

UCH-FC
Biotecnología
M491
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**REGENERACIÓN *IN VITRO* DE BROTES
A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES
DE *Jatropha curcas***

Seminario de Título

Entregado a la

Universidad de Chile

en cumplimiento de los requisitos

para optar al título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Felipe Andrés Medina Marín

Octubre – 2012

Santiago – Chile

Director del Seminario de Título: Dr. Manuel Paneque Corrales

Patrocinante del Seminario de Título: Dra. Lorena Norambuena Morales



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Felipe Andrés Medina Marín

“REGENERACIÓN *IN VITRO* DE BROTES A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Jatropha curcas*”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

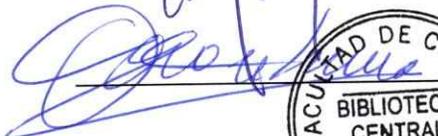
Dr. Manuel Paneque
Director Seminario de Título

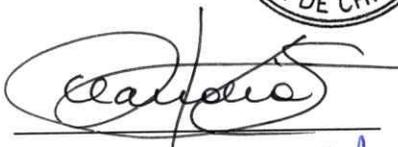
Dra. Lorena Norambuena
Patrocinante del Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Claudia Stange
Presidente Comisión

Dr. Michael Handford
Evaluador


Santiago, 22/10/2013



Dedicado a mis padres:

Ana María de los Ángeles Marín Puga × Marco Antonio Medina Molina.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero agradecer a mis padres por permitirme entrar a la carrera de Biología Ambiental, financiarme toda mi carrera en la Universidad de Chile, y aguantarme todos los años que vivimos juntos.

Quiero agradecer al bioquímico Guillermo Martínez, mi co-tutor *de facto*, por ayudarme durante el desarrollo de este trabajo y mi estadía en el laboratorio, escuchar mis inquietudes (científicas, éticas, etc.), y compartir más de alguna discusión sobre el rumbo o la interpretación de los experimentos junto a una buena taza de café, amenizando así jornadas que podrían haber resultado frustrantes sin su apoyo.

Aprovecho de agradecer a varias personas que aportaron de alguna u otra forma a la realización de este trabajo (en orden cronológico): Manuel Paneque (por aceptarme y aguantarme como “tesista” en su laboratorio), Leticia Acosta (por sus consejos agronómicos, y cuidar del material vegetal del campo e invernadero), Catalina Rojas del INIA La Platina (por sus consejos sobre cultivo *in vitro*, donarnos el preciado antibiótico, y prestarnos el mango de bisturí que nunca devolvimos), Danae Riquelme y colaboradores del Lab. de Microbiología de la Facultad de Cs. Agronómicas (por regalarnos una tarde identificando a los contaminantes fúngicos), y a Claudia Stange (por sus comentarios que dieron resultado en la versión final de este escrito, y por alentarme a terminar esta etapa que es “la tesis” de pregrado).

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer nuevamente a mis padres. Ya que de no ser por ellos y su constante amor, apoyo, y “termina la tesis”; Usted no tendría este trabajo en sus manos.



INDICE DE CONTENIDO

Cuerpo preliminar

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice de contenido	iv
Índice de tablas	vii
Índice de figuras	viii
Lista de abreviaturas	ix

Resumen

Abstract

1. Introducción

1.1. Datos generales de <i>Jatropha curcas</i>	1
1.2. Métodos de micropropagación de <i>Jatropha curcas</i>	2
1.3. Organogénesis en explantes foliares de <i>Jatropha curcas</i>	5
1.4. Hipótesis de trabajo	10
1.5. Objetivos	10

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

2.1.1. Material vegetal	11
2.1.2. Reactivos y materiales de laboratorio	11

2.2. Métodos	
2.2.1. Desinfección	12
2.2.2. Medios de cultivo	12
2.2.3. Condiciones de cultivo	14
2.2.4. Diseños experimentales y recolección de datos	
2.2.4.1. Diseño factorial completo	14
2.2.4.2. Diseño factorial fraccional	15
2.2.4.3. Diseño en bloques	16
2.2.5. Análisis estadísticos	17
3. Resultados	
3.1. Contaminación <i>in vitro</i>	18
3.2. Efecto de la edad foliar y aditivos	19
3.3. Análisis exploratorio de factores exógenos	22
3.4. Efecto de la polaridad foliar	22
3.5. Efecto de la concentración de sacarosa	24
3.6. Efecto del medio de cultivo y su concentración	27
3.7. Efecto de la concentración de BAP e IBA	30
4. Discusión	
4.1. Desarrollo morfológico – callos y estructuras organizadas	36
4.2. Material vegetal y condiciones para el cultivo <i>in vitro</i>	
4.2.1. Contaminantes microbianos	37

4.2.2. Condiciones ambientales del lugar de cultivo	39
4.2.3. Rol de las características de la hoja fuente de explantes	40
4.2.4. Apreciación cualitativa del efecto del genotipo	41
4.3. Los componentes del medio de cultivo	
4.3.1. Aditivos: carbón activado, polivinilpirrolidona y citrato	42
4.3.2. Rol de la sacarosa en la proliferación de callo foliar	43
4.3.3. Comparación de los medios basales MS y WPM	44
4.3.4. Rol de las hormonas BAP e IBA	46
5. Conclusiones	50
6. Bibliografía	51



INDICE DE TABLAS

Tabla I	Resultados de diferentes métodos de micropropagación de <i>Jatropha curcas</i>	4
Tabla II	Medios de cultivo utilizados en los experimentos de este trabajo	13
Tabla III	Diseño de Plackett-Burman utilizado en el análisis exploratorio	16
Tabla IV	Factores modificados y sus niveles en el análisis exploratorio	16
Tabla V	Tabla de ANOVA del efecto de la edad foliar y aditivos (AC y PVP) sobre el crecimiento de discos foliares en cultivo <i>in vitro</i>	21
Tabla VI	Tabla de ANOVA del efecto de la sacarosa en el crecimiento de callo de discos foliares en la incubadora de cultivo	27
Tabla VII	Tabla de ANOVA del efecto de la sacarosa en el crecimiento de callo de discos foliares en el armario de cultivo	27
Tabla VIII	Tabla de ANOVA del efecto del medio basal nutritivo en el crecimiento de callo de discos foliares en la incubadora de cultivo	29
Tabla IX	Tabla de ANOVA del efecto del medio basal nutritivo en el crecimiento de callo de discos foliares en el armario de cultivo	29
Tabla X	Tabla de ANOVA del efecto de la concentración de hormonas en el crecimiento de callo de discos foliares en la incubadora de cultivo	31
Tabla XI	Tabla de ANOVA del efecto de la concentración de hormonas en el crecimiento de callo de discos foliares en el armario de cultivo	32

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Contaminantes microbianos del cultivo <i>in vitro</i>	18
Figura 2	Efecto de la edad foliar, la adición de carbón activado y polivinilpirrolidona en el crecimiento de discos foliares	20
Figura 3	Efecto prolongado del carbón activado y la edad del disco foliar	21
Figura 4	Análisis de los resultados del diseño de Plackett-Burman	23
Figura 5	Estructuras parecidas a primordios foliares	24
Figura 6	Discos foliares crecidos en medios con diferente concentración de sacarosa dentro de la incubadora de cultivo	25
Figura 7	Discos foliares crecidos en medios con diferente concentración de sacarosa dentro del armario de cultivo	26
Figura 8	Efecto de la concentración de sacarosa y el lugar de cultivo sobre el crecimiento de callo en discos foliares	26
Figura 9	Discos foliares crecidos en medios basales nutritivos diferentes dentro de la incubadora de cultivo	28
Figura 10	Discos foliares crecidos en medios basales nutritivos diferentes dentro del armario de cultivo	28
Figura 11	Efecto del medio basal nutritivo y el lugar de cultivo sobre el crecimiento de callo en discos foliares	28
Figura 12	Discos foliares crecidos en medios con diferente concentración de hormonas dentro de la incubadora de cultivo	31
Figura 13	Discos foliares crecidos en medios con diferente concentración de hormonas dentro del armario de cultivo	32
Figura 14	Efecto de la concentración de las hormonas y el lugar de cultivo sobre el crecimiento de callo en discos foliares	33
Figura 15	Pigmentación celular en callos de discos foliares	34
Figura 16	Estructuras organizadas en callos de discos foliares	35

LISTA DE ABREVIATURAS¹

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético / (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid
AC	Carbón activado (Activated Charcoal)
ANOVA	Análisis de la varianza (ANalysis Of VAriance)
BAP	Bencilaminopurina / N-(phenylmethyl)-7H-purin-6-amine
GLM	Modelo lineal generalizado (General Linear Model)
IAA	Ácido indolacético / 2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl) acetic acid
IBA	Ácido indolbutírico / 1H-Indole-3-butanoic acid
Kn	Kinetina / N ⁶ -furfuryladenine
MS	Medio Murashige & Skoog con vitaminas
NAA	Ácido naftilacético / 2-(1-Naphthyl) acetic acid
PAR	Radiación fotosintéticamente activa (Photosynthetically Active Radiation)
PBD	Diseño de Plackett-Burman (Plackett-Burman Design)
PVP	Polivinilpirrolidona / Polyvinylpyrrolidone
TDZ	Thidiazuron / 1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl) urea
WPM	Medio Lloyd & McCown para plantas leñosas (Woody Plant Medium)

¹ Entre paréntesis se indica el nombre en inglés que da origen a la abreviatura utilizada. También se han incluido los nombres de los compuestos químicos según la IUPAC después de una barra “/”.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue micropropagar plantas de *Jatropha curcas* L. de origen guatemalteco mediante organogénesis desde discos foliares. Se estableció el cultivo *in vitro* de callo, los que mostraron la formación de estructuras organizadas que no fueron capaces de convertirse en brotes. El crecimiento de contaminantes se previno usando plantas de laboratorio y agregando 100 mg/L de cefotaxime al medio de cultivo. La edad de la hoja afectó el crecimiento del disco foliar sin notar otras diferencias. Agregar al medio de cultivo 1 g/L de carbón activado inhibió el crecimiento de callo, mientras que 1 g/L de PVP y 0,5 mM de citrato no tuvieron efecto. Según los resultados, el mejor crecimiento de callo debería ocurrir en medio WPM (0,5 o 1,0), con 15 g/L de sacarosa, 4,44 μ M de BAP y 2,46 μ M de IBA. El crecimiento de callo, así como la formación de estructuras organizadas, pudo depender del genotipo, lo que explicaría su variación entre experimentos en los que se utilizó el mismo medio de cultivo.

ABSTRACT

The goal of this work was to micropropagate plants of Guatemalan *Jatropha curcas* L. by organogenesis from leaf discs. *In vitro* culture callus was established, and some of these showed the development of organized structures which were not able to become shoots. Biological contaminants were prevented by using plants grown and kept in the laboratory and by adding 100 mg/L of cefotaxime to the culture media. The age of the leaf affected the growth of the leaf disc without noting other effects. Addition of 1 g/L of activated charcoal to the culture media inhibited the growth of the leaf disc, while 1 g/L of PVP and 0,5 mM of citrate did not have any effect. Taking into account the results, the best callus growth should happen on WPM media (0,5 or 1,0), with 15 g/L of sucrose, 4,44 μ M of BAP and 2,46 μ M of IBA. The growth of callus and the development of organized structures could depend on the genotype, which would explain their variability among experiments where the same culture medium was used.

1. INTRODUCCION

1. 1. Datos generales sobre *Jatropha curcas*

Jatropha curcas L. pertenece a la familia de las Euphorbiaceae y es una especie arbustiva que ha atraído la atención mundial por su promisorio potencial energético. Originaria de Centroamérica y México, actualmente extendida en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Brittaine & Lutaladio, 2010), su potencial energético deriva de sus semillas que poseen un alto contenido de aceite (50-55% p/p) transformable en biodiésel (Paneque et al, 2009). Su aceite además, sirve como purgante, para hacer jabón, velas, barnices, lubricantes, o combustible para lámparas (Brittaine & Lutaladio, 2010), y la torta de semillas, un subproducto de la extracción de aceite, puede ser tratada para utilizarse como alimento para ganado en el caso de las semillas de la variedad no tóxica (Sujatha et al 2005). Es una planta tolerante a sequía y posee una alta plasticidad adaptativa, lo que la hacen una planta candidata para la recuperación de suelos degradados entre otros programas agroforestales (e.g. control de inundaciones, lixiviación de nutrientes, erosión del suelo, y desplazamiento de dunas de arena). Fue por este potencial energético y ambiental que se introdujeron a Chile semillas de *J. curcas* originarias de Guatemala, como parte del proyecto “Desarrollo del Sistema *Jatropha* para la Producción de Biodiésel en la Zona Norte de Chile” financiado por la Fundación para la Innovación Agraria del Ministerio de Agricultura (FIA-PI-C-2007-1A-009).

El cultivo de *J. curcas* en Chile ha resultado en la selección de los individuos adaptados a las condiciones climáticas del país. Sin embargo, este tipo de selección estaría limitada por el acervo genético de las semillas introducidas, por lo que podría tardar varias

generaciones obtener plantas con características que les permitan adaptarse al clima de Chile (e.g. resistencia a heladas). Una solución al problema anterior es el uso de ingeniería genética para agregar genes que confieran una característica nueva a la planta. Además de mejorar su adaptación agro-climática, mediante ingeniería genética se podrían conseguir características que mejoran la producción agrícola (Gressel, 2008), como: enanismo, supresión de la ramificación, ausencia de dehiscencia en los frutos, sincronía en la maduración de los frutos, y supresión de la producción de compuestos tóxicos (i.e. curcina y esteroides de forbol). Se han reportado diferentes protocolos de transformación genética de *J. curcas*, los cuales difieren en el material vegetal y el vector génico utilizados, así como la frecuencia de transformación alcanzada (Li *et al.*, 2008; Trivedi *et al.*, 2009; Pei *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2010b; Mazumdar *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2010; Pei *et al.*, 2010; Purkayastha *et al.*, 2010). La relación de estas técnicas con el cultivo *in vitro* es que el desarrollo de un sistema de regeneración eficiente y compatible con el método de transformación genética es uno de los prerequisites de la ingeniería genética de plantas (Misra & Misra, 2010).

1.2. Métodos de micropropagación de *Jatropha curcas*

La micropropagación, o cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es una técnica de propagación vegetativa que permite obtener plantas completas a partir del cultivo aséptico de pequeños segmentos de tejido vegetal (explantes) en medios de cultivo que contienen macro- y micronutrientes (vitaminas y minerales), fuentes de carbono (e.g. azúcares), y reguladores del crecimiento (e.g. hormonas sintéticas) (George *et al.*, 2008). La importancia de esta técnica en el cultivo de *J. curcas* radica en que, además de servir para la propagación clonal de

individuos, abre paso al mejoramiento genético basado en biotecnologías como la selección asistida por marcadores moleculares o la ingeniería genética (Divakara *et al.*, 2010).

Entre las ventajas de la micropropagación, el cultivo de explantes requiere poco espacio, con control de las variables ambientales, independizando de la estación a la producción y facilitando la conservación del material vegetal especial (e.g. de stock, elite) (George & Debergh, 2008). Permite la obtención de plantas libres de patógenos, o con características transitorias atractivas para el productor. Además, el cuidado de las plantas se ve reducido al momento en que se realizan los subcultivos. Sin embargo, entre sus desventajas se tiene que por tratarse de un método intensivo necesita de una instalación y personal especializados, lo que aumenta el costo de las plantas micropropagadas (George & Debergh, 2008). Además, antes de ser trasladadas a campo, las plantas necesitan de un período de aclimatación en el que se vuelven autótrofas y adquieren su tolerancia natural a la humedad del medio ambiente. Por último, existe la posible desventaja de obtener plantas genéticamente diferentes a la planta original que se quería propagar (variabilidad somaclonal; Pierik, 1990).

La micropropagación se puede realizar mediante la multiplicación de brotes desde meristemas pre-existentes (ápice o yemas axilares), o mediante la formación de brotes adventicios o embriones somáticos adventicios (i.e. que crecen en un lugar que no es habitual) (George & Debergh, 2008). Esta última puede ocurrir de forma directa sobre los explantes, o indirectamente desde células en suspensión o tejidos no organizados (i.e. callos). La Tabla I presenta diferentes resultados de la micropropagación de *J. curcas*.

Tabla 1. Resultados de diferentes métodos de micropropagación de *Jatropha curcas*.

Método de micropropagación	Explantante o tejido fuente de explantes	% respuesta positiva	Respuesta promedio de los casos positivos	Días de cultivo	Referencia	
Multiplicación desde meristemas pre-existentes	Ápice	96%	6,2 brotes/explante	14	Purkayastha et al., 2010	
	Nodo axilar	100%	5,9 brotes/explante	42	Thepsamran et al., 2006	
		95-100%	35-45 brotes/explante	70	Kalimuthu et al., 2007	
	Embrión ⁽¹⁾ maduro	100%	6,2 brotes/explante	28-42	Datta et al., 2007	
		100%	10 brotes/explante	21	Shrivastava & Banerjee, 2008	
		99%	7 brotes/explante	84	Shrivastava & Banerjee, 2009	
	Directa	Hoja	50%	(sin datos)	42	Sujatha & Mukta, 1996
			79%	(sin datos)	28	Sujatha et al., 2005
		Pecíolo de hoja joven	54%	(sin datos)	42	Deore & Johnson, 2008
			80%	22,8 brotes/explante	42	Khurana-Kaul et al., 2010
Tallo cercano al ápice		84%	6,8 brotes/explante	42	Misra et al., 2010a	
		74%	14 brotes/explante	42	Kumar & Reddy, 2010	
Ápice		69%	10-15 brotes/explante	28	Singh et al., 2010	
		100%	4,9 brotes/explante	30-50	Kaewpoo & Te-chato, 2009	
Organogénesis		Plántula	38%;	(sin datos)	30	Wei et al., 2004
			100%	15 brotes/explante	42	Kaewpoo & Te-chato, 2010
	Cotiledón	100%	4,1 brotes/explante	30-50	Kaewpoo & Te-chato, 2009	
		93%	26,2 brotes/explante	42	Kumar et al., 2010a	
	Nodo axilar	100%	4,7 brotes/explante	30-50	Kaewpoo & Te-chato, 2009	
		100%	22,7 brotes/explante	42	Kaewpoo & Te-chato, 2010	
	Hoja	67%	10,7 brotes/callo	(sin datos)	Sujatha & Mukta, 1996	
		100%	12,6 brotes/callo	21	Rajore & Batra, 2007	
	Indirecta	Cotiledón	100%	7-10 brotes/callo	10	Misra et al., 2010a
			94%	(sin datos)	28	Li et al., 2008
Embriogénesis somática	Epicotilo	44%	(sin datos)	30	Wei et al., 2004	
	Embrión ⁽¹⁾ Inmaduro	90%	9,1 brotes/callo	28	Varshney & Johnson, 2010	
	Cotiledón	90%	40 embriones ⁽²⁾ /explante	8 días	Kalimuthu et al., 2007	
	Hoja joven	45%	56 embriones ⁽²⁾ /callo	42-84	Jha et al., 2007	

⁽¹⁾ Embrión cigótico.

⁽²⁾ Embrión somático.

De todas las fuentes de explantes, las hojas de las plantas adultas son las más idóneas para micropropagar *J. curcas*, ya que son abundantes y de fácil acceso. Considerando que se han publicado más casos exitosos de organogénesis que de embriogénesis somática al utilizar esta fuente de explantes, la organogénesis sería la forma más plausible de micropropagar las plantas de *J. curcas* seleccionadas en Chile.

1.3. Organogénesis en explantes foliares de *J. curcas*

La organogénesis en explantes foliares de *J. curcas* puede ocurrir directamente mediante brotes adventicios o indirecta a partir de callo (Sujatha & Mukta, 1996; Misra et al, 2010a). La ruta por la cual se generan los brotes, depende de las hormonas disponibles en el medio de cultivo (factores exógenos) y la calidad genética y epigenética del explante foliar (factores endógenos). Los factores exógenos citados con mayor frecuencia para inducir organogénesis, son la interacción entre bencilaminopurina (BAP) y ácido indolbutírico (IBA) (Sujatha & Mukta, 1996; Sujatha et al, 2005; Misra et al, 2010a), la interacción entre BAP y kinetina (Kn) (Rajore & Batra, 2007), y el efecto promotor de thidiazuron (TDZ) (Deore & Johnson, 2008); mientras que los factores endógenos, aunque menos estudiados, son el genotipo de la planta madre (Peraza Abán et al, 2009; López Erosa et al, 2009; Misra et al, 2010a), y la etapa de desarrollo de la hoja (Sujatha & Mukta, 1996; Misra et al, 2010a). A continuación se procede a hacer una revisión narrativa de estos factores sobre la organogénesis en hojas de *J. curcas*.

El trabajo de Sujatha & Mukta (1996) es el primer intento exitoso reportado de regenerar plántulas de *J. curcas* mediante cultivo *in vitro*. En este se encontró que los explantes foliares provenientes de la tercera hoja (desde el ápice hacía la base)

presentaban un mayor porcentaje de regeneración de brotes que los de la cuarta hoja para un espectro más amplio de concentraciones de hormonas (BAP e IBA). Sin embargo, la relación entre la concentración de hormonas y el porcentaje de formación de callos o brotes en los explantes no fue clara, ya que el diseño experimental no incluyó todas las combinaciones posibles de niveles de los factores. Además, estos factores interactuaron con la edad fisiológica del explante (i.e. el efecto de la combinación hormonal fue condicional a la edad fisiológica del explante). Para explantes de la tercera hoja, la ausencia de IBA casi anuló la formación de callos, mientras que la ausencia de IBA o la baja concentración de BAP ($0,44 \mu\text{M}$) impidió la regeneración de brotes. Para explantes de la cuarta hoja las relaciones anteriores no fueron claras, alcanzando porcentajes de callogénesis altos para las combinaciones $4,44 \mu\text{M}$ BAP + $4,9 \mu\text{M}$ IBA y $2,22 \mu\text{M}$ BAP + $2,46 \mu\text{M}$ IBA, pero sólo obteniendo regeneración de brotes en la primera combinación. En la regeneración de brotes desde callos, la concentración de BAP sí tuvo un efecto importante en el porcentaje de callos regenerativos (100% para $4,44 \mu\text{M}$), y no así para IBA ($0,49 - 2,46 \mu\text{M}$).

Sujatha & Prabakaran (2003), reportaron porcentajes de regeneración muy inferiores a los de Sujatha & Mukta (1996), sin distinguir entre la obtención de brotes directos o indirectos. Sin embargo, la combinación $4,44 \mu\text{M}$ BAP + $2,46 \mu\text{M}$ IBA (Sujatha & Mukta, 1996), donde se obtuvieron entre 92% y 100% de callos regenerativos, ahora solo obtenían un 8%, siendo que ambos estudios usaron plantas de un mismo jardín. Sujatha et al (2005), utilizando hojas de una variedad no tóxica, obtuvieron 79% de regeneración en un primer cultivo en un medio con $22,2 \mu\text{M}$ BAP y $4,90 \mu\text{M}$ IBA.

Rajore & Batra (2007) reportaron haber obtenido callos morfogénicos verdes y compactos desde discos foliares cultivados en 5,37 μM ácido naftilacético (NAA) y 22,2 μM BAP. Estos autores estudiaron el efecto de combinar BAP y Kn en el medio de inducción de brotes en que colocaban estos callos morfogénicos, encontrando que al mezclarse en igual proporción (mg/L) BAP y Kn disminuían la cantidad de brotes generados en comparación a cuando se aplicaban por separado (siendo BAP mejor inductor de brotes que Kn). El mejor resultado lo obtuvieron al colocar callos en un medio con 6,66 μM BAP y 2,46 μM IBA. Este resultado además sería dependiente del explante, ya que para ápices agregar Kn a un medio optimizado con BAP disminuía el porcentaje y número de brotes obtenidos por explante (Purkayastha et al, 2010), mientras que la regeneración a partir de segmentos de tallo cercanos al ápice solo era posible en presencia de ambas hormonas (Singh et al, 2010).

Deore & Johnson (2008) encontraron que TDZ (2,27–4,55 μM) promovía la inducción de brotes adventicios, mientras que su reemplazo por BAP sólo indujo callos. El máximo porcentaje de regeneración (53,5%) se obtuvo en un medio con 2,27 μM TDZ + 2,22 μM BAP + 0,49 μM IBA, siendo TDZ esencial y BAP potenciador en la inducción de brotes (Deore & Johnson, 2008). Por otro lado, Khurana-Kaul et al (2010) encontraron que TDZ (0,9 – 22,72 μM) + 0,98 μM IBA producían un mayor número de brotes de forma directa, en comparación a BAP + 2,46 μM IBA que los produjo de forma indirecta. El efecto de TDZ también sería dependiente del explante, ya que para segmentos de pecíolo a bajas concentraciones de TDZ producen pocos brotes que continúan desarrollándose correctamente, mientras que concentraciones altas generan muchos que no continúan su desarrollo (Kumar & Reddy, 2010); en segmentos de tallo

cercanos al ápice TDZ produce brotes condensados que no continúan su desarrollo (Singh et al, 2010); y para ápices simplemente se obtiene una menor proliferación de brotes que con BAP o Kn (Purkayastha et al, 2010).

Misra et al (2010a) probaron tres citoquininas (BAP, Kn, TDZ) en combinación con IBA para la inducción de organogénesis directa. Con Kn se obtuvo el menor porcentaje de respuesta y menor número promedio de brotes por explante, siendo estos últimos de color verde amarillento. Con TDZ se alcanzaron valores más altos de porcentaje de respuesta y número promedio de brotes por explante, pero estos brotes estaban vitrificados y con gran cantidad de callo, limitando así el crecimiento de los brotes. Mientras que con BAP se obtuvieron los mejores resultados de porcentaje de respuesta y número promedio de brotes por explante, generando brotes verdes y sanos. Por otro lado, el efecto de IBA (0,49 – 0,98 μM) dependió de la citoquinina, y fue diferente para el porcentaje de respuesta y el número promedio de brotes por explante, obteniendo el mejor resultado al usar 0,49 μM IBA + 2,22 μM BAP. De las primeras cinco hojas, la segunda y la tercera sirvieron como fuente de explantes regenerativos que no empardecieron ni murieron durante el cultivo *in vitro*.

Misra et al (2010a) también estudiaron la organogénesis indirecta, encontrando que el tratamiento óptimo para inducir callos foliares era un medio con 2,22 μM BAP + 4,53 μM 2,4-D + 5,71 μM IAA, el cual generó callos verdes y compactos. Para la inducción de brotes desde estos callos TDZ fue crucial, siendo necesario aplicar un pulso de 2,27 μM TDZ y 0,49 μM IBA, seguido de un subcultivo en 2,22 μM BAP + 0,49 μM IBA, resultando en un proceso asincrónico de regeneración en que se regeneraron entre 7 y 10 brotes por cm^2 de callo.

El efecto de diferentes aditivos se ha estudiado en el cultivo *in vitro* de diferentes tipos de explantes de *J. curcas*, siendo algunos aditivos: filtrado de cianobacterias (Shrivastava & Banerjee, 2009), antioxidantes (Misra et al, 2010b), derivados proteicos (Shrivastava & Banerjee, 2008), y las sales de cobre y plata (Varshney & Johnson, 2010). En el cultivo *in vitro* de explantes foliares, se ha reportado la posibilidad de que aumentar levemente la concentración de níquel (menos de 0,01 mM) podría estimular el crecimiento y regeneración, pero concentraciones mayores lo inhibirían y producirían mutaciones (Sarkar et al, 2010). También se ha reportado que al aumentar 10 veces la concentración de cobre del medio Murashigue-Skoog (MS) (i.e. usar 1 μ M Cu) mejoraba los resultados del cultivo *in vitro*, aumentando el porcentaje de explantes responsivos y el número de brotes por explante (Khurana-Kaul et al, 2010). No se encontraron reportes sobre el efecto de la concentración de azúcar o la composición basal del medio de cultivo sobre la regeneración desde explantes foliares.

La dependencia de los resultados del cultivo *in vitro* con el genotipo de la planta se ha descrito para varios tipos de explantes (Kumar & Reddy, 2010; Kumar et al., 2010a; Singh et al, 2010; Varshney & Johnson, 2010). Se ha descrito que hojas de diferentes variedades de clones elite presentan diferente intensidad de contaminación bacteriana y diferentes potenciales de regeneración (Misra et al, 2010a), así como diferentes accesiones de una misma zona geográfica pueden presentar diferentes porcentaje de respuesta y número promedio de brotes por explante (Peraza Abán et al, 2009; López Erosa et al, 2009). Por lo anterior, resulta evidente la necesidad de desarrollar un protocolo de regeneración para los individuos introducidos a Chile.

1.4. Hipótesis de trabajo

Se pueden regenerar brotes de *Jatropha curcas* mediante el cultivo *in vitro* de discos foliares en medios de composición nutricional y hormonal óptima.

1.4. Objetivos

Objetivo general:

- Establecer un protocolo de regeneración de brotes *in vitro* de *Jatropha curcas* a partir de discos foliares.

Objetivos específicos:

- Analizar el efecto de las características de la hoja que se utiliza como fuente de discos foliares sobre la regeneración de brotes *in vitro*.
- Determinar la concentración óptima de nutrientes y fitohormonas para la formación de callos diferenciables desde discos foliares.
- Determinar la concentración óptima de nutrientes y fitohormonas para la regeneración de brotes, directos o indirectos, desde discos foliares o callos.

2. MATERIALES

2.1. Materiales

2.1.1. Material vegetal

Se usaron plantas de *Jatropha curcas* L., ecotipo no tóxico, crecidas en el campus Antumapu de la Universidad de Chile y originadas de semillas importadas de Guatemala. Estas plantas se clasificaron en dos grupos: 1) de campo, plantas originadas de semillas germinadas en invernadero y luego de un año transplantadas al campo para estar expuestas a condiciones ambientales; y 2) de laboratorio, plantas originadas de semillas desinfectadas y germinadas en tierra dentro del laboratorio, siendo mantenidas en el laboratorio bajo condiciones monitoreadas y semi-controladas de luz y temperatura. Se tomaron hojas, de plantas menores de 2 años, para ser utilizadas como fuentes de explantes, y se eligieron las primeras cinco hojas sanas desde el ápice que tuviesen una longitud mayor a 0,5 cm.

2.1.2. Reactivos y material de laboratorio

Se utilizaron medio basal Murashige & Skoog con vitaminas (MS), (Murashige & Skoog, 1962) y medio para plantas leñosas Lloyd & McCown con vitaminas (WPM) (Lloyd & McCown, 1981), provenientes de Plant *Phyto*Technology. Las hormonas 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido indol-3 butírico (IBA), así como las placas de Petri Greiner (de poliestireno) de 94 y 145 mm de diámetro, de la marca Sigma. El ácido clorhídrico y el hidróxido de sodio de Analytic. La sacarosa D(+) de Arquimed; la Cefotaxima de Laboratorios Chile; el sodio citrato 2-hid de Riedel-de Haën; el alcohol

etfílico 99,9% de Arquimed; la polivinilpirrolidona (PVP) y el carbón activado (AC) de la marca Sigma, además de cloro comercial marca Clorinda. Los productos fungicidas utilizados fueron Captan 80 WP y Benomyl 50 WP de BASF.

2.2. Métodos

2.2.1. Desinfección

La desinfección de hojas comenzó con un lavado rápido bajo agua de grifo para quitar la tierra y el polvo superficial, seguido por 30 min en una solución de fungicida (1,5 g/L Captan 80 WP y 0,5 g/L Benomyl 50 WP), 3 min en solución de alcohol al 70%(v/v), y 5 min en una solución de cloro comercial al 25%(v/v). Posteriormente se realizaron tres lavados con agua estéril. Se obtuvieron discos foliares, desde las hojas desinfectadas, con un sacabocados de 8 mm de diámetro, los cuales fueron colocados con su cara abaxial en contacto con el medio de cultivo en placas de Petri de poliestireno.

2.2.2. Medios de cultivo

Se prepararon medios de cultivo con diferente composición para cada experimento realizado (Tabla II). Se utilizaron los medios de cultivos MS o WPM completos o a la mitad de su concentración, y se agregaron la fuente de carbono (sacarosa), fitohormonas (BAP, IBA), y otros compuestos (AC, PVP, citrato), se ajustó el pH a 5,8 o 6,8 según el experimento, y se utilizó 7 g/L de agar. Los medios se esterilizaron mediante calor húmedo en una autoclave a c. 124 °C y 16 psi durante 20 min. Para prevenir el crecimiento de bacterias se utilizó 100 mg/L de cefotaxima.

Tabla II. Medios de cultivo utilizados en los experimentos de este trabajo.

Medio	Componentes ¹								pH
	MS	WPM	Sacarosa	BAP	IBA	AC	PVP	Citrato	
1a	0,5	-	30	4,44	2,46	1	-	-	5,8
1b	0,5	-	30	4,44	2,46	-	1	-	5,8
1c	0,5	-	30	4,44	2,46	1	1	-	5,8
1d	0,5	-	30	4,44	2,46	-	-	-	5,8
2a	1,0	-	30	2,22	2,46	-	-	-	6,8
2b	0,5	-	30	4,44	2,46	-	-	-	5,8
2c	1,0	-	30	4,44	2,46	-	-	0,5	5,8
2d	0,5	-	15	4,44	2,46	-	-	0,5	6,8
2e	0,5	-	30	2,22	2,46	-	-	0,5	6,8
2f	1,0	-	15	4,44	2,46	-	-	-	6,8
2g	1,0	-	15	2,22	2,46	-	-	0,5	5,8
2h	0,5	-	15	2,22	2,46	-	-	-	5,8
3a	0,5	-	-	2,22	2,46	-	-	-	5,8
3b	0,5	-	15	2,22	2,46	-	-	-	5,8
3c	0,5	-	30	2,22	2,46	-	-	-	5,8
4a	0,5	-	30	2,22	2,46	-	-	-	5,8
4b	1,0	-	30	2,22	2,46	-	-	-	5,8
4c	-	0,5	30	2,22	2,46	-	-	-	5,8
4d	-	1,0	30	2,22	2,46	-	-	-	5,8
5a	0,5	-	30	1,11	0,49	-	-	-	5,8
5b	0,5	-	30	1,11	1,47	-	-	-	5,8
5c	0,5	-	30	1,11	2,46	-	-	-	5,8
5d	0,5	-	30	2,22	0,49	-	-	-	5,8
5e	0,5	-	30	2,22	1,47	-	-	-	5,8
5f	0,5	-	30	2,22	2,46	-	-	-	5,8
5g	0,5	-	30	4,44	0,49	-	-	-	5,8
5h	0,5	-	30	4,44	1,47	-	-	-	5,8
5i	0,5	-	30	4,44	2,46	-	-	-	5,8

¹ Unidades de cada componente: MS (medio Murashige & Skoog con vitaminas), fracción de la concentración sugerida (4,430 g/L), WPM (medio Lloyd & McCown para plantas leñosas), fracción de la concentración sugerida (2,410 g/L); Sacarosa, g/L; BAP (bencilaminopurina), µM; IBA (ácido indolbutírico), µM; AC (carbón activado), g/L; Citrato, mM; PVP (polivinilpirrolidona), g/L; pH, unidades de pH (escala de 1 a 14).

2.2.3. Condiciones de cultivo

La obtención y manejo de discos foliares se realizó bajo cámara de flujo laminar y en condiciones estériles. Los cultivos de los primeros experimentos se mantuvieron en una incubadora, mientras que en los siguientes experimentos se mantuvo un duplicado de los cultivos de incubadora en un armario re-acondicionado. Esto se realizó para probar el efecto de otras condiciones ambientales y aumentar la capacidad de cultivos simultáneos. En ambos lugares de cultivo se utilizó un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. En la incubadora de cultivo la temperatura se controló por termostato y calefactor, manteniéndose a 30 °C. La iluminación de la incubadora se obtuvo con luces LED, consiguiendo niveles de iluminación entre 932 y 1775 lx y radiación fotosintéticamente activa (PAR) entre 13,4 y 34,6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En el armario de cultivo la temperatura se controló con una unidad de aire acondicionado y ventiladores, oscilando entre 21 y 30 °C. La iluminación del armario se obtuvo con tubos fluorescentes de luz fría, obteniendo niveles de iluminación entre 3257 y 4372 lx y PAR entre 99,0 y 143,3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La duración de los cultivos fue de 30 días antes de evaluarlos y transferirlos a medio fresco.

2.2.4. Diseños experimentales y recolección de datos

2.2.4.1. Diseño factorial completo

Se usó un diseño factorial completo para estudiar el efecto de la edad foliar, y la adición de PVP y CA. Los discos foliares se clasificaron en tres grupos según la edad de las hojas que les dieron origen (jóvenes pequeñas de color rojizo o verde oscuro; jóvenes medianas de color verde oscuro; y maduras grandes de color verde) y se repartieron en

placas con o sin 1 g/L de PVP, y con o sin 1 g/L de CA (medios 1a–d). Después de 10 días de cultivo *in vitro* en la incubadora de cultivo, se tomaron fotografías digitales de las placas y, con el programa ImageJ 1.43u (Rasband, 1997-2011), se midió el perímetro circular relativo de cada disco foliar, además de anotar la presencia de callo.

Para estudiar los efectos de 1) la concentración de sacarosa (0, 15, y 30 g/L), 2) el tipo de medio nutritivo (MS y WPM) y su concentración (0,5 y 1,0 veces lo recomendado), y 3) la concentración de BAP (1,11; 2,22; y 4,44 μM) e IBA (0,46; 1,47; y 2,46 μM), se utilizó en cada caso un diseño factorial completo, y se repitió una vez en cada lugar de cultivo (incubadora y armario). Cada repetición del diseño se analizó por separado (i.e. el lugar de cultivo no fue un factor de bloque) debido a que los discos foliares de cada repetición no provenían del mismo grupo de hojas. Los medios de cultivo de cada experimento fueron: 3a–c, concentración de sacarosa; 4a–d, tipo y concentración del medio de cultivo; y 5a–i concentración de BAP e IBA. Después de 30 días de cultivo *in vitro*, se tomaron fotografías digitales de cada disco foliar bajo lupa, y se midió con ImageJ el área de callo como una medida de la cantidad relativa de callo.

2.2.4.2. Diseño factorial fraccional

Se usó un diseño factorial fraccional de Plackett-Burman (PBD, Tabla III) para estudiar el efecto de variar seis factores exógenos (sacarosa, BAP, citrato, pH, MS y lugar de cultivo; Tabla IV) (Barrentine, 1999; Nuri Nas et al, 2005). Para cada tratamiento se utilizaron tres placas (réplicas) con 12 discos foliares cada una. Después de 30 días de cultivo *in vitro* se calculó la proporción de discos foliares con callos y la proporción de discos foliares con estructuras similares a primordios de brotes.

Tabla III. Diseño de Plackett-Burman utilizado en el análisis exploratorio.

Corrida	Medio	A	B	C	D	E	F	G
1	2 ^a	+	-	-	+	-	+	+
2	2b	+	+	-	-	+	-	+
3	2c	+	+	+	-	-	+	-
4	2d	-	+	+	+	-	-	+
5	2e	+	-	+	+	+	-	-
6	2f	-	+	-	+	+	+	-
7	2g	-	-	+	-	+	+	+
8	2h	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aliases</i> ¹		-BD	-AD	-AG	-AB	-AF	-AE	-AC
		-CG	-CE	-BE	-CF	-BC	-BG	-BF
		-EF	-FG	-DF	-EG	-DG	-CD	-DE

¹ Corresponden a las interacciones que podrían ser causa de lo que aparentemente es un efecto principal.

Tabla IV. Factores modificados y sus niveles en el análisis exploratorio.

Factor	Variable	Nivel bajo (-)	Nivel alto (+)
A	Sacarosa	15 g/L	30 g/L
B	BAP	2,22 μ M (0,5 mg/L)	4,44 μ M (1,0 mg/L)
C	Citrato	0 mM	0,5 mM
D	Ph	5,8	6,8
E	<i>Dummy</i>	Indiferente	Indiferente
F	MS	0,5 (2,215 g/L)	1,0 (4,430 g/L)
G	Lugar de cultivo	Incubadora	Armario

2.2.4.3. Diseño en bloques

Para estudiar los efectos de la polaridad y nervación foliar se utilizó un diseño en bloques (Taucher, 1997). Para esto, los discos foliares se clasificaron en cuatro categorías según su polaridad foliar (i.e. si procedía de la base o el ápice de la hoja) y la presencia o ausencia de nervadura principal, para luego mantenerlos en ocho condiciones de cultivo diferentes (bloques) correspondientes con las de las ocho corridas del PBD. Después de 30 días de cultivo *in vitro* en cada placa se les asignó a cada tipo de discos foliares un puntaje en base al crecimiento de callo y la formación de estructuras similares a brotes.

2.2.5. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron en el programa R 2.12.2 (R Development Core Team, 2011). El PBD se analizó siguiendo las instrucciones de Barrentine (1999). El diseño en bloques se analizó con la prueba de análisis de la varianza (ANOVA) no-paramétrico de Friedman (función `friedman.test`). Los resultados del resto de los diseños experimentales se modelaron como modelos lineales generalizados (GLM) con la función `glm` y se analizaron con un ANOVA usando la suma de cuadrados tipo III para modelos no balanceados (función `Anova` del paquete `car` (Fox & Weisberg, 2011)), seguido de comparaciones múltiples *a posteriori* mediante la prueba de diferencia significativa honesta de Tukey (Sokal & Rohlf, 1981; función `TukeyHSD`).

Los supuestos estadísticos de cada GLM se evaluaron con pruebas formales y gráficos de diagnóstico. El supuesto de normalidad de los residuos se evaluó con la prueba de Shapiro-Wilk (función `shapiro.test`), mientras que el supuesto de homocedasticidad se probó con la prueba de Levene (función `leveneTest` del paquete `car`). Los gráficos de diagnóstico se obtuvieron con la función `plot.glm.diag` (del paquete `SMPracticals` (Davison, 2009)). En caso de que los supuestos se violasen, se usaron transformaciones habituales de la variable original para cumplirlos, eligiendo cual utilizar en base al algoritmo de Box-Cox (Sokal & Rohlf, 1981; función `boxcox` del paquete `MASS` (Venables & Ripley, 2002)). Si la transformación no solucionaba esto, entonces se procedió a eliminar datos sospechosos de ser anómalos y causar la violación.

El nivel de significación (α) elegido fue de 0,05. En los ANOVA paramétricos, la importancia biológica de cada factor se evaluó en base al tamaño de su efecto (η^2 y η^2_p).

3. RESULTADOS

3.1. Contaminación *in vitro*.

Los contaminantes biológicos aparecieron durante la primera semana del cultivo *in vitro*. Los contaminantes aparentemente bacterianos crecieron como pequeñas colonias sobre el medio de cultivo o los discos foliares (Figura 1 A–D). Mientras que los contaminantes fúngicos crecieron desde los discos foliares o el borde de las placas de Petri cuya cinta parafilm se rasgó, y se reconocieron por presentar colonias de textura algodonosa o aterciopelada, con hifas observables bajo lupa estereoscópica, y en algunos casos por formar y acumular exudados además de producir pigmentos (Figura 1 E–G).

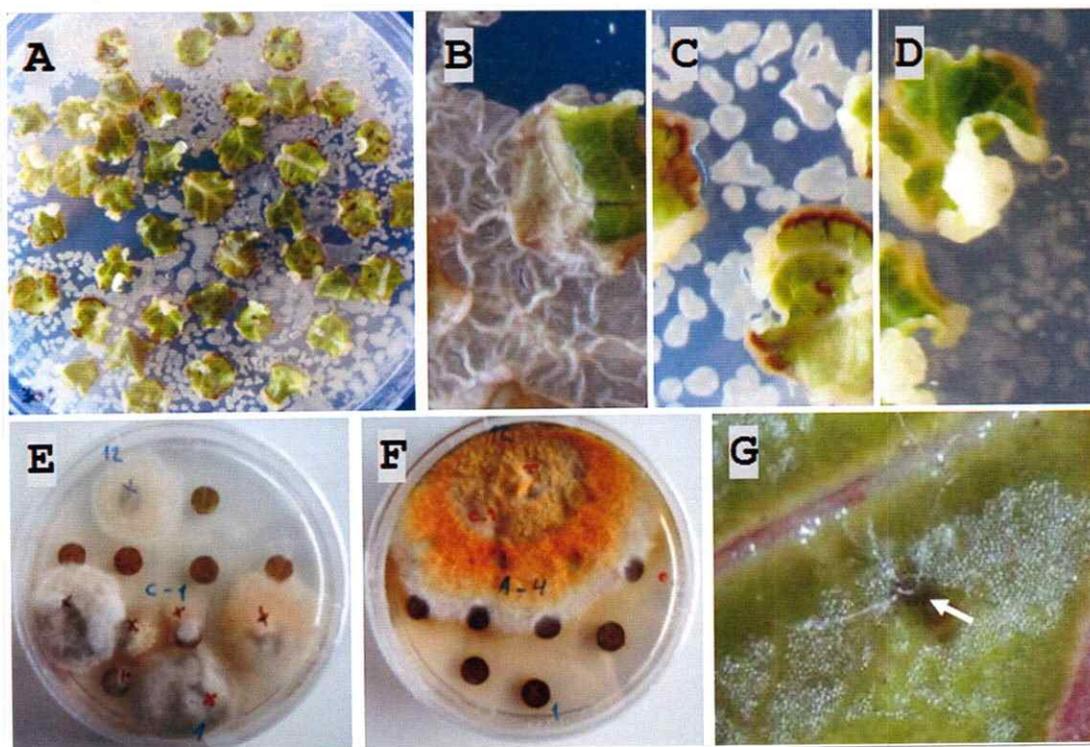


Figura 1. Contaminantes microbianos del cultivo *in vitro*. (A) Vista general de la contaminación bacteriana (diámetro placa = 145 mm). B – D: Ampliación de diferentes hábitos de crecimiento de la contaminación bacteriana. E – F: Vista general de la contaminación fúngica (diámetro placa = 94 mm). (G) Ampliación del crecimiento fúngico inicial; la flecha indica una herida del disco foliar desde la cual extruyen hifas.

El Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Cs. Agronómicas, mediante observación microscópica de conidias y uso de referencia especializada (Barnett & Hunter, 1998), logró identificar entre los contaminantes fúngicos recurrentes los siguientes géneros de hongos filamentosos: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fussarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, y *Ulocladium*. De estos, sólo *Cladosporium* y *Penicillium* crecieron en medios expuestos a corrientes de aire dentro del laboratorio; mientras que el resto se originó desde los discos foliares.

La inclusión de fungicidas en la desinfección no previno el crecimiento de hongos, por lo que se optó por utilizar hojas de plantas de laboratorio como fuente de discos foliares, siendo este cambio efectivo y suficiente para prevenir el crecimiento de hongos, por lo que se decidió omitir el lavado con fungicidas. Por otro lado, el crecimiento de bacterias se previno efectivamente al añadir 100 mg/L de cefotaxima al medio de cultivo.

3.2. Efecto de la edad foliar y aditivos.

Después de 10 días, los discos foliares de plantas de laboratorio crecidos en medios sin AC produjeron callos verdes en sus bordes, mientras que los discos en medios con AC no produjeron callos. Esto era esperado, pero no deseado, ya que el AC absorbe los compuestos orgánicos sin distinguir inhibidores de promotores del cultivo. Lo observado indica que 1 g/L AC sería suficiente para reducir el efecto promotor de 4,44 μ M BAP + 2,46 μ M IBA. Los discos de hojas jóvenes crecieron más que los de hojas más maduras, independiente de la presencia de AC en el medio de cultivo (Figura 2), siendo consistente con la tendencia de que los tejidos jóvenes crecen más en el cultivo *in vitro*. La edad fisiológica de la hoja que dio origen al disco foliar fue el factor más importante

en el crecimiento de los discos, seguido de la adición de AC (Tabla V). La adición de PVP no afectó al grado de oxidación de los discos foliares (datos no mostrados).

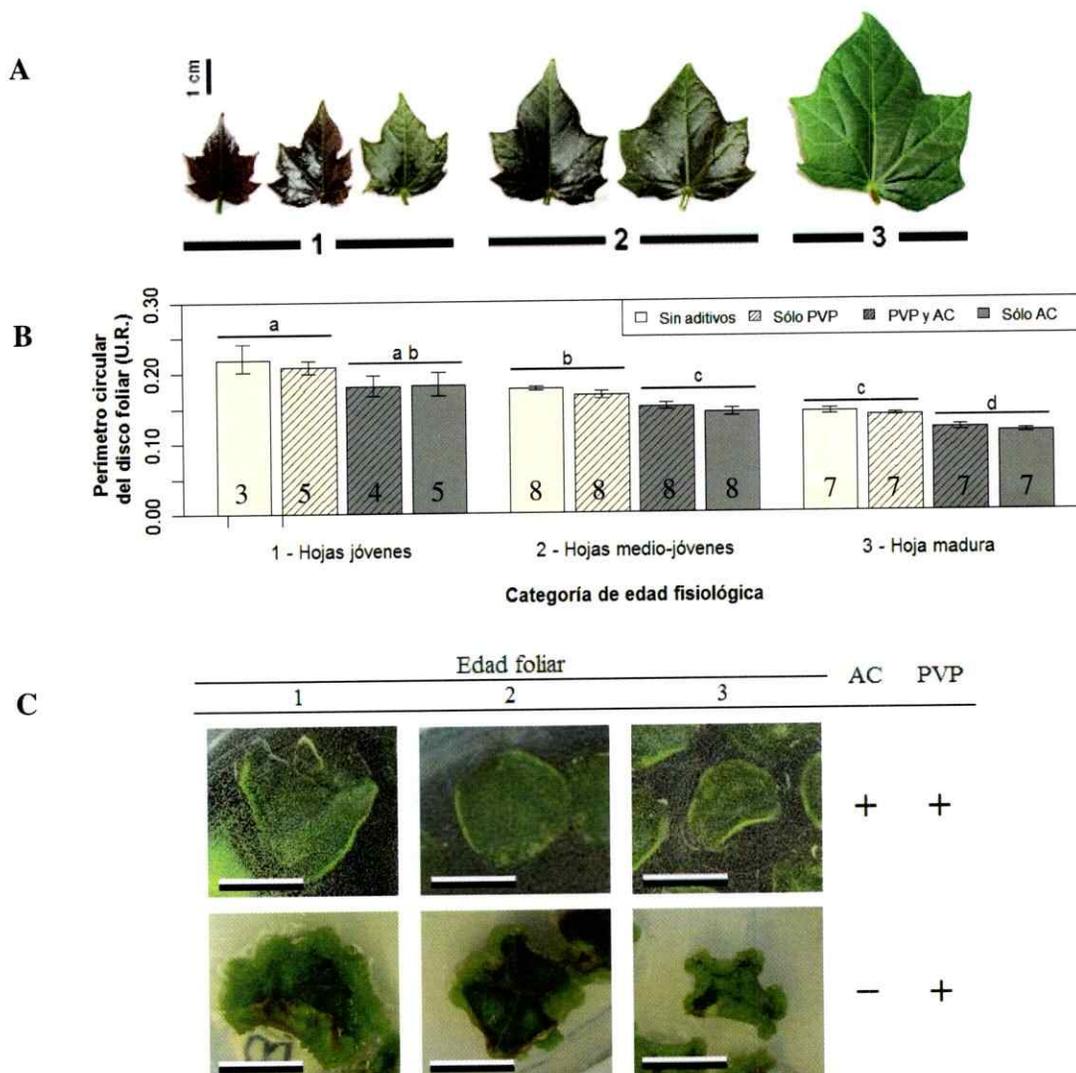


Figura 2. Efecto de la edad foliar y la adición de carbón activado y polivinilpirrolidona en el crecimiento de discos foliares. (A) Las hojas usadas como fuentes de discos agrupadas en tres categorías según su edad fisiológica (siendo 1 un trío de hojas jóvenes, 2 un par de hojas medio-jóvenes, y 3 una hoja madura). (B) Perímetro circular del disco foliar (unidades relativas, U.R.) en función de la edad foliar (eje horizontal) y la presencia o ausencia de carbón activado (AC, barra oscura) y la presencia o ausencia de polivinilpirrolidona (PVP, barra achurada). La altura de cada barra y el largo de cada barra de error indican el promedio y ± 1 error estándar del perímetro circular del disco foliar para cada tratamiento. El número de datos por tratamiento está indicado en cada barra. El factor PVP se omitió en las comparaciones múltiples de los tratamientos por no ser significativo; los pares de tratamientos con letras diferentes tienen promedios significativamente diferentes (pruebas de Tukey, $p < 0,05$). (C) Fotografías de discos foliares de hojas de las tres categorías de edad fisiológica en medios con y sin AC y con PVP, después de 10 días de cultivo *in vitro* en la incubadora de cultivo (barra = 1 cm).

Tabla V. Tabla de ANOVA del efecto de la edad foliar y aditivos (AC y PVP) sobre el crecimiento de discos foliares en cultivo *in vitro*.¹

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P	η^2	η^2_p
Edad (E)	2	88,659	44,330	115,30	$< 2,2 \times 10^{-16}$	0,64	0,78
AC (C)	1	22,744	22,74	59,155	$1,032 \times 10^{-10}$	0,16	0,48
PVP (P)	1	0,001	0,001	0,0027	0,95845	$< 0,01$	$< 0,01$
E \times C	2	1,467	0,734	1,9083	0,15655	0,01	0,06
E \times P	2	0,149	0,075	0,1940	0,82415	$< 0,01$	0,01
C \times P	1	1,282	1,282	3,3355	0,07239	0,01	0,05
E \times C \times P	2	0,184	0,092	0,2395	0,78771	$< 0,01$	0,01
Error	65	24,991	0,384	-	-	0,18	-
Total	76	139,48	1,835	-	-	1	-

¹ Datos de perímetro circular relativo del disco foliar transformados con la función recíproco (i.e. $1/X$).

Después de 30 días de cultivo *in vitro*, los discos foliares en medios con AC se mantuvieron verdes en caso de provenir de hojas jóvenes, o se oxidaron cuando provenían de hojas adultas, mientras que los discos foliares en medios sin AC sólo se tornaron más pálidos (Figura 3). Todos los discos foliares crecidos en medios con y sin AC, al ser cambiados a medios sin y con AC respectivamente, se oxidaron dentro de las dos semanas siguientes al cambio de medio (datos no mostrados).

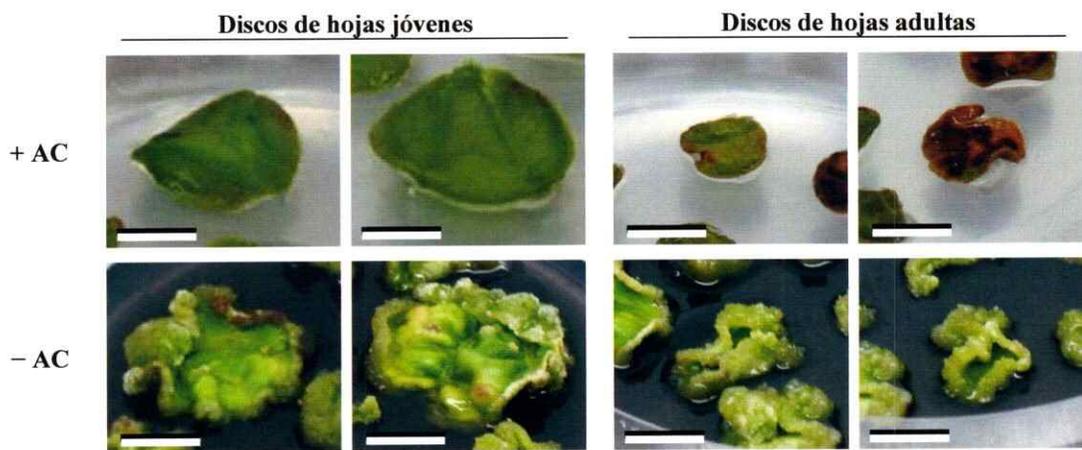


Figura 3. Efecto prolongado del carbón activado y la edad del disco foliar. Fotografías tomadas después de 30 días de cultivo *in vitro* (barra = 1 cm). Nota: los discos foliares se cambiaron desde medio de cultivo sin AC a medio de cultivo con AC y viceversa el mismo día en que se tomó las fotografías, por ello la discrepancia de color del medio.

3.3. Análisis exploratorio de factores exógenos.

Después de 30 días de cultivo *in vitro*, se observaron discos foliares con callo y estructuras parecidas a primordios de brote sólo en los medios colocados en la incubadora de cultivo (Figura 4 A y B). Debido a esto, el lugar de cultivo se consideró un factor importante en la generación de resultados no-nulos en el cultivo *in vitro*.

Reflejando lo anterior, el análisis de PBD reveló que el lugar de cultivo afecta la obtención de discos con callo o estructuras parecidas a primordios de brote (tanto en escala, Figura 4 C y D; como en su variabilidad, Figura 4 E y F). Otros factores que tuvieron un impacto significativo fueron las concentraciones de BAP y MS, siendo 2,22 BAP y 0,5 MS promotores de la obtención de discos con callos y estructuras parecidas a primordios foliares (Figura 4 C y D). A su vez, estas concentraciones también afectarían la variabilidad de los resultados, aumentándola al usar 2,22 BAP y 0,5 MS (Figura 4 F).

A los 60 días de cultivo, las estructuras parecidas a brotes continuaron creciendo, siendo verdes y de textura rugosa (Figura 5). Estos discos se mantuvieron por más de 150 días, con recambios a medio fresco cada 30 días, pero se oxidaron progresivamente, empezando por la hoja, luego el callo, y finalmente sus estructuras organizadas.

3.4. Efecto de la polaridad foliar.

Los resultados entre los medios de cultivo usados en el PBD fueron diferentes entre sí, y similares con los que se obtuvieron al explorar el efecto de diferentes factores exógenos. Para no considerar el efecto del medio, y enfocarse en el efecto de la polaridad foliar, se asignaron rangos a cada categoría de polaridad foliar dentro de cada medio de cultivo según la cantidad de callo y la presencia de estructuras parecidas a primordios de brotes.

El análisis de los resultados confirmó la observación de que no hubieron tendencias en los resultados para cada tipo de disco foliar (coeficiente de concordancia de Kendall = 0,094). No se halló evidencia de un efecto de la polaridad del disco foliar y la presencia de venas principales sobre los resultados del cultivo *in vitro* (prueba de Friedman, $\chi^2_3 = 2,26$; $p = 0,52$).

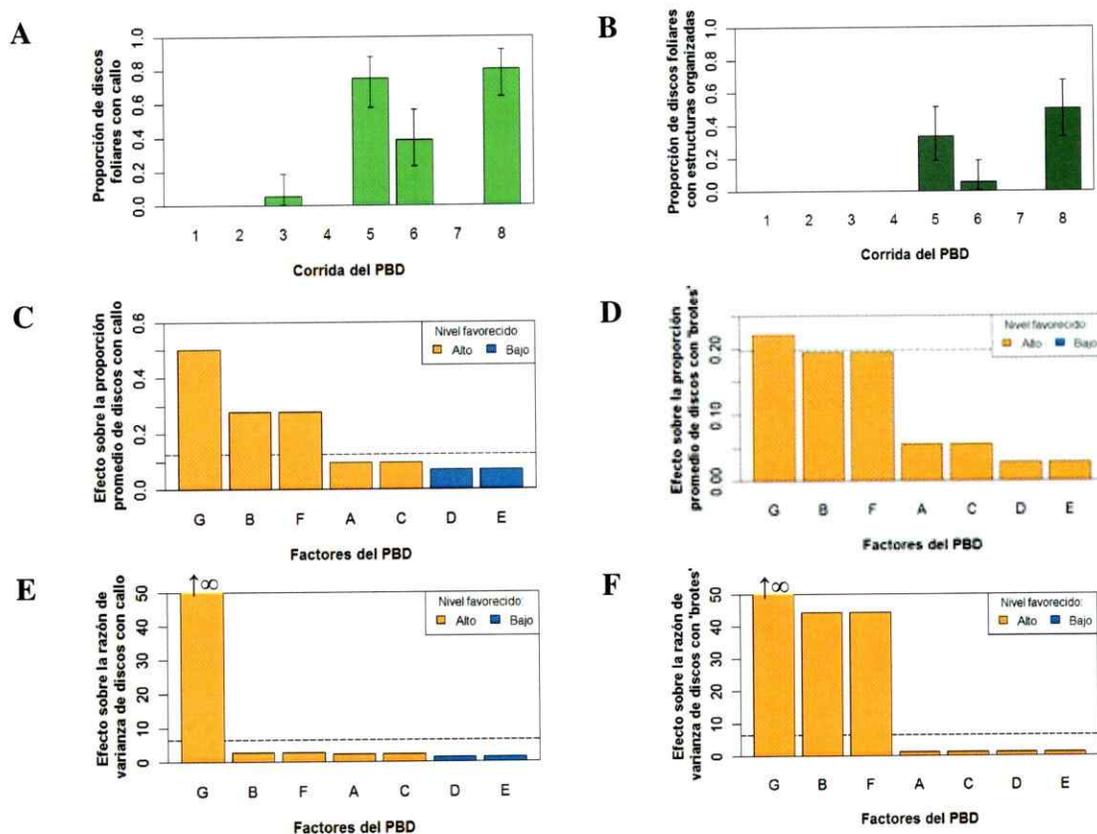


Figura 4. Análisis de los resultados del diseño de Plackett-Burman. A–B: Proporción de discos foliares con (A) callo y con (B) estructuras parecidas a primordios foliares (“brotos”), después de 30 días de cultivo *in vitro* para cada corrida del diseño de Plackett-Burman (PBD, Tabla III). En cada corrida se usaron tres repeticiones con 12 discos foliares. Las barras de error indican el intervalo de confianza del 95% exacto para la proporción resultante de juntar las repeticiones. **C–F:** Magnitud del efecto de cada factor de la Tabla IV sobre (C y D) el promedio y (E y F) la razón de varianzas de la proporción de discos con (C y E) callo y con (D y F) estructuras parecidas a brotes. Barras de color naranja indican que el “nivel bajo” del factor aumentó el promedio o la razón de varianzas; las azules indican que fue el “nivel alto”. Factores y niveles bajo y alto (Tabla IV): A, sacarosa (15 – 30 g/L); B, BAP (2,22 – 4,44 μ M); C, citrato (0 – 0,5 mM); D, pH (5,8 – 6,8); E, *dummy*; F, MS (0,5 – 1,0); G, lugar de cultivo (incubadora, armario). La línea discontinua indica el límite de detección para el nivel de significación 0,05. En este análisis la proporción de cada repetición se trabajó como una variable aleatoria continua. $\uparrow\infty$: en E y F la razón de varianzas para el factor G no puede graficarse por que su denominador fue 0 (cero), y un número dividido por cero no está definido en los números reales.

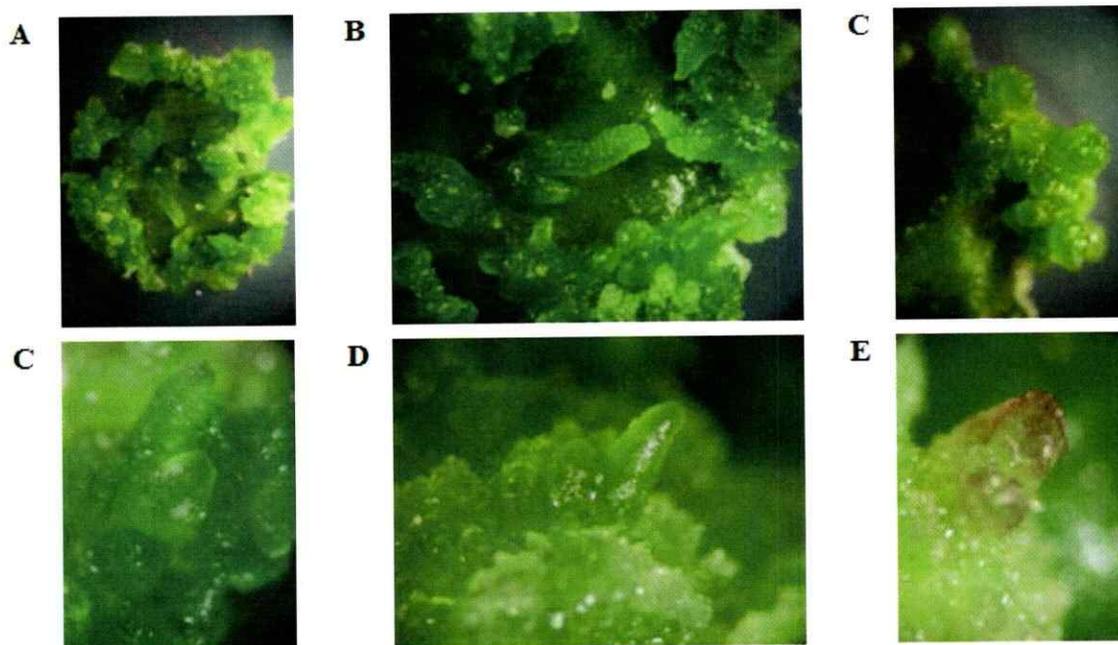


Figura 5. Estructuras parecidas a primordios foliares. A y B: Fotografías de un disco foliar después de 60 días de cultivo *in vitro*, se pueden observar estructuras organizadas parecidas a primordios foliares (aumento de lupa estereoscópica fijado en 0.65X y 1.00X). C–E: Fotografías de estructuras organizadas en otros discos foliares después de 60 días de cultivo *in vitro* (aumentos de la lupa estereoscópica fijados en: 0.65X, 1.00X, 1.25X, 4.00X, 4.00X, 5.00X). Note la pigmentación rojiza en E.

3.5. Efecto de la concentración de sacarosa.

Todos los discos foliares presentaron algún grado de deformación durante el cultivo *in vitro*. Independiente del lugar de cultivo, los discos foliares colocados en medios sin sacarosa se doblaron levemente, cerrándose hacía la cara abaxial, mientras que los discos foliares colocados en medios con sacarosa se doblaron cerrándose hacía su cara adaxial, siendo más pronunciado en el medio con 15 g/L de sacarosa (Figuras 6 y 7). En la incubadora de cultivo, los discos foliares colocados en medios sin sacarosa se tornaron pálidos y empardecieron (Figura 6). Esto contrasta con lo ocurrido en el armario de cultivo, donde los discos foliares en medios sin sacarosa sólo palidieron y los colocados en medios con 30 g/L de sacarosa se volvieron pardos (Figura 7).

El crecimiento de callo ocurrió desde los bordes de los discos foliares, y fue visiblemente menor en medios sin sacarosa. Al analizar el área de callo de fotografías digitales de cada disco foliar se observa que el crecimiento de callo fue mayor en medios con 15 g/L de sacarosa en lugar de 30 g/L, y fue casi nulo en ausencia de sacarosa (Figura 8). Excluyendo del análisis el nivel de concentración 0 g/L de sacarosa, el ANOVA reveló en ambas condiciones (incubadora y armario de cultivo) la significación estadística del factor sacarosa (Tabla VI y Tabla VII). En ambos casos el tamaño del efecto de la concentración de sacarosa fue grande (0,40 y 0,60). Cuando los discos foliares se mantuvieron en la incubadora de cultivo en medios con 15g/L de sacarosa, el área de callo aumentó en promedio entre un 95 y un 202% relativo al promedio obtenido en 30 g/L de sacarosa (intervalo de confianza del 95%). Este aumento fue menos pronunciado cuando los discos foliares se mantuvieron en el armario de cultivo, siendo entre un 50 y un 167% (intervalo de confianza del 95%).

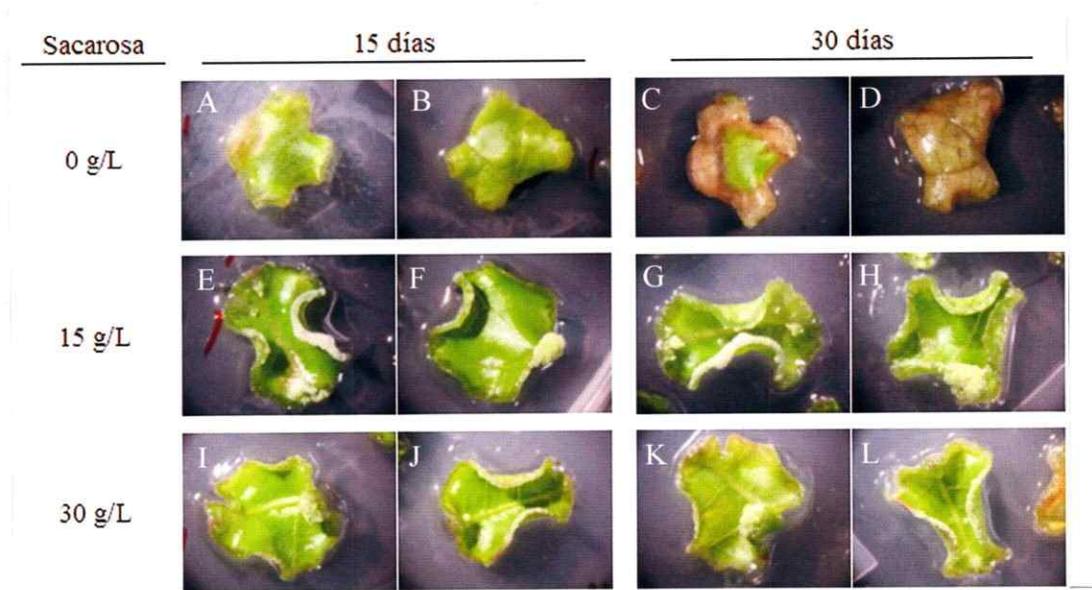


Figura 6. Discos foliares crecidos en medios con diferente concentración de sacarosa dentro de la incubadora de cultivo. Fotografías tomadas con lupa estereoscópica con aumento fijado en 0.65X.

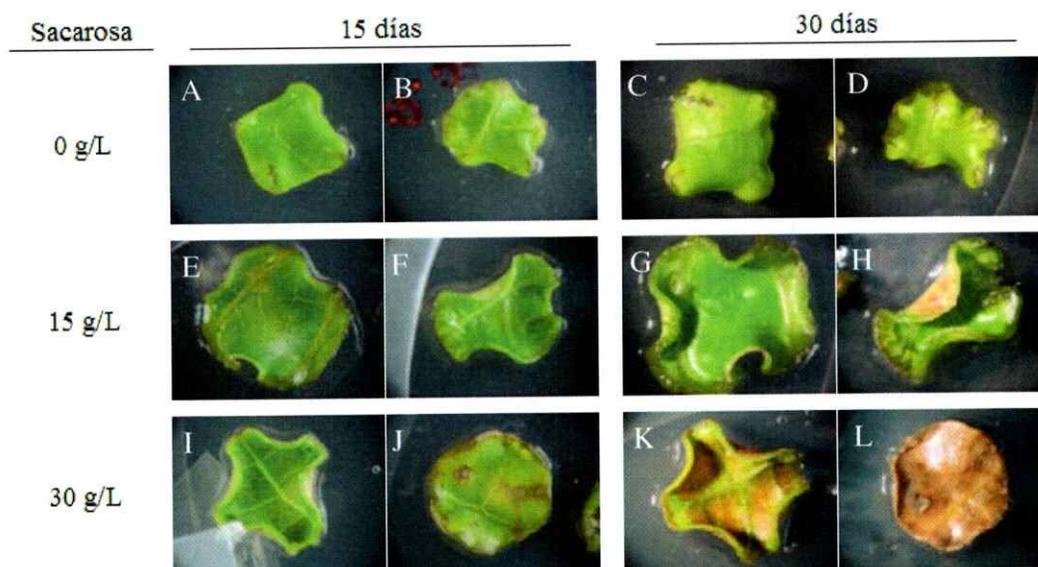


Figura 7. Discos foliares crecidos en medios con diferente concentración de sacarosa dentro del armario de cultivo. Fotografías tomadas con lupa estereoscópica con aumento fijado en 0.65X.

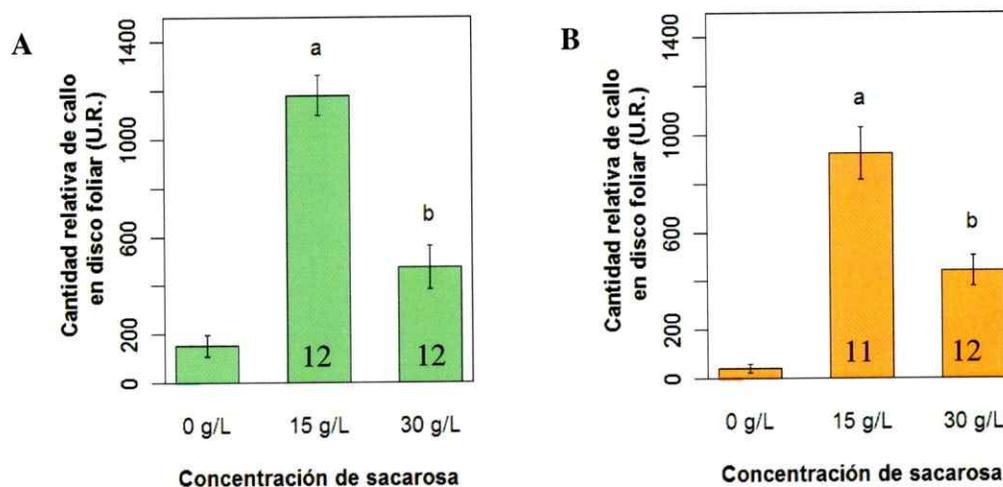


Figura 8. Efecto de la concentración de sacarosa y el lugar de cultivo sobre el crecimiento de callo en discos foliares. Cantidad de callo (unidades relativas, U.R.) en función de la concentración de sacarosa (eje horizontal) y el lugar de cultivo (incubadora, **A**; armario, **B**). Las barras de error indican el promedio ± 1 error estándar para cada tratamiento. El número de datos por tratamiento está indicado en cada barra, excepto para los de 0 g/L, en los que hubo 12 datos en cada uno. Se excluyeron del análisis los tratamientos de 0 g/L de sacarosa. Los tratamientos, dentro de cada lugar de cultivo (y no entre ellos), con letras diferentes tienen promedios significativamente diferentes (pruebas de Tukey, $p < 0,05$).

Tabla VI. Tabla de ANOVA del efecto de la sacarosa en el crecimiento de callo de discos foliares en la incubadora de cultivo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	p	η^2	η^2_p
Sacarosa	1	$2,8534 \times 10^{12}$	$2,8534 \times 10^{12}$	33,428	$9,7 \times 10^{-6}$	0,61	0,61
Error	21	$1,7926 \times 10^{12}$	$8,5360 \times 10^{10}$	-	-	0,39	-
Total	22	$4,6460 \times 10^{12}$	-	-	-	1	-

Tabla VII. Tabla de ANOVA del efecto de la sacarosa en el crecimiento de callo de discos foliares en el armario de cultivo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	p	η^2	η^2_p
Sacarosa	1	$1,3896 \times 10^{12}$	$1,3896 \times 10^{12}$	14,911	$8,45 \times 10^{-4}$	0,40	0,40
Error	22	$2,0503 \times 10^{12}$	$9,3193 \times 10^{10}$	-	-	0,60	-
Total	23	$3,4399 \times 10^{12}$	-	-	-	1	-

3.6. Efecto del medio de cultivo y su concentración.

A los 30 días de cultivo *in vitro*, todos los discos foliares colocados en medios de cultivo con 1,0 MS se oxidaron independiente del lugar de cultivo en el que se hallaban, y fueron los discos que menor cantidad de callo produjeron (Figuras 9, 10 y 11). Por otro lado, los discos colocados en medios con 0,5 MS se oxidaron en menor cantidad y produjeron más callo en sus bordes que los discos colocados en medios con 1,0 MS.

Los mejores resultados se obtuvieron con los discos foliares colocados en medios de cultivo con WPM, los cuales presentaron una mayor cantidad de callo y un menor grado de oxidación al ser comparados con los discos cultivados en medios con MS (Figuras 9 y 10). Sin embargo, la cantidad de callo como respuesta a la concentración de WPM fue dependiente del lugar de cultivo, invirtiéndose la concentración más favorable dependiendo del lugar (Figura 11).

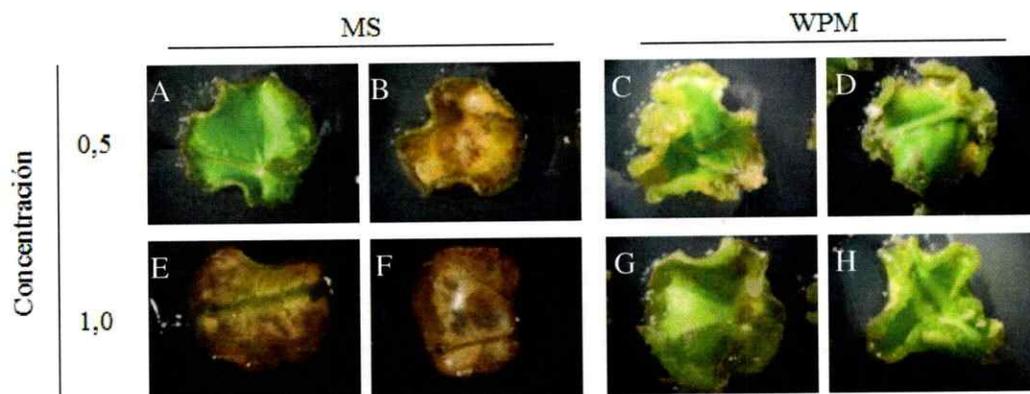


Figura 9. Discos foliares crecidos en medios basales nutritivos diferentes dentro de la incubadora de cultivo. Fotografías tomadas después de 30 días de cultivo *in vitro* con lupa estereoscópica con aumento fijado en 0.65X. Concentración del medio en relación a la estándar.

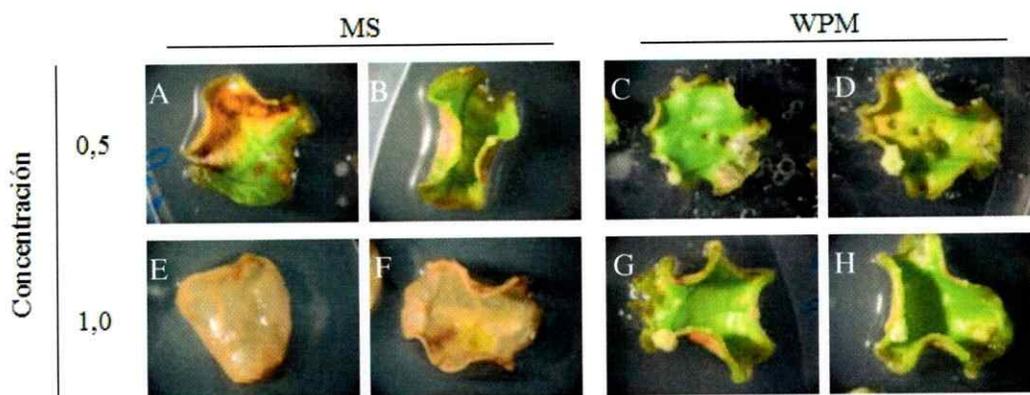


Figura 10. Discos foliares crecidos en medios basales nutritivos diferentes dentro del armario de cultivo. Fotografías tomadas después de 30 días de cultivo *in vitro* con lupa estereoscópica con aumento fijado en 0.65X. Concentración del medio en relación a la estándar.

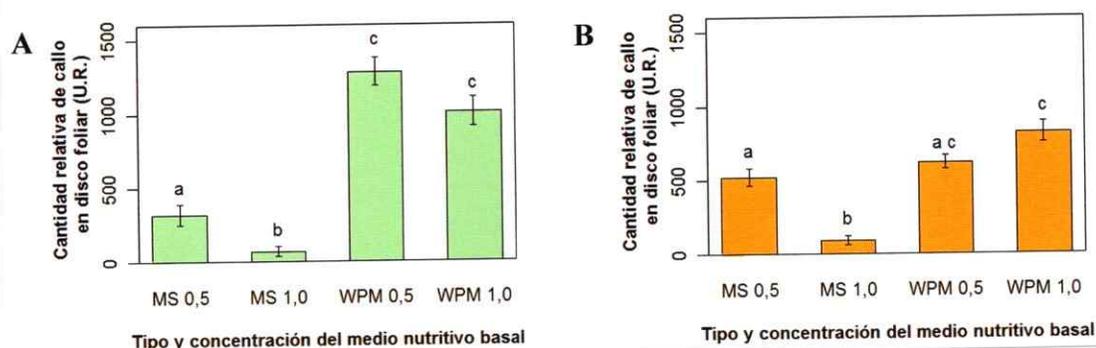


Figura 11. Efecto del medio basal nutritivo y el lugar de cultivo sobre el crecimiento de callo en discos foliares. Cantidad de callo (unidades relativas, U.R.) en función del medio basal nutritivo (eje horizontal) y el lugar de cultivo (incubadora, A; armario, B). Las barras de error indican el promedio ± 1 error estándar para cada tratamiento. El número de datos para todos los tratamientos fue 12. Los tratamientos, dentro de cada lugar de cultivo (y no entre ellos), con letras diferentes tienen promedios significativamente diferentes (pruebas de Tukey, $p < 0,05$).

El análisis de los resultados confirmó la significancia e importancia del factor medio de cultivo independiente del lugar de cultivo (Tablas VIII y IX). La importancia del medio de cultivo pareció disminuir un poco cuando se trabajó en el armario de cultivo. Sin embargo, las comparaciones a posteriori indicaron que, tanto en la incubadora como en el armario de cultivo, los resultados de los tratamientos 0,5 WPM y 1,0 WPM no fueron significativamente diferentes (prueba de Tukey, $p = 0,351$ en la incubadora y $p = 0,051$ en el armario de cultivo). En el armario de cultivo la diferencia entre los resultados de los tratamientos 0,5 MS y 0,5 WPM tampoco fue significativa (prueba de Tukey, $p = 0,571$). El resto de las diferencias, para cada lugar de cultivo, fueron estadísticamente significativas (prueba de Tukey, $p < 0,05$).

Tabla VIII. Tabla de ANOVA del efecto del medio basal nutritivo en el crecimiento de callo de discos foliares en la incubadora de cultivo.¹

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P	η^2	η^2_p
Medio	3	5858876	1952958,8	56,248	$4,2 \times 10^{-15}$	0,79	0,79
Error	44	1527709	34720,65	-	-	0,21	-
Total	47	7386585	-	-	-	1	-

¹ Datos de cantidad relativa de callo transformados con la función raíz cuadrada (i.e. \sqrt{X}).

Tabla IX. Tabla de ANOVA del efecto del medio basal nutritivo en el crecimiento de callo de discos foliares en el armario de cultivo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P	η^2	η^2_p
Medio	3	$3,4391 \times 10^{12}$	$1,1464 \times 10^{12}$	32,583	$3,0 \times 10^{-11}$	0,69	0,69
Error	44	$1,5481 \times 10^{12}$	$3,5183 \times 10^{10}$	-	-	0,31	-
Total	47	$4,9871 \times 10^{12}$	-	-	-	1	-

3.7. Efecto de la concentración de BAP e IBA.

Después de 30 días de cultivo *in vitro* los discos foliares en medios con 1,11 μM de BAP no tuvieron un crecimiento considerable de callo en la incubadora de cultivo (Figura 12) o se oxidaron en el armario de cultivo (Figura 13). El resto de los discos foliares crecidos en medios con 2,22 y 4,44 μM de BAP mostraron un crecimiento de callo observable a simple vista, siendo considerablemente mayor en la incubadora de cultivo (Figuras 12 y 13). Al comparar el efecto de estas dos concentraciones de BAP para una misma concentración de IBA, en cuatro de las seis comparaciones se produjo más callo con 4,44 μM que con 2,22 μM de BAP (Figura 14).

Las tres concentraciones estudiadas de IBA produjeron callos (Figuras 12 y 13). Teniendo en consideración el efecto de BAP sobre el crecimiento de callo, el efecto de IBA fue, en tres de cuatro condiciones, independiente y aditivo, aumentando el crecimiento de callo al aumentar la concentración de IBA (Figura 14). La condición que fue la excepción a lo anterior fue cuando los discos se mantuvieron en la incubadora de cultivo y la concentración de BAP fue 4,44 μM , caso en el que la respuesta pareció homogénea para las tres concentraciones de IBA.

Excluyendo los tratamientos con 1,11 μM de BAP, el ANOVA de dos vías indicó un efecto significativo para las hormonas en los dos lugares de cultivo (Tablas X y XI). El análisis también confirmó una interacción significativa entre BAP e IBA en la incubadora de cultivo (Tabla X). En el caso de la incubadora de cultivo, los factores IBA y la interacción IBA BAP fueron los más importantes, explicando en conjunto un 48% de la variabilidad total observada. Por otra parte, en el caso del armario de cultivo, el factor IBA explicó por si solo un 54% de la variabilidad total observada.

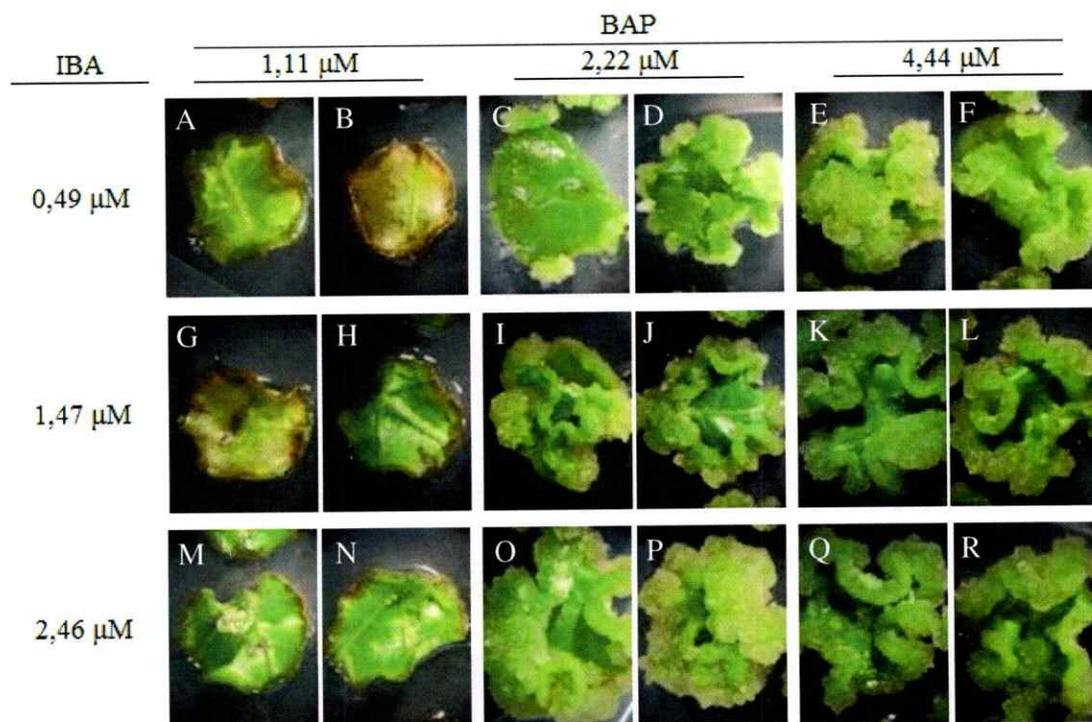


Figura 12. Discos foliares crecidos en medios con diferente concentración de hormonas dentro de la incubadora de cultivo. Fotografías tomadas después de 30 días de cultivo *in vitro* con lupa estereoscópica con aumento fijado en 0.65X.

Tabla X. Tabla de ANOVA del efecto de la concentración de hormonas en el crecimiento de callo de discos foliares en la incubadora de cultivo.¹

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	p	η^2	η^2_p
BAP	1	$8,6371 \times 10^{26}$	$8,6371 \times 10^{26}$	18,267	$6,7 \times 10^{-5}$	0,12	0,23
IBA	2	$1,7916 \times 10^{27}$	$8,9579 \times 10^{26}$	18,945	$3,8 \times 10^{-7}$	0,25	0,38
BAP \times IBA	2	$1,6679 \times 10^{27}$	$8,3394 \times 10^{26}$	17,637	$8,6 \times 10^{-7}$	0,23	0,36
Error	62	$2,9316 \times 10^{27}$	$4,7283 \times 10^{25}$	-	-	0,40	-
Total	67	$7,2547 \times 10^{27}$	-	-	-	1	-

¹ Datos de cantidad relativa de callo transformados con la función potencia cuadrática (i.e. X^2).

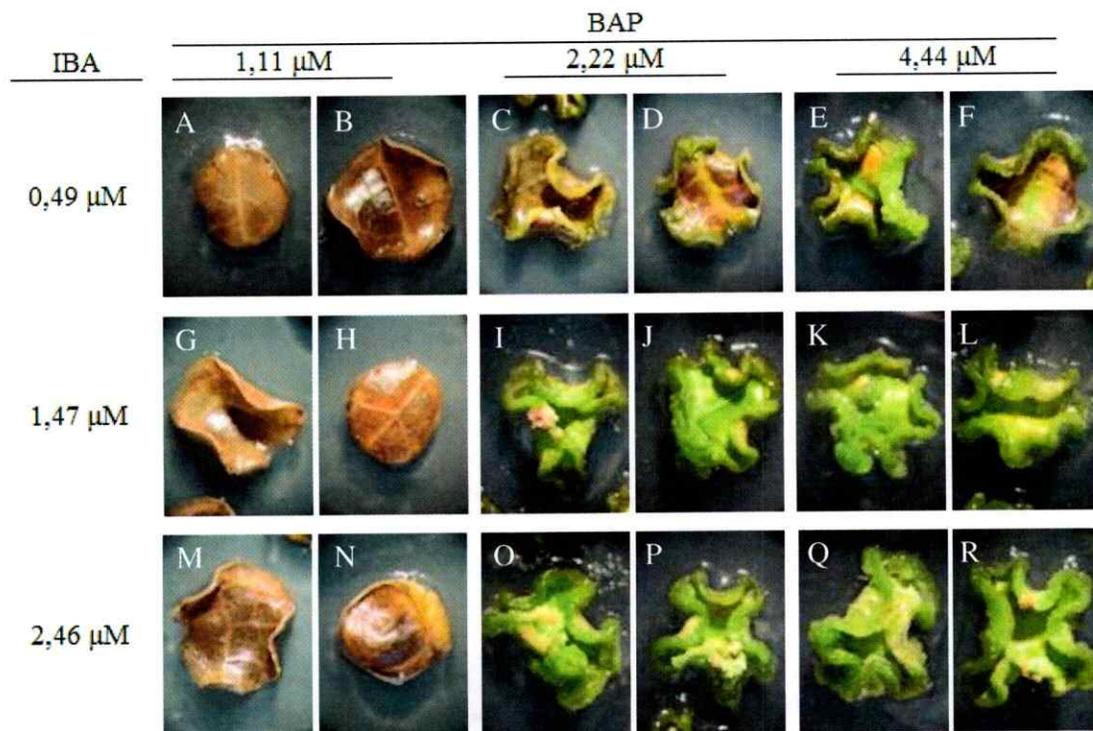


Figura 13. Discos foliares crecidos en medios con diferente concentración de hormonas dentro del armario de cultivo. Fotografías tomadas después de 30 días de cultivo *in vitro* con lupa estereoscópica con aumento fijado en 0.65X.

Tabla XI. Tabla de ANOVA del efecto de la concentración de hormonas en el crecimiento de callo de discos foliares en el armario de cultivo.¹

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	p	η^2	η^2_p
BAP	1	718.795	718.795	21,693	$1,9 \times 10^{-5}$	0,12	0,27
IBA	2	3.313.478	1.656.739	49,999	$2,4 \times 10^{-13}$	0,54	0,63
BAP \times IBA	2	151.690	75.845	2,289	0,1105	0,02	0,07
Error	58	1.921.841	33.135	-	-	0,32	-
Total	63	6.105.803	-	-	-	1	-

¹ Datos de cantidad relativa de callo transformados con la función raíz cuadrática (i.e. \sqrt{X}).

Las comparaciones múltiples *a posteriori* dividieron a los tratamientos en tres grupos para los resultados obtenidos en la incubadora de cultivo, mientras que para los resultados obtenidos en el armario de cultivo se obtuvieron cinco grupos de tratamientos (Figura 14).

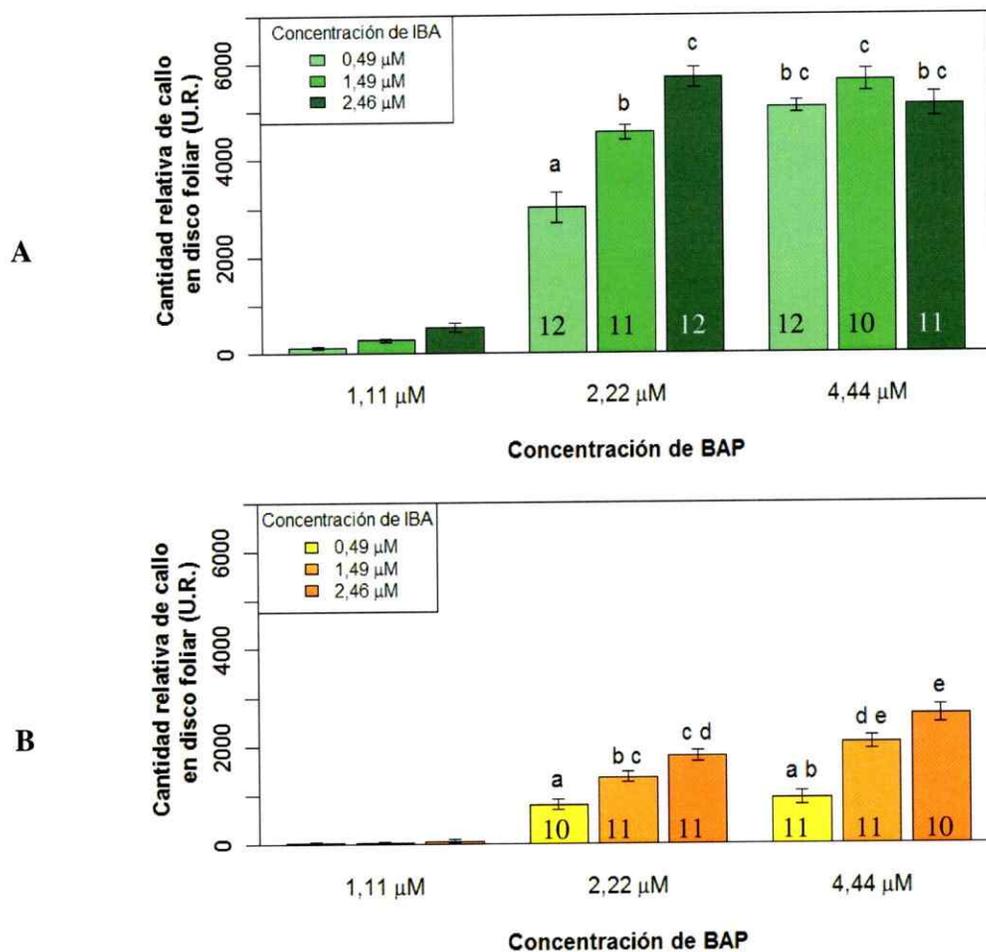


Figura 14. Efecto de la concentración de las hormonas y el lugar de cultivo sobre el crecimiento de callo en discos foliares. Cantidad de callo (unidades relativas, U.R.) en función de la concentración de BAP (eje horizontal) e IBA (barras de colores) y el lugar de cultivo (incubadora, **A**; armario, **B**). Las barras de error indican el promedio ± 1 error estándar para cada tratamiento. El número de datos por tratamiento está indicado en cada barra, excepto para los de 1,11 μM de BAP, cuyo número de datos fue 12 para las tres concentraciones de IBA en la incubadora de cultivo, y 9 y 11 para los tratamientos de 0,49 μM y los dos restantes de IBA. Se excluyeron del análisis los tratamientos de 1,11 μM de BAP. Los tratamientos, dentro de cada lugar de cultivo (y no entre ellos), con letras diferentes tienen promedios significativamente diferentes (pruebas de Tukey, $p < 0,05$).

En pocos discos foliares (~7%), de los crecidos en medios de cultivo con 2,22 o 4,44 μM de BAP, se observó que un grupo de células del callo se pigmentaron de color rojizo (Figura 15). En menos discos foliares, se observaron estructuras parecidas a primordios de brote o indicios de un aparente inicio de morfogénesis, las cuales presentaron o no pigmentación rojiza (Figura 16). Estos casos ocurrieron en los medios “e” (2,22 μM de BAP + 1,47 μM de IBA), “f” (2,22 μM de BAP + 2,46 μM de IBA), “h” (4,44 μM de BAP + 1,47 μM de IBA) e “i” (4,44 μM de BAP + 2,46 μM de IBA).

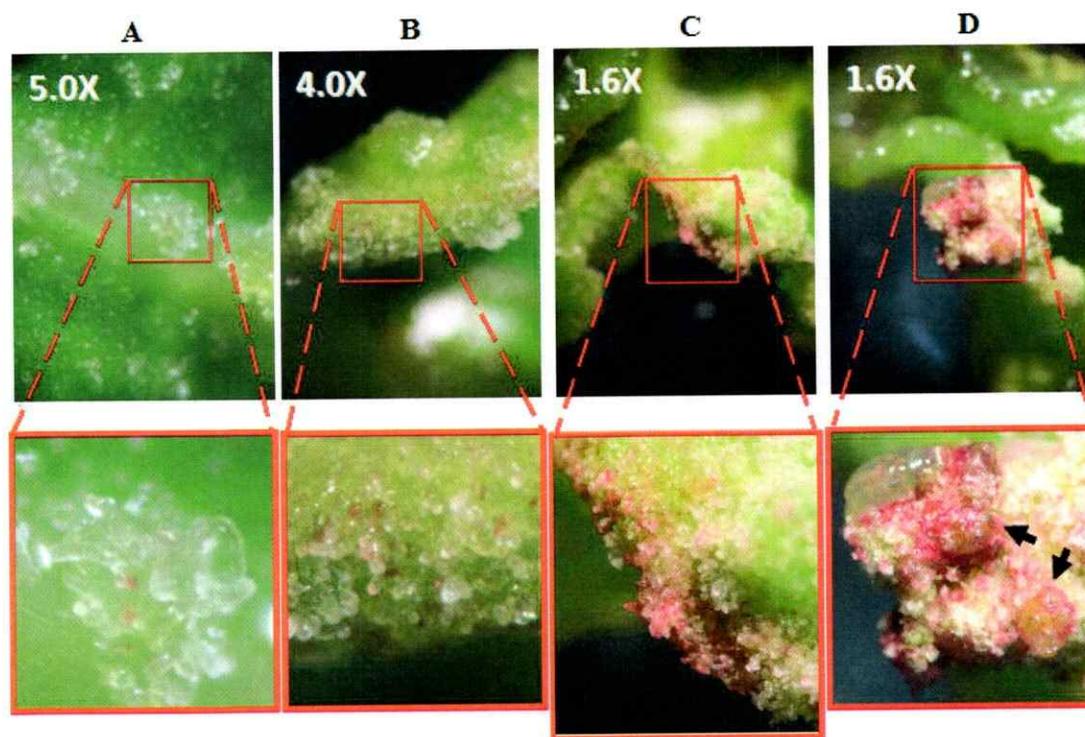


Figura 15. Pigmentación celular en callos de discos foliares. (A) En un grupo de células cristalinas que crecen sobre una vena de un disco foliar se pigmentan de color rojizo dos células (aumento de un disco foliar crecido en medio “f” durante 15 días dentro de la incubadora de cultivo). (B) Algunas de las células del callo que crece en el borde de un disco foliar se pigmentan de color rojizo (aumento de un disco foliar crecido en medio “i” durante 15 días dentro del armario de cultivo). (C) Varias células de un callo que crece en el borde de un disco foliar se pigmentaron de color rojizo (aumento de un disco foliar crecido en medio “i” durante 30 días dentro del armario de cultivo). (D) Un grupo de células rojizas crece sobre el callo que crece en el borde de un disco foliar; pueden observarse dos estructuras organizadas (señaladas con flechas negras) (aumento de un disco foliar crecido en medio “e” durante 30 días dentro del armario de cultivo). Arriba de cada fotografía se señala el aumento fijado en la lupa estereoscópica.

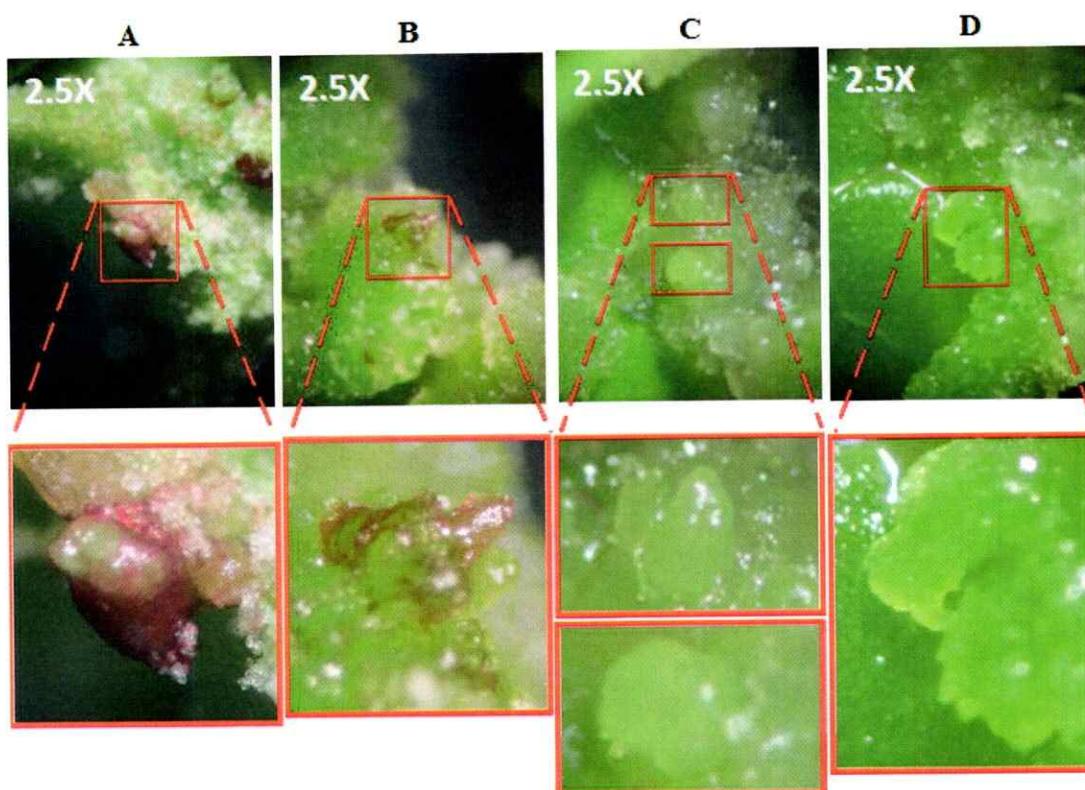


Figura 16. Estructuras organizadas en callos de discos foliares. (A) Estructura con pigmentación rojiza parecida a un meristema apical (aumento de un disco foliar crecido en medio “f” durante 30 días dentro del armario de cultivo). (B) Estructura con leve pigmentación rojiza parecida a un meristema apical (aumento de un disco foliar crecido en medio “e” durante 30 días dentro de la incubadora de cultivo). (C) Estructuras sin pigmentación rojiza con forma similar a un meristema apical (arriba) o forma globosa (abajo) (aumento de un disco foliar crecido en medio “i” durante 30 días dentro de la incubadora de cultivo). (D) Estructura sin pigmentación rojiza y de forma lanceolada (aumento de un disco foliar crecido en medio “h” durante 30 días dentro de la incubadora de cultivo). Arriba de cada fotografía se señala el aumento fijado en la lupa estereoscópica, que en este caso fue el mismo para todas (2.5X).

4. DISCUSION

4.1. Desarrollo morfológico – callos y estructuras organizadas

La respuesta más frecuente de los discos foliares al cultivo *in vitro* fue el crecimiento de callo. Las células que originan el callo pueden ser parenquimáticas, de la región sub-epidérmica, tal como ocurre en cotiledones (Varshney et al, 2011). Estas células parenquimáticas, a través de las heridas abiertas, originan los callos en los bordes de los discos foliares.

En todos los experimentos se observó que las células de los callos fueron translúcidas blanquecinas o verdes, coincidiendo con la descripción en los reportes de callos de *J. curcas* (e.g. Rajore & Batra, 2007), mientras que en unos pocos casos un grupo de células se pigmentaron de color rojizo. Estudios realizados de organogénesis desde discos foliares de *J. curcas* no han encontrado aparición de células pigmentadas de color rojizo. Por el contrario, Prabakaran & Sujatha (1999) reportan haber observado áreas de color rojo en callos foliares de *J. tanjorensis* durante la primera semana de cultivo *in vitro*, áreas a partir de las cuales surgieron brotes después de la cuarta semana. La pigmentación rojiza observada en algunos callos y estructuras organizadas podría estar relacionada con que algunas de las hojas provenían de plantas cuyas hojas jóvenes son de color rojizo (como las de la Figura 2A), pero para probar esta hipótesis se necesitarían realizar estudios con seguimientos controlados.

Pese a que se observaron estructuras organizadas, ninguna de estas se desarrolló como un brote normal dentro del tiempo de duración de los experimentos. Cuando estas se separaron para ser sub-cultivadas en otros medios murieron oxidadas (datos no

mostrados). El desarrollo incompleto del órgano puede deberse a que los componentes del medio no eran los indicados, mientras que la muerte de las estructuras al ser subcultivadas se podría deber a la liberación de compuestos fenólicos al momento de cortar y separar las estructuras desde sus explantes originales (Pierik, 1990).

La poca frecuencia de estructuras organizadas en los últimos experimentos no significa que los discos foliares no hayan tenido una respuesta morfogénica ante los tratamientos. Avilés et al (2009), trabajando con nogal (*Juglans regia* L.), hallaron zonas meristematicas en cortes histológicos de callos foliares que macroscópicamente no mostraban indicios de organogénesis. Por lo anterior, se recomienda recurrir a esta técnica cuando no se puedan observar estructuras macroscópicas asociadas a organogénesis, además de que permitiría eventualmente determinar el origen de los órganos que se obtengan mediante micropropagación (Varshney et al, 2011).

En las siguientes secciones se discuten los posibles roles de los diferentes factores en el cultivo *in vitro*. La primera sección discute el efecto de las condiciones del material vegetal que se desea micropropagar y el lugar dónde se realizará, mientras que la segunda sección discute el efecto de variar los componentes del medio de cultivo.

4.2. Material vegetal y condiciones para el cultivo *in vitro*

4.2.1. Contaminantes microbianos

El crecimiento de bacterias fue controlado al utilizar 100 mg/L de cefotaxima. El uso de este antibiótico en el cultivo *in vitro* de *J. curcas* ha sido reportado por Li et al (2008), para eliminar a *Agrobacterium* después de su co-cultivación con cotiledones, resultando inocuo para el tejido vegetal y su capacidad de regeneración hasta la concentración de

250 mg/L. Por otro lado, Misra et al (2010a) reportan haber utilizado una mezcla de amoxicilina y ácido clavulánico para prevenir el crecimiento de una bacteria endofita identificada como *Enterobacter ludwigii*.

El crecimiento de hongos se previno utilizando plantas cultivadas en el laboratorio como fuente del material vegetal. La contaminación fúngica recurrente al utilizar plantas de campo pudo deberse a que los discos foliares portaban una carga fúngica superior a la que el tratamiento de desinfección pudo contrarrestar, o a que esta carga estuvo inaccesible para los desinfectantes superficiales utilizados. Esto último puede ocurrir cuando los microbios se encuentran al interior de los tejidos de la planta (i.e. endófitos), y sólo se observan macroscópicamente cuando se colocan en contacto con el medio nutritivo (Pierik, 1990). Estos microbios, independientemente de si son o no patógenos *in vivo*, se vuelven entonces perjudiciales en el cultivo *in vitro* al competir por nutrientes y superar en crecimiento al explante (Cassells, 2011).

De los contaminantes fúngicos identificados, *Alternaria* y *Fusarium* han sido descritos como fitopatógenos que pueden afectar negativamente a *J. curcas* (Erazo López, sin fecha). Li et al (2005) reportan haber aislado dos cepas endofíticas de *Alternaria* a partir de tejidos saludables de *J. curcas*. *Trichoderma* es común en suelos y raíces, y puede ser tanto una amenaza oportunista para la planta en campo o un aliado como bio-controlador de hongos patógenos (Harman et al, 2004). Por último, el monitoreo de los contaminantes presentes en el ambiente del laboratorio ayuda a determinar en que casos se está enfrentando a un contaminante propio del o externo al material vegetal con que se trabaja, e.g. en este trabajo se encontró que *Cladosporium* y *Penicillium* fueron contaminantes introducidos externos al material vegetal.

4.2.2. Condiciones ambientales del lugar de cultivo

Durante la realización de este trabajo se contó con la disponibilidad de dos lugares de cultivo: una incubadora y un armario. Debido a restricciones logísticas se tuvo que recurrir a acondicionamientos diferentes que resultaron en lugares de cultivo de diferentes características. La ventaja de la incubadora de cultivo fue el control preciso de la temperatura de cultivo, mientras que su debilidad era su reducido espacio para mantener varios experimentos simultáneamente. Por otro lado, el armario de cultivo tuvo la ventaja de tener un espacio mucho mayor que permitía mantener más experimentos en paralelo, pero con la desventaja de presentar variaciones de temperatura diaria y posiblemente dependientes de la temperatura del laboratorio.

Según el análisis del diseño de Plackett-Burman, el lugar de cultivo fue uno de los factores más influyentes en las proporciones de discos foliares con callos y brotes, lo cual se observó a simple vista al notar que ninguno de las placas colocadas en el armario de cultivo en esa ocasión respondieron al cultivo *in vitro*. En los experimentos que le siguieron, sí se obtuvieron resultados, siendo en ocasiones de magnitudes similares a los obtenidos en la incubadora de cultivo.

Los reportes sobre organogénesis desde discos foliares de *J. curcas* revisados reportan temperaturas de cultivo entre 23 y 28 °C, fotoperíodos de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, y PAR entre 25 y 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (e.g. Khurana-Kaul et al, 2010; Misra et al, 2010a). Comparados con los valores obtenidos en este trabajo, parece ser que el armario de cultivo tenía más iluminación de la necesaria (de 99 a 143 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), lo que junto a la amplia variación de temperatura (de 21 a 30 °C) pudo haber estresado a los discos foliares.

4.2.3. Rol de las características de la hoja fuente de explantes

La edad de la hoja es un factor endógeno del material vegetal que puede afectar la capacidad regenerativa del explante en el cultivo *in vitro*, siendo en general las hojas más jóvenes las más propensas a desarrollar organogénesis (Gahan & George, 2008). En *J. curcas*, se ha reportado que hojas del tercer nodo son más regenerativas que las hojas del cuarto nodo (Sujatha & Mukta, 1996). Misra et al (2010a) confirman esta tendencia, pero determinan que hojas del primer nodo se tornan café y no responden al cultivo debido a compuestos fenólicos, las del cuarto demoran en responder y terminan coloreándose amarillas y muriendo, mientras que las del quinto simplemente no responden. En este trabajo se observó que los explantes provenientes de hojas jóvenes crecían más que los de hojas más adultas, pero no se observaron signos de regeneración de brotes durante el experimento. El aumento de tamaño se podría explicar porque las hojas más jóvenes tienen un mayor potencial de desarrollo que las maduras que se ve activado o potenciado por las hormonas del medio de cultivo, sea esto debido a una mejor predisposición o mayor totipotencialidad celular del tejido o a una mayor concentración endógena de hormonas en las hojas jóvenes.

Misra et al (2010a) reportan haber observado que la capacidad de regeneración aumentaba desde el ápice (sección distal) hacia la base (sección proximal) de la hoja, explicando esto con el hecho de que las hojas alcanzan su madurez primero en la sección distal y luego en las secciones más proximales. En el presente trabajo no se halló evidencia de un efecto debido a la polaridad o a la presencia de venas, aunque esto se pudo haber debido a la baja potencia estadística del experimento (ca. 0,20 en simulaciones), por lo que no se descarta que pueda existir tal efecto.

4.2.4. Apreciación cualitativa del efecto del genotipo

Al trabajar con plantas obtenidas desde semillas se corre el riesgo de que la variabilidad genética entre individuos agregue variabilidad a los resultados del cultivo *in vitro*, ya que la respuesta del tejido suele tener una dependencia genética importante (Gahan & George, 2008), lo cual se ha reportado para el cultivo *in vitro* de discos foliares de *J. curcas* (Peraza Abán et al, 2009; López Erosa et al, 2009; Misra et al, 2010a).

Para tener una idea del efecto del genotipo en la proliferación de callo se pueden comparar los resultados que se obtuvieron en medios equivalentes entre experimentos diferentes realizados dentro de un mismo lugar de cultivo. Los medios de cultivo “3c”, “4a” y “5f” son en composición el mismo (Tabla II). En el caso de la incubadora de cultivo, los discos foliares de las Figuras 6 KL, 9 AB, y 12 OP deberían ser similares si no hubiese un efecto del genotipo. Mientras que en el caso del armario de cultivo, son los discos foliares de las Figuras 7 KL, 10 AB, y 13 OP los que deberían ser similares en caso de no haber efecto del genotipo. En ambas comparaciones se ve que hubo un mayor crecimiento de callo en el experimento del efecto de la concentración de BAP e IBA, lo cual podría deberse a que las diferentes plantas utilizadas en los tres experimentos provenían de semillas.

Para estudiar la diversidad genética de las plantas que se utilizan como fuente de hojas se pueden usar diferentes técnicas de análisis de marcadores moleculares (Ferreira & Grattapaglia, 1998). En el caso de *J. curcas*, existe una basta bibliografía sobre el análisis de la diversidad genética de diferentes poblaciones mediante la aplicación de marcadores moleculares (Ovando-Medina et al, 2011).

4.3. Los componentes del medio de cultivo

4.3.1. Aditivos: carbón activado, polivinilpirrolidona y citrato

El carbón activado (AC) es un adsorbente que se suele agregar al medio de cultivo *in vitro* esperando que este retenga compuestos inhibidores del crecimiento (e.g. compuestos fenólicos), prevenga el crecimiento indeseado de callo, o promueva la morfogénesis, entre otras funciones que logra mediante la reducción de la concentración efectiva de los componentes del medio que adsorbe en base a la naturaleza química de estos últimos (Thorpe et al, 2008). En el caso de *J. curcas*, el uso de AC se ha reportado para la obtención de brotes a partir del cultivo de ápices (Rajore & Batra, 2005) y en la etapa de enraizamiento (Datta et al, 2007). La falta de formación de callo o brotes adventicios en discos foliares crecidos en medios con 1 g/L AC seguramente se debió a que la concentración de las hormonas disponible fue baja, alcanzando solamente para que el disco foliar continuase eventualmente con su desarrollo natural (Figura 3, fila superior): elongación en el caso de las hojas jóvenes, senescencia en las hojas maduras. De todas maneras se recomienda estudiar el efecto de concentraciones menores de AC, especialmente en etapas avanzadas del cultivo *in vitro*, ya que en otro experimento se observó su efecto promotor del enraizamiento de embriones aislados de semilla (resultados no publicados).

La polivinilpirrolidona, de forma similar al carbón activado, se agrega al medio de cultivo para la retención de compuestos fenólicos (Pierik, 1990). El uso de PVP en la micropropagación de *J. curcas* sólo ha sido reportado por Varshney & Johnson (2010), utilizándolo como componente de sus medios de regeneración para la organogénesis indirecta a partir de embriones inmaduros. En el presente estudio no se observaron

diferencias en el crecimiento de los discos foliares crecidos en medios con 1 g/L de PVP comparado con el de discos foliares en medios sin PVP, así como tampoco hubo diferencias visuales en el grado de oxidación posterior.

El ácido cítrico puede mejorar el resultado del cultivo *in vitro* de algunas plantas (Thorpe et al, 2008), además de que su sal conjugada puede utilizarse como un amortiguador del pH y antioxidante para controlar el empardecimiento de los explantes (Herman, 2000). El uso de citrato en la micropropagación de *J. curcas* ha sido reportado por Varshney & Johnson (2010), en el medio de regeneración para la organogénesis indirecta a partir de embriones inmaduros, y por Shrivastava & Banerjee (2008), en el medio de multiplicación de brotes para aumentar la longitud de los mismos, no superando en ningún caso la concentración de 0,15 mM de ácido cítrico. En este trabajo no se encontró un efecto significativo de agregar 0,50 mM de citrato sobre la proporción de discos foliares con callo o con estructuras organizadas cuando se realizó el análisis exploratorio de diferentes factores exógenos.

4.3.2. Rol de la sacarosa en la proliferación de callo foliar

La sacarosa en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales posee dos funciones importantes: 1) fuente de carbono, y 2) regulador osmótico (Thorpe et al., 2008). La casi nula proliferación de callo en el medio de cultivo sin sacarosa, comparada con la proliferación obtenida en los medios con 15 y 30 g/L de sacarosa, indicaría que esta azúcar es, en efecto, utilizada como fuente de carbono por el disco foliar.

La menor proliferación de callo en el medio con 30 g/L de sacarosa comparada con la obtenida en el medio con 15 g/L de sacarosa, puede ser explicada por dos factores

negativos (osmolaridad y compuestos orgánicos) no excluyentes, que contrarrestan al factor positivo que es la disponibilidad de una mayor cantidad de fuente de carbono (Thorpe et al., 2008). Un factor negativo podría ser el aumento de la osmolaridad del medio de cultivo, el cual inhibiría la proliferación de callo debido a la deshidratación de las células y la inducción de un cambio metabólico en ellas (Thorpe et al., 2008). Otro factor negativo podría ser la producción de compuestos orgánicos inhibitorios al autoclavar la sacarosa (Thorpe et al., 2008). La existencia de tales factores negativos puede probarse mediante la sustitución parcial de la sacarosa por una cantidad osmo-equivalente de un azúcar no metabolizable, y la adición de sacarosa post-autoclave mediante filtración, respectivamente.

4.3.3. Comparación de los medios básicos MS y WPM

El medio de cultivo basal que se utiliza en el cultivo *in vitro* provee al tejido vegetal de macro y micronutrientes, y en ocasiones vitaminas. Su potencial importancia en el cultivo *in vitro* es tal que, en algunos casos, sólo basta que los nutrientes estén en las concentraciones adecuadas para obtener la respuesta morfogénica deseada sin necesidad de adicionar hormonas (Pierik, 1990). En este trabajo se encontró que los discos foliares cultivados en medio WPM presentaron en general mayor proliferación de callos que los discos foliares cultivados en el frecuentemente utilizado medio MS. En cuanto a sus concentraciones, es notorio que 0,5 MS produce más callo y discos foliares más saludables en comparación a 1,0 MS; pero no queda claro qué concentración de WPM (0,5 o 1,0) produce mejores resultados. Considerando sólo las diferencias más grandes de sus formulaciones, el medio WPM comparado con el medio MS tiene: 4 veces menos

nitrato, ca. 4 veces menos amonio, 4½ veces menos cloruro, ca. 4 veces más sulfato, 10 veces más cobre, 10 veces más tiamina, y no contiene cobalto ni yoduro (comparación de las composiciones dispuestas por Plant *Phyto*Technology).

Las plantas leñosas crecen mejor en medios nutritivos basales con baja concentración de sales, como es el caso del WPM comparado con el medio MS (Margara, 1988). El único componente salino que se ve aumentado en el medio WPM comparado con el MS, además del cobre, es el ión sulfato. Sin embargo, en el cultivo *in vitro* los tejidos vegetales, en general, son prácticamente insensibles a un aumento del ión sulfato de esta magnitud, necesitando concentraciones mucho mayores para alcanzar un efecto nocivo (George & de Klerk, 2008). Lo anterior no significa que el sulfato no afecta al tejido vegetal, por ejemplo, en el cultivo hidropónico del tomate, el aumento de los niveles de sulfato en la solución de riego se correlacionan con el aumento de los niveles intracelulares de sulfato y azufre total en las hojas (Kowalska, 2005).

El cobre es un cofactor de enzimas involucradas en reacciones con oxígeno, como ocurre en la cadena transportadora de electrones o en la dismutación del radical superóxido (George & de Klerk, 2008). La concentración de cobre en el medio MS suele ser menor a la que se encuentra en las plantas, por lo que no es raro encontrar trabajos en que la adición de cobre al medio haya aumentado el crecimiento del tejido vegetal (George & de Klerk, 2008). En efecto, Khurana-Kaul et al. (2010) reportan haber aumentado en un 50% el número de brotes adventicios en explantes foliares de *J. curcas* cuando aumentaron en 10 veces la concentración de cobre del medio MS.

La tiamina (o vitamina B₁) es un cofactor esencial en el metabolismo de carbohidratos y está directamente involucrada en la biosíntesis de algunos aminoácidos

(Thorpe et al., 2008). Este componente podría explicar en parte el que los callos crecieran más, y los discos foliares se mantuvieran saludables, en los medios WPM comparado con los MS, ya que promovería el consumo de la sacarosa del medio y la biosíntesis de aminoácidos.

Para investigar cuál o cuáles de las diferencias entre el medio basal WPM y el medio basal MS son las responsables de las diferencias observadas, se sugiere partir por suplementar el medio MS con cobre, tiamina y ambos hasta alcanzar las concentraciones presentes en el medio WPM. Si las diferencias observadas entre el medio MS enmendado y el medio WPM persisten, querría decir que las sales restantes (o la interacción de ellas y los compuestos enmendados) son importantes en la respuesta del disco foliar. Por último, se recomienda estudiar la implementación de otros medios nutritivos para investigar cómo *J. curcas* responde a ellos en el cultivo *in vitro*.

4.3.4. Rol de las hormonas BAP e IBA

La adición de hormonas vegetales (o reguladores de crecimiento vegetal) al medio de cultivo es esencial para que el explante siga el desarrollo morfogénico deseado, siendo las auxinas y citoquininas los reguladores más importantes en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Machakova et al, 2008; van Staden et al, 2008). En el cultivo *in vitro* de discos foliares de *J. curcas* BAP e IBA son la citoquina y la auxina más utilizadas, y por ello nos propusimos optimizar sus concentraciones probando el efecto de variar sus concentraciones en la inducción de la formación de callos.

El análisis del efecto de variar la concentración de BAP indicó que, en presencia de 2,46 μM de IBA, y 2,22 μM de BAP en lugar de 4,44 μM de BAP promovía la

formación de callo y estructuras organizadas (análisis del PBD). Esto coincidió parcialmente con experimentos donde se encontró que 2,22 μM de BAP generaba menos callo que 4,44 μM de BAP en el armario de cultivo (Figura 14 B), pero no cuando las placas se colocaban en la incubadora de cultivo (Figura 14 A). Esto puede deberse a que en el análisis del PBD se confundió el efecto del BAP con la interacción entre la concentración de MS y el lugar de cultivo (uno de los posibles *aliases*, indicado en la Tabla III), o a que existen predisposiciones genéticas o fisiológicas diferentes entre los discos foliares de cada experimento.

El análisis de estos experimentos permiten rescatar algunas características de la respuesta de crecimiento de callo ante la concentración de BAP e IBA. La primera es la posible existencia de una concentración mínima de BAP para desencadenar un crecimiento de callo apreciable macroscópicamente, la cual estaría entre 1,11 y 2,22 μM de BAP. La segunda característica es el aparente efecto potenciador de la concentración de IBA en el crecimiento de callo, el cual deja de existir cuando se cultivan discos foliares en 4,44 μM de BAP en la incubadora de cultivo, quizás porque se ha alcanzado el máximo crecimiento de callo posible en 30 días de cultivo *in vitro* gracias a las condiciones favorables de la incubadora.

Comparado con otros reportes de uso de BAP e IBA en el cultivo *in vitro* de discos foliares de *J. curcas*, en este trabajo no se observó la respuesta morfogénica esperada (organogénesis), sino que sólo la formación de callo junto a estructuras organizadas en un experimento inicial, y luego la formación de sólo callo en los últimos.

Sujatha & Mukta (1996) en los medios "f" (2,22 μM BAP + 2,46 μM IBA) e "i" (4,44 μM BAP + 2,46 μM IBA) hallaron 100% de discos foliares con callo después de 6

semanas de cultivo, con un 30% de discos con brotes, al usar hojas del tercer nodo. Cuando usaron hojas del cuarto nodo sus resultados fueron 100% de callo para "f" y 50% de callo para "i", con 0% de discos con brotes para ambos. A partir de callos foliares obtuvieron un 67 y 100% de discos con brotes respectivamente, con ca. 11 y 4,5 brotes en promedio por disco foliar. En contrastando, en el presente trabajo no se observó más de un 5% de discos foliares con estructuras organizadas en los medios "f" e "i", lo que se puede deberse a diferencias genéticas, ya que aquí se trabajó con plantas de fondo genético centroamericano y no-tóxico, a diferencia de Sujatha & Mukta (1996).

Rajore & Batra (2007) obtuvieron brotes a partir de callos morfogénicos en 21 días al utilizar 3,33 μM BAP + 2,46 μM IBA. Mientras que en este trabajo no se obtuvieron brotes en medios 2,22 y 4,44 μM BAP + 2,46 μM IBA. Esto seguramente se debió a que trabajaron con callos organogénicos obtenidos previamente en un medio con 5,37 μM de NAA y 22,2 μM de BAP, siendo estos de color verde y además compactos, a diferencia de los observados en este trabajo que, si bien tuvieron un color verde, no parecieron ser compactos.

Deore & Johnson (2008), después de 6 semanas de cultivo y trabajando en un medio base de MS y con 30 g/L de sacarosa, encontraron que en un medio con 2,22 μM de BAP y 0,49 μM de IBA se obtenía el mismo porcentaje de discos foliares con callo que en un medio con 4,44 μM de BAP y 2,46 μM de IBA (ca. 60%). En ambos medios se observó inducción de brotes, pero menores a las observadas cuando se agregó entre 2,27 y 4,55 μM de TDZ al medio de cultivo, obteniendo las mejores respuestas morfogénicas cuando se usaron TDZ y BAP en presencia de IBA. Este par de combinaciones de BAP e IBA, sin TDZ, coincide con los medios "d" e "i" de este

trabajo respectivamente, excepto porque aquí se utilizó la mitad de MS en lugar del 100%, y a que nosotros medimos la cantidad de callo, siendo mayor en el medio "i".

Khurana-Kaul et al (2010) encontraron que, usando MS completo, en 2,22 μM de BAP y 2,46 μM de IBA (medio "f") y en 4,44 μM de BAP y 2,46 μM de IBA (medio "i") se obtenían porcentajes de organogénesis directa de 78 y 73%, con 6.8 y 4.2 brotes por explantes. Dentro de las 6 semanas de cultivo *in vitro*, reportaron que los explantes se hinchaban y agrandaban, además de que las respuestas fueron mayores en la vena media. El uso de BAP e IBA en lugar de TDZ e IBA indujo el crecimiento de callo junto a la inducción de brotes. Además, el uso de TDZ en lugar de BAP como citoquinina indujo un mayor número de brotes por explante (máximos: 18,8 vs. 6,8). Esto sugiere que usar TDZ, solo o con BAP, puede mejorar los resultados obtenidos, incluso inducir organogénesis.

Misra et al (2010a) encontraron que el medio "d" presentaba el mayor porcentaje de respuesta (83,6%) luego de 45 días de cultivo. Si los resultados de este trabajo siguieran la misma tendencia que los de ellos en cuanto al crecimiento de callo asociado, se tendría que los medios usados en este trabajo, ordenados de menor a mayor cantidad de callo, serían: "a" = "d" < "g" = "b" = "e" < "h". Este orden no coincide con el observado en la incubadora ni en el armario de cultivo. Revisando sus resultados es notorio que en su caso fue la mayor concentración de IBA la asociada a una mayor cantidad de callo. Misra et al (2010a) además reportan haber probado otras citoquininas, encontrando que BAP fue la única capaz de regenerar brotes frescos, verdes y saludables, a diferencia de Kn (que produjo brotes amarillentos) y TDZ (que produjo brotes vitrificados). En su estudio se micropropagó una variedad elite, por lo que la diferencia observada, en la eficacia de TDZ frente a BAP para inducir organogénesis, se puede deber a las diferencias genotípicas.

5. CONCLUSIONES

Se desarrolló la base metodológica para el establecimiento del cultivo *in vitro* de callo a partir de discos foliares, además de exponer y probar diferentes formas de optimizar la composición del medio de cultivo. La identificación de los factores que puedan inducir la organogénesis indirecta desde estos callos debe ser la continuidad de este trabajo de investigación.

Los resultados obtenidos no permiten disponer de un protocolo optimizado que facilite la regeneración de brotes de *J. curcas* mediante el cultivo *in vitro* de discos foliares en los medios de cultivo de composición nutricional y hormonal probados. En su lugar, nuestros resultados sugieren que la composición óptima de un medio para producir callo es cercana a: 15 g/L sacarosa, WPM a 0,5 o 1,0 veces la concentración estándar, 2,22 μM BAP + 2,46 μM IBA o 4,44 μM BAP + 1,49 μM IBA, sin añadir carbón activado, y sin necesidad de agregar 0,5 mM de citrato o 1 g/L de PVP.

La revisión y discusión de la bibliografía, nos sugieren que este resultado es producto de la dependencia genética del proceso de organogénesis, por lo que no se descarta la posibilidad de hallar la composición nutricional y hormonal del medio de cultivo que induzca la regeneración de brotes a partir de discos foliares de las plantas de *J. curcas* de origen guatemalteco que se han introducido a Chile.

6. BIBLIOGRAFÍA

Avilés, F., Ríos, D., González, R. y Sánchez-Olate, M. 2009. Effect of culture medium in callogenesis from adult walnut leaves (*Juglans regia* L.). Chilean Journal of Agricultural Research, **69**: 460-467.

Barnett, H.L. y Hunter, B.B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 4th ed. American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, USA.

Barrentine, L.B. 1999 An introduction to design of experiments: a simplified approach. American Society for Quality, Knoxville, Tennessee, USA.

Brittaine, R. y Lutaladio, N. 2010. *Jatropha*: A Smallholder Bioenergy Crop. The Potential for Pro-Poor Development. Integrated Crop Management, Vol. 8.

Cassells, A.C. 2011. Detection and Elimination of Microbial Endophytes and Prevention of Contamination in Plant Tissue Culture. En R.N. Trigiano y D.J. Gray (eds.), Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology. pp 223-238. CRC Press, Northwest, Washington, D.C., USA. Taylor & Francis Group, Florida, USA.

Davison A. 2009. Package 'SMPracticals'. Versión 1.3-1.

URL: <http://cran.r-project.org/web/packages/SMPracticals/SMPracticals.pdf>

Datta, M.M., Mukherjee, P., Ghosh, B. y Jha, T.B. 2007. *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). Current Science, vol. **93**, No. 10: 1438-1442.

Deore, A.C. y Johnson T.S. 2008. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. Plant Biotechnology Reports, **2**: 7-11.

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

Erazo López, J.D. Sin fecha. Manual de plagas y enfermedades de tempate (*Jatropha curcas*). Centro de Documentación del CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y forestal), El Salvador.

URL: <http://www.centa.gob.sv/uploads/documentos/Manual%20de%20plagas%20y%20enfermedades%20Tempate.pdf>

Ferreira, M.E. y Grattapaglia, D. 1998. Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético, 1^a ed. EMBRAPA-CENARGEN Documento 20, Brasilia, DF, Brasil.

Fox, J. y Weisberg, S. 2011. An {R} Companion to Applied Regression, 2nd ed. SAGE Publications, Inc., Thousand Oaks, California, USA.
URL: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>

Gahan, P.B. y George, E.F. 2008. Adventitious Regeneration, *En* E.F. George, M.A. Hall y G.-J. de Klerk (eds.), Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition – Volume 1. The Background, pp 355-401. Springer, The Netherlands.

George, E.F., Hall, M.A. y de Klerk, G.-J. (eds.). 2008. Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition – Volume 1. The Background. Springer, The Netherlands.

George, E.F. y Debergh, P.C. 2008. Micropropagation: Uses and Methods, *En* E.F. George, M.A. Hall y G.-J. de Klerk (eds.), Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition – Volume 1. The Background, pp 29-64. Springer, The Netherlands.

George, E.F. y de Klerk, G.-J. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients, *En* E.F. George, M.A. Hall y G.-J. de Klerk (eds.), Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition – Volume 1. The Background, pp 65-113. Springer, The Netherlands.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. y Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews | Microbiology*, vol. 2: 43-56.

Herman, E.B. 2000. Recent Advances in Plant Tissue Culture. Vol. 6. Regeneration and Micropropagation: Techniques, Systems and media 1997-1999. Agritech Consultants, New York, USA.

Jha, T.B., Mukherjee, P. y Datta M.M. 2007. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnology Reports*, vol. 1, No. 3: 135-140.

Kaewpoo, M. y Te-chato, S. 2009. Influence of explant types and plant growth regulators on multiple shoot formation from *Jatropha curcas*. *ScienceAsia*, 35: 353-357.

Kaewpoo, M. y Te-chato, S. 2010. Study on ploidy level of micropropagated *Jatropha curcas* L. via flow cytometry. *Journal of Agricultural Technology*, Vol. 6(2): 391-400.

Kalimuthu, K., Paulsamy, S., Senthilkumar, R. y Sathya, M. 2007. *In vitro* propagation of the biodiesel plant *Jatropha curcas* L. *Plant Tissue Culture & Biotechnology*, 17(2): 137-147.

Khurana-Kaul, V., Kachhwaha, S. y Kothari, S.L. 2010. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thiadizuron and high copper contents in the medium. *Biologia Plantarum*, 54(2): 369-372.

- Kowalska, I. 2005. Effects of sulphate level in the nutrient solution on plant growth and sulphur content in tomato plants. *Folia Horticulturae*, **17**: 91-100.
- Kumar, N. y Reddy, M.P. 2010. Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant. *Annals of Applied Biology*, **156**: 367-375.
- Kumar, N., Vijay Anand, K.G. y Reddy, M.P. 2010a. Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodiesel plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, vol. **32**, No. 5: 917-924.
- Kumar, N., Vijay Anand, K.G., Sudheer Pamidimarri, D.V.N., Tanmoy Sarkar, Reddy, M.P., Radhakrishnan, T., Tanuushri Kaul, Reddy, M.K. y Sudhir K. Sopori 2010b. Stable genetic transformation of *Jatropha curcas* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using leaf explants. *Industrial Crops and Products* **32**: 41-47.
- Li, H., Qing, C., Zhang, Y. y Zhao, Z. 2005. Screening for endophytic fungi with antitumor and antifungal activities from Chinese medicinal plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **21**: 1515-1519.
- Li, M., Li, H., Jiang, H., Pan, X. y Wu, G. 2008. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. **92**, No. 2: 173-181.
- Lloyd, G. y McCown, B.H. 1981. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagators' Society*, **30**: 421-427.
- López Erosa, S., Ortega Rojas, F.E., Rivera Lorca, J.A. y Fuentes-Cerda, C.F.J. 2009. Organogénesis indirecta a partir de explantes foliares de *Jatropha curcas* L. de Chiapas. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, VII Simposio Internacional de Producción Alcoholes y Levaduras, México.
- Machakova, I., Zazimalova, E. y George, E.F. 2008. Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors, *En* E.F. George, M.A. Hall y G.-J. de Klerk (eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition – Volume 1. The Background*, pp 175-204. Springer, The Netherlands.
- Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro* – Los meristemos y la organogénesis. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Mazumdar, P., Basu, A., Paul, A., Mahanta, C. y Sahoo, L. 2010. Age and orientation of the cotyledonary leaf explants determine the efficiency of *de novo* plant regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *Jatropha curcas* L. *South African Journal of Botany*, **76**: 337-344.

Misra, M. y Misra, A.N. 2010. *Jatropha*: The Biodiesel Plant Biology, Tissue Culture and Genetic Transformation – A Review. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 1(1): 11-24.

Misra, P., Gupta, N., Toppo, D.D., Pandey, V., Mishra, M.K. y Tuli, R. 2010a. Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 100, No. 2: 189-197.

Misra, P., Toppo, D.D., Gupta, N., Chakrabarty, D. y Tuli, R. 2010b. Effect of antioxidants and associate changes in antioxidant enzymes in controlling browning and necrosis of proliferating shoots of elite *Jatropha curcas* L. *Biomass and Bioenergy*, vol. 34, Issue 12: 1861-1869.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.

Nuri Nas, M., Eskridge, K.M. y Read, P.E. 2005. Experimental designs suitable for testing many factors with limited number of explants in tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81: 213-220.

Ovando-Medina, I., Espinosa-García, F.J., Núñez-Farfán, J.S. y Salvador-Figueroa, M. 2011. State of the art of genetic diversity research in *Jatropha curcas*. *Scientific Research and Essays*, vol. 6(8): 1709-1719.

Pan, J., Fu, Q. y Xu, Z.-F. 2010. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of biofuel plant *Jatropha curcas* using kanamycin selection. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 9(39): 6477-6481.

Paneque, M., Román, C., Vásquez, K., Valenzuela, R., Martínez, G., Lillo, G., Morales, L., Fuster, R., de la Fuente, A., Uribe, J., y Faúndez, L. 2009. ANDROS Impresores. Santiago, Chile.

Pei, H., Zhao, D. y Song, B. 2010. Genetic transformation of explant with *KN1* gene and its overexpression on transgenic plant in *Jatropha curcas* L. *Genomics and Applied Biology*, vol. 29, No. 3: 419-426.

Peraza Abán, A.N., Ortega Rojas, F.E., Rivera Lorca, J.A. y Fuentes-Cerda, C.F.J. 2009. Organogénesis directa en accesiones de *Jatropha curcas* L. colectadas en Chiapas. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, VII Simposio Internacional de Producción Alcoholes y Levaduras, México.

Pierik, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.

- Prabakaran, A.J. y Sujatha, M. 1999. *Jatropha tanjorensis* Ellis & Saroja, a natural interspecific Irbid occurring in Tamil Nadu, India. Genetic Resources and Crop Evolution, **36**: 213-218.
- Purkayastha, J., Sugla, T., Paul, A., Solleti, S.K., Mazumdar, P., Basu, A., Mohommad, A., Ahmed, Z. y Sahoo, L. 2010. Efficient in vitro plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. Biologia Plantarum, **54**(1): 13-20.
- R Development Core Team. 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. ISBN: 3-900051-07-0. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>
- Rajore, S. y Batra, A. 2005. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, **14**(1): 73-75.
- Rajore, S. y Batra, A. 2007. An alternative source for regenerable organogenic callus induction in *Jatropha curcas* L. Indian Journal of Biotechnology, vol. **6**: 545-548.
- Rasband, W.S. 1997-2011. ImageJ, U.S. Nacional Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. URL: <http://imagej.nih.gov/ij/>
- Sarkar, T, Vijay Anand, KG y Reddy, MP. 2010. Effect of nickel on regeneration in *Jatropha curcas* L. and assessment of genotoxicity using RAPD markers. Biometals, vol. **23**, No. 6: 1149-1158.
- Shrivastava, S. y Banerjee, M. 2008. *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): influence of additives. International Journal of Integrative Biology. vol. **3**, No. 1: 73-79.
- Shrivastava, S. y Banerjee, M. 2009. Algal filtrate: a low cost substitute to synthetic growth regulators for direct organogenesis of embryo culture in *Jatropha curcas* (Ratanjyot) Acta Physiologiae Plantarum, vol. **31**, No. 6: 1205-1212.
- Singh, A., Reddy, M.P., Chikara, J. y Singh, S. 2010. A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas* – A biodiesel plant. Industrial Crops and Products, **31**: 209–213.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. 1981. Biometry, The Principles and Practice of Statistics in Biological Research, 2nd ed. W.H. Freeman and Company, San Francisco, USA.
- Sujatha, M y Mukta, N. 1996. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **44**: 135-141.

- Sujatha, M. y Prabakaran, A.J. 2003. New ornamental *Jatropha* hybrids through interspecific hybridization. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **50**: 75-82.
- Sujatha, M., Makkar, H.P.S. y Becker, K. 2005. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regulation*, **47**: 83-90.
- Taucher, E. 1997. *Bioestadística*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Thepsamran, N., Thepsithar, C. y Thongpukdee, A. 2006. *In vitro* multiple shoot induction of physic nut (*Jatropha curcas*). Proceeding: Congress on Science and Technology of Thailand Science and Technology for Sufficiency Economy to Celebrate the 60th Anniversary of the Majesty the king's Accession to Throne. Sirikit Convention Hall, Bangkok, Thailand.
- Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E.C., de Klerk, G.-J., Roberts, A. y George, E.F. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems, *En* E.F. George, M.A. Hall y G.-J. de Klerk (eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition – Volume 1. The Background*, pp 115-173. Springer, The Netherlands.
- Trivedi, S., Gaudani, H., Gupta, M., Gupta, N., Patil, P., Gupta, G., Krishna, V. y Reddy, M.P. 2009. Establishment of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Jatropha curcas* L. *International Journal of Agriculture Sciences*, Vol. **1**, Issue 2: 11-20.
- van Staden, J., Zazimalova, E. y George, E.F. 2008. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists, *En* E.F. George, M.A. Hall y G.-J. de Klerk (eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition – Volume 1. The Background*, pp 205-226. Springer, The Netherlands.
- Varshney, A. y Johnson, T.S. 2010. Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports*, vol. **4**, No. 2: 139-148.
- Varshney, A., Sangapillai, R., Patil, M.S. y Johnson, S. 2011. Histological evidence of morphogenesis from various explants of *Jatropha curcas* L. *Trees*, vol. **25**, No. 4: 689-694.
- Venables, W.N. y Ripley, B.D. 2002. *Modern Applied Statistics with S*. 4th ed. ISBN 0-387-95457-0. Springer, New York.
- Wei, Q., Lu, W.-D., Liao, Y., Pan, S.-L., Xu, Y., Tang, L. y Chen, F. 2004. Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, **30** (4): 475-478.