morfológica en cada incremento, la corteza es verde amarillento, pálido y casi liso con desprendimientos en tiras horizontales. Exuda savia amarillenta y de sabor astringente (Toral *et al.*, 2008).

Ésta especie presenta distribución en los trópicos y los subtrópicos, es tolerante a altas temperaturas, se encuentra mayormente a 1 200 msnm en planicies o colinas con precipitaciones de 300 a 1 800 mm, no requiere de un tipo de suelo especial. Su requerimiento de agua es sumamente bajo y puede soportar períodos largos de sequía (de tres a seis meses). Se adapta a

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

---

una gran variedad de suelos, incluyendo los de bajo contenido de nutrientes (Torres, 2007; Martínez, 2008).

Es probable que el lugar de origen sea México y otros países de América Central (Toral, 2008). Según Schmook *et al.* (1997), *J. curcas* era conocida y utilizada por los mayas y sugieren que, desde el Caribe, fue probablemente distribuida por los navegantes portugueses a países de África, a través de Cabo Verde y Guinea Bissau, y también a países del sudeste de Asia tales como Indonesia, Malasia y Filipinas (Toral, 2008).

### **3.2. Problemática mundial e importancia de *J. curcas* como cultivo energético**

Los recursos energéticos son indispensables para el desarrollo económico sostenible y social de un país. La extracción indiscriminada y el aumento del consumo de combustibles fósiles han dado lugar a la reducción de los recursos de carbono y la liberación de emisiones nocivas que son la principal razón del calentamiento global y el agotamiento de la capa de ozono. Los derivados de aceites vegetales son combustibles alternativos bastante prometedores y alternativos para motores diésel (Saravanan *et al.*, 2015). Las energías renovables se han convertido en la elección estratégica del mundo para resolver la contaminación del medio ambiente y lograr un desarrollo social sostenible frente a la crisis energética (He *et al.*, 2016). En medio de este escenario, dos de las tareas más difíciles son reducir el consumo de fósiles combustibles y aumentar el uso de energías renovables.

En los últimos años, países como India, China, Malasia, México entre otros han estado explorando el potencial de *J. curcas* para la producción de biodiesel y para el uso de la torta de extracción como alimentación de ganado (Navarro *et al.*, 2016). Además éste cultivo permite recuperar tierras marginales y degradadas (Biswas *et al.*, 2010) y podría contribuir a la disminución de la pobreza rural a través de la diversificación de la actividad agrícola (Edrisi *et al.*, 2015).

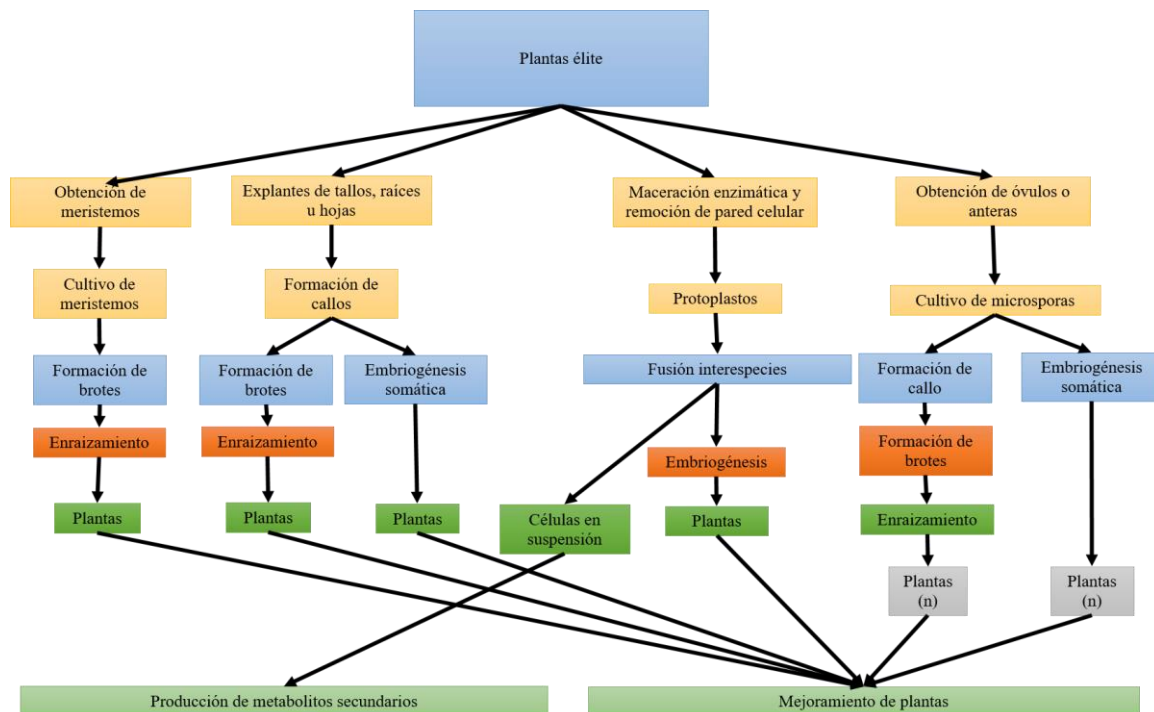
A pesar de la importancia ecológica, agronómica, sociológica y cultural de ésta especie, no se cuenta con variedades que sean redituables, sin embargo, se ha explorado varias maneras de

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

aprovechar la biomasa como materia prima para diversos procesos como: pirolisis, densificación, carbón activado, gasificación, combustión, digestión anaeróbica, fermentación en estado sólido, extracción y purificación de compuestos (Navarro *et al.*, 2016).

### 3.3. El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) como técnica para la micropropagación

El CTV es un conjunto de técnicas aplicadas *in vitro*, que comprende el cultivo aséptico de protoplastos, células, tejidos u órganos (denominados comúnmente explantes) en un medio artificial de composición química definida, los cuales, se incuban en condiciones ambientales controladas (Levitus *et al.*, 2010) con el fin de generar protocolos de micropropagación que permitan realizar mejoramiento genético de plantas y la producción de metabolitos (Figura 1). Las aplicaciones del CTV se pueden resumir en: a) estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica, y ciencias afines, b) obtención de plantas libres de patógenos, c) método para la conservación e intercambio de germoplasma y d) morfogénesis *in vitro* (Organogénesis o embriogénesis somática) (Roca y Mroginski, 1991).



**Figura 1.** Aplicaciones del cultivo de tejidos y células vegetales (Moniruzzaman *et al.*, 2016).

### 3.4. Organogénesis *in vitro*

La organogénesis en plantas es un evento morfogénico que ocurre por modificaciones estructurales y de organización celular dando como resultado un organismo unipolar. En el cultivo de tejidos *in vitro* puede ser directa (formación a partir del explante) o indirecta (tiene que pasar por la previa inducción de callo) (Sharry *et al.*, 2015). Éste proceso por lo general puede ser inducido por la aplicación de reguladores de crecimiento vegetal (RCV), con un adecuado balance de auxinas y citocininas, por otro lado, también influye la capacidad del tejido a responder a estos factores durante el cultivo (Munetaka, 1999).

La organogénesis ocurre en diferentes fases, primero las células del explante adquieren competencia, la cual, es definida como la habilidad de las células para reorganizarse mediante la respuesta a las señales hormonales y posteriormente las células competentes son canalizadas para la formación de órganos específicos influenciadas por el balance de los RCV (Munetaka, 1999). La organogénesis está basada en la totipotencia que poseen las células vegetales que se refiere a que toda la información genética necesaria para el crecimiento y reproducción del organismo, está contenido en la célula, aunque en teoría todas las células son totipotenciales, particularmente las células meristemáticas son las más capaces de expresarla (Razdan, 2003).

Ésta totipotencia es una de las principales propiedades de las células vegetales que aseguran la posibilidad de sobrevivencia de las plantas bajo diferentes condiciones ambientales. La misma garantiza un amplio uso de la biotecnología. En condiciones *in vitro*, prácticamente cualquier célula, aun las diferenciadas son capaces de retomar (des-diferenciarse) a un estado basal meristemático, esto se logra bajo la influencia de reguladores crecimiento exógenos en un medio de cultivo adecuado, que estimula el inicio de la división celular y la proliferación de las células hasta formar callos y/o suspensiones celulares, e iniciar la formación de brotes o raíces, o embriones somáticos. Estudios recientes han logrado detectar que los genes que controlan el desarrollo vegetal *in vivo* juegan un papel principal en la expresión de la totipotencia de las células vegetales *in vitro* (Ezhova, 2003).



## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

### 3.4.1. Factores que influyen en la organogénesis

#### 3.4.1.1. El explante

Un explante, en cultivo de tejido vegetal, es un grupo de células, tejido u órgano de una planta que se coloca en un medio artificial con las condiciones correctas que puede adquirir competencia organogénica para desarrollar tejidos diferenciados. En el Cuadro 2, se pueden observar los tipos de explantes el método de regeneración, medios de cultivo y los reguladores de crecimiento vegetal más utilizados en la micropropagación de *J. curcas*.

Cuadro 2. Tipos de explante, método de regeneración, medios de cultivo y reguladores de crecimiento vegetal utilizados en micropropagación de *J. curcas*.

<b>Tipo de explante</b>	<b>Método de regeneración</b>	<b>Medio + RCV</b>	<b>Referencias</b>
Segmentos nodales	BA	MS + AIA, AIB, Kin	Rathore <i>et al.</i> (2015)
Hoja cotiledonar	OI	MS+ BAP, AIB, AG <sub>3</sub>	Soares <i>et al.</i> (2016)
Pecíolo	OD	MS+TDZ, Kin, BAP, ANA	Kumar y Reddy (2010)
Segmento de hoja	BA	MS+TDZ, BAP, AIB	Deore y Johnson (2008)
Yemas axilares	OD	MS+BAP, AIB	Shrivastava y Banerjee (2008)
Embrión inmaduro	OI	MS+BA, Kin, AIB	Varshney y Johnson (2010)
Hoja cotiledonar	OD	MS+TDZ, Kin, BAP,	Kumar <i>et al.</i> (2010)
Epicótilo e hipocótilo	OD y OI	MS+TDZ, Kin, AIB	Kaewpoo y Te-chato (2010)
Yema axilar	BA	MS+BAP + AIB	Thepsamran <i>et al.</i> (2008)
Pecíolos	OD	MS+ TDZ, BAP, AIB	Pequeño <i>et al.</i> (2015)

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

Peciolo cotiledonar	OD	MS+TDZ	Liu <i>et al.</i> (2016)
Segmentos nodales	OD y OI	MS+AIB,BAP, Kin,	Ali <i>et al.</i> (2015)
Laminas foliares,	C	MS+2,4-D, ANA	Kumar <i>et al.</i> (2015)
Brotos adventicios	OD	MS+TDZ,AG <sub>3</sub> AIB	Liu <i>et al.</i> (2015)

RCV: Reguladores de Crecimiento Vegetal; BAP: Bencilaminopurina; Kin: Kinetina; AIB: Ácido indolbutírico; TDZ: Tidiázuron; AIA: Ácido indolacético; ANA: Ácido naftalenacético; PVP: Polivinilpirrolidona, Gln: L-Glutamina. BA: Brotos Adventicios, OI: Organogénesis Indirecta, OD: Organogénesis Directa, C: callogénesis.

### 3.4.1.2. El medio de cultivo basal

En la actualidad existen varios medios de cultivo que contienen entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran nutrimentos minerales, vitaminas, sacarosa, agente gelificante, reguladores de crecimiento entre otros compuestos. Los reportes sobre el cultivo *in vitro* de *J. curcas* señalan al medio Murashige y Skoog, 1962 (MS) como el medio más utilizado para la embriogénesis somática y la organogénesis directa o indirecta de los explantes (Cuadro 2).

### 3.4.1.3. Componentes principales del medio de cultivo

Los medios de cultivo están constituidos por componentes inorgánicos, los cuales son suministrados en cantidades relativamente grandes (macronutrientes) y otros que se adicionan en menor cantidad (micronutrientes).

Dentro de los macronutrientes, se encuentran el nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg) y azufre (S). El nitrógeno se adiciona al medio de cultivo en forma de nitrato o iones amonio, o la combinación de ambos iones, el sulfato de magnesio ( $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$ ) satisface tanto el requerimiento de magnesio como el de azufre, el fósforo puede adicionarse en cualquiera de las formas  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  o  $KH_2PO_4$ , el potasio es un catión que se agrega en forma de KCl,  $KNO_3$ , o  $KH_2PO_4$ , el calcio se adiciona con,  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  o la forma anhidra de cualquier sal y el cloro se presenta en forma de KCl o  $CaCl_2$  (George *et al.*, 2008a).

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

---

Entre los micronutrientes, que se adicionan a los medios de cultivo se encuentran: hierro (Fe), níquel (Ni), cloro (Cl), manganeso (Mn), Zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu), y molíbdeno (Mo). Estos elementos junto con el carbono (C), oxígeno (O) e hidrógeno (H) constituyen los 17 elementos esenciales, para una adecuada actividad metabólica de las células vegetales (Gamborg *et al.*, 1976).

El Fe es requerido para la formación de precursores de la clorofila y es un componente de los citocromos, ferredoxina y leghemoglobina, esta última es esencial en la fijación de nitrógeno por las plantas leguminosas (Pushnik *et al.*, 1984). Por lo general, el Fe es añadido en forma de quelato cuyas moléculas son capaces de retener unión de un metal con varias uniones químicas, formando un anillo complejo (un quelato) como el EDTA (ácido etilendinitrotetraacético) que en bajas concentraciones estimula el crecimiento al hacer disponible en bajas cantidades este elemento (George *et al.*, 2008a). El Mn es necesario para el mantenimiento del proceso fotosintético (Yachandra *et al.*, 1996).

Los elementos Cu y Zn son requeridos para la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos (Murashige y Skoog, 1962). El Zn está relacionado con la síntesis de triptófano, precursor del ácido indolacético (AIA) y ejerce control sobre las ribonucleasas lo que permite mantener la síntesis proteica en caso de estrés ambiental (medio de cultivo) (Tsui, 1984). El Cu, además es un componente de la Plastocianina que es esencial en el funcionamiento del transporte electrónico de la fotosíntesis y es activador de otras enzimas como la oxidasa del ácido ascórbico (Vitamina C), tirosinasa, lacasa, fenolasa y citocromoxidasa, esta última forma parte de la cadena de transporte electrónico del proceso respiratorio (Shioi *et al.*, 1978).

El Mo forma parte de las enzimas nitrato reductasas en plantas y de las nitrogenasas en leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno (Murashige y Skoog, 1962; Gamborg *et al.*, 1976). El boro (B) es necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática; está involucrado en la síntesis de bases nitrogenadas, en particular uracilo y adenina y por ello aumenta los niveles de citocininas y ácidos nucleicos (Johnson y Albert, 1967).

### 3.4.1.4. Los Reguladores de Crecimiento Vegetal (RCV)

Los RCV son un grupo de moléculas pequeñas de naturaleza química diversa que controlan procesos, que van desde el crecimiento y desarrollo de la planta, hasta su respuesta frente al estrés biótico y abiótico (Lumba *et al.*, 2010). El éxito del CTV depende en parte de la adición de RCV y de otras sustancias que activan la organogénesis (Gaspar *et al.*, 1996).

Las auxinas usadas en CTV, usualmente forman una parte integral del medio de cultivo; promueven (en combinación con las citocininas) principalmente el crecimiento de callo y células en suspensión, de igual forma, regulan el desarrollo de órganos (George *et al.*, 2007); también controlan los procesos de división y elongación celular; están involucradas en la formación de meristemas que originan la formación de órganos en los tejidos organizados, las auxinas están involucradas en el establecimiento y mantención de la polaridad, marcando en todas las plantas la dominancia apical (Zažímalová *et al.*, 2003).

Por lo general, el uso de las auxinas depende de la concentración administrada, tipo de regulador y desarrollo requerido, la conjugación con las citocininas y la síntesis endógena del explante (George *et al.*, 2007). Entre las auxinas naturales o sintéticas que se pueden utilizar en el CTV podemos mencionar al ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB), ácido naftalenacético (ANA), glucobrassicina, 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D), dicamba, Picloram entre otros (George *et al.*, 2007).

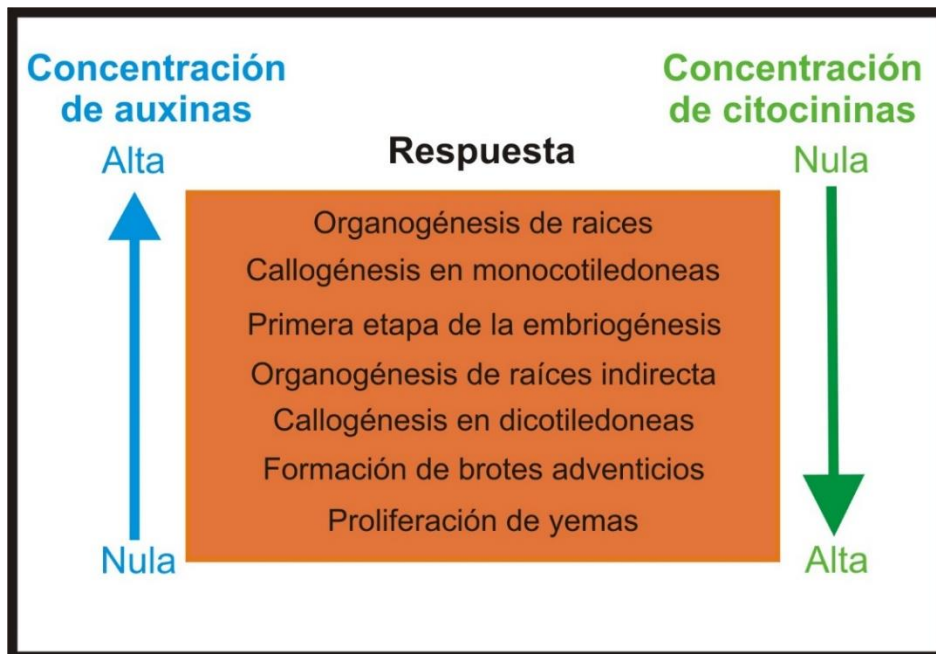
Las citocininas son un grupo de reguladores de crecimiento que producen varios efectos cuando son aplicados a los explantes y particularmente estimulan la síntesis de proteínas que participan en el control del ciclo celular (George *et al.*, 2008b); estimulan el desarrollo de meristemas y promueven el desarrollo de brotes en combinación con concentraciones bajas de auxinas (Maharana *et al.*, 2012).

Al igual que las auxinas se conocen varias citocininas naturales y sintéticas, la primera citocinina descubierta fue la kinetina (Miller *et al.*, 1955), llamada así, porque estimula la división celular, aunque la kinetina no ha sido aceptada como un regulador natural, se han identificado muchas

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

citocininas estructuralmente relacionadas a la kinetina; hasta ahora algunas de las citocininas naturales o sintéticas utilizadas en el cultivo *in vitro* son la kinetina (Kin), bencilaminopurina (BAP), trans-zeatina, dihidro-zeatina, cis-zeatina, zeatina ribosa, tidiazuron (TDZ), 6- ( $\gamma$ ,  $\gamma$ -Dimethylallylamino) purina (2ip) entre otros (George *et al.*, 2007; George *et al.*, 2008b).

La asociación de citocininas con auxinas casi siempre genera respuestas organogénicas a los diversos explantes expuestos en el medio basal (George *et al.*, 2008b). Las respuestas que se pueden generar depende de las concentraciones de cada una, por ejemplo, cuando se agregan concentraciones similares de cada una, la tendencia es desarrollo de tejido calloso; por otro lado, la adición de altas concentraciones de auxinas y bajas de citocininas, generan raíces o inducción de procesos de embriogénesis somática, contrario a lo que sucede en presencia de bajas concentraciones de auxina y altas de citocininas que contribuirán a la formación de brotes adventicios o proliferación de yemas (Figura 2).



**Figura 2.** Respuestas generadas a la relación de la adición auxinas y citocininas típicamente requerida para crecimiento y morfogénesis (George *et al.*, 2007).

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

---

---

La relación auxina-citocinina en *J. curcas* se aprecia en el trabajo de Nogueira *et al.* (2011) donde se indica que el uso de altas concentraciones de citocininas (BAP) en combinación con bajas de auxinas (AIA) producen un mayor número de brotes.

### 3.4.1.5. Aditivos orgánicos

Los aditivos son sustancias químicas orgánicas que se pueden agregar al medio nutritivo para mejorar las respuestas de los explantes a la organogénesis, por ejemplo, hay muchos aminoácidos que se pueden adicionar al medio para facilitar la producción de proteínas en cultivo de células en suspensión (Thorpe, 1993).

Existen diversos modos de acción de los aditivos como el extracto de levadura de cerveza que influencia la morfogénesis *in vitro* (George *et al.*, 2008a; Al-Khayri, 2010) ya que es una fuente de vitaminas, nitrógeno, aminoácidos, péptidos y carbohidratos (Pervin *et al.*, 2013); la caseína hidrolizada (CH) es producida desde la hidrólisis de la caseína encontrada en la leche el cual es un excelente recurso de aminoácidos y nitrógeno (Bister *et al.*, 1985); el agua de coco muestra actividad citocinina ya que promueve la división celular (Pervin *et al.*, 2013), también es utilizado en diversos protocolos de micropropagación, aporta principalmente azúcares, minerales y contiene reguladores de crecimiento vegetal como zeatina, giberelinas, ácido indolacético y ácido absísico (Prades *et al.*, 2012).

Otro aditivo orgánico es la adenina, que es una nucleobase de purina con una amplia gama de funciones químicas y bioquímicas *in vivo* e *in vitro*. Es una molécula reguladora y un componente de las moléculas de ADN, ARN, cofactores (NAD, FAD) y de señalización (cAMP) (George *et al.*, 2008a). De acuerdo con Murashige (1974) la adenina en forma de sulfato de adenina (SAd) puede estimular el crecimiento celular y mejorar enormemente la formación de brotes; esto se debe a que actúa como un precursor de la síntesis de citocinina natural (Khan *et al.*, 2014). Los compuestos producidos podrían ser más efectivos a causa de una respuesta fisiológica de las citocininas añadidas al medio (Van Staden *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2014); provee también de un recurso adicional de nitrógeno a las células, el cual puede ser absorbido más rápidamente como nitrógeno inorgánico (Husain *et al.*, 2006).

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

---

Shrivastava y Banerjee (2008) han reportado el uso de aditivos orgánicos con un método eficiente de morfogénesis de *J. curcas* a través de yemas axilares en medio MS al 100% de su fuerza iónica conteniendo BAP ( $3.0 \text{ mg L}^{-1}$ ), AIB ( $1.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) y los aditivos orgánicos sulfato de adenina ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ), glutamina ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ), L- arginina ( $15 \text{ mg L}^{-1}$ ) y ácido cítrico ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante cuatro semanas de inoculación. Por otro lado, Datta *et al.* (2007) obtuvieron la mayor proliferación de brotes al adicionar  $55.6 \mu\text{M}$  de sulfato de adenina en un medio MS al 100% de su fuerza iónica más BAP ( $22.2 \mu\text{M}$ ). Otra investigación realizada por Rajore *et al.* (2002) logró la multiplicación de los brotes en medio MS conteniendo kinetina ( $2.0 \text{ mg/L}$ ) más AIB ( $1.5 \text{ mg/L}$ ) y compuestos orgánicos como: ácido ascórbico ( $10.0 \text{ mg/L}$ ), ácido cítrico ( $50.0 \text{ mg/L}$ ), sulfato de adenina ( $25.0 \text{ mg/L}$ ) y glutamina ( $100.0 \text{ mg/L}$ ). Panghal *et al.* (2012) establecieron un protocolo para la inducción de la organogénesis utilizando un medio MS conteniendo  $23.61 \mu\text{M}$  de TDZ mas aditivos orgánicos como sulfato de adenina ( $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), glutamina ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), L-arginina ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ), ácido cítrico (0.0025%) y ácido ascórbico (0.005%).

### **3.5. Optimización de la inducción de brotes mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)**

La MSR es un método estadístico de identificación de variables críticas en un proceso influenciado por factores los cuales afectan la variable de respuesta. Estas variables, pueden ser determinadas por experimentos preliminares, bibliografía o por la experiencia del investigador. Usualmente los factores se limitan a dos o tres con el fin de simplificar el modelo estadístico (Bezerra *et al.*, 2008).

Una de las ventajas de la MSR, es que se establece los experimentos adecuados a realizarse al seleccionar un grupo de experimentos de todos los posibles. El análisis de datos se realiza por medio de un programa de computación adecuado para obtener los valores óptimos. Las conclusiones hechas de estos análisis son confirmados con pruebas posteriores, en donde se trabaja con los valores óptimos encontrados para las variables probadas y se puede estimar el margen de error del modelo (Humberto y de la Vara, 2008; Zhao *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014).

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

En un protocolo de micropropagación se pueden optimizar una o todas las etapas del proceso, dependiendo del objetivo del trabajo; hay poca investigación con la optimización por MSR en cultivo de tejidos, sin embargo, algunos trabajos como el realizado por Gómez *et al.* (2015), sugiere que el modelo de MSR con diseño de puntos centrales obtuvieron óptimas condiciones para la organogénesis de brotes a partir de hojas cotiledonares de lechuga (*Latuca sativa* L.). Naveenchandra *et al.* (2011) utilizaron como factores para encontrar las condiciones óptimas de organogénesis en berenjena (*Solanum melongena* L.) el tidiazuron, el medio de cultivo y la sacarosa, sugiriendo que las condiciones encontradas son ideales para producir a gran escala y reducir costos el cultivo. En el Cuadro 3 se puede observar el promedio de organogénesis de brotes en *J. curcas in vitro* que servirá como referencia para optimizar la inducción de brotes del presente trabajo.

**Cuadro 3.** Tiempo de inducción, Número de brotes por explante y medio más reguladores de crecimiento vegetal en organogénesis de brotes en *J. curcas*.

Tiempo de inducción (dds)	Número de brotes por explante	Medio + RCV	Referencia
35	6.77±0.51	MS+TDZ	Liu <i>et al.</i> (2015)
30	11.50±0.50	MS+BAP e AIB	Verma y Verma (2015)
22	4.00±0.30	MS+BAP e AIB	Ali <i>et al.</i> (2015)
30	12.67±0.42	MS+TDZ	Liu <i>et al.</i> (2016)

dds: Días después de la siembra; MS: medio basal Murashige y Skoog (1962); BAP: bencilaminopurina, ANA: ácido naftalenacético; TDZ: tidiazurón; AIB: ácido indolbutírico.

### 3.6. Variación somaclonal (VS)

La VS fue un término acuñado por primera vez por Larkin y Scowcroft (1981), quienes la definieron como una variación originada en las células y cultivo de tejidos. Éste término, también es conocido universalmente para todas las formas variantes obtenidas en el cultivo de tejidos (Bajaj, 1990). La frecuencia de VS no es única de procesos *in vitro*, ya que puede ser

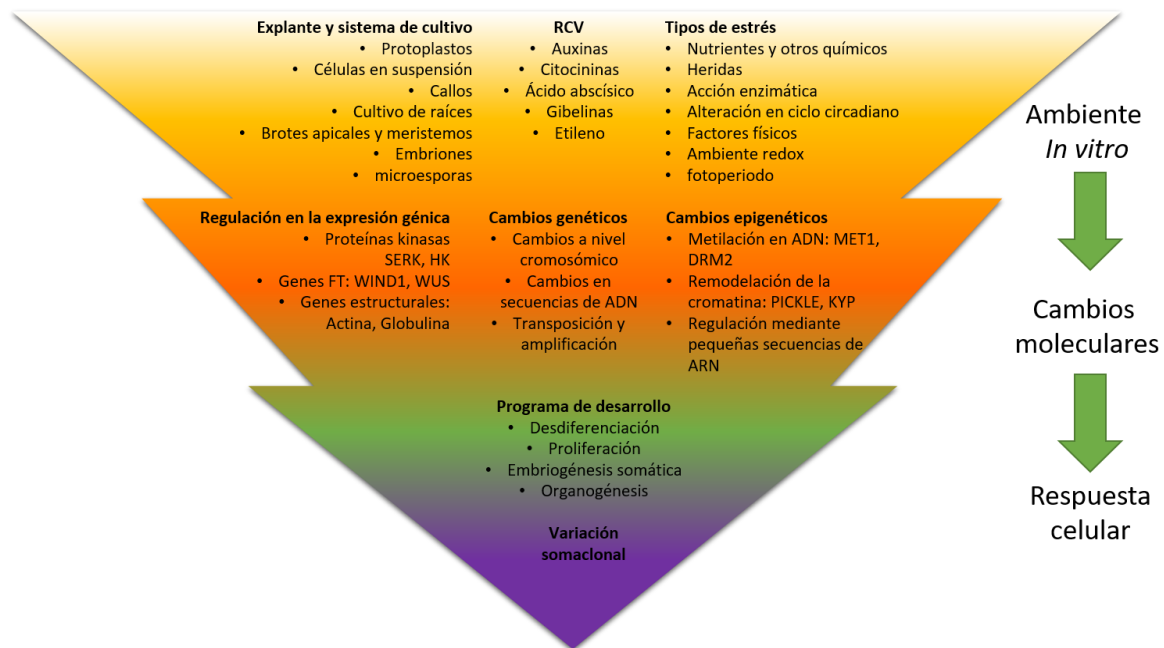


## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

observada en la naturaleza, sin embargo, se ha demostrado que por lo general suceden más frecuentemente en cultivo de tejidos *in vitro* que en cultivos *in vivo* (Yang *et al.*, 2010).

### 3.6.1. Variación somaclonal en plantas cultivadas *in vitro*

El cultivo de tejidos *in vitro* tiene un enorme potencial en investigación fundamental y aplicaciones comerciales tales como la propagación clonal, la ingeniería genética y la producción de metabolitos de interés; hace más de medio siglo, se ha buscado comprender los cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares asociados a las respuestas en el cultivo de tejidos (Neelakandan y Wang, 2012), ya que, por lo general en un ambiente donde el explante y el sistema de cultivo, los RCV y los tipos de estrés generan cambios moleculares como la regulación en la expresión génica, cambios genéticos y epigenéticos, los cuales, originan una desdiferenciación, proliferación celular, organogénesis o embriogénesis somática, que con el tiempo pueden llevar a una VS (Figura 3).



**Figura 3.** Respuesta celular a cambios moleculares generados por el ambiente *in vitro* en el cultivo de tejidos vegetales (Neelakandan y Wang, 2012).

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

---

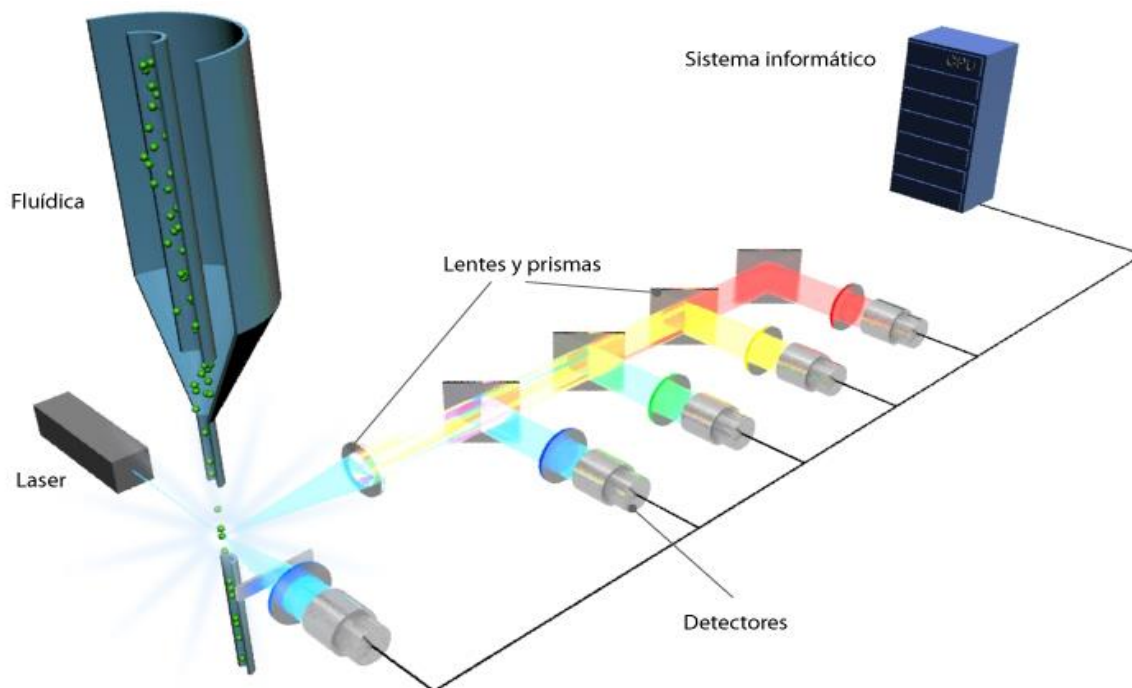
La VS puede ser detectada usando un amplio rango de técnicas llevando consigo sus propias ventajas y desventajas; por lo tanto, la elección del método va a depender de los fines de la investigación (Bairu *et al.*, 2011), generalmente para cambios en secuencias génicas o modificaciones en las mismas, para cambios en niveles de ploidía se puede utilizar el conteo de cromosomas o actualmente una herramienta para estimar el contenido de ADN nuclear puede ser la citometría de flujo.

### 3.7. Citometría de flujo

La Citometría de flujo (CF) es una técnica eficaz que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz, aplicados principalmente en el análisis de niveles de ploidía, contenido de ADN nuclear (Doležel, 1997; Bennett *et al.*, 2000).

Un citómetro de flujo comprende básicamente un microscopio de fluorescencia, que analiza las propiedades ópticas de partículas que se mueven en una suspensión (Galbraith *et al.*, 2005; Doležel *et al.*, 2007). Estas partículas, iluminadas por un potente laser, producen la dispersión de luz frontal (FSC), lateral (SSC) y señales de fluorescencia, que son detectados selectivamente utilizando una serie de filtros dicroicos, fotodetectores y fotomultiplicadores.

Los circuitos eléctricos dentro del instrumento convierten estas señales en valores digitales, que se almacenan y muestran en forma de histogramas o gráfico de puntos (Ochatt, 2006; Doležel *et al.*, 2007). En la Figura 4 se puede apreciar los componentes principales de un CF, la parte hidráulica (fluídica), óptica (láser y lentes) y electrónica (detectores y sistema informático), configurados para permitir la medición de las células en suspensión que pasan a través de un flujo e interrogadas por un haz de luz con precisión (Robinson, 2006; Ochatt, 2008).



**Figura 4.** Componentes principales de un citómetro de flujo (Fuente: Anon, 2016 en: [https://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=1104a\\_tecnica\\_citometra](https://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=1104a_tecnica_citometra)).

### 3.7.1. Estandarización del protocolo de citometría de flujo

Es importante estandarizar el protocolo que se utilizará durante todo el proceso para la medición del contenido nuclear, para ello se debe tener en cuenta el tampón para la extracción de núcleos, fluorocromo y la muestra control para estimar el contenido de ADN nuclear.

#### 3.7.1.1. Tampones utilizados para la estimación del contenido de ADN nuclear

En plantas, se debe poner especial atención a la preparación de las células en suspensión para el análisis en el CF (Ochatt, 2008); existen muchos métodos para preparar la muestra para el análisis nuclear, esto depende del tipo de citómetro y las variables a estimar (Ochatt, 2008). Por ejemplo, para la estimación del contenido del ADN nuclear se debe realizar una extracción previa de los núcleos, degradar el ARN y teñir estequiométricamente el ADN con un fluorocromo; actualmente se conocen varios métodos de extracción desarrollados (Cuadro 4);

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

los cuatro métodos más utilizados son el Galbraith, LB01, Otto y el Tris.MgCl<sub>2</sub> (Loureiro *et al.*, 2006).

Cuadro 4. Tampones de aislamiento nuclear más utilizados en citometría de flujo en plantas.

Buffer	Composición	Referencia
Galbraith	45mM MgCl <sub>2</sub> , 30mM de citrato de sodio, 20 mM de MOPS, 0.1% (v/v) de Triton X-100, pH 7.0	Galbraith <i>et al.</i> (1983)
LB01	15mM Tris, 2mM Na <sub>2</sub> EDTA, 0.5 mM espermina, 4HCl, 80 mM KCl, 20mM NaCl, 15mM de mercaptotanol, 0.1 (v/v) Triton X-100, pH8.0	Doležel <i>et al.</i> (1989)
Otto*	Otto I: 100 mM de ácido cítrico, 0.5 % (v/v) tween 20 (pH 2-3); Otto II: 400mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O (pH 8-9)	Otto (1992); Doležel y Göhde (1995)
Tris. MgCl <sub>2</sub>	200 mM Tris, 4 mM MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O, 0.5 (v/v) Triton X-100, pH 7.5	Pfosser <i>et al.</i> (1995)

\* El pH del tampón no se ajusta, los núcleos son aislados en Otto I, el DNA es teñido en una mezcla de Otto I y Otto II (1:4) con un volumen final de 1mL.

Loureiro *et al.*( 2006), sugieren que el uso del tampón Otto es mejor para la extracción de núcleos, debido a que el ácido cítrico mejora la accesibilidad de la cromatina y homogeniza su estructura, eliminando diferencias en la intensidad de fluorescencia, así mismo, la fijación específica del fluorocromo en los núcleos genera una emisión más proporcional de la cromatina teñida (Doležel y Bartoš, 2005); algunas desventajas de éste tampón, es que en algunas especies, después de la adicción del Otto II, los núcleos se deterioran rápidamente, y también pueden presentar poca liberación de núcleos debido al uso del Tween 20 que es un tensoactivo débil en comparación con Triton X-100 (Doležel y Bartoš, 2005).

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

### 3.7.1.2. Fluorocromos

Los fluorocromos son moléculas que absorben la energía luminosa de una longitud de onda específica y posteriormente emite luz en una longitud de onda más larga con energía más baja (Cuadro 5). Este fenómeno es dependiente del tipo de fluorocromo y su ambiente químico. Los fluorocromos utilizados en citometría de flujo pueden estar unidos a anticuerpos que se unirán específicamente a los componentes celulares de manera no covalente (Errante *et al.*, 2016).

**Cuadro 5.** Fluorocromos comúnmente utilizados en citometría de flujo y espectro de emisión dependiendo del tipo de laser usado.

Fluorocromo	Laser (nm)	Emisión (nm)	Referencia
FITC	488	519 – 525	Ibáñez <i>et al.</i> (2008)
Alexa Flúor	488	519	Davis <i>et al.</i> (2013)
R-PE (PE)	488	575 – 578	Davis y Bishop. (1997)
PE-Cy5 (TC1)	488	667	Kalina <i>et al.</i> (2012)
PerCP (BD2)	488	675 – 678	Davis <i>et al.</i> (2013)
PerCP/Cy5.5 (BD)	488	695	Degheidy <i>et al.</i> (2015)
PE – Cy7	488	795	Preijers <i>et al.</i> (2011)
7 – AAD	488	655 (620 – 675)	Davis <i>et al.</i> (2013)
Höchst 3342	488	461	Barnett <i>et al.</i> (2013)
IP	488	570 – 617	De Rosa <i>et al.</i> (2001)
Rodamine 123	488	528	Adler (2007)
Texas Red	595	615	Kapoor <i>et al.</i> (2008)
APC	633,635,640	660	Tjioe <i>et al.</i> (2001)
Cy5	633,635	667	Kalina <i>et al.</i> (2012)
DAPI	488	461 (DNA), 500 (RNA)	Darzynkiewicz <i>et al.</i> (2011).

FITC = isotiocianato de fluoresceína; PE = ficoeritrina; 7-AAD=7 aminoactinomicina; IP = ioduro de propidio; APC = alofocianina; PerCP / Cy5.5 = tinte 5.5 proteína de cianina

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

piperidin clorofila; Höchst 3342 = 2'-[4-etoxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5'-bi-1Hbenzimidazole trihidrato de trihidrocloruro; Texas Red = sulforodamina 101 cloruro de ácido; DAPI = 4',6-diamidino-2-fenilindol.

El uso de fluorocromos para estimar diversos parámetros de una célula es importante, ya que, dependiendo del fin, el proceso adecuado de la muestra y la configuración específica del CF, se obtendrán mejores estimaciones. En el Cuadro 6 se observan ejemplos del mecanismo de acción de algunos fluorocromos utilizados en CF.

**Cuadro 6.** Mecanismos de acción de fluorocromos utilizados en citometría de flujo (Rosselló y Bouza, 2012).

Fluorocromos	Mecanismos de acción
Isotiocianato y yoduro de propidio.	La fluorescencia se incrementa con la unión a componentes específicos.
Bis-(1,3-dibutilbarbiturato) trimetinaoxonol.	La fluorescencia depende de parámetros fisiológicos de las células.
Diacetato de fluoresceína.	La fluorescencia depende de la hidrólisis enzimática de la célula.
Péptido marcado con un fluorocromo que se une a las esporas del género <i>Bacillus</i> .	Conjugación con anticuerpos o nucleótidos para la detección directa de antígenos microbianos o secuencias de ARN

El yoduro de propidio (IP) es un fluorocromo ampliamente utilizado en citometría de flujo para la evaluación de la apoptosis en diferentes modelos experimentales; también, es capaz de unirse y marcar el ADN estequiométricamente, haciendo posible la obtención de una rápida evaluación y contenido preciso del ADN nuclear (Riccardi y Nicoletti, 2006).

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

### 3.7.1.3. Muestra estándar

La interpretación de los resultados en términos de estimación del contenido de ADN requiere de un estándar de referencia; es decir una muestra con un nivel de ploidía y contenido de ADN nuclear conocido (Doležel *et al.*, 2007). Se debe elegir un estándar cuyo tamaño del genoma no difiera más del doble respecto a la muestra de estudio para evitar posibles errores en las lecturas, por otra parte, no deben utilizarse estándares cuyo contenido de ADN sea muy parecido a nuestra muestra de estudio, ya que podría darse el caso de obtener picos superpuestos y no diferenciar cual corresponde al estándar (Rodríguez y Moliner, 2011). Los principales estándares empleados en citometría de flujo para la estimación del contenido de ADN son mostrados en el Cuadro 7.

**Cuadro 7.** Principales estándares de referencia para la estimación del contenido de ADN nuclear en unidades absolutas en plantas.

Especie	Pg de ADN nuclear 2C	Referencias
<i>Raphanus sativus</i> L. 'Saxa'	1.11	Doležel <i>et al.</i> ( 1992)
<i>Solanum lycopersicum</i> L. 'Stupické polní rané'	1.96	Doležel <i>et al.</i> ( 1992)
<i>Glycine max</i> Merr. 'Polanka'	2.50	Doležel <i>et al.</i> ( 1994)
<i>Zea mays</i> L. 'CE-777'	5.43	Lyzak y Doležel (1998)
<i>Pisum sativum</i> L. 'Ctirad'	9.09	Doležel <i>et al.</i> ( 1998)
<i>Secale cereale</i> L. 'Daněkovske''	16.19	Doležel <i>et al.</i> ( 1998)
<i>Vicia faba</i> L. 'Inovec'	26.90	Doležel <i>et al.</i> ( 1992)
<i>Allium cepa</i> L. 'Alice'	34.89	Doležel <i>et al.</i> ( 1998)

El cálculo para la estimación del contenido de ADN nuclear se realiza con la siguiente formula:

$$\text{Estimación del ADN nuclear (pg)} = \text{contenido de referencia del ADN (pg)} \left( \frac{\text{pico promedio de la muestra (G1)}}{\text{Pico promedio de referencia (G1)}} \right)$$

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

---

Dónde: estimación del ADN nuclear (pg)= contenido de ADN de la muestra a evaluada, contenido de referencia del ADN (pg)= valor del contenido 2C de ADN de la muestra estándar que se puede obtener del Cuadro 7, pico promedio de la muestra (G1)=valor del promedio del pico obtenido en el citómetro de flujo de la muestra a evaluar y pico promedio de la referencia (G1)= valor del promedio del pico obtenido en el citómetro de flujo de la muestra estándar seleccionada.

Para disminuir el error provocado por el proceso de la muestra y el análisis con el citómetro de flujo, es recomendable utilizar al menos tres mediciones del contenido de ADN nuclear en días distintos (Doležel *et al.*, 2007; Rodríguez y Moliner, 2011). Finalmente hay que calcular la media de contenido de 2C ADN y realizar el análisis estadístico correspondiente. También se puede convertir los picogramos de ADN en números de pares de bases según la fórmula: 1pg de ADN=0.978x10<sup>9</sup>pb (Doležel *et al.*, 2003).

### 3.7.2. Aplicaciones de la Citometría de Flujo (CF) en plantas

La citometría de flujo primero llegó a ser importante durante la década de 1970 para analizar el contenido de ADN en las células humanas. Posteriormente la técnica se extendió a células vegetales durante la década de 1980 (Atry y Banga, 2016). Actualmente, es el método de elección para el análisis de ploidía y contenido de ADN nuclear, ya que permite un análisis rápido y representativo de un gran número de núcleos en un corto tiempo (Doležel *et al.*, 2007).

El cultivo *in vitro* de genotipos élite de *J. curcas* a gran escala ofrece mejores expectativas de conservación a largo plazo (Franco *et al.*, 2014), sin embargo, el contenido de ADN puede verse afectado por el uso de altos niveles de RCV y las constantes resiembras de los brotes. Todo ello puede generar alteraciones genéticas y epigenéticas, conocidas como VS (Larkin y Scowcroft, 1981). Los cambios en el nivel de ploidía es una de las formas más frecuentes que puede ocurrir la VS (Predieri, 2001) como lo demuestran los trabajos de Leal *et al.* (2006) y Prado *et al.* (2010), en la que células de plantas obtenidas por embriogénesis somática de uva, generó VS durante el cultivo *in vitro*.



## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

---

En el pasado, la determinación del nivel de ploidía en las plantas era limitada a las evaluaciones cariotípicas, contando el número de cromosomas en metafase (Altinordu *et al.*, 2016) y siendo muy lento y laborioso (Vosa, 2013). En la actualidad la técnica de citometría de flujo (CF) es muy utilizada ya que permite la medición rápida de múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma, complejidad y la estimación del contenido de ADN o cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo (Barrera *et al.*, 2004).

Un claro ejemplo es el trabajo realizado por Leal *et al.* (2006), en el cual, aplicaron CF en células de plantas de uva (*Vitis vinífera* L.) regeneradas por embriogénesis somática, detectando 5.6% de células de plantas con un contenido de ADN tetraploide; de la misma manera, Ren *et al.*, (2013) realizaron citometría de flujo a plántulas micropropagadas de *Cucumis melo*, detectando tetraploidía y mixoploidía.

Se ha sugerido que las plantas micropropagadas en la etapa de calogénesis pueden incrementar la VS en comparación con la variación generada en procesos de morfogénesis directa (Neelakandan y Wang, 2012). Basado en características ligeramente similares entre propagación de segmentos nodales y callos, Scherer *et al.* (2013) concluyeron que estas variaciones quizás también ocurren en plantas regeneradas vía segmentos nodales, porque, en etapas tempranas, los segmentos nodales presentan células desdiferenciadas y tiene altas tasas de multiplicación.

El genotipo también puede influir en la variación del contenido de ADN como lo demostraron Franco *et al.* (2014) al evaluar por citometría de flujo el contenido de ADN nuclear en dos genotipos de *J. curcas*. Estos autores detectaron un 4% de plantas tetraploides en el genotipo 1, mientras que en el genotipo 2, todas las plantas evaluadas fueron diploides.

La citometría de flujo es una técnica confiable que puede ser utilizada para estimar la uniformidad del contenido de ADN nuclear en plantas micropropagadas *in vitro*, como lo demostraron Kaewpoo y Te-Chato (2010), quienes reportaron un protocolo de micropropagación de *J. curcas* con el mismo contenido de ADN nuclear tanto en planta madre como el callo y plántulas micropropagadas. Además, Carvalho *et al.* (2008) reportaron que el tamaño del genoma en plantas 2C es de  $0.085 \pm 0.006$  picogramos (pg). Por otro lado, también

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

---

puede ser utilizada en estudios de poloploidización *in vitro*, como lo reportan de Oliveira *et al.* (2013), quienes indujeron mixoploides en *J. curcas* y utilizaron citometría de flujo como estrategia práctica y rápida para la selección de plántulas diploides, mixoploides y tetraploides.

Debido a que en el cultivo *in vitro* las constantes resiembras pueden llevar a la VS, hay reportes que utilizan citometría de flujo para monitorear los cambios en el contenido de ADN nuclear como en el caso de Clarindo *et al.* (2012), quienes aplicaron CF para verificar la inestabilidad de la ploidía en agregados de células embriogénicas de *C. arabica*, a lo largo de resiembras sucesivas. Estos autores, concluyeron que la CF es una herramienta importante para detectar VS en una etapa temprana del cultivo de tejidos en esta especie, demostrando ser muy útil para el control de calidad en la propagación clonal y en la introducción de somaclones en los programas de reproducción. En otro reporte sobre la caña de azúcar *in vitro*, se reportó una disminución en la cantidad relativa estimada de ADN nuclear en plántulas con 12 meses de cultivo para la mayoría de las variedades examinadas (Nogueira *et al.*, 2015).

### 3.8. Marcadores moleculares para detección de polimorfismos

Los marcadores moleculares han sido usados para identificar líneas mejoradas, ensayos de diversidad genética y examinar el flujo genético en poblaciones (Slotta, 2008). Para contribuir con el conocimiento a los estudios genéticos, los marcadores moleculares deben ser polimórficos, o variables, en toda la gama del organismo (Wolfe y Liston, 1998). Entre los marcadores moleculares utilizados para detección de polimorfismos en diversas especies podemos mencionar a los RAPD, AFLP, ISSR (O'Hanlon *et al.* 2000) y los DAMD-PCR (Heath *et al.*, 1993; Bhattacharya y Ranade, 2001; Ha *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2006; Karaca y Ince, 2008).

Los marcadores moleculares más utilizados para la detección de polimorfismos y estabilidad genética son los ISRR y RAPD (Varshney *et al.*, 2001; Bhatia *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2017; Bose *et al.*, 2017; Moharana *et al.*, 2018;), sin embargo, se ha demostrado que los DAMD son sistemas de marcadores moleculares multiloci efectivos de gran utilidad para la identificación genética (Seyedimoradi y Talebi, 2014). La técnica DAMD ha sido utilizado con éxito para evaluar las relaciones genéticas en especies como: *Triticum aestivum* (Bebeli *et al.*, 1997),

## MARCO TEÓRICO/ANTECEDENTES

*Oryza sativa* (Zhou *et al.*, 1997), *Capsicum* spp. (Ince *et al.*, 2009), *Cicer* spp. (Amirmoradi *et al.*, 2012) y *Cicer arietinum* (Pakseresht *et al.*, 2013). También han sido utilizados con éxito para demostrar la uniformidad genética y fidelidad clonal en plantas cultivadas *in vitro* de *Mentha arvensis* (Faisal *et al.*, 2014).

Aunque en *J. curcas* ha sido utilizado para detectar diversidad genética adecuada entre las accesiones (Murty *et al.*, 2013; Alipour *et al.*, 2017) los cuales fueron capaces de discriminarlos de acuerdo a el lugar de origen, su utilidad para detectar la fidelidad genética en plantas regeneradas *in vitro* puede ser una opción factible ya que Aguilera-Cauich (2015) menciona que los marcadores moleculares DAMD usados para determinar variación y relaciones genéticas entre accesiones americanas de *J. curcas*, resultan eficientes debido a que revelan altos niveles de polimorfismo y diversidad genética. En el Cuadro 8 se observan los marcadores DAMD utilizados para detección de polimorfismos en diferentes accesiones de *J. curcas* para la detección de polimorfismos sugeridos por Aguilera-Cauich (2015).

**Cuadro 8.** Marcadores DAMD utilizados para detección de polimorfismo genético en *J. curcas*

Nombre del iniciador	Secuencias (5'-3')	Tm (°C)	Referencias
JJ336	GAGGGTGGCGGTTCT	55	Zhou <i>et al.</i> (1997)
HVR	CCTCCTCCCTCCT	55	Zhou <i>et al.</i> (1997)
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	42	Zhou <i>et al.</i> (1997)
HVA	AGGATGGAAAGGAGGC	55	Zhou <i>et al.</i> (1997)
HBV	GGTGTAGAGAGGGGT	55	Bridge <i>et al.</i> (1997)

### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los recursos energéticos son indispensables para el desarrollo económico sostenible y social de un país. La extracción indiscriminada y el aumento del consumo de combustibles fósiles han dado lugar a la reducción de éstos recursos y la consecuente liberación de emisiones nocivas que son la principal razón del calentamiento global, por lo tanto, una alternativa son los derivados de aceites vegetales para producir combustibles para motores diésel (Saravanan *et al.*, 2015).

En los últimos años, países como India, China, Malasia, México entre otros, han estado explorando el potencial de *J. curcas* para la producción de biodiesel y el uso de la torta de extracción, para la alimentación de ganado (Navarro *et al.*, 2016). Por otro lado, el cultivo de esta especie, permite recuperar tierras marginales y degradadas (Biswas *et al.*, 2010), de igual forma puede contribuir a la disminución de la pobreza rural a través de la diversificación de la actividad agrícola (Edrisi *et al.*, 2015).

A pesar de las ventajas de la especie, ésta planta aún se considera no domesticada, lo que muestra un rendimiento variable considerable (Fairless, 2007; Achten *et al.*, 2008). El nivel de heterocigosidad en el germoplasma es generalmente bajo, excepto en algunas accesiones de Guatemala y México (Pecina-Quintero *et al.*, 2014; Montes *et al.*, 2014; Trebbi *et al.*, 2015; Salvador-Figueroa *et al.*, 2015). Además de la diversidad molecular a nivel de ADN, existe una gran diversidad genética en rasgos agronómicos (por ejemplo: rendimiento de semilla, estabilidad de rendimiento de semilla, período de floración, patrón de ramificación, altura de planta) (Martin y Montes, 2015), rasgos de calidad (por ejemplo: contenido de aceite en semillas, contenido de proteínas en granos, perfil de ácidos grasos de aceite) (Montes *et al.*, 2013), y rasgos reproductivos y / o fisiológicos (por ejemplo: esterilidad masculina, arquitectura floral, Contenido de clorofila en las hojas) (Nietsche *et al.*, 2014; Senger *et al.*, 2014; Nietsche *et al.*, 2015).

El Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del estado de Jalisco subsele Sureste (CIATEJ), desarrolló el proyecto: Mejoramiento genético de *Jatropha* para generar al

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

---

---

menos una variedad con alto rendimiento agronómico, alto contenido de aceite y baja toxicidad para la obtención de biodiesel (número de proyecto: 163502), en el cual, uno de los objetivos del proyecto fue la micropropagación de variedades de la especie *J. curcas* con características agronómicas deseables. Algunos autores (Pecina *et al.*, 2011; Rincón-Rabanales *et al.*, 2016) han indicado que debido a que es una especie con una alta variabilidad genética se requiere establecer un protocolo efectivo para la micropropagación de los genotipos promisorios agronómicamente de este cultivo. Por lo tanto, es necesario contar con información sobre la fidelidad genética del material micropropagado. Debido a esto, el desarrollo de un protocolo para las variedades que se trabajan en el proyecto hace un reto, además que las constantes resiembras para la conservación del material *in vitro* pudiesen generar VS.

### 5. JUSTIFICACIÓN

Se cuenta con información sobre la inducción de procesos de organogénesis en *J. curcas*, sin embargo, éstos no han resultado del todo efectivos por su baja reproducibilidad, posiblemente debido a la variabilidad de los genotipos en estudio. Esto hace uno de los principales retos al desarrollar un protocolo de micropropagación para la variedad ALJC01 que se están trabajando actualmente en el proyecto 163502 del Fondo SAGARPA-CONACY en el CIATEJ Subsele Sureste, el cual, busca generar al menos una variedad con alto rendimiento agronómico, alto contenido de aceite y baja toxicidad para la obtención de biodiesel.

Por otro lado, llevar a cabo una optimización del desarrollo de brotes permite obtener el número máximo de éstos por explante lo que facilitaría la etapa de multiplicación, que es una etapa importante en la micropropagación. La cuantificación del contenido de ADN nuclear con ayuda del citómetro de flujo, permitirá corroborar la estabilidad genética de la especie *J. curcas* variedad ALJC01 en el proceso de micropropagación de uno hasta ocho resiembras y el uso de iniciadores DAMD permitirá verificar la fidelidad genética de clonas con la planta madre, donante.

## HIPÓTESIS

---

---

### 6. HIPÓTESIS

El explante de hoja cotiledonar de *J. curcas* tiene células totipotenciales que sometidas al cultivo *in vitro* en un medio basal suplementado con RCV y un aditivo orgánico, permitirá la inducción, elongación, multiplicación y enraizamiento de brotes lográndose obtener un protocolo de organogénesis para la generación de plantas *in vitro*. Además, la MSR permitirá obtener las condiciones óptimas durante la inducción de organogénesis adventicia, obteniendo así el mayor número de brotes por explante y el contenido de ADN nuclear así como el perfil genético de planta madre y clonas evaluado a lo largo de varias resiembras en el protocolo de micropropagación de *J. curcas* variedad ALJC01 se mantendrán estables.

## OBJETIVOS

---

---

### 7. OBJETIVOS

#### 7.1. Objetivo general

Desarrollar un protocolo para la inducción de un proceso morfogénico en *Jatropha curcas* var ALJC01 así como obtener la optimización de la inducción de organogénesis adventicia por MSR y evaluar la estabilidad genética en clonas con ocho resiembras *in vitro*.

#### 7.2. Objetivos específicos

Definir un protocolo para la inducción y el desarrollo de las estructuras morfogénicas como brotes y raíces, en células de explante de hoja de *J. curcas* variedad ALJC01.

Evaluar la efectividad de la metodología de superficie de respuesta (MSR) para optimizar la inducción de brotes adventicios en *J. curcas* variedad ALJC01.

Determinar por citometría de flujo la estabilidad del contenido de ADN nuclear de las plántulas provenientes de uno hasta ocho resiembras *in vitro*.

Determinar mediante marcadores DAMD la estabilidad en los perfiles de bandas de la planta madre y las plántulas provenientes de la octava resiembra *in vitro*.



### 8. METODOLOGÍA

#### 8.1. Obtención y establecimiento del material vegetal de *J. curcas*

Se cosecharon semillas al azar de *J. curcas* variedad ALJC01 de una plantación en Sucilá, Yucatán, México. Las semillas se esterilizaron superficialmente en una solución 0.5% (v/v) de cloruro de benzalconio. Posteriormente, se colocaron en agitación con detergente comercial a 1 mg/100 mL durante 15 min. Se dejaron secar en papel absorbente por 30 min. Posteriormente se retiró la testa y los embriones extraídos se desinfectaron en campana de flujo laminar mediante inmersión en una solución 5 % (v/v) de Extran<sup>®</sup> durante 5 min; luego se transfirieron a etanol al 70% (v/v) por 1 min, seguido de agitación en solución al 30% (v/v) de hipoclorito de sodio durante 15 min. Finalmente se efectuaron tres enjuagues en agua destilada estéril. Los embriones desinfectados fueron sembrados en cajas magenta con 40 mL de medio de cultivo MS basal al 100% de su fuerza iónica y se incubaron en oscuridad por 15 días (Figura 5). Posteriormente se transfirieron a fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad) con lámparas de iluminación led de  $60 \mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$  de intensidad lumínica a temperatura de  $23\pm 2^\circ\text{C}$ , y 60% de HR por 15 días.



**Figura 5.** Etapas seguidas en el establecimiento aséptico de embriones de *J. curcas*.

## METODOLOGÍA

### 8.2. Inducción del proceso de morfogénesis en *J. curcas*

Se estableció un diseño factorial  $3^3$  consistiendo en 3 niveles con 3 factores obteniéndose así 27 tratamientos con 6 repeticiones; los tratamientos fueron combinaciones de 6- ( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilamino) purina (2ip), ácido indolacético (AIA) y sulfato de adenina (SAd) (Cuadro 9). El medio de cultivo fue MS al 75% de su fuerza iónica. Para la evaluación se determinó el peso fresco inicial del explante y el peso fresco a los 45 días. Para obtener la ganancia promedio del peso obtenido durante el tiempo de cultivo se calculó la diferencia entre el peso final y del peso inicial. También se evaluó el número de brotes inducidos a los 45 días de cultivo.

**Cuadro 9.** Diseño experimental propuesto para la inducción de brotes de *J. curcas*.

Número de tratamiento	Variable codificada			Variable real		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	2ip ( $\mu$ M)	AIA ( $\mu$ M)	SAd ( $\mu$ M)
1	-	-	-	96.000	1.10	282.34
2	0	-	-	110.70	1.10	282.34
3	+	-	-	125.40	1.10	282.34
4	-	+	-	96.000	1.44	282.34
5	0	+	-	110.70	1.44	282.34
6	+	+	-	125.40	1.44	282.34
7	-	0	-	96.000	1.27	282.34
8	0	0	-	110.70	1.27	282.34
9	+	0	-	125.40	1.27	282.34
10	-	-	+	96.000	1.10	369.21
11	0	-	+	110.70	1.10	369.21
12	+	-	+	125.40	1.10	369.21
13	-	+	+	96.000	1.44	369.21
14	0	+	+	110.70	1.44	369.21
15	+	+	+	125.40	1.44	369.21
16	-	0	+	96.000	1.27	369.21
17	0	0	+	110.70	1.27	369.21
18	+	0	+	125.40	1.27	369.21

## METODOLOGÍA

19	-	-	0	96.000	1.10	325.78
20	0	-	0	110.70	1.10	325.78
21	+	-	0	125.40	1.10	325.78
22	-	+	0	96.000	1.44	325.78
23	0	+	0	110.70	1.44	325.78
24	+	+	0	125.40	1.44	325.78
25	-	0	0	96.000	1.27	325.78
26	0	0	0	110.70	1.27	325.78
27	+	0	0	125.40	1.27	325.78

X<sub>1</sub>: 2ip: 6- ( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilamino) purina, X<sub>2</sub>: AIA: ácido indolacético, X<sub>3</sub>: SAd: sulfato de adenina.

Para el porcentaje de sobrevivencia se consideró si los brotes estaban vivos o muertos y se obtuvo el promedio por cada tratamiento, para el conteo de los brotes se utilizó un microscopio estereoscópico marca Nikon® modelo C-LEDS y la evaluación se realizó a los 45 días después de la siembra considerando el porcentaje de sobrevivencia y el número de brotes inducidos. Los resultados se analizaron con el software estadístico Statgraphics® Centurión XVI (2009) (Statgraphics Technologies, Inc. The Plains, Virginia, URL: <http://www.statgraphics.com/>).

### 8.3. Elongación de brotes adventicios

Para la elongación de brotes se utilizó un diseño factorial 3<sup>3</sup>, considerando como factores los reguladores de crecimiento vegetal (RCV): BAP, AIA y el aditivo orgánico SAd, cada uno con tres concentraciones. En total se establecieron un total de 27 tratamientos con tres replicas (cuadro 10); la unidad experimental fue un brote de 0.5 cm de longitud inicial, los cuales fueron medidos a los 45 días de cultivo para tener la longitud final, posteriormente se realizó una resta del crecimiento final menos crecimiento inicial y el resultado fue considerado el crecimiento total en cm a los 45 días de cultivo. Cabe mencionar que se observó multiplicación de brotes y desarrollo de hojas en algunos tratamientos por lo que también fueron evaluadas estas dos variables.

## METODOLOGÍA

**Cuadro 10.** Diseño experimental propuesto para la elongación de brotes de *J. curcas*.

Número de tratamiento	Variable codificada			Variable real		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	BAP (μM)	AIA (μM)	SAd (μM)
1	-	-	-	4.44	1.0	543
2	0	-	-	6.66	1.0	543
3	+	-	-	8.88	1.0	543
4	-	+	-	4.44	2.4	543
5	0	+	-	6.66	2.4	543
6	+	+	-	8.88	2.4	543
7	-	0	-	4.44	1.7	543
8	0	0	-	6.66	1.7	543
9	+	0	-	8.88	1.7	543
10	-	-	+	4.44	1.0	1086
11	0	-	+	6.66	1.0	1086
12	+	-	+	8.88	1.0	1086
13	-	+	+	4.44	2.4	1086
14	0	+	+	6.66	2.4	1086
15	+	+	+	8.88	2.4	1086
16	-	0	+	4.44	1.7	1086
17	0	0	+	6.66	1.7	1086
18	+	0	+	8.88	1.7	1086
19	-	-	0	4.44	1.0	814.5
20	0	-	0	6.66	1.0	814.5
21	+	-	0	8.88	1.0	814.5
22	-	+	0	4.44	2.4	814.5
23	0	+	0	6.66	2.4	814.5
24	+	+	0	8.88	2.4	814.5
25	-	0	0	4.44	1.7	814.5
26	0	0	0	6.66	1.7	814.5
27	+	0	0	8.88	1.7	814.5

X<sub>1</sub>: BAP: Bencilaminopurina, X<sub>2</sub>: AIA: ácido indolacético, X<sub>3</sub>: SAd: sulfato de adenina.

## METODOLOGÍA

### 8.4. Enraizamiento

Para el enraizamiento se utilizaron brotes de aproximadamente 2 cm de longitud; el diseño experimental fue un arreglo factorial  $3^2$ , siendo los factores la concentración iónica del medio basal MS y la auxina AIB; el diseño experimental se realizó con y sin floroglucinol (Phl) (Cuadro 11), las variables a medir fueron el porcentaje de respuesta organogénica, número y longitud de raíces.

**Cuadro 11.** Diseño experimental propuesto para el enraizamiento de brotes de *J. curcas* usando la auxina AIB.

Tratamientos <sup>a</sup>	AIB ( $\mu\text{M}$ ) + 2.4 mg · L <sup>-1</sup> Phl	MS (gL <sup>-1</sup> )
1	14.7	1.32
2	17.7	1.32
3	20.7	1.32
4	14.7	2.2
5	17.7	2.2
6	20.7	2.2
7	14.7	4.4
8	17.7	4.4
9	20.7	4.4

Tratamientos <sup>b</sup>	AIB ( $\mu\text{M}$ )	
10	14.7	1.32
11	17.7	1.32
12	20.7	1.32
13	14.7	2.2
14	17.7	2.2
15	20.7	2.2
16	14.7	4.4
17	17.7	4.4
18	20.7	4.4

AIB: ácido indolbutírico, Phl: Floroglucinol, <sup>a</sup> tratamientos 1-9 con floroglucinol, <sup>b</sup> tratamientos 10-18 sin floroglucinol.

### 8.5. Aclimatación

Se utilizaron macetas de plástico (90 x 80 x 70 mm) (MATEC, Morelia, México), las cuales se llenaron con roca de perlita expandida (Accimin, Tlalnepantla, México) humedecida con agua potabilizada. Se seleccionaron treinta plántulas con raíces y se enjuagaron con agua potabilizada para eliminar el exceso de medio de cultivo de las raíces. Antes del trasplante, se retiraron las hojas de las plántulas para evitar la deshidratación y muerte. Las plantas transplantadas en las macetas fueron fumigadas con  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de oxiclورو de cobre (w/v) (VITA, México, DF), fertilizadas con estiércol de murciélago (NPK-10: 3: 1) (Carmich, Michoacán, México) y cubiertas con bolsas de nailon transparente perforada (Productos de polietileno, Mérida, México). Las plántulas se cultivaron en un invernadero a una temperatura máxima de  $30 - 20 \pm 2^\circ\text{C}$ , 70% HR y fotoperiodo promedio de 11/13 h (luz/oscuridad). Después de siete días, se retiró la cubierta de nailon, se regaron las plántulas con agua destilada y se añadió estiércol de murciélago (NPK-10: 3: 1). Durante el siguiente mes y medio, el riego se realizó en días alternos, se fertilizó y se fumigó ( $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de oxiclورو de cobre) una vez a la semana. El período total de cultivo en invernadero fue de 60 días.

### 8.6. Optimización de la inducción de brotes *in vitro* de *J. curcas*

#### 8.6.1. Establecimiento de cultivos asépticos de *J. curcas*

El establecimiento se realizó siguiendo las etapas descritas en el apartado 8.1 y la figura 5.

#### 8.6.2. Inducción de callogénesis y brotes adventicios en explantes de *J. curcas*

Transcurridos 15 días de desarrollo de las plántulas *in vitro*, se cortaron explantes de hoja cotiledonar y se cultivaron en unos frascos con un medio de cultivo MS al 75% de su fuerza iónica, 22.5 % (w/v) de sacarosa y 0.2% (w/v) de Gelrite® adicionado con combinaciones de 6- ( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilamino) purina (2ip), ácido indolacético (AIA) y sulfato de adenina (SAd) (Cuadro 12).

## METODOLOGÍA

**Cuadro 12.** Diseño factorial  $3^3$  para la inducción de brotes adventicios en explantes de *J. curcas*.

Número de tratamiento	Variable codificada			Variable real		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	2ip (µM)	AIA (µM)	SAd (µM)
1	-	-	-	096.00	1.10	282.34
2	0	-	-	110.70	1.10	282.34
3	+	-	-	125.40	1.10	282.34
4	-	+	-	096.00	1.44	282.34
5	0	+	-	110.70	1.44	282.34
6	+	+	-	125.40	1.44	282.34
7	-	0	-	096.00	1.27	282.34
8	0	0	-	110.70	1.27	282.34
9	+	0	-	125.40	1.27	282.34
10	-	-	+	096.00	1.10	369.21
11	0	-	+	110.70	1.10	369.21
12	+	-	+	125.40	1.10	369.21
13	-	+	+	096.00	1.44	369.21
14	0	+	+	110.70	1.44	369.21
15	+	+	+	125.40	1.44	369.21
16	-	0	+	096.00	1.27	369.21
17	0	0	+	110.70	1.27	369.21
18	+	0	+	125.40	1.27	369.21
19	-	-	0	096.00	1.10	325.78
20	0	-	0	110.70	1.10	325.78
21	+	-	0	125.40	1.10	325.78
22	-	+	0	096.00	1.44	325.78
23	0	+	0	110.70	1.44	325.78
24	+	+	0	125.40	1.44	325.78
25	-	0	0	096.00	1.27	325.78
26	0	0	0	110.70	1.27	325.78
27	+	0	0	125.40	1.27	325.78

X<sub>1</sub>: 2ip: 6- (γ, γ-dimetilalilamino) purina, X<sub>2</sub>: AIA: ácido indolacético, X<sub>3</sub>: SAd: sulfato de ad

## METODOLOGÍA

### 8.6.3. Diseño central compuesto (DCC)

Una vez analizado el diseño experimental para la inducción de brotes adventicios, se definió la combinación de citocinina y auxina que tuvo efecto sobre la variable dependiente. Para el DCC, se realizó nuevamente el establecimiento de los embriones para obtener explantes de hoja cotiledonar que fueron cultivados en un medio MS basal al 75% de su fuerza iónica más 282.34  $\mu\text{M}$  de SAd, 22.5 % (w/v) de sacarosa y 0.2% (w/v) de Gelrite® (Cuadro 13).

**Cuadro 13.** Diseño central compuesto en la inducción de brotes adventicios de *J. curcas*.

Diseño	Número de tratamiento*	Variable codificada		Variable real	
		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	2ip ( $\mu\text{M}$ )	AIA ( $\mu\text{M}$ )
	1	-	-	050	1.2
	2	+	-	100	1.2
	3	-	+	050	1.4
<b>Primer grupo de experimentos</b>	4	+	+	100	1.4
	5	0	0	075	1.3
	6	0	0	075	1.3
	7	0	0	075	1.3
	8	0	0	075	1.3

X<sub>1</sub>: 2ip: 6- ( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilamino) purina, X<sub>2</sub>: AIA: ácido indolacético. \*1-4 tratamientos del factorial 2<sup>2</sup>, 5-8 tratamientos puntos centrales, 2ip: 6- ( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilamino) purina, AIA: ácido indolacético.

### 8.6.4. Establecimiento del experimento para los términos rotatables

Al realizar el análisis de varianza del DCC y detectar falta de ajuste al modelo lineal, se procedió a realizar el experimento para los términos rotatables. Para obtener los nuevos tratamientos se aplicó la siguiente fórmula:

$$\sqrt{x} \cdot 1^* = X'1 - PCA$$



## METODOLOGÍA

Despejando la variable:

$$X'1 = PC + \Delta (\sqrt{x} 1^*)$$

Dónde:

$X'1$  = valor real a probar para cada variable

$\sqrt{x} 1^*$  = variable codificada sustituida por  $-\sqrt{2}$  o  $+\sqrt{2}$

PC = punto central para rango de la variable

$\Delta$  = incremento del rango al punto central

Los explantes de hoja cotiledonar fueron colocados en un medio de cultivo MS al 75% de su fuerza iónica más 282.34  $\mu\text{M}$  de SAd, 22.5 % (w/v) de sacarosa y 0.2% (w/v) de Gelrite® (Cuadro 14).

**Cuadro 14.** Diseño experimental para puntos rotables en optimización de la inducción de brotes adventicios en *J. curcas*.

Diseño	Número de tratamiento*	Variable codificada		Variable real	
		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	2ip ( $\mu\text{M}$ )	AIA ( $\mu\text{M}$ )
<b>Segundo grupo de experimentos</b>	9	$+\sqrt{2}$	0	110.4	1.3
	10	$-\sqrt{2}$	0	39.65	1.3
	11	0	$+\sqrt{2}$	75.00	1.4
	12	0	$-\sqrt{2}$	75.00	1.1

X<sub>1</sub>: 2ip: 6- ( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilamino) purina, X<sub>2</sub>: AIA: ácido indolacético \*9-12 términos rotables.

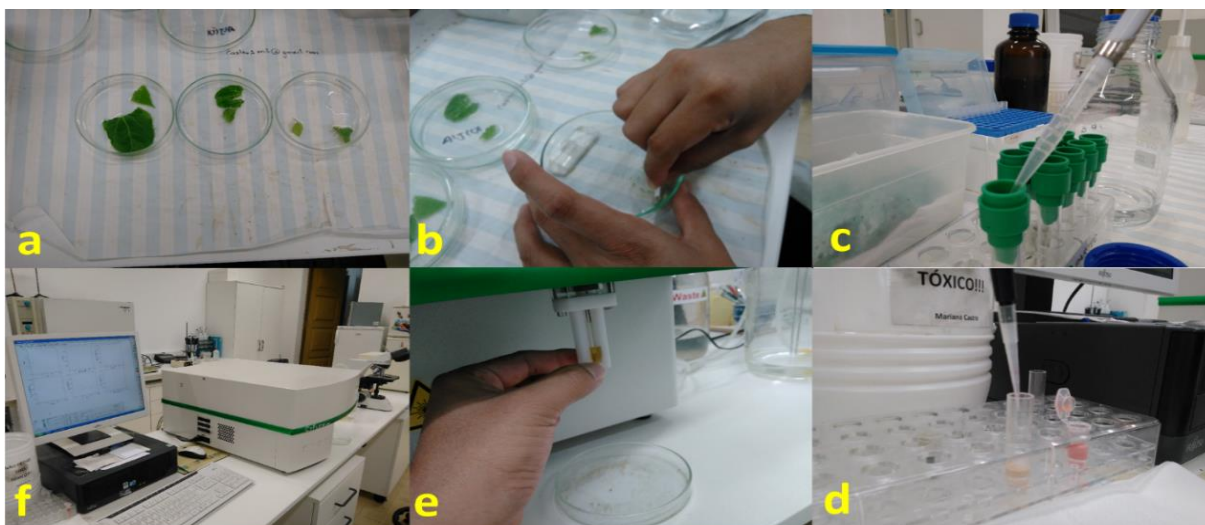
### 8.6.5. Validación de resultados

Una vez que se obtuvo el modelo de segundo orden y los valores óptimos, se estableció y analizó un experimento basado en esos resultados para verificar y calcular el porcentaje de error del modelo.

### 8.7. Citometría de flujo

#### 8.7.1. Establecimiento de protocolo para estimación de contenido de ADN en plantas madre.

Para el proceso de la muestra, se picó con un filo de bisturí 100 mg de hoja de *J. curcas* y 100 mg de hoja de *Bellis perennis* sobre una caja Petri con 1000  $\mu$ L de solución WPB (0.2 M Tris·HCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2 mM EDTA Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 86 mM NaCl, 10 mM metabisulfato de sodio, 1 % PVP-10, 1 % (v/v) Triton X-100, pH 7.5) (Loureiro *et al.*, 2007). Se filtró el sobrenadante con filtro de 40  $\mu$ m malla nylon y se le añadió 50  $\mu$ L de Ioduro de propidio (1mg/mL), se agitó ligeramente y se tomaron las lecturas en un citómetro de flujo Sysmex (CyFlow® Space, Silesia, Alemania) (Figura 6).



**Figura 6.** Proceso seguido para evaluar por citometría de flujo muestras de hojas de *J. curcas*. a) muestras de hojas estándar, *Bellis perennis* y *J. curcas*, b) fragmentación de las muestras y colocado en tampón WPB, c) filtrado de las muestras, d) aplicación del ioduro de propidio, e) colocado de la muestra en el citómetro de flujo, f) toma de lecturas y análisis de los resultados.

La medición se realizó tres días, cada día se procesaron 6 muestras y cada muestra se procesó con su respectiva referencia estándar. El control interno fue *Bellis perennis* L. con un contenido de ADN nuclear de 3.43 pg (2C). Una vez obtenidas las lecturas se aplicó la fórmula para estimar el contenido de ADN descrita por Doležel *et al.* (2007)

## METODOLOGÍA

---

---

### 8.7.2. Estimación del contenido de ADN de 1 hasta 8 resiembras.

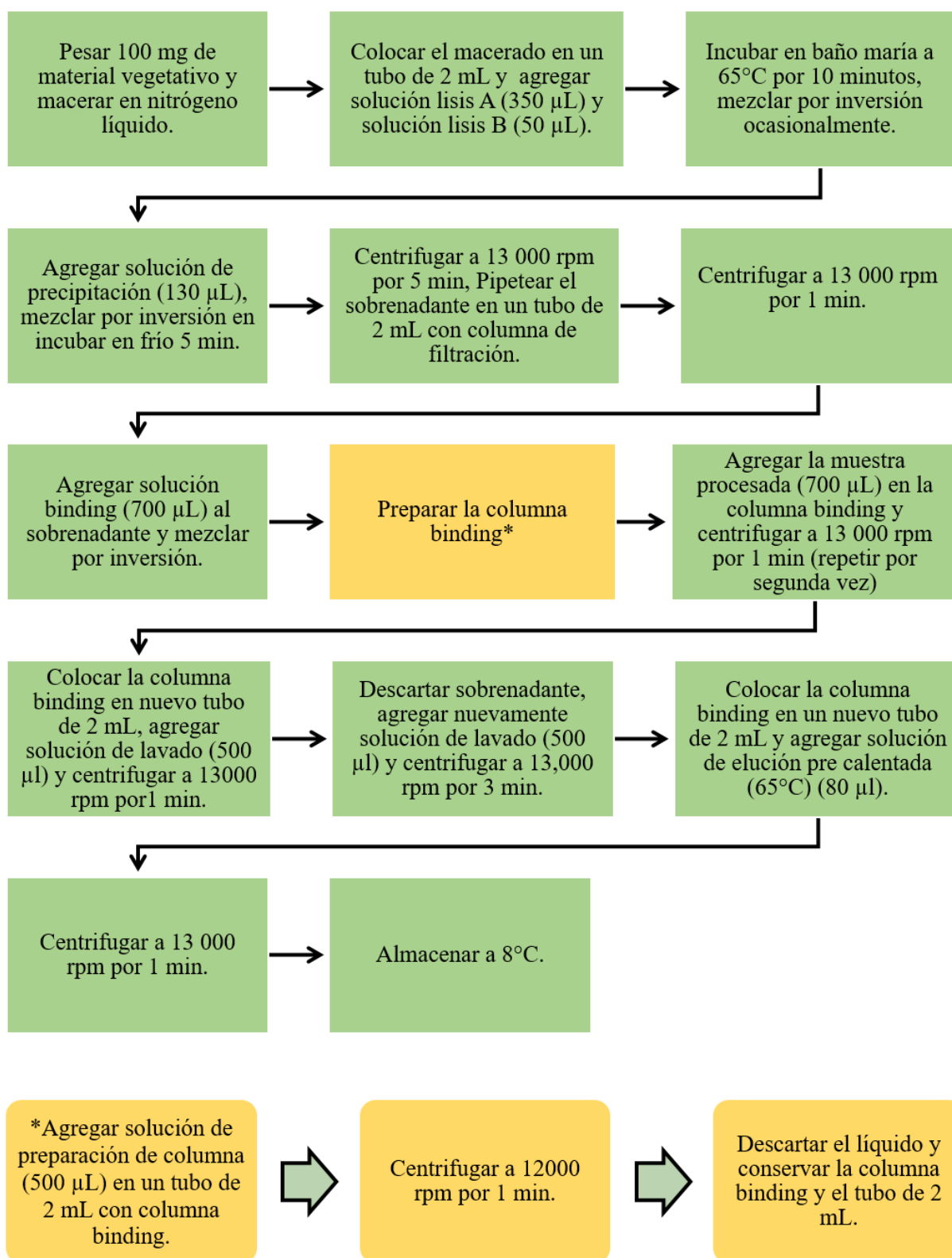
Para obtener la muestra, se seccionaron finamente 100 mg de hoja de *J. curcas* y 100 mg de hoja de *Zea mays* CE-777' (Lysak y Doležel, 1998) sobre una caja Petri con 1000  $\mu$ L de solución WPB (0.2 M Tris·HCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2 mM EDTA Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 86 mM NaCl, 10 mM metabisulfato de sodio, 1 % PVP-10, 1 % (v/v) Triton X-100, pH 7.5); se filtraron con una membrana de 40  $\mu$ M malla nylon; se le añadió 50  $\mu$ L de Ioduro de propidio (1mgmL<sup>-1</sup>), se agitó ligeramente y se tomaron las lecturas en un citómetro de flujo BD Accuri (C6® flow cytometer, Nueva Jersey, Estados Unidos). La medición se realizó tres días y cada día se procesaron 3 muestras por cada resiembra con su respectiva referencia estándar 2C. Una vez generados los histogramas que señalan los picos de fluorescencia, se obtuvieron los picos promedio 2C de *J. curcas* variedad ALJC01 y *Zea mays* L. 'CE-777', y se estimó el contenido de ADN según Doležel *et al.* (2007).

### 8.8. Fidelidad genética en clones de *J. curcas*

#### 8.8.1. Extracción de ADN de explantes de *J. curcas*

Se extrajo ADN nuclear a partir de explante de hoja de la planta madre *in vivo* y de brotes de *J. curcas* provenientes de ocho resiembras *in vitro* con un kit de extracción GenElute™ plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos) con algunas modificaciones (Figura 7).

## METODOLOGÍA



**Figura 7.** Proceso de extracción de ADN utilizado en explantes de *J. curcas*.

### 8.8.2. Amplificación de DAMD mediante PCR

La amplificación por PCR se realizó con 2.5  $\mu\text{L}$  de tampón PCR 10X  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  de 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2  $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa 5 unidades por  $\mu\text{L}$  (Invitrogen™, California, Estados Unidos), 2  $\mu\text{L}$  de dNTPs 0.2 mM, 1  $\mu\text{L}$  de iniciador 100  $\mu\text{M}$  (Integrate DNA technologies, Iowa, Estados Unidos). La PCR se realizó con un termociclador de 96 Pociillos Veriti (Applied Biosystems, California, Estados Unidos). Para los marcadores HVA, HBV, HVR y JJ336 se programó una temperatura de alineamiento de 55°C descrito por Zhou *et al.* (1997) y Aguilera-Cauich (2015). Para el marcador M13, se programó la fase de alineamiento a 42°C según lo descrito por Bridge *et al.* (1997) y Aguilera-Cauich (2015). La programación inició con una etapa de desnaturalización a 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 1 min a 92°C, 2 min, con la temperatura de alineamiento antes mencionada según el tipo de iniciador más 2 min a 72°C y finalmente una etapa de extensión de 7 min a 72°C. Finalizada la amplificación, las muestras se almacenaron a -8°C hasta su posterior uso.

### 8.8.3. Electroforesis

La separación del ADN extraído, fue realizada en una cámara para electroforesis MGU-202T (C.B.S. Scientific C.O., Los Ángeles, Estados Unidos) en gel de agarosa ultrapura (Invitrogen, California, Estados Unidos) al 1.0 % (w/v), disuelto en TAE 1X (Anexo 2). A la solución de agarosa con TAE se le agregó 2  $\mu\text{L}$  de solución de bromuro de etidio (10mg/mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) (Anexo 2).

### 8.8.4. Interpretación del perfil de bandeo

El gel obtenido de la electroforesis, fue observado en un transiluminador de UV de alto rendimiento (UVP Ultraviolet Products, Jena, Alemania). Los fragmentos amplificados por PCR fueron separados y observados con el protocolo descrito anteriormente en gel de agarosa ultrapura (Invitrogen, California, Estados Unidos) al 1.5 % (w/v) disuelto en TAE 1X (Anexo 2). Todas las imágenes obtenidas, tanto para corroborar el ADN como la amplificación por PCR fueron analizadas con el software Gel Analyzer 2010 (<http://www.gelanalyzer.com/>) y se creó

## **METODOLOGÍA**

---

---

una matriz de datos con los valores 0 y 1 para denotar la ausencia y presencia de bandas para obtener los porcentajes de polimorfismo genético con cada uno de los iniciadores utilizados (Anexo 3).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 9.1. Establecimiento del material vegetal e inducción de brotes adventicios

Se obtuvo un 100% de cultivos asépticos de embriones. La germinación inició aproximadamente a los 20 días después de la siembra; ésta concluyó a los 20 días después de pasar los cultivos a fotoperiodo. El tratamiento con las mejores condiciones para la inducción de brotes fue el tratamiento T17 (Cuadro 15) (MS al 75% de su fuerza iónica con 110.25  $\mu$ M de 2ip, 1.27  $\mu$ M de AIA y 369.21  $\mu$ M de SAd), en el cual, se desarrollaron hasta 18.50 $\pm$ 1.34 brotes promedio, éstos resultados superan los resultados obtenidos por Varshney y Johnson (2010) y Getaa y Sudheer (2008) quienes reportaron hasta 10 brotes por explante por organogénesis indirecta y directa respectivamente. En reportes recientes (Verma y Verma, 2015; Liu *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016) han reportado hasta 12 brotes por explante en organogénesis indirecta e indirecta utilizando diversos explantes de *J. curcas*.

**Cuadro 15.** Peso promedio final y número promedio de brotes obtenidos en explantes de *J. curcas* a los 45 días de cultivo.

Tratamiento	RCV			Peso promedio final del explante	Número promedio de brotes obtenidos
	2ip ( $\mu$ M)	AIA ( $\mu$ M)	SAd ( $\mu$ M)		
1	96.00	1.1	282.34	3.08 $\pm$ 0.38 <sup>cde</sup>	0.50 $\pm$ 0.700 <sup>a</sup>
2	110.7	1.1	282.34	2.46 $\pm$ 1.20 <sup>abcde</sup>	1.50 $\pm$ 2.100 <sup>a</sup>
3	125.4	1.1	282.34	0.14 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	00.0 $\pm$ 0.000 <sup>a</sup>
4	96.00	1.44	282.34	2.55 $\pm$ 0.48 <sup>abcde</sup>	7.50 $\pm$ 1.600 <sup>abc</sup>
5	110.7	1.44	282.34	2.42 $\pm$ 1.81 <sup>abcde</sup>	15.5 $\pm$ 1.760 <sup>bc</sup>
6	125.4	1.44	282.34	0.88 $\pm$ 0.13 <sup>abc</sup>	00.0 $\pm$ 0.000 <sup>a</sup>
7	96.00	1.27	282.34	1.30 $\pm$ 0.53 <sup>abcde</sup>	3.50 $\pm$ 4.940 <sup>ab</sup>
8	110.7	1.27	282.34	2.75 $\pm$ 0.90 <sup>bcde</sup>	0.50 $\pm$ 0.700 <sup>a</sup>
9	125.4	1.27	282.34	3.62 $\pm$ 0.64 <sup>e</sup>	10.0 $\pm$ 4.200 <sup>abc</sup>
10	96.00	1.1	369.21	3.08 $\pm$ 1.00 <sup>cde</sup>	9.50 $\pm$ 6.300 <sup>abc</sup>
11	110.7	1.1	369.21	0.73 $\pm$ 0.16 <sup>abc</sup>	0.50 $\pm$ 0.700 <sup>a</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

12	125.4	1.1	369.21	1.72±0.67 <sup>abcde</sup>	6.50±7.700 <sup>abc</sup>
13	96.00	1.44	369.21	3.40±0.26 <sup>de</sup>	4.00±4.240 <sup>ab</sup>
14	110.7	1.44	369.21	1.42±0.11 <sup>abcde</sup>	0.00±0.000 <sup>a</sup>
15	125.4	1.44	369.21	0.79±0.65 <sup>abc</sup>	3.00±2.800 <sup>ab</sup>
16	96.00	1.27	369.21	2.56±1.56 <sup>abcde</sup>	2.50±3.500 <sup>ab</sup>
17	110.7	1.27	369.21	3.64±0.39 <sup>e</sup>	18.5±1.340 <sup>c</sup>
18	125.4	1.27	369.21	1.99±0.51 <sup>abcde</sup>	13.0±1.100 <sup>abc</sup>
19	96.00	1.1	325.78	0.64±0.16 <sup>abc</sup>	1.00±1.400 <sup>a</sup>
20	110.7	1.1	325.78	0.85±0.33 <sup>abc</sup>	7.00±0.800 <sup>abc</sup>
21	125.4	1.1	325.78	0.69±0.14 <sup>abc</sup>	0.00±0.000 <sup>a</sup>
22	96.00	1.44	325.78	1.19±1.16 <sup>abcde</sup>	2.50±3.500 <sup>ab</sup>
23	110.7	1.44	325.78	1.50±1.14 <sup>abcde</sup>	1.00±1.400 <sup>a</sup>
24	125.4	1.44	325.78	1.00±0.95 <sup>abcd</sup>	3.50±4.900 <sup>ab</sup>
25	96.00	1.27	325.78	2.12±0.72 <sup>abcde</sup>	0.00±0.000 <sup>a</sup>
26	110.7	1.27	325.78	2.24±0.85 <sup>abcde</sup>	1.50±2.100 <sup>a</sup>
27	125.4	1.27	325.78	0.51±0.25 <sup>ab</sup>	0.00±0.000 <sup>a</sup>

Misma letra corresponde a tratamientos estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Tukey con  $p < 0.05$ . RCV: Reguladores de crecimiento vegetal, 2ip: 6- ( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilamino) purina, AIA: Ácido indolacético, SAd: sulfato de Adenina. \*todos los tratamientos se prepararon con medio basal MS al 75% de su fuerza iónica.

En la Figura 8 se puede apreciar la inducción de brotes a partir de explante de hoja cotiledonar de *J. curcas*. El 70% de los explantes presentaron organogénesis de brotes adventicios.

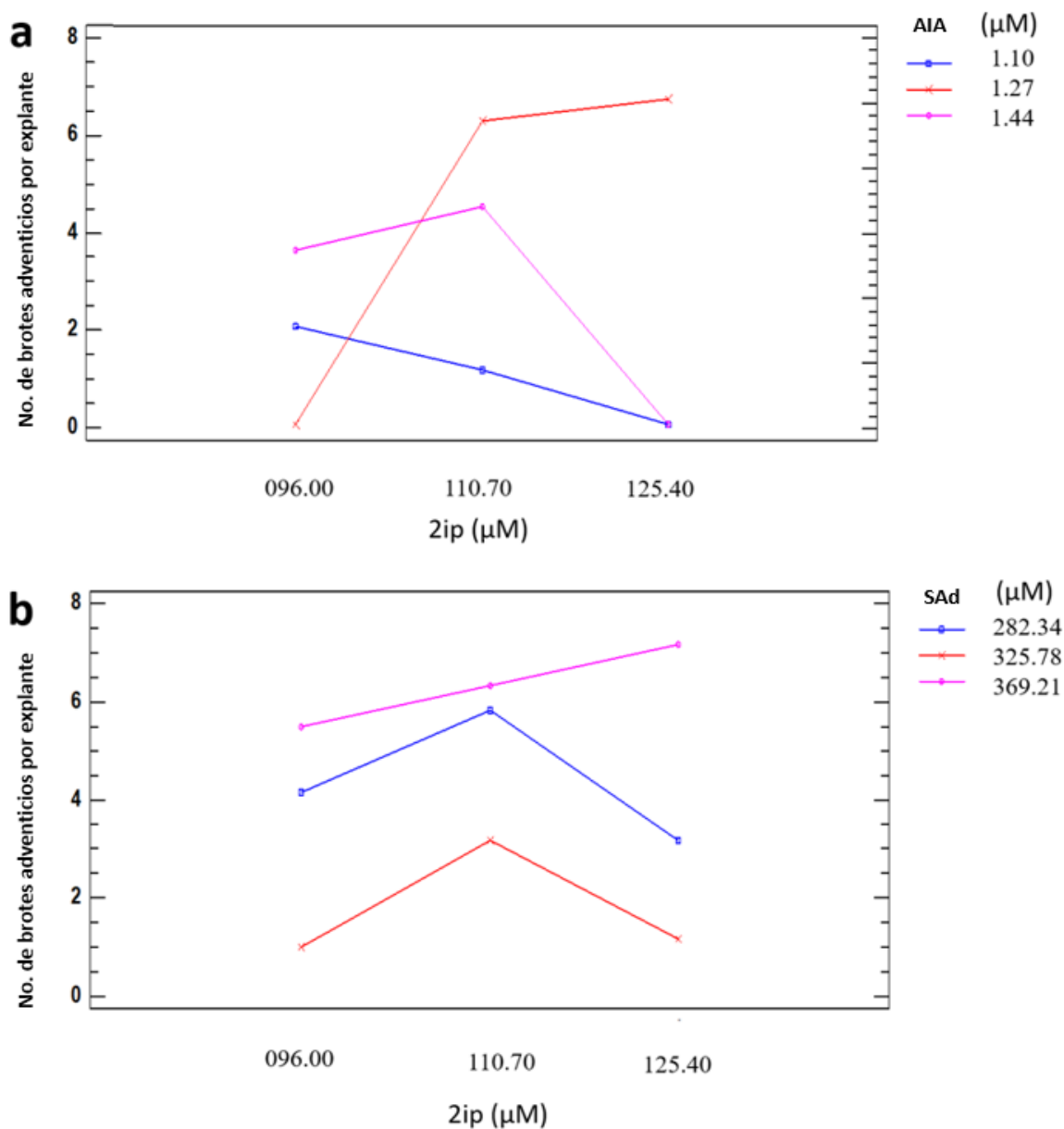


**Figura 8.** Inducción de brotes adventicios de *J. curcas*. a) callogénesis, b) desarrollo del brote a los 30 días de cultivo y c) desarrollo de plántula a los 45 días de cultivo.

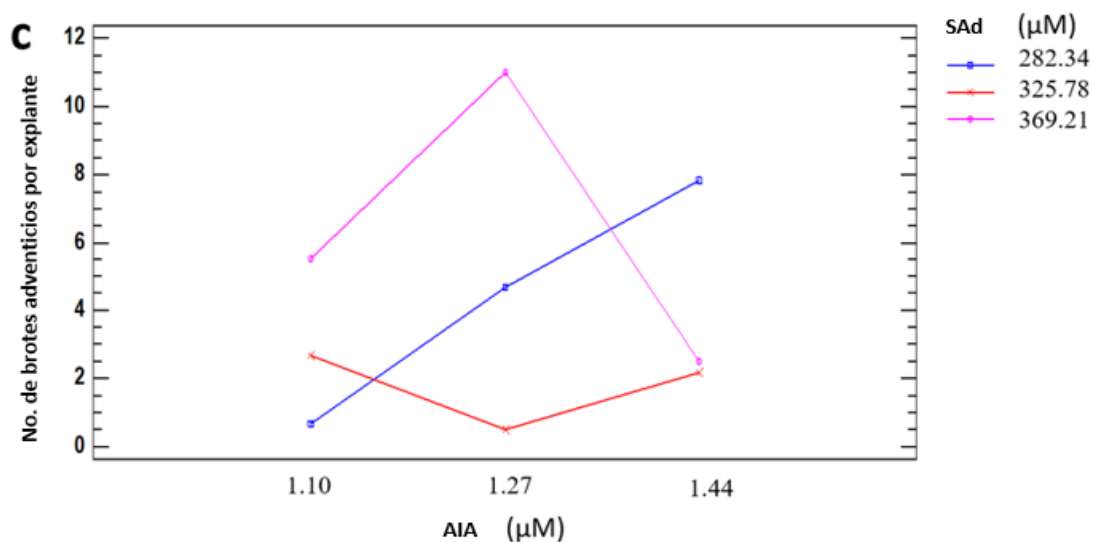


## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis de varianza realizado ( $P < 0.05$ ) mostraron que el desarrollo de los brotes se debió a la interacción de los efectos principales 2ip, AIA y SAd (Anexo 1). En la Figura 9a se puede observar un promedio de 7 brotes con la interacción de la concentración de 125.40  $\mu\text{M}$  de 2ip y 1.27  $\mu\text{M}$  de AIA; en la Figura 9b se observa que 125.40  $\mu\text{M}$  de 2ip con 369.21  $\mu\text{M}$  de SAd generaron el mismo número de brotes, mientras que en la Figura 9c fue posible observar la interacción de 1.27  $\mu\text{M}$  de AIA y 369.21  $\mu\text{M}$  de SAd que promovió la formación de 11 brotes por explante.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 9.** Interacciones de los factores principales en organogénesis de brotes adventicios de *J. curcas*. a) interacción de 2ip con AIA, b) interacción de 2ip con SAd, c) interacción de AIA con SAd.

George *et al.* (2008b) han indicado que SAd actúa como un precursor de la síntesis natural de citocinina o mejora la biosíntesis natural de la misma, por lo tanto, los compuestos producidos podrían ser más eficientes en causar una respuesta fisiológica mejor a las citocininas agregadas al medio de cultivo. Por otro lado, McGaw *et al.* (1984) han demostrado que el SAd puede servir como un precursor de la síntesis de zeatina, lo que indica su posible efecto sobre la inducción de brotes adventicios en *J. curcas*.

### 9.2. Elongación de brotes adventicios

Se observó elongación de los brotes a los 45 días de cultivo. En la Cuadro 16 se puede observar que el tratamiento T1 (4.44 μM de BAP, 1.0 μM de AIA y 543 μM de SAd) fue el medio en el cual los brotes elongaron hasta  $1.67 \pm 0.76$  cm de longitud. En cuanto al desarrollo de hojas y número de brotes, la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) indicó diferencias estadísticas significativas, sin embargo, el tratamiento 1 fue el que generó hasta  $18.00 \pm 2.65$  hojas en promedio y el tratamiento 2 con  $7.67 \pm 1.53$  brotes promedio (Cuadro 16).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Cuadro 16.** Desarrollo de brotes adventicios de *J. curcas*: crecimiento del tallo en cm, número de hojas y número de brotes.

Tratamientos*	Variables			Altura (cm)	Número de hojas	Número de Brotes
	BAP ( $\mu$ M)	AIA ( $\mu$ M)	SAd ( $\mu$ M)			
1	4.44	1.0	543.00	1.67 $\pm$ 0.76 <sup>g</sup>	18.00 $\pm$ 2.65 <sup>e</sup>	4.67 $\pm$ 1.53 <sup>def</sup>
2	6.66	1.0	543.00	0.37 $\pm$ 0.32 <sup>abcd</sup>	15.33 $\pm$ 8.14 <sup>de</sup>	7.67 $\pm$ 1.53 <sup>f</sup>
3	8.88	1.0	543.00	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	1.000 $\pm$ 1.73 <sup>ab</sup>	1.00 $\pm$ 1.73 <sup>ab</sup>
4	4.44	2.4	543.00	0.90 $\pm$ 0.79 <sup>def</sup>	8.000 $\pm$ 8.00 <sup>abcd</sup>	1.00 $\pm$ 1.00 <sup>ab</sup>
5	6.66	2.4	543.00	0.13 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	6.670 $\pm$ 8.08 <sup>abcd</sup>	4.00 $\pm$ 1.00 <sup>bcd</sup>
6	8.88	2.4	543.00	0.07 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>	1.670 $\pm$ 2.89 <sup>ab</sup>	0.67 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>
7	4.44	1.7	543.00	0.27 $\pm$ 0.21 <sup>abc</sup>	3.330 $\pm$ 3.51 <sup>abc</sup>	3.00 $\pm$ 2.00 <sup>abcde</sup>
8	6.66	1.7	543.00	0.13 $\pm$ 0.23 <sup>ab</sup>	4.330 $\pm$ 7.51 <sup>abc</sup>	4.33 $\pm$ 2.52 <sup>cde</sup>
9	8.88	1.7	543.00	0.20 $\pm$ 0.17 <sup>abc</sup>	2.330 $\pm$ 4.04 <sup>abc</sup>	4.67 $\pm$ 3.79 <sup>def</sup>
10	4.44	1.0	1086.0	0.07 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	1.670 $\pm$ 1.53 <sup>ab</sup>	2.67 $\pm$ 0.58 <sup>abcde</sup>
11	6.66	1.0	1086.0	0.57 $\pm$ 0.51 <sup>bcd</sup>	8.000 $\pm$ 7.21 <sup>abcd</sup>	1.00 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>
12	8.88	1.0	1086.0	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.000 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	3.33 $\pm$ 1.53 <sup>abcde</sup>
13	4.44	2.4	1086.0	0.73 $\pm$ 0.15 <sup>cdef</sup>	13.67 $\pm$ 3.06 <sup>cde</sup>	1.33 $\pm$ 0.58 <sup>ab</sup>
14	6.66	2.4	1086.0	0.17 $\pm$ 0.29 <sup>ab</sup>	2.330 $\pm$ 4.04 <sup>abc</sup>	1.00 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>
15	8.88	2.4	1086.0	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	2.330 $\pm$ 4.04 <sup>abc</sup>	1.00 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>
16	4.44	1.7	1086.0	0.00 $\pm$ 0.36 <sup>f</sup>	0.330 $\pm$ 3.46 <sup>cde</sup>	3.67 $\pm$ 2.52 <sup>abcde</sup>
17	6.66	1.7	1086.0	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.330 $\pm$ 0.58 <sup>a</sup>	3.67 $\pm$ 1.53 <sup>abcde</sup>
18	8.88	1.7	1086.0	0.23 $\pm$ 0.21 <sup>abc</sup>	2.000 $\pm$ 2.65 <sup>ab</sup>	2.33 $\pm$ 1.15 <sup>abcde</sup>
19	4.44	1.0	814.50	0.30 $\pm$ 0.44 <sup>abc</sup>	8.000 $\pm$ 8.54 <sup>abcd</sup>	3.67 $\pm$ 3.21 <sup>abcde</sup>
20	6.66	1.0	814.50	0.53 $\pm$ 0.47 <sup>abcde</sup>	16.33 $\pm$ 7.51 <sup>de</sup>	4.67 $\pm$ 0.58 <sup>def</sup>
21	8.88	1.0	814.50	0.50 $\pm$ 0.36 <sup>abcde</sup>	15.00 $\pm$ 1.73 <sup>cde</sup>	4.33 $\pm$ 0.58 <sup>cde</sup>
22	4.44	2.4	814.50	0.27 $\pm$ 0.21 <sup>abc</sup>	2.330 $\pm$ 1.15 <sup>abc</sup>	2.33 $\pm$ 2.31 <sup>abcd</sup>
23	6.66	2.4	814.50	0.13 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>	2.000 $\pm$ 2.65 <sup>ab</sup>	3.67 $\pm$ 1.53 <sup>abcde</sup>
24	8.88	2.4	814.50	0.37 $\pm$ 0.15 <sup>abcd</sup>	10.67 $\pm$ 6.66 <sup>cdef</sup>	5.33 $\pm$ 3.51 <sup>ef</sup>
25	4.44	1.7	814.50	0.37 $\pm$ 0.55 <sup>abcd</sup>	9.330 $\pm$ 10.6 <sup>bcd</sup>	1.67 $\pm$ 2.08 <sup>abc</sup>
26	6.66	1.7	814.50	1.03 $\pm$ 0.40 <sup>df</sup>	8.000 $\pm$ 3.00 <sup>abcd</sup>	3.33 $\pm$ 3.21 <sup>abcde</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

27	8.88	1.7	814.50	0.03±0.06 <sup>ab</sup>	2.670±2.31 <sup>abc</sup>	3.33±0.5 <sup>abcde</sup>
----	------	-----	--------	-------------------------	---------------------------	---------------------------

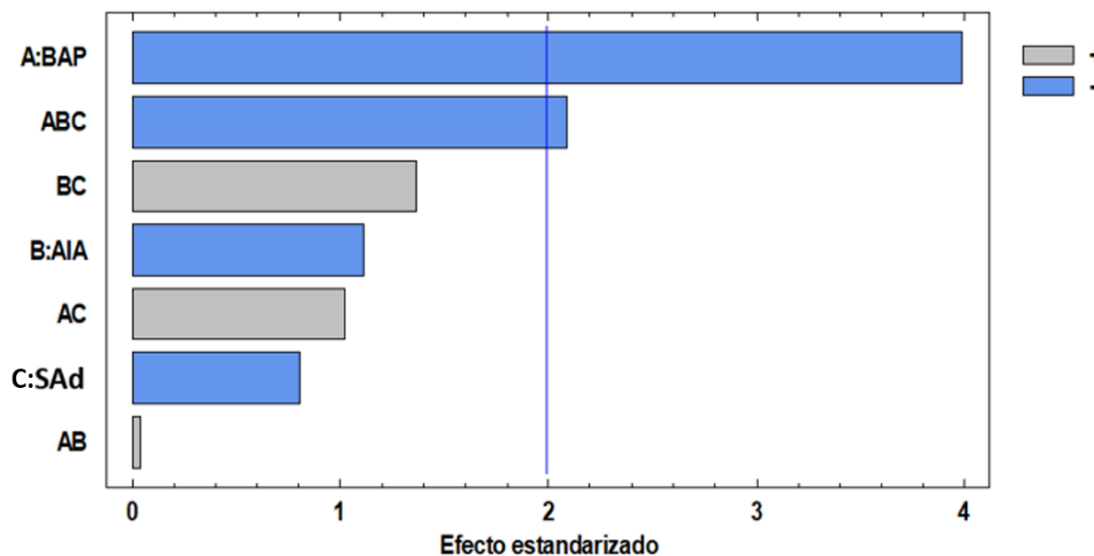
Misma letra en la misma columna corresponde a tratamientos estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Tukey con  $p < 0.05$ . BAP: Bencilaminopurina, AIA: Ácido indolacético, SAd: Sulfato de Adenina; \*todos los tratamientos se establecieron en medio basal MS al 100% de su fuerza iónica.

Se pudo observar que el sulfato de adenina es un aditivo orgánico que tiene efecto tanto en la inducción como en la elongación de los brotes adventicios *in vitro* de *J. curcas*. Esto puede deberse a la interacción que tiene éste compuesto con las citocininas, el cual ayuda al desarrollo de los brotes (Nwankwo y Krikorian, 1983). Ésta respuesta *in vitro*, se corrobora con los resultados obtenidos por Shrivastava y Banerjee (2008) quienes reportaron el desarrollo de brotes de *J. curcas* combinando sulfato de adenina con BAP, ácido 3-indolbutirico (AIB) y otros aditivos como la L-Glutamina, L-Arginina y Ácido cítrico. En la Figura 10 se pueden observar los brotes de *J. curcas* elongados a los 45 días de cultivo en el que se aprecia el desarrollo de brotes y hojas.



**Figura 10.** Brotes desarrollados de *J. curcas* a los 45 días de cultivo.

A pesar del mayor efecto obtenido en con el factor BAP sobre el desarrollo de los brotes, se pudo observar en el diagrama de Pareto (Figura 11) una triple interacción, lo cual indica que es necesaria la presencia conjunta tanto del AIA, BAP y el SAd.



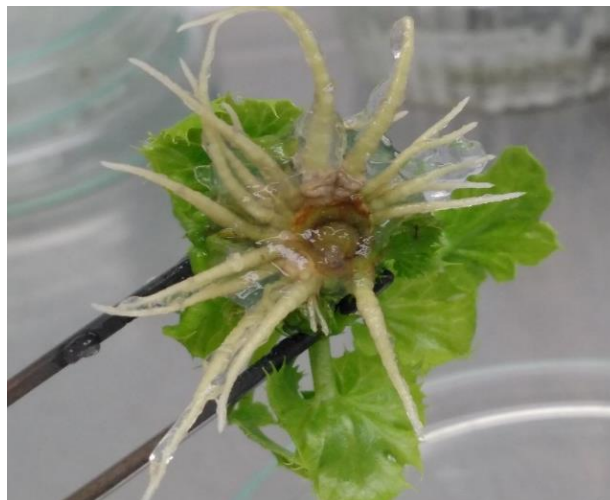
**Figura 11.** Diagrama de Pareto para el desarrollo de brotes adventicios de *J. curcas* a los 45 días de cultivo.

Los RCV desempeñan un papel crucial en el control de la forma en que las plantas crecen y se desarrollan, regulan la velocidad de crecimiento de las partes individuales y luego las integran para producir la forma que conocemos como planta (Davies, 2010). Los RCV rara vez actúan solos y durante muchos procesos interactúan para producir el efecto final (Gaspar *et al.*, 1996). Las auxinas promueven el crecimiento del tallo y el desarrollo de los órganos (Thorpe *et al.*, 2008). Las citocininas estimulan la síntesis de proteínas que participan en el ciclo celular (George *et al.*, 2008b), producen desarrollo en meristemos y promueven el desarrollo de brotes adventicios en combinación con bajas concentraciones de auxinas (Maharana *et al.*, 2012).

### 9.3. Enraizamiento de plántulas de *J. curcas* obtenidas *in vitro*

Las plántulas sometidas en el medio de enraizamiento presentaron morfogénesis de raíces a los 45 días de cultivo. Se obtuvo como promedio 15 raíces adventicias con una longitud de 2 cm aproximadamente (Figura 12).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 12.** Raíces adventicias desarrolladas en plántulas *in vitro* de *J. curcas* a los 45 días de cultivo.

Los tratamientos que presentaron mejor respuesta a la organogénesis de raíces fueron el 11, 15 y el 16 en medio MS al 25% + 17.7 $\mu$ M de AIB, MS al 50% + 20.7  $\mu$ M de AIB y MS al 100%+14.7 $\mu$ M de AIB respectivamente, sin embargo, el que tuvo mayor número de raíces fue el tratamiento 15 (MS al 25% + 20.7  $\mu$ M de AIB) con 13.6 $\pm$ 15.0 raíces promedio y 1.90 $\pm$ 0.81 cm de longitud. A pesar de que en el tratamiento 16 (MS al 100% +14.7  $\mu$ M de AIB) tuvo 2.86 $\pm$ 1.87 cm de longitud (Cuadro 17), fue necesario considerar que un sistema de micropropagación exitoso requiere las mejores condiciones para el enraizamiento y desarrollo de brotes, por lo tanto, la obtención de un buen número de raíces sanas permite que las plántulas se establezcan en el suelo y promueven el crecimiento y desarrollo normal (Dewir *et al.*, 2016).

**Cuadro 17.** Porcentaje de organogénesis, número y longitud de raíces obtenidas en plántulas de *J. curcas in vitro*.

Tratamientos	AIB $\mu$ M + 2.4		% raíces	No. Raíces	Longitud (cm)
	mg*L <sup>-1</sup> Phl	MS gL <sup>-1</sup>			
1	14.7	1.32	66.6	5.00 $\pm$ 6.20 <sup>abc</sup>	1.16 $\pm$ 1.00 <sup>abc</sup>
2	17.7	1.32	33.5	0.33 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.80 <sup>ab</sup>
3	20.7	1.32	00.0	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
4	14.7	2.2	33.3	0.33 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	0.50 $\pm$ 0.86 <sup>ab</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5	17.7	2.2	66.6	7.30±11.0 <sup>abc</sup>	1.53±1.50 <sup>abc</sup>
6	20.7	2.2	33.3	2.00±3.40 <sup>ab</sup>	0.66±1.10 <sup>ab</sup>
7	14.7	4.4	33.3	0.66±1.10 <sup>a</sup>	0.40±0.60 <sup>ab</sup>
8	17.7	4.4	00.0	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
9	20.7	4.4	00.0	2.00±1.70 <sup>ab</sup>	1.80±2.30 <sup>bc</sup>
Tratamientos	AIB $\mu$ M				
10	14.7	1.32	66.0	11.6±10.4 <sup>bc</sup>	0.86±0.70 <sup>ab</sup>
11	17.7	1.32	100	2.66±1.15 <sup>ab</sup>	0.56±0.05 <sup>ab</sup>
12	20.7	1.32	66.6	6.00±8.70 <sup>abc</sup>	0.66±0.76 <sup>ab</sup>
13	14.7	2.2	33.3	1.30±2.30 <sup>a</sup>	0.83±1.40 <sup>ab</sup>
14	17.7	2.2	00.0	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
15	20.7	2.2	100	13.6±15.0 <sup>c</sup>	1.90±0.81 <sup>bc</sup>
16	14.7	4.4	100	5.30±4.00 <sup>abc</sup>	2.86±1.87 <sup>c</sup>
17	17.7	4.4	33.3	3.00±5.10 <sup>ab</sup>	0.40±0.69 <sup>ab</sup>
18	20.7	4.4	00.0	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>

Misma letra en la misma columna corresponde a tratamientos estadísticamente iguales de acuerdo a la prueba de Tukey con  $p < 0.05$ . AIB: ácido indolbutírico, PhI: Phloroglucinol.

Baker y Wetzstein (1994) mencionan que concentraciones más altas de AIB pueden inducir niveles más altos de metabolitos secundarios, lo que puede conducir a la inhibición del proceso de formación de raíces. Además, los altos niveles de AIB pueden dar lugar a la acumulación de etileno, lo que también inhibe la inducción de primordios de raíz (De Klerk, 2002), sin embargo, en los resultados obtenidos se puede observar que la concentración más baja (14.7  $\mu$ M) y la más alta (20.7  $\mu$ M) utilizadas en los tratamientos, arrojaron resultados similares, al parecer la interacción de las concentraciones de AIB con la fuerza iónica del medio de cultivo son factores importantes que generan respuesta organogénica de raíces.

En el cultivo de tejidos vegetales, la base de todos los medios nutritivos es una mezcla de sales minerales que contienen los macro y micronutrientes esenciales (Ramage *et al.*, 2002). No se tiene un estudio claro que explique el proceso por el cual las plántulas con el medio de cultivo

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

---

reducido a la mitad de su fuerza iónica pueda ayudar a la morfogénesis de raíces, sin embargo, la absorción de los nutrientes en plántulas *in vitro*, es similar a los principios subyacentes de la absorción y transporte de minerales de plántulas *in vivo* (Williams, 1993; Leifert *et al.*, 1995;).

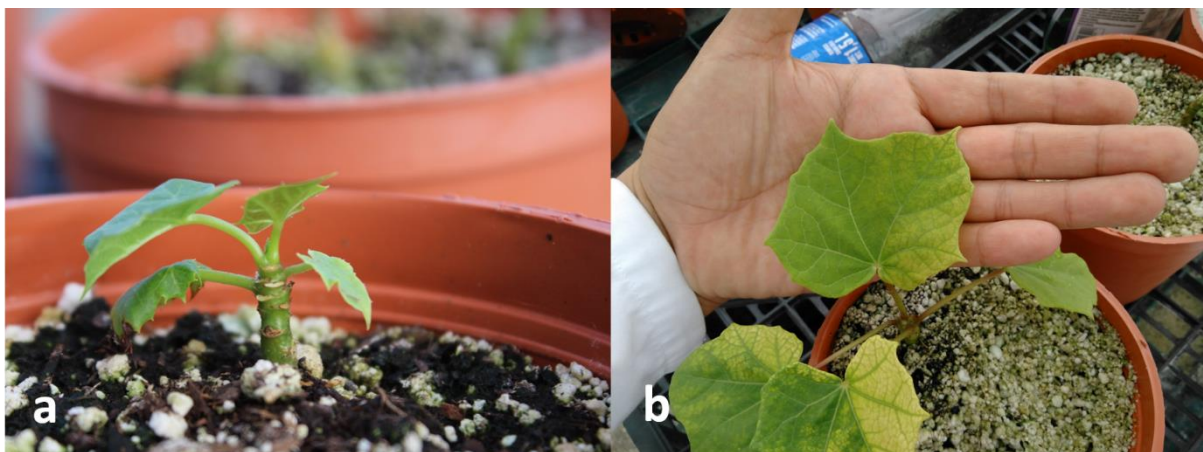
Geiss *et al.* (2018) mencionan que la organogénesis de raíces adventicias y la nutrición mineral, están íntimamente relacionados, aunque hay pocos estudios intentando caracterizar los efectos de minerales específicos en el proceso morfogenético. Schwambach *et al.* (2005), quienes trabajaron con morfogénesis de raíces adventicias de *Eucalyptus globulus*, mencionan que la fuente de calcio (Ca), nitrógeno (N) y el zinc (Zn) afectó significativamente el número de raíces adventicias, mientras que, la fuente de fósforo (P), hierro (Fe), manganeso (Mn) y nitrógeno influyó en la longitud de la misma. Considerando lo anterior, Maathuis (2009) menciona que la deficiencia localizada o el exceso de muchos nutrientes inducen adaptaciones morfológicas de la raíz.

El floroglucinol es un aditivo que promueve fuertemente la inducción de raíces (Daud *et al.*, 2013), sin embargo, diferentes concentraciones de AIB + Phl en un medio MS no generaron buenos resultados, ya que el número más alto de organogénesis de raíces con Phl fue el tratamiento 5 (17.7 de AIB+MS 50%+ 2.54 mgL<sup>-1</sup>) con 7.30±11.0 raíces, el cual fue superado por el tratamiento 15 como se puede observar en el Cuadro 17.

### 9.4. Aclimatación de plántulas de *J. curcas*

Se logró obtener el 90 % de plántulas aclimatadas. En la Figura 13 se puede observar el desarrollo de las plántulas a los 45 y 90 días de aclimatación.





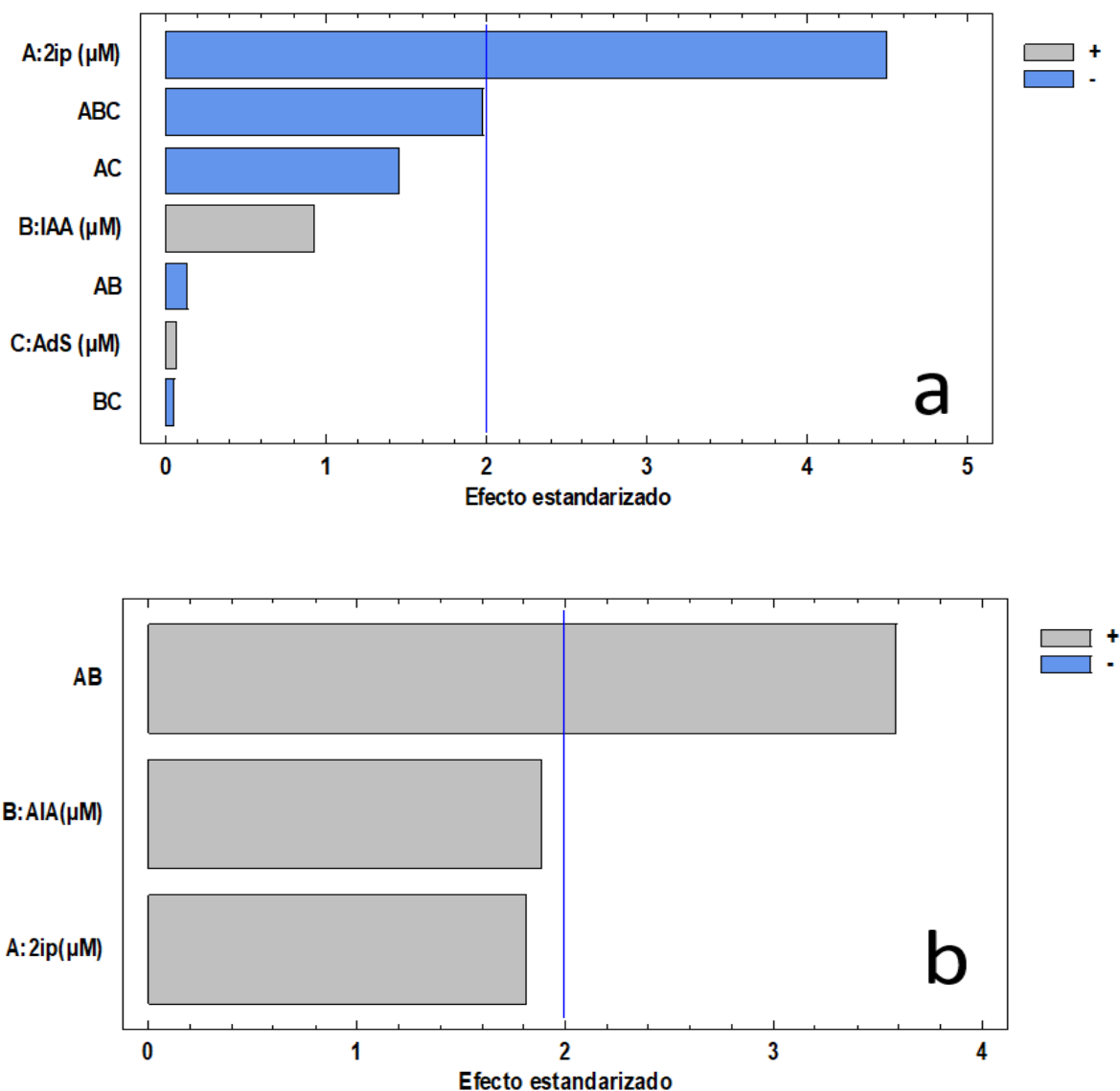
**Figura 13.** Desarrollo de plántulas aclimatadas de *J. curcas*, a) 45 días después de la aclimatación, b) 90 días después de la aclimatación

### 9.5. Optimización de la inducción de brotes adventicios de *J. curcas* por MSR

#### 9.5.1. Diseño factorial $3^3$ y Diseño central compuesto $2^2$ con cuatro puntos centrales

En el diagrama de Pareto de la Figura 14a se puede observar que el 2ip en su nivel más bajo es el factor que tiene mayor efecto estandarizado sobre la inducción de brotes de *J. curcas*, por otro lado, se puede observar triple interacción cercana al efecto estandarizado, en el caso del factor AIA, no tuvo efecto sobre la variable de respuesta, sin embargo, Coenen y Lomax (1997) mencionan que es indispensable la interacción de auxina-citocinina ya que forman un sistema que controla muchos aspectos de crecimiento y diferenciación celular, por otro lado el sulfato de adenina no generó efecto sobre la variable de respuesta, aunque Raha y Roy (2001) mencionan que ésta tiene un efecto sinérgico con otras citocininas estimulando el crecimiento celular y mejorando la inducción de brotes, debido a esto no se descartó utilizar el sulfato de adenina en el diseño central compuesto. En el análisis del diseño central compuesto (Figura 14b) se puede apreciar el efecto de la doble interacción obtenida del 2ip mas AIA en la inducción de número de brotes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 14.** Diagramas de Pareto para el efecto de los factores 2ip, AIA y SAd en la inducción de brotes adventicios de *J. curcas*; a) diagrama para el diseño factorial  $3^3$  y b) diagrama para el diseño central compuesto  $2^2$  con cuatro puntos centrales.

### 9.5.2. Ajuste al modelo cuadrático y análisis de superficie de respuesta

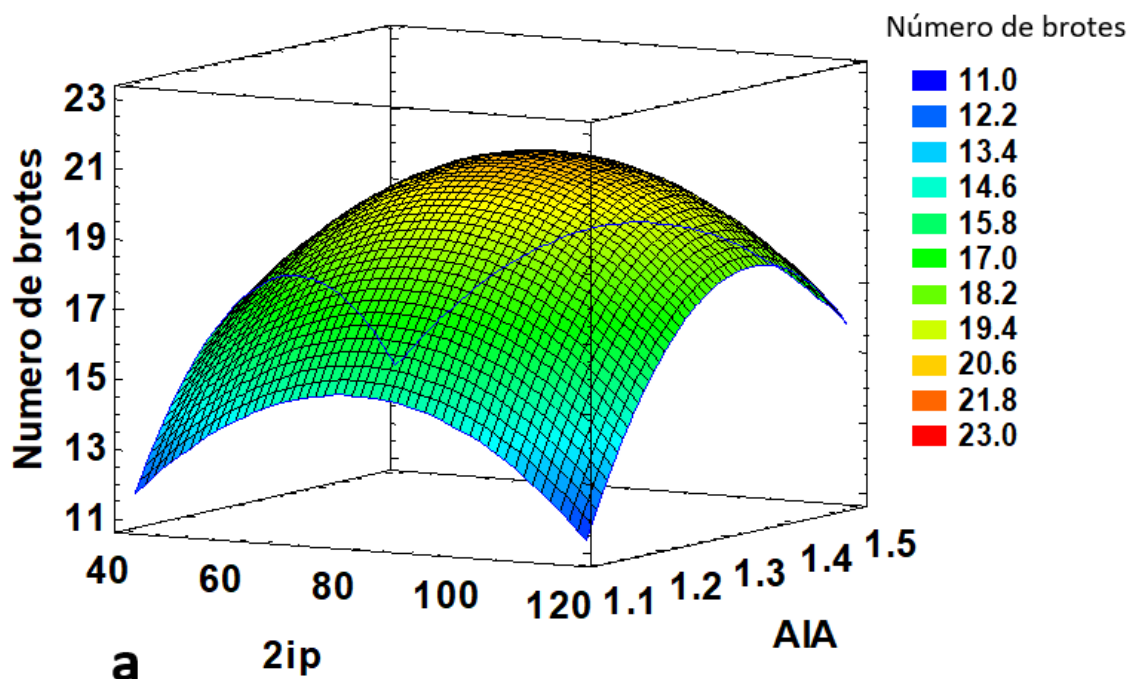
El ajuste al modelo cuadrático indicó que el DCC  $2^2$  más puntos centrales y términos rotables, se ajusta a un modelo de segundo orden ( $P < 0.05$ ), lo cual, indica que se tiene curvatura en el

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

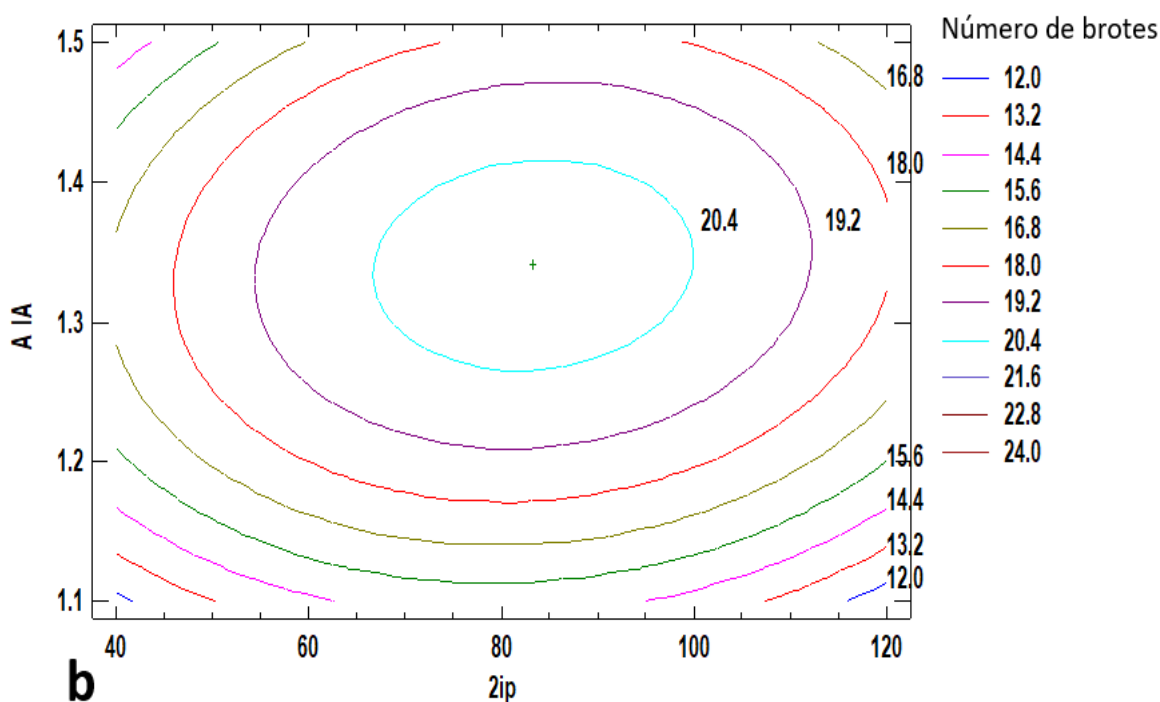
modelo. El coeficiente de determinación ajustado, señaló que el 85.1% de los datos son explicados por éste modelo, obteniendo así, la siguiente ecuación:

$$Y = -173.726 + 0.252628X_1 + 274.831X_2 + 0.08X_1X_2 - 0.00216001X_1^2 - 105.001X_2^2$$

El tipo de superficie modelada para el diseño analizado fue de punto máximo (Figura 15a), como se puede observar, en los tonos azul se señalan el número de brotes promedio más bajos obtenidos y en la superficie de color rojo-naranja se aprecia la superficie máxima que se puede obtener al utilizar 80  $\mu\text{M}$  de 2ip más 1.3  $\mu\text{M}$  de AIA. Éste punto máximo de repuesta se puede apreciar en el gráfico de contornos de la Figura 15b, indicando que al utilizar 83.3  $\mu\text{M}$  de 2ip más 1.3  $\mu\text{M}$  de AIA se obtiene un máximo número de brotes inducidos de 21. En el mismo gráfico de contornos 15b, se puede apreciar que el factor con mayor efecto es el AIA, ya que al utilizar una concentración de 2ip fija y combinarlo con mayores o menores concentraciones de AIA, la respuesta del número de brotes, varía con más facilidad. Esto se debe a que los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) son sustancias orgánicas naturales que influyen de manera rápida y efectiva en los procesos fisiológicos al aplicarse en bajas concentraciones (Davies 2010).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 15.** Superficie de respuesta generada para la optimización de la inducción de brotes de *J. curcas*. a) superficie de punto máximo, b) gráfico de contornos.

El número de brotes máximo obtenido fue 21 en promedio, lo cual indica que es el número máximo que se puede obtener al utilizar el protocolo de inducción de brotes adventicios. La tecnología de micropropagación es costosa debido a las instalaciones, los gastos generales y la mano de obra requerida por lo que a menudo, no es económicamente viable y generan costos que son insostenibles para ciertas plantas, variedades, productos o mercados (Loberant y Altman, 2009). En el Anexo 4 se puede observar el costo del proceso de micropropagación incluyendo mano de obra y gastos de energía para las condiciones artificiales (sin considerar infraestructura), se calculó que el costo por planta de *J. curcas* micropropagadas *in vitro* es de \$15.30. El costo de propagación de plantas *in vitro* de *J. curcas* podría disminuir significativamente implementando el uso de biorreactores y utilizando energía solar durante el proceso de cultivo *in vitro*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.5.3. Validación de resultados

La validación mostró un 10.95% de error (Cuadro 18), el óptimo obtenido fue de 21 brotes adventicios y la validación fue 19 brotes adventicios. A partir del modelo obtenido en la MSR y los resultados de optimización, los valores pronosticados y verificados están bastante cerca, lo que indica que el modelo desarrollado se puede usar de manera efectiva para predecir el número de brotes adventicios en función de los factores 2ip ( $\mu\text{M}$ ) y AIA ( $\mu\text{M}$ ).

**Cuadro 18.** Porcentaje de error obtenido de acuerdo con lo teórico y práctico para la inducción de brotes adventicios.

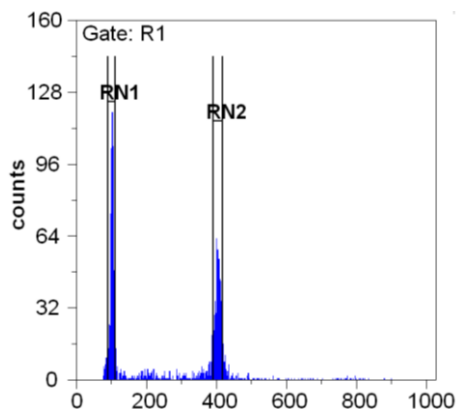
Factores		Número de brotes adventicios obtenidos		Porcentaje de error (%)
2ip ( $\mu\text{M}$ )	AIA ( $\mu\text{M}$ )	Teórico	Práctico	
83	1.3	21	19	9.5

2ip: 6-( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilamino) purina; AIA: ácido indolacético.

### 9.6. Estimación del contenido de ADN nuclear en *J. curcas*

#### 9.6.1. Estimación en plantas madre

El histograma obtenido para la estimación del contenido de ADN en plantas madre (Figura 16) muestra un promedio de intensidad de  $112.95 \pm 7.63$  para *J. curcas* y  $435.5 \pm 27.28$  para *Bellis perennis* obteniendo un estimado de contenido de ADN nuclear de  $0.89 \pm 0.028$  pg.

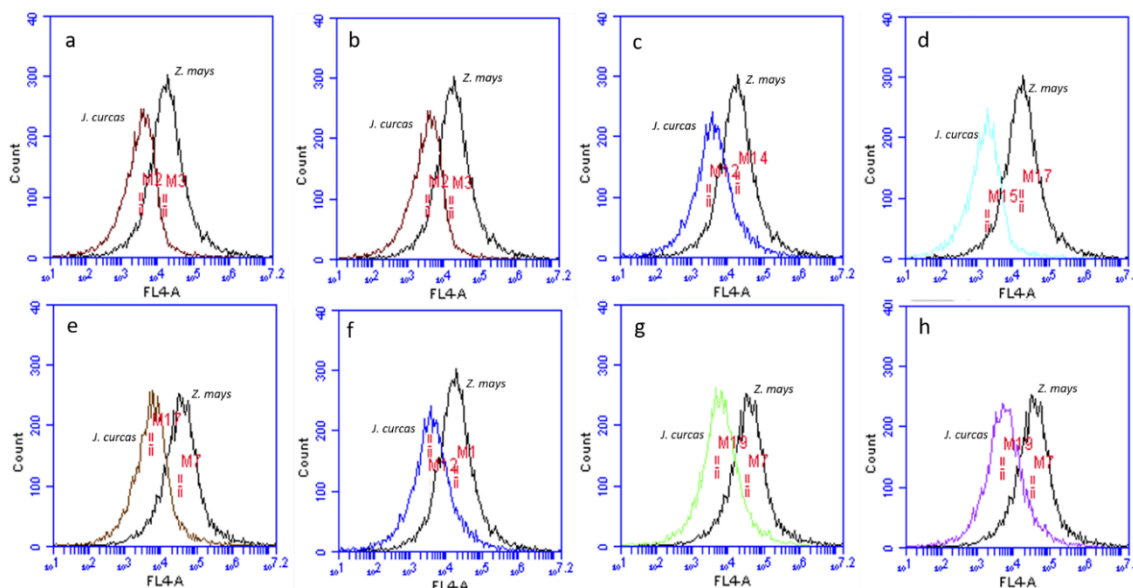


**Figura 16.** Histograma con promedios en G0/G1 para *J. curcas* variedad ALJC01 (RN1) y *Bellis perennis* L (RN2).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.6.2. Estimación de ADN de uno hasta ocho resiembras *in vitro*

Las intensidades promedio obtenidas a partir de los histogramas de 1 a 8 resiembras fue de  $3634.32 \pm 1519.02$  para *J. curcas* variedad ALJC01 y  $22922.1 \pm 10448.1$  para *Zea mays* 'CE-777'; como se puede observar en la Figura 17 en cada histograma los picos promedio para *J. curcas* se encuentra entre los canales de intensidad  $10^3$  y  $10^4$  y para *Zea mays* entre los canales de intensidad  $10^4$  y  $10^5$ .



**Figura 17.** Histogramas obtenidos en citometría de flujo de explantes de *J. curcas* provenientes de 1 a 8 resiembras. a-h) primera hasta la octava resiembra *in vitro*.

El promedio para el contenido de ADN nuclear estimado para *J. curcas* según Carvalho *et al.* (2008) es de  $0.85 \text{ pg} \pm 0.006$ . Como se puede observar en los resultados obtenidos el contenido de ADN nuclear estimado de *J. curcas* para cada uno de las resiembras se encuentran entre  $0.80 \pm 0.12$  y  $1.07 \pm 0.23$  pg de ADN, detectando diferencias estadísticas significativas (Cuadro 19).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Cuadro 19.** Promedios de los picos de los histogramas en explantes de *Zea mays* y explantes de *J. curcas*; contenido de ADN estimado de uno hasta ocho resiembras *in vitro*.

Periodo de Resiembra <i>in vitro</i> (meses)	Promedio de pico para <i>Zea mays</i> L.*	Promedio de pico para <i>J. curcas</i> L.	Contenido estándar de ADN en <i>Zea mays</i> L.* (pg)	Contenido estimado de ADN para <i>J. curcas</i> (pg)
1	12985.57	2796.98	5.43	1.02±0.13 <sup>ab</sup>
2	12141.18	1951.32	5.43	0.89±0.16 <sup>ab</sup>
3	12904.38	2445.68	5.43	1.07±0.23 <sup>b</sup>
4	13224.10	2007.84	5.43	0.82±0.02 <sup>a</sup>
5	32155.34	4925.31	5.43	0.83±0.09 <sup>a</sup>
6	33041.56	5242.80	5.43	0.86±0.05 <sup>ab</sup>
7	33165.54	4928.03	5.43	0.80±0.12 <sup>a</sup>
8	33147.85	4991.40	5.43	0.81±0.09 <sup>a</sup>

pg: picogramos de ADN;\* *Zea mays* L. 'CE-777' Lysak y Doležel (1998); mismas letras corresponden a tratamientos estadísticamente iguales con un  $p < 0.05$

La diferencia estadística significativa encontrada puede deberse a la descondensación y condensación rápida y activa del ADN (Belmont, 2003), lo que podría implicar que en algunas poblaciones nucleares se adhieran con más facilidad el yoduro de propidio. Además, el estándar utilizado para la medición fue *Zea mays* L. "CE-777", que difiere del estándar *Raphanus sativus* "Saxa" utilizado por Carvalho *et al.* (2008) en la estimación del contenido de ADN nuclear de *J. curcas*.

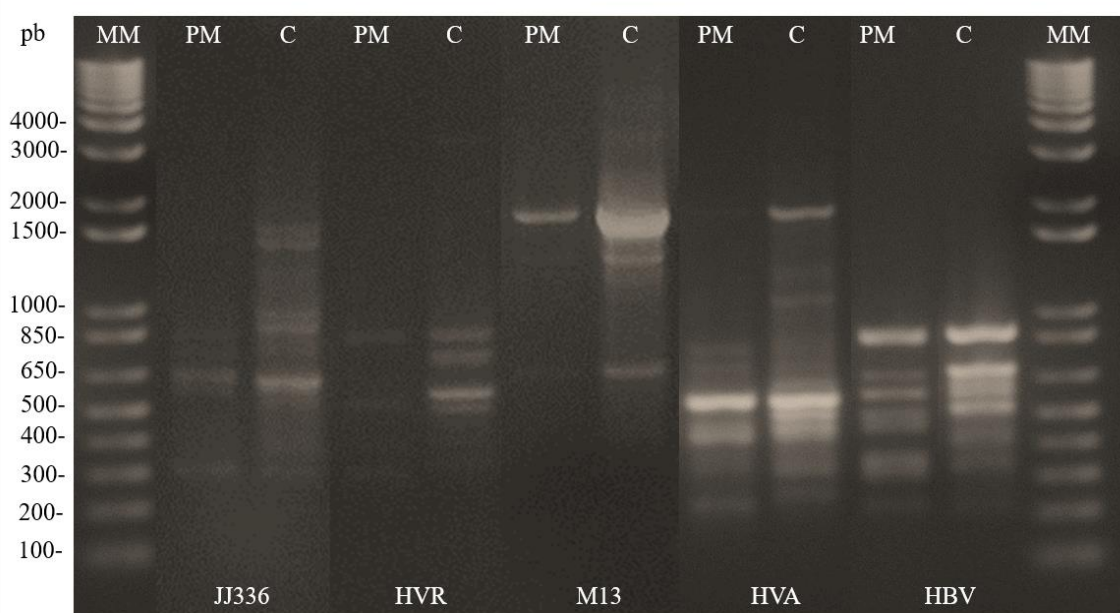
Para la multiplicación de genotipos de elites de *J. curcas* en una escala más grande, es importante evaluar la estabilidad genética de los materiales micropropagados y demostrar los sistemas de regeneración, como lo demuestran Rathore *et al.* (2014) quienes evaluaron los genotipos de *J. curcas* a partir de tejidos regenerados *in vitro*, además, se descubrió que la detección del nivel de ploidía del ADN por citometría de flujo es una estrategia práctica y rápida para la selección de plántulas diploides, mixoploides y tetraploides inducidas en *J. curcas* (de Oliveira *et al.*, 2013). Además, la organogénesis indirecta se asocia con niveles más altos de

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

inestabilidad genética. Soares *et al.* (2016) informaron variaciones en la estabilidad genética en tres generaciones de *J. curcas* subcultivadas por organogénesis indirecta, lo que sugeriría que esta variación aumenta con cada resiembra sucesiva.

### 9.7. Detección de polimorfismos genético con marcadores DAMD

Los 5 iniciadores DAMD utilizados para evaluar la estabilidad genética tanto de la planta madre como en las plántulas micropropagadas mostraron la presencia de bandas con adecuada resolución como se puede observar en la Figura 18. El iniciador que presentó mayor número de bandas fue el HVA (S7-S8). Todos los iniciadores utilizados amplificaron desde 200 a 2000 pb aproximadamente, en el caso del iniciador HVA los fragmentos amplificados fueron desde los 200 a 850 pb para planta madre y de 200 a 2000 pb para la clona.



**Figura 18.** Bandas detectadas en electroforesis de *J. curcas* con 5 iniciadores DAMD (JJ336, HVR, M13, HVA y HBV). MM: marcador molecular de 1 Kb, PM: planta madre *in vivo*, C: plántula clona *in vitro*.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El iniciador HVA generó el mayor número de bandas (11 bandas), sin embargo, presentó solo 54.5% de polimorfismo. El iniciador HVR, fue el que resultó más efectivo para su uso en estudios de homogeneidad genética en los materiales micropropagados ya que permitió detectar un 87.5 % de polimorfismo genético (Cuadro 20).

**Cuadro 20.** Porcentaje de bandas polimórficas generadas con cinco iniciadores DAMD utilizados para amplificación por PCR.

Iniciador DAMD	Secuencia (5'-3')	Bandas generadas	Bandas polimórficas	% de bandas polimórficas
JJ336	GAGGGTGGCGGTTCT	8	6	75.0
HVR	CCTCCTCCCTCCT	8	7	87.5
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	5	3	60.0
HVA	AGGATGGAAAGGAGGC	11	6	54.5
HBV	GGTGTAGAGAGGGGT	8	6	75.0

Rathore *et al.* (2014), señalaron que es posible mantener la fidelidad genética en materiales de *J. curcas* cultivados *in vitro* hasta por 20 generaciones. Sin embargo, Sharma *et al.* (2011), detectaron polimorfismo a partir de la segunda generación en plántulas *in vitro* de *Jatropha curcas*. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de polimorfismo genético en las plántula de *J. curcas* provenientes de ocho resiembras *in vitro* con todos los iniciadores analizados, esto era de esperar considerando que *J. curcas* es un cultivo que aún se encuentra en proceso de domesticación y por ende presenta una gran variabilidad genética, por lo tanto el protocolo indicado el presente documento presenta variación somaclonal hasta la octava resiembra *in vitro*.

Una de las variantes a considerar en un protocolo de micropropagación, es el genotipo como lo mencionan Sharma *et al.* (2011), Éstos autores detectaron la presencia de polimorfismo genético en dos de tres variedades de *J. curcas* que fueron cultivadas *in vitro*. Larkin y Scowcroft (1981), mencionan que ésta variación puede deberse a las constantes resiembras o a los factores intrínsecos tan estresantes que genera el cultivo *in vitro*. Por otro lado, se puede considerar que el programa de micropropagación presentado es organogénesis indirecta, lo cual, al someter las células a una desdiferenciación y posterior diferenciación, podría causar ésta variación que va desde cambios a nivel cromosómico, transposición, amplificación o cambios en secuencias de

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

---

ADN (Neelakandan y Wang, 2012). El reordenamiento de cromosomas durante el cultivo celular ha sido bien documentado en plantas y animales (Hsu, 1962; Harris, 1971). Lee y Phillips (1988) mencionan que cualquier perturbación que afecte a la sincronía entre la replicación de cromosomas durante la fase de síntesis y la división celular sería probable resultado en aberraciones cromosómicas, éstas aberraciones pueden deberse a que las regiones heterocromáticas suelen replicarse más tarde que los segmentos eucromáticos (Allshire y Madhani, 2018), por lo que la integridad de la cromatina puede ser particularmente vulnerable a las fluctuaciones en el ciclo (Vanrobays *et al.*, 2018).

Cambios genéticos fueron observados en las clonas obtenidas por organogénesis *in vitro* utilizando el protocolo establecido para la micropropagación de *J. curcas* ALJC01, lo que indica que el protocolo obtenido presenta variación somaclonal. Mientras que en la mayoría de los informes se ha encontrado que la variación genética ocurre en frecuencias relativamente modestas, la variación en los patrones de metilación del ADN parece ser mucho más frecuente y en algunos casos se ha relacionado directamente con la variación fenotípica (Miguel y Marum, 2011)

Larkin *et al.* (1984) mencionan que las tasas de variación somaclonal *in vitro* ocurre de 1 en 100,000 a 1,000,000 para un locus dado, por otro lado, Evans (1988) reportó la frecuencia de un mutante en cada 20 a 25 plántulas regeneradas. Orton (1987) reportó que el 100% líneas aisladas *in vitro* de apio (*Apium graveolens*) presentaron variación somaclonal. Aunque las tasas de VS parecen altas, usualmente es un fenómeno aleatorio que puede ocurrir en cualquier ubicación en el genoma y estos cambios al azar se agrupan para llegar a las tasas de VS total.

A pesar de haber detectado VS en las clonas de *J. curcas*, para el presente trabajo, habría que realizar estudios cuantitativos para conocer el porcentaje de variación obtenido, ya que pudiese ser no significativo en un programa de multiplicación masiva, por otro lado, en especies alógamas como esta en la que hay un poco de variación, contribuiría a que no haya depresión consanguínea y presente adecuada plasticidad para enfrentarse a factores bióticos y abióticos estresantes.

## CONCLUSIONES

---

---

### 10. CONCLUSIONES

Las células de los explantes de hoja, mostraron totipotencia celular, lo cual, permitió establecer el proceso de morfogénesis por la vía de la organogénesis indirecta en *J. curcas* variedad ALJC01. Para el protocolo de micropropagación desarrollado, se obtuvo hasta el 100% de cultivos asépticos a partir de embriones. Las mejores condiciones para la inducción de brotes fue en un medio MS (75%) mas 110.25  $\mu\text{M}$  de 2ip, 1.27  $\mu\text{M}$  de AIA, 369.21  $\mu\text{M}$  de SAd, 22.5 % (w/v) de sacarosa y 0.2% (w/v) de Gelrite®, obteniendo hasta 18.50 $\pm$ 1.34 brotes promedio. La elongación de los brotes fue obtenida a los 45 días de cultivo en un medio MS (100%) mas 4.44  $\mu\text{M}$  de BAP, 1.0  $\mu\text{M}$  de AIA, 543  $\mu\text{M}$  de SAd, 30 % (w/v) de sacarosa y 0.2% (w/v) de Gelrite® con un promedio de crecimiento de 1.67 $\pm$ 0.76 cm. Las mejores condiciones para la organogénesis de raíces fue en un medio MS (25%) mas 20.7  $\mu\text{M}$  de AIB con 13.6 $\pm$ 15.0 raíces promedio y 1.90 $\pm$ 0.81 cm de longitud. En la etapa de aclimatación se logró obtener el 90 % de plántulas aclimatadas a los 90 días de cultivo.

En el análisis del diseño central compuesto se observó el efecto de la doble interacción de los reguladores de crecimiento vegetal 2ip más AIA para la inducción de número de brotes. El tipo de superficie modelada para el diseño analizado fue de punto máximo. El número de brotes máximo obtenido fue 21 en promedio, lo cual indica que es el número máximo que se puede obtener al utilizar el protocolo de inducción de brotes adventicios. La validación mostró un 10.95% de error al aplicar el modelo de segundo orden generado. El modelo de segundo orden obtenido  $Y = -173.726 + 0.252628X_1 + 274.831X_2 + 0.08X_1X_2 - 0.00216001X_1^2 - 105.001X_2^2$  en la optimización por metodología de superficie de respuesta (MSR) de brotes adventicios de *J. curcas*, podría ser utilizado para predecir el efecto de los reguladores de crecimiento vegetal 2ip y AIA en la respuesta morfogénica.

El promedio para el contenido de ADN nuclear estimado para planta madre de *J. curcas* fue 0.89 $\pm$ 0.028 pg. En cuanto al contenido de ADN nuclear estimado para cada una de las resiembras el contenido varió desde 0.80 $\pm$ 0.12 hasta 1.07 $\pm$ 0.23 pg de ADN. El contenido de ADN estimado se mantuvo estable durante todo el tiempo de cultivo a pesar de encontrar

## **CONCLUSIONES**

---

---

diferencias estadísticas significativas, ésta variación pudo deberse a factores no controlados en el proceso para la estimación.

Los iniciadores DAMD (JJ336, HVR, M13, HVA, HBV) utilizados para evaluar la estabilidad genética tanto de la planta madre como en las plántulas micropropagadas mostraron la presencia de bandas con adecuada resolución, los cuales permitieron realizar un adecuado análisis de polimorfismo. El iniciador HVR, fue el que resultó más efectivo para su uso en estudios de homogeneidad genética en los materiales micropropagados ya que permitió detectar un 87.5 % de polimorfismo genético.

### 11. PERSPECTIVAS/RECOMENDACIONES

La obtención de un protocolo de micropropagación por la vía organogénesis indirecta de *J. curcas* para la variedad ALJC01 es la primera etapa para realizar trabajos futuros de mejoramiento genético *in vitro* en ésta especie.

A pesar de haber obtenido un protocolo eficiente de micropropagación y haber optimizado la inducción de brotes adventicios en la etapa de multiplicación, no se cuenta aún con un sistema redituable de este proceso ya que los costos son elevados con respecto a las ganancias que de ello se deriva. Por lo tanto se recomienda a futuro el empleo de la micropropagación en sistemas de inmersión temporal para incrementar la eficiencia del protocolo en cuanto a la obtención de un mayor número de brotes en menor tiempo, disminución de los costos y del espacio durante este proceso.

La citometría de flujo es una técnica que puede ser utilizada para la medición del contenido de ADN nuclear de manera rápida y eficiente con bajo coeficiente de variación, sin embargo, para detección de cambios genéticos puntuales como cambios en secuencias génicas o cambios en bases es necesario el uso de técnicas moleculares que permitan asegurar la homogeneidad genética del material genético micropropagado.

*J. curcas* aún sigue siendo un cultivo prometedor en vías de desarrollo y mejoramiento genético con potencial bioenergético, el material vegetal del presente trabajo se encuentra en el banco de germoplasma del CIATEJ subsección sureste, el cual puede ser utilizado para investigaciones posteriores.

Los polimorfismos detectados pueden generar ventajas en las clonas obtenidas, ya que éstos pudiesen ser adaptaciones morfogenéticas con características agronómicas deseables. Sin embargo, evaluaciones más detalladas a futuro podrían asegurar la ventaja o desventaja de los cambios generados *in vitro*.

## REFERENCIAS

---

---

### 12. REFERENCIAS

- Achten, W. M., Verchot, L., Franken, Y. J., Mathijs, E., Singh, V. P., Aerts, R., y Muys, B. (2008). *Jatropha* bio-diesel production and use. *Biomass and bioenergy*, 32(12):1063-1084. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.03.003>
- Adler, N. E., Schmitt, J. M., y Altenburger, R. (2007). Flow cytometry as a tool to study phytotoxic modes of action. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(2), 297-306. <https://doi.org/10.1897/06-1636R.1>
- Ahmed, M. R., Anis, M., Alatar, A. A., y Faisal, M. (2017). *In vitro* clonal propagation and evaluation of genetic fidelity using RAPD and ISSR marker in micropropagated plants of *Cassia alata* L.: a potential medicinal plant. *Agroforestry Systems*, 91(4):637-647. <https://doi.org/10.1007/s10457-016-9992-1>
- Aguilera-Cauich, E. A. (2015). Evaluación de *Jatropha curcas* para la selección de genotipos con potencial para la producción de biodiesel en Yucatán (Tesis de grado). Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México. <https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/1276>
- Ali, S., Afzal, A., y Usman, M. (2015). Micropropagation of *Jatropha curcas* L. *International Journal of Biology and Biotechnology*, 12(1), 29-38.
- Alipour, A., Tsuchimoto, S., y Fukui, K. (2017). Molecular Markers in *Jatropha*: Current Status and Future Possibilities. In *The Jatropha Genome*. Springer, Cham. pp. 61-79. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-49653-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-49653-5_4)
- Al-Khayri, J. M. (2010). Somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) improved by coconut water. *Biotechnology*, 9:477-484.
- Allshire, R. C., y Madhani, H. D. (2018). Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 229-244.
- Altınordu, F., Peruzzi, L., Yu, Y., y He, X. (2016). A tool for the analysis of chromosomes: KaryoType. *Taxon*, 65(3):586-592. <http://dx.doi.org/10.12705/653>
- Amirmoradi, B., Talebi, R., y Karami, E. (2012). Comparison of genetic variation and differentiation among annual *Cicer* species using start codon targeted (SCoT) polymorphism, DAMD-PCR, and ISSR markers. *Plant systematics and evolution*, 298(9):1679-1688. <https://doi.org/10.1007/s00606-012-0669-6>

## REFERENCIAS

---

---

- Anon (2016). Available at: [https://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=1104a\\_tecnica\\_citometra](https://biotechspain.com/es/tecnica.cfm?iid=1104a_tecnica_citometra) [Accessed 27 Jul. 2016].
- Atry, C., y Banga, S. S. (2016). A protocol for flow cytometric determination of expected chromosome number of *Brassica juncea* L. introgression lines. *Journal of Oilseed Brassica*, 1(2):170-174.
- Backeljau, T., De Brun, L., De Wolf, H., Jordaens, K., Dongen, S., Verhagen, R. y Winnepeninckx, B. (1995). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. *Cladistics*, 11:119-130. [https://doi.org/10.1016/0748-3007\(95\)90009-8](https://doi.org/10.1016/0748-3007(95)90009-8)
- Bahadur, B., Sujatha, M., y Carels, N. (2012). *Jatropha*, Challenges for a New Energy Crop: Volume 2: Genetic Improvement and Biotechnology (Vol. 2). *Springer Science and Business Media*, pp. 187-218.
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., y Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63(2):147-173. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9554-x>
- Bajaj, Y. P. S. (1990). Somaclonal variation—origin, induction, cryopreservation, and implications in plant breeding. In *Somaclonal Variation in Crop Improvement I* (pp. 3-48). *Springer Berlin Heidelberg*. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-02636-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-02636-6_1)
- Baker, C. M., y Wetzstein, H. Y. (1994). Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 36(3):361-368. <https://doi.org/10.1007/BF00046094>
- Barnett, D., Louzao, R., Gambell, P., De, J., Oldaker, T., y Hanson, C. A. (2013). Validation of cell-based fluorescence assays: Practice guidelines from the ICSH and ICCS—part IV—postanalytic considerations. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 84(5):309-314.
- Barrera, R. L., Drago, S. M., Pérez, R. J., Sainz, E. T., Zamora, A. C., Gómez, A. F. y Mendoza, P. F. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1):42-55.
- Bebeli, P. J., Zhou, Z., Somers, D. J., y Gustafson, J. P. (1997). PCR primed with minisatellite core sequences yields DNA fingerprinting probes in wheat. *Theoretical and applied genetics*, 95(1):276-283. <https://doi.org/10.1007/s001220050560>

## REFERENCIAS

---

---

- Beder, S. (2006). Environmental principles and policies: an interdisciplinary introduction. *Earthscan*. Reino Unido. <https://doi.org/10.4324/9781315065908>
- Belmont, A. (2003). Dynamics of chromatin, proteins and bodies within the cell nucleus. *Current Opinion in Cell Biology*, 15:304-310. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00045-0](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00045-0)
- Bennett, M. D., Bhandol, P., y Leitch, I. J. (2000). Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses—807 new estimates. *Annals of botany*, 86(4):859-909. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1253>
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., y Escalera, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5):965-977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Bhatia, R., Singh, K. P., Sharma, T. R., y Jhang, T. (2011). Evaluation of the genetic fidelity of *in vitro*-propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(1):131-135. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9806-5>
- Bhattacharya, E., Ranade, S.A. (2001). Molecular distinction amongst varieties of mulberry using RAPD and DAMD profiles. *BMC Plant Biol*, 1:3. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-1-3>
- Bister, M. F., Guignard, J.L., y Agier, C., (1985). Glutamine as an active component of casein hydrolysate: it's balancing effect on plant cells cultured in phosphorus deficient medium. *Plant Cell Reports*, 4:161-163. <https://doi.org/10.1007/BF00571307>
- Biswas, P. K., Pohit, S. y Kumar, R. (2010). Biodiesel from *Jatropha*: can India meet the 20% blending target?. *Energy Policy*, 38:1477-1484. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2009.11.029>
- Bose, S., Karmakar, J., Fulzele, D. P., Basu, U., y Bandyopadhyay, T. K. (2017). *In vitro* shoots from root explant, their encapsulation, storage, plant recovery and genetic fidelity assessment of *Limonium* hybrid 'Misty Blue': a florist plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 129(2):313-324. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1179-6>
- Bridge, P. D., Pearce, D. A., Rivera, A., y Rutherford, M. A. (1997). VNTR derived oligonucleotides as PCR primers for population studies in filamentous fungi. *Letters in*



## REFERENCIAS

---

---

- Applied Microbiology*, 24(5):426-430. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00060.x>
- Carels, N. (2013). Towards the domestication of *Jatropha*: the integration of sciences. In *Jatropha*, Challenges for a New Energy Crop. Springer New York. pp. 263-299. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4915-7\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4915-7_14)
- Carvalho, C. R., Clarindo, W. R., Praça, M. M., Araújo, F. S., y Carels, N. (2008). Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. *Plant Science*, 174(6):613-617. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.03.010>
- Clarindo, W. R., Carvalho, C. R., y Mendonça, M. A. C. (2012). Ploidy instability in long-term *in vitro* cultures of *Coffea arabica* L. monitored by flow cytometry. *Plant growth regulation*, 68(3):533-538. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9325-1>
- Coenen, C., y Lomax, T. L. (1997). Auxin—cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in plant science*, 2(9):351-356. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)84623-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)84623-7)
- Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Zhao, H., Halicka, H. D., y Li, J. (2011). Cytometry of DNA replication and RNA synthesis: Historical perspective and recent advances based on “click chemistry”. *Cytometry Part A*, 79(5):328-337. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21048>
- Dahab, A. A., Amin, A., Ibrahim, Y. V. R., y Safwat, G. (2016). Genetic variability of somaclonal variation in micropropagated *Jatropha curcas* L. In *IX International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding*, 1187:243-250. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1187.24>
- Datta, M. M., Mukherjee, P., Ghosh, B., y Jha, T. B. (2007). *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). *Current Science-Bangalore-*, 93(10):1438.
- Daud, N., Faizal, A., y Geelen, D. (2013). Adventitious rooting of *Jatropha curcas* L. is stimulated by phloroglucinol and by red LED light. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 49(2):183-190. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9486-4>
- Davies, P. J. (2010). The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In *Plant hormones* (pp. 1-15). Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2686-7_1)

## REFERENCIAS

---

---

- Davis, K. A., y Bishop, J. E. (1997). *U.S. Patent No. 5,620,842*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Davis, S. C., Samkoe, K. S., Tichauer, K. M., Sexton, K. J., Gunn, J. R., Deharvengt, S. J., y Pogue, B. W. (2013). Dynamic dual-tracer MRI-guided fluorescence tomography to quantify receptor density *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22):9025-9030. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213490110>
- De Klerk, G. J. (2002). Rooting of microcuttings: theory and practice. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 38(5):415-422. <https://doi.org/10.1079/IVP2002335>
- de Oliveira, S.C., Nunes, A.C.P., Carvalho, C.R., Clarindo, W.R. (2013). *In vitro* polyploidization from shoot tips of *Jatropha curcas* L.: a biodiesel plant. *Plant Growth Regulators*. 69:79-86. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9749-4>
- De Rosa, S. C., Herzenberg, L. A., Herzenberg, L. A., y Roederer, M. (2001). 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nature medicine*, 7(2):245-248.
- Degheidy, H., Abbasi, F., Mostowski, H., Gaigalas, A. K., Marti, G., Bauer, S., y Wang, L. (2015). Consistent, multi-instrument single tube quantification of CD20 in antibody bound per cell based on CD4 reference. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21253>
- Deore, A. C., y Johnson, T. S. (2008). High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports*, 2(1):7-11. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0042-y>
- Dewir, Y. H., Murthy, H. N., Ammar, M. H., Alghamdi, S. S., Al-Suhaibani, N. A., Alsadon, A. A., y Paek, K. Y. (2016). *In vitro* rooting of leguminous plants: difficulties, alternatives, and strategies for improvement. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 57(4):311-322. <https://doi.org/10.1007/s13580-016-0060-6>
- Dias, L. D. S., Missio, R. F., y Dias, D. C. (2012). Antiquity, botany, origin and domestication of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), a plant species with potential for biodiesel production. *Genetics and Molecular Research*, 11(3):2719-2728. <http://dx.doi.org/10.4238/2012.June.25.6>

## REFERENCIAS

---

---

- Divakara, B. N., Upadhyaya, H. D., Wani, S. P., y Gowda, C. L. (2010). Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: a review. *Applied Energy*, 87(3):732-742. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.07.013>
- Doležel, J. (1997). Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of applied Genetics*, 3(38):285-302.
- Doležel, J., y Bartoš, J. A. N. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95(1):99-110. <https://doi.org/10.1093/aob/mci005>
- Doležel, J., y Göhde, W. (1995). Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flowcytometry. *Cytometry*, 19:103–106. <https://doi.org/10.1002/cyto.990190203>
- Doležel, J., Bartoš, J., Voglmayr, H., y Greilhuber, J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 51(2):127. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.10013>
- Doležel, J., Binarová, P., y Lucretti, S. (1989). Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum*, 31(2):113-120. <https://doi.org/10.1007/BF02907241>
- Doležel, J., Doleželová, M., y Novák, F. J. (1994). Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum*, 36(3):351-357. <https://doi.org/10.1007/BF02920930>
- Doležel, J., Greilhuber, J., y Suda, J. (2007). Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes. *John Wiley and Sons*. <https://doi.org/10.1002/9783527610921.ch3>
- Doležel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M. A., Nardi, L., y Obermayer, R. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, 82(1):17-26. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a010312>
- Doležel, J., Sgorbati, S., y Lucretti, S. (1992). Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia plantarum*, 85(4):625-631. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04764.x>
- Edrisi, S. A., Dubey, R. K., Tripathi, V., Bakshi M., Shrivastava, P., Jamil, S., Singh, H. B., y Abhilash, P. C. (2015). *Jatropha curcas* L.: a crucified plant waiting for resurgence. *Renew. Sustain. Energy Rev*, 41:855-862. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.082>

## REFERENCIAS

---

---

- Errante, P. R., Ebbing, P. C. C., Rodrigues, F. S. M., Ferraz, R. R. N., y da Silva, N. P. (2016). Flow cytometry: a literature review. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 14(2):221-224.
- Evans, D. A., & Sharp, W. R. (1986). Applications of somaclonal variation. *Bio/technology*, 4(6), 528.
- Ezhova, T. A. (2003). Genetic control of totipotency of plant cells in an *in vitro* culture. *Russian Journal of Developmental Biology*, 34(4):197-204. <https://doi.org/10.1023/A:1023/A:102>
- Fairless, D. (2007). Biofuel: the little shrub that could-maybe. *Nature News*, 449(7163):652-655. <https://doi.org/10.1038/449652a>
- Faisal, M., Alatar, A. A., Hegazy, A. K., Alharbi, S. A., El-Sheikh, M., y Okla, M. K. (2014). Thidiazuron induced *in vitro* multiplication of *Mentha arvensis* and evaluation of genetic stability by flow cytometry and molecular markers. *Industrial Crops and Products*, 62:100-106.4940130511. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.019>
- Font, F. (2003). Las especies del género *Jatropha* L (*Euphorbiacea*, *Crotonoideae*) en Argentina. *Revista del Círculo de Coleccionistas de Cactus y Crasas de la República Argentina*, 2(1):4-20.
- Franco, M. C., Marques, D. D. A., Siqueira, W. J., y Latado, R. R. (2014). Micropropagation of *Jatropha curcas* superior genotypes and evaluation of clonal fidelity by target region amplification polymorphism (TRAP) molecular marker and flow cytometry. *African Journal of Biotechnology*, 13(38):3872-3880. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2014.13649>
- Galbraith, D. W., Bartoš, J., y Doležel, J. (2005). Flow cytometry and cell sorting in plant biotechnology. Flow cytometry in biotechnology. *Oxford Univ. Press*, New York, NY, pp.291-322.
- Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P., y Firoozabady, E. (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220(4601):1049-1051. <http://dx.doi.org/1049-1051>. 10.1126/science.220.4601.1049
- Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A., y Vasil, I. K. (1976). Plant tissue culture media. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 12(7):473-478. <https://doi.org/10.1007/BF02796489>

## REFERENCIAS

---

---

- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., y Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 32(4):272-289. <https://doi.org/10.1007/BF02822700>
- Geiss, G., Gutierrez, L., y Bellini, C. (2018). Adventitious root formation: new insights and perspectives. *Annual Plant Reviews online*, 127-156. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0400>
- George, E. F., Hall, M. A., y De Klerk, G. J. (2007). Plant propagation by tissue culture: volume 1. the background (Vol. 1). Netherlands, Holanda. *Springer Science & Business Media*. pp. 175-281.
- George, E. F., Hall, M. A., y De Klerk, G. J. (2008a). The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems. In *Plant Propagation by Tissue Culture*, Netherlands, Holanda. *Springer & Business Media*, pp. 115-117.
- George, E. F., Hall, M. A., y De Klerk, G. J. (2008b). Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In *Plant propagation by tissue culture*, Netherlands Holanda. *Springer & Business Media*. pp. 205-226.
- Gómez, M. E. O., Oliver, S. C., Durán, F. N., Badillo, C. J. A., y Salas, C. E. (2015). Optimization of direct shoot regeneration using cotyledonary explants and true leaves from lettuce cv. Romaine (*Lactuca sativa* L.) by surface response methodology. *Plant Growth Regulation*, 77(3):327-334. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0067-5>
- Grover, V. (2008). *Global Warming and Climate Change: Ten years after Kyoto and still counting*. Vol 1. Science Publishers. United Nations University. Ontario, Canada.
- Ha, W.Y., Shaw, P.C., Liu, J., Yau, F.C.F., y Wang, J. (2002). Authentication of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* using amplified fragment length polymorphism (AFLP) and directed amplification of minisatellite region DNA (DAMD). *J Agr Food Chem*, 50:1871-1875. <https://doi.org/10.1021/jf0113651>
- Harris, M. (1971). Mutation rates in cells at different ploidy levels. *Journal of cellular physiology*, 78(2):177-184. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040780204>
- He, Y., Xu, Y., Pang, Y., Tian, H. y Wu, R. (2016). A regulatory policy to promote renewable energy consumption in China: review and future evolutionary path. *Renewable Energy*, 89:695-705. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.12.047>

## REFERENCIAS

---

---

- Heath, D.D., Iwama, G.K., y Devlin, R.H. (1993). PCR primed with VNTR core sequence yields species specific patterns and hypervariable probes. *Nucl Acids Res*, 21:5782-5785. <https://doi.org/10.1093/nar/21.24.5782>
- Ho, W.S., Wickneswari, R., Mahani, M.C., y Shukor, M.N. (2006). Comparative genetic diversity studies of *Shorea curtisii* (Dipterocarpaceae): an assessment using SSR and DAMD markers. *J Trop Forest Sci*, 18:22-35. <https://www.jstor.org/stable/43594643>
- Hsu, T. C. (1962). Chromosomal evolution in cell populations. *In International review of cytology*, 12:69-161. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60539-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60539-2)
- Humberto, G. P., y de la Vara, S. R. (2008). Análisis y diseño de experimentos. México, D.F. Mc Graw Hill. pp. 384-420.
- Husain, M. K., Anis, M., y Shahzad, A. (2006). *In vitro* control of shoot tip necrosis (STN) in *Pterocarpus marsupium* Roxb.—a leguminous tree. *Physiol and Molecular Biol of Plants*, 12, 259–301.
- Ince, A. G., Karaca, M., y Onus, A. N. (2009). Development and utilization of diagnostic DAMD-PCR markers for *Capsicum* accessions. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(2):211-221. <https://doi.org/10.1007/s10722-008-9356-4>
- Ibáñez, P. R., Bergquist, P. L., Walter, M. R., Gibbs, M., Goldys, E. M., y Ferrari, B. (2008). Potential use of quantum dots in flow cytometry. *International journal of molecular sciences*, 9(12):2622-2638. <https://doi.org/10.3390/ijms9122622>
- Johnson, D. L., y Albert, L. S. (1967). Effect of selected nitrogen-bases and boron on the ribonucleic acid content, elongation, and visible deficiency symptoms of tomato root tips. *Plant physiology*, 42(9):1307-1309.
- Kaewpoo, M., y Te-Chato, S. (2010). Study on ploidy level of micropropagated *Jatropha curcas* L. via flow cytometry. *J Agri Tech*, 6:391-400.
- Kalina, T., Flores, M. J., Van Der Velden, V. H. J., Martin, A. M., Böttcher, S., Ritgen, M., y de Tute, R. (2012). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, 26(9):1986-2010. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.122>
- Kapoor, V., Karpov, V., Linton, C., Subach, F. V., Verkhusha, V. V., y Telford, W. G. (2008). Solid state yellow and orange lasers for flow cytometry. *Cytometry Part A*, 73(6):570-577. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20563>

## REFERENCIAS

---

---

- Karaca, M., Ince, A.G. (2008). Minisatellites as DNA markers to classify Bermuda grasses (*Cynodon* spp.), confirmation of minisatellite in amplified products. *J Genet*, 87:83-86.
- Khan, M. K., Misra, P., Sharma, T., Shukla, P. K., y Ramteke, P. W. (2014). Effect of adenine sulphate on *in vitro* mass propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(13):543-549. <https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5217>
- Kumar, N., Anand, K. V., y Reddy, M. P. (2010). Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodiesel plant. *Acta physiologiae plantarum*, 32(5):917-924. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0479-9>
- Kumar, N., y Reddy, M. P. (2010). Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant. *Annals of Applied Biology*, 156(3):367-375. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00394.x>
- Kumar, S., Kumar, V., Sharma, M. K., Kumar, N., Kumar, A., Tomar, K. P. S., Sharma, K. S., Singh, M. K., Sengar, R. S. y Jaiswal, N. (2015). Effects of different plant growth regulators on *in vitro* callus induction in physic nut (*Jatropha curcas* L.). *Journal of Applied and Natural Science*, 7(1):30-37. <https://doi.org/10.31018/jans.v7i1.559>
- Larkin, P. J., y Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and applied Genetics*, 60(4):197-214. <https://doi.org/10.1007/BF02342540>
- Larkin, P. J., Ryan, S. A., Brettell, R. I. S., & Scowcroft, W. R. (1984). Heritable somaclonal variation in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 67(5):443-455. <https://doi.org/10.1007/BF00263410>
- Leal, F., Loureiro, J., Rodríguez, E., Pais, M. S., Santos, C., y Pinto, C. O. (2006). Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture. *Plant cell reports*, 25(9):978-985. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0162-1>
- Lee, M., y Phillips, R. L. (1988). The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39(1):413-437.
- Leifert, C., Murphy, K. P., y Lumsden, P. J. (1995). Mineral and carbohydrate nutrition of plant cell and tissue cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(2):83-109. <https://doi.org/10.1080/07352689509701923>

## REFERENCIAS

---

---

- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., y Mroginski, L. (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Buenos Aires, Argentina. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*. pp. 15-17.
- Li, C., Ng, A., Xie, L., Mao, H., Qiu, C., Srinivasan, R., y Hong, Y. (2016). Engineering low phorbol ester *Jatropha curcas* seed by intercepting casbene biosynthesis. *Plant cell reports*, 35(1):103-114. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1871-0>
- Liu, Y., Lu, J., Zhu, H., Li, L., Shi, Y., y Yin, X. (2016). Efficient culture protocol for plant regeneration from cotyledonary petiole explants of *Jatropha curcas* L. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 30(5):907-914. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1199971>
- Liu, Y., Tong, X., Hui, W., Liu, T., Chen, X., Li, J., y Liu, Z. (2015). Efficient culture protocol for plant regeneration from petiole explants of physiologically mature trees of *Jatropha curcas* L. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29(3):479-488. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1013308>
- Loberant, B., y Altman, A. (2009). Micropropagation of plants. *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation and cell technology*, 1-17.
- Loureiro, J., Rodríguez, E., Doležel, J., y Santos, C. (2006). Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Annals of Botany*, 98(3):679-689. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl141>
- Lumba, S., Cutler, S., y McCourt, P. (2010). Plant nuclear hormone receptors: a role for small molecules in protein-protein interactions. *Annual review of cell and developmental biology*, 26:445-469. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-103956>
- Lysak, M. A., y Doležel, J. (1998). Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). *Caryologia*, 51(2):123-132. <https://doi.org/10.1080/00087114.1998.10589127>
- Maathuis, F. J. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Current opinion in plant biology*, 12(3):250-258. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.04.003>
- Maharana, S. B., Mahato, V., Behera, M., Mishra, R. R., y Panigrahi, J. (2012). *In vitro* regeneration from node and leaf explants of *Jatropha curcas* L. and evaluation of genetic fidelity through RAPD markers. *Indian Journal of Biotechnology*, 11(3):280-287. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/14567>



## REFERENCIAS

---

---

- Martin, M., y Montes, J. M. (2015). Quantitative genetic parameters of agronomic and quality traits in a global germplasm collection reveal excellent breeding perspectives for *Jatropha curcas* L. *Gcb Bioenergy*, 7(6):1335-1343. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12227>
- Martínez, J. (2008). El Piñón, una planta nativa de México con potencial alimentario y agroindustrial. Disponible en: <http://hypatia.morelos.gob.mx/No12/pinon.html>. Consulta: julio 2016.
- Masera, O., Coralli, F., García, C., Riegelhaupt, E., Arias, T., Vega, J., y Cecotti, L. (2011). La bioenergía en México. Situación actual y perspectivas. Red Mexicana de Bioenergía, AC, México, pp. 7-8.
- McGaw, B. A., Heald, J. K., Horgan, R., 1984. Dihydrozeatin metabolism in radish seedlings. *Phytochemistry*, 23:1373-1377. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80468-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80468-9)
- Miguel, C., y Marum, L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *Journal of experimental botany*, 62(11):3713-3725. <https://doi.org/10.1093/jxb/err155>
- Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., y Strong, F. M. (1955). Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 77(5):1392-1392. <https://doi.org/10.1021/ja01610a105>
- Mitchell J., Beck, P., y Grubb, M., (1996). The New Geopilitcs of Energy. Inglaterra, Reino Unido. *The royal institute of international affairs*. 214 pag.
- Moharana, A., Das, A., Subudhi, E., Naik, S. K., y Barik, D. P. (2018). Assessment of genetic fidelity using random amplified polymorphic DNA and inter simple sequence repeats markers of *Lawsonia inermis* L. plants regenerated by axillary shoot proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(1):133-141. <https://doi.org/10.1007/s40011-016-0740-0>
- Moniruzzaman, M., Yaakob, Z., y Khatun, R. (2016). Biotechnology for *Jatropha* improvement: A worthy exploration. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, 1262-1277. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.074>
- Montes, J. M., Technow, F., Bohlinger, B., y Becker, K. (2013). Seed quality diversity, trait associations and grouping of accessions in *Jatropha curcas* L. *Industrial crops and products*, 51:178-185. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.046>

## REFERENCIAS

---

---

- Montes, J., Technow, F., Martin, M., y Becker, K. (2014). Genetic diversity in *Jatropha curcas* L. assessed with SSR and SNP markers. *Diversity*, 6(3):551-566. <https://doi.org/10.3390/d6030551>
- Munetaka, S. (1999). Organogénesis *in vitro*. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(1):61-64.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual review of plant physiology*, 25(1):135-166.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3):473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Murty, S.G., Patel, F., Punwar, B.S., Patel, M., Singh, A.S., Fougat, R.S. (2013). Comparison of RAPD, ISSR, and DAMD markers for genetic diversity assessment between accessions of *Jatropha curcas* L. and its related species. *J Agric Sci Technol*, 15:1007–1022.
- Navarro, P. F. S., Baz, R. S. A., Handler, R. y Sacramento, R. J. (2016). Advances on the processing of *Jatropha curcas* towards a whole-crop biorefinery. *Renewable and sustainable Energy Reviews*, 54:247-269. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.009>
- Naveenchandra, P. M., Bhattacharya, S., y Ravishankar, G. A. (2011). Culture media optimization through response surface methodology for *in vitro* shoot bud development of *Solanum melongena* L. for micropropagation. *Int J Bioautom*, 15(3):159-172.
- Neelakandan, A. K., y Wang, K. (2012). Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant cell reports*, 31(4):597-620. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1202-z>
- Nietsche, S., Vendrame, W. A., Crane, J. H., y Pereira, M. C. (2014). Assessment of reproductive characteristics of *Jatropha curcas* L. in south Florida. *Gcb Bioenergy*, 6(4):351-359. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12051>
- Nietsche, S., Vendrame, W. A., Crane, J. H., Pereira, M. C., Costa, A., y Reis, S. T. (2015). Variability in reproductive traits in *Jatropha curcas* L. accessions during early developmental stages under warm subtropical conditions. *Gcb Bioenergy*, 7(1):122-134. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12113>
- Nogueira, A. R., Soares, A. A., Ibrahim, A. B., y Campos, F. A. (2011). Analysis of organogenic competence of cotyledons of *Jatropha curcas* and their *in vitro* histological behavior.

## REFERENCIAS

---

---

- African Journal of Biotechnology*, 10(54):11249-11258.  
<http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.978>
- Nogueira, G. F., Pio, L. A. S., Pasqual, M., Amaral, A., y Scherwinski-Pereira, J. E. (2015). An approach on the *in vitro* maintenance of sugarcane with views for conservation and monitoring of plant nuclear DNA contents via flow cytometry. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 51(2):220-230. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9660-y>
- Nwankwo, B. A., Krikorian, A. D. (1983). Morphogenetic potential of embryo-and seedling-derived callus of *Elaeis guineensis* Jacq. var. *pisifera* Becc. *Annals of Botany*, 51(1):65-76. <http://dx.doi.org/0305-7364>
- Ochatt, S. J. (2006). Flow cytometry: Ploidy determination, cell cycle analysis, DNA content per nucleus. In: *Medicago truncatula* Handbook, version Julio, 27 p. Available at <http://www.noble.org/medicagohandbook/index.html>. ISBN 0-9754303-1-9.
- Ochatt, S. J. (2008). Flow cytometry in plant breeding. *Cytometry part A*, 73 (7):581-598.
- O'hanlon, P. C., Peakall, R., y Briese, D. T. (2000). A review of new PCR-based genetic markers and their utility to weed ecology. *Weed Research (Oxford)*, 40(3):239-254.
- Orton, T. J. (1987). Genetic instability in celery tissue and cell cultures. *Iowa state journal of research (USA)*.
- Otto, F. J. (1992). Preparation and staining of cells for high-resolution DNA analysis. In *Flow Cytometry and Cell Sorting*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 65-68. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-02785-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-662-02785-1_8)
- Pakseresht, F., Talebi, R., y Karami, E. (2013). Comparative assessment of ISSR, DAMD and SCoT markers for evaluation of genetic diversity and conservation of landrace chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes collected from north-west of Iran. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(4):563-574. <https://doi.org/10.1007/s12298-013-0181-7>
- Panghal, S., Beniwal, V. S., y Laura, J. S. (2012). An efficient plant regeneration protocol from petiole explants of physic nut (*Jatropha curcas* L.). *African Journal of Biotechnology*, 11(63):12652-12656. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB11.2165>
- Pecina, Q. V., Anaya-López, J. L., Colmenero, A. Z., García, N. M., Colín, C. A. N. (2011). Molecular characterization of *Jatropha curcas* L. genetic resources from Chiapas,

## REFERENCIAS

---

---

- México through AFLP markers. *Biomass and Bioenergy*, 35(5):1897-1905. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.027>
- Pecina-Quintero, V., Anaya-López, J. L., Zamarripa-Colmenero, A., Núñez-Colín, C. A., Montes-García, N., Solís-Bonilla, J. L., & Jiménez-Becerril, M. F. (2014). Genetic structure of *Jatropha curcas* L. in Mexico and probable centre of origin. *Biomass and Bioenergy*, 60:147-155. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.11.005>
- Pequeño, G. I. L., Ojeda, Z. M. C., Olivares, S. E., Zavala, G. F., Alvarado, G. O. G., y Iracheta, D. L. (2015). *In vitro* petiole morphogenesis of *Jatropha curcas* L. *Agrociencia*, 49(7):775-785.
- Pervin, R., Azam, S., Tanvir, M., Morshed, T., Rahman, S., y Anam, K. (2013). Natural growth substances has effective role in callus culture of Banana (*Musa* spp.) cultivar 'Anupam' (AAB Genome, *Sapientum* Subgroup). *Am-Eurasian J Sustain Agric*, 7(3):149-154.
- Pfossier, M., Heberle, B. E., Amon, A., y Lelley, T. (1995). Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry*, 21(4):387-393. <https://doi.org/10.1002/cyto.990210412>
- Prades, A., Dornier, M., Diop, N., y Pain, J. P. (2012). Coconut water uses, composition and properties: a review. *Fruits*, 67(2):87-107.
- Prado, M. J., Rodríguez, E., Rey, L., González, M. V., Santos, C., y Rey, M. (2010). Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103(1):49-59. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9753-1>
- Predieri, S. (2001). Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant cell, tissue and organ culture*, 64(2):185-210. <https://doi.org/10.1023/A:1010623203554>
- Preijers, F. W., Huys, E., Leenders, M., Nieto, L., Gautherot, E., y Moshaver, B. (2011). The new violet laser dye, Krome Orange, allows an optimal polychromatic immunophenotyping based on CD45-KO gating. *Journal of immunological methods*, 372(1):42-51. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.06.025>
- Pushnik, J. C., Miller, G. W., y Manwaring, J. H. (1984). The role of iron in higher plant chlorophyll biosynthesis, maintenance and chloroplast biogenesis. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5):733-758. <https://doi.org/10.1080/01904168409363238>

## REFERENCIAS

---

---

- Raha, S., y Roy, S. C. (2001). *In vitro* plant regeneration in *Holarrhena antidysenterica* wall., through high-frequency axillary shoot proliferation. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37(2):232-236. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0041-y>
- Rajore, S., Sardana, J., y Batra, A. (2002). *In vitro* cloning of *Jatropha curcas* L. *Journal of Plant Biology*, 29(2):195-198.
- Ramage, C. M., y Williams, R. R. (2002). Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 38(2):116-124. <https://doi.org/10.1079/IVP2001269>
- Rathore, M. S., Yadav, S., Yadav, P., Kheni, J., y Jha, B. (2015). Micropropagation of elite genotype of *Jatropha curcas* L. through enhanced axillary bud proliferation and *ex vitro* rooting. *Biomass and Bioenergy*, 83:501-510. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.10.023>
- Rathore, M. S., Yadav, P., Mastan, S. G., Prakash, C. R., Singh, A., y Agarwal, P. K. (2014). Evaluation of genetic homogeneity in tissue culture regenerates of *Jatropha curcas* L. using flow cytometer and DNA-based molecular markers. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(1):298-310. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0517-3>
- Razdan, M. K. (2003). Introduction to plant tissue culture. *Science Publishers*. pp 388-339.
- Ren, Y., Bang, H., Gould, J., Rathore, K. S., Patil, B. S., y Crosby, K. M. (2013). Shoot regeneration and ploidy variation in tissue culture of honeydew melon (*Cucumis melo* L. inodorus). *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 49(2):223-229. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9482-8>
- Riccardi, C. y Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*, 3:1458-1461. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.238>
- Rincón-Rabanales, M., Vargas-López, L.I., Adriano-Anaya, L., Vázquez-Ovando, A., Salvador-Figueroa, M., y Ovando-Medina, I. (2016). Reproductive biology of the biofuel plant *Jatropha curcas* in its center of origin. *Peer J.*, 4, 1819-1825. <https://doi.org/10.7717/peerj.1819>
- Robinson, J. P. (2006) Introduction to flow cytometry. Flow cytometry talks. USA: Purdue University Cytometry Laboratory. Available at: <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/educate/pptslide.htm>

## REFERENCIAS

---

---

- Roca, W. M., y Mroginski, L. A. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia. *Centro Internacional de Agricultura Tropical*. pp. 19-30.
- Rodríguez, E. C., y Moliner, C. C. (2011). Una herramienta eficaz en el estudio de la Botánica: la citometría de flujo. *Cuadernos de biodiversidad*, 37:19-25. <https://doi.org/10.14198/cdbio.2011.37.03>
- Roselló, G. A. M., y Bouza, J. M. E. (2012). Citometría de flujo: fundamento, instrumentación y aplicaciones en microbiología clínica. *Rev Electron Biomed / Electron J Biomed*, 3:45-53. <http://biomed.uninet.edu/2012/n3/march.html>
- Sabandar, C. W., Ahmat, N., Jaafar, F. M., y Sahidin, I. (2013). Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (*Euphorbiaceae*): a review. *Phytochemistry*, 85:7-29. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.10.009>
- Salvador-Figueroa, M., Magaña-Ramos, J., Vázquez-Ovando, J. A., Adriano-Anaya, M. L., y Ovando-Medina, I. (2015). Genetic diversity and structure of *Jatropha curcas* L. in its centre of origin. *Plant Genetic Resources*, 13(1):9-17. <https://doi.org/10.1017/S1479262114000550>
- Saravanan, R., Krishnan, P. N. y Muralimanohar, R. (2015) Experimental and performance analysis of four stroke CI engine on *Sapotaceae* biodiesel and its blends. *Journal of Chemical and pharmaceutical Sciences JCHPS Special Issue*, 6:215-218.
- Scherer, R. F., Garcia, A. C., de Freitas, F. H. P., Dal Vesco, L. L., Steinmacher, D. A., y Guerra, M. P. (2013). Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Scientia Horticulturae*, 151:38-45. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.11.027>
- Schmook, B., Serralta, P., y Vera, J. K. (1997). *Jatropha curcas*: Distribution and uses in the Yucatan Peninsula. In Proceedings of First International Symposium on Biofuel and Industrial Products from *Jatropha curcas* and other Tropical Oil Seed Plants, Managua, Nicaragua, pp. 23-27.
- Schwambach, J., Fadanelli, C., y Fett-Neto, A.G. (2005). Mineral nutrition and adventitious rooting in microcuttings of *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiol.* 25:487-494. <https://doi.org/10.1093/treephys/25.4.487>

## REFERENCIAS

---

---

- Senger, E., Peyrat, A., Martin, M., y Montes, J. M. (2014). Genetic variation in leaf chlorophyll content of *Jatropha curcas* L. *Industrial Crops and Products*, 58:204-211. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.04.003>
- Seyedimoradi, H., y Talebi, R. (2014). Detecting DNA polymorphism and genetic diversity in Lentil (*Lens culinaris* Medik.) germplasm: comparison of ISSR and DAMD marker. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20(4):495-500. <https://doi.org/10.1007/s12298-014-0253-3>
- Sharma, S. (2010). The relationship between energy and economic growth: Empirical vidence from 66 countries. *Applied energy* 87. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.06.015>
- Sharma, S., Pamidimarri, D. S., Anand, K. V., y Reddy, M. P. (2011). Assessment of genetic stability in micropropagules of *Jatropha curcas* genotypes by RAPD and AFLP analysis. *Industrial Crops and Products*, 34(1):1003-1009. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.03.008>
- Sharry, S. E., Adema, M., y Abedini, W. (2015). Plantas de probeta, Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Buenos Aires, Argentina. *Editorial de la Universidad Nacional de La Plata*. pp. 92-111.
- Shioi, Y., Tamai, H., y Sasa, T. (1978). Effects of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 19(2):203-209. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a075586>
- Shrivastava, S., y Banerjee, M. (2008). *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Influence of additives. *Int J Integr Biol*, 3, 73-79.
- Slotta, T. A. B. (2008). What we know about weeds: insights from genetic markers. *Weed science*, 56(2):322-326. <https://doi.org/10.1614/WS-07-064.1>
- Soares, D. M. M., Sattler, M. C., da Silva Ferreira, M. F., y Praça-Fontes, M. M. (2016). Assessment of genetic stability in three generations of *in vitro* propagated *Jatropha curcas* L. plantlets using ISSR markers. *Tropical plant biology*, 9(4):229-238. <https://doi.org/10.1007/s12042-016-9171-6>
- Statgraphics Centurion, X. V. I. (2009). Statpoint technologies. INC. version, 16, 17.
- Sujatha, M., Makkar, H. P. S., y 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. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-0859-0>

## REFERENCIAS

---

---

- Thepsamran, N., Thepsithar, C., y Thongpukdee, A. (2008). *In vitro* induction of shoots and roots from *Jatropha curcas* L. explants. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(1):106-112. <https://doi.org/10.1080/14620316.2008.11512354>
- Thorpe, T. A. (1993). *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. In *Morphogenesis in plants*, Springer US, pp. 19-38. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1265-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1265-7_2)
- Thorpe, T.A., Stasolla, C., Yeung, E.C., de Klerk, G.J., Roberts, A.V., George, E.F. (2008). Plant propagation by tissue culture. Volume 1. The background. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. Springer, Dordrecht, pp.115-173. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_4)
- Tjioe, I., Legerton, T., Wegstein, J., Herzenberg, L. A., y Roederer, M. (2001). Phycoerythrin-allophycocyanin: A resonance energy transfer fluorochrome for immunofluorescence. *Cytometry*, 44(1):24-29. [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20010501\)44:1<24::AID-CYTO1078>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20010501)44:1<24::AID-CYTO1078>3.0.CO;2-J)
- Toral, O. C., Iglesias, J. M., Montes de Oca, S., Sotolongo, J. A., García, S., y Torsti, M. (2008). *Jatropha curcas* L., una especie arbórea con potencial energético en Cuba. *Pastos y Forrajes*, 31(3):1-1.
- Torres, C. (2007). *Jatropha curcas*: desarrollo fisiológico y técnico. En: Boletín CUBAENERGÍA. Centro de Gestión de la Información y Desarrollo de la Energía. La Habana, Cuba. 7 p. Disponible en: <http://www.cubaenergia.cu/>. Consulta: Julio, 2016
- Trebbi, D., Papazoglou, E. G., Saadaoui, E., Vischi, M., Baldini, M., Stevanato, P., Cettul, E., Pia, S. A., Gualdi, L., y Fabbri, A. (2015). Assessment of genetic diversity in different accessions of *Jatropha curcas*. *Industrial Crops and Products*, 75:35-39. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.051>
- Tsui, C. (1984). The Role of Zinc in Auxin Synthesis in the Tomato Plant. *American Journal of Botany*, 172-179. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1948.tb05203.x>
- Van Staden, J., Zazimalova, E. y George, E. F. (2008). Plant growth regulators II, Plant propagation by Tissue Culture: Cytokinins, their analogues and antagonist. In: George, E. F., Hall, M., De Kleck, G.J. *Academic press*, Netherland, pp. 205-226.



## REFERENCIAS

---

---

- Vanrobays, E., Thomas, M., y Tatout, C. (2018). Heterochromatin positioning and nuclear architecture. *Annual Plant Reviews online*, 46:157-190. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0502>
- Varshney, A., y Johnson, T. S. (2010). Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports*, 4(2):139-148. <https://doi.org/10.1007/s11816-010-0129-0>
- Varshney, A., Lakshmikumar, M., Srivastava, P. S., y Dhawan, V. (2001). Establishment of genetic fidelity of *in vitro*-raised *Lilium* bulblets through RAPD markers. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(2):227-231. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0040-z>
- Verma, K. C., y Verma, S. K. (2015). Interaction effect of explants types and phytohormones on tissue culture of *Jatropha curcas* seed embryo. *INTERACTION*, 10(2):563-566.
- Vosa, C. (2013). Techniques in karyotype analysis. *Commentaries in Plant Science*, 183.
- Whitkus, R., Doebley, J., y Wendel, J.F. (1994). Nuclear DNA markers in systematics and evolution. In: Phillips R.L. y J.K. Vasil (Ed.). DNA-based markers in plants. *Kluwer Academic Publishers, Netherlands*. pp. 116-141. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-1104-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-011-1104-1_6)
- Williams, R. R. (1993). Mineral nutrition *in vitro* 1 a mechanistic approach. *Australian Journal of Botany*, 41(2):237-251. <https://doi.org/10.1071/BT9930237>
- Wolfe, A. D., y Liston, A. (1998). Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In Molecular systematics of plants II (pp. 43-86). *Springer, Boston, MA*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5419-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5419-6_2)
- Yachandra, V. K., Sauer, K., y Klein, M. P. (1996). Manganese cluster in photosynthesis: where plants oxidize water to dioxygen. *Chemical Reviews*, 96(7):2927-2950. <https://doi.org/10.1021/cr950052k>
- Yang, W. R., Zhang, Q. X., Pan, H. T., y Sun, M. (2010). *In vitro* regeneration of *Lilium tsingtauense* Gilg. and analysis of genetic variability in micropropagated plants using RAPD and ISSR techniques. *Propag. Orn. Plants*, 10:59-66.
- Yucatan.com.mx. (2017). Avanza un proyecto. El Diario de Yucatán. Available at: <http://yucatan.com.mx/merida/economia-merida/avanza-un-proyecto> [Accessed 11 Jul. 2017].

## REFERENCIAS

---

---

- Zažímalová, E., Petrášek, J., y Morris, D. A. (2003). The dynamics of auxin transport in tobacco cells. *Bulgarian J Plant Physiol Spec*, 207-224.
- Zhao, X., Han, Y., Tan, X. Q., Wang, J., y Zhou, Z. J. (2014). Optimization of antifungal lipopeptide production from *Bacillus* sp. BH072 by response surface methodology. *Journal of Microbiology*, 52(4):324-332. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3354-3>
- Zhou, Z., Bebeli, P. J., Somers, D. J., y Gustafson, J. P. (1997). Direct amplification of minisatellite-region DNA with VNTR core sequences in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(6):942-949. <https://doi.org/10.1007/s001220050645>
- Zhu, X., Mang, Y., Shen, F., Xie, J., y Su, W. (2014). Homogenate extraction of gardenia yellow pigment from *Gardenia Jasminoides* Ellis fruit using response surface methodology. *Journal of food science and technology*, 51(8):1575-1581. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0683-2>

## ANEXOS

### 13. ANEXOS

#### Anexo 1. Análisis de varianza.

##### 1. ANOVA para factores de inducción de brotes adventicios de *J. curcas*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Efectos principales					
A:2ip	16.8889	2	8.44444	24.43	<b>0.0000</b>
B:SAd	133.852	2	66.9259	193.61	<b>0.0000</b>
C:AIA	42.8889	2	21.4444	62.04	<b>0.0000</b>
Interacciones					
AB	22.5926	4	5.64815	16.34	<b>0.0000</b>
AC	98.8889	4	24.7222	71.52	<b>0.0000</b>
BC	253.259	4	63.3148	183.16	<b>0.0000</b>
ABC	387.185	8	48.3981	140.01	<b>0.0000</b>
Residuos	18.6667	54	0.345679		
Total	974.222	80			

##### 2. ANOVA para desarrollo de brotes de *J. curcas*

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Efectos principales					
A:BAP	13.1358	2	6.5679	1.99	0.1473
B:AIA	21.2099	2	10.6049	3.21	<b>0.0484</b>
C:SAd	38.0988	2	19.0494	5.76	<b>0.0054</b>
Interacciones					
AB	6.49383	4	1.62346	0.49	0.7425
AC	46.0494	4	11.5123	3.48	<b>0.0134</b>
BC	44.1975	4	11.0494	3.34	<b>0.0163</b>
ABC	49.6543	8	6.20679	1.88	0.0830
Residuos	178.667	54	3.30864		
Total	397.506	80			

**ANEXOS**

**3. ANOVA para elongación de brotes de *J. curcas***

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Efectos principales</b>					
A:BAP	3.13358	2	1.56679	13.66	<b>0.0000</b>
B:AIA	0.240247	2	0.120123	1.05	0.3579
C:SAd	0.140988	2	0.0704938	0.61	0.5446
<b>Interacciones</b>					
AB	0.373827	4	0.0934568	0.81	0.5213
AC	2.57753	4	0.644383	5.62	<b>0.0007</b>
BC	1.29975	4	0.324938	2.83	<b>0.0332</b>
ABC	5.04617	8	0.630772	5.50	<b>0.0000</b>
Residuos	6.19333	54	0.114691		
Total	19.0054	80			

**4. ANOVA para número de hojas desarrolladas en brotes de *J. curcas***

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
<b>Efectos principales</b>					
A:BAP	486.395	2	243.198	9.00	<b>0.0004</b>
B:AIA	240.691	2	120.346	4.46	<b>0.0162</b>
C:SAd	348.84	2	174.42	6.46	<b>0.0031</b>
<b>Interacciones</b>					
AB	417.086	4	104.272	3.86	<b>0.0079</b>
AC	206.716	4	51.679	1.91	0.1215
BC	303.753	4	75.9383	2.81	<b>0.0342</b>
ABC	633.358	8	79.1698	2.93	<b>0.0086</b>
Residuos	1458.67	54	27.0123		
Total	4095.51	80			

**ANEXOS**

**5. ANOVA para número de raíces desarrolladas en plántulas de *J. curcas***

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Efectos principales					
A:AIB	38.037	2	19.0185	0.49	0.6153
B:MS	67.1481	2	33.5741	0.87	0.4273
Interacciones					
AB	278.519	4	69.6296	1.80	0.1460
Residuos	1743.33	45	38.7407		
Total	2127.04	53			

**6. ANOVA para longitud de raíces en plántulas de *J. curcas***

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Efectos principales					
A:IBA	3.32704	2	1.66352	1.22	0.3059
B:MS	0.982593	2	0.491296	0.36	0.7002
Interacciones					
AB	5.70852	4	1.42713	1.04	0.3955
Residuos	61.5433	45	1.36763		
Total	71.5615	53			

**7. ANOVA del diseño central compuesto para la optimización de la inducción de brotes adventicios de *J. curcas***

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A:2ip	220.9	1	220.9	3.28	0.0741
B:AIA	240.1	1	240.1	3.56	0.0629
AB	864.9	1	864.9	12.84	<b>0.0006</b>
Error total	5120.05	76	67.3691		
Total	6445.95	79			

R-cuadrada: 20.5695 %, R-cuadrada (ajustada por grados libertad): 17.4341 %, Error estándar del estadístico: 8.20787, Error absoluto medio: 6.14563, Estadístico Durbin-Watson: 1.29352 (P=0.0002): Autocorrelación residual de Lag 1: 0.345362.

**ANEXOS**

**8. ANOVA para ajuste al modelo lineal en la optimización de brotes adventicios de *J. curcas***

<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Estadístico T</b>	<b>Valor-P</b>
Constante	244.8	45.7742	5.34799	0.0000
2ip	-4.544	0.663297	-6.85063	<b>0.0000</b>
AIA	-115.0	33.7086	-3.4116	0.0010
2ip*AIA	1.86	0.426383	4.36227	0.0000
2ip*2ip	0.0148	0.00241199	6.13602	0.0000

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Modelo	3037.15	4	759.287	16.71	<b>0.0000</b>
Residuo	3408.8	75	45.4507		
Total	6445.95	79			

R-cuadrada: 47.1172 %, R-cuadrado (ajustado para grados libertad): 44.2968 %, Error estándar del estadístico: 6.74171, Error absoluto medio: 5.265, Estadístico Durbin-Watson: 1.91073 (P=0.1997), Autocorrelación de residuos en retraso 1: 0.0267337.

**9. ANOVA para ajuste al modelo cuadrático en la optimización de brotes adventicios de *J. curcas***

<b>Parámetro</b>	<b>Estimación</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Estadístico T</b>	<b>Valor-P</b>
Constante	-173.726	20.4336	-8.50198	0.0000
2ip	0.252628	0.0806598	3.13202	<b>0.0028</b>
AIA	274.831	30.2478	9.08598	0.0000
2ip*AIA	0.08	0.0582111	1.37431	0.1750
2ip*2ip	-0.00216001	0.000184081	-11.734	0.0000
AIA*AIA	-105.001	11.5051	-9.12644	0.0000

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Modelo	130.527	5	26.1055	61.63	<b>0.0000</b>
Residuo	22.8726	54	0.423567		
Total (Corr.)	153.4	59			

R-cuadrada: 85.0896 %, R-cuadrado (ajustado para grados libertad): 83.709 %, Error estándar del estadístico: 0.65082, Error absoluto medio = 0.518444, Estadístico Durbin-Watson: 2.12539 (P=0.6933), Autocorrelación de residuos en retraso 1: -0.0910425

## ANEXOS

### Anexo 2. Soluciones utilizadas en electroforesis.

#### 1. Reactivos, cantidad y concentración final para preparar tampón Tris, Acetato y EDTA (TAE)

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Tris base	242 g	1,9 M
Ácido acético glacial	571 ml	57.1%
EDTA 0,5 M pH 8,0	100 mL	0.05 M

Para preparar una solución stock 50X se pesan las cantidades descritas en el Cuadro del anexo

2. Se agrega Tris base y el EDTA en 200 mL de agua desionizada bidestilada y se agita hasta que se disuelva. Se añade el ácido acético y se ajusta el volumen a 1000 mL. Para preparar 100 mL de TAE 1X utilizar 2 mL de TAE 50X por cada 98 mL de agua desionizada bidestilada. La solución 1x TAE es Tris 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1 mM y generalmente tiene un pH de alrededor de 8,6 (no ajustar).

#### 2. Solución Stock de bromuro de etidio (10 mg/10ml)

Pesar 100 mg de bromuro de etidio en 10 mL de agua bidestilada. Forrar el recipiente con papel aluminio u otro que impida el paso de la luz y almacenar a temperatura ambiente.

#### 3. Preparación de gel agarosa con TAE 1X

1. Pesar agarosa (0.8 , 1.5 o 2 %) y agregarlo a la solución TAE 1X, posteriormente disolver en horno microondas por 30 segundos y agregar 2 $\mu$ L de bromuro de etidio cuando la mezcla se encuentre tibio. Vaciar en el molde previamente preparado con el peine para la electroforesis.

2. Dejar 15 minutos a que la agarosa solidifique y colocarlo cuidadosamente en la cámara de electroforesis. Añadir tampón de electroforesis TAE 1X en la cámara de electroforesis hasta que el gel quede sumergido en el tampón.

3. Preparar los pocillos mezclando 2  $\mu$ L de tampón de carga con 10  $\mu$ L de muestra amplificada y agregar en un pocillo del gel el marcador molecular de 1kb.

4. Correr la cámara de electroforesis a 70 volts constante durante 60 min y finalmente observar en UV.

## ANEXOS

**Anexo 3.** Matrices generadas con el análisis de la electroforesis con 5 iniciadores DAMD.



S1	S2	S1	S2	S3	S4	S3	S4	S5	S6	S5	S6	S7	S8	S7	S8	S9	S10	S9	S10
0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1
1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1
0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0
1	0	1	0	0	1	0	1					0	1	0	1	0	1	0	1
1	1	1	1	1	0	1	0					1	1	1	1	1	0	1	0
1	0	1	0	1	0	1	0					1	1	1	1	1	0	1	0
												0	1	0	1				
												1	1	1	1				
												1	0	1	0				

M: marcador molecular de 1 Kb, S1-S2: planta madre y clona respectivamente replica 1 y 2 con marcador JJ336, S3-S4: planta madre y clona respectivamente replica 1 y 2 con marcador HVR, S5-S6: planta madre y clona respectivamente replica 1 y 2 con marcador M13, S7-S8: planta madre y clona respectivamente replica 1 y 2 con marcador HVA, S9-S10: planta madre y clona respectivamente replica 1 y 2 con marcador HBV.



**Anexo 4.** Costo de proceso de micropropagación por organogénesis indirecta de *J. curcas*.

<b>Establecimiento de embriones</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo por medio</b>	<b>Litros</b>	<b>Litros segunda resiembra</b>	<b>Litros tercera resiembra</b>	<b>Total usado</b>	<b>Material establecido</b>	<b>Dias de cultivo</b>	<b>Mano de obra</b>
Medio basal MS (5019)	4.4 g	\$59.64							
Cloruro de benzalconio	10 mL	\$00.20							
Extran®	20mL	\$00.88							
Hipoclorito de sodio	30 mL	\$00.29							
Agua destilada	2 L	\$22.00							
Sacarosa	30 g	\$00.85							
Gelrite®	2.3 g	\$35.43							
<b>Total</b>									
	<b>:</b>	<b>\$119.29</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>\$119.29</b>	<b>33 semillas</b>	<b>30</b>	<b>\$2,000.00</b>
<b>Callogénesis e inducción de brotes para 528 explantes</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo por medio</b>	<b>Litros</b>	<b>Litros segunda resiembra</b>	<b>Litros tercera resiembra</b>	<b>Total usado</b>	<b>Material establecido</b>	<b>Dias de cultivo</b>	<b>Mano de obra</b>
Medio basal MS (5019)	3.3 g	\$44.73							
Sulfato de adenina	0.06 g	\$07.03							
Sacarosa	22.5 g	\$00.64							
Gelrite®	2.3 g	\$35.43							
2ip	0.0001g	\$00.25							
ácido indolacético									
<b>Total</b>									
	<b>:</b>	<b>\$88.08</b>	<b>13.2</b>	<b>13.2</b>	<b>0</b>	<b>\$2,325.37</b>	<b>11088 brotes</b>	<b>90</b>	<b>\$8,000.00</b>
<b>Elongación de 11088 brotes</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo por medio</b>	<b>Litros</b>	<b>Litros segunda resiembra</b>	<b>Litros tercera resiembra</b>	<b>Total usado</b>	<b>Material establecido</b>	<b>Dias de cultivo</b>	<b>Mano de obra</b>
Medio basal MS (5019)	4.4 g	\$59.64							
Sulfato de adenina	0.06 g	\$07.03							
Sacarosa	30g	\$00.85							
Gelrite®	2.3 g	\$35.43							
Bencilaminopurina	0.0001g	\$00.40							
Ácido indolacético	0.0001g	\$00.12							
<b>Total</b>									
	<b>:</b>	<b>\$103.47</b>	<b>110.88</b>	<b>110.88</b>	<b>110.88</b>	<b>\$34,419.26</b>	<b>11088 brotes</b>	<b>135</b>	<b>\$24,000.00</b>

Enraizamiento de 11088 brotes	Cantidad	Costo por medio	Litros	Total por litro	Material establecido	Dias de cultivo
Medio basal MS (5019)	2.2g	\$29.82				
Ácido indolbutírico	0.0001g	\$00.03				
Sacarosa	30g	\$00.85				
Gelrite®	2.3 g	\$35.43				
<b>Total</b>	<b>:</b>	<b>\$66.13</b>	<b>443.52</b>	<b>\$29,327.76</b>	<b>11088 brotes</b>	<b>30</b>
<b>\$8,000.00</b>						
Aclimatación de 11088 brotes enraizados	Cantidad	Costo por maceta	macetas requeridas	Total usado	Material establecido	Dias de cultivo
Perlita	1L	\$1.23				
Suelo	100g	\$0.25				
Bolsas negras	1	\$0.35				
Fungicida oxiclورو de cobre	0.1g	\$0.03				
Plástico para cubrir	1	\$0.66				
<b>Total</b>	<b>:</b>	<b>\$2.52</b>	<b>11088</b>	<b>\$27,919.58</b>	<b>11088 plántulas</b>	<b>90</b>
<b>\$24,000.00</b>						
Total de plantas aclimatadas						11088
Tiempo de proceso (días)						375
Total insumos						\$94,111.26
Mano de obra						\$66,000.00
Consumo energético de autoclave, aire acondicionado, Lámparas y campanas de flujo laminar						\$09,526.00
<b>Gastos total promedio</b>						<b>\$169,637.26</b>

Al dividir el Gasto total promedio entre el número de plantas aclimatadas nos da un costo por plántula de \$15.30.

## ANEXOS

### Anexo 5. Constancias de cursos impartidos.



Guadalajara, Jal. A 27 de Noviembre de 2018  
Ref. CP/1162 /2018

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este medio hago constar que el M. en C. Gilbert José Herrera Cool participó en la colaboración de la siguiente asignatura que se imparte en el marco del Posgrado en Maestría en Ciencias de la Floricultura que se imparte en este Centro de Investigación.

Asignatura	Periodo	Año	Función	Horas
Seminario de Investigación III	Enero –Abril	2018	Colaborador	6

Se extiende la presente para los fines que el interesado considere conveniente

ATENTAMENTE

**Mtra. Fátima Gabriela Ordóñez de la Cruz**  
Coordinadora de Posgrados



Avenida Normalistas No. 800, Colinas de la Normal. C.P. 44270, Guadalajara, Jalisco, Mexico  
Tel.01 (33) 3345. 5200 - [www.ciatej.mx](http://www.ciatej.mx)

ANEXOS



Guadalajara, Jal. A 24 de Julio de 2018  
Ref. CP/760/2018

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este medio hago constar que el C. **Gilbert José Herrera Cool** ha participado en la siguiente asignatura impartida en el marco del Posgrado en Maestría en Ciencias de la Floricultura que se imparten en este Centro de Investigación.

Asignatura	Año	Función	Horas impartidas
Seminario I	2018	Colaborador	12

Se extiende la presente para los fines que el interesado considere convenientes

ATENTAMENTE

  
**Mirra Edith de la Cruz**  
Coordinadora de Posgrados  
y Gestión de Estudiantes

## ANEXOS



Guadalajara, Jal. A 02 de Julio de 2018  
Ref. CP/736 /2018

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este medio hago constar que el M. en C. Gilberth José Herrera Cool participo en la siguiente asignatura impartida en el marco del Posgrado **Maestría y Doctorado en Ciencia e Innovación Tecnológica** que se imparte en este Centro de Investigación.

Asignatura	Periodo	Año	Función	Horas
Introducción a la Innovación Biotecnológica	Febrero-Junio	2018	Colaborador	10.5

Se extiende la presente para los fines que el interesado considere convenientes

ATENTAMENTE

**Mtra. Fátima Gabriela Ordóñez de la Cruz**  
Coordinadora de Posgrados



Avenida Normalistas No. 800, Colinas de la Normal. C.P. 44270, Guadalajara, Jalisco, México  
Tel. 01 (33) 3345.5200 - [www.ciatej.mx](http://www.ciatej.mx)

## ANEXOS



Guadalajara, Jal. A 5 de noviembre de 2018  
Ref. CP/1115/2018

### A QUIEN CORRESPONDA:

Por este medio hago constar que el Dr. Gilbert José Herrera Cool participó en la siguiente asignatura impartida en el marco del Posgrado en Maestría en Ciencias de la Floricultura que se imparte en este Centro de Investigación.

Asignatura	Periodo	Año	Función	Horas
Mejoramiento Genético Vegetal	Mayo - Agosto	2018	Colaborador	12

Se extiende la presente para los fines que el interesado considere conveniente

### ATENTAMENTE

  
**Mtra. Fátima Gabriela Oroño de la Cruz**  
Coordinadora de Posgrado  
  
Coordinación de Posgrados  
y Gestión de Estudiantes

Avenida Normalistas No. 800, Colinas de la Normal. C.P. 44270, Guadalajara, Jalisco, México  
Tel. 01 (33) 3345.5200 - [www.ciatej.mx](http://www.ciatej.mx)

## ANEXOS



Guadalajara, Jal. A 14 de Febrero de 2019  
Ref. CP/265/2019

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este medio hago constar que el M.C. Gilbert José Herrera Cool ha participado en la siguiente asignatura impartida en el marco del Posgrado que se imparten en este Centro de Investigación.

ASIGNATURA	PROGRAMA	PERIODO	FUNCIÓN	HORAS
Cultivo de células y tejidos Vegetales	Maestría en Ciencias de la Floricultura	Septiembre – Diciembre 2018	Colaborador	12

Se extiende la presente para los fines que el interesado considere convenientes

ATENTAMENTE

P. A.   
*Mtra. Fátima Gabriela Ordóñez de la Cruz*  
Coordinadora de Posgrados



Anexo 6. Constancia de estancia en el extranjero.



**Constancia de participación**

El que suscribe, Profesor João Loureiro, hace constar que el estudiante de Doctorado Gilbert José Herrera Cool participó en esta universidad en una estancia en el periodo del 16 de octubre al 1 de diciembre de 2017. Durante su estancia, el estudiante antes mencionado, aprendió técnicas modernas de biotecnología de plantas; por otro lado, participó en una “práctica de laboratorio de citometría de flujo” estimando el contenido de ADN nuclear de la especie *J. curcas* y presentó el tema: “Caso de Estudios en Mejoramiento Genético Vegetal” como parte de la clase de “Mejoramiento Genético Vegetal” que se imparte en ésta universidad.


Se extiende la presente constancia a los veintiocho días del mes de noviembre del año dos mil diecisiete.


ATENTAMENTE

Prof. João Loureiro  
Professor Auxiliar  
Departamento de Ciências da Vida,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Universidade de Coimbra  
Coimbra, Portugal.



Anexo 7. Constancias de participación en congresos.



 **RED TEMÁTICA DE  
BIOENERGÍA**

**II Reunión Nacional de la  
Red Temática de Bioenergía  
XI Reunión Nacional de la REMBIO**

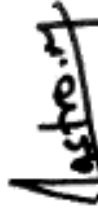
**HACIA LA CONSOLIDACIÓN DE LA BIOENERGÍA EN MÉXICO  
OTORGA LA PRESENTE CONSTANCIA**


A: Gilbert José Herrera Cool


POR SU PARTICIPACIÓN CON EL CARTEL:


“ Morfogénesis in vitro para una variante de *Jatropha curcas* cultivada en una plantación en Tizimin, Yucatán ”

Ixtapa, Zihuatanejo, México a 04 de Dic de 2015

  
Dr. Agustín Jaime Castro Montoya  
Responsable Técnico de la  
Red Temática de Bioenergía

  
Omar Maserá Cerutti  
Presidente de la  
Red Mexicana de Bioenergía

 **CONACYT**  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

 Red Mexicana de Bioenergía

# 3<sup>rd</sup> BIOTECHNOLOGY SUMMIT

**OCTOBER 24-28, 2016**  
CIUDAD OBREGON, SONORA, MEXICO

## CERTIFICATE TO

FOLEJO 002686-16

Gilbert José Herrera Cool, Guadalupe López Puc, Ingrid Mayanin Rodriguez Buenfil, Alberto Uc Vázquez, Luis Alberto Mota Narváez, Eddy de Jesús

For the poster presentation "Organogenesis in vitro of *Jatropha curcas* variety AL JC01 obtained from a plantation in Sucilá, Yucatan" in the 3<sup>rd</sup> Biotechnology Summit 2016.

October 24<sup>th</sup> to 28<sup>th</sup>, 2016. Cd. Obregón, Sonora, México.

Dr. Sergio de los Santos Villalobos  
President  
3<sup>rd</sup> Biotechnology Summit

Dra. Susana Lozano Muñiz  
President  
International Biotechnology Foundation

Dr. Fabián Fernández Luqueño  
Scientific Committee Coordinator  
3<sup>rd</sup> Biotechnology Summit



## Anexo 8. Publicaciones en revistas científicas y notas periodísticas.

ISSN: 2320-5407

Int. J. Adv. Res. 7(3), 1276-1284



Journal Homepage: - [www.journalijar.com](http://www.journalijar.com)  
**INTERNATIONAL JOURNAL OF  
 ADVANCED RESEARCH (IJAR)**  
 Article DOI: 10.21474/IJAR01/8761  
 DOI URL: <http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/8761>



ISSN NO. 2320-5407

## RESEARCH ARTICLE

OPTIMIZATION OF *IN VITRO* ADVENTITIOUS SHOOT INDUCTION IN *JATROPHA CURCAS* BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY.Herrera-Cool Gilbert José<sup>1</sup>, Rodríguez-Buenfil Ingrid Mayanin<sup>1</sup>, Iglesias-Andreu Lourdes Georgina<sup>2</sup> and López-Puc Guadalupe<sup>1</sup>.

1. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Sede Sureste, Carretera Sierra Papacal-Chuburna Puerto Km. 5, 97302 Sierra Papacal, Mérida, Yucatán, México.
2. Instituto de Biotecnología y Ecología. Universidad Veracruzana, Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte, 91001 Xalapa, Veracruz, México.

## Manuscript Info

## Manuscript History

Received: 20 January 2019

Final Accepted: 22 February 2019

Published: March 2019

## Key words:-

optimization, response surface methodology, *in vitro*, *Jatropha curcas*, central composite design.

## Abstract

*Jatropha curcas* is a second generation biofuel crop that is also an important biological resource. Meeting increasing biofuel demand requires wider cultivation of specialized varieties, highlighting the need for massive culture techniques such as *in vitro* micropropagation. Key stages in plant tissue culture processes, such as adventitious shoot induction, can be optimized to increase micropropagation protocol efficiency. Response surface methodology, a statistical tool for this purpose, was applied to optimize *in vitro* induction of adventitious shoots in the *J. curcas* micropropagation process. A preliminary assay was done in which 6-( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimethylallylamino) purine and indolacetic acid were selected as the factors to optimize. A 2<sup>2</sup> central composite design with four central points was then applied to fit it to a second grade model and a rotatable design applied to produce the final model and surface graphics. Focused on maximum point, the surface model design identified maximum adventitious shoot induction to be 21 shoots per explant in Murashige and Skoog medium at 75% ionic strength and containing 83.3  $\mu$ M 6-( $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimethylallylamino) purine and 1.3  $\mu$ M indolacetic acid. This is the first report in which response surface methodology was found to be an effective statistical technique for optimizing adventitious shoot induction in *Jatropha curcas*.

Copy Right, IJAR, 2019., All rights reserved.

## Introduction:-

A member of the *Euphorbiaceae* plant family, *Jatropha curcas* is native to Mexico and Central America (Navarro et al., 2016). Its seeds can contain up to 40% oil which has made it a preferred source for producing biodiesel by transesterification (Li et al., 2016; Soares et al., 2016). Increasing demand for biodiesel has driven efforts to expand its cultivation. Asexual propagation through stakes and sexual propagation through seeds have been used to broaden cultivation, although production remains challenging due to the species low drought resistance, disease susceptibility and weak radicular system (Sujatha et al., 2005; Datta et al., 2007). Growing demand for *J. curcas* genetic material has led to use of massive plant multiplication techniques (Panghal et al., 2012). *In vitro* plant tissue culture of *J. curcas* has been studied and shown to be viable for adventitious shoot induction by indirect organogenesis,

Corresponding author:-Guadalupe López-Puc.

Address:- Carretera Sierra Papacal-Chuburna Puerto Km. 5, 97302 Sierra Papacal, Mérida, Yucatán, México

1276



INDIRECT ORGANOGÉNESIS AND ESTIMATION OF NUCLEAR DNA CONTENT IN REGENERATED CLONES OF A NON-TOXIC VARIETY OF *Jatropha curcas*<sup>†</sup>

[ORGANOGÉNESIS INDIRECTA Y ESTIMACION DEL CONTENIDO DE ADN NUCLEAR EN CLONES REGENERADOS DE UNA VARIEDAD NO TÓXICA DE *Jatropha curcas*]

Herrera-Cool Gilbert José<sup>1</sup>, Loureiro João<sup>2</sup>, Rodríguez-Buenafil Ingrid Mayanín<sup>1</sup>, Uc-Vázquez Alberto<sup>1</sup>, Iglesias-Andreu Lourdes Georgina<sup>3</sup>, Góngora-Cauil Carlos Cecilio<sup>4,5</sup>, Martínez-Sebastián Gregorio<sup>4</sup>, Aguilera-Cauich Erick Alberto<sup>6</sup> and López-Puc Guadalupe<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C., Unidad Sureste Mérida, Yucatán, México Email: glopez@ciatej.mx Tel: 523333455200 Ext. 4028

<sup>2</sup>Center for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>3</sup>Instituto de biotecnología y ecología Universidad Veracruzana, Campus para la Cultura, las Artes y el Deporte, Xalapa, Veracruz, México.

<sup>4</sup>División de Ingeniería y Ciencias Exactas, Universidad Anáhuac Mayab, Mérida, Yucatán, México

<sup>5</sup>Agroindustria Alternativa del Sureste LODEMO Group, Mérida, Yucatán, México.

\*Corresponding author

#### SUMMARY

*Jatropha curcas* L. is a second-generation energy crop, which produces approximately 40% oil in its seeds, which can be transformed into biodiesel. *In vitro* culture is a valuable tool for the multiplication and conservation of elite plant varieties. In *J. curcas*, there are several reports on the micropropagation of the species, but with low reproducibility. The objective of this study was to obtain the *in vitro* organogenesis of *J. curcas* and estimate the nuclear DNA content by flow cytometry during eight subcultures *in vitro*. The organogenesis of adventitious shoots was obtained in 3.3 g/l of MS, 110.25 µM of 6-(γ, γ-Dimethylallylamino) purine (Zip), 1.27 µM of indoleacetic acid (IAA) and 369.21 µM of adenine sulfate (AdS), obtaining up to 18.50 ± 0.7 shoots per explant. The development of the shoots was 1.67 ± 0.76 cm in MS medium, 4.44 µM of benzylaminopurine (BAP), 1.0 µM of IAA and 543 µM of AdS. The rooting was 13.6 ± 2.51 roots in ½ MS and 14.7 µM of indole butyric acid (IBA). The nuclear DNA content was from 0.80 ± 0.12 to 1.07 ± 0.23 pg of nuclear DNA during the eight subcultures. **Keywords:** *in vitro* culture; 6-(γ, γ-Dimethylallylamino) purine; benzylaminopurine; adenine sulfate; flow cytometry; somaclonal variation; micropropagation; indole acetic acid; adventitious organogenesis.

#### RESUMEN

*Jatropha curcas* L. es un cultivo energético de segunda generación, que produce aproximadamente el 40% de aceite en sus semillas, que puede transformarse en biodiesel. El cultivo *in vitro* es una herramienta valiosa para la multiplicación y conservación de variedades de plantas de elite. En *J. curcas*, hay varios reportes sobre la micropropagación de la especie, pero con baja reproducibilidad. El objetivo de este estudio fue obtener la organogénesis *in vitro* de *J. curcas* y estimar el contenido de ADN nuclear por citometría de flujo durante ocho subcultivos *in vitro*. La organogénesis de brotes adventicios se obtuvo en 3.3 g/l de MS, 110.25 µM de 6-(γ, γ-Dimethylallylamino) purina (Zip), 1.27 µM de ácido indolacético (ALA) y 369.21 µM de sulfato de adenina (SAd), obteniendo hasta 18.50 ± 0.7 brotes por explante. El desarrollo de los brotes fue de 1.67 ± 0.76 cm en medio MS, 4.44 µM de benzilaminopurina (BAP), 1.0 µM de IAA y 543 µM de AdS. El enraizamiento fue de 13.6 ± 2.51 raíces en ½ MS y 14.7 µM de ácido indolbutírico (AIB). El contenido de ADN nuclear fue desde 0.80 ± 0.12 a 1.07 ± 0.23 pg de ADN nuclear durante los ocho subcultivos. **Palabras clave:** cultivo *in vitro*; 6-(γ, γ-Dimethylallylamino) purina; benzilaminopurina; sulfato de adenina; citometría de flujo; variación somaclonal; micropropagación; ácido indolacético; organogénesis adventicia.

<sup>†</sup> Submitted May 24, 2018 – Accepted May 24, 2019. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License. ISSN: 1870-0462

# BIOTECHNOLOGY SUMMIT

## Organogenesis *in vitro* of *Jatropha curcas* variety AL JC01 obtained from a plantation in Sucilá, Yucatán

Gilbert José Herrera Cool, Guadalupe López Puc<sup>†</sup>, Ingrid Mayanin Rodríguez Buenfil, Alberto Uc Vázquez, Luis Alberto Mota Narváez, Eddy de Jesús Morales Mis

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Unidad Sureste, Sierra Papacal, Yucatán C.P. 97302. Email: [\\*glopez@ciatej.mx](mailto:glopez@ciatej.mx)

### Abstract

*Jatropha curcas* is a second-generation energy crop that produces up to 40% oil in its seeds and by a transesterification process it can to obtain quality biodiesel. Despite these desirable features, there is no a variety generate high seed production therefore makes it unprofitable; one of the tools that help keep pure genetic lines would be the *in vitro* culture of elite varieties. However, the low reproducibility of micropropagation protocols do a difficult task for this specie; until now it has obtained shoot induction variety ALJC01 using MS medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with adenine sulfate, 6- ( $\gamma$ ,  $\gamma$ -Dimethylallylamino) purine (2iP), indoleacetic acid (AIA), myo-inositol and thiamine; the shoot elongation was achieved on MS medium supplemented with benzylaminopurine (BAP), indoleacetic acid (IAA) and adenine sulfate.

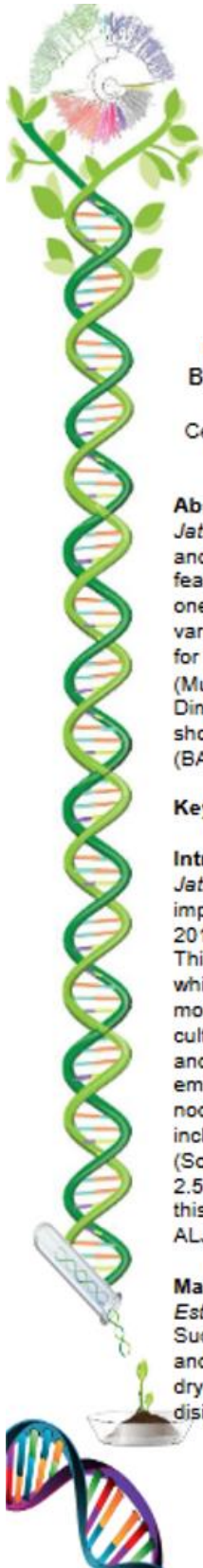
**Keywords:** *Jatropha curcas*•Organogenesis•Micropropagation•*in vitro*.

### Introduction

*Jatropha curcas* is a perennial oleaginous plant belonging to the family Euphorbiaceae, its importance in recent years is because the seeds have about 30 to 40% oil (Soares *et al.* 2016) and by transesterification can be obtained biodiesel high quality (Pan *et al.* 2016). This species has an impressive genetic diversity (Rincón *et al.* 2016; Pecina *et al.* 2011), which may partly explain the different responses of an explant of an accession morphogenesis *in vitro* culture (Rajore and Batra, 2005); Furthermore, studies *in vitro* culture, include supplementation of organic additives such as polyvinylpyrrolidone (PVP) and citric acid to the culture medium for indirect morphogenesis by establishing immature embryos (Varshney and Johnson, 2010) or sulfate adenine for direct organogenesis from nodes (Datta *et al.* 2007), somatic embryogenesis on leaf explants (Baran-Jha *et al.* 2007), including the addition of coconut water for cell culture suspension from leaf and hypocotyl (Soomro and Memon, 2007).due to this specie (registered in Mexico) has a productivity of 2.5 ton / ha, length approximately of 1.5 m and is tolerant to pests and diseases, the aim of this study was to develop a protocol for *in vitro* morphogenesis of *Jatropha curcas* variety ALJC01 for future research and agricultural applications.

### Materials and Methods

**Establishment.** the seeds of *J. curcas* variety ALJC01 were harvested of a plantation in Sucilá, Yucatan, Mexico; seeds were surface sterilized with benzalkonium chloride (0.5%) and chloride by stirring with commercial detergent (1 mg / 100 mL) for 15 min, allowed to dry on paper towels for 30 min. Later the seed coat was removed and the embryos were disinfected in laminar flow cabinet; by immersion in a solution of Extran (5%) for 5 min, then



Vol. 17(35), pp. 1082-1089, 29 August, 2018  
 DOI: 10.5897/AJB2018.16540  
 Article Number: DE0385C58391  
 ISSN: 1684-5315  
 Copyright ©2018  
 Author(s) retain the copyright of this article  
<http://www.academicjournals.org/AJB>



African Journal of Biotechnology

Full Length Research Paper

## Isolation and regeneration of protoplasts from leaf explants of *Rhynchoaelia digbyana*

Luis Alberto Mota-Narváez<sup>1</sup>, Gilbert José Herrera-Cool<sup>1</sup>, Teresa del Rosario Ayora-Talavera<sup>1</sup>, Nancy Santana-Buzzy<sup>2</sup>, and Guadalupe López-Puc<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Sede Sureste, km 5.5 Sierra Papacal-Chuburna Puerto, Parque Científico y Tecnológico de Yucatán, Postal code 97302 Mérida, Yucatán, México.

<sup>2</sup>Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Unidad de bioquímica Calle 43 No. 130 x 32 y 34 Chuburná de Hidalgo, Postal code. 97205, Mérida, Yucatán, México.

Received 5 June 2018; Accepted 30 July 2018

A protocol for the isolation and regeneration of protoplasts from leaf explant of *Rhynchoaelia digbyana* is presented. The protoplasts were isolated using hemicellulase enzymes at 1.5, 2.25, and 3% (w/v), pectinase at 0.5 and 0.75% (w/v) and cellulase at 1 and 2% (w/v). Protoplast counting was carried out with a Neubauer camera and an optical microscope at 40X, and viability was determined with Evans blue dye at 0.025% (w/v). The protoplasts were cultivated following the standard plate method, using the K&M media with 0.06 M of saccharose, 2.3% of Gelrite and plant growth regulators. It produced a yield of  $386250 \pm 1875$  protoplasts/g of tissue using an enzymatic combination of 1.5% (w/v) of hemicellulase, 0.5% (w/v) of pectinase and 1% (w/v) of cellulase with an incubation time of 4 h. The colonies were observed after two months of culture and the highest number of colonies ( $1.66 \pm 0.50$ ) was obtained when the protoplasts were cultured in Kao medium with  $4.53 \mu\text{M}$  of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D),  $0.912 \mu\text{M}$  of Zeatin and  $3.10 \mu\text{M}$  of 6-Benzylaminopurine (BA). The nuclear DNA content estimated by flow cytometry for *R. digbyana* was  $27.39 \pm 3.8$  pg of DNA equivalent to  $26.79 \times 10^8$  pb and the number of mitotic chromosomes counted was  $2n=40$ .

**Key words:** Isolation, *in vitro* culture, plant regeneration, flow cytometry.

### INTRODUCTION

Orchids belong to the family Orchidaceae and their diversity in the world is comprised 28,484 species, classified in more than 1,000 plant genera (Dodson, 2016; WCSP, 2017). These plants are cosmopolitan and present a diversity of forms, sizes, colors, and aromas. However, their main attribute is their floral structure (Tamay et al., 2016). The ornamental characteristics and long life span of the flower place them among the families with greater commercial importance. In 2015, the

Department of Agriculture of the United States reported that the sales of orchids occupied 1st place in commercialized ornamental plants, dominating this category with 288 million dollars, a 5% increase in comparison with 2014; with *Cymbidium*, *Cattleya*, *Dendrobium*, and *Phalaenopsis* representing the most cultivated genera (Suárez and Téllez, 2015; Murguía et al., 2016).

*Rhynchoaelia digbyana* is a species that belongs to the

\*Corresponding author. E-mail: glopez@ciatej.mx.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)



## Jatronergy, apuesta por la investigación y la innovación empresarial

[Share](#) [Tweet](#)

Por Marytere Narváez

Mérida, Yucatán. 30 de agosto de 2017 (Agencia Informativa Conacyt).- [Jatronergy Agroindustria Alternativa del Sureste](#), empresa mexicana dedicada a la producción de biocombustibles en la península de Yucatán, y el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco ([Ciatej](#)), unidad Sureste, desarrollan un programa de mejoramiento genético de *Jatropha curcas* L., con la finalidad de generar híbridos adaptados a las condiciones de Yucatán y con rendimiento óptimo para la fabricación de biocombustible.



## Anexo 9. Capítulos de libro publicados.

## Capítulo 8

**Micropropagación de *Jatropha curcas* L**

Guadalupe López Puc<sup>1</sup>; Gilbert José Herrera Cool<sup>1</sup>, Yanuari Aké-Mex<sup>1</sup>, Gustavo Vázquez-Díaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco AC., Sede Sureste. Parque Científico y Tecnológico de Yucatán, tablaje catastral 31264, km 5.5 carretera Sierra Papacal- Chuburná Puerto. CP 97302. Tel. 01 999 9202671.

\*Autor por correspondencia: [glopez@ciatej.mx](mailto:glopez@ciatej.mx)

**Resumen**

*Jatropha curcas* es una especie multipropósito con proyecciones que consideran que es necesario contar con métodos eficientes de propagación para cubrir la demanda de plantas que se requerirán para establecer plantaciones comerciales. Por lo tanto, el uso de técnicas biotecnológicas, como el cultivo *in vitro*, es una opción para cubrir la demanda de material vegetal de variedades elite. La generación de plantas puede ser por propagación clonal a partir de nudos con yemas y germinación de semillas. Sin embargo, se considera que los métodos más eficientes con respecto del número de plantas que se pueden obtener son a través de la morfogénesis inducida a partir de tejidos de origen somático, que por lo general son hojas, hipocótilo y raíz. Las dos rutas morfogénicas que se pueden inducir son la organogénesis y la embriogénesis somática. Es importante tener en cuenta que los métodos morfogénicos también son una herramienta útil para el

Guadalupe López Puc; Gilbert José Herrera Cool,  
Yanuari Aké-Mex, Gustavo Vázquez-Díaz

205



## Capítulo 9

**Roadmapping para el cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas*: Una visión para 2025**

Gilbert José Herrera Cool<sup>1</sup>, Javier Rivera Ramírez<sup>1</sup>, Ariel Vázquez Elorza<sup>1</sup>, Guadalupe López Puc<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco AC., Sede Sureste. Parque Científico y Tecnológico de Yucatán, tablaje catastral 31264 km 5.5 carretera Sierra Papacal- Chuburná Puerto. CP 97302. Tel. 01 999 9202671.

Autor por correspondencia: [glopez@ciatej.mx](mailto:glopez@ciatej.mx)

**Resumen**

*Jatropha curcas* sigue siendo un cultivo energético prometedor para el futuro, debido al avance científico y tecnológico que ha alcanzado, sin embargo, aún falta obtener métodos eficientes en micropropagación y la obtención de variedades elites, así como el vínculo para la obtención de empresas de base tecnológicas para su propagación en campo, invernaderos o *in vitro*. La visión para generar una empresa basada en el cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas* ayudará a solucionar uno de los problemas para la producción a gran escala de plantas elite y mejoradas genéticamente; para la creación de este tipo de empresas es necesario utilizar herramientas como el roadmapping o mapas de de-

Gilbert José Herrera Cool, Javier Rivera Ramírez,  
Ariel Vázquez Elorza, Guadalupe López Puc

241