

Efecto de tres reguladores de crecimiento en la inducción de callo y obtención de brotes y plantas de *Jatropha curcas* mediante cultivo in vitro

Denisse Téllez, Rubén Domingo, Jorge Hernández y Hugo Mendoza

D. Téllez, R. Domingo, J. Hernández y H. Mendoza

Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense. Carretera Huejutla Chalahuiyapa. S/N Colonia Tepoxteco Huejutla de Reyes Hidalgo. C.P. 43000.
nis06@hotmail.com.

M. Ramos., V.Aguilera., (eds.).Ciencias Naturales y Exactas, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2014.

Abstract

This research was conducted in the laboratory of plants Biotechnology of the Technological University of the Huasteca Hidalguense, with the objective of evaluating various concentrations of plant growth regulators (2-4-D, BAP and IBA) to establish in vitro culture for the induction of callus, shoots and seedlings of *Jatropha curcas*. A design was completely randomized and the response variables were assessed by analysis of variance. For the induction of callus were used segments of young leaves, being the treatment T2 (AIB 0.1 mg/l BAP 0.1 mg/l), T4 (AIB 0.5 mg/l BAP 0.25 mg/l) and the T5 (AIB 0.25 mg/l 2,4-d 0.1 mg/l) had a 20% induction being the best treatments. For the induction of shoots were used stems with a knot being the T4 treatment with four outbreaks. To obtain plants were used embryos being the treatment T4 (AIB 0.25 mg/l BAP 0.5 mg/l) with the higher percentage of 90% germination, this same treatment showed plants with a greater diameter of stem of 0.47 cm, while the witness showed plants of greater height of 11.33 cm and length of leaves of 2.05 cm.

12 Introducción

La *Jatropha curcas* pertenece a la familia de las Euphorbiaceas, una de las más grandes y diversas en México. Normalmente crece a una altura entre tres y cinco metros. Sus hojas son grandes, alternadas de color verde a verde pálido. Las flores son pequeñas de 6 a 8 mm con pétalos de 6 a 7 mm de largo, mientras que la inflorescencia se forma en la axila de las hojas y los frutos se producen en invierno cuando el árbol queda sin hojas. Los frutos son triloculares (dividido en tres partes) con semillas en cada cavidad, formado por una cascara dura y leñosa. Las semillas maduran cuando su coloración cambia de color verde a amarillo, dos o tres meses después de la floración y las flores son polinizadas por insectos.

En México la *Jatropha curcas* presenta una gran distribución, se le registra en los estados de Yucatán, Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Guerrero, Puebla, Hidalgo, Morelos, Nayarit, Jalisco, Michoacán y Sinaloa (Rodríguez-Acosta et al., 2009). En México ha sido cultivada en desde tiempos precolombinos y era conocida y utilizada por los mayas (Toral et al., 2008).

Esta especie presenta un gran potencial industrial y medicinal. En la actualidad se desarrolla la producción de biodiesel a partir de las semillas de esta especie, luego del proceso de transesterificación (aceite de *Jatropha* + alcohol) para la elaboración del biodiesel, se obtiene un 15% de glicerol, con alto valor para su uso farmacológico e industrial, así como la producción de un metabolito denominado curcina una proteína de interés antiviral y antifúngica producida por esta misma especie. Así mismo la cascara de esta especie es utilizada para biogás por el alto poder calorífico y/o en su defecto para fertilizante orgánico (por contener N, P, K).

Mientras que el aceite de la semilla tiene acción purgativa, en enfermedades de la piel y se utiliza para disminuir el dolor causado por el reumatismo, en tanto que el látex tiene propiedades antimicrobianas (Jongschaap et al., 2007).

La planta es tolerante a sequía Gübittz et al. (1959) además de crecer en suelos pedregosos o arenosos con un contenido bajo en nutrientes (Li et al., 2008) y es ligeramente tolerante a terrenos salinos. Actualmente esta especie se propaga a escala masiva por siembra directa de semillas o por esquejes (Li et al., 2008), sin embargo el bajo rendimiento de la semilla y la facilidad con que se sacan las plantas de los suelos pobres y marginales impiden la utilidad práctica de estos métodos de propagación.

En la actualidad, la demanda de plantas de *Jatropha curcas* ha incrementado considerablemente y el método de propagación convencional a través de semillas produce plantas con alta variabilidad genética, lo que en un futuro causará problemas en los usos agroindustriales (López et al., 2008). En la propagación convencional asexual (estacas, acodos) la acumulación de enfermedades sistémicas es una de las principales causas que produce bajos rendimientos (Jiménez, 1998).

Debido a esta situación la regeneración in vitro, mediante las técnicas de cultivo de tejidos está teniendo una gran importancia para la productividad de este cultivo (Kalimuthu et al., 2007). La razón más importante es que con la propagación in vitro se obtienen plántulas genotípicamente iguales, esto hace posible la propagación de especies o variedades élites (López et al., 2008).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales o cultivo in vitro permite la obtención de una gran cantidad de plantas de interés, además es posible obtener plantas libres de patógenos en un medio nutritivo y aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas, además es posible identificar y producir metabolitos de uso industrial a mayor escala, calidad y rendimiento (Gómez, 2005).

Actualmente el cultivo de células y tejidos vegetales (CCTV) es una técnica de gran aplicación biotecnológica que consiste en la regeneración de plantas completas a partir de una masa amorfa, de células, que se denomina "callo" (vía organogénesis indirecta) o el desarrollo directo de plántulas sin el proceso de la formación de un callo denominada vía directa.

Actualmente se han desarrollado algunos protocolos de propagación de cultivo de tejidos vegetales de endospermos y la propagación rápida y masiva de genotipos selectos de *Jatropha curcas* debido al gran potencial industrial, medicinal y alimentario que presenta (Kumar et al., 2012; Misra et al., 2010 y Varshney y Jhonson, 2010). Además de que las plantas obtenidas por cultivo de tejidos vegetales no muestran diferencias con plantas obtenidas por técnicas tradicionales (Sujatha y Dinagra, 1993).

En la región de la Huasteca Hidalguense la planta de *Jatropha curcas* se encuentra en forma silvestre y es utilizada como alimento en la preparación de diversos platillos como tamales con huevo o simplemente tostada en comal (Martínez, 2007), así mismo la especie es utilizada como cerca para la delimitación de terrenos. Esta especie tiene un gran interés agronómico en la región debido a su gran potencial de adaptación para la reforestación de suelos erosionados y por su actual interés para la producción de biocombustible.

La propagación masiva de esta especie, resultaría una fuente de ingreso para los productores de la región, siendo alta la demanda de semilla por parte de empresas que transforman la materia prima en biocombustible y biorreductores de viscosidad, es por ello que la Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense comienza a realizar protocolos de propagación in vitro de esta especie.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la aplicación de tres reguladores de crecimiento (2-4-D diclorofenoxiacético, BAP, y AIB) para la inducción de callo y obtención de brotes y plantas de *Jatropha curcas*, así como evaluar el porcentaje de germinación, diámetro de tallo, altura y número de hojas de las plántulas obtenidas in vitro.

12.1 Materiales y métodos.

Localización del proyecto.

El presente proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense, ubicado en la ciudad de Huejutla de Reyes, Hidalgo localizada al norte del estado y geográficamente entre los paralelos 21°08´ de latitud norte y 98°25´ de longitud oeste, a una altitud de 140 metros sobre el nivel del mar. Registrando un clima cálido-húmedo y una temperatura media anual de 40.1 °C. La precipitación pluvial es de 1,500 milímetros por año (INEGI, 2010).

Recolección de germoplasma

Se utilizaron semillas de la especie *Jatropha curcas*, recolectadas con anterioridad en la localidad de Tepeco situado en el Municipio de Huautla en el Estado de Hidalgo. Se trabajo con estas semillas debido a que en estudios anteriores presentaron un alto porcentaje de ácidos grasos y proteínas.

Pruebas sanitaria en semillas de *Jatropha curcas*.

Se colocaron 12 semillas de la especie *Jatropha curcas* en 125 ml de medio de cultivo Agar Dextrosa Saboraud (ADS) con tetraciclina como antibiótico al 0.1 %; distribuidos en 6 placas Petri.

La siembra de las semillas se realizó bajo dos tratamientos en la campana de flujo laminar, colocando 3 placas Petri con semillas de piñón sin desinfectar y 3 placas Petri con semillas de piñón desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1 % durante 30 segundos y enjuagadas con H₂O destilada, con el objetivo de trabajar con semillas libres de patógenos antes de ser colocadas en el sustrato.

Colocación de las semillas en sustrato para la selección de plantas madre y obtención de hojas y tallos para el cultivo in vitro.

Las semillas se colocaron en bolsas de 25 x10 que fueron llenadas con la combinación de sustratos de lombricomposta, arena y peat moss previamente desinfectado por solarización y agua caliente, esto se llevó a cabo en el invernadero de tipo baticenital que se encuentra dentro de la Universidad Tecnológica. A los 20 días de germinación se tomaron hojas jóvenes para la inducción de callos y tallos con un nudo para la inducción de brotes. Obteniéndose este material vegetal de las plantas que presentaron un adecuado manejo de nutrición y fertilización.

Preparación de medio de cultivo.

Se utilizó el medio de cultivo suplementado con las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS) complementado con 30 g de sacarosa y 7 g/l de Agar con un pH de 5.8, esterilizado en un autoclave por 20 minutos a 121 °C.

Desinfección de las hojas, tallos y embriones.

Se utilizaron segmentos de hoja (área 1.0 cm²) y tallos con un nudo (área 1.0 cm²), obtenidos de las plantas conservadas en el invernadero, fueron trasladados al laboratorio de biotecnología vegetal en un vaso de precipitado con agua para evitar su deshidratación. Fueron desinfectados con solución jabonosa y agua de la llave.

El segundo lavado se realizó con una solución de tween 20 al 1% durante 5 min con agitación constante, después se realizaron lavados con agua destilada para remover la capa de grasa de los tejidos vegetales y permitir una mejor penetración de la solución desinfectante. Posteriormente fueron colocados en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 1% por 25 min, agitando periódicamente para un mejor contacto de la solución. Se enjuagaron con agua destilada estéril y por último se colocaron en una solución de etanol al 80% por 20 s.

Los embriones fueron desinfectados con solución jabonosa y agua de la llave, posteriormente se sometieron a una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 5 minutos, después se colocaron en una solución de etanol al 70% durante 5 minutos y se enjuagaron con agua estéril para su posterior siembra en una campana de flujo laminar. La desinfección se realizó bajo condiciones estériles en una campana de flujo laminar. (Dixon, 1991).

Colocación de las hojas, tallos y embriones en el medio de cultivo.

Una vez que el material vegetal se desinfectó, con la ayuda de un bisturí previamente flameado se realizaron cortes de los segmentos de hoja y tallos, mientras a que las semillas se les elimino la testa y se extrajo el embrión partiendo del endospermo. El material vegetal se coloco en frascos que contenían 25 ml de medio MS, a cada frasco se le colocaron 2 segmentos de hoja, 1 tallo y 2 embriones por frasco, el proceso se realizó en la campana e flujo laminar cerca del mechero para evitar posible contaminación.

Incubación de los frascos

Después de que se realizó la siembra, los frascos se colocaron en el área de incubación con un fotoperiodo de (16 h luz / 8 oscuridad).

Tratamientos

Se establecieron 6 tratamientos y un control con 2 repeticiones utilizando la combinación de los reguladores de crecimientos ácido-indol-butírico (AIB), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y Bencil-amino-purina (BAP) para el material vegetal de hojas y tallos. Los tratamientos evaluados consistieron en: T1 (AIB 0 mg/l + BAP 0.5 mg/l), T2 (AIB 0.1 mg/l + 0.1 mg/l), T3 (AIB 0.25 mg/l + BAP 0.1 mg/l), T4 (AIB 0.5 mg/l + BAP 0.25 mg/l), T5 (AIB 0.25 mg/l + 2,4 D 0.1 mg/l), T6 (2-4-D 0.1 mg/l) + (2,4-D 0.1 mg/l + BAP 2 mg/l) y un control (Bermejo et al., 2010).

Para el material vegetal de embriones se utilizaron 4 tratamientos y un control con 2 repeticiones. Los tratamiento evaluados consistieron en: T1 (AIB 0.1 mg/l + BAP 0.1 mg/l), T2 (AIB 0.25 mg/l + 0.25 mg/l), T3 (AIB 0.5 mg/l + BAB 0.5 mg/l), T4 (AIB 0.25 mg/l + BAP 0.5 mg/l) y un control. (Bermejo et al., 2010).

Diseño experimental

Se estableció un diseño completamente al azar y se evaluaron las variables de respuesta mediante un análisis de varianza, a las variables que resultaron con diferencias significativas, se realizo la comparación de medias por la prueba de Tukey. Los datos se analizaron en el programa estadístico de la Universidad de Nuevo León.

Variables de respuesta

Porcentaje de inducción de Callos

Se obtuvo registrando el porcentaje de formación de callos después de un mes de haber realizado el cultivo in vitro de las hojas.

Inducción de brotes.

Se obtuvo registrando el número de brotes después de 21 días de haber realizado el cultivo de tallos con un nudo.

Germinación de embriones.

Esta variable se obtuvo registrando el porcentaje de germinación de cada uno de los tratamientos, a partir de los 5 días después de la siembra.

Diámetro de tallo de la plántula.

Se obtuvo midiendo el diámetro de tallo con la ayuda de un vernier en la parte central de la planta, después de dos meses haber realizado el cultivo, los datos se reportaron en centímetros (cm).

Altura de plántula

Se estuvo realizando las mediciones de la altura de cada plántula, después de dos meses de haber realizado el cultivo, para ello se tomaron datos de cinco plantas por tratamiento, los datos fueron reportados en centímetros (cm).

Longitud de la hoja

Se obtuvo tomando la longitud de las hojas de cada planta en los diferentes tratamientos después de dos meses de haber realizado el cultivo, se realizó con la ayuda de una regla.

12.2 Resultados y discusión

Porcentaje de inducción de callo (PIC).

Para el porcentaje de inducción de callos, el tratamiento T2 (AIB .01 mg/l + BAP 0.1 mg/l), el tratamiento T4 (AIB 0.5 mg/l + BAP 0.25 mg/l) y el tratamiento 5 (AIB 0.25 mg/l + 2,4-D 0.1 mg/l), presentaron una inducción del 20%, mientras que un 10% para los tratamientos 3 (AIB 0.25 mg/l + BAP 0.1 mg/l), y 6 (2-4-D 0.1 mg/l + (2,4-D 0.1 mg/l + BAP mg/l), siendo el T1 (AIB 0 mg/l + BAP 0.5 mg/l) y el control en los que no hubo presencia de callo, obteniéndose este resultado a un mes de establecido el cultivo de hojas jóvenes.

Tabla 12 Comparación de medias para la variable porcentaje de inducción de callos obtenidos por tratamiento

Tratamiento	Concentración de los reguladores de crecimiento.	% de inducción de callo
1	AIB 0 mg/l + BAP 0.5 mg/l	0% NI
2	AIB 0.1 mg/l + BAP 0.1 mg/l	20% A
3	AIB 0.25 mg/l + BAP 0.1 mg/l	10% B
4	AIB 0.5 mg/l + BAP 0.25 mg/l	20% A
5	AIB 0.25 mg/l + 2,4- D 0.1 mg/l	20% A
6	2,4-D 0.1 mg/l + BAP 2 mg/l	10% B
0	0	0% NI

NI: no inducido. Se realizaron 2 repeticiones para cada tratamiento; diferentes letras en los valores del % de inducción de callo indican diferencia significativa $P < 0.05$.

Figura 12 Callos obtenidos a partir de hojas jóvenes de *Jatropha curcas*



Los resultados obtenidos difieren con el trabajo de Bermejo et al., (2010) que utilizando las concentraciones del tratamiento 2 (AIB 0.1 mg/l + BAP 0.1 mg/l) obtuvieron un porcentaje de inducción del 66%, para el tratamiento 4 (AIB 0.5 mg/l + BAP 0.25 mg/l) estos autores obtuvieron un 100% de inducción, mientras que para el tratamiento T3 (AIB 0.25 mg/l + BAP 0.1 mg/l) obtuvieron un porcentaje de inducción del 88%.

Las diferencias de porcentaje en la inducción de callos utilizando los mismos tratamientos pueden deberse a que las condiciones de diferenciación celular y su respuesta a los factores físicos controlados de temperatura, fotoperiodo y humedad pueden variar aun en plantas de la misma especie. Bermejo y col. trabajaron con *Jatropha curcas* del estado de Morelos y este trabajo se desarrolló con plantas provenientes del estado de Hidalgo.

López y Hernández col. (2008) trabajando con plantas de *Jatropha curcas* de dos variedades cubana y africana mostraron diferentes resultados aún trabajando con el mismo material vegetal (hojas, peciolo e inflorescencias) y los mismos reguladores de crecimiento (BAP y 2-4-D) siendo la variedad cubana la que presentó un 100% de inducción de callos a partir de peciolo y la variedad africana un 100% de inducción de callos a partir de hojas. Andrés (2012) logró la inducción de callo utilizando auxinas y citocininas de esta especie a partir de hojas jóvenes, lo mismo sucedió con el trabajo realizado por Muñoz et al., (2003).

Se ha reportado que si se desea inducir a callo en un medio que no contenga auxinas, la producción de callo es casi nula o muy baja, pero si se incrementa la concentración de auxinas se podría incrementar la producción de callo (García et al., 1987).

Inducción de brotes (IB).

Para la inducción de brotes el T 1 (AIB 0 mg/l + BAP 0.5 mg/l) obtuvo una inducción de 1-3 brotes por tallo, mientras que con el T2 (AIB 0.1 mg/l + BAP 0.1 mg/l) y el T4 (AIB 0.5 mg/l + BAP 0.25 mg/l) se indujeron de 2 a 4 brotes respectivamente.

Tabla 12.1 Comparación de medias para la variable número de brotes inducidos por tratamiento.

Tratamiento	Concentración de la hormona	No. Brotes
1	AIB 0 mg/l + BAP 0.5 mg/l	3
2	AIB 0.1 mg/l + BAP 0.1 mg/l	2
3	AIB 0.25 mg/l + BAB 0.1 mg/l	NI
4	AIB 0.5 mg/l + BAP 0.25 mg/l	4
5	AIB 0.25 mg/l + 2,4- D 0.1 mg/l	NI
6	2,4-D 0.1 mg/l + BAP 2 mg/l	NI
0	0	NI

Figura 12.1 Brotes obtenidos de tallos con un nudo de *Jatropha curcas*



Publicaciones como las de Datta y col. (2007) reportaron la inducción de brotes a partir de nodales de *J. curcas* a los 28-42 días de incubación, de igual forma que Banerjee y Shrivastava (2008) obtuvieron brotes con el mismo material vegetal a los 21-28 días de cultivo, utilizando AIB y BAP en concentraciones mas altas que en está investigación, además de otros aditivos como sulfato adenina, glutamina y acido cítrico.

En este trabajo se obtuvieron brotes en menos tiempo (21 días), el numero de brotes obtenidos difiere con Bermejo (2010) en el T1 (AIB 0 mg/l + BAP 0.5 mg/l) donde obtuvieron 1 brote, mientras que en el tratamiento T4 (AIB 0.5 mg/l + BAP 0.25 mg/l) obtuvieron 9 brotes.

El número de brotes obtenido en este trabajo fue menor, podría deberse al material vegetal utilizado (tallos con un nudo). Andrés (2012) obtuvo un mayor número de brotes utilizando como material vegetal hojas, lo mismo sucede con Tejedor (2010) al utilizar hojas cotiledonares permitiendo la inducción de brotes después de 4 semanas.

Porcentaje de germinación de embriones (PGE).

Para el porcentaje de germinación de embriones, el tratamiento T4 (AIB 0.25 mg/l + BAP 0.5 mg/l) obtuvo un 90% de germinación y 9 plántulas, siendo el tratamiento T3 (AIB 0.5 mg/l + BAB 0.5 mg/l) el que obtuvo un menor porcentaje de germinación del 60% con 6 plántulas.

Tabla 12.2 Comparación de medias para la variable porcentaje de germinación de embriones en los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Concentración de la hormona	% Germinación	No. de Plántulas obtenidas
1	AIB 0.1 mg/l + BAP 0.1 mg/l	80 B	8
2	AIB 0.25 mg/l + 0.25 mg/l	70 C	7
3	AIB 0.5 mg/l + BAB 0.5 mg/l	60 D	6
4	AIB 0.25 mg/l + BAP 0.5 mg/l	90 A	9
Control	0	80 B	8

Se realizaron 2 repeticiones para cada tratamiento; diferentes letras en los valores del % de inducción de germinación indican diferencia significativa $P < 0.05$.

Trabajos realizados por Ville (1996) menciona que utilizando citocininas como BAP se obtiene un 90% de germinación mientras no se presente contaminación.

Diámetro de tallo de las plántulas de *Jatropha curcas* obtenidas in vitro (DT).

En el análisis de varianza se observa que no existe diferencia significativa entre tratamientos para esta variable. Como se puede observar la f calculada es menor que la f de tablas ($f_c < f_t$), por lo tanto no se realiza la comparación de medias ya que todos los tratamientos son estadísticamente iguales.

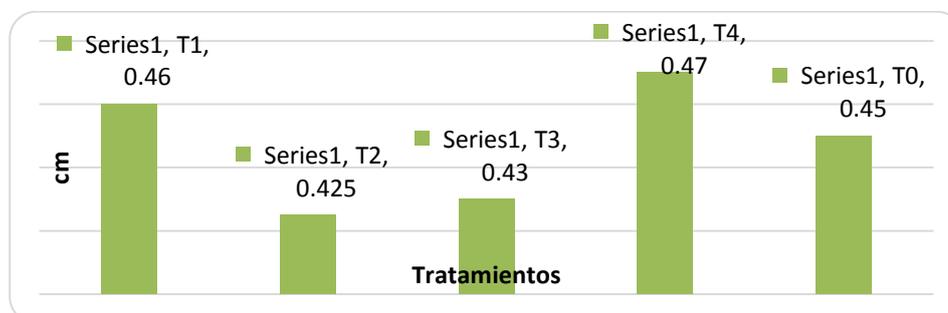
Tabla 12.3 Análisis de varianza para la variable Diámetro de tallo de plántulas de *Jatropha curcas* obtenidas in vitro.

FV	GL	SC	CM	Fc	Ft.
					0.05
TRATAMIENTOS	4	0.00346	0.000865	1.8804	5.19
ERROR	5	0.0023	0.00046		
TOTAL	9	0.00576			

C.V= 4.6877%

Como se puede observar en la gráfica 1, el T4 (AIB 0.25 mg/l + BAP 0.5 mg/l) fue el que presentó plántulas con mayor diámetro del tallo con .47 cm seguido por el T1 (AIB 0.1 mg/l + BAP 0.1 mg/l) con .46 cm, siendo el tratamiento T2 (AIB 0.25 mg/l + 0.25 mg/l) el que presentó plántulas con menor diámetro de tallo con .42 cm.

Gráfico 12 Diámetro de tallo de plántulas de *Jatropha curcas* obtenidas in vitro.



Las citocininas son un grupo de reguladores de crecimiento consideradas responsables del proceso de división celular (Klee y Stelle, 1991) y también son responsables de varios procesos vegetales.

Altura de plántulas de *Jatropha curcas* obtenidas in vitro (AP).

Para la altura de plántulas de *Jatropha curcas* obtenidas in vitro se observó que el tratamiento T0 (Testigo) y el tratamiento T1 (AIB 0.1 mg/l + BAP 0.1 mg/l), presentaron plántulas con mayor altura, con rangos que van de 11.33 cm a 10.70 cm, respectivamente siendo estos dos estadísticamente iguales pero diferentes a los demás tratamientos.

Tabla 12.4 Comparación de medias para la variable altura de plántulas de *Jatropha curcas* obtenidas in vitro.

Tratamientos	Media (cm)
T0	11.33 a
T1 (aib 0.1 mg/l + bap 0.1 mg/l)	10.70 a
T2 (aib 0.25 mg/l + 0.25 mg/l)	6.82 c
T3 (aib 0.5 mg/l + bab 0.5 mg/l)	7.1 bc
T4 (aib (0.25 mg/l + bap 0.5 mg/l)	8.38 b

Se realizaron 2 repeticiones para cada tratamiento; diferentes letras en los valores de la altura indican diferencia significativa $P < 0.05$.

La biosíntesis y homeostasis de las citocininas están finamente controladas por factores internos y externos como el nivel de otros reguladores de crecimiento (auxinas) y las fuentes de nitrógeno inorgánico como las contenidas en el medio de cultivo (Klee y Stelle, 1991). Las auxinas influyen principalmente en el alargamiento celular, el crecimiento de la raíz y dominancia apical. (Bywater, 2001).

Villancinda (1990) menciona que en el cultivo in vitro las citocininas han permitido grandes progresos especialmente en micropropagación por su función de proliferación celular mediante la división celular.

En plántulas de la familia de las cactáceas específicamente en la especie *Ferocactus latispinus* se observó también que plántulas provenientes del tratamiento control presentaron mayor longitud total Amador et al. (2013).

Longitud de hojas de las plántulas de *Jatropha curcas* obtenidas in vitro (LH).

En la longitud de hojas de las plántulas de *Jatropha curcas* obtenidas in vitro el T0 (Control) mostró plántulas con hojas de mayor longitud con un promedio de 2.05 cm, mientras que el T2 (AIB 0.25 mg/l + 0.25 mg/l) y el T4 (AIB (0.25 mg/l + BAP 0.5 mg/l) se encuentran en segundo lugar siendo estadísticamente iguales con valores promedios que van de 1.95 a 1.85 cm.

Siendo los T1 (AIB 0.1 mg/l + BAP 0.1 mg/l) y T3 (AIB 0.5 mg/l + BAB 0.5 mg/l) los que presentan valores que van de 1.685 a 1.37 cm respectivamente.

Tabla 12.5 Comparación de medias para la longitud de hojas de las plántulas de *Jatropha curcas* obtenidas in vitro.

Tratamientos	Media (cm)
T0	2.05 a
T1 (AIB 0.1 mg/l + BAP 0.1 mg/l)	1.685 BC
T2 (AIB 0.25 mg/l + 0.25 mg/l)	1.95 AB
T3 (AIB 0.5 mg/l + BAB 0.5 mg/l)	1.37 C
T4 (AIB (0.25 mg/l + BAP 0.5 mg/l)	1.85 AB

Se realizaron 2 repeticiones para cada tratamiento; diferentes letras en los valores de la altura indican diferencia significativa $P < 0.05$.

Muñoz et al., (2003) obtuvo plántulas de *Jatropha curcas* con crecimiento normal y raíces delgadas y largas sin adicionar reguladores de crecimiento utilizando medio de cultivo MS.

Figura 12.2 Plántulas de *Jatropha curcas* después de dos meses de haber sido obtenidas in vitro



12.2 Conclusiones

Para inducir a la formación de callo (masa amorfa) es necesario utilizar hojas jóvenes de *Jatropha curcas* utilizando reguladores de crecimiento como auxinas (AIB, 2,4-D) y citocininas (BAP) en concentraciones adecuadas y en condiciones controladas.

En cuanto al % de inducción de callo los mejores tratamientos fueron el T2 (AIB 0.1 mg/l + BAP 0.1 mg/l), T4 (AIB 0.5 mg/l + BAP 0.25 mg/l) y el T5 (AIB 0.25 mg/l + 2,4-D 0.1 mg/l), con 20%.

En la inducción de brotes el T4 (AIB 0.5 mg/l + BAP 0.25 mg·L⁻¹) fue el mejor presentando de 2 a 4 brotes por tallo.

Para el cultivo de embriones el mejor tratamiento fue el T4 (AIB (0.25 mg/l + BAP 0.5 mg/l) con un 96% de germinación y la obtención de 9 plantas, además de ser el tratamiento con mayor diámetro de tallo en plántulas de *Jatropha curcas* con .47 cm.

El tratamiento control presento plántulas de *Jatropha curcas* con mejor altura y longitud de hojas, con 11.33 y 2.05 centímetros respectivamente

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica de la biotecnología que nos permite obtener plantas libres de patógenos a partir de material vegetal en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad aprovechando la totipotencialidad de las células (Hartmann y Kester, 1995).

12.3 Agradecimientos

Los autores agradecemos al Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP) por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto. Con número de carta PROMEP/103.5/12/7956.

12.4 Referencias

Amador-Alfárez, K. A., Díaz-González, J., Loza-Cornejo, Sofía y Bivián-Castro Eglá Yareth. 2013. Efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas de dos especies de *Ferocactus* (Cactaceae). *Polibotánica*, 35 (35), 109-131.

Andrés-Prada, J. (2012). Regeneración de plantas vía organogénesis y crioconservación de *Jatropha curcas* L. Tesis de Maestría. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza. Turrialba, Costa Rica.

Banerjee, M. y Shrivastava S. (2008). *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.) Influence of additives. *International Journal of Integrative Biology*, 3 (1), 73-79.

Bermejo-Cruz, M. E .G., Lozano, E. S. y Martínez-Ayala, A. L. (2010). Cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas* para la obtención de curcuma. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN. México.

Bywater, M. (2001). "Plant Growth Regulators. Mode of Action. Australian Turfgrass Management. http://www.agcsa.com.au/static/atm_articles/html/3_3c.html.

Datta, M. M., Mukherjee, P., Ghosh, B. y Baran, Jha, T. (2007). *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant *Jatropha curcas* L. *Current Science*, 93 (10), 1438-1842.

- Dixon, R.A. 1991. Plant cell culture: a practical approach. Washington DC. IRL PRESS.
- Gómez Y. (2005). Establecimiento de un cultivo *in vitro* de *Ipomea intrapilosa* y evaluación de su actividad insecticida contra *Trialeurodes vaporarionum*. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN.México.
- Gübittz, G.M., Mitelbach, M. y Trabbi, M. (1999). Exploration of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Biores. Technol*, 67 (3), 73-82.
- Hartmann, H. y Kester, E. (1995). Propagación de plantas. Principios y Prácticas. México. Continental.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2010.
- Jiménez, E.A. (1998). Generalidades del Cultivo *in vitro*. En Pérez J. N. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. p. 13-24. Santa Clara, Cuba.
- Jongschaap, R. E. E., Corre, W. J., Bindrama, P. S. y Branderbug, W. S. (2007). Claims and facts of *Jatropha curcas* L. global *Jatropha curcas* evaluation, breeding and propagation programme. Report 158. Plant Research International, Wageningen. Netherlands.
- Kalimuthu, K., S. Paulsamy, R. Senthilkumar, M. Sathya. (2007). *In vitro* propagation of the Biodiesel plant *Jatropha curcas* L. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 17 (2), 137-147.
- Klee, H. y Estelle, M. (1991). Molecular genetic approaches to plant hormone biology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 42 (3), 529-551. doi: 10.1146/annurev.pp.42.060191.002525.
- Kumar, N., Vijay, Anand, K. J. y Reddy, M. P. (2011). *In vitro* regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas*. *Ind Crop prod*, 33 (2), 146-151.
- Li, J., Li, M. R., Wu, P. Z. y Gu, J. L. (2008). Molecular cloning and expression analysis of a gene encoding a putative B-Ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) synthetase III Kas III from *Jatropha curcas*, *Tree Physiol*, 28 (6), 921-927.
- López-Hernández, D., Peñate A. L., Daquinta, G. M., Pina, M. D. y Escalona, M. M. (2008). Cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas*. Resultados preliminares y estrategias futuras. Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Avila, Cuba.
- Martínez-Herrera, J. (2006). Caracterización genética, nutricional y no nutricional de *Jatropha curcas* de México. Tesis de doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas de México. México. D.F.
- Misra, P., Gupta, N., Topo, D.D., Pandey, V., Misra, M. K. y Tuli R. (2010). Establishment of long-term proliferating shoots cultura of elite *Jatropha curcas* L. by controlling entophytic bacterial contamination. *Plant Cell. Tissue and Organ culture*, 100 (2), 189-197.
- Muñoz, J., Valerin, K., Alvarenga, S. y Alan, E. (2003). Cultivo *in vitro* de Tempate (*Jatropha curcas*). *Tecnología en marcha*, 16 (4), 53-59.
- Rodríguez-Acosta, M., Vega-Flores, K., De Gante-Cabrera, V. H. y Jiménez- Ramírez, J. (2009). Distribución del género *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) en el estado de Puebla. México. *Polibotánica*, 16 (28), 37-48.
- Sujatha, M. y Dinagra, M. (1993). Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerrima*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 35 (3), 293-296.

- Tejedor, B. (2010). Micropropagación de *Jatropha curcas*. Escuela Técnica General de Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica de Valencia, España,
- Toral, O., Iglesias, J. M., Montes de Oca, S., Sotolongo, J. A., García, S. y Torsti, M. (2008). *Jatropha curcas* una especie arbórea con potencial energético en Cuba. *Pastos y Forrajes*, 31 (3), 191-207.
- Varshney, A. y Jhonson, T. (2010). Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of *Jatropha curcas* a biodiesel plant. *Plant Biotechnol. Rep*, 4 (2), 139-148. doi 10.1007/s11816-010-0129-0.
- Villancinda, Maldonado, R. W. (1990). Respuesta de la especie tres puntas (*Neurotonalobata* L.) a la propagación *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía.
- Ville, C. (1996). Biología. México. Mc-Graw Hill.