



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.



**Determinación de la variación genética del híbrido interespecífico
entre *Jatropha curcas* × *Jatropha integerrima***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA

PRESENTA

JUAN JORGE LATOUR GORDILLO

DIRECTORA: Dra. Guadalupe López Puc

CODIRECTOR: Dr. Rodrigo Barba González

ASESOR: Dra. Erika Mellado Mojica

MÉRIDA, YUCATÁN. MÉXICO, Febrero de 2020



Guadalajara, Jalisco, México, febrero de 2020

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este punto provienen en las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las unidades y laboratorios del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenecen patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaran de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente declaración.

Juan Jorge Latour Gordillo

Guadalajara, Jalisco a 28 de enero de 2020

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 de la estudiante Juan Jorge Latour Gordillo, una vez leída y revisada la Tesis titulada “DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN GENÉTICA DEL HÍBRIDO INTERESPECÍFICO ENTRE JATROPHA CURCAS × JATROPHA INTEGERRIMA” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias de la Floricultura con la opción terminal en Mejoramiento genético, durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al 28 de enero del dos mil veinte.



Dra. Guadalupe López Puc

Director de tesis/tutor académico



Dr. Rodrigo Barba González

Co-director de tesis/tutor en planta



Dra. Erika Mellado Mojica

Asesor/Asesora



Guadalajara, Jalisco, a 18 de febrero de 2020

CP/230/2020

JUAN JORGE LATOUR GORDILLO
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA FLORICULTURA
NÚMERO DE MATRÍCULA 1701PF6377
PRESENTE

Por este medio le informo que el trabajo de tesis "**Determinación de la variación genética del híbrido interespecífico entre *Jatropha curcas* x *Jatropha integerrima***" desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dra. Guadalupe López Puc Directora de tesis
Dr. Rodrigo Barba González. Co-director de tesis
Dra. Erika Mellado Mojica. Asesora

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la floricultura

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo

ATENTAMENTE



Fátima Gabriela Ordóñez de la Cruz
Coordinadora de Posgrados



LIBERACIÓN DEL SÍNODO



Mérida, Yucatán a 28 de febrero de 2020

Dr. Rodrigo Barba González
Coordinador Académico de la Maestría
en Ciencias de la Floricultura
Guadalajara, Jalisco.

Los que suscriben integrantes del jurado de examen de grado del estudiante Juan Jorge Latour Gordillo, una vez leída y revisada la Tesis titulada “**Determinación de la variación genética del híbrido interespecífico entre *Jatropha curcas* × *Jatropha integerrima***” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencias de la Floricultura durante el examen correspondiente.

Y para que así, conste firmamos la presente al 28 del mes de Febrero del 2020.

Dr. Gilbert José Herrera Cool
Presidente

Dra. Ana Luisa Ramos Díaz
Secretaria

Dra. Guadalupe López Puc
Vocal



JUNTA DIRECTIVA

Título

**Determinación de la variación genética del híbrido interespecífico entre *Jatropha curcas*
× *Jatropha integerrima***

Presenta: Juan Jorge Latour Gordillo

Junta directiva:

Directora: Dra. Guadalupe López Puc

Co-directora: Dr. Rodrigo Barba González

Asesora: Dra. Erika Mellado Mojica

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a la directora de esta tesis, Dra. Guadalupe López Puc, por permitirme ser parte de su equipo de investigación, por su guía y dirección para la culminación de este trabajo y por todo el conocimiento adquirido durante mi estancia en su laboratorio.

Quiero agradecer a los integrantes de mi comité tutorial, Dra. Erika Mellado Mojica y Dr. Rodrigo Barba González, por sus comentarios y sugerencias para el desarrollo de esta tesis.

Agradezco al Dr. Gil Herrera Cool y Dr. Erick Aguilera Cauich, por compartir su experiencia y contribuir a la realización de este trabajo.

A la Dra. Elida Gastelum Martínez, Dr. Zahaed Evangelista Martínez y Dr. Manuel Sucre Ramírez por sus consejos, su apoyo incondicional y desmesurado y, finalmente pero no menos importante, la amistad que se forjó durante este tiempo.

A mis compañeros, Luis, Yuli, Betsy, Inés, María José, Julio y Daniel, por hacer más amena mi estadía en el centro de investigación.

Agradezco al CONACYT por la beca (N° 797362) autorizada durante la realización de esta tesis, incluyendo el apoyo brindado para mi estancia en el extranjero, y por el financiamiento brindado para este proyecto (N° 163502).

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo, gracias.

DEDICATORIAS

Esta tesis está dedicada a:

A la memoria de mi Papá, Jorge, porque tu enseñanza me ayuda a enfrentar la vida y tu ejemplo me estimula a ser una mejor persona. Estoy orgulloso de ti por tu dedicación y valor, porque sé que me diste todo lo que tenías. Aunque no pude despedirme de ti, llevo muy dentro de mi tu amor y cariño. Hoy, Padre Querido, te dedico mi tesis y en mis memorias vivirás para toda la vida.

A mi esposa, Daniela, por ser una maravillosa persona, por todo su amor y cariño, por siempre darme ánimo en todo momento, por ser mi mejor amiga y compañera en la vida. Esta meta también es un logro para ti.

I. ÍNDICE DE CONTENIDO

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1. Generalidades del genero <i>Jatropha</i> | 4 |
| 2.1.1. Características de <i>Jatropha curcas</i> | 5 |
| 2.1.2. Características de <i>Jatropha integerrima</i> | 6 |
| 2.2. Mejoramiento genético | 8 |
| 2.2.1. Técnicas de mejoramiento genético por cultivo <i>in vitro</i> | 8 |
| 2.2.2. Métodos de ingeniería genética. | 10 |
| 2.2.3. Técnicas de mejoramiento genético por métodos convencionales..... | 14 |
| 2.2.3.1. Cruzas dialélicas. | 14 |
| 2.2.3.2. Selección masal. | 15 |
| 2.2.3.3. Cruza interespecífica. | 16 |
| 2.4. Rescate de embriones. | 18 |
| 2.5. Técnicas para analizar la hibridación. | 19 |
| 2.5.1. Técnicas moleculares. | 19 |
| 2.5.1.1. Marcadores ISSR..... | 20 |
| 2.5.1.2. Marcadores DAMD..... | 20 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 22 |
| JUSTIFICACION..... | 23 |
| HIPOTESIS | 24 |
| OBJETIVOS..... | 25 |
| 6.1. Objetivo general. | 25 |
| 6.2. Objetivos específicos. | 25 |

| | |
|--|----|
| METODOLOGIA..... | 26 |
| 7.1 Selección de parentales e inflorescencias femeninas de <i>J. curcas</i> | 26 |
| 7.2 Establecimiento del cultivo y selección de inflorescencias del parental <i>J. integerrima</i> | 26 |
| 7.3 Polinización de <i>J. curcas</i> con <i>J. integerrima</i> | 27 |
| 7.4 Colecta y establecimiento <i>in vitro</i> de embriones y semillas híbridas..... | 29 |
| 7.5 Callogénesis en hojas híbridas de la cruce entre <i>J. curcas</i> y <i>J. integerrima</i> . 29 | |
| 7.6. Análisis molecular de parentales e híbridos. | 29 |
| 7.6.1.1 Extracción de ADN de explantes de <i>J. curcas</i> y <i>J. integerrima</i> | 29 |
| 7.6.1.2 Extracción de ADN del híbrido. | 30 |
| 7.6.2 Amplificación del ADN de parentales e híbridos mediante la técnica de la PCR..... | 30 |
| 7.6.2.1. Marcadores DAMD..... | 30 |
| 7.6.2.2. Marcadores ISSR. | 31 |
| 7.6.3. Electroforesis..... | 32 |
| 7.6.4. Interpretación del perfil de bandeo. | 32 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 33 |
| Conclusiones..... | 52 |
| PERSPECTIVAS | 53 |
| REFERENCIAS | 54 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Marcadores moleculares DAMD de <i>J. curcas</i> | 31 |
| Tabla 2. Marcadores moleculares ISSR de <i>J. integerrima</i> | 31 |
| Tabla 3. Medidas de los frutos híbridos..... | 35 |
| Tabla 4. Matriz binaria para el patrón de bandeo. | 41 |
| Tabla 5. Análisis SIMQUAL | 43 |
| Tabla 6. Coeficiente de similitud entre parentales e híbridos con marcadores ISSR. | 44 |
| Tabla 7. Matriz binaria del patrón de bandeo de los marcadores ISSR. | 45 |
| Tabla 8. Análisis SIMQUAL | 48 |
| Tabla 9. Matriz binaria general de los marcadores DAMD e ISSR..... | 48 |
| Tabla 10. Análisis SIMQUAL de similitud | 50 |

II. ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Especies del genero <i>Jatropha</i> de interés comercial, agrícola y ornamental. | 4 |
| Figura 2. Puntos georreferenciados de especies del genero <i>Jatropha</i> en México. . | 5 |
| Figura 3. Cultivo de <i>J. curcas</i> L. var Sikilte. | 6 |
| Figura 4. Cultivo de <i>J. integerrima</i> en vivero. | 7 |
| Figura 5. Esquema metodológico de cultivo de tejidos para evaluar variantes somaclonales. | 9 |
| Figura 6. Esquema del proceso de degradación de la pared celular para obtener protoplastos. | 10 |
| Figura 7. Procesos de transformación vegetal por medio de <i>Agrobacterium</i> | 11 |
| Figura 8. Transformación genética por biolística. | 12 |
| Figura 9. Edición de genes utilizando el sistema CRISPR-Cas. | 14 |
| Figura 10. Diagrama ejemplificando un modelo de cruza dialélicas. | 155 |
| Figura 11. Proceso de selección masal. | 16 |
| Figura 12. Esquema de la cruza interespecífica de <i>J. curcas</i> con <i>J. integerrima</i> . . | 17 |
| Figura 13. Diagrama de la cruza interespecífica. | 18 |
| Figura 14. Inflorescencias y anteras con polen. | 27 |
| Figura 15. Polinización manual de <i>J. curcas</i> | 28 |
| Figura 16. Inflorescencias femeninas de <i>J. curcas</i> polinizadas y protegidas con bolsas de papel en campo. | 28 |
| Figura 17. Etapas del establecimiento del parental masculino, <i>J. integerrima</i> , en condiciones de casa sombra. | 33 |
| Figura 18. Establecimiento de las estacas de <i>J. integerrima</i> en campo. | 34 |
| Figura 19. Frutos híbridos colectados para la obtención de semillas y rescate de embriones. | 35 |
| Figura 20. Diagrama de la compatibilidad o incompatibilidad polen-pistilo entre la cruza interespecífica del genero <i>Jatropha</i> | 36 |
| Figura 21. Germinación <i>in vitro</i> de semilla híbrida. | 37 |
| Figura 22. Germinación de embriones híbridos <i>in vitro</i> | 38 |
| Figura 23. Callo híbrido obtenido de explantes de hoja. | 39 |

| | |
|--|----|
| Figura 24. Extracciones del ADN total de los parentales y el híbrido en gel de agarosa al 1% | 40 |
| Figura 25. Bando observado en gel de agarosa al 1% de la amplificación de ADN con los marcadores DAMD..... | 41 |
| Figura 26. Dendograma de similitud DICE entre los parentales e híbridos del genero <i>Jatropha</i> con marcadores DAMD. | 42 |
| Figura 27. Dendograma de similitud de DICE de los parentales e híbridos con marcadores ISSr. | 44 |
| Figura 28. Dendograma de las 5 accesiones de <i>J. curcas</i> y 2 accesiones de <i>Jatropha intergerrima</i> | 46 |
| Figura 29. Dendograma de las 5 accesiones de <i>J. curcas</i> | 47 |
| Figura 30. Dendograma de las 3 especies de <i>Jatropha</i> : <i>J. curcas</i> , <i>J. integerrima</i> e híbrido. | 50 |
| Figura 31. Planta híbrida en maceta. | 51 |

III. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|----------------------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADN-T | ADN de transferencia |
| ARNrc | ARN corto y maduro |
| Cas9 | Sistema asociado a CRISPR |
| Cm | Centímetro |
| CRISPR | Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas |
| DAMD | Amplificaciones directas de ADN minisátelites, por sus siglas en inglés |
| DDE | Días después del establecimiento |
| DDP | Días después de la polinización |
| H1 | Generación de híbridos 1 |
| IISH | Híbrido específico 2 |
| ISH | Híbrido específico 1 |
| ISSR | Inter-simple secuencias repetidas |
| JC | Jatropha curcas |
| JI | Jatropha integerrima |
| M | Metro |
| Mm | Milímetro |
| Pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés |
| pre-ARNr | ARN precursora de CRISPR |
| PVP | Polivinilpirrolidona |
| R | Replica |
| RAPD | Amplificación aleatoria del ADN polimórfico |
| RCV | Reguladores del crecimiento vegetal |
| RFLP | Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción |
| SSR | Secuencias simples repetidas |
| T_a | Temperatura de alineamiento |
| TAE | Tris-Acetato-EDTA |
| VS | Variaciones somaclonales |

RESUMEN

En este trabajo se efectuó mejoramiento genético con el objetivo de generar una nueva variedad que pueda posteriormente ser comercializada con fines ornamentales. La variedad nueva se obtuvo mediante la cruce interespecífica entre *Jatropha curcas* X *Jatropha integerrima*, la cual se realizó mediante polinización cruzada artificial, siendo *J. integerrima* la donadora de polen para *J. curcas*, por lo cual se cubrieron las inflorescencias femeninas previas a la antesis para evitar polinización externa o autopolinización, después de la polinización las inflorescencias se cubrieron hasta la obtención de frutos. Se recolectaron frutos en diferentes periodos de maduración, para evitar pérdidas de material en dado caso que los frutos no llegaran a su desarrollo final y se germinaron *in vitro* hasta la obtención de plántulas. Las plántulas germinadas sirvieron para la obtención de explantes de hojas para la extracción y purificación del ADN genómico utilizando la combinación de dos metodologías de extracción y su amplificación por PCR utilizando marcadores moleculares ISSR y DAMD, visualizando mediante electroforesis el patrón de bandeo, así como para inducir a la callogénesis y multiplicar el material vegetal. Para el análisis de resultados se hizo una matriz binaria con 1 y 0 (Presencia y ausencia), y el patrón de bandeo se analizó con ayuda del software Gel Analyzer 2010, de igual manera se realizaron arboles filogenéticos con los parentales y el híbrido para ver la distancia que existe entre un parental de otro y entre el híbrido determinado la cercanía genética, determinando la variación genética, así como el parental dominante en el híbrido.

INTRODUCCIÓN

La floricultura a nivel nacional genera ganancias anuales de aproximadamente \$5,646 millones de pesos. A nivel mundial, los principales productores en la industria de la Floricultura destacan Holanda, Colombia, Ecuador, Etiopía y Kenia, parte del éxito de estos países es que constantemente están generando nuevas variedades con nuevas características que atraen al consumidor. En México se requiere de la generación de nuevas variedades al catálogo nacional de variedades vegetales, que, a parte del valor económico y comercial, es el aporte para enriquecer la diversidad genética de las especies endémicas y nativas esto por efecto de la especiación que se pueda llevar a cabo por la introducción de nuevas variedades.

El mejoramiento genético es una herramienta útil cuando se trabaja con especies vegetales para la obtención de nuevas variedades o para incrementar características de interés. Existen diversos métodos para realizar el mejoramiento genético en especies vegetales, que pueden ir desde técnicas novedosas de ingeniería genética hasta los métodos convencionales como las cruzas entre individuos para generar cambios morfológicos y/o moleculares, estas cruzas pueden ser intergéricas, intraespecíficas o interespecíficas. Sin embargo, existen algunas desventajas al realizar este tipo de mejoramiento, ya que las plantas cuentan con mecanismos para evitar ciertos cruzamientos, a estos mecanismos se les conoce como barreras reproductivas, las cuales, pueden ser precigóticas o postcigóticas. La crusa interespecífica es una herramienta de mejoramiento genético, mediante el método convencional, en el que, dos especies del mismo género, pero de diferente especie son cruzadas para obtener un híbrido.

El género *Jatropha* cuenta con diferentes especies de interés comercial y económico siendo *J. curcas* la especie insignia debido a las propiedades que caracterizan a su fruto ya que presenta grandes cantidades de aceites vegetales que son usados para la producción de biocombustibles. Por otro lado, hay especies con potencial ornamental, como *J. intergerrima* que presenta características ornamentales deseables entre ellas, porte medio, elevado número de ramas e inflorescencias grandes de color rojo carmesí.

Por lo general, la realización de una cruce interespecífica no garantiza la obtención de híbridos, pues, existen factores ambientales y fisiológicos que pueden evitar el éxito de la misma. Debido a esto, se emplean técnicas e instrumentos que nos ayudan a comprobar el éxito de la cruce interespecífica como las herramientas de biología molecular. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se planteó realizar una cruce interespecífica entre *J. curcas* con *J. integerrima* con el fin de obtener una nueva variedad con potencial ornamental.

ANTECEDENTES

2.1. Generalidades del género *Jatropha*.

El género *Jatropha* ocupa el 6% de la familia *Euphorbiaceae*, se encuentra integrado aproximadamente por 175 especies (Kolawole *et al.*, 2016; Fresnedo- Ramírez *et al.*, 2013). *Jatropha* está compuesto principalmente por árboles, subarbustos rizomatosos, plantas anuales y geófitas, que se encuentran distribuidas principalmente en zonas de climas tropicales como América, África y Asia (Fresnedo-Ramírez *et al.*, 2013; Sujatha y Prabakaran, 2003).

Dentro de este género existen diferentes especies con características de interés comercial, agrícola u ornamental (Tanya *et al.*, 2011). Por ejemplo: *Jatropha curcas*, *Jatropha gossypifolia*, *Jatropha integerrima* y *Jatropha podagrica* (Figura 1).



Figura 1. Especies del género *Jatropha* de interés comercial, agrícola y ornamental: (A) *J. integerrima*; (B) *J. curcas* var *Sikilte*; (C) *J. gossypifolia*; (D) *J. podagrica*.

Este género se encuentra ampliamente distribuido en México, usualmente por todo el centro, norte y sur del país (Figura 2). Su distribución no solo toma en cuenta los plantíos establecidos para parcelas experimentales, sino lugares en los que existen reportes de diversas especies del género *Jatropha*.



Figura 2. Puntos georreferenciados de especies del género *Jatropha* en México.

Fuente: <https://www.naturalista.mx/taxa/119100-Jatropha>

2.1.1. Características de *Jatropha curcas*.

De manera particular *J. curcas* (Figura 1B), es una especie que se usa principalmente como una alternativa al uso de combustibles derivados del petróleo mediante la producción de biodiesel gracias a los altos contenidos de aceites vegetales que produce en sus semillas (Ovando-Medina *et al.*, 2011). 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 menos una variedad con alto rendimiento agronómico, alto contenido de aceite y baja toxicidad para la obtención de biodiesel (número de proyecto: 163502) y una de las variedades registradas por el proyecto es la denominada *J. curcas* var Sikilte. Esta variedad presenta rendimiento promedio por hectárea de 4.5 toneladas en el año 2, 35% de contenido de aceite (con testa y extracción mecánica), ciclo de producción de 2 veces al año (mayo y septiembre – enero), porte semierguido, de altura promedio de 1.91 m, con 5 ramas principales en promedio, tolerancia

intermedia a enfermedades, buena tolerancia a sequias y temperaturas bajas (Figura 3A) (Góngora-Canul *et al.*, 2018).

Esta variedad se caracteriza por solo producir inflorescencias femeninas (FOF) (Figura 3C). Los frutos de *J. curcas* var Sikilte (Figura 3B) presentan semillas con las siguientes particulares: cada semilla pesa en promedio 0.94 g, para obtener un kilo se necesitan de aproximadamente 1,064 semillas, presentan una forma oblonga con longitud promedio de 19.1 mm, ancho de 11.3 mm y grosor de 9.4 mm (Góngora-Canul *et al.*, 2018).



Figura 3. Cultivo de *J. curcas* L. var Sikilte. (A) Árbol establecido en campo; (B) Inflorescencias de *J. curcas*; (C) Frutos de *J. curcas*.

2.1.2. Características de *Jatropha integerrima*.

Por otro lado, *J. integerrima* (Figura 4A), es una especie comúnmente denominada como “*peregrina*” o “*Jatropha picante*”. Es una especie con alto potencial ornamental debido a sus inflorescencias de tamaño grande y coloración rojo carmesí (Figura

4B). Puede llegar a alcanzar alturas de 2 a 3 metros, con una forma de corona redonda o forma de florero, con follaje todo el año (Gilman y Watson, 1993).

J. integerrima no presenta producción de frutos extensa (Figura 4C). Esta especie se ha nacionalizado en varias regiones de América, principalmente las regiones con climas tropicales o subtropicales. Esta planta tiene alto potencial ornamental debido a que presenta flores todo el año (Sujatha *et al.*, 2000). Los requerimientos para su cultivo son mínimos, no necesita grandes cantidades de agua y puede desarrollarse tanto en sol directo como en semi sombra (Muakrong *et al.*, 2014).



Figura 4. Cultivo de *J. integerrima* en vivero. (A) Árbol en maceta de *J. integerrima*; (B) Inflorescencias; (C) Fruto.

Gracias a las características descritas anteriormente de *J. integerrima* y *J. curcas*, la cruce interespecífica de estas dos especies podría garantizar obtener al menos una híbrido con potencial ornamental o potencial productivo, pues *J. integerrima* cuenta con aceites vegetales dentro de sus frutos (Subashini *et al.*, 2015).

2.2. Mejoramiento genético

El mejoramiento genético se puede obtener por diferentes vías, que van desde sembrar una semilla y cubrir las necesidades específicas que no tendría de manera silvestre, tanto como en un laboratorio haciendo modificaciones en alguna de las secuencias de nucleótidos de su ADN (Cubero Salmerón, 2013). Muchas especies vegetales han sido mejoradas genéticamente con el fin de incrementar el aprovechamiento de la planta. Dentro de las técnicas para realizar mejoramiento genético podemos mencionar el cultivo *in vitro*, métodos de ingeniería genética y los métodos convencionales.

2.2.1. Técnicas de mejoramiento genético por cultivo *in vitro*

Las técnicas de mejoramiento por cultivo *in vitro* son aquellas que permiten hacer modificaciones en las plantas bajo condiciones controladas y asépticas, entre ellas podemos mencionar la variación somaclonal. Esta técnica, es un enfoque alternativo al mejoramiento convencional y los productos transgénicos para introducir una variabilidad genética deseable en el acervo genético. Las variaciones somaclonales (VS) que ocurren espontáneamente en el cultivo inducen cambios en una variedad de caracteres de plantas. Sin embargo, la probabilidad de mejorar un rasgo agronómico, como la resistencia a la enfermedad, puede ser un reto cuando se deja solo al azar. La eficacia de desarrollar VS resistentes a enfermedades es mejor con la imposición de una presión de selección *in vitro* apropiada (Figura 5). Los agentes de selección que se han aplicado incluyen inductores de patógenos, filtrado de cultivos de patógenos y patotoxinas purificadas. Este método de selección de VS ha tenido éxito en mejorar la resistencia a enfermedades en varios cultivos y es un enfoque biotecnológico aceptado con un tremendo potencial para el mejoramiento de cultivos (Anil *et al.*, 2018).

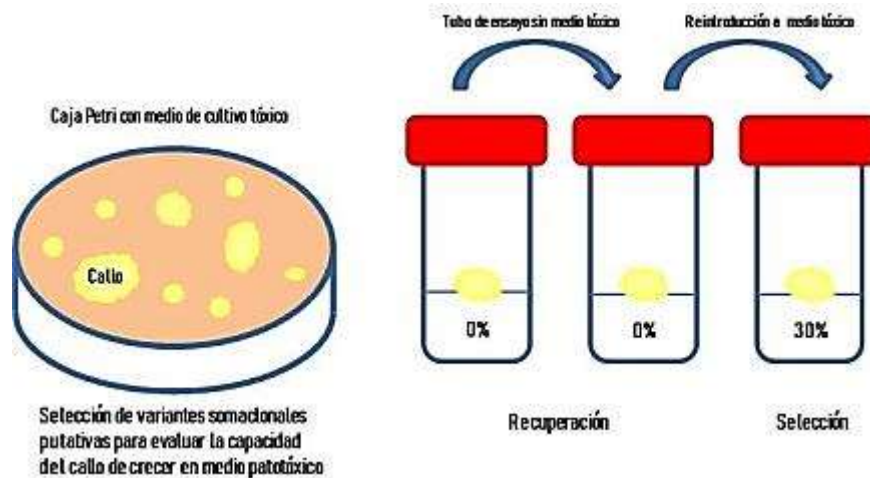


Figura 5. Esquema metodológico de cultivo de tejidos para evaluar variantes somaclonales.

Otra técnica de mejoramiento genético *in vitro* es la generación y fusión de protoplastos, estos son células desprovistas de pared celular, mediante procesos enzimáticos y/o mecánicos de degradación, para exponer a la célula a un entorno sin ningún tipo de protección o barrera física que evite el ingreso de agentes externos (Ayala, 2007) (Figura 6). De esta manera al eliminar las barreras físicas de la célula, se puede producir el mejoramiento genético asociado a esta técnica, mediante la hibridación somática o fusión de protoplastos, mediante el cual se proveen las oportunidades de pasar las barreras de aislamiento reproductivo, facilitando el flujo de genes entre la misma especie e incluso entre diferentes especies (Ayala, 2007).

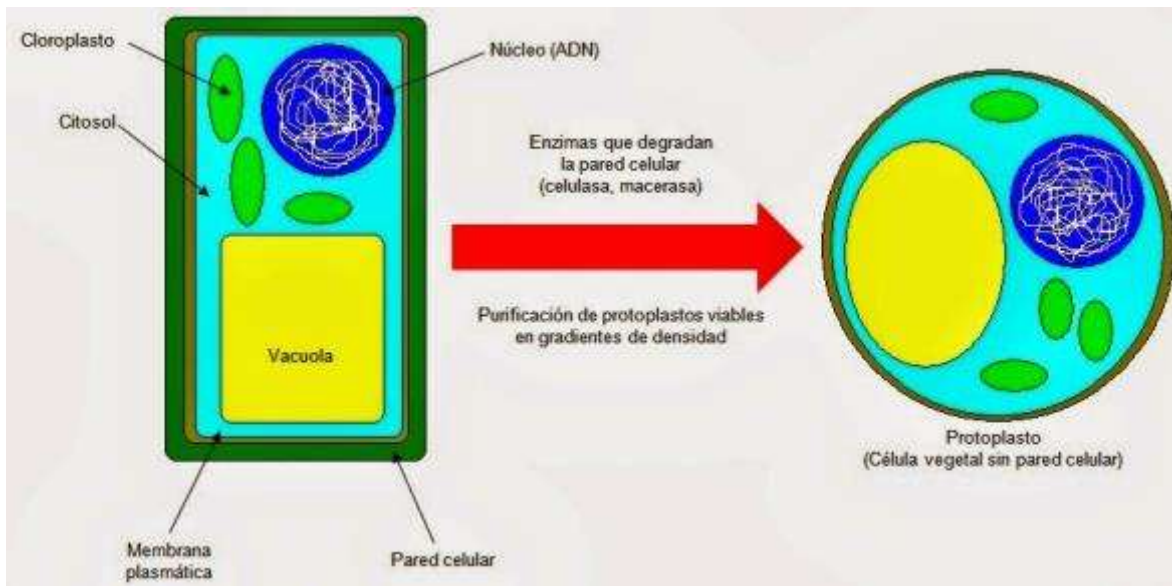


Figura 6. Esquema del proceso de degradación de la pared celular para obtener protoplastos.

2.2.2. Métodos de ingeniería genética.

Los métodos de ingeniería genética se empezaron a utilizar a partir de 1977, cuando se demostró la presencia de un fragmento de ADN de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* al aislar tumores axénicos de la agalla de la corona en tabaco (Chilton *et al.*, 1977). Las especies de *Agrobacterium* son patógenas de plantas capaces de integrar establemente parte de su material genético al genoma de su hospedador. *Agrobacterium* transforma plantas genéticamente al transferir una región de ADN plasmídico, ADN-T (ADN de transferencia), a células vegetales. Los genes del ADN-T se expresan en el hospedero para inducir la formación de tumores o raíces y la síntesis de opinas, derivados de aminoácidos útiles para la bacteria. Además, el ADN-T contiene los genes *vir*, que son necesarios para que el fragmento de ADN bacteriano se transfiera e incorpore al genoma de la planta (Figura 7).

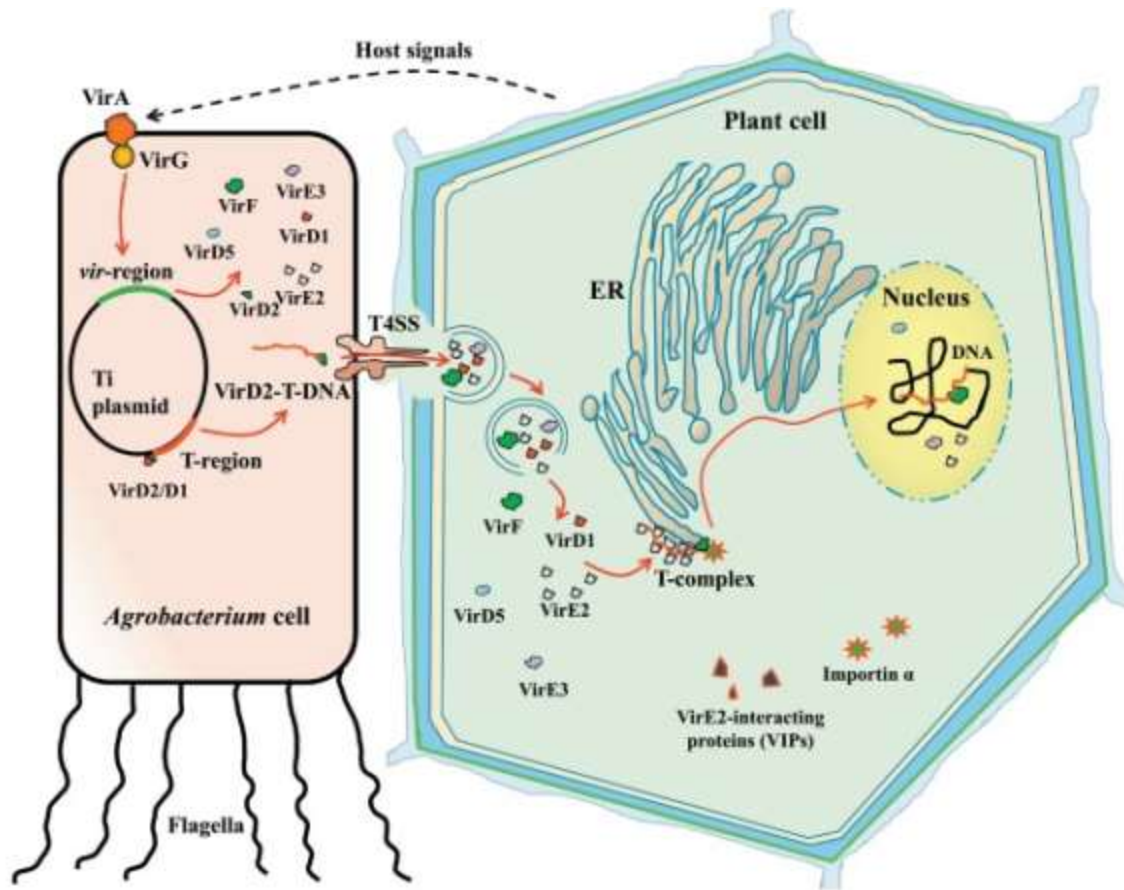


Figura 7. Procesos de transformación vegetal por medio de *Agrobacterium*.

Al descubrir que los genes *vir* son imprescindibles para que la transferencia de material genético, diera inicio al diseño de vectores para transformación genética de especies vegetales (Garfinkel *et al.*, 1981) (Zambryski *et al.*, 1983). Desde entonces, la inserción de genes y sus elementos reguladores al ADN-T ha permitido realizar mejoras a especies de importancia agronómica. También, ha servido para estudiar la función y expresión de genes, esto ha ayudado a desarrollar plantas con nuevas características (Gelvin, 2003).

Por otro lado, la biobalística, o bombardeo de partículas, como un método para la producción de plantas transgénicas, como una alternativa a la transformación con protoplastos. En lo que respecta a plantas, las principales aplicaciones de la biobalística incluyen estudios de expresión génica transitoria, producción de plantas

transgénicas e inoculación de plantas con patógenos virales. Las construcciones genéticas para biobalística pueden estar en forma de plásmidos circulares o lineales o un casete de expresión lineal (Figura 8). Los cultivos de células embriogénicas son probablemente los mejores explantes que se utilizan para la transformación biobalística, ya que pueden extenderse como objetivos uniformes de las células y tener una alta capacidad de recuperación (Kikkert *et al.*, 2005) En algunos cereales recalcitrantes, como el arroz y el trigo, la biobalística se ha convertido en un método reproducible para la transformación pues se ha alcanzado una eficiencia del 50% (Li *et al.*, 1993 ; Bliffeld *et al.*, 1999) Además, la primera transformación estable de una conífera comercialmente importante, *Picea glauca*, se logró a través de callo embriogénico, como explante, y biobalística (Ellis *et al.*, 1993).

Como todo, el bombardeo de partículas presenta algunas desventajas. Por ejemplo, la eficiencia de transformación es menor que con la transformación mediada por *Agrobacterium* y también es más costosa. Los objetivos intracelulares son aleatorios y el ADN no está protegido contra daños. Esto produce una alta frecuencia de patrones de integración complejos e inserciones de copias múltiples que pueden causar el silenciamiento de genes y la variación de la expresión del transgén (Dai *et al.*, 2001; Darbani *et al.*, 2008).

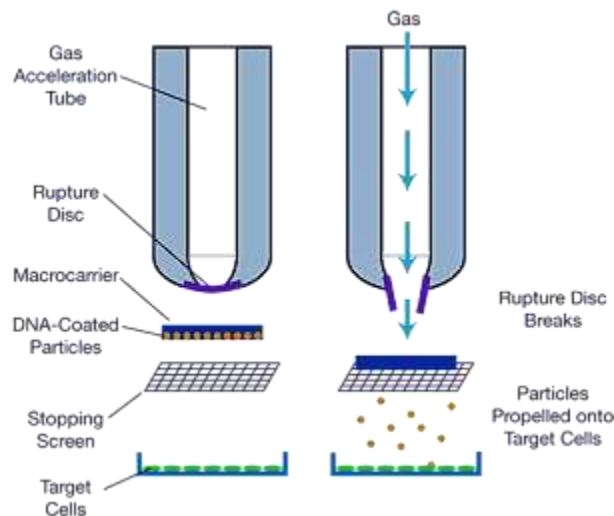


Figura 8. Transformación genética por biobalística.

Una de las técnicas recientes en ingeniería genética es el sistema CRISPR/Cas, el cual, es un mecanismo muy diverso de inmunidad adaptable utilizado por algunas bacterias y arqueas para protegerse de virus invasores, plásmidos y otros ácidos nucleicos extraños (Barrangou *et al.*, 2007; Horvath *et al.*, 2010). Los CRISPR consisten en una sucesión de secuencias repetidas cortas muy conservadas, de 23 a 44 pb de longitud, separadas por "espaciadores" de tamaño similar. Estos espaciadores son secuencias únicas que generalmente se originan a partir de fagos o ADN plasmídico (Brouns *et al.*, 2008). Estos sistemas adaptativos pueden aprender a reconocer las características específicas de los patógenos invasores. La adición de estos motivos al genoma del huésped permite el reconocimiento y la destrucción de invasiones posteriores de patógenos genéticamente similares. Los genes cas codifican proteínas esenciales para la actividad CRISPR. La genómica comparativa de genomas bacterianos y arqueales ha sugerido más de 45 familias de genes cas. Los únicos dos de estos genes presentes en las 45 familias son cas1 y cas2; ambos de los cuales están involucrados en la adquisición de espaciadores (Haft *et al.*, 2005).

El sistema de inmunidad CRISPR / Cas se compone de tres etapas: adaptación, expresión e interferencia (Figura 9). La etapa de adaptación involucra el reconocimiento y la división de un protoespaciador de la invasión del ADN por los genes cas. La posterior inserción de ADN extraño, espaciadores, en el locus CRISPR también se conoce como adquisición de espaciador o inmunización. La etapa de expresión está relacionada a la expresión de los genes cas relevantes y sus proteínas que conducen a la transcripción de la matriz CRISPR en una molécula de ARN larga llamada ARN precursora de CRISPR (pre-ARNr). Las proteínas Cas y otros factores accesorios luego procesan esto aún más en ARNrc corto y maduro. En la etapa final de interferencia, este ARNrc maduro y otras proteínas cas reconocen el ácido nucleico extraño y lo destruyen. Esto también se conoce como la etapa de inmunidad (Makarova *et al.*, 2006). Es importante mencionar que estas etapas pueden presentar variaciones según el sistema CRISPR que se trate.

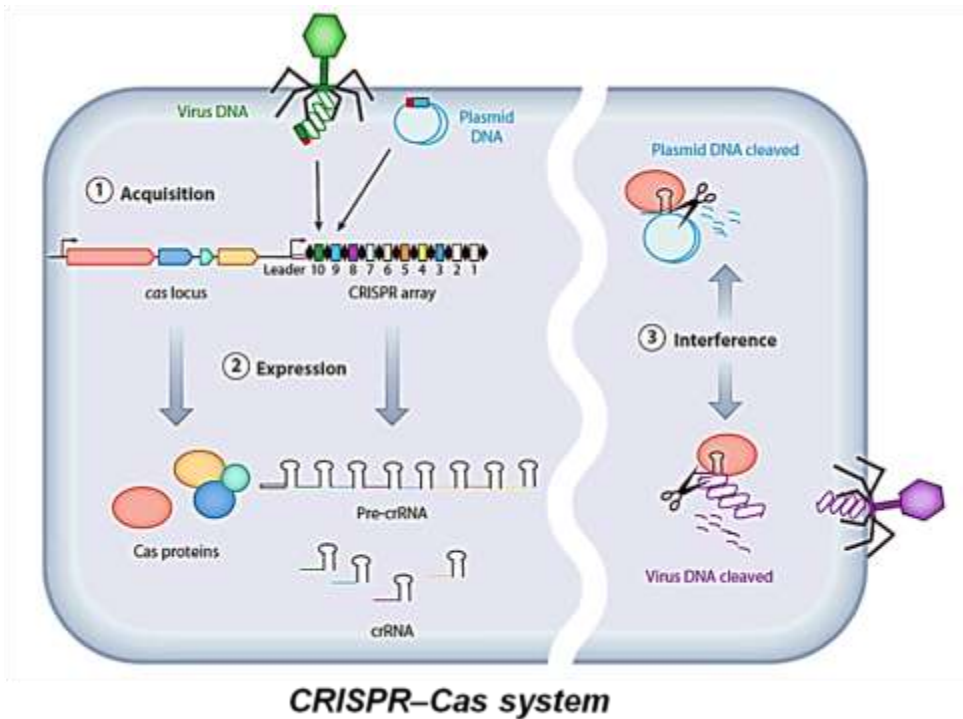


Figura 9. Edición de genes utilizando el sistema CRISPR-Cas.

2.2.3. Técnicas de mejoramiento genético por métodos convencionales.

2.2.3.1. Cruzas dialélicas.

Las cruas dialélicas, son aquellas que se realizan entre un número de individuos de variedades o líneas puras (Gilbert, 1958). Con las cruas dialélicas se busca lograr el máximo número de combinaciones posibles entre individuos, con el fin de obtener una cantidad significativa de híbridos, a partir de los cuales se puede realizar la selección de individuos con características agronómicas deseadas o mejoradas para la obtención de una progenie con características definidas en relación a la altura, follaje, producción (Barreta *et al.*, 2019) (Figura 10).

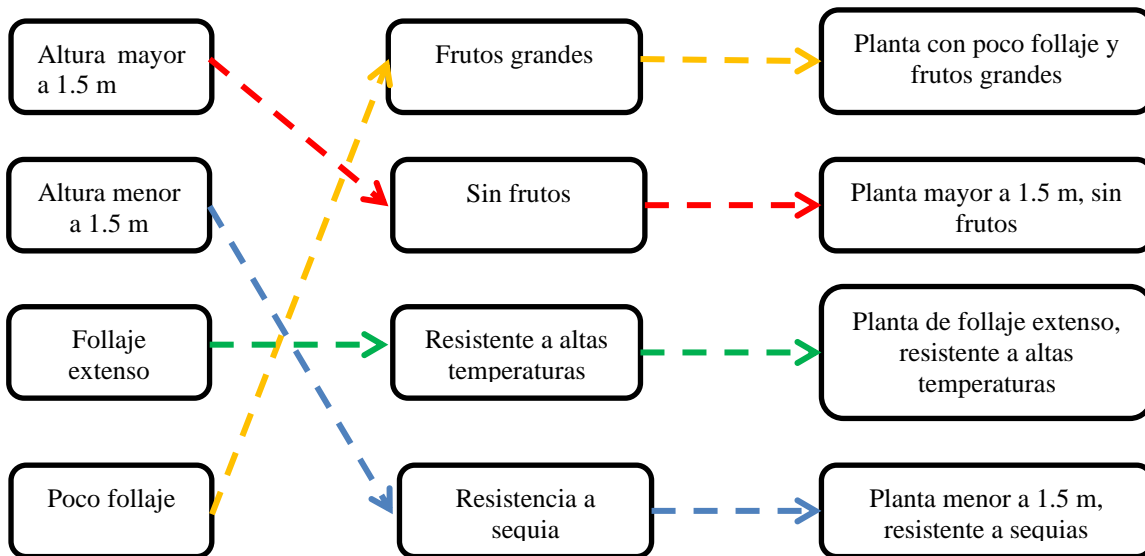


Figura 10. Diagrama ejemplificando un modelo de cruces dialélicas. En la primera columna las características de interés de los parentales masculinos, en la segunda columna características de los parentales femeninos y en la columna tres, la progenie con la combinación de caracteres. En estas cruces todos los individuos de la primera columna, se cruzan con todos los individuos de la segunda columna, dando un total de 16 progenies diferentes ($4 \times 4 = 16$).

Para realizar las cruces dialélicas es necesario tomar en cuenta ciertos puntos, los cuales son: 1) los progenitores deben ser homocigotos, 2) deben presentar segregación diploide, 3) no deben existir diferencias entre los híbridos H1 y sus recíprocos, 4) no presentar ligamiento, 5) no presentar alelismo múltiple, 6) ausencia de interacción alélica y 7) distribución independiente de genes (Barreta *et al.*, 2019).

2.2.3.2. Selección masal.

Divakara *et al.* (2010), se refiere a la selección masal o selección de masas, como un método antiguo de selección fácil y simple. Esta técnica consiste en tres etapas: 1) seleccionar plantas en función de su rendimiento fenotípico, 2) utilizar las semillas de las plantas seleccionadas para producir la generación a utilizar en el mejoramiento genético mediante esta técnica, 3) una vez obtenida la generación para realizar el mejoramiento genético realizar una regresión progenitora positiva, la cual es dependiente de los efectos ambientales (Figura 11).

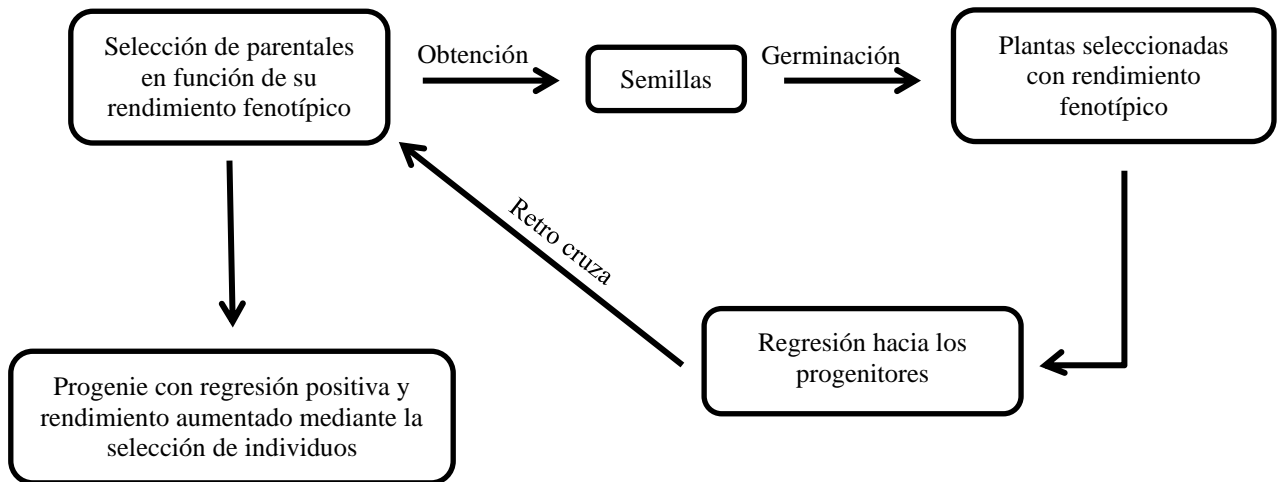


Figura 11. Proceso de selección masal.

2.2.3.3. Cruza interespecífica.

La cruce interespecífica es una técnica utilizada en el mejoramiento genético convencional para la creación de híbridos resaltando las mejores características de los padres. Sin embargo, gracias a la hibridación podemos obtener múltiples progenies debido a que existen diferentes formas de integrar la información y diferentes porcentajes de fusión al unir los gametos sexuales durante el cruzamiento. De igual manera, podemos obtener híbridos viables que tengan una germinación normal y presentar características distintas a los padres u obtener quimeras, las cuales no podrán reproducirse o tendrán un ciclo de vida muy corto. La hibridación en especies vegetales por medio de la cruce interespecífica nos puede ayudar a generar características deseables como por ejemplo: obtener flores de diversos colores, tamaños y formas (Figura 12) (Hieber *et al.*, 2006; Lieb *et al.*, 2017; Naeem *et al.*, 2017; Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2016).

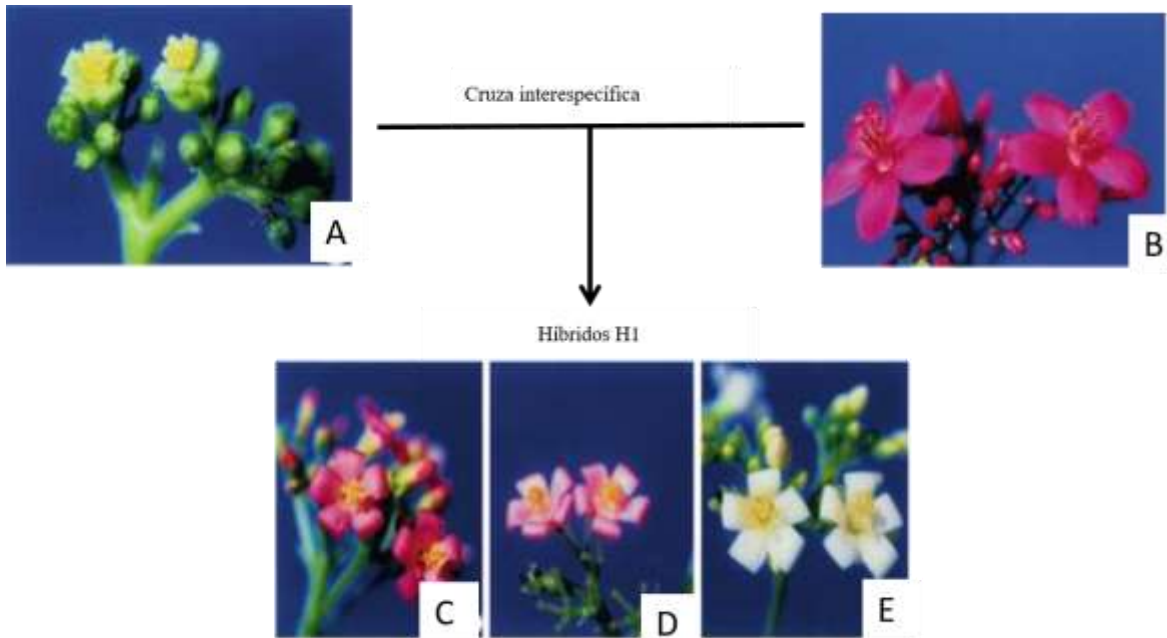


Figura 12. Esquema de la cruce interespecífica de *J. curcas* con *J. integerrima*: (A) Inflorescencia del parental femenino de *J. curcas* L.; (B) inflorescencia del parental masculino de *J. integerrima* L.; (C), (D) y (E) Inflorescencias de los híbridos H1 generados a partir de la cruce interespecífica de *J. curcas* con *J. integerrima*

En especies ornamentales la cruce interespecífica ha permitido obtener variedades con mayores rendimientos, mayor variedad de formas y colores en las flores al emplear especies que comparten el género pero no la especie se presentan características muy diversas después de realizar las cruces como el caso de los híbridos obtenidos mediante la cruce interespecífica de *Lilium* cultivares Dordogne, Casa Blanca, White Heaven como progenitores femeninos y América, Brunello, Avelino, Vermeer y Pollyana generaron progenies viables y no viables (Mendoza-Villaseñor y Barba-González, 2006).

Karanam y Bhavanasi (2010) publicaron una patente de cruce interespecífica entre *Jatropha curcas* y *Jatropha gossypifolia*, en la cual describen diferencias entre los parentales y el híbrido. Sin embargo, en el híbrido existe una combinación de caracteres de los parentales que no pueden ser diferenciadas visualmente, por lo

tanto se necesita realizar una comprobación más profunda. En este caso al existir similitudes morfológicas entre los parentales y el híbrido, se buscan alternativas para poder diferenciar estos materiales con ayuda de marcadores moleculares.

Sunilkumar *et al.* (2015) reportaron la cruce interespecífica de *Elaeis guineensis* jacq. y dos híbridos específicos (ISH-1 e IISH2), lograron reducir el tamaño de la palma aceitera, su ciclo del cultivo, incremento de la tolerancia a climas adversos y, además, incrementaron las capacidades reproductivas con la ayuda de retrocruzas. Alexandrov (2016) reportó que a través de la cruce interespecífica de *Vitis vinífera* L. con *Muscadina rotundifolia* Michx. aumentó la resistencia contra factores bióticos y abióticos que pudieran presentarse a los cultivos (Figura 13).

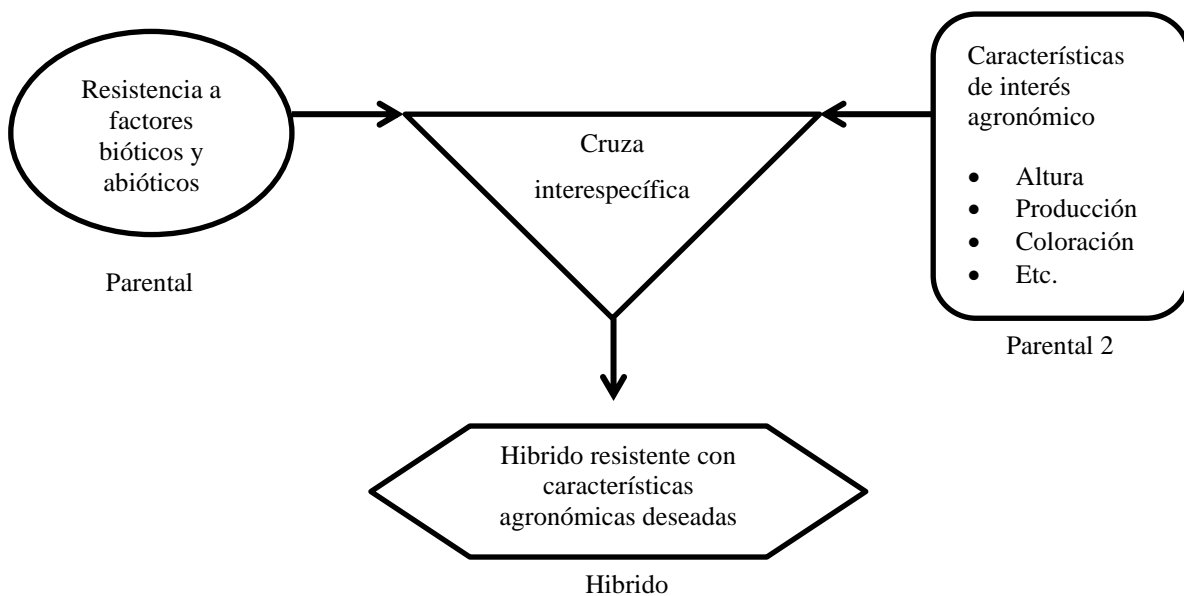


Figura 13. Diagrama de la cruce interespecífica.

2.4. Rescate de embriones.

El rescate de embriones es una técnica que busca disminuir o evitar la pérdida de material genético que pudiese resultar de la cruce interespecífica (Sharma *et al.*, 1996). Los embriones pueden ser trasplantados *in vivo* o *in vitro*. Esta técnica que

da inicio gracias a los trabajos que establecieron la base de la teoría celular en la que establece que la célula es parte fundamental de toda vida, es autónoma y totipotente (Schleiden, 1838; Schwann y Hünsele, 1910).

La totipotencia celular es la capacidad que tiene una célula de diferenciarse en otras células del organismo al que pertenece, incluso regenerar completamente al organismo (Portillo y Santacruz-Ruvalcaba, 2004). Debido a la totipotencia, es posible regenerar a los embriones independientemente de la maduración del fruto ya que al contar con un medio de cultivo con vitaminas, macró y micro nutrientes, los embriones son capaces de desarrollarse sin la necesidad de contar con un endospermo que proporcione este tipo de suplementos para el desarrollo, pudiendo así obtener una planta regenerada a partir de embriones inmaduros acortando el tiempo de la germinación y reduciendo el tiempo para poder determinar la hibridación con marcadores moleculares.

2.5. Técnicas para analizar la hibridación.

2.5.1. Técnicas moleculares.

En 1980 ya se tenía conocimiento sobre los marcadores moleculares, el primero de estos se describió como polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción, RFLP por sus siglas en inglés (restriction fragment length polymorphism), siendo estos los primeros en usarse por Botstein (1980).

A finales de la década de los 80's fue descrito el segundo tipo de marcadores moleculares, dando origen a la primera generación de estos, que consistían en la amplificación aleatoria del ADN polimórfico RAPD por sus siglas en inglés (randomly amplified polymorphic DNAs). Posteriormente, en la década de los 90's la segunda generación de marcadores moleculares se hizo presente en una técnica que consistía en hacer secuencias simples repetidas SSR por sus siglas en inglés (simple sequence repeats) (Gupta *et al.*, 2002) de la cuales deriva la técnica ISSR (Inter-simple sequence repeats). Dichas técnicas usan la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para poder analizar los resultados que puedan obtenerse de estos, en todo caso funcionan resaltando alelos dominantes o recesivos, dependiendo la técnica utilizada, mostrando una secuencia de bandeos a la hora de revelarse el gel por electroforesis (Wang *et al.*, 2003).

Existen diversos casos en que los marcadores moleculares son utilizados para determinar la variación genética que se puede presentar entre los individuos de una misma región o población. Por ejemplo, Zabala y colaboradores (2016) analizaron 64 accesiones de *J. curcas* en el estado de Veracruz para evidenciar que existe una diversidad genética en ese estado analizando accesiones tóxicas y no tóxicas mediante la utilización de técnicas de marcaje molecular las cuales consistían en marcadores RAPD, ISSR, DAMD. Existen diferentes casos de uso de estos marcadores.

2.5.1.1. Marcadores ISSR.

Los marcadores de Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR) son usados para determinar la diversidad genética y relaciones filogenéticas entre genotipos de especies silvestres o domesticadas (Haritha *et al.*, 2016). Los ISSR son marcadores multilocus que se amplifican utilizando las regiones microsatélites, son altamente reproducibles y polimórficos, estas características nos pueden ayudar a determinar la diversidad intra e inter genómica entre individuos de una misma especie (Alhasnawi *et al.*, 2015).

2.5.1.2. Marcadores DAMD.

Las Amplificaciones Directas de ADN Minisatélites por PCR (DAMD, por sus siglas en inglés, Direct Amplification of Minisatellites DNA by PCR)(Mohan Jain y Brar, 2009). Como su nombre lo indica, es una técnica dependiente de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Esta metodología implica el uso de una serie de ciclos repetitivos conocidos como, ciclos térmicos en los cuales el ADN es desnaturalizado, posteriormente el iniciador o primer se une a la cadena desnaturalizada de ADN, y finalmente se produce la síntesis del ADN,

logrando de esta manera una acumulación exponencial de fragmentos específicos de ADN (Azofeita-delgado, 2006).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

J. curcas y *J. integerrima* son especies que cuentan con características morfológicas diferenciales muy notorias. Por ejemplo, la proporción de flores femeninas y masculinas por inflorescencias es diferente entre estas dos especies, siendo *J. curcas* superior en este aspecto, con un mayor número de inflorescencias femeninas que *J. integerrima*. Debido a esto, y aunque *J. integerrima* no presenta dificultades para reproducirse de manera sexual, su reproducción mediante esta vía es mucho menor que *J. curcas*. Sin embargo, cuando de flores se habla, las flores masculinas de *J. integerrima* tienen características bastante deseables que *J. curcas*, debido a su tamaño y coloración. Al realizar la cruce interespecífica entre *J. curcas* y *J. integerrima*, se pretende heredar a la progenie H1 (híbridos) las características morfológicas de interés de cada uno de los parentales obteniendo un híbrido con propiedades ornamentales y con una alta reproducción sexual que sea de utilidad para incrementar la variedad ornamental del catálogo nacional, así como incrementar las variedades vegetales del género *Jatropha*.

JUSTIFICACION

La producción de híbridos interespecíficos, tiene como propósito incrementar la biodiversidad. La cruce interespecífica es una herramienta de mejoramiento genético convencional, que permite obtener híbridos con nuevas características. Sin embargo, al existir barreras reproductivas es necesario contar con métodos o técnicas que ayuden a evitar esta problemática. Por lo que, el uso de técnicas como el cultivo *in vitro* y el rescate de embriones, permitirá obtener óvulos fecundados después de la polinización y así evitar la pérdida de material vegetal. Se espera que el híbrido (H1) obtenido de la cruce de *J. curcas* y *J. integerrima* sea una nueva variedad vegetal con potencial ornamental, permitiendo incrementar la variedades que tiene México y propiciado así la especiación del género *Jatropha*.

HIPOTESIS

Al realizar el mejoramiento genético del género *Jatropha*, para la obtención de una nueva variedad vegetal, mediante la utilización de técnicas convencionales como la cruce interespecífica entre *J. curcas* y *J. integerrima*, en adición de técnicas complementarias como el cultivo *in vitro* y técnicas de soporte como el rescate de embriones. Se pretende lograr la combinación de caracteres genéticos que podrán o no, conducir a la generación de variaciones fenotípicas y/o genotípicas. Estas variaciones pueden resultar en la obtención de características mejoradas, las cuales podrán o no ser notorias en la progenie H1 (híbridos) con respecto a los parentales. Estos híbridos podrían servir para enriquecer la biodiversidad del género *Jatropha* mediante la introducción de nuevo material genético al ecosistema, propiciando la especiación de este género y permitiendo la introducción de una nueva variedad con potencial ornamental e incrementando la variedad floral del catálogo comercial nacional.

OBJETIVOS

6.1. Objetivo general.

- Obtener híbridos por medio de la cruce interespecífica entre *J. curcas* y *J. integerrima*.

6.2. Objetivos específicos.

- Obtener embriones de frutos jóvenes obtenidos de las cruces interespecíficas, para realizar cultivos *in vitro* y regenerar híbridos.
- Obtener plántulas híbridas mediante la germinación de semillas obtenidas de la cruce interespecífica entre *J. curcas* y *J. integerrima*.
- Determinar las diferencias y relaciones entre los parentales e híbridos utilizando marcadores ISSR y DAMD.
- Determinar las similitudes y disimilitudes mediante el uso de software analítico.

METODOLOGIA

7.1 Selección de parentales e inflorescencias femeninas de *J. curcas*.

La selección del parental femenino, en este caso *J. curcas* var Sikilte, se realizó de manera aleatoria. Seleccionando 5 plantas que componen la distribución aleatoria de esta variedad, en la plantación del Centro de Investigación y Asistencia y Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) Subsede Sureste, ubicado en el km 5.5 de la Carretera Sierra Papacal-Chuburná Puerto Parque Científico Tecnológico de Yucatán, México.

Se seleccionaron 5 accesiones de la variedad Sikilte y se aislaron las inflorescencias, este aislamiento se realizó con bolsas de papel, a las cuales se les hizo una abertura de forma cuadrada de aproximadamente 12 cm por lado, a la cual se le colocó un pedazo de plástico transparente, con la finalidad de poder visualizar el desarrollo de las inflorescencias y determinar el momento adecuado para su polinización y evitar la polinización cruzada efectuada por el viento e insectos polinizadores.

7.2 Establecimiento del cultivo y selección de inflorescencias del parental *J. integerrima*.

Se realizó el establecimiento del cultivo del parental masculino, que en este caso fue *J. integerrima*. Se recolectaron estacas de la planta madre la cual se encuentra ubicada en la ciudad de Mérida, Yucatán Calle 53^o 210, Francisco de Montejo, 97203 Mérida, Yucatán con coordenadas geográficas 21°01'34.9"N - 89°38'35.9"W.

Se estableció un cultivo de 12 estacas, las cuales fueron sembradas en bolsas de plástico negro rellenas con sustrato estéril y riego semanal. La selección de inflorescencias fue de manera indiscriminada, ya que el único parámetro a tomar en cuenta fue la presencia de polen en las flores masculinas (Figura 14) de *J.*

integerrima. En algunos casos las flores masculinas eran recolectadas con 24 horas de anticipación.

Se recolectaron inflorescencias con su, respectiva, rama, presentando un largo de aproximadamente de 30 cm. Las ramas con inflorescencias se mantuvieron en agua o cajas magenta con algodón humedecido, posteriormente se mantuvieron en refrigeración a 8°C. Las inflorescencias que presentaban flores abiertas eran recolectadas con 1 o 2 horas de anticipación previa a la polinización (Figura 14A).

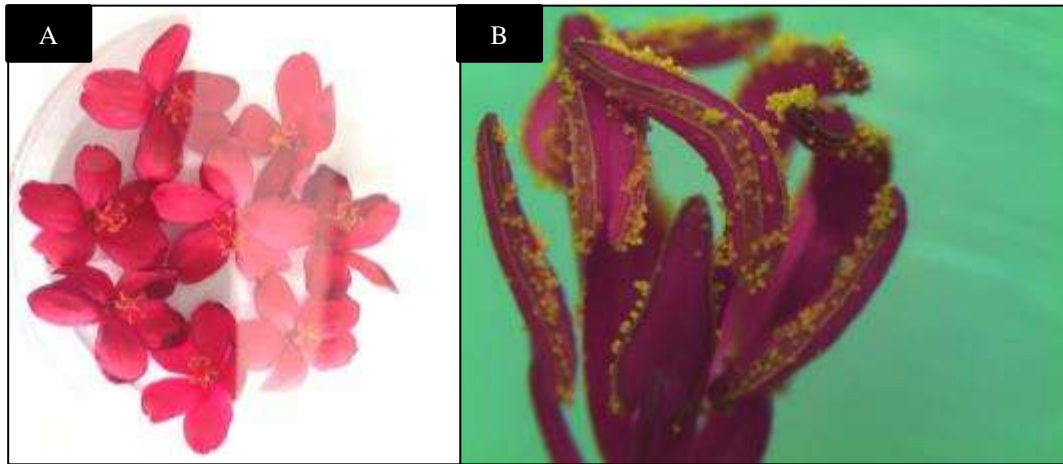


Figura 14. Inflorescencias y anteras con polen. (A) Flores masculinas de *J. integerrima*. (B) Anteras con polen de *J. integerrima*.

7.3 Polinización de *J. curcas* con *J. integerrima*.

Las flores de *J. integerrima* se seleccionaron al azar, antes y después de la antesis y se realizó la polinización directa sobre las flores de *J. curcas* que se encontraban abiertas y previamente cubiertas con bolsas de papel. La polinización se realizó a primeras horas de la mañana entre 8:00 a.m. y las 9:00 a.m.



Figura 15. Polinización manual de *J. curcas* con polen de *J. integerrima*.

Se polinizó frotando el polen directamente de la inflorescencia masculina de *J. integerrima* a la inflorescencia femenina de *J. curcas* (Figura 15). Hasta que los pistilos se encontraron cubiertos con suficiente polen, después de realizar la polinización las inflorescencias se cubrieron nuevamente con las bolsas de papel (Figura 16), las mismas que se utilizaron para cubrir las inflorescencias femeninas seleccionadas previamente.



Figura 16. Inflorescencias femeninas de *J. curcas* polinizadas y protegidas con bolsas de papel en campo.

7.4 Colecta y establecimiento *in vitro* de embriones y semillas híbridas.

Para la recolección de semillas híbridas, se seleccionaron frutos con diferentes tiempos de desarrollo, que iban desde los más pequeños hasta los más grandes (Figura 19). Cada uno de los frutos recolectado para la obtención de embriones y semillas fue medido con ayuda de un vernier para conocer la relación entre las dimensiones de altura y ancho (Tabla 3). Posteriormente, se extrajeron los embriones para su establecimiento *in vitro*.

Los embriones y semillas extraídos se desinfectaron en campana de flujo laminar mediante inmersión en una solución 5 % (v/v) de Extran® durante 5 min; luego, se transfirieron a etanol al 70% (v/v) por 1 min, seguido de agitación constante en una solución al 30% (v/v) de hipoclorito de sodio durante 15 min. Finalmente, se efectuaron tres enjuagues en agua destilada estéril. Los embriones se establecieron en el medio de cultivo DKW con algunas modificaciones ((Driver y Kuniyuki, 1984)) y las semillas se establecieron en medio de cultivo MS al 100% de su fuerza iónica más sacarosa al 30% (w/v) y gel rite al 2.2% (w/v).

7.5 Callogénesis en hojas híbridas de la cruza entre *J. curcas* y *J. integerrima*.

Los explantes de hojas jóvenes se sembraron en medio Murashige y Skoog Shoot Multiplication Medium A® suplementado con 30g/L⁻¹ de sacarosa, con el fin de inducir a la callogénesis y, como consecuente, la embriogénesis somática indirecta para multiplicar el tejido vegetal, así mismo obtener material para realizar las pruebas moleculares correspondientes.

7.6. Análisis molecular de parentales e híbridos.

7.6.1.1 Extracción de ADN de explantes de *J. curcas* y *J. integerrima*

Se extrajo el ADN nuclear de *J. curcas* y *J. integerrima* a partir de explantes de hoja. Para este proceso, se utilizó el kit de extracción GenElute™ plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos).

Por otro lado, para la extracción de ADN de algunos tejidos se realizó una modificación al protocolo antes mencionado y se usó Plant DNAzol™ Reagen (Invitrogen™) adicionado con Polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma-Aldrich). Con ayuda de un mortero y pistilo de porcelana se maceraron las muestras hasta obtener una solución acuosa, a partir de este procedimiento todo fue de acuerdo a la metodología sugerida.

7.6.1.2 Extracción de ADN del híbrido.

Se utilizaron dos tipos de explantes: hoja y callo producto de la calogénesis, se utilizó aproximadamente 100 mg en peso fresco, se pulverizaron con Plant DNAzol™ Reagen (Invitrogen™) adicionado con Polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma-Aldrich) con ayuda de un mortero y pistilo de porcelana, siguiendo la metodología utilizando el kit GenElute™ plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos).

7.6.2 Amplificación del ADN de parentales e híbridos mediante la técnica de la PCR.

La amplificación por PCR se realizó con 2.5 µL de tampón PCR 10X MgCl₂, 1 µL de 50 mM MgCl₂, 0.2 µL de Taq polimerasa 5 unidades por µL (Invitrogen™, California, Estados Unidos), 2 µL de dNTPs 0.2 mM, 1 µL de iniciador 10 µM (Integrate DNA technologies, Iowa, Estados Unidos). La PCR se realizó con un termociclador Applied biosystem™ verity™ 96-well thermal cycler.

7.6.2.1. Marcadores DAMD.

Para los marcadores HVA, HBV, HVR y JJ33.6 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 Aguilera-Cauich (2015) (Tabla 1). 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, 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.

Tabla 1. Marcadores moleculares DAMD de *J. curcas*.

| Nombre | Secuencia (5'-3') | T_a (°C) |
|---------------|--------------------------|---------------------------|
| HVA | AGGATGGAAAGGAGGC | 55 °C |
| HBV | GGTGTAGAGAGGGGT | 55 °C |
| JJ33.6 | GAGGGTGGCGGTTCT | 55 °C |
| HVR | CCTCCTCCCTCCT | 55 °C |

Nota: Reportado por Zhou *et al.* (1997) y Aguilera-Cauich (2015).

7.6.2.2. Marcadores ISSR.

Se utilizaron 3 marcadores UBC (set No. 9 UBC 807, UBC 810, UBC 815, University of British Columbia, Canadá) con temperatura de alineamiento (T_a) de 35°C y un marcador IMPN (IMPN 28) con T_a de 47° (Tabla 2). El programa térmico para todos los marcadores ISSR consistió en: temperatura de desnaturalización inicial 94°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a la T_a para cada marcador, 1 minuto a 72°C y, por último, la extensión final de 7 minutos a 72°C (Tanya *et al.*, 2011). Las muestras se almacenaron a -8°C hasta su posterior uso.

Tabla 2. Marcadores moleculares ISSR de *J. integerrima*.

| Nombre | Secuencia (5'-3') | T_a (°C) |
|----------------|--------------------------|---------------------------|
| UBC 807 | AGAGAGAGAGAGAGAGT | 35 °C |
| UBC 810 | GAGAGAGAGAGAGAGAT | 35 °C |
| UBC 815 | CTCTCTCTCTCTCTG | 35 °C |
| IMPN 28 | AATGCAATGCAATGCAAT | 47 °C |

Nota: Reportado por Zavala del Angel *et al.* (2016).

7.6.3. Electroforesis.

La separación de los fragmentos de ADN amplificados, se realizó en una cámara para electroforesis MGU-202T (C.B.S. Scientific C.O., Los Ángeles, Estados Unidos) en gel de agarosa ultra pura (Invitrogen, California, Estados Unidos) al 1.0 % (w/v), disuelto en TAE 1X. Los productos separados fueron teñidos con 2 µL de solución de bromuro de etidio (10mg/mL de H₂O) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania)

7.6.4. Interpretación del perfil de bandeo.

El gel obtenido de la electroforesis, se observó en un transiluminador de UV de alto rendimiento (UVP Ultraviolet Products, Jena, Alemania). Los fragmentos amplificados por PCR se separaron y observaron 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 se analizaron con el software Gel Analyzer 2010 (<http://www.gelanalyzer.com/>) y se creó una matriz de datos con los valores 0 y 1 para denotar la presencia y ausencia de bandas que permitiera obtener los porcentajes de polimorfismo genético con cada uno de los iniciadores utilizados, los cuales serán analizados con ayuda del software NTSYSpc versión 2.10e.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Establecimiento del cultivo y selección de inflorescencias del parental masculino *J. integerrima*.

El desarrollo de las estacas hasta la obtención de inflorescencias tuvo un periodo de 85 días después del establecimiento (DDE), con riego semanal, siendo el día cero, el día del establecimiento. De los 15 a 25 días de establecidas las estacas, se observó el desarrollo de brotes en algunas de las estacas (Figura 17B). A partir del día 35 DDE de las estacas se apreciaron las primeras hojas (Figura 17C), a los días 50 (Figura 17E) y 65 (Figura 17F) DDE las plantas presentaban condiciones favorables para su traspaso a campo.

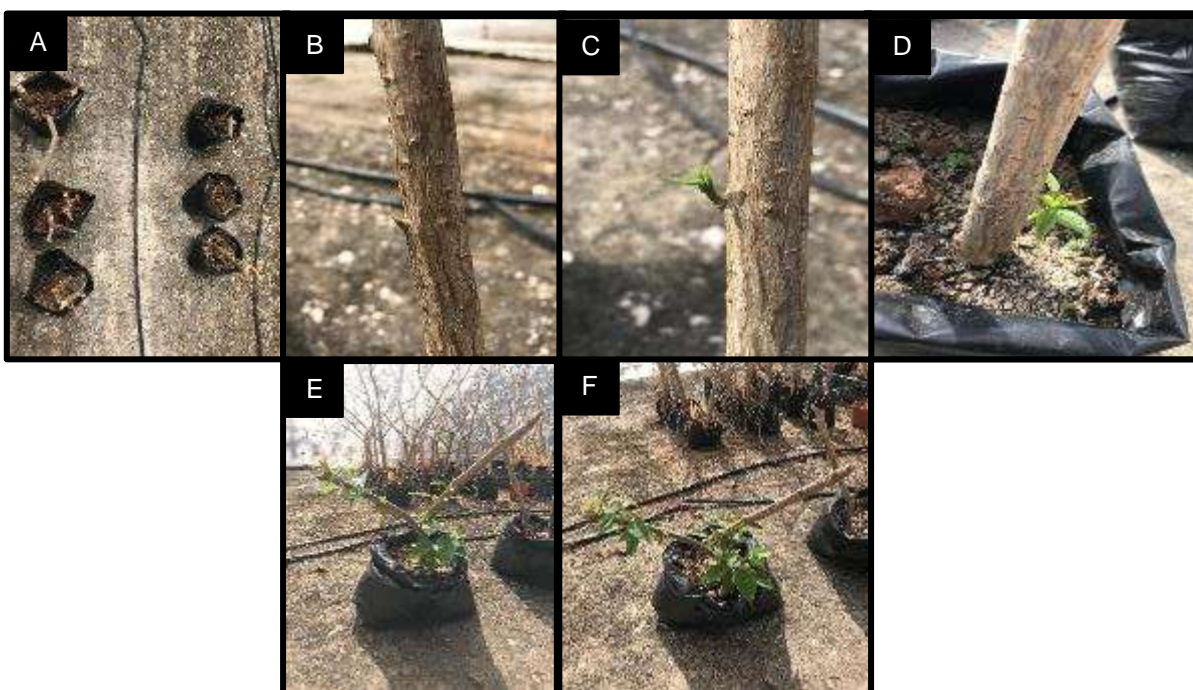


Figura 17. Etapas del establecimiento del parental masculino, *J. integerrima*, en condiciones de casa sombra. (A) Día 0, establecimiento de las estacas; (B) Día 15, aparición del primer brote; (C) día 25, estaca con inicio del desarrollo de los brotes. (D) Día 35, estaca con inicio del desarrollo de hojas. (E) Día 50, estaca con desarrollo de varios brotes. (F) Día 65, estacas listas para el trasplante.

Las mejores condiciones para trasplantar a campo las estacas del parental Masculino *J. integerrima* fueron a los 65 días después del establecimiento (Figura 17F). Dicha actividad se realizó, después de 5 días (día 70), en las instalaciones de la subselección sureste del CIATEJ, en Mérida, Yucatán (Figura 18A). Una vez, que las plantas llevaban 15 días trasplantadas en campo se presentaron las primeras inflorescencias de *J. integerrima* (Figura 18B).

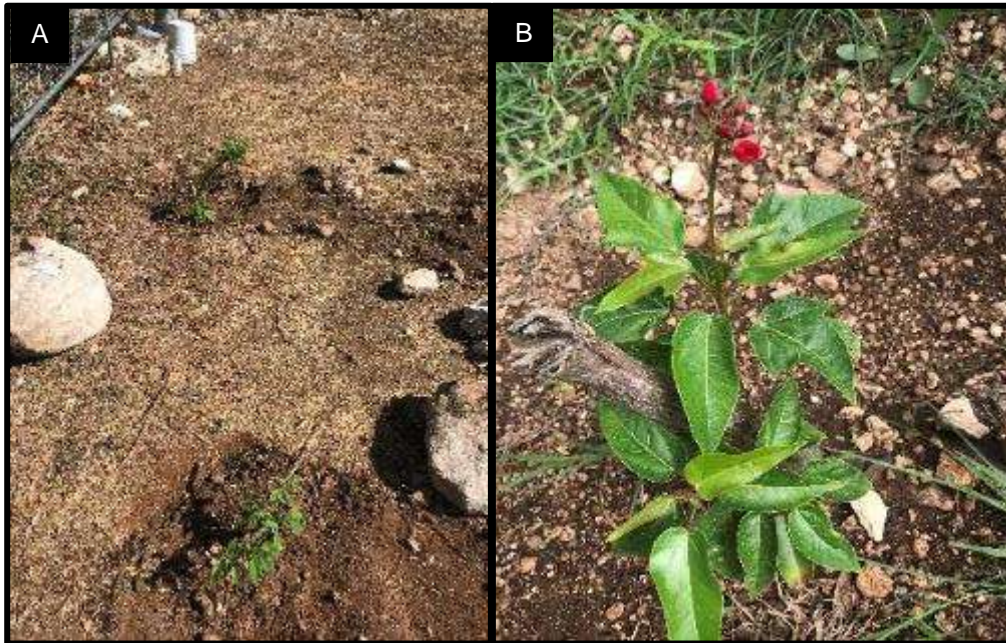


Figura 18. Establecimiento de las estacas de *J. integerrima* en campo. (A) Día 70, las estacas fueron establecidas en campo para continuar su desarrollo. (B) Planta con su primera inflorescencia en campo después del establecimiento del cultivo.

A partir de las plantas establecidas en campo, se obtuvo material vegetal para realizar las polinizaciones a *J. curcas*, quien fue la planta receptora de polen, así como la fuente para la obtención de explantes para la extracción de ADN total y para la inducción a la callogénesis.

8.2 Colecta y establecimiento *in vitro* de embriones y semillas híbridas.

Los frutos fueron colectados los días 3, 5, 7, 11, 15, 18, 20, 23, 25 y 28 DDP, presentaban una coloración verde hasta el día 22 DDP. A partir de ese día, iniciaba

el cambio de coloración a una tonalidad amarilla lo que indicaba el inicio de la maduración del fruto (Figura 19).



Figura 19. Frutos híbridos colectados para la obtención de semillas y rescate de embriones.

La medida de los frutos presento gran variación, los datos obtenidos partieron de 11.30 mm de alto y 8.37 mm de ancho hasta 30.77 mm de alto y 28.73 mm de ancho. Con respecto a las semillas, alcanzaron un tamaño superior a los 24.15 mm de alto y 16.89 mm de ancho. De la totalidad de frutos colectados, solamente el 35% germino exitosamente. Por tal motivo, se recomienda recolectar frutos a partir de los 18 DDP para la obtención de semillas y germinación *in vitro*.

Tabla 3. Medidas de los frutos híbridos.

| Fruto | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Alto (mm) | 30.77 | 30.98 | 29.88 | 25.46 | 24.15 | 23.35 | 18.28 | 18.16 | 11.41 | 11.30 |
| Ancho (mm) | 28.73 | 24.02 | 27.50 | 19.37 | 16.89 | 19.37 | 12.54 | 11.97 | 8.19 | 8.37 |

Nota: Datos usados en los experimentos de germinación.

Como se mencionó anteriormente, se observaron diferencias en el tamaño de los frutos cosechados, a pesar de haber sido polinizados en el mismo tiempo, esto pudo

deberse a que existe incompatibilidad reproductiva, la cual es bastante común cuando se realiza cruza interespecífica, como lo reporto Kumar *et al.*, 2009 realizaron una cruza interespecífica de tres especies distintas del genero *Jatropha*, *J. gossypifolia* x *J. curcas*, *J. podagrica* x *J. curcas*, *J. villosa* x *J. curcas*. En dicho estudio, cada planta era tanto receptora como donadora de polen. Ellos determinaron que *J. curcas* es un receptor idóneo de polen para estas tres especies. Sin embargo, este comportamiento no se repite siempre en el sentido inverso, pues existe una autoincompatibilidad entre la interacción del polen con el pistilo que en algunos casos es causante de la baja obtención de material híbrido en la cruza interespecífica (Figura 20).

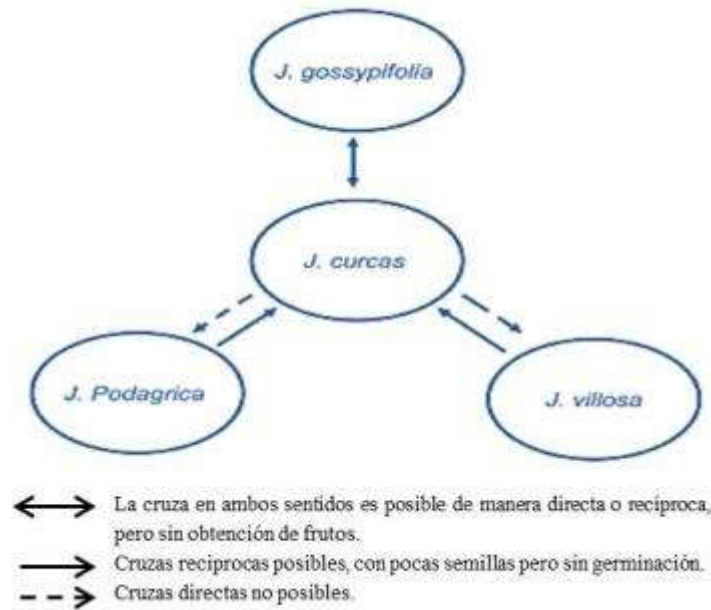


Figura 20. Diagrama de la compatibilidad o incompatibilidad polen-pistilo entre la cruza interespecífica del género *Jatropha*. (Modificado de Kumar *et al.*, 2009)

Kumar *et al.* (2009) también indicaron que podrían existir diferencias con respecto a la germinación dependiendo el sentido de la cruza, así como tiempos diferentes para la fecundación del ovulo que van desde 1 a 4 horas. Por lo tanto, en la cruza interespecífica de *J. integerrima* x *Jatropha curcas*, se optó por utilizar las medidas

como unidad de referencia (Tabla 3), dando como resultado una germinación del 50%. Tomando en cuenta las medidas de la tabla 3 los frutos que presentaron medidas superiores a 24 mm de altura lograron germinar sin mostrar diferencias entre semillas inmaduras y las que se encontraban cerca de alcanzar la maduración (Figura 21).

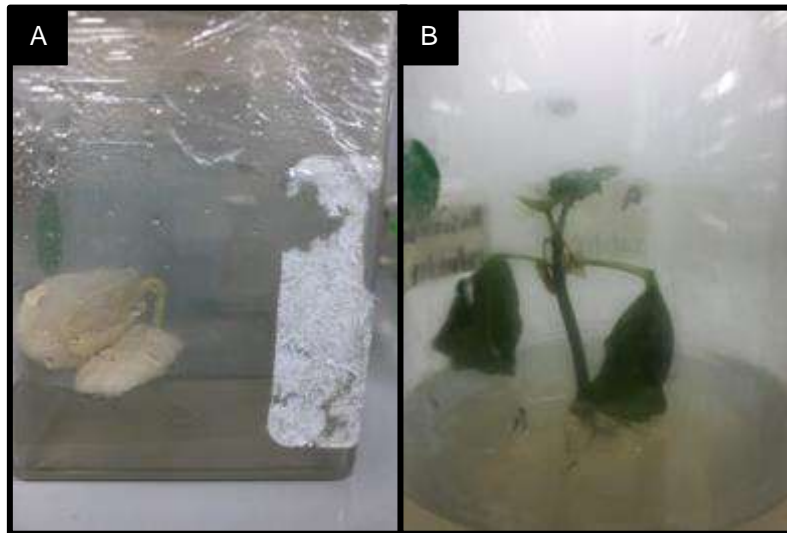


Figura 21. Germinación *in vitro* de semilla híbrida. (A) Semilla híbrida germinada en condiciones *in vitro*; (B) Plántula en desarrollo a partir de una semilla híbrida germinada en laboratorio, se observan las primeras hojas verdaderas.

En contraste a lo anterior, el rescate de embriones *in vitro* resulto ser un camino inviable, ya que, algunos de los embriones y sacos embrionarios obtenidos presentaron oxidación o entraron en periodo de latencia (Figura 22).

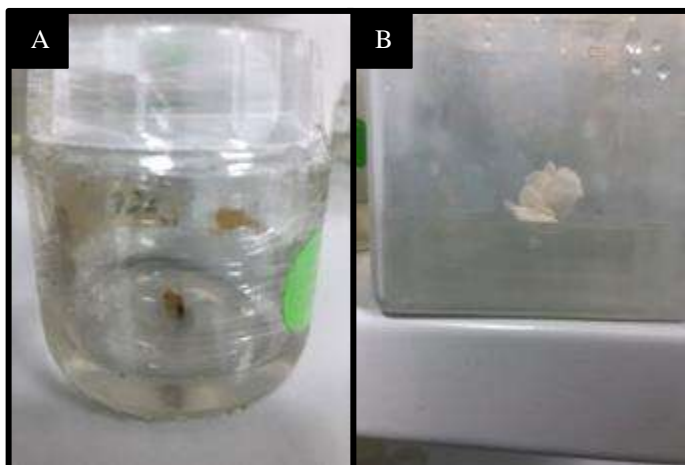


Figura 22. Germinación de embriones híbridos *in vitro*. (A) Embrión híbrido con fenolización; (B) Embrión híbrido en latencia.

8.3. Callogénesis.

Las hojas cotiledonares expuestas al medio de cultivo mostraron callogénesis a los 45 días después de haber sido expuestos al medio, la coloración del callo fue verde intenso y el callo obtenido fue friable con desarrollo de pequeños brotes (Figura 23).

Debido a la nula obtención de plántulas a partir del rescate de embriones, se buscó una alternativa para la multiplicación de material vegetal que permitiera obtener un porcentaje de germinación mayor al 50%. Sin embargo, es bien sabido que al inducir la callogénesis, no solo nos es posible propagar sino también inducir o no variación somaclonal, que resultara en un fenotipo diferente a la planta madre donadora del explante (Rodríguez Beraud *et al.*, 2014).



Figura 23. Callo de explantes foliar del híbrido.

8.4 Análisis molecular de parentales e híbrido.

Previo al análisis molecular se realizó la extracción del ADN total de cada uno de los individuos a analizarse, así como una réplica de cada uno de ellos con diferente tejido. Posteriormente, se realizó la comprobación mediante un gel de agarosa al 1%, teñido con 2 μ l de Bromuro de etidio, y utilizando una cámara de electroforesis. En el cual se puede demostrar la integridad de ADN total de las muestras, las cuales presentan un peso superior a los 15,000 pb, siendo material viable para realizar las pruebas moleculares, como se puede observar en la Figura 24, el H1 presenta una mayor intensidad en relación con la intensidad de bandeo de los parentales.

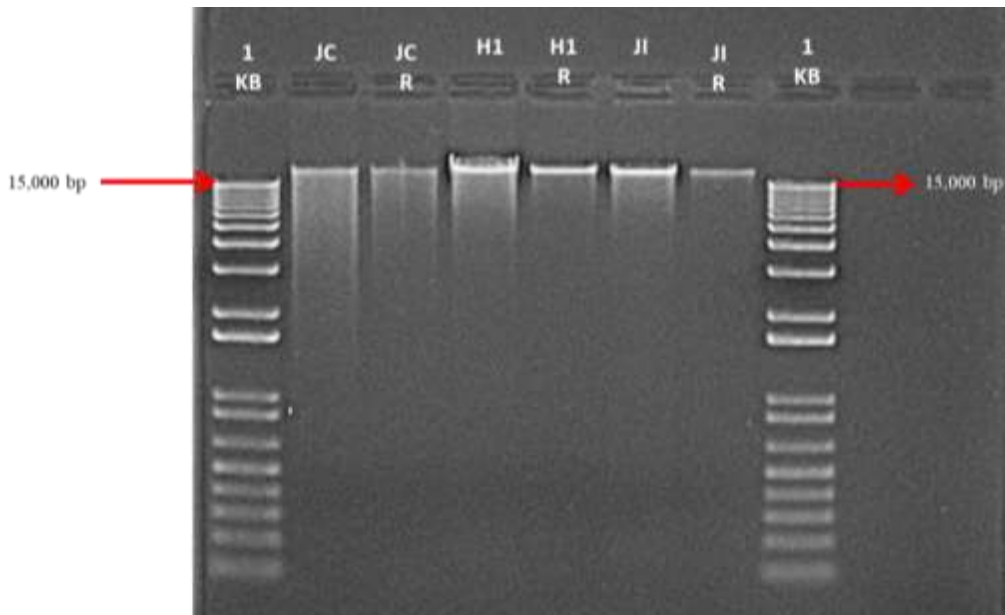


Figura 24. Extracciones del ADN total de los parentales y el híbrido en gel de agarosa al 1%.

J. curcas var Sikilte (JC), Híbrido interespecífico (H1) y *J. integerrima* (JI), cada uno con su respectiva replica (R).

Después de realizar la comprobación de las extracciones y determinar que el ADN es viable, se procedió a realizar la amplificación de cada uno de los parentales utilizando marcadores moleculares DAMD (Tabla 1) e ISSR (Tabla 2), esto con la finalidad de determinar las diferencias genéticas que puedan existir entre los parentales, y las diferencias de estos con el híbrido.

8.4.1 Marcadores DAMD.

Para el análisis molecular se realizaron 3 matrices binarias, una matriz para el patrón de bandeo proporcionado por los marcadores DAMD, una matriz para marcadores ISSR y, por último, una matriz general que incluye los dos diferentes tipos de marcadores moleculares. Para el caso de los arcadores DAMD, el producto de la amplificación de ADN mediante la técnica de la PCR (Figura 25), fue analizado con ayuda del software Gel Analyzer 2010 (<http://www.gelanalyzer.com/>), el cual nos ayudó a obtener la matriz binaria para los marcadores DAMD. Después de la

normalización de las bandas, se asignaron números para la codificación en el cual, 1 significa la presencia de bandas y 0 la ausencia de estas (Tabla 4).

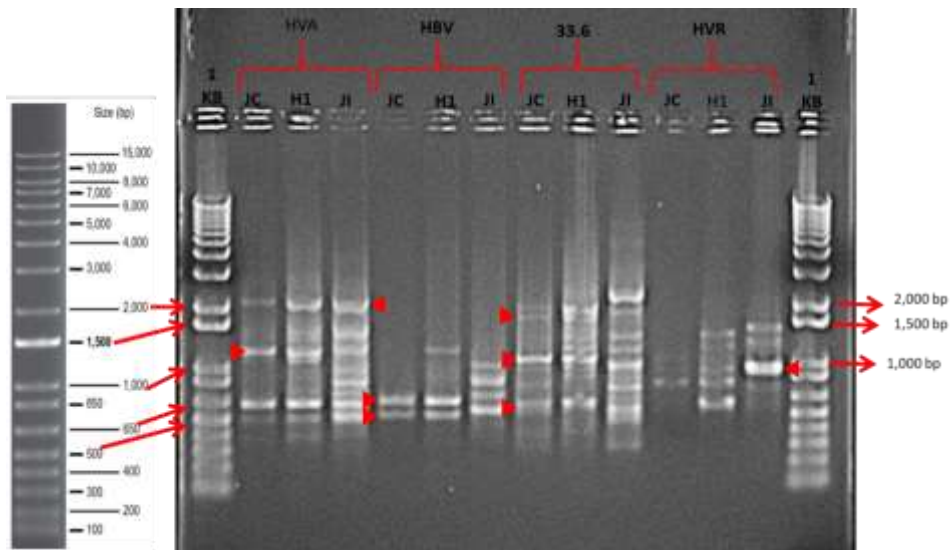


Figura 25. Bando observado en gel de agarosa al 1% de la amplificación de ADN con los marcadores DAMD.

Marcadores DAMD reportados Zhou *et al.* (1997) y usados por Aguilera-Cauich (2015), en el cual los triángulos rojos presentan las bandas que exhiben similitud entre el híbrido y los parentales las que apuntan hacia la derecha reflejan la similitud del parental JC con el híbrido, las que apuntan hacia la izquierda representan la similitud entre el parental JI y el híbrido. *J. curcas* var Sikilte (JC), Híbrido interespecífico (H1) y *J. integerrima* (JI).

Tabla 4. Matriz binaria para el patrón de bando.

| Marcador | <i>J. curcas</i> | Híbrido | <i>J. integerrima</i> | Marcador | <i>J. curcas</i> | Híbrido | <i>J. integerrima</i> |
|----------|------------------|---------|-----------------------|-----------|------------------|---------|-----------------------|
| HVA.1 | 1 | 1 | 1 | JJ33.6.3 | 0 | 1 | 1 |
| HVA.2 | 0 | 1 | 1 | JJ33.6.4 | 1 | 0 | 0 |
| HVA.3 | 1 | 1 | 1 | JJ33.6.5 | 0 | 1 | 1 |
| HVA.4 | 0 | 0 | 1 | JJ33.6.6 | 0 | 1 | 1 |
| HVA.5 | 0 | 0 | 1 | JJ33.6.7 | 1 | 1 | 0 |
| HVA.6 | 0 | 1 | 1 | JJ33.6.8 | 0 | 0 | 1 |
| HVA.7 | 1 | 1 | 1 | JJ33.6.9 | 1 | 0 | 0 |
| HVA.8 | 0 | 0 | 1 | JJ33.6.10 | 0 | 1 | 0 |
| HVA.9 | 1 | 1 | 0 | JJ33.6.11 | 1 | 0 | 1 |
| HVA.10 | 0 | 1 | 0 | JJ33.6.12 | 1 | 1 | 0 |
| HBV.1 | 0 | 1 | 0 | JJ33.6.13 | 0 | 0 | 1 |
| HBV.2 | 0 | 0 | 1 | JJ33.6.14 | 0 | 0 | 1 |

| | | | | | | | |
|----------|---|---|---|-------|---|---|---|
| HBV.3 | 0 | 0 | 1 | HVR.1 | 0 | 0 | 1 |
| HBV.4 | 0 | 0 | 1 | HVR.2 | 1 | 0 | 0 |
| HBV.5 | 1 | 1 | 0 | HVR.3 | 0 | 1 | 0 |
| HBV.6 | 0 | 0 | 1 | HVR.4 | 1 | 0 | 0 |
| HBV.7 | 1 | 1 | 0 | HVR.5 | 0 | 1 | 1 |
| JJ33.6.1 | 0 | 0 | 1 | HVR.6 | 1 | 1 | 1 |
| JJ33.6.2 | 1 | 0 | 0 | HVR.7 | 0 | 1 | 0 |

Nota: Se utilizaron 4 marcadores DAMD: 1) HVA, 2) HBV, 3) JJ33.6 y 4) HVR. Esta matriz fue generada con ayuda del software Gel Analyzer 2010, 1 = representa la presencia de bandas y 0 = representa la ausencia de bandas.

Los datos obtenidos a partir de la matriz binaria (Tabla 4), se emplearon para realizar el análisis de datos utilizando la versión 2.10e del software Sistema de Análisis Multivariado y Taxonomía Numérica (NTSYSpc, por sus siglas en inglés). Este análisis arrojó como resultado el siguiente dendrograma entre los dos parentales (*J. curcas* y *J. integerrima*) y el híbrido seleccionado (Figura 26).

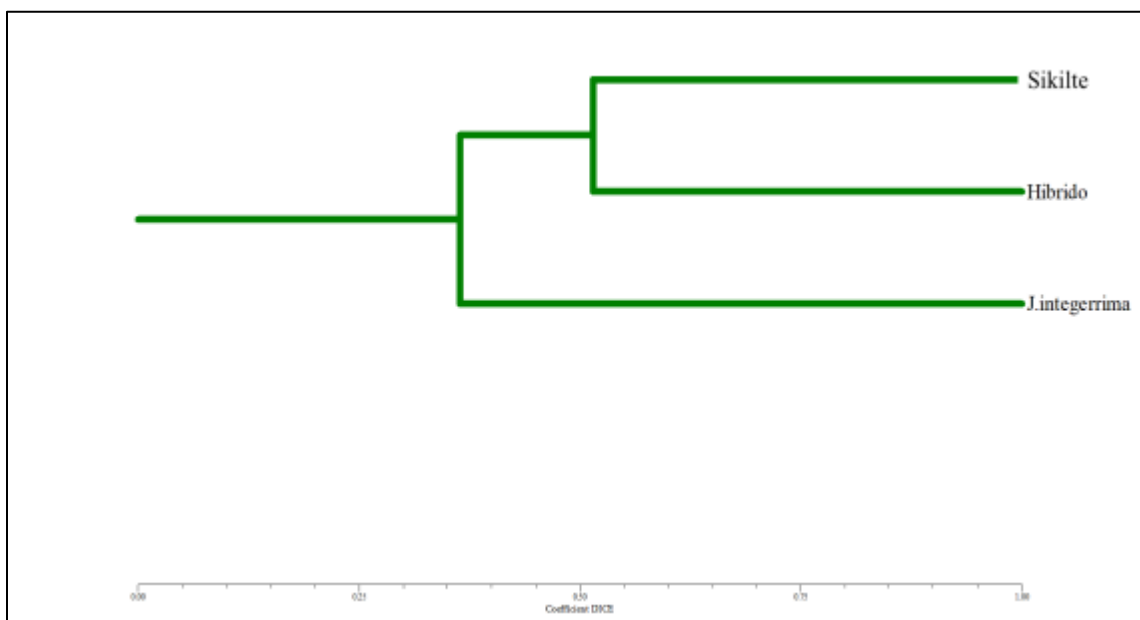


Figura 26. Dendrograma de similitud DICE entre los parentales e híbridos del género *Jatropha* con marcadores DAMD. Árbol filogenético resultante de la matriz binaria generada por el programa NTSYSpc versión 2.10e, a partir del patrón de bandeo presentado por los marcadores DAMD donde entre más cerca del 0 menor será similitud y entre más cerca del 1 mayor será la similitud.

Con ayuda del dendrograma resultante del análisis molecular utilizando marcadores DAMD, podemos determinar que *J. integerrima* presente mayores diferencias con el híbrido debido a que se encuentra más cercano al 0, respecto a *J. curcas*, pues, este último se encuentra más cercano del 1 (Tabla 5). El análisis SIMQUAL, entre *J. curcas*, *J. integerrima* y el híbrido utilizando los marcadores DAMD, dio como

resultado una mayor similitud con *J. curcas* debido a que se encuentra más cerca del híbrido en una escala 0 al 1, con 0.519. En términos porcentuales podemos decir que el híbrido presenta una similitud del 51% con respecto a *J. integerrima* utilizando marcadores DMAD, los cuales fueron utilizados por Aguilera-Cauich en 2015.

Tabla 5. Análisis SIMQUAL

| Individuos | <i>J. curcas</i> | Hibrido | <i>J. integerrima</i> |
|-----------------------|------------------|---------|-----------------------|
| <i>J. curcas</i> | 1 | | |
| Hibrido | 0.514 | 1 | |
| <i>J. integerrima</i> | 0.263 | 0.465 | 1 |

Nota: Datos obtenidos del programa NTSYSp versión 2.10e, en el que podemos determinar la similitud entre los parentales y el híbrido seleccionado. Se observa que el híbrido presenta una mayor similitud con *J. curcas* var sikilte con 0.541, respecto a *J. integerrima*, que presenta una similitud de 0.465.

8.4.2 Marcadores ISSR.

El uso de los marcadores ISSR reportados por Tanya *et al.* (2011), fueron analizados con mayor profundidad, ya que ella y sus colaboradores utilizan los mismos marcadores que se reportan en este trabajo. Sin embargo previo a ese análisis, se comprobó la similitud de los parentales con el H1 para determinar si existe alguna diferencia entre marcadores moleculares DAMD e ISSR, ya que, como se pudo observar, con el uso de los marcadores DAMD, el H1 se encuentra más emparentado con el parental femenino en este caso *J. curcas* con 0.514 unidades (Tabla 5). Por lo tanto, con ayuda del dendograma obtenido con el programa NTsys, determinamos que al igual que con los marcadores DAMD, con el uso de los ISSR el H1 se encuentra más emparentado con el parental femenino sobrepasando las 0.5 unidades (Figura 27).

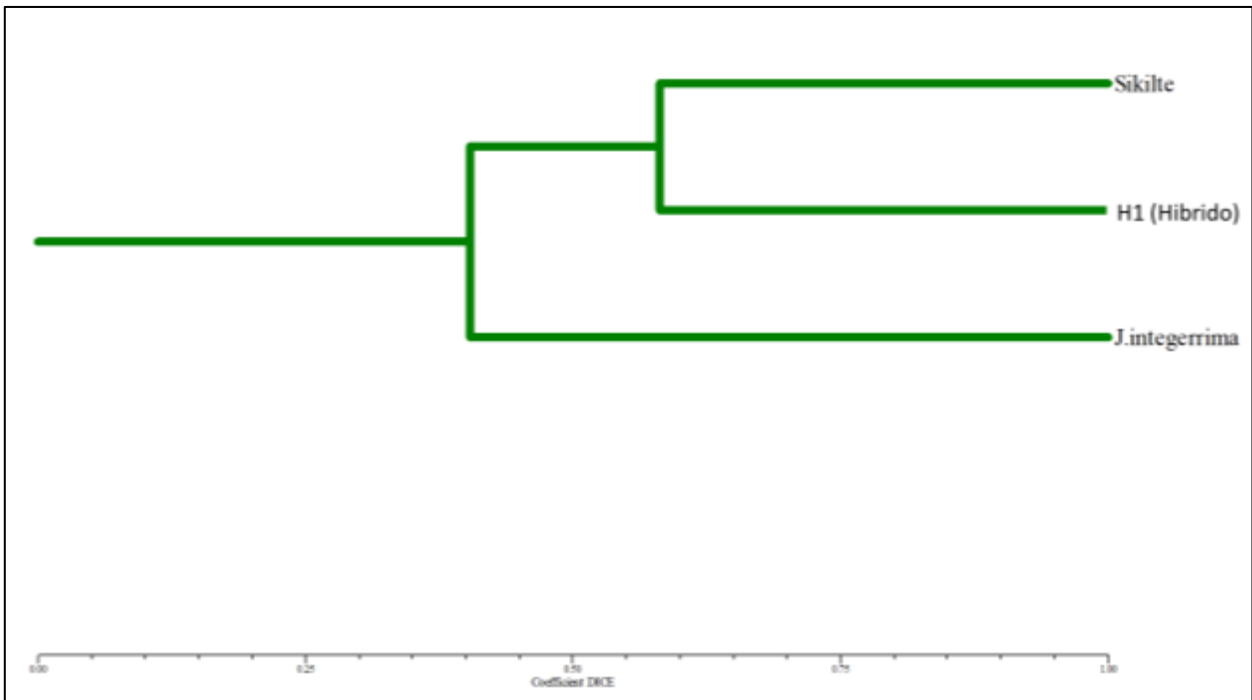


Figura 27. Dendrograma de similitud de DICE de los parentales e híbridos con marcadores ISSr.

Para poder tener un dato más preciso de la similitud y disimilitud se realizó el análisis de coeficiente de similitud (Tabla 6) el cual nos dice que el híbrido presenta una similitud con el parental femenino *J. curcas* con 0.581 unidades siendo este el que se encuentra más cerca del 1 y un valor de 0.444 unidades con respecto al parental masculino *J. integerrima* siendo el valor más próximo a 0, denotando que existe mayor disimilitud con este parental

Tabla 6. Coeficiente de similitud entre parentales e híbridos con marcadores ISSR.

| | Sikilte | H1(Hibrido) | <i>J. integerrima</i> |
|------------------------------|----------------|--------------------|------------------------------|
| Sikilte | 1 | | |
| H1(Hibrido) | 0.581 | 1 | |
| <i>J. integerrima</i> | 0.364 | 0.444 | 1 |

El grupo de investigación analizó 4 diferentes accesiones de *Jatropha* de diferentes lugares (China, Taiwán, Vietnam y México) y una accesión de *J. integerrima*.

Tomando en cuenta la matriz binaria que reportaron (Tabla 6) se hizo un análisis comparativo entre las accesiones reportadas contra las especies utilizadas en este trabajo para determinar si existía alguna diferencia entre el material utilizado por ellos y el material nuestro, con ayuda de un genograma generado con ayuda del software NTSYSpc versión 2.10e.

Tabla 7. Matriz binaria del patrón de bandeo de los marcadores ISSR.

| M.M | G1 (MEX) | G2 (C HI) | G3 (THA) | G4 (VIE) | G6 (J.I) | M.M | G1 (MEX) | G2 (CHI) | G3 (THA) | G4 (VIE) | G6 (J.I) |
|--------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| IMP 28.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | UBC 810.7 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| IMP 28.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | UBC 810.8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| IMP 28.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | UBC 810.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| IMP 28.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | UBC 810.10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| IMP 28.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | UBC 810.11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| IMP 28.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | UBC 810.12 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| IMP 28.7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | UBC 810.13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| IMP 28.8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | UBC 810.14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| IMP 28.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | UBC 810.15 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| IMP 28.10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | UBC 810.16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| IMP 28.11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | UBC 810.17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| IMP 28.12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | UBC 810.18 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| IMP 28.13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | UBC 810.19 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| UBC 807.1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | UBC 810.20 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| UBC 807.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | UBC 810.21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| UBC 807.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | UBC 810.22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| UBC 807.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | UBC 815.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| UBC 807.5 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | UBC 815.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| UBC 807.6 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | UBC 815.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| UBC 810.1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | UBC 815.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | | | |
|-----------|---|---|---|---|---|-----------|---|---|---|---|---|
| UBC 810.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | UBC 815.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| UBC 810.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | UBC 815.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| UBC 810.4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | UBC 815.7 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| UBC 810.5 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | UBC 815.8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| UBC 810.6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | UBC 815.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Nota: Marcadores ISSR: 1) HVA, 2) HBV, 3) JJ33.6 y 4) HVR utilizados por Tanya *et al.*, (2011), los cuales son los mismo utilizados para este trabajo.

Las 5 accesiones de *Jatropha* reportados por Tanya *et al.*, 2011, se compararon contra *J. curcas* Var Sikilte y *J. integerrima*, esto con el fin de determinar si existe alguna similitud o diferencia entre estas especies con ayuda de un dendograma para conocer las distancias entre estas 7 especies (Figura 28).

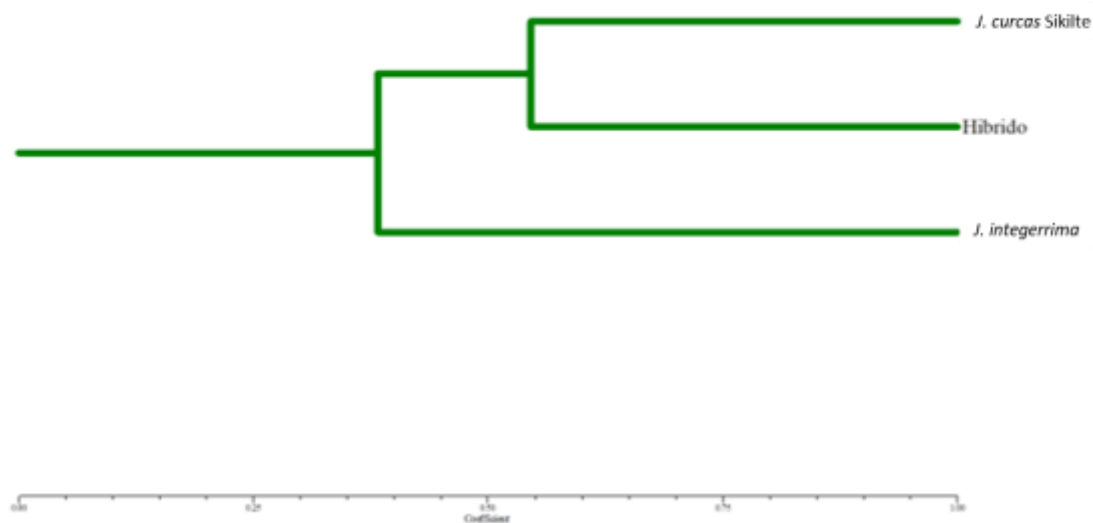


Figura 28. Dendograma de las 5 accesiones de *J. curcas* y 2 accesiones de *J. integerrima*.

El análisis de distancias genéticas de DICE demostró que existe similitud entre las dos especies de *J. integerrima*, la reportada por Tanya *et al.*, 2011 y la especie utilizada para este trabajo. Para las accesiones de *J. curcas* el resultado fue diferente (Figura 28), en la cual *J. curcas* var Sikilte se encuentra completamente alejado de las otras variedades de *J. curcas*, esto se debe a que la variedad Sikilte

es una nueva variedad mejorada, es decir un híbrido, por eso no se encuentra una similitud en comparación a las demás. En el dendograma de la Figura 29 se observa la variedad Sikilte, se encuentra completamente separado de las demás accesiones de *J. curcas*

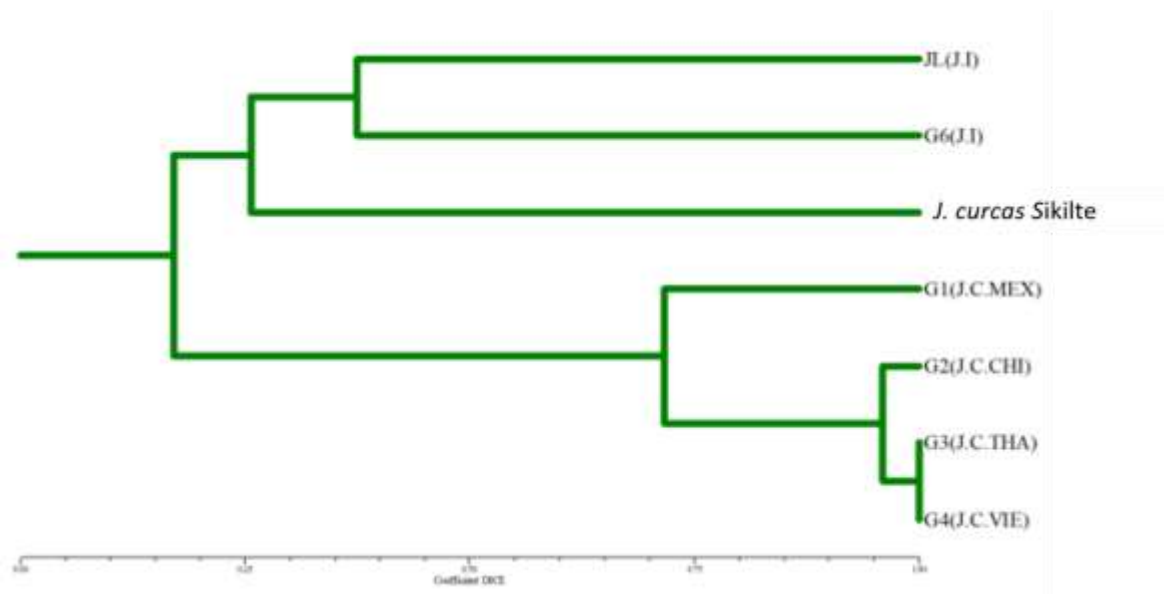


Figura 29. Dendograma de las 5 accesiones de *J. curcas*.

El análisis SIMQUAL (Tabla 8), explica de mejor manera las similitudes y disimilitudes, al ser resultante de una matriz binaria de 1 y 0, entre más cerca del 0 mayor será la diferencia entre ellos, y entre más cerca del 1, mayor será la similitud entre ellas. En este caso, la variedad Sikilte se encuentra más cerca de *J. integerrima* utilizando en este trabajo, siendo el que más cerca del 1 se encuentra con 0.364 unidades y siendo *J. curcas* de México la más lejana de todas con 0.083.

Tabla 8. Análisis SIMQUAL

| Especie | JL(J.I) | G6(J.I) | G1(J.C.M) | G2(J.C.C) | G3(J.C.T) | G4(J.C.V) | Sikilte |
|-------------|---------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|
| JL(J.I) | 1 | | | | | | |
| G6(J.I) | 0.375 | 1 | | | | | |
| G1(J.C.MEX) | 0.207 | 0.174 | 1 | | | | |
| G2(J.C.CHI) | 0.188 | 0.231 | 0.696 | 1 | | | |
| G3(J.C.THA) | 0.194 | 0.16 | 0.727 | 0.96 | 1 | | |
| G4(J.C.VIE) | 0.194 | 0.16 | 0.727 | 0.96 | 1 | 1 | |
| Sikilte | 0.364 | 0.148 | 0.083 | 0.148 | 0.154 | 0.154 | 1 |

Nota: Con este análisis se pudo determinar que la variedad Sikilte se encuentra más emparentada con *J. integerrima* al ser la más cercana a 1 con 0.364, y presenta mayor diferencia con *J. curcas* de México utilizado por Tanya *et al.*, 2011.

Con estos análisis es posible determinar la eficacia de los marcadores ISSR para conocer las similitudes y disimilitudes entre especies de *Jatropha*. Después de determinar la eficacia de los ISSR, se prosiguió a analizar a los parentales junto al híbrido para determinar las similitudes y disimilitudes entre ellos así como conocer la variación que se puede generar a partir de la cruce interespecífica.

8.4.5 Análisis entre parentales e híbrido.

Después de comprobar la eficacia de los marcadores para determinar las similitudes y disimilitudes entre las poblaciones reportadas por Tanya *et al.*, (2011), así como los reportados por Zhou *et al.* (1997) y usados por Aguilera-Cauich (2015), se realizó una matriz general uniendo los 2 tipos de marcadores tanto ISSR como DAMD (Tabla 8).

Tabla 9. Matriz binaria general de los marcadores DAMD e ISSR.

| Marcadores | <i>J. curcas</i> | Híbrido | <i>j. integerrima</i> | Marcadores | <i>J. curcas</i> | Híbrido | <i>j. integerrima</i> |
|------------|------------------|---------|-----------------------|------------|------------------|---------|-----------------------|
| IMPN 28.1 | 1 | 0 | 0 | HVA.4 | 0 | 0 | 1 |
| IMPN 28.2 | 1 | 0 | 1 | HVA.5 | 0 | 0 | 1 |
| IMPN 28.3 | 0 | 1 | 0 | HVA.6 | 0 | 1 | 1 |
| IMPN 28.4 | 1 | 0 | 0 | HVA.7 | 1 | 1 | 1 |

| | | | | | | | |
|-------------------|---|---|---|----------------|---|---|---|
| IMPN 28.5 | 0 | 1 | 1 | HVA.8 | 0 | 0 | 1 |
| IMPN 28.6 | 0 | 0 | 1 | HVA.9 | 1 | 1 | 0 |
| IMPN 28.7 | 1 | 1 | 0 | HVA.10 | 0 | 1 | 0 |
| IMPN 28.8 | 0 | 0 | 1 | HBV.1 | 0 | 1 | 0 |
| IMPN 28.9 | 1 | 1 | 1 | HBV.2 | 0 | 0 | 1 |
| IMPN 28.10 | 1 | 1 | 1 | HBV.3 | 0 | 0 | 1 |
| IMPN 28.11 | 0 | 0 | 1 | HBV.4 | 0 | 0 | 1 |
| IMPN 28.12 | 1 | 0 | 0 | HBV.5 | 1 | 1 | 0 |
| IMPN 28.13 | 1 | 0 | 0 | HBV.6 | 0 | 0 | 1 |
| UBC 807.1 | 1 | 1 | 0 | HBV.7 | 1 | 1 | 0 |
| UBC 807.2 | 0 | 1 | 1 | 33.6.1 | 0 | 0 | 1 |
| UBC 807.3 | 1 | 1 | 1 | 33.6.2 | 1 | 0 | 0 |
| UBC 807.4 | 1 | 1 | 1 | 33.6.3 | 0 | 1 | 1 |
| UBC 807.5 | 1 | 1 | 0 | 33.6.4 | 1 | 0 | 0 |
| UBC 807.6 | 0 | 0 | 1 | 33.6.5 | 0 | 1 | 1 |
| UBC 810.1 | 0 | 0 | 1 | 33.6.6 | 0 | 1 | 1 |
| UBC 810.2 | 0 | 0 | 1 | 33.6.7 | 1 | 1 | 0 |
| UBC 810.3 | 0 | 0 | 1 | 33.6.8 | 0 | 0 | 1 |
| UBC 810.4 | 1 | 1 | 1 | 33.6.9 | 1 | 0 | 0 |
| UBC 815.1 | 0 | 1 | 0 | 33.6.10 | 0 | 1 | 0 |
| UBC 815.2 | 0 | 1 | 0 | 33.6.11 | 1 | 0 | 1 |
| UBC 815.3 | 0 | 0 | 1 | 33.6.12 | 1 | 1 | 0 |
| UBC 815.4 | 0 | 1 | 0 | 33.6.13 | 0 | 0 | 1 |
| UBC 815.5 | 0 | 0 | 1 | 33.6.14 | 0 | 0 | 1 |
| UBC 815.6 | 0 | 1 | 0 | HVR.1 | 0 | 0 | 1 |
| UBC 815.7 | 0 | 1 | 1 | HVR.2 | 1 | 0 | 0 |
| UBC 815.8 | 0 | 0 | 1 | HVR.3 | 0 | 1 | 0 |
| UBC 815.9 | 1 | 1 | 0 | HVR.4 | 1 | 0 | 0 |
| HVA.1 | 1 | 1 | 1 | HVR.5 | 0 | 1 | 1 |
| HVA.2 | 0 | 1 | 1 | HVR.6 | 1 | 1 | 1 |
| HVA.3 | 1 | 1 | 1 | HVR.7 | 0 | 1 | 0 |

Nota: Incluye ambos marcadores moleculares ISSR y DAMD

La matriz binaria fue editada para su análisis en NTSYSpc versión 2.10e, obteniendo un dendograma entre los parentales y el híbrido interespecífico (Figura 30). Las distancias entre las especies se midieron a través de su cercanía con los extremos del dendograma, el cual va de 0 a 1, siendo el valor mínimo de similitud y el valor máximo desimilitud, respectivamente.

El híbrido presenta mayor similitud con el parental femenino *J. curcas* var Sikilte con 0.545, y mayor disimilitud con *J. integerrima* con un rango menor y más cercano al 0 con 0.456 (Tabla 10). En la Figura 30 se puede observar que *J. curcas* y el híbrido presentan similitud entre ellos respecto a *J. integerrima* y el híbrido, ya que entre más cerca del 0, mayor será la disimilitud entre ellos.

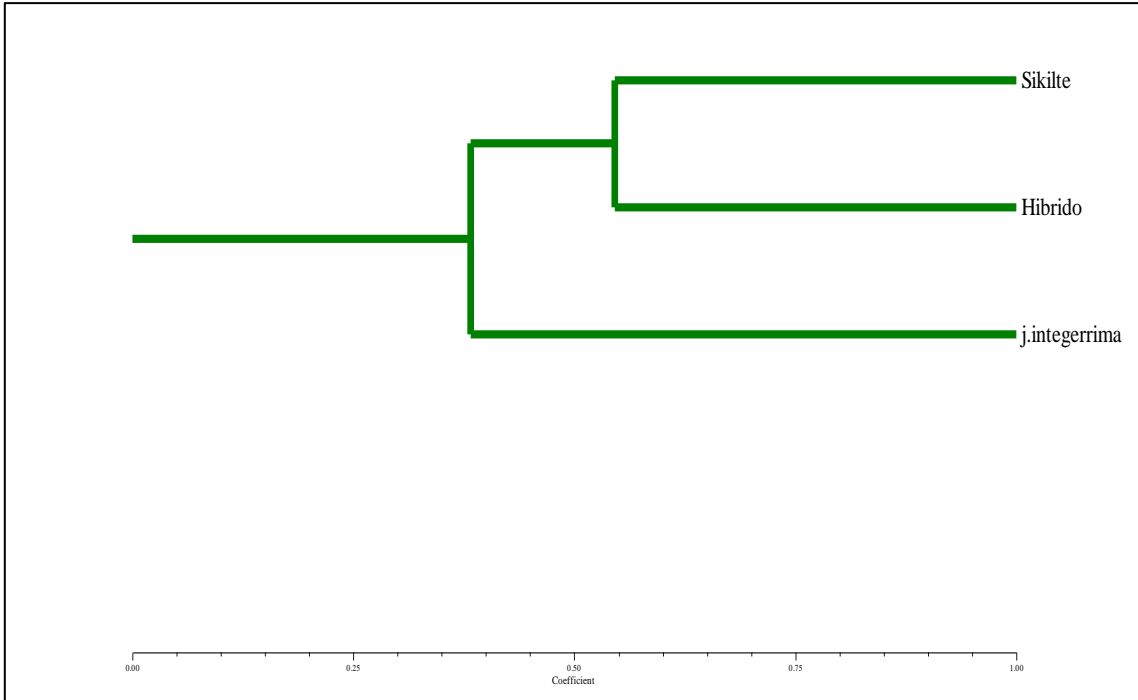


Figura 30. Dendrograma de las 3 especies de *Jatropha*: *J. curcas*, *J. integerrima* e híbrido.

Tabla 10. Análisis SIMQUAL de similitud

| Especie | <i>J. curcas</i> | Hibrido | <i>J. integerrima</i> |
|-----------------------|------------------|---------|-----------------------|
| <i>J. curcas</i> | 1 | | |
| Hibrido | 0.545 | 1 | |
| <i>J. integerrima</i> | 0.31 | 0.456 | 1 |

Nota: Para demostrar la similitud de *J. curcas* y el híbrido con un 0.545, y la disimilitud entre el híbrido y *J. integerrima* con 0.456.

Como resultado de los análisis moleculares se puede determinar la diferencia a nivel molecular entre los parentales y el híbrido, con esto se pudo comprobar que el

hibrido presenta características de ambos parentales, pero al mismo tiempo presenta una variación en su contenido de ADN, ya que exhibe patrones de bandeo que no presentan homología con los parentales.

De manera más visual, el hibrido presenta una morfología combinada de caracteres (Figura 31). Sin embargo, para poder realizar una caracterización morfológica es necesario tomar ciertas medidas y normas.



Figura 31. Planta híbrida en maceta. Resultado de la cruza interespecífica *J. curcas* var *Sikilte* × *J. integerrima*.

Conclusiones

La cruce interespecífica entre *J. curcas* y *J. integerrima* tuvo como resultado la combinación de características de los parentales en el híbrido, esto se comprobó mediante el análisis molecular con el uso de marcadores DAMD e ISSR. También, se observó que la cruce interespecífica generó una variación en el ADN del híbrido, pues este presentó características que no presentaban ninguno de los parentales. Porcentualmente, se puede decir que el 35% del contenido de ADN es del parental femenino *J. curcas*, 25% corresponde al parental masculino *J. integerrima*, 25% es una combinación de ambos parentales y el 15% restante no tiene relación alguna con los parentales, es decir, este contenido es nuevo dentro del H1 con base en el patrón de bandeo. Además, al ser *J. curcas* el parental femenino, la carga genética que este ejerce sobre el híbrido es mayor, por lo cual siempre tendrá mayor similitud con el híbrido, que el parental masculino.

Desde el punto de vista morfológico, el híbrido después de 3 meses en aclimatación presentó hojas con morfología de ambos parentales. Para caracterizar más descriptores hay que esperar dos años según lo recomendado en el manual "Guía técnica para la descripción varietal" de *J. curcas*, ya que después de este periodo la planta ha concluido su desarrollo.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas del trabajo, se puede continuar con la línea de investigación de mejoramiento genético, haciendo la crucea en el sentido inverso en el cual *J. integerrima* sea el parental femenino y receptor de polen de *J. curcas*, siendo este último el parental masculino. Esto, con el único fin de demostrar si existe o no incompatibilidad en la crucea recíproca. En dado caso de lograr la crucea recíproca y obtener frutos, se podría inducir la germinación de híbridos y, de este modo, caracterizarlos morfológica y molecularmente. Para así, determinar las diferencias que puedan existir entre los híbridos obtenidos de ambas cruceas interespecíficas.

Es bien sabido que *J. curcas* presenta alto contenido de ácidos grasos en sus frutos. Por lo tanto, realizar un perfil de los ácidos grasos presentes en los híbridos, nos puede ayudar a determinar si existe algún incremento o disminución del contenido de esta clase de moléculas. El descubrimiento de un híbrido con mayor contenido de ácidos grasos sería bastante benéfico para la industria en producción de biocombustibles.

Por lo cual, realizar la aclimatación de los híbridos obtenidos, es fundamental para realizar análisis posteriores, que van desde su caracterización morfológica y molecular, hasta perfiles bioquímicos de toxicidad y contenido de ácidos grasos, que nos permitirá experimentar con cruceas y retro cruceas en este género con el fin de incrementar su aprovechamiento.

Realizar las retro cruceas con el parental masculino *J. integerrima* nos ayudara a incrementar la carga genética del híbrido aumentando así las características de *J. integerrima* en el F2, incrementando la posibilidad de que las características morfológicas deseadas sean pasadas a la siguiente generación.

Continuar con el trabajo en especies del género *Jatropha*, nos ayudara a entender su comportamiento reproductivo y obtener plantas híbridas que tengan un aprovechamiento agronómico, comercial y ornamental.

REFERENCIAS

Aguilera-Cauich E.A. (2015). Evaluación de *Jatropha curcas* L. para la selección de genotipos con potencial energético en yucatán. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatan.

Alexandrov, E. (2016). The concentration of the chemical compounds and the color of berry to the varieties of the interspecific hybrids to the vines (*Vitis vinifera* L. X *Muscadinia rotundifolia* Michx.). Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development, 16 (1): 53-56.

Alhasnawi, A. N., Kadhimi, A. A., Isahak, A., Ashraf, M. F., Doni, F., Mohamad, A., Zain, C. M. (2015). Application of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) for Detecting Genetic Analysis in Rice (*Oryza sativa* L.). Journal of Pure and Applied Microbiology, 9(2): 1091–1101.

Anil, V. S., Lobo, S., Bennur, S. (2018). Somaclonal variations for crop improvement: Selection for disease resistant variants in vitro. Plant Science Today, 5(2): 44–54.

Ayala Tejada, D. (2007). Regeneración de plantas de Tabaquillo (*Nicotiana glauca*) a partir de protoplastos. Bachelor's thesis, Quito: USFQ, 2007.

Azofeita-Delgado, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales. Agronomía mesoamericana. 17(2): 221–242.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H. Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science, 315(5819): 1709–1712.

Barreta, D. M., Konflanz, V. A., de Pelegrin, A. J., Ferrari, M., Szareski, V. J., da Maia, L. C. (2019). Diallelic analysis of endogamic Maize lines with emphasis on agronomic traits of tassel in different environments. Journal of Crop Science and Biotechnology, 22(2): 101–111.

Bliffeld, M., Mundy, J., Potrykus, I., Futterer, J. (1999). Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. Theor. Applied Genet. 98(7): 1079-1086.

Botstein, D. White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American journal of human genetics, 32 (3): 314–331.

Brouns, S.J., Jore, M.M., Lundgren, M. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. Science, 321(5891): 960–964.

Chilton, M. D. Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., Nester, E. W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell, 11 (2): 263-271.

Cubero Salmerón, J. I. (2013). Introducción a la mejora genética vegetal. Mundi-Prensa. Available at: http://cataleg.ub.edu/record=b2110086~S1*cat (Accessed: 5 July 2019).

Dai, S., Zheng, P., Marmey, P., Zhang, S., Tian, W., Chen, S., Beachy R.N., Fauquet, C. (2001). Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium* mediated transformation and particle bombardment. *Mol. Breed.* 7(1): 25- 33.

Darbani, B., Farajnia S., Toorchi, M., Zakerbostanabad, S., Noeparvar, S., Stewart, C.N. (2008). DNA-delivery methods to produce transgenic plants. *Biotechnology* 7(3): 385-402.

Divakara, B. N. Upadhyaya, H. D., Wani, S. P., Gowda, C. L. (2010). Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: a review. *Applied Energy*, 87(3): 732-742.

Driver, J., Kuniyuki, A. H. (1984). In vitro propagation of Paradox Walnut root stock', *HortScience*, 19 (4): 507–509.

Ellis, D. D., McCabe, D. E., McInnis, S., Ramachandran R., Russell, D. R., Wallace K.M., McCown, B. H. (1993). Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. *BioTechnology* 11(1): 84-89.

Fresnedo-Ramírez, J., Orozco-Ramírez, Q. (2013). Diversity and distribution of genus *Jatropha* in Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60(3): 1087–1104.

Garfinkel, D. J., Simpson, R. B., Ream, L. W., White, F. F., Gordon, M. P., Nester, E. W. (1981). Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the TDNA by site-directed mutagenesis. *Cell*, 27(1): 143-153.

Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the Biology behind the “gene jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(1): 16-37.

Gilbert, N. E. G. (1958). Diallel cross in plant breeding', *Heredity*, 12(4): 477–492.

Gilman, E. F., Watson, D. G. (1993). *Jatropha integerrima peregrina*. Environmental Horticulture Department, University of Florida. USFS, Fact Sheet ST-319.

Góngora-Canul, C. C., Sebastian-Martínez, G., Uc-Varguez, A. López-Puc, G. (2018). El cultivo de *Jatropha curcas* L. en el sureste de México, Paquete Tecnológico. Ed: CIATEJ: 118–120.

Gupta, P. K., Varshney, R. K., Prasad, M. (2002), *Molecular Techniques in Crop Improvement, Molecular Techniques in Crop Improvement*. Edited by Jain, S.M., Brar, D.S., Ahloowalia B.S. (2010). *Molecular techniques in crop improvement*.

New York, NY, USA: Springer. doi: 10.1007/978-94-017-2356-5.

Haft, D.H., Selengut, J., Mongodin, E.F., Nelson, K.E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*;1(6) :e60.

Haritha, G., Sudhakar, T., Chandra, D., Ram, T., Divya, B., Sarla, N. (2016). Informative ISSR markers help identify genetically distinct accessions of *Oryza rufipogon* in yield improvement. *Rice Science*, 23(5): 225–241.

Hieber, A. D., Mudalige-Jayawickrama, R. G., Kuehnle, A. R. (2006). Color genes in the orchid *Oncidium Gower Ramsey*: Identification, expression, and potential genetic instability in an interspecific cross. *Planta*, 223(3):521–531.

Horvath P., Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 327(5962):167–70.

Karanam, K. R., Bhavanasi, J. (2010). U.S. Patent Application No. 12/810,759.

Kikkert, J. R., Vidal, J.R., Reisch, B. I. (2005). Stable transformation of plant cells by particle bombardment/ Biolistics. In: *Methods in molecular biology. Transgenic plants: Methods and protocols*, Pena, L. (Ed.). Humana Press Inc: Totowa, NJ., pp:61-78.

Kolawole, O.S., Abdulrahman, A. A., Jimoh, M. A., Oladele, F. A. (2016). Morphometric Study of Several Species of the genus *Jatropha* Linn.(Euphorbiaceae). *Notulae Scientia Biologicae*, 8(2), 211-215.

Li, L., Qu R., de Kochko A., Fauquet C.M., Beachy, R. N. (1993). An improved rice transformation system using the biolistic approach. *Plant Cell Rep.* 12(5): 250-255.

Lieb, V. M., Kerfers, M. R., Kronmüller, A., Esquivel, P., Alvarado, A., Jiménez, V. M., Steingass, C. B. (2017). Characterization of Mesocarp and Kernel Lipids from *Elaeis guineensis* Jacq., *Elaeis oleifera* [Kunth] Cortés, and Their Interspecific Hybrids', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18): 3617–3626.

Makarova, K.S., Grishin, N.V., Shabalina, S.A., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct*, 1 (1):7.

Mendoza-Villaseñor, M. L., Barba Gonzalez, R. (2006). Determinación de compatibilidad y obtención de híbridos inter-Específicos del género *Lilium*', (April), p. 44270.

Mikulic-Petkovsek, M., Ivancic, A., Schmitzer, V., Veberic, R., Stampar, F. (2016). Comparison of major taste compounds and antioxidative properties of fruits

and flowers of different *Sambucus* species and interspecific hybrids. *Food Chemistry*, (200): 134–140.

Mohan Jain, S., Brar, D. S. (2009). *Molecular techniques in crop improvement: 2nd edition, Molecular Techniques in Crop Improvement: 2nd Edition*. doi: 10.1007/978-90-481-2967-6.

Naeem, M., Verry, I.M., Kemp, P. D., Millner, J. P., Williams, W. M. (2017). Comparing mating designs to restore seed production of interspecific hybrids between *Trifolium repens* (white clover) and *Trifolium uniflorum*. *Plant Breeding*, 136(3): 420–426.

Ovando-Medina, I., Espinosa-García, F. J., Núñez-Farfán, J., Salvador-Figueroa, M. (2011). Genetic variation in Mexican *Jatropha curcas* L. estimated with seed oil fatty acids. *Journal of oleo science*, 60(6): 301–311.

Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F. (2004). Totipotencia celular: Una revisión y aplicación del concepto', Luz María Villarreal de Puga, 13.

Rodríguez Beraud, M. M., Rodríguez Beraud, M. M., Latsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., Astorga Brevis, P. K. (2014). In vitro induction of callogenesis and indirect organogenesis from explants of cotyledon, hypocotyl and leaf in *Ugni molinae*. *Bosque*, 35(1): 111–118.

Muakrong, N., Phetcharat, C., Tanya, P., Srinives, P. (2014). Inheritance of dwarfiness and erect growth habit in progenies of *Jatropha curcas* × *Jatropha integerrima*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 139(5): 582-586.

Schleiden, M. J. (1838) Beiträge zur phytogenesis.

Schwann, T., Hünslers, F. (1910). Mikroskopische Untersuchungen über die Ubereinstimmung in der Struktur und dem Wachstume der Tiere und Pflanzen (No. 176). W. Engelmann.

Kumar, R. S., Parthiban, K. T., Hemalatha, P., Kalaiselvi, T., Rao, M. G. (2009). Investigation on cross-compatibility barriers in the biofuel crop *Jatropha curcas* L. with wild *Jatropha* species. *Crop science*, 49(5): 1667-1674.

Subashini, G., Paramathma, M., Manivannan, N. (2015). Character association analysis for oil yield and yield components in bc4 f1 population of interspecific cross (*Jatropha curcas* × *Jatropha integerrima*). *Journal of Breeding and Genetics*, 47(4): 335–339.

Sujatha, M., Prabakaran, A. J. (2003). New ornamental *Jatropha* hybrids through interspecific hybridization, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(1): 75–82.

Sujatha, M., Sivaraj, N., Prasad, M. S. (2000). Biochemical and histological changes during in vitro organogenesis in *Jatropha integerrima*. *Biologia Plantarum*,

43(2): 167–171.

Sunilkumar, K., Mathur, R. K., Sparjanbabu, D. S., Pillai, R. S. N. (2015). Evaluation of interspecific oil palm hybrids for dwarfness, *Journal of Plantation Crops*, 43 (1): 29-34.

Tanya, P. Taeprayoon, P., Hadkam, Y., Srinives, P. (2011). Genetic Diversity Among *Jatropha* and *Jatropha*-Related Species Based on ISSR Markers', *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(1): 252–264.

Wang, D., Shi, J., Carlson, S. R., Cregan, P. B., Ward, R. W., Diers, B. W. (2003). A Low-Cost, high-throughput polyacrylamide gel electrophoresis system for genotyping with microsatellite DNA Markers', *Crop Science*, 43(5): 1828.

Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Van Montagu, M., Schell, J. (1983). Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *The EMBO journal*, 2(12): 2143-2150.

Zavala del Angel, I., García-Pérez, E., Hernández, D. G., Pérez-Vázquez, A., Reséndiz, C. A. (2016). Genetic Diversity of *Jatropha curcas* L. in Veracruz State, Mexico, and its Relationships with the Content of Phorbol Esters. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*, 5(5): 149–158.

Zhou, Z., Bebeli, P. J., Somers, D. J., Gustafson, J. P. (1997). Direct amplification of minisatellite-region DNA with VNTR core sequences in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(5-6): 942-949.