

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE
INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
ESCUELA DE POSGRADO

Regeneración de plantas vía organogénesis y crioconservación
de *Jatropha curcas* L.

por

Julián Andrés Prada

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgrado
como requisito para optar el grado de

Magister Scientiae en Agroforestería Tropical

Turrialba, Costa Rica, 2012

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la División de Educación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante, como requisito parcial para optar por el grado de

MAGISTER SCIENTIAE EN AGROFORESTERÍA TROPICAL

FIRMANTES:



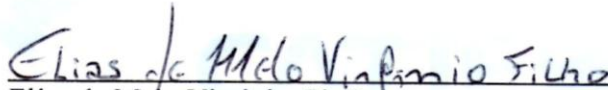
María Elena Aguilar, Ph.D.

Codirectora de tesis



Francisco Mesén, Ph.D.

Codirector de tesis



Elías de Melo Virginio, Ph.D.

Miembro Comité Consejero



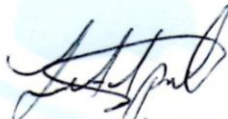
Ana Abdelnour, Ph.D.

Miembro Comité Consejero



Thomas Dormody, Ph.D. / Francisco Jiménez, Dr. Sc.

Decano / Vicedecano de la Escuela de Posgrado



Julián Andrés Prada

Candidato

DEDICATORIA

A Dios por las bendiciones que me ha dado.

A mi madre: Ana Prada Cabezas por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido lograr mis objetivos.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de mis estudios.

AGRADECIMIENTOS

A María Elena Aguilar, Ph. D. Asesora principal agradezco sus enseñanzas, confianza y apoyo constante, igualmente la oportunidad y el aprendizaje que representó para realizar este trabajo.

A todos los miembros de mi comité consejero Francisco Mesén Sequeira, Ph. D., Ana Abdelnour Esquivel, Ph. D., Elías de Melo Virginio Filho, Ph. D. Por sus sugerencias y la orientación en la revisión del documento.

A todo el personal de los Laboratorios de Biotecnología, especialmente a Karla Garita por toda su colaboración y amistad brindada durante la realización de este trabajo.

A todos los profesores, por sus enseñanzas.

A William Jesús Vargas Aroca por todo su apoyo y confianza constante durante la realización de mis estudios.

A Lilia Violeta Loján Zumba por su apoyo y confianza incondicional y por estar siempre ahí.

A la familia Devia Arias por sus consejos y apoyo brindado que permitió continuar con mis estudios.

A todos los compañeros estudiantes y sus familias, por el tiempo compartido.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
CONTENIDO	v
RESUMEN.....	viii
SUMARY.....	x
ÍNDICE DE CUADROS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	xv
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 Objetivos del estudio.....	18
<i>1.1.1 Objetivo general</i>	18
<i>1.1.2 Objetivos específicos</i>	18
<i>1.1.3 Hipótesis</i>	19
2. MARCO TEORICO.....	20
2.1 Aspectos generales de la <i>Jatropha curcas</i>	20
<i>2.1.1 Distribución geográfica y hábitat</i>	20
<i>2.1.2 Descripción taxonómica</i>	20
2.2 Importancia de la <i>Jatropha curcas</i> L.	21
<i>2.2.1 Biocombustibles</i>	22
<i>2.2.2 Medicina</i>	22
<i>2.2.3 Uso en la agroforestería</i>	25
2.3 Mejoramiento genético	26
2.4 Propagación del cultivo.....	27
<i>2.4.1 Propagación sexual</i>	27
<i>2.4.2 Propagación vegetativa</i>	28
<i>2.4.3 Micropropagación de la especie</i>	29
2.5 Conservación de germoplasma	32

2.5.1 Conservación <i>in vitro</i>	32
3. MATERIALES Y METODOS	34
3.1 Localización del estudio.....	34
3.2 Material vegetal.....	34
3.3 Manejo de las plantas madre de <i>J. curcas</i>	34
3.4 Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i>	35
3.4.1 Inducción de brotes axilares a partir plántulas <i>in vitro</i>	35
3.4.2 Inducción de brotes adventicios a partir de hojas.....	36
3.5 Crioconservación	39
3.5.1 Técnica de desecación y congelamiento rápido de semillas.....	39
3.5.2 Desecación y congelamiento rápido de embriones cigóticos	40
3.5.3 Técnica de Vitriificación de embriones cigóticos.....	41
3.6 Análisis estadístico.....	43
3.6.1 Variables de estudio durante la micropropagación	43
3.6.2 Variables de estudio durante la crioconservación	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1 Inducción de brotes axilares a partir plántulas <i>in vitro</i>	45
4.1.1 Inducción de brotes.....	45
4.1.2. Desarrollo de brotes	45
4.1.3 Enraizamiento.....	46
4.1.4 Aclimatación.....	47
4.2 Inducción de brotes adventicios a partir de hojas	47
4.2.1 Inducción de callo.....	47
4.2.2 Regeneración de brotes.....	50
4.2.3 Desarrollo de brotes	51
4.2.4 Enraizamiento.....	53
4.3 Crioconservación	53

4.3.1 Técnica de desecación y congelamiento de semillas	53
4.3.2 Técnica de desecación y congelamiento de embriones cigóticos	55
4.3.3 Técnica de vitrificación.....	56
5. DISCUSIÓN	58
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	65
7. BIBLIOGRAFÍA	67

RESUMEN

La investigación se realizó en los Laboratorios de Biotecnología del CATIE. El objetivo fue contribuir a la multiplicación vegetativa de *Jatropha curcas* L. a partir de la regeneración de callos organogénicos, segmentos nodales y a su conservación mediante la crioconservación de semillas y embriones cigóticos.

En este estudio, la micropropagación de *J. curcas* fue abordada utilizando dos metodologías: 1) La multiplicación de brotes axilares a partir del cultivo de segmentos nodales de plántulas germinadas *in vitro* y; 2) La inducción de brotes adventicios a partir de segmentos de hoja de plantas establecidas en invernadero. Los segmentos de hojas juveniles y semimaduros de la variedad tóxica y no tóxica se establecieron en un medio MS 100% con 2,0 mg/l de BAP y 1,0 mg/l de AIB, igualmente las hojas juveniles y semimaduras de la variedad tóxica se establecieron en 2,0 y 5,0 mg/l de BAP combinado con 0,0 – 0,5 – 1,0 mg/l de AIB. Además, hojas semimaduras se cultivaron con BAP y kinetina (2,0 – 5,0 – 7,0 – 10,0 mg/l) en combinación de las mismas concentraciones de AIB para la formación de callo. El desarrollo de los brotes fue evaluado en los medios MS y WPM con 100 y 200 g/l de caseína hidrolizada para los brotes axilares; y en el medio MS suplementado con BAP y AIA (0,25 mg/l) en combinación 0,0 – 0,25 – 0,5 mg/l de GA3 para los brotes adventicios. El enraizamiento de todos los brotes fue realizado en el medio MS en dos tratamientos 1) AIB (3,0 mg/l); 2) AIB (3,0 mg/l), AIA (1,0 mg/l) y ANA (3,5 mg/l) en dos tiempos de inducción (42 y 96 horas).

La crioconservación de semillas y embriones cigóticos de *J. curcas* fue realizada utilizando dos metodologías; 1) la desecación e inmersión directa de las semillas en NL, y la desecación de embriones cigóticos en cámara de flujo laminar durante 0 – 30 y 60 minutos, seguida de la inmersión en NL; 2) la vitrificación de embriones cigóticos. En todos los casos se determinó el CH de humedad de las semillas previo a la crioconservación, las semillas fueron escarificadas y desinfectadas después de la crioconservación.

El mejor medio para la inducción de brotes axilares en explantes de nudo cotiledonar fue el MS con 0,5 mg/l de BAP que permitió la producción de 2,06 brotes por explante. La regeneración de brotes adventicios fue superior en hojas semimaduras de la variedad tóxica en presencia de 2,0 mg/l de BAP donde se obtuvo 4,13 brotes/explante. En brotes producidos de explantes nodales el mayor alargamiento no superó los 6,4 mm en un medio MS suplementado con 100 mg/l de caseína hidrolizada. En tanto que, en brotes adventicios producidos por organogénesis se logró una longitud promedio de 15,8 mm solamente en presencia de 0,25 mg/l de AIA. La inducción de raíces en brotes axilares y brotes adventicios fue favorecida cuando se cambió el tiempo de inducción de 96 a 42 horas utilizando el mismo tratamiento auxínico (3,0 mg/l de AIB, AIA 1,0 mg/l y ANA 3,5 mg/l). Esta reducción en el tiempo de inducción permitió aumentar el porcentaje de enraizamiento de 8,3% a 50% en brotes axilares y del 50% al 62,5% en brotes adventicios.

La germinación de las semillas después de su congelamiento a -196°C fue del 100%, la mejor respuesta en el desarrollo de las plántulas se logró cuando las semillas fueron inoculadas en arena. La respuesta de los embriones cigóticos a la crioconservación también fue muy exitosa alcanzando porcentajes de sobrevivencia del 100% si mostrar diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, el mejor desarrollo (100%) y longitud de las plántulas (51,77 mm) fue alcanzado cuando los embriones fueron sometidos un tiempo de secado de 60 minutos al flujo laminar.

Con esta investigación se pudo constatar que la propagación *in vitro* de *J. curcas* aún encierra limitaciones, asociadas principalmente al desarrollo de los brotes que dificulta la multiplicación y el enraizamiento de los mismos, haciendo difícil la transferencia de las plantas a condiciones de invernadero y suelo. Sin embargo, también una gran diversidad de respuestas posiblemente relacionadas a las diferencias en el genotipo. Con respecto a la crioconservación, este estudio permite hacer aportes al conocimiento de las semillas y embriones cigóticos de esta especie y su comportamiento durante la congelación en NL. Aunque el uso de la técnica de vitrificación de embriones cigóticos no permitió ninguna señal de sobrevivencia después de la congelación en NL, los resultados graduales de sobrevivencia observados en cada una de las fases previas a la inmersión en NL, permiten ampliar el conocimiento sobre la tolerancia de estos embriones a las diferentes sustancias crioprotectoras y sus concentraciones y su efecto durante la congelación.

SUMARY

This research was done at CATIE biotechnology laboratories. The objective of this research was to contribute to the vegetative multiplication of *Jatropha curcas* L. from the regeneration of callus organogenics, nodal segments and its conservation through cryopreservation of seeds and embryos zygotic.

This work, the micropropagation of *J. curcas* was done using two methodologies: 1) the multiplication of axillaries shoots from the cultivation of nodal segments of seedlings *in vitro* germinated; 2) the induction of adventitious shoots from plant leaf segments placed in a greenhouse. The segment of young and semi-mature leaves of toxic and no toxic variety were placed in an environment MS 100% with 2,0 mg/l of BAP and 1,0 mg/l of AIB, similarly the young and semi-mature leaves of toxic variety were established in 2,0 and 5,0 mg/l of BAP combined with 0,0 – 0,5 – 1,0 mg/l of AIB. Furthermore, semi-mature leaves were cultivated with BAP and kinetina (2,0 – 5,0 – 7,0 – 10,0 mg/l) combined in equal concentrations of AIB in order to form the callus. The development of the shoots was evaluated in the environments MS and WPM with 100 and 200 g/l of hydrolyzed casein for the axillaries shoots; and in the environment MS supplemented with BAP and AIA (0,25 mg/l) in combination 0,0 – 0,25 – 0,5 mg/l de GA3 for the adventitious shoots. The rooting of all the shoots was made in the environment MS in two treatments 1) AIB (3,0 mg/l); 2) AIB (3,0 mg/l), AIA (1,0 mg/l) and ANA (3,5mg/l) in two moments of induction (42 and 96 hours).

The cryopreservation of *J. curcas* zygotes seeds and embryos was done using two methodologies; 1) the direct desiccation and immersion of seeds in LN, and the desiccation of zygotes embryos in a laminar flow chamber during 0 - 30 and 60 minutes, following the immersion in LN; 2) the vitrification of zygotes embryos. In all cases, it was determined the CH of wet of the seeds before the cryopreservation, the seeds were scarified and disinfected after the cryopreservation

The best environment for the induction of the axillaries shoots in cotyledonary knot explants was the MA with 0,5 mg/l of BAP; it allowed the production of 2,06 shoots by explanting. The regeneration of adventitious shoots was high in semi-mature leaves of toxic variety with 2,0 mg/l of BAP obtaining 4,13 shoots by explanting. On one hand, in shoots produced of nodal explants the lengthly was not high to 6,4 mm in an environment MS supplemented with 100 mg/l of hydrolyzed casein. On the order hand, in adventitious shoots produced by organogenesis was obtained an average length of 15,8 mm, only in presence of 0,25 mg/l of AIA. The induction of roots in axillaries and adventitious shoots was favored when a change of weather occurred in the induction time of 96 hours to 42 hours using the same auxinic treatment (3,0 mg/l de AIB, AIA 1,0 mg/l and ANA 3,5 mg/l). This reduction in the induction time allowed the increment of rooting percentage of 8,3% to 50% in axillaries shoots, and from 50% to 62,5% in adventitious shoots.

The germination of seeds after freezing them to -196°C was 100%. The best reply in the development of the seedlings occurred when these ones were introduced in sand. The answer of zygote embryos to the cryopreservation was very successful achieving a survival percentage of 100% without showing relevant differences between treatments. Nevertheless, the best development (100 %) and length of the seedlings (51,77mm) was achieved when the embryos were exposed to a drying time of 60 minutes in the laminar flow.

Through this research, it was possible to verify that the *J. Curcas in vitro* propagation encloses limitations mainly related with the development of shoots. These limitations not only make difficult the multiplication and rooting of the shoots making difficult the transfer of the plants to greenhouse and soil conditions. However, also these ones present a variety of answers relating to genotype differences. Regarding to cryopreservation, this investigation makes contributions to the knowledge about seeds and zygote embryos of this specie and the behavior of these ones during the freezing process in LN. Even though, the use of the zygote embryos vitrification technique did not permit a survival signal after freezing in LN, the gradual results of survival observed during the different stages before the immersion in NL allowed to expand the knowledge in regards to the tolerance of these embryos to the different cryoprotective substances and levels of concentration, and its effects during the freezing process.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Productos químicos aislados de diferentes partes de la planta.....	23
Cuadro 2. Usos medicinales de diferentes partes de la planta <i>J. curcas</i>	24
Cuadro 3. Estudios sobre el cultivo de tejidos de <i>Jatropha curcas</i> L.....	30
Cuadro 4. Tiempo de cultivo, porcentaje de éxito y número de brotes por explante durante la regeneración de <i>J. curcas</i> a partir de diferentes tipos de órganos.....	31
Cuadro 5. Efecto de diferentes concentraciones de BAP y Kinetina en combinación del AIB sobre la inducción de callo organogénico en hojas semimaduras de <i>J. curcas</i>	37
Cuadro 6. Efecto de la inducción de raíces durante 96 horas con AIA, AIA y ANA sobre el enraizamiento de <i>J. curcas</i> , variedad tóxica.....	46
Cuadro 7. Efecto de la inducción de raíces durante 42 horas con AIB, AIA y ANA sobre el enraizamiento de <i>J. curcas</i> , variedad tóxica.....	47
Cuadro 8. Efecto de la variedad y el estado de madurez de la hoja sobre la formación de callo organogénico en <i>J. curcas</i>	48
Cuadro 9. Efecto del estado de maduración de la hoja y de la BAP en combinación con el AIB sobre la inducción de callo organogénico en <i>J. curcas</i> , variedad tóxica.....	48
Cuadro 10. Efecto de la inducción de raíces durante 42 horas con AIB, AIA y ANA sobre la regeneración de raíces de <i>J. curcas</i> , variedad tóxica.....	53
Cuadro 11. Efecto del congelamiento en nitrógeno líquido de las semillas de <i>J. curcas</i> en nitrógeno líquido (-196 °C) sobre la germinación y desarrollo de las plántulas.....	54
Cuadro 12. Germinación y supervivencia de los embriones cigóticos y desarrollo de plántulas de <i>J. curcas</i> a las diferentes condiciones de desecación en cámara de flujo laminar, antes y después de la congelación en NL (-196 °C).....	55
Cuadro 13. Efecto del pretratamiento y de las soluciones vitrificadoras Loading y PVS2 sobre la sobrevivencia de los embriones de <i>J. curcas</i> antes de la inmersión en NL (-196 °C).....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Partes importantes de *J. curcas*: a) ramas florecidas; b) corteza; c) venas de la hoja; d) flor con pistilo; e) flor con estambres; f) corte transversal de un fruto inmaduro; g) frutos; h) corte longitudinal de un fruto; i) semilla. (Heller 1996)..... 6
- Figura 2. Efecto de la BAP sobre el desarrollo de brotes axilares en segmentos nodales de *J. curcas*, variedad tóxica. . Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$)..... 45
- Figura 3. Efecto de los medios de cultivo MS y WPM suplementados con caseína hidrolizada sobre el crecimiento de brotes axilares de *J. curcas*, variedad No tóxica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$)..... 31
- Figura 4. Regeneración de raíces a partir de segmentos nodales de *J. curcas*. A) Desarrollo de raíces con una inducción de 96 horas con 3,0 mg/l AIB. B) y C). Desarrollo de raíces con una inducción de 42 horas con 3,0 mg/l AIB, 1,0 mg/l de AIA y 3,5 mg/l de ANA..... 47
- Figura 5. Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de BAP y AIB sobre la inducción de callo organogénico en hojas semimaduras de *J. curcas*, variedad tóxica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher 0,05)..... 34
- Figura 6. Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de Kinetina y AIB sobre la inducción de callo organogénico en hojas semimaduras de *J. curcas*, variedad tóxica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$)..... 49
- Figura 7. Inducción de callo organogénico y diferenciación de brotes adventicios en explantes foliares de *J. curcas*, variedad tóxica. Callo organogénico y brotes adventicios formados con 10,0 mg/l de BAP y 1,0 mg/l de AIB (A), con 2,0 (B) y 7,0 mg/l de BAP en ausencia de AIB (C). Callo organogénico y brotes adventicios formados con 5,0 y 7,0 mg/l de Kinetina y 1,0 mg/l de AIB, respectivamente (D-E). Explante necrosado con 10,0 mg/l de Kinetina y 0,5 mg/l de AIB..... 50
- Figura 8. Efecto de las hojas juveniles y semimaduras de dos variedades de *J. curcas* sobre la regeneración de brotes a partir de callos organogénicos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$)..... 51
- Figura 9. Efecto del AIA y la BAP solas o en combinación de diferentes concentraciones de GA3 sobre el desarrollo y alargamiento de brotes regenerados de callos embriogénicos de *J. curcas*, variedad tóxica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$)..... 52
- Figura 10. Regeneración de brotes a partir de hojas semimaduras de la variedad tóxica. A) Brotes inducidos con 2,0 mg/l de BAP y 0,5 mg/l de AIB. B) Brotes utilizados en la fase de desarrollo..... 52

Figura 11. Germinación de las semillas y desarrollo de las plántulas de *J. curcas*. Se utilizó arena como sustrato para las semillas no congeladas (A) y congeladas (B) en NL, y medio de cultivo MS 100% para las semillas no congeladas (C) y congeladas (D) cultivadas *in vitro*..... 54

Figura 12. Germinación y desarrollo de embriones cigóticos y desarrollo de plántulas de *J. curcas* después de la congelación a -196°C. A) 0 minutos de desecación de los embriones (-NL). B) 30 minutos de desecación de los embriones (-NL). C) 60 minutos de desecación de los embriones (-NL). D) 0 minutos de desecación de los embriones (+NL). E) 30 minutos de desecación de los embriones (+NL) y F) 60 minutos de desecación de los embriones (+NL)..... 56

LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS

AIA:	Ácido indol acético
AIB	Ácido indol butírico
ANA:	Ácido naftalenacetico
ANDEVA:	Análisis de varianza
BAP:	6-Bencil amino purina
BSF:	Banco de Semillas Forestales - CATIE
CATIE:	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
CIAT:	Centro Internacional de Agricultura Tropical
DCA:	Diseño Completamente Aleatorizado
DMSO:	Dimetil sulfóxido
FDA:	Diacetato de fruoresceína
GA3:	Ácido giberélico
Kn:	Kinetina
ISSRs:	Inter Simple Sequence Repeats
MS:	Murashige y Skoog (1962)
NL:	Nitrogeno líquido
SH:	Schenk e Hildebrandt (1972)
TTC:	Cloruro de trifenil tetrazolio
WPM:	Woody Plant Medium (1980)

1. INTRODUCCIÓN

Jatropha curcas L. es una especie perenne, pertenece a la familia Euphorbiaceae, originaria de México y Centroamérica, aunque actualmente es cultivada en América del Sur, el Caribe y países de África, Asia y Oceanía (Heller 1996). En diferentes países *J. curcas* se ha utilizado en cercas vivas, para control de la erosión del suelo, como tutores de plantas escandentes, en la medicina tradicional y veterinaria, en la producción de energía y combustibles diesel (Machado y Suarez 2009). El cultivo de *J. curcas* en los últimos años ha sido una importante alternativa para la producción de biodiesel, ya que presenta un alto rendimiento de aceite a partir de las semillas. Además, se caracteriza por su fácil adaptabilidad a diferentes tipos de suelos y su baja exigencia en nutrientes y agua (King *et al.* 2009).

La importancia de esta especie radica en que es un cultivo energético de gran interés para la producción de biodiesel, de sus semillas se extrae entre 1100 a 1700 litros de aceite por hectárea por año (Nunes 2007). Este valor supera al de otros cultivos como la colza (1100 l/ha año), el girasol (960 l/ha año) o la soja (420 l/ha año) los cuales también son utilizados para la producción de biodiesel (Jongschaap *et al.* 2007). Otra de las ventajas de la *J. curcas* como cultivo es que no tiene finalidad alimentaria, por lo tanto, no compite con la demanda de otros cultivos alimentarios. No es un cultivo comestible debido a que el aceite de sus semillas contiene compuestos anti-nutricionales tóxicos como formol ésteres y curricina (Toral *et al.* 2008).

Existen dos variedades de *J. curcas*, una tóxica y otra no tóxica o de baja toxicidad proveniente de México (Heller 1996; Martínez *et al.* 2007). En algunas poblaciones de México las semillas de la variedad no tóxica las emplean para el consumo humano mediante el tostado en comal (Martínez 2008; Martínez *et al.* 2006; Schmook y Sánchez 2000). Las semillas se caracterizan por no contener forbol ésteres o por contenerlo en cantidades inferiores al 0,11%, por lo anterior no se considera tóxica (Schmook y Sánchez 2000).

A parte del aprovechamiento del aceite para la obtención de biodiesel, el cultivo de *J. curcas*, se hace con otros propósitos como uso medicinal, ya que actúa como antiséptico, anticoagulante (Kone-Bamba *et al.* 1987) y como purgante (Heller 1996). También, En la agricultura es usado como insecticida para controlar varias plagas que atacan al algodón, maíz, tomate y patata (Grainge y Ahmed 1988); y como fertilizante ya que las hojas, el exocarpo de los frutos y la torta se obtienen como subproducto del proceso de extracción de aceite. También se utiliza como aporte de materia orgánica al suelo, aportando entre un 3,2 y 3,8% de nitrógeno (Juillet *et al.* 1995).

La *J. curcas* es una especie generalmente propagada por semillas, con el inconveniente de que los cultivos establecidos a partir de semillas presentan alta heterocigosidad, enfermedades transmitidas de la semilla a la planta y no se puede garantizar el contenido de aceite (Mukherjee *et al.* 2011). Aunque algunos autores sugieren que las semillas de esta especie son ortodoxas (Zhijun *et al.* 2008), otros mencionan que las semillas pierden el 50% de su viabilidad después de 15 meses de almacenamiento (Joker y Jepsen 2003).

Además se ha observado que las plantas que han sido propagadas vegetativamente a partir de estacas presentan una baja longevidad y una reducción en la producción de semillas (Mukherjee *et al.* 2011). Teniendo en cuenta estos inconvenientes se considera que el uso de herramientas de la biotecnología como la micropropagación y la criopreservación pueden contribuir desde el punto de vista práctico a mejorar las posibilidades de multiplicación de genotipos de interés y al almacenamiento de germoplasma de esta especie.

Por lo tanto, en esta investigación se propone contribuir a la multiplicación vegetativa de *J. curcas* por medio de la regeneración de plantas a partir de callos organogénicos y segmentos nodales y a su conservación mediante la criopreservación de semillas y embriones cigóticos.

1.1 Objetivos del estudio

1.1.1 Objetivo general

Contribuir a la multiplicación vegetativa de *Jatropha curcas* L. a partir de la regeneración de callos organogénicos, segmentos nodales y a su conservación mediante la crioconservación de semillas y embriones cigóticos.

1.1.2 Objetivos específicos

Determinar el efecto de la variedad y tipo de explante en la regeneración de callos organogénicos.

Evaluar el efecto de medios de cultivo y reguladores del crecimiento para el desarrollo y alargamiento de brotes de *J. curcas*.

Comparar la respuesta *in vitro* de los brotes de *J. curcas* al enraizamiento, utilizando diferentes tipos, concentraciones y combinaciones de auxina y tiempos de inducción del enraizamiento.

Evaluar la sobrevivencia de las plantas establecidas en invernadero.

Evaluar las técnicas de desecación y congelación directa en NL de semillas y embriones cigóticos y la técnica de vitrificación de embriones cigóticos.

Determinar la sobrevivencia de las semillas y embriones cigóticos a los tratamientos de crioprotección y al congelamiento en NL.

Evaluar el desarrollo de las plántulas después de la congelación en NL (-196°C).

1.1.3 Hipótesis

Se observará un efecto positivo en la regeneración de callos organogénicos en los explantes de *J. curcas*.

Se observará una respuesta positiva de los brotes de *J. curcas* al cultivo en diferentes medios y a la adición de reguladores de crecimiento.

Se obtendrán concentraciones de auxinas adecuados, para el enraizamiento de brotes de *J. curcas*.

Las plantas de *J. curcas* lograrán tener una tasa óptima de sobrevivencia durante la aclimatación.

Las semillas de *J. curcas* tendrán una óptima recuperación y desarrollo después de su congelamiento en nitrógeno líquido.

Los embriones cigóticos de *J. curcas* tendrán una óptima recuperación y desarrollo después del congelamiento en nitrógeno líquido.

Se determinarán las sustancias crioprotectoras y el tiempo adecuado de exposición para el pretratamiento previo a la crioconservación de embriones cigóticos.

2. MARCO TEORICO

2.1 Aspectos generales de la *Jatropha curcas*

2.1.1 Distribución geográfica y hábitat

J. curcas es originaria de México y Centroamérica (Heller 1996); sin embargo, actualmente se cultiva en América del Sur, el Caribe y varios países de África, Asia y Oceanía (Machado y Suarez 2009). Esta especie se encuentra en su mayoría en bajas elevaciones, inferiores a 1200 msnm (CATIE 2003). La temperatura adecuada para el cultivo está entre 18°C y 28,5°C y puede resistir heladas leves (Jongschaap *et al.* 2007). Los suelos óptimos para *J. curcas* son los franco arenosos o arcillo arenosos livianos, bien drenados ya que esta especie no tolera suelos inundados (Jongschaap *et al.* 2007). Habita bajo precipitaciones de 300 a 1800 mm bien distribuidos durante el año (CATIE 2003).

2.1.2 Descripción taxonómica

El género *Jatropha* pertenece a la familia Euphorbiaceae, Subfamilia Crotonoideae y fue determinado por Linneo entre los años 1753 y 1754 (Font 2003). Este género cuenta con más de 175 especies, 45 de ellas se encuentran en México, donde el 77% son endémicas (Jiménez y Martínez 1994; Martínez *et al.* 2002). La especie *J. curcas* es conocida comúnmente por coquillo, tempate (Costa Rica), tárgaro (Puerto Rico), piñón (Guatemala), piñoncillo (México), piñol (Perú), piñón (Honduras y Nicaragua) (Heller 1996) y piñón botija (Cuba) (Bisse 1988). A la madurez esta especie alcanza una altura de 2 a 3 m y en condiciones óptimas ha logrado alcanzar hasta los 5 m (Jongschaap *et al.* 2007). Según el manual técnico del CATIE (2003) este árbol alcanza los 20 cm de diámetro a la altura del pecho (dap), presenta ramificación baja, su copa es ancha e irregular, su corteza es verde amarillenta, pálida y casi lisa, delgada y se desprende en tiras horizontales. Sus hojas son simples, alternas, con peciolo de 5-35 cm de largo, lámina acorazonada, de 7-32 cm de diámetro, con 3-5 lóbulos, su borde es liso, el haz es de color verde y el envés un color verde más claro. Tiene flores masculinas y femeninas en la misma planta, algunas hermafroditas, y en algunas ocasiones hay plantas con solo flores femeninas, con pétalos de 6 mm de largo, de color blanquecino. Sus frutos son cápsulas elípticas, tricarpeles de 2,5 a 4 cm de largo, de 3 cm de ancho aproximadamente, un poco carnosas y de color amarillo volviéndose de color café al madurar. Cada fruto presenta de 2-3 semillas de forma oblongo elipsoide, de 2 cm de largo y 1 cm de ancho aproximadamente, pálidas con líneas negras conspicuas. La Figura 1 muestra una descripción morfológica de *J. curcas* (Heller 1996).

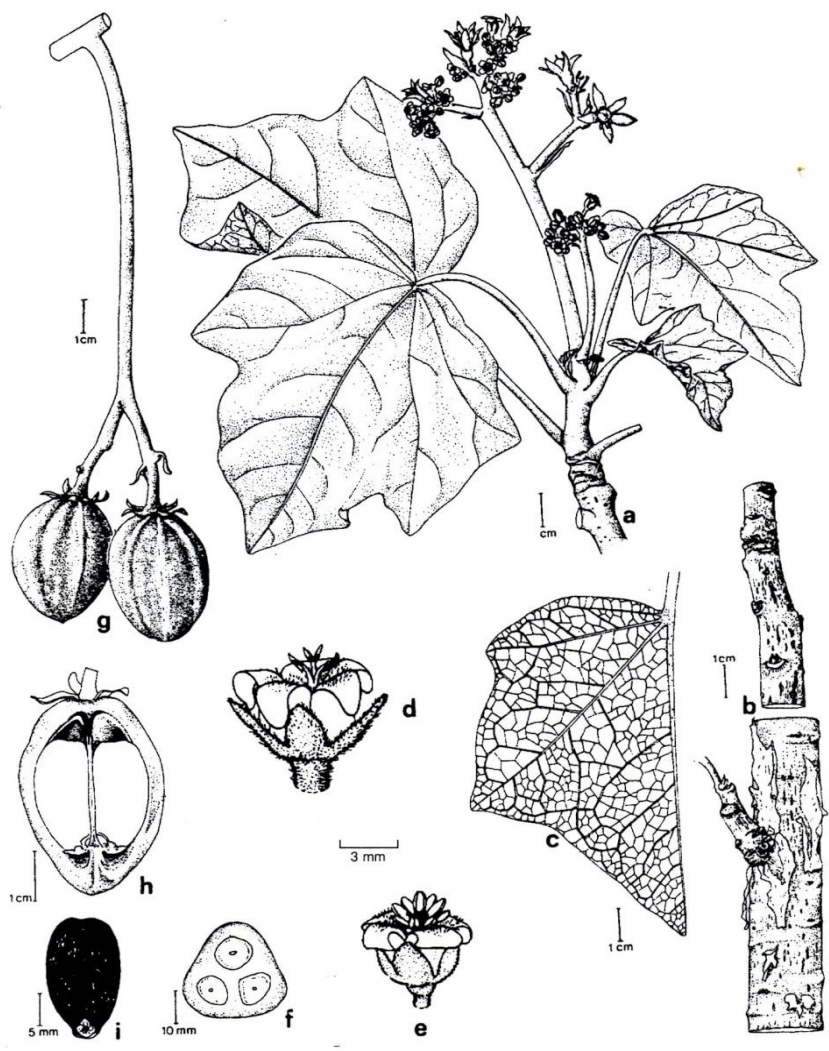


Figura 1. Partes importantes de *J. curcas*: a) ramas florecidas; b) corteza; c) venas de la hoja; d) flor con pistilo; e) flor con estambres; f) corte transversal de un fruto inmaduro; g) frutos; h) corte longitudinal de un fruto; i) semilla. (Heller 1996).

2.2 Importancia de la *Jatropha curcas* L.

La *J. curcas* es una especie perenne multipropósito de rápido crecimiento, con un ciclo productivo comprendido entre 30 – 50 años (Jongschaap *et al.* 2007). El cultivo de *J. curcas* es de gran interés para los sectores públicos y privados, en parte, atribuido a su potencial como materia prima para la producción de biodiesel (King 2009). La relevancia económica de esta especie para la producción de biodiesel ha promovido la distribución de germoplasma en el mundo entero; sin embargo, la falta

de conocimiento sobre la genética de la especie y la ausencia de variedades mejoradas limitan el éxito de la especie como un cultivo energético (Sudhakar *et al.* 2011).

2.2.1 Biocombustibles

En los últimos años viene existiendo una preocupación por la seguridad energética y por el cambio climático, observándose numerosos esfuerzos en todo el mundo para enfrentar el suministro de la energía y la conservación del medio ambiente. Por tanto, se ha visto un aumento significativo en la producción de agrocombustibles (Sanhueza 2009; King 2009).

Debido a la disminución en los recursos del petróleo se están estableciendo cultivos de semillas oleaginosas para la producción de biodiesel en todo el mundo. Los principales cultivos para la producción del biocombustible incluyen colza (EEUU), girasol (Italia y el sur de Francia), soja (EEUU y Brasil), aceite de palma (Malasia), semillas de lino (España), semilla de algodón (Grecia) y *Jatropha curcas* (Nicaragua y América del Sur) (Jayasingh 2004).

Actualmente la *J. curcas* es uno de los cultivos más usados como fuente de materia prima para la producción de biodiesel como combustible renovable (Cifuentes y Fallot 2009; Verma y Gaur 2009; Fairless 2007). Por lo tanto, se ha despertado gran interés por el desarrollo de proyectos en países tropicales y subtropicales debido a la adaptabilidad de esta especie en terrenos marginales y semi áridos (King 2009; Sujatha *et al.* 2005).

Según Parsons (2005) el rendimiento en la producción de semillas de *J. curcas* puede llegar hasta 8 toneladas de semilla por hectárea. Las semillas contienen entre 35 a 38% de aceite (Toral *et al.* 2008) con un alto valor de cetano que puede ser utilizado directamente en motores diesel como un diluyente (Datta 2007).

2.2.2 Medicina

Las plantas medicinales se han utilizado como una fuente de medicamentos para tratar enfermedades desde tiempos inmemoriales. Durante mucho tiempo, las plantas han proporcionado una fuente de nuevas medicinas y compuestos de drogas, como los medicamentos derivados de plantas han hecho grandes contribuciones a la salud humana. Su función es relevante en el desarrollo de nuevos fármacos y puede llegar a ser la base en el desarrollo de la medicina para el tratamiento de enfermedades (Prasad *et al.* 2012).

Las plantas medicinales como *J. curcas* han desempeñado un papel importante en el tratamiento de diversas enfermedades, como infecciones bacterianas y fúngicas (Prasad *et al.* 2012). Todas las partes de *J. curcas* (hojas, cortezas del tallo, semillas, etc.) han sido utilizadas en la medicina tradicional y para fines veterinarios por mucho tiempo (Dalziel 1995). Debido a sus propiedades medicinales se han realizado muchos estudios dirigidos a conocer la composición química de cada una de las partes de esta planta. Se han identificado flavonoides, diterpenos, esteroides, triterpenos, cumarinas, saponinas, deoxipreusomerinas, ácidos orgánicos, iridoides, saponinas, taninos entre otros (Pabón y Hernandez 2012; Prasad *et al.* 2012). En el Cuadro 1 se muestra los compuestos químicos aislados en cada una de las estructuras de esta planta.

Cuadro 1. Productos químicos aislados de diferentes partes de la planta.

Partes	Composición química	Referencias
Hoja	Flavonoides, apigenina, isovitexin, estigmasterol esterol, β -D-sitosterol, β -D-glucósido, saponinas, alcaloides, alcohol triterpene y 1-triacontanol Contiene un dimero de alcohol tripene Un complejo de 5-hidroxi pyrrolidin-2-ona y pirimidina 2,4-diona	Chhabra <i>et al.</i> (1990) Neuwinger (1994) Staubmann <i>et al.</i> (1999 ^a)
Corteza del tallo	Saponinas, esteroides, taninos, glocósidos, alcaloides y flavoides	Igbinosa <i>et al.</i> (2009)
Látex	Curcacycline A (un octapéptido cíclico) Curcacycline B (un nonapéptido cíclico) Taninos, saponinos, cera y resina	Van den Berg <i>et al.</i> (1995) Catherine <i>et al.</i> (1997) Perry <i>et al.</i> (1980)
Semillas	Cursina (una lectina) Esteres de forbol Esterasas (JEA and (JEB) y lipasa (JL)	Stirpe <i>et al.</i> (1976) Adolf <i>et al.</i> (1984) Staubmann <i>et al.</i> (1999 ^b)
Raíces	Esteroides, alcaloides y saponinas	Aiyelaagbe <i>et al.</i> (2007)

Fuente: Prasad *et al.* (2012)

Según Thomas (1989) y Heller (1996) la *J. curcas* tiene usos medicinales, la ingestión de 2 a 3 semillas actúa como un purgante fuerte, su sabor es como el del maní por ello se recomienda que los niños no las consuman, ya que se han tenido consecuencias fatales. El aceite extraído de las semillas se usa como curativo para enfermedades de la piel y aliviar dolores, uno de ellos acusado por el reumatismo. El látex es usado como antibiótico contra algunas bacterias, y también tiene efectos coagulantes, aplicándose directamente en la herida como antiséptico, al igual que para quemaduras e infecciones de la piel. Con las semillas, hojas y la corteza se hacen varios preparados para usarse en la medicina tradicional o como medicamento veterinario, ya que tiene efectos diuréticos, contra estreñimiento, dolores reumáticos

y fiebre. Según Prasad *et al.* (2012) la *J. curcas* es una planta muy versátil en la medicina tradicional, con muchos usos potenciales que deben de desarrollarse con la ciencia moderna y el enfoque de la tecnología promoviendo la capacidad para curar enfermedades. Este autor hace un resumen de los usos medicinales de diferentes partes de la planta de *J. curcas* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Usos medicinales de diferentes partes de la planta *J. curcas*.

Parte de la planta	Indicaciones terapéuticas	Forma del remedio	Referencias
Hojas	Tratamiento de la hemorragia vaginal	Preparar una infusión	Singh <i>et al.</i> (1984)
	Cicatrización de heridas	Se aplican a las heridas	Staubmann <i>et al.</i> (1999b)
	Fiebre	Decocción se utiliza interna y externamente	Staubmann <i>et al.</i> (1999b)
	Reumatismo	Decocción es aplicada externamente	Staubmann <i>et al.</i> (1999b)
	Leucemia linfocítica	Extracto etanólico hojas y ramitas sin grasa	Thomas (1989)
	Actividad antiparasitaria	Savia	Hufford and Oguntimein (1978)
	Malaria	Aplicación	Henning (1997)
Ramas	Infeción bucal	Aplicación	Irvine (1961), Oliver (1986)
	Promover la lactancia	Macerar y aplicar a la mama	Parveen <i>et al.</i> (2007)
	Flemones y fortalecimiento de encías	Utiliza como cepillo de dientes	Parveen <i>et al.</i> (2007)
Látex	Fuertes agentes antimicrobianos	Extracto	Igbinosa <i>et al.</i> (2009)
	Actividades antimicrobianas	Metabolitos secundarios	Igbinosa <i>et al.</i> (2009)
	Sangrado de encías, dolor de muela	Enjuague bucal	Fazwishni and Kristiani (2007); Perry <i>et al.</i> (1980)
Frutos y semillas	Cicatrización de heridas	Aplicación	Nath and Dutta (1991)
	Infeción bucal	Aplicación	Schmook and Serralta (1997)
	Anti inflamatorio	Masajear en zona traumática	De Feo (1989)
	La artritis, la gota y la ictericia	Aplicación de las semillas	Khafagy <i>et al.</i> (1977)
Raíces	Quemaduras, inflamaciones, fiebre y convulsión	Aplicación de las semillas	Mujumdar <i>et al.</i> (2000)
	Eczema, reumatismo, acción como purgante	Aplicación del aceite	Heller (1996)
	Ciática, hidropesía y parálisis	Aplicación del aceite	Mujumdar <i>et al.</i> (2000)
	Anticonceptivo	Aplicación del aceite	List and Horhammer (1979)
Raíces	Enfermedades de transmisión sexual	Decocción	Aiyelaagbe <i>et al.</i> (2007)
	Inflamación	Extracto	Aiyelaagbe <i>et al.</i> (2001)
		Acetato de etilo y metanol	Aiyelaagbe <i>et al.</i> (2007)
		Se macera y se aplica	Joshi (1995)

Fuente: Prasad *et al.* (2012)

2.2.3 Uso en la agroforestería

La agroforestería es una forma de uso de la tierra, donde leñosas perennes y cultivos agrícolas y/o animales interactúan biológicamente con el objetivo de maximizar la producción en un área determinada para satisfacer necesidades del administrador de la finca (Montagnini 1992; Somarriba 1992). Las especies perennes por tener un sistema de raíces profundas almacenan más carbono, mantienen una mejor calidad del suelo, del recurso hídrico y se administra de forma más conservadora los nutrientes (Cox *et al.* 2006).

En particular la *J. curcas* es una especie perenne de gran potencial para su establecimiento en áreas deforestadas, suelos marginales y agotados. Esta especie se puede establecer en asocio con cultivos anuales, bianuales y en pasturas siendo ecológicamente viable, económicamente rentable y de una excelente aceptación por la comunidad (Quimbayo *et al.* 2010). Esta especie se cultiva en los trópicos como setos y cercas vivas con el fin de brindarle protección a los cultivos, también es ampliamente utilizada como ornamental y como soporte de plantas escandentes (CATIE 2003). Además, la principal característica radica en que sus semillas son tóxicas debido a su contenido de formol ésteres y curricina (King 2009) y por lo tanto, no compite con cultivos de alimentación humana y animal (Toral *et al.* 2008), además de que su precio no está influenciado por la competencia para su uso alimenticio (Quimbayo 2010).

Sánchez (2008) menciona que en la zona norte del estado de Veracruz, México la *J. curcas* se encuentra establecida en cercos vivos, también dentro de huertos caseros en asocio con plantas de café, cacao, vainilla, entre otras.

En Cuba los agricultores han utilizado la *J. curcas* y otras especies como cercas vivas, como linderos para protección de espacios cultivados y/o con ganado, ya que actúan minimizando el impacto del viento (Sordo 2007). La *J. curcas* cuando se establece en cercas vivas requiere poco manejo durante su crecimiento, solo se realizan actividades de control de plagas durante su establecimiento (Toral *et al.* 2008).

En Perú esta especie se establece en sistemas integrados con cultivos anuales (maní, frijol, maíz, yuca, culantro y piña) y especies forestales nativas. Se observó que los cultivos anuales mejoraron el balance económico para los agricultores, al igual que las especies forestales prometen en el futuro un ingreso significativo. El cultivo de *J. curcas* después del primer año tuvo una producción de 50 kilogramos de semilla seca por hectárea, siendo un nivel bajo de producción. Esto resalta la importancia de aplicar cultivos asociados para el caso de pequeños agricultores con la

finalidad de diversificar los ingresos y mitigar los costos de establecimiento del cultivo de *J. curcas* (Veen 2011).

2.3 Mejoramiento genético

El mejoramiento genético de especies arbóreas está definido como un proceso de identificación y desarrollo de poblaciones genéticamente superiores, y el uso de estas especies como fuente de semilla o material vegetativo para establecer cultivos mejorados (Jara 1998). Teniendo en cuenta el gran interés por el establecimiento de cultivos a gran escala de *J. curcas*, el material genético no ha sido bien caracterizado y conservado, existiendo pocos cultivos con plantas de buenas características genéticas (King 2009).

Las especies del género *Jatropha* son de polinización cruzada, y por lo tanto presentan una alta variabilidad genética, permitiendo tener más posibilidad para analizar y seleccionar características deseables en el cultivo. Debido a esta variabilidad es muy importante en un programa de mejoramiento genético conocer y documentar esa variabilidad genética existente dentro de las poblaciones y entre ellas (Basha y Sujatha 2007).

La limitada información generada en materia de mejora genética de la *J. curcas* ha permitido identificar una serie de características consideradas como relevantes a ser estudiadas para el mejoramiento genético y la explotación comercial del cultivo. Entre estas características destacan el rendimiento de las semillas, el contenido de aceite, la tasa de floración masculina *vs* femenina, el incremento de la ramificación, la floración temprana, la sincronización de la maduración y la adaptación al estrés biótico y abiótico. Por lo tanto, genotipos con rendimientos consistentes, mejores prácticas agrícolas y la disponibilidad de clones uniformes en grandes cantidades podrían asegurar el éxito de la plantación de esta especie a gran escala (Sudhakar *et al.* 2011).

En este sentido, Muñoz (2009), estudió las características morfométricas de cuatro ecotipos de *J. curcas* de Santa Elena, Manabí, Imbabura y Loja en Ecuador, asociado a un sistema agroforestal con *Tectona grandis*. Las variables evaluadas fueron altura, diámetro de tallo, número de hojas y supervivencia. Los ecotipos que presentaron mayor altura después de siete meses fueron el de Manabí y Loja, las variables diámetro y número de hojas presentaron respuestas similares en los cuatro ecotipos. El asocio de *T. grandis* con *J. curcas*, influyó negativamente en el desarrollo morfológico debido a la opacidad proyectada por *T. grandis*. Además Salinas *et al.* (2011) caracterizaron y estudiaron la diversidad genética de 18

poblaciones de *J. curcas* en la Provincia de Manabí utilizando marcadores moleculares ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats), encontrando que si existía variabilidad genética considerable en la muestra analizada. Lo que indica que la especie *J. curcas* constituye una fuente potencial de genes para planes de mejoramiento, o también para buscar alelos relacionados con características agronómicas deseables.

Machado y Suárez (2009) evaluaron en Cuba tres procedencias (Cabo verde, Las Tunas y Spiritus) de *J. curcas*, en suelo ferralítico rojo lixiviado, en fase de vivero, establecimiento y cosecha. Las variables evaluadas fueron altura de plántulas, diámetro de tallo y número de hojas, siendo estadísticamente superior el material procedente de Cabo verde. Pero en la producción de frutos con tres semillas no presentaron diferencias significativas, indicando que las tres procedencias alcanzaron más del 70%.

Pedraza y Cayón (2010), estudiaron la caracterización morfofisiológica de *J. curcas* variedad Brasil, cultivada en el departamento de Santander y Vichada en Colombia. Las variables evaluadas fueron altura, número de tallos, área foliar, peso foliar específico, porcentaje y perfil de ácidos grasos. Los resultados observados en las dos zonas evaluadas no presentan diferencias significativas.

Con las diferentes técnicas de mejoramiento genético, el desarrollo de sistemas de producción, la introducción de material genético de otros países y el uso de métodos biotecnológicos han permitido incrementar la producción del grano desde 4000 – 9000 kg/ha y de aceite desde 1500 a 3500 kg/ha lo que hace que la especie *J. curcas* tenga un gran potencial de producción (Embrapa Agroenergía 2012).

2.4 Propagación del cultivo

2.4.1 Propagación sexual

Para la reproducción sexual es necesario la existencia del sexo masculino y femenino, que a través del proceso de polinización y su posterior fecundación se forma la semilla, que dará origen a una nueva planta. Este método solo se da por medio de semillas (Irigoyen y Cruz 2005).

La *J. curcas* es una especie generalmente propagada por semilla; durante la época seca se observan dos picos de floración, pero en las regiones húmedas se presenta durante todo el año, y las semillas se maduran después de los tres meses de floración (Joker y Jepsen 2003). Heller (1996) menciona que la semilla cuando está

recién colectada presenta un porcentaje de germinación cerca del 80% e inicia su germinación 10 días después de su siembra. Los tratamientos pregerminativos que se han utilizado en las semillas consistieron en la remoción parcial de la testa y el remojo durante 24 horas.

La siembra de la semilla se puede hacer en camas de arena o directamente en la bolsa con sustrato franco a franco arenoso, mezclado con abono orgánico. Las plántulas deben permanecer en la cama de arena o en las bolsas durante 3 meses hasta que alcancen una altura de 30 a 40 cm (Joker y Jepsen 2003).

2.4.2 Propagación vegetativa

También llamada propagación asexual, se da por la fragmentación de la planta madre, donde las plantas hijas son idénticas a la madre, ya que no existe intercambio genético. Una forma sencilla de propagación consiste en la partición de secciones del tallo, que una vez en contacto con el suelo consiguen enraizar. Las formas más utilizadas en este método de propagación son por medio de estacas y esquejes, injertos o propagación de copas, usando acodos, raíces y por el cultivo de tejidos (Irigoyen y Cruz 2005). En este proceso se involucra solamente las divisiones mitóticas de las células, reproduciendo toda la información genética del organismo original (Mesén 1997).

La información obtenida en *J. curcas* sobre el uso de la propagación vegetativa es confusa y no aporta datos convincentes sobre la eficiencia del uso de esta vía con respecto al uso de plántulas de semilla. Por ejemplo; Mukherjee *et al.* (2011) mencionan que las plantas de *J. curcas* propagadas por esquejes presentan una baja longevidad y son más susceptibles a enfermedades y a las sequías que los árboles propagados por semilla. También, se ha reportado que plantas propagadas vegetativamente presentan una reducción en la producción de semillas. En tanto, Joker y Jepsen (2003) mencionan que este método de propagación depende de la finalidad que tenga la plantación. La siembra se debe hacer en áreas con buena humedad, después del inicio del periodo de lluvia. Para lograr un buen establecimiento de setos y plantaciones para el control de la erosión, se recomienda la siembra directa de esquejes. Los esquejes de 30 cm de longitud son los de mayor índice de supervivencia. Además, las plantas que son propagadas por este sistema, muestran un crecimiento rápido y normalmente la producción de semillas inicia en el primer año de su establecimiento.

2.4.3 Micropropagación de la especie

El cultivo de tejidos consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por segmentos de un tejido u órgano que se extrae de la planta. En el mismo sentido, la micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva *in vitro*. Actualmente, la micropropagación se practica con éxito en especies hortícolas, ornamentales y más recientemente en especies leñosas. Esta metodología de multiplicación se ha utilizado en varias especies mostrando importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación; las más importantes son (CIAT 1991):

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajo costo y en tiempos económicamente costeables.
- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos.

Estos autores sugieren tres pasos fundamentales para micropropagar eficientemente una especie: el establecimiento aséptico del cultivo, su multiplicación y el enraizamiento seguido de la preparación del inóculo para su trasplante al suelo.

Las técnicas de cultivo de tejidos y biología molecular son herramientas poderosas de la biotecnología que pueden complementar el mejoramiento genético convencional, contribuyendo a acelerar la mejora de los cultivos y responder a la demanda por disponibilidad de clones uniformes en grandes cantidades. El cultivo *in vitro* de meristemos, ápices y yemas axilares estimula el desarrollo de las yemas existentes permitiendo la formación de una planta por cada yema presente (CIAT 1991). Sin embargo, el cultivo *in vitro* puede explotar la flexibilidad de las células vegetales y dependiendo de la competencia propia o inducida de las mismas células se puede dar la regeneración directa o indirecta (Mukherjee *et al.* 2011). Los métodos de regeneración directa consisten en la formación de órganos, es decir, brotes y raíces (organogénesis); o bien, de embriones somáticos o asexuales (embriogénesis somática) de manera directa sin la formación de callo. Los métodos indirectos de regeneración a partir de organogénesis o de embriogénesis somática son mediados por la formación previa de callo. La regeneración de plantas directamente de los explantes o a partir de callo por medio de la organogénesis o embriogénesis somática es utilizada como una alternativa en los métodos de propagación (CIAT 1991).

En *J. curcas* varios autores han hecho una revisión exhaustiva de los métodos usados para la propagación *in vitro* utilizando ápices, yemas axilares, hojas cotiledonares y hojas verdaderas, segmentos de hipocotilo y epicótilo, así como embriones cigóticos maduros e inmaduros (Mukherjee *et al.* 2011). El Cuadro 3 muestra esta información.

Cuadro 3. Estudios sobre el cultivo de tejidos de *Jatropha curcas* L.

Tipo de explante	Modo de regeneración	PGRs + medio	Referencias
Yemas axilares	Organogénesis directa	BA; Kn + IBA + sulfato de adenina	Datta <i>et al.</i> (2007)
Yema axilar y segmento de hoja	Multiplicación adventicia de brotes por regeneración directa	TDZ, BA, IBA	Sujatha <i>et al.</i> (2005)
Hipocotilo, peciolo y segmento de hoja	Regeneración vía brotación adventicia, enraizamiento <i>in vitro</i>	BA + IBA	Sujatha y Mukta (1996)
Ápices	Organogénesis, enraizamiento de brotes <i>in vitro</i>	BAP, AIA, Sulfato de adenina, Glutamina	Rajore y Batra (2005)
Peciolo	Inducción directa de brotes	TDZ, Kn, BAP, ANA	Kumar y Reddy (2010)
Segmento de hoja	Brotación adventicia	TDZ, BAP, IBA	Deore y Johnson (2008)
Yemas axilares	Regeneración directa de brotes	BA, IBA + Sulfato de adenina + Glutamina + Acido cítrico	Shrivastava y Banerjee (2008)
Embrión inmaduro	Organogénesis indirecta (mediante callos)	BA + Kn + IBA + PVP + acido cítrico	Varshney y Johnson (2010)
Hoja cotiledonar	Regeneración directa de brotes	TDZ, Kn, BAP, ANA	Kumar <i>et al.</i> (2010a)
Segmentos nodales	Formación múltiple de brotes	BAP, Kn, AIA	Kalimuthu <i>et al.</i> (2007)
Epicótilo	Organogénesis directa y diferenciación de brotes a partir de callo	BA + AIB	Qin <i>et al.</i> (2004)
Ápices	Inducción de brotes con formación de callos en la base	BAP, GA ₃	Purkayastha <i>et al.</i> (2010)
Segmentos foliares	Embriogénesis somática	Kn, AIB, Sulfato de adenina	Jha <i>et al.</i> (2007)
Epicótilo e hipocotilo	Organogénesis directa e indirecta	TDZ, Kn, AIB	Kaewpoo y Techato (2010)
Hojas	Regeneración de embriones somáticos	MS sales y B5 vitaminas + BA + AIA	Sardana <i>et al.</i> (2000)
Hojas e hipocotilo	Callos y suspensión de cultivo	2,4-D + 2% leche de coco	Soomro y Memon (2007)
Yema axilar	Inducción a la brotación múltiple	BAP + AIB	Thepsamran <i>et al.</i> (2007)

Fuente: Elaboración propia en base a las referencias citadas.

De igual forma el Cuadro 4 muestra un resumen según Samson *et al.* (2011) donde incluye datos de duración del cultivo, porcentaje de regeneración, número de brotes y las respectivas referencias.

Cuadro 4. Tiempo de cultivo, porcentaje de éxito y número de brotes por explante durante la regeneración de *J. curcas* a partir de diferentes tipos de órganos.

Tipo de explante	Técnica <i>in vitro</i>	Duración (semanas)	Regeneración (%)	N° de brotes	Referencias
Ápices	Multiplicación conforme	2-3	100	6,2	Purkayasthe <i>et al.</i> 2010
Yemas axilares	Multiplicación conforme	4-8	95-100	30,0	Datta <i>et al.</i> 2007
Hipocotilo	Regeneración	4-6	67	-	Sujatha y Reddy 2000
Epicótilo	Regeneración	2-4	38	-	Qin <i>et al.</i> 2004
Peciolo	Regeneración	4-6	50	-	Sujatha y Reddy 2000
Hojas	Regeneración	4-8	60-90	18,8	Khurana-Kaul <i>et al.</i> 2010 y Sujatha y Reddy 2000
Cotiledón	Embriogénesis somática	6-8	50-93	26,2	Kumar <i>et al.</i> 2010b

Fuente: Elaboración propia en base a las referencias citadas.

Aunque existen muchos resultados sobre la micropropagación de *J. curcas* y la producción de brotes a partir del cultivo de ápices, yemas axilares y a través de la regeneración directa o indirecta de brotes, la literatura muestra pocas evidencias sobre condiciones de cultivo repetibles para el buen desarrollo y enraizamiento de los brotes. Además, la información referente a la recuperación de plantas durante la aclimatación es escasa. Por lo tanto, esta investigación será basada en mejorar las condiciones de cultivo que favorezcan el desarrollo longitudinal de los brotes producidos a partir de la organogénesis indirecta de fragmentos de hojas y de yemas axilares preexistentes de *J. curcas*. Asimismo, se profundizará en el estudio de las condiciones de cultivo que permitan favorecer la inducción y desarrollo de raíces y la sobrevivencia de las plantas durante la aclimatación.

2.5 Conservación de germoplasma

Las estrategias de conservación de germoplasma son de gran importancia en los programas de mejoramiento genético y gestión de las especies de interés económico, social y ambiental. Existen diferentes formas de conservación: 1. La conservación *in situ* en la cual la especie de interés se conserva en su sitio de origen (Maxted *et al.* 1997); esta forma de conservación mantiene las combinaciones genéticas específicas y una continua evolución, por lo que permite conservar la especie, su entorno y las interacciones entre ellas (Baena 2003). 2. La conservación *ex situ* que consiste en la conservación de muestras genéticamente representativas de las especies o cultivos, que se mantienen viables a través del tiempo, fuera de su hábitat natural o lugar de cultivo, en ambientes controlados y con el apoyo de tecnologías adecuadas (Frankel y Solulé 1992). Esta otra forma de conservación permite el almacenamiento de germoplasma utilizando varias estrategias como bancos de semillas, bancos genéticos *in vitro*, colecciones de campo y jardines botánicos (Carneiro 2000). Ambas estrategias permiten favorecer la conservación de especies vulnerables a procesos de erosión genética (Carneiro 2000).

La información existente sobre la conservación de *J. curcas* es muy escasa y es limitada al tratamiento de semillas. Algunos autores mencionan que las semillas en almacenamiento pierden el 50% de su viabilidad después de 15 meses (Joker y Jepsen 2003). Otros indican que las semillas de *J. curcas* se pueden almacenar durante un año con un contenido de humedad entre el 5 y 7% (Toral *et al.* 2008). En tanto que Verma y Gaur (2009) dicen que las semillas de *J. curcas* son ortodoxas y pueden secarse y almacenarse en condiciones de baja humedad, se contradicen al mencionar que debido al alto contenido de aceite no puede esperarse su almacenamiento por largos periodos de tiempo. Lo anterior hace suponer que posiblemente las semillas de esta especie más bien presentan una condición de recalcitrancia intermedia.

2.5.1 Conservación *in vitro*

La conservación utilizando métodos *in vitro* se logra haciendo cambios en el ambiente de cultivo para desacelerar o suprimir parcial o totalmente el crecimiento de las células y de los tejidos. Existen dos sistemas básicos de conservación *in vitro*:

1. La conservación a corto o mediano plazo que tiene por objetivo aumentar al máximo el periodo de transferencia del cultivo mediante la limitación del crecimiento hasta tasas mínimas. Esta forma de conservación se logra mediante la reducción de la temperatura de cultivo, o manipulando las concentraciones de nutrimentos, reguladores del crecimiento y el uso de sustancias osmóticamente activas (CIAT 1991).

2. La conservación a largo plazo o criopreservación que consiste en la preservación del material biológico mediante la inmersión en nitrógeno líquido a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, o en forma de vapor alrededor de $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cuando el material biológico es sometido a estas bajas temperaturas, las células se congelan y se mantienen en un estado de latencia. Los procesos metabólicos cesan y el material puede permanecer almacenado indefinidamente sin cambios en su estructura (Engelmann 1991; Abdelnour 1999). En general, el material vegetal que se usa para la criopreservación a temperaturas ultrabajas son los ápices caulinares, meristemos, anteras, embriones, protoplastos, callos y suspensiones celulares (CIAT 1991).

Engelmann (1991) indica el uso de tres técnicas de criopreservación: 1. *El encapsulamiento/deshidratación*, en la cual el explante es cultivado en un gel de alginato de calcio durante varios días usando medios con alta concentración de sacarosa, desecando parcialmente bajo flujo laminar o silica gel, seguido de la congelación lenta o rápida del explante encapsulado. 2. *La vitrificación* es una técnica que se ha desarrollado recientemente usando suspensiones celulares, protoplastos, embriones somáticos y meristemos de varias especies. En el proceso de vitrificación el material se congela muy rápido con el fin de que el agua se vitrifique, siendo necesario realizar un pretratamiento en un medio altamente concentrado para garantizar la crioprotección del explante. Este mismo autor menciona una tercera técnica que consiste en la congelación de suspensiones celulares y embriones somáticos utilizando un congelador comercial. Las muestras son sometidas a un pretratamiento utilizando altas concentraciones de sacarosa, posteriormente son almacenadas en un congelador comercial a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, seguido de la inmersión en nitrógeno líquido. Esta técnica de criopreservación fue desarrollada con material de café, obteniendo como respuesta una viabilidad del 50%.

La literatura registra sólo dos trabajos relacionados a la criopreservación de semillas de *J. curcas*; en uno de ellos se logró el 63,2% de germinación cuando las semillas fueron congeladas directamente en nitrógeno líquido y nitrógeno en forma de vapor durante diferentes periodos de tiempo (Goldfarb *et al.* 2010); en el otro se obtuvo un 78,6% de germinación cuando las semillas fueron congeladas a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Silva *et al.* 2011)

Teniendo en cuenta que las semillas de *J. curcas* no pueden ser almacenadas en bancos de semilla por más de un año debido a la pérdida de su viabilidad, se propone en esta investigación el uso de la criopreservación como una técnica de gran potencial para la conservación a largo plazo de esta especie utilizando las semillas y otros propágulos para el desarrollo experimental.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización del estudio

La presente investigación se realizó en los Laboratorios de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Turrialba, Costa Rica. Este trabajo de investigación se desarrolló de enero a diciembre del 2012.

3.2 Material vegetal

El material vegetal de *J. curcas* que se utilizó para la experimentación tiene diferentes fuentes: Plántulas germinadas *in vitro* provenientes de semillas del Banco de Semillas Forestales del CATIE (BSF-CATIE) y segmentos de hojas tomadas de plantas madre de dos procedencias establecidas en el invernadero: la variedad tóxica catalogada como Nicaragua 196/07A por el BSF-CATIE y una variedad de baja toxicidad procedente de la comunidad de Papantla en Veracruz, México. Igualmente se utilizaron semillas procedentes de fuentes semilleras ubicadas en Buenos Aires de Osa en Puntarenas, Costa Rica, aportadas por el BSF-CATIE para los experimentos de crioconservación.

3.3 Manejo de las plantas madre de *J. curcas*

El material vegetal ya establecido en invernadero fue tratado con fertilización granular (10 – 30 - 10) a razón de 20 gramos por planta, cada 4 meses y con la aplicación de Bayfolán® y Nitrofoska® como fertilizante foliar en dosis de 2,5 ml/l cada dos semanas. Para el control fitosanitario se utilizó Benlate® y Agrimicin® como fungicidas sistémicos y Manzate® como fungicida de contacto en dosis de 3,0 g/l con aplicaciones cada 3 meses. Estos tratamientos fueron aplicados de manera alterna. También se realizó un control de podas durante cada ciclo de introducción *in vitro* de explantes. El riego de las plantas se hizo manualmente dos días por semana.

3.4 Establecimiento de cultivos *in vitro*

3.4.1 Inducción de brotes axilares a partir plántulas *in vitro*

3.4.1.1 Tipo de explante

Como explantes se utilizó segmentos de nudo cotiledonar de 1,5 cm de longitud que fueron aislados de plántulas de 4 semanas de edad obtenidas por la germinación de semillas *in vitro*. Para esto, las semillas se escarificaron manualmente y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 100% (v/v – 3,5%) durante 30 minutos, seguido de 3 enjuagues con agua estéril. Luego, las semillas se cultivaron en tubos de vidrio de 2,5 x 15 cm, con un contenido de 10 ml del medio de cultivo de Murashige y Skoog – MS (1962), suplementado con 30 g de sacarosa, el pH se ajustó a 5,7 y el medio fue solidificado con 7,0 g de agar antes de la esterilización en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. El cultivo se realizó dos semanas en oscuridad y dos semanas con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, con una temperatura de 27±2 °C.

3.4.1.2 Inducción de brotes

Los segmentos nodales fueron colocados verticalmente en un medio de cultivo MS al 100% de su composición básica, suplementado con 3% de sacarosa. Para determinar la capacidad de producción de brotes se usó como regulador del crecimiento la 6- Bencil aminopurina (BAP) en concentraciones de 0,25 y 0,50 mg/l. Se utilizó 30 repeticiones por tratamiento y un frasco “Gerber” con una microestaca como unidad experimental. Los cultivos fueron llevados a un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y una temperatura de 27 ±2 °C durante 4 semanas.

3.4.1.3 Desarrollo de brotes

Los brotes de mayor longitud (>5 mm) fueron aislados y cultivados en diferentes medios de cultivo para estimular su desarrollo. Se evaluó el efecto de dos medios de cultivo el MS y el Woody Plant Medium-WPM (Lloyd y Mccown 1980) en una concentración del 100% de su formulación en sales minerales, vitaminas y hierro. Estos medios fueron suplementados con, caseína hidrolizada (100 – 200 mg/l), y glutamina (150 mg/l), dos fuentes de nitrógeno reducido importantes en el desarrollo de los brotes. Los experimentos se evaluaron con un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x2 bajo modelos lineales generales y mixtos. Consistió en 38 repeticiones por tratamiento. Los cultivos permanecieron bajo un fotoperiodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad y una temperatura de 27±2 °C.

3.4.1.4 Enraizamiento

La inducción de raíces de los brotes se realizó durante 96 horas en el medio MS (50%) líquido y sacarosa al 3%, en cuatro tratamientos: 1) 3,0 y 5,0 mg/l de ácido indolacético (AIB) por separado; 2) 3,0 y 5,0 mg/l de AIB en combinación de 1,0 mg/l de AIA y 3,5 mg/l de ácido naftalenacético (ANA). Posterior a la inducción, los brotes fueron transferidos a un medio semisólido para la expresión de raíces (MS 50%, sacarosa 3%, y 0,25 g/l de carbón activado) durante 4 semanas. Cada tratamiento consistió en 12 repeticiones.

Con el fin de mejorar la regeneración de raíces se cultivaron los brotes durante 42 horas en un medio líquido de inducción constituido del medio MS al 50% en dos tratamientos: 1) 3,0 mg/l de AIB sola; 2) 3,0 mg/l de AIB en combinación de 1,0 mg/l de AIA y 3,5 mg/l de ANA. Posterior al cultivo de los brotes en un medio de inducción, estos son transferidos a un medio semisólido para la regeneración de las raíces (MS 50% semisólido, 3% sacarosa, y 0,25 g/l de carbón activado) durante 4 semanas. Cada tratamiento consistió en 7 repeticiones.

3.4.1.5 Aclimatación

Las plantas con raíces fueron extraídas de los frascos de cultivo, el exceso del medio fue eliminado de las raíces mediante su lavado con agua corriente. Seguidamente las plantas fueron sembradas manualmente en pellets (Jiffy®) con ayuda de una pinza. Las plántulas se colocaron en bandejas bajo un túnel de plástico con riego automático por aspersión, aplicado dos veces al día durante un minuto cada vez para lograr una humedad relativa cercana al 100%.

3.4.2 Inducción de brotes adventicios a partir de hojas

3.4.2.1 Tipo de explante

Como explante se utilizó hojas de *J. curcas* en diferentes estados de madurez tomadas de plantas de 3 años de edad establecidas en el invernadero.

3.4.2.2 Desinfección de explantes

Las hojas fueron desinfectadas mediante un lavado superficial con agua corriente, seguido de una inmersión en hipoclorito de sodio al 25% (v/v – 3,5%) durante 25 minutos. Finalmente se realizó 3 enjuagues con agua estéril en la campana de flujo laminar. Los bordes de las hojas se eliminaron con un bisturí y segmentos de hoja de 1 cm² fueron cultivados con el envés hacia el medio de cultivo.

3.4.2.3 Inducción de callo organogénico

La inducción de callo organogénico se realizó utilizando como base las condiciones de cultivo definidas por Tejedor (2010). Se usó el medio MS 100%, suplementado con 2,0 mg/l de BAP, 1,0 mg/l de AIB, 3% de sacarosa y 7,0 g de agar como gelificante; el pH se ajustó a 5,7.

Para determinar la capacidad de inducción de callo organogénico se utilizaron dos variedades, una tóxica (T) y otra de baja toxicidad designada como no tóxica (NT); dos tipos de hojas, semimaduras (SM) y juvenil (J). Este experimento se analizó con modelos lineales mixtos para determinar que la variable de respuesta es una variable binomial. Los cultivos permanecieron en un cuarto de crecimiento con una temperatura de 27 ± 2 °C en la oscuridad, durante 4 a 6 semanas hasta la formación de callos con presencia de meristemoides y algunos brotes.

Con el fin de optimizar el proceso de inducción de callo organogénico se evaluó dos concentraciones de BAP (2,0 – 5,0 mg/l) en combinación de tres concentraciones de AIB (0,0 – 0,5 – 1,0 mg/l) en hojas SM y J de la variedad tóxica. Se utilizó 70 repeticiones por tratamiento y se estableció un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x2.

En otro experimento se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de BAP y Kinetina (2,0 – 5,0 – 7,0 y 10,0 mg/l) utilizadas cada una por separado y en combinación del AIB en dos concentraciones (0,0 – 0,5 y 1,0 mg/l) sobre la inducción de callo organogénico en hojas semimaduras (SM) de la variedad tóxica. El experimento consistió de 20 repeticiones por cada tratamiento y se estableció un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x4 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de diferentes concentraciones de BAP y Kinetina en combinación del AIB sobre la inducción de callo organogénico en hojas semimaduras de *J. curcas*.

BAP(mg/l)	AIB (mg/l)		
	0.0	0.5	1.0
2,0	20 Rep.	20 Rep.	20 Rep.
5,0	20 Rep.	20 Rep.	20 Rep.
7,0	20 Rep.	20 Rep.	20 Rep.
10,0	20 Rep.	20 Rep.	20 Rep.
Kinetina(mg/l)			
2,0	20 Rep.	20 Rep.	20 Rep.
5,0	20 Rep.	20 Rep.	20 Rep.
7,0	20 Rep.	20 Rep.	20 Rep.
10,0	20 Rep.	20 Rep.	20 Rep.

3.4.2.4 Regeneración de brotes

Para determinar la capacidad de regeneración de brotes adventicios de *J. curcas* se utilizaron los callos organogénicos provenientes de la fase de inducción. Estos callos fueron subcultivados en el medio de regeneración establecido por Tejedor (2010) y constituido de un MS (100 %) suplementado con 2,0 mg/l de BAP y 0,5 mg/l de AIB, 3% de sacarosa y como agente gelificante se utilizó 7,0 g de agar. El pH fue ajustado a 5,7. Se evaluó el potencial de regeneración de brotes de las hojas juveniles (J) y semimaduras (SM) de las variedades tóxica (T) y de baja toxicidad (NT) de *J. curcas*. Se realizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x2.

3.4.2.5 Desarrollo de brotes

Los mejores brotes que resultaron de los callos de hojas semimaduras de la variedad tóxica fueron inoculados en un medio MS 100%, suplementado con BAP (0,25 mg/l) y AIA (0,25 mg/l) cada uno por separado en combinación de tres concentraciones (0,0 – 0,25 – 0,5 mg/l) de ácido giberélico (GA3). Se utilizó 3% de sacarosa, 7,0 g de agar y un pH de 5,7. El experimento consistió en 5 repeticiones por tratamiento y se estableció un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2x3

3.4.2.6 Enraizamiento

Los brotes que alcanzaron una longitud mayor a 0,5 cm fueron sometidos a diferentes experimentos de inducción de raíces en los que se utilizó el medio MS al 50% líquido, 3% de sacarosa en dos tratamientos: 1) 3,0 mg/l de AIB sola; 2) 3,0 mg/l de AIB en combinación con 1,0 mg/l de AIA y 3,5 mg/l de ANA durante 42 horas. Posterior a la inmersión de los brotes en el medio de inducción, estos fueron transferidos a un medio semisólido MS 50%, 3% de sacarosa, pH a 5,7 durante 4 semanas. Se establecieron 8 repeticiones por tratamiento.

3.4.2.7 Aclimatación de plantas

Las plantas con raíces fueron extraídas de los frascos de cultivo y se eliminó el exceso de medio de cultivo de las raíces mediante su lavado con agua corriente. Seguidamente las plantas fueron sembradas manualmente en pellets (Jiffy®) con ayuda de una pinza. Las plantas se colocaron en invernadero bajo túnel de plástico con riego automático por aspersión aplicado dos veces al día durante 2 minutos cada vez para lograr una humedad relativa cercana al 100%.

3.5 Crioconservación

La experimentación en crioconservación se realizó utilizando técnicas simplificadas de crioconservación como la desecación y congelación rápida en nitrógeno líquido (-196 °C) de semillas completas y embriones cigóticos aislados y la vitrificación de estos embriones.

3.5.1 Técnica de desecación y congelamiento rápido de semillas

Se utilizaron semillas maduras de *J. curcas* aportadas por el BSF-CATIE. En el laboratorio no se utilizó ningún procedimiento de desecación debido a que estas semillas fueron sometidas previamente a secado al ambiente durante una semana en las instalaciones del BSF-CATIE.

3.5.1.1 Determinación del contenido de humedad (CH) de las semillas

El contenido de humedad de las semillas fue determinado previo a los tratamientos de crioconservación mediante la fórmula siguiente:

$$CHI = \frac{PF - PS}{PF} \times 100$$

El peso fresco (PF) corresponde al peso de las semillas después de la fase de secado al ambiente. El peso seco (PS) corresponde al peso de las semillas después de un periodo de secado en estufa a 170 °C durante 17 horas.

3.5.1.2 Escarificación de las semillas

Las semillas fueron escarificadas manualmente por eliminación de la testa.

3.5.1.3 Congelación rápida en nitrógeno líquido (-196 °C)

Las semillas escarificadas fueron colocadas en criotubos, en tres réplicas de 10 semillas cada una. Posteriormente los criotubos fueron colocados directamente en el tanque de nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C, donde permanecieron 24 horas.

3.5.1.4 Descongelamiento rápido

Los criotubos fueron sacados del nitrógeno líquido y colocados en un baño de María a 40 °C para su descongelamiento.

3.5.1.5 Recuperación

Después del descongelamiento todas las semillas fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 100% (v/v – 3,5%) durante 30 minutos, seguido de tres enjuagues con agua estéril para su posterior siembra. Se evaluó la recuperación del crecimiento en condiciones de germinación *in vitro* y en condiciones de germinación del BSF. En ambos casos se utilizó tres replicas de 10 semillas cada una. Para la germinación *in vitro* de las semillas, estas fueron colocadas en tubos de cultivo conteniendo el medio de germinación de las semillas previamente descrito. Seguidamente, las muestras fueron colocadas en condiciones de oscuridad durante una semana antes de su cultivo en presencia de luz.

La germinación en el BSF consistió en la siembra de las semillas en cajas plásticas con arena las que fueron colocadas en un cuarto de germinación con un fotoperiodo de 24 horas luz, una temperatura de 30 °C y una humedad relativa del 90%, durante dos semanas. Los experimentos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x2.

3.5.2 Desección y congelamiento rápido de embriones cigóticos

3.5.2.1 Desección de los embriones cigóticos

Los embriones cigóticos fueron aislados de las semillas después de su escarificación y desinfección en la cámara de flujo laminar, como fue descrito. Seguidamente los embriones fueron colocados sobre cajas Petri que contenían 10 embriones cada una y colocadas bajo el flujo laminar para evaluar el efecto de tres tiempos de desecación (0, 30 y 60 minutos) sobre la sobrevivencia a la congelación en nitrógeno líquido. Se utilizaron 3 réplicas de 10 ejes por tratamiento.

3.5.2.2 Determinación del contenido de humedad de los embriones cigóticos

El contenido de humedad de los embriones fue determinado antes y después de la desecación según la fórmula siguiente:

$$CHI = \frac{PF - PS}{PF} \times 100$$

El peso fresco (PF) de los embriones fue tomado antes de la desecación en el flujo laminar y el peso seco (PS) después de la desecación.

3.5.2.3. Congelamiento en nitrógeno líquido

Luego de la desecación las muestras de 10 embriones cada una fueron colocadas en criotubos de 2 ml y congeladas rápidamente en nitrógeno líquido (-196 °C). Estas muestras permanecieron 5 días en congelamiento.

3.5.2.4 Descongelación rápida

Después de la congelación los embriones fueron descongelados rápidamente en un baño María a 40 °C.

3.5.2.5 Recuperación del crecimiento

- a) Los embriones descongelados fueron cultivados en un medio semisólido MS (100%) con 3% de sacarosa y 7,0 g de agar. Los cultivos fueron colocados en un cuarto oscuro durante dos semanas y posteriormente pasados a un cuarto con un fotoperiodo de 12 horas luz 12 horas oscuridad y temperatura de 27 ± 2 °C durante dos semanas.
- b) En este experimento se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x2.

3.5.3 Técnica de Vitricación de embriones cigóticos

3.5.3.1 Precultivo

Los embriones fueron cultivados durante 15 días en el medio de germinación (semisólido) suplementado con una alta concentración de sacarosa (0,3M) para el preacondicionamiento celular.

3.5.3.2 Pretratamiento

Los embriones fueron transferidos a concentraciones crecientes de sacarosa (0,3 – 0,5 – 0,75 M) en el medio de germinación semisólido, durante 24 horas.

3.5.3.3 Vitricación

La vitricación se realizó en dos pasos:

- 1) La inmersión de las muestras en la solución de descarga (solución loading), constituida por el medio de germinación líquido, suplementado con 2,0 M de glicerol y 0,4 M de sacarosa como sustancias crioprotectoras. En este medio los embriones permanecieron durante 20 minutos.
- 2) Seguidamente, la solución loading es eliminada de las muestras y sustituida por la solución vitrificadora conocida como PVS2, que consiste en el medio MS con 0,4 M de sacarosa, 30% de glicerol (v/v), 15 % de etilenglicol (v/v) y 15 % de DMSO (v/v). Las muestras permanecieron en la solución PVS2 durante 15 minutos.

Tanto la solución loading como la solución de vitricación son agregadas en un baño de hielo a 0 °C. Como variables se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de la solución PVS2 (60 – 80 – 100%) sobre la supervivencia de los embriones a la congelación en nitrógeno líquido.

3.5.3.4 Congelamiento en nitrógeno líquido

Los embriones fueron sacados del baño de hielo y colocados directamente en el nitrógeno líquido a -196 °C durante 24 horas.

3.5.3.5 Descongelamiento rápido

Los criotubos fueron sacados del tanque de nitrógeno y descongelados en un baño María a 40 °C.

3.5.3.6 Lavado de las muestras y recuperación

Las soluciones utilizadas durante la vitricación son altamente concentradas y por lo tanto también son muy tóxicas, razón por la cual las muestras fueron lavadas dos veces, durante 2 min cada lavado, en una solución de 1,2 M de sacarosa antes de la recuperación. La recuperación se hizo gradualmente mediante el subcultivo de las muestras al medio MS 100% con 0,75 M de sacarosa durante 1 hora; seguidamente se transfirieron al medio MS 100% con 0,3 M de sacarosa donde permanecieron 24 horas y finalmente fueron subcultivados al medio MS 100% con 0,1 M de sacarosa donde permanecieron a la oscuridad durante una semana.

Se utilizaron 3 réplicas en cada tratamiento y se establecieron réplicas control en cada una de las fases que fueron llevadas a germinación para poder evaluar el efecto de cada tratamiento sobre la supervivencia y recuperación del crecimiento. En este experimento se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo simple de tratamientos.

3.6 Análisis estadístico

En los ensayos se realizó un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) con o sin un diseño factorial de los tratamientos y se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y pruebas de Fisher para la comparación de medias.

3.6.1 Variables de estudio durante la micropropagación

3.6.1.1 Desarrollo y alargamiento de brotes

a) Longitud de brotes

Se registró la medición del brote en mm desde la inserción hasta el extremo superior y se promedió por cada unidad experimental.

b) Número de brotes por explante

Se registró el número de brotes por cada explante y se promedió por cada unidad experimental.

3.6.1.2 Enraizamiento de brotes

a) Enraizamiento

Se registró el porcentaje de enraizamiento de los brotes y se promedió por cada unidad experimental.

b) Número de raíces por explante

Se registró el número de raíces por cada brote y se promedió por cada unidad experimental.

c) Longitud de raíz

Se registró la longitud en mm de cada raíz y se promedió por cada unidad experimental.

3.6.1.3 Aclimatación

Se registró la supervivencia de las plantas.

3.6.2 Variables de estudio durante la crioconservación

a) Supervivencia

Se registró el porcentaje de los cultivos que sobrevivieron después de cada fase.

b) Germinación

Se registró el porcentaje de cultivos que lograron germinar en la fase de recuperación.

c) Desarrollo

Se registró el desarrollo presentado por las plántulas en la fase de recuperación.

d) Longitud

Se registró la longitud de las plántulas en la fase de recuperación.

4. RESULTADOS

4.1 Inducción de brotes axilares a partir plántulas *in vitro*

4.1.1 Inducción de brotes

El cultivo de nudos cotiledonares para la inducción de brotes axilares mostró diferencias significativas con las concentraciones de 0,25 mg/l y 0,5 mg/l de BAP. El mayor efecto se observó con 0,5 mg/l de BAP, concentración que permitió un promedio de 2,06 brotes por explante. Comparativamente, en presencia de 0,25 mg/l de esta citocinina sólo se desarrolló 1,53 brotes/explante (Figura 2).

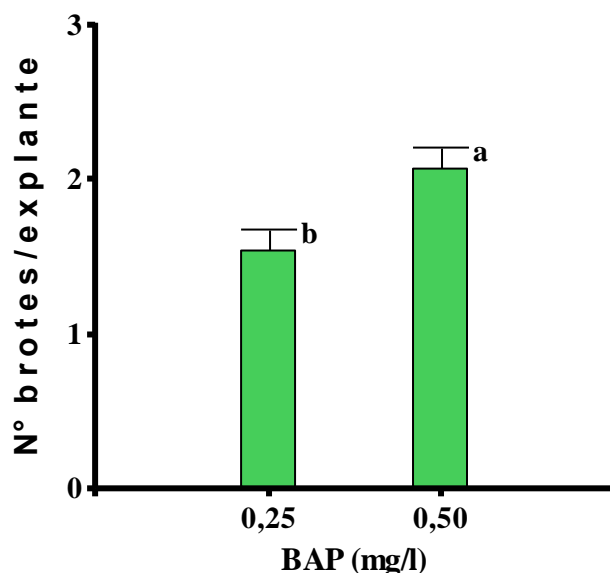


Figura 2. Efecto de la BAP sobre el desarrollo de brotes axilares en segmentos nodales de *J. curcas*, variedad tóxica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).

4.1.2. Desarrollo de brotes

Aunque el uso de diferentes concentraciones de caseína hidrolizada en los medios MS y WPM manifiestan diferencias significativas, la longitud alcanzada en el desarrollo de los brotes es limitada. Se observó que el medio MS suplementado con 100 mg/l de caseína hidrolizada favoreció el crecimiento en longitud de los brotes (6,4 mm) en comparación con los brotes cultivados en el medio WPM en la misma concentración de caseína hidrolizada que alcanzaron una longitud de 3,6 mm. En ambos medios de cultivo el aumento en la concentración de caseína no incrementó la longitud de los brotes (Figura 3).

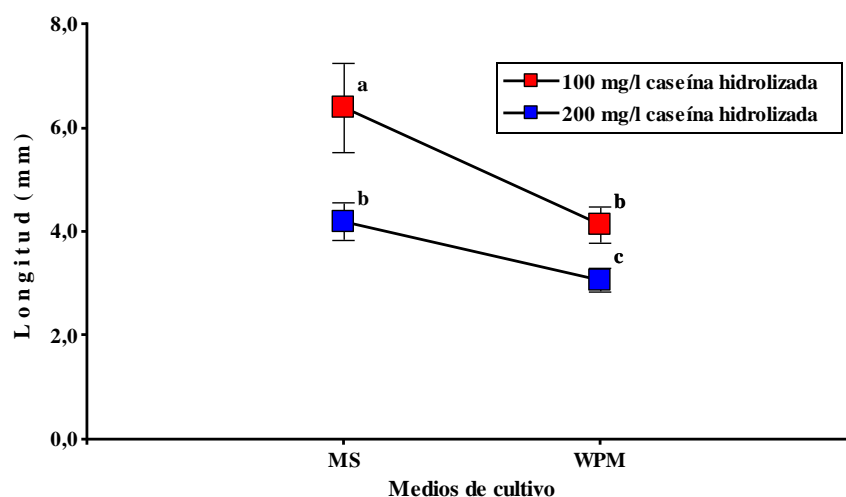


Figura 3. Efecto de los medios de cultivo MS y WPM suplementados con caseína hidrolizada sobre el crecimiento de brotes axilares de *J. curcas*, variedad No tóxica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).

4.1.3 Enraizamiento

La inducción de raíces en medio líquido con auxina durante 96 horas y el subcultivo posterior de los brotes a un medio semisólido sin auxina no tuvo una buena respuesta en la regeneración de raíces de los brotes de *J. curcas*. Los mejores porcentajes de enraizamiento se observaron con 3,0 mg/l de AIB (25%), la combinación de AIB (3,0 mg/l), AIA (1,0 mg/l) y ANA (3,5 mg/l) resultó en un enraizamiento (8,3%) mucho inferior (Cuadro 6).

Aunque el mayor número de raíces (0,5) se observó con la combinación de las tres auxinas (AIB – AIA - ANA), la longitud de las raíces fue significativamente superior (173,3 mm) al utilizar solo 3,0 mg/l de AIB (Figura 4A). La concentración de 5,0 mg/l de AIB sola o en combinación no tuvo efecto sobre el enraizamiento de los brotes.

Cuadro 6. Efecto de la inducción de raíces durante 96 horas con AIA, AIA y ANA sobre el enraizamiento de *J. curcas*, variedad tóxica.

Auxinas (mg/l)			Enraizamiento (%)	N° de raíces	Longitud de raíces (mm)
AIB	AIA	ANA			
3,0	0,0	0,0	25,0 a	0,2 a	173,3 a
3,0	1,0	3,5	8,3 b	0,5 a	28,3 b
5,0	1,0	3,5	0,0 b	0,0 a	0,0 b
5,0	0,0	0,0	0,0 b	0,0 a	0,0 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).

La inducción de raíces en los mejores tratamientos del Cuadro 6, pero esta vez durante 42 horas mejoró significativamente el enraizamiento de los brotes (50%) y la longitud de las raíces (98,6 – 100,7 mm) según se muestra en el Cuadro 7 y la Figura 4 (B - C).

Cuadro 7. Efecto de la inducción de raíces durante 42 horas con AIB, AIA y ANA sobre el enraizamiento de *J. curcas*, variedad tóxica.

AIB	Auxinas (mg/l)		Enraizamiento (%)	N° de raíces	Longitud de raíces (mm)
	AIA	ANA			
3,0	0,0	0,0	28,5 b	0,4 a	100,7 a
3,0	1,0	3,5	50,0 a	1,0 a	98,6 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).

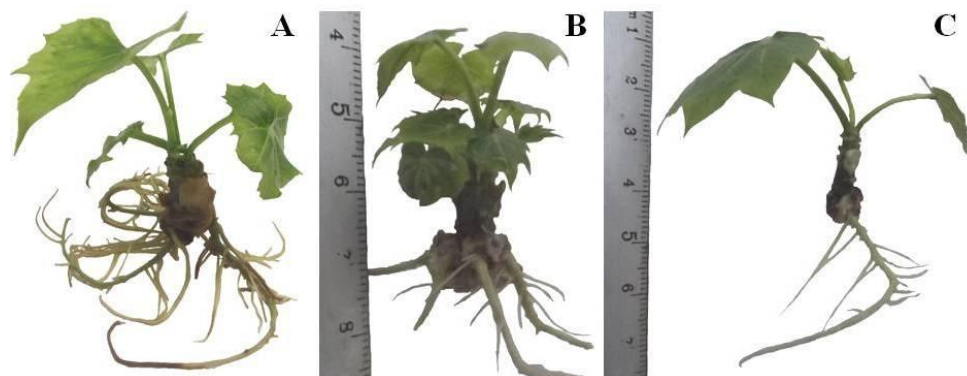


Figura 4. Regeneración de raíces a partir de segmentos nodales de *J. curcas*. A) Desarrollo de raíces con una inducción de 96 horas con 3,0 mg/l AIB. B) y C). Desarrollo de raíces con una inducción de 42 horas con 3,0 mg/l AIB, 1,0 mg/l de AIA y 3,5 mg/l de ANA.

4.1.4 Aclimatación

Las plantas enraizadas presentaron una supervivencia del 13,6% durante la aclimatación. Este bajo porcentaje podría ser atribuido a tiempos muy largos de riego, ya que se utilizó un riego de 2 minutos 3 veces al día.

4.2 Inducción de brotes adventicios a partir de hojas

4.2.1 Inducción de callo

Las variedades (T y NT) y el estado de madurez de las hojas de *J. curcas* utilizadas en el medio de cultivo establecido por Tejedor (2010), no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos para la formación de callo organogénico en presencia de 2,0 mg/l de BAP y 0,5 mg/l de AIB (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de la variedad y el estado de madurez de la hoja sobre la formación de callo organogénico en *J. curcas*.

Variedad	Estado de madurez de la hoja	Callo organogénico (%)
No tóxica (NT)	J	71,0 ± 3,0 a
No tóxica (NT)	SM	71,0 ± 3,0 a
Tóxica (T)	J	66,0 ± 3,0 a
Tóxica (T)	SM	70,0 ± 3,0 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).

Cuando se utilizó diferentes concentraciones de BAP (2,0 – 5,0 mg/l) y AIB (0,0 - 0,5 – 1,0 mg/l) en combinación, el efecto de los tratamientos fue altamente significativo ($p < 0,0001$). El cultivo de hojas juveniles con 2,0 mg/l de BAP y 1,0 mg/l de AIB presentó mejor respuesta en la formación de callo organogénico con un 90,64%. De forma similar, en el cultivo de hojas semimaduras con 2,0 mg/l de BAP en combinación de 0,5 y 1,0 mg/l AIB, se observó una formación de callo organogénico de entre el 85,1 y 86,6%. La menor formación de callo organogénico (11,88%) se observó en hojas semimaduras con 5,0 mg/l de BAP (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto del estado de maduración de la hoja y de la BAP en combinación con el AIB sobre la inducción de callo organogénico en *J. curcas*, variedad tóxica.

Reguladores del crecimiento (mg/l)		Tipo de hoja	Formación de callo (%)
BAP	AIB		
2,0	0,0	Juvenil	75,9±6,3 abc
2,0	0,5	Juvenil	46,4±6,3 de
2,0	1,0	Juvenil	90,6±6,3 a
2,0	0,0	Semimadura	39,6±6,3 e
2,0	0,5	Semimadura	86,6±6,3 ab
2,0	1,0	Semimadura	85,1±6,3 ab
5,0	0,0	Juvenil	30,4±6,3 e
5,0	0,5	Juvenil	78,6±6,3 ab
5,0	1,0	Juvenil	59,9±6,3 cd
5,0	0,0	Semimadura	11,8±6,3 f
5,0	0,5	Semimadura	38,3±6,3 e
5,0	1,0	Semimadura	69,2±6,3 bc

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).

Sin embargo, con el uso de concentraciones crecientes (2,0 – 5,0 – 7,0 -10,0 mg/l) de BAP (Figura 5) y Kinetina (Figura 6) en combinación del AIB (0,0 – 0,5 – 1,0 mg/l) se observó diferencias significativas en la formación de callo organogénico utilizando hojas SM (Figura 6). Cuando se utilizó 2,0 mg/l de BAP en ausencia de AIB hubo una formación de callo de 81,5%, y al utilizar 7,0 g/l de BAP se observó una formación de callo de 8,2%. Sin embargo, al utilizar 10,0 mg/l de BAP en combinación con 1,0 mg/l de AIB presento una formación de callo de 88,2% (Figura 5).

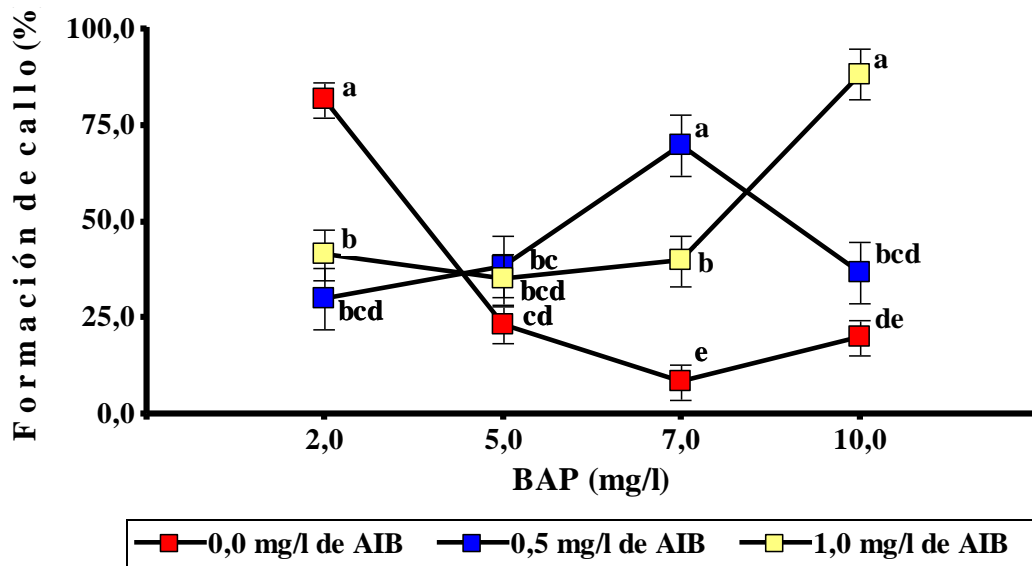


Figura 5. Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de BAP y AIB sobre la inducción de callo organogénico en hojas semimaduras de *J. curcas*, variedad tóxica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).

Comparativamente, cuando se utilizó 10,0 mg/l de Kinetina y 1,0 mg/l de AIB el porcentaje de cultivos con callo organogénico fue sólo del 41,0%; mientras que con 5,0 y 7,0 mg/l de Kinetina y 1,0 mg/l de AIB hubo una formación de callo del 63,3 y 58,2%, respectivamente (Figura 6).

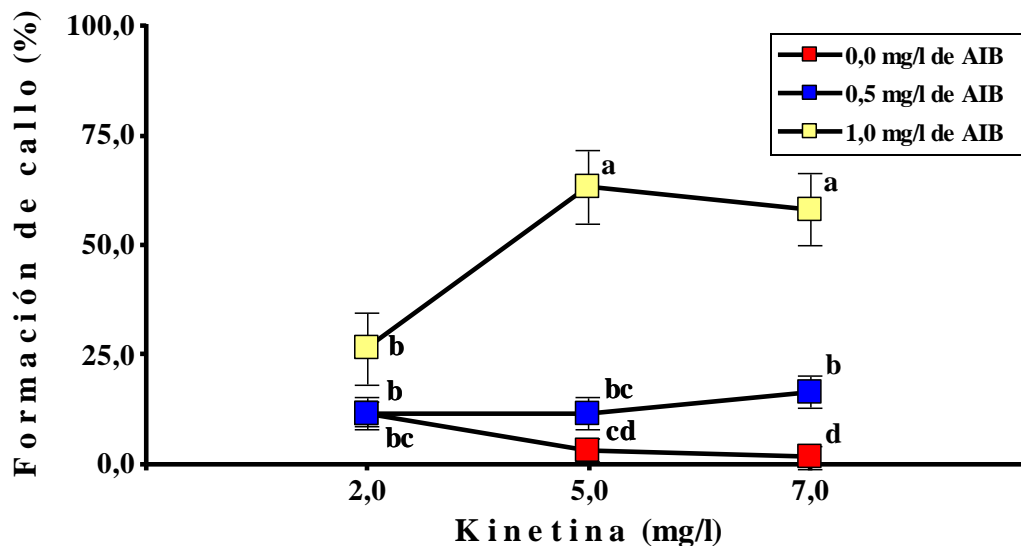


Figura 6. Efecto de la combinación de diferentes concentraciones de Kinetina y AIB sobre la inducción de callo organogénico en hojas semimaduras de *J. curcas*, variedad tóxica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).

La Figura 7 (A-C) muestra la inducción de callo organogénico en presencia de BAP y AIB. La formación de callo organogénico y la diferenciación de brotes adventicios sobre el mismo callo se observa en el cultivo de hojas SM con 10,0 mg/l de BAP y 1,0 mg/l de AIB (Figura 7A), y en menor grado con 2,0 mg/l de BAP sin AIB (Figura 7B). Muy poca formación de callo se observa con 7,0 mg/l de BAP (Figura 7C). En la Figura 7 (D-F) se observa la formación de callo organogénico con brotes adventicios en presencia de Kinetina.

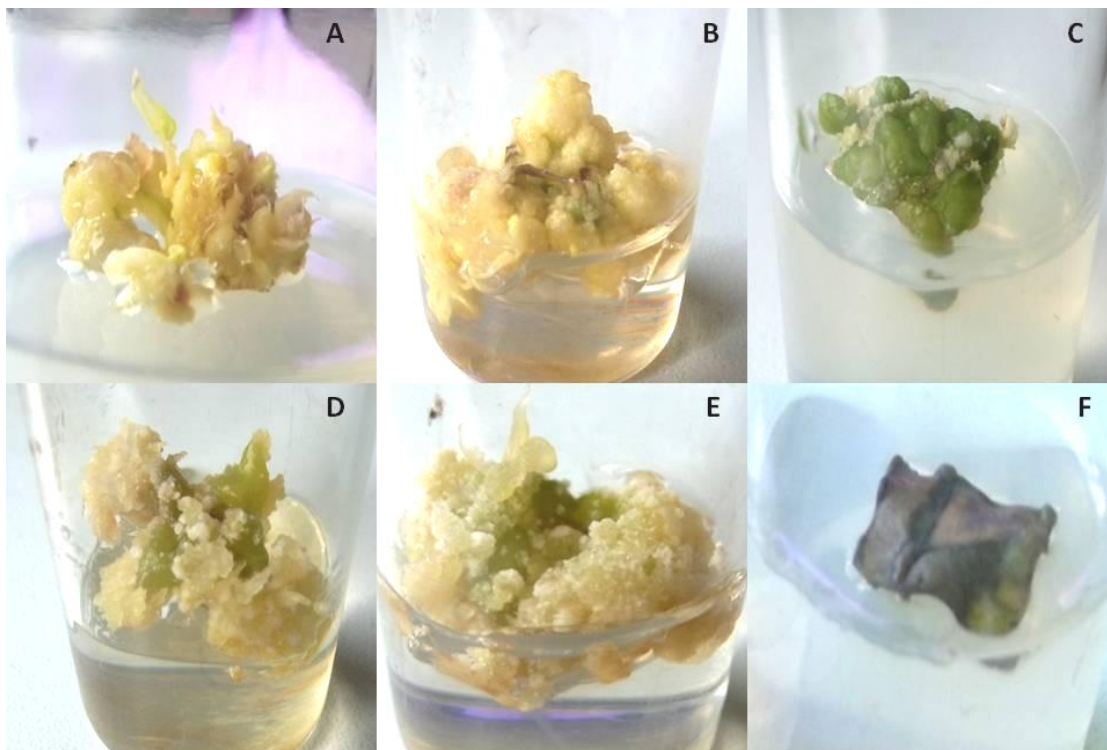


Figura 7. Inducción de callo organogénico y diferenciación de brotes adventicios en explantes foliares de *J. curcas*, variedad tóxica. Callo organogénico y brotes adventicios formados con 10,0 mg/l de BAP y 1,0 mg/l de AIB (A), con 2,0 (B) y 7,0 mg/l de BAP en ausencia de AIB (C). Callo organogénico y brotes adventicios formados con 5,0 y 7,0 mg/l de Kinetina y 1,0 mg/l de AIB, respectivamente (D-E). Explante necrosado con 10,0 mg/l de Kinetina y 0,5 mg/l de AIB.

4.2.2 Regeneración de brotes

Durante la regeneración de callos organogénicos se observó un efecto altamente significativo ($P < 0,0001$) en la interacción entre la madurez de las hojas utilizadas como explantes y las variedades de alta y baja toxicidad utilizadas de *J.*

curcas (Anexo 4). La mayor regeneración de brotes se observó en hojas semimaduras de la variedad tóxica con 4,13 brotes/explante (Figura 10A), cultivadas en presencia de 2,0 mg/l de BAP y 0,5 mg/l de AIB. Los demás tratamientos sólo alcanzaron entre 0,2 – 0,47 brotes/explante. La variedad de baja toxicidad resultó ser la menos organogénica para las condiciones de cultivo evaluadas. (Figura 8).

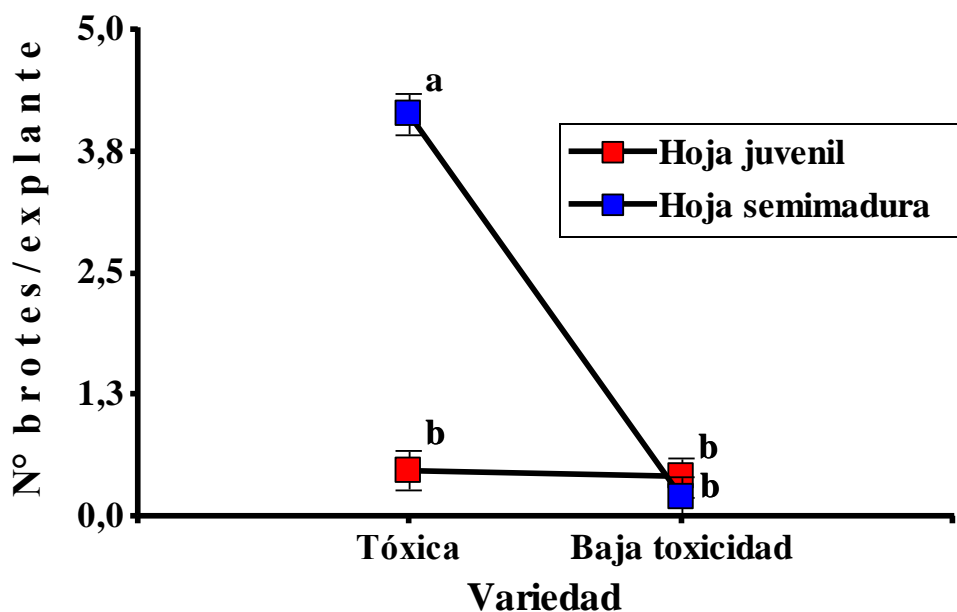


Figura 8. Efecto de las hojas juveniles y semimaduras de dos variedades de *J. curcas* sobre la regeneración de brotes a partir de callos organogénicos. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).

4.2.3 Desarrollo de brotes

El desarrollo de los brotes procedentes de callos organogénicos (Figura 10B) presentó diferencias significativas entre el uso de AIA y BAP solas y en combinación de diferentes concentraciones de GA3 (Figura 9). El mejor crecimiento de los brotes se observó en presencia de 0,25 mg/l de AIA (15,8 mm), seguido de 0,25 mg/l de BAP sin GA3 (8,4 mm). El uso de GA3 no estimuló de manera significativa el desarrollo de los brotes. El desarrollo de brotes no fue logrado en la variedad de baja toxicidad (Anexo 2).

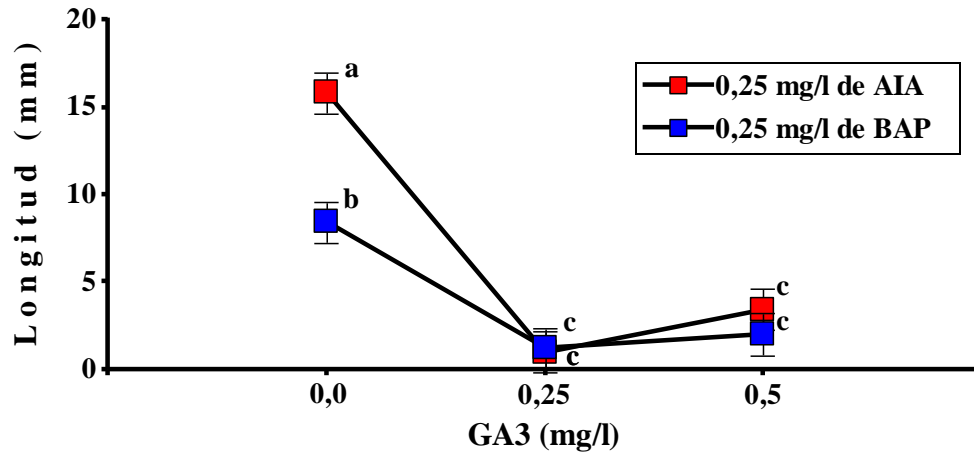


Figura 9. Efecto del AIA y la BAP solas o en combinación de diferentes concentraciones de GA3 sobre el desarrollo y alargamiento de brotes regenerados de callos embriogénicos de *J. curcas*, variedad tóxica. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).



Figura 10. Regeneración de brotes a partir de hojas semimaduras de la variedad tóxica. A) Brotes inducidos con 2,0 mg/l de BAP y 0,5 mg/l de AIB. B) Brotes utilizados en la fase de desarrollo.

4.2.4 Enraizamiento

De los experimentos realizados para lograr el enraizamiento de brotes adventicios de *J. curcas* el mejor tratamiento consistió en una inducción de 42 horas en el medio MS líquido suplementado con 3,0 mg/l de AIB, 1,0 mg/l de AIA y 3,5 mg/l de ANA. Estas condiciones permitieron el porcentaje de enraizamiento más alto (62,5%) y el mayor número de raíces (1,38) de longitud superior (14,0 mm) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto de la inducción de raíces durante 42 horas con AIB, AIA y ANA sobre la regeneración de raíces de *J. curcas*, variedad tóxica.

AIB	Auxinas (mg/l)		Enraizamiento (%)	N° de raíces	Longitud de raíces (mm)
	AIA	ANA			
3,0	0,0	0,0	37,5	0,3±0,38 a	95,0 a
3,0	1,0	3,5	62,5	1,3±0,38 a	140,0 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).

4.3 Crioconservación

4.3.1 Técnica de desecación y congelamiento de semillas

Las semillas utilizadas presentaron un contenido de humedad (CH) de 7,4% después de la desecación realizada bajo condiciones ambientales de manera rutinaria en el BSF del CATIE (Anexo 5). Las semillas utilizadas como testigo (-NL), es decir, que no fueron congeladas en nitrógeno líquido presentaron un 100% de germinación en las dos condiciones evaluadas (con arena del BSF y en cultivo *in vitro*, en el medio MS 100% gelificado con agar). Sin embargo, las semillas que fueron congeladas en nitrógeno líquido sí mostraron diferencias significativas durante la germinación y el desarrollo posterior de la plántula, en función del sustrato y las condiciones de germinación utilizadas.

Las semillas congeladas (+NL) germinadas en arena presentaron una germinación del 100%, y las plántulas desarrolladas alcanzaron una longitud de 195 mm después de dos semanas de germinación sin mostrar diferencia significativa con respecto al testigo sin congelar. Asimismo, las semillas germinadas *in vitro* no mostraron diferencias estadísticas entre la germinación de las semillas congeladas (100%) y no congeladas (100%), y tampoco, con respecto a las semillas germinadas en arena (Figura 9). Las condiciones de cultivo *in vitro* utilizadas también manifestaron un efecto negativo sobre el desarrollo de las plántulas, tanto para el testigo sin congelar (-NL) donde las plántulas alcanzaron una longitud promedio de

67,0 mm y para las muestras congeladas (+NL) donde las plántulas apenas alcanzaron una longitud promedio de 28,5 mm (Cuadro 11).

Cuadro 11. Efecto del congelamiento en nitrógeno líquido de las semillas de *J. curcas* en nitrógeno líquido (-196 °C) sobre la germinación y desarrollo de las plántulas.

Condiciones de crioconservación	Sustrato	Germinación (%)	Desarrollo (%)	Longitud (mm)
-NL	Arena	100,0 a	100,0 a	195,3 a
	MS 100%	100,0 a	93,3 b	67,8 b
+NL	Arena	100,0 a	100,0 a	194,3 a
	MS 100%	100,0 a	86,6 c	28,5 c

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$)

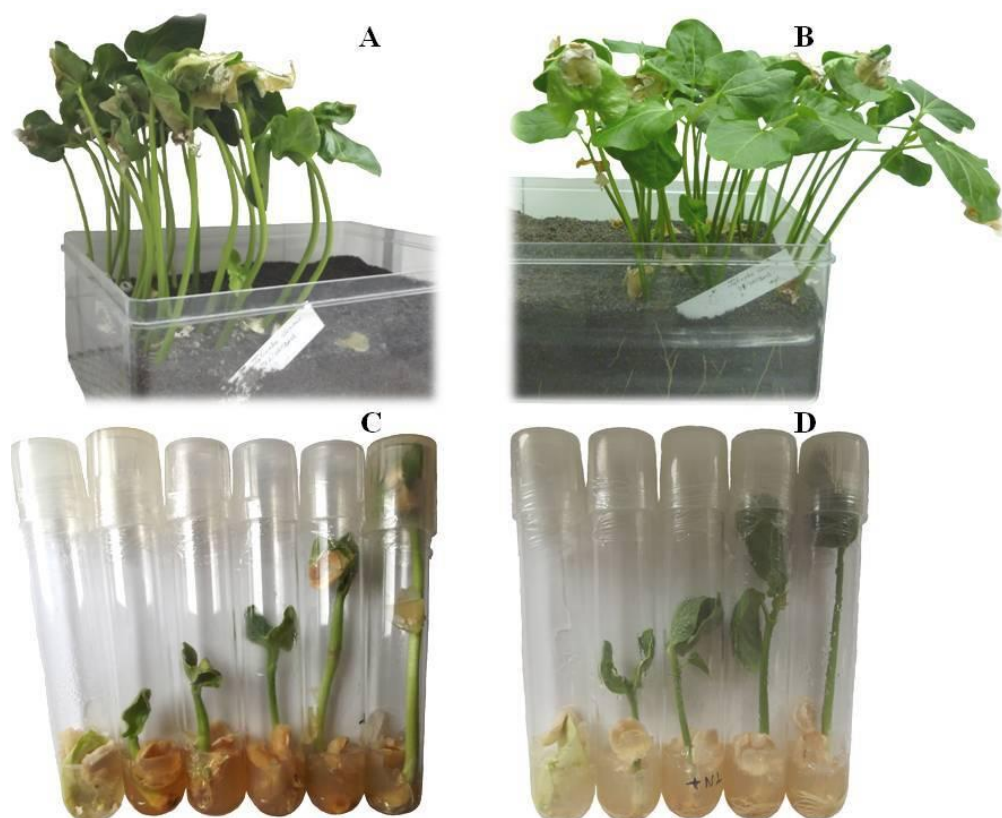


Figura 11. Germinación de las semillas y desarrollo de las plántulas de *J. curcas*. Se utilizó arena como sustrato para las semillas no congeladas (A) y congeladas (B) en NL, y medio de cultivo MS 100% para las semillas no congeladas (C) y congeladas (D) cultivadas *in vitro*.

4.3.2 Técnica de desecación y congelamiento de embriones cigóticos

El contenido de humedad de los embriones antes de la desecación fue de 11,6% (Testigo, sin desecación). Después de 30 minutos de desecación en cámara de flujo laminar el CH de los embriones se redujo al 9,7% y después de 60 minutos de desecación el CH fue de 9,4%. Los embriones cigóticos aislados de *J. curcas* respondieron favorablemente a la inmersión en nitrógeno líquido después de la desecación bajo la cámara de flujo laminar en tiempos de secado en campana de flujo laminar de 30 y 60 minutos figura 12 (D-F). El desarrollo alcanzado por las plántulas fue de 45,9 mm y 51,7 mm respectivamente. Los ejes que no se sometieron a secado (0 min) solo alcanzaron una longitud de 21,3 mm. Los ejes que pasaron por secado en cámara de flujo laminar figura 12 (A-C) y que no fueron sumergidos en nitrógeno líquido (testigo) presentaron una longitud de 51,6 mm, 51,1 mm y 49,2 mm respectivamente (Cuadro 12). Los ejes permanecieron dos semanas en oscuridad antes de ser evaluados.

Cuadro 12. Germinación y supervivencia de los embriones cigóticos y desarrollo de plántulas de *J. curcas* a las diferentes condiciones de desecación en cámara de flujo laminar, antes y después de la congelación en NL (-196 °C).

Inmersión en NL (-196 °C)	Tiempo de desecación (min.)	Germinación (%)	Desarrollo (%)	Longitud (mm)
-NL	0	100,0 a	100,0 a	51,67 a
	30	100,0 a	100,0 a	51,17 a
	60	100,0 a	100,0 a	49,20 a
+NL	0	100,0 a	93,3 b	21,30 b
	30	100,0 a	100,0 a	45,93 a
	60	100,0 a	100,0 a	51,77 a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).

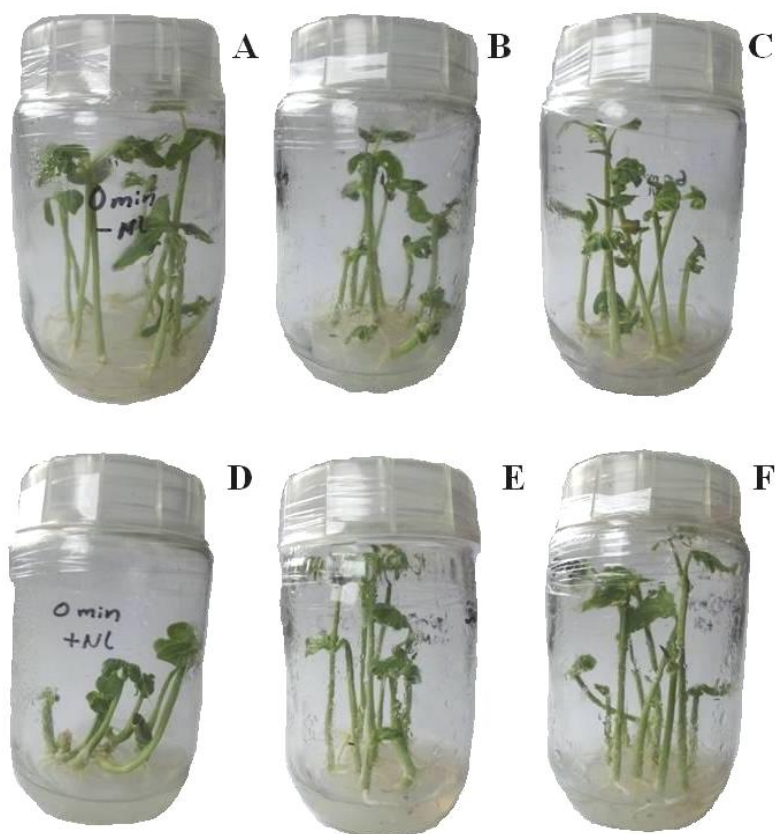


Figura 12. Germinación y desarrollo de embriones cigóticos y desarrollo de plántulas de *J. curcas* después de la congelación a -196°C . A) 0 minutos de desecación de los embriones (-NL). B) 30 minutos de desecación de los embriones (-NL). C) 60 minutos de desecación de los embriones (-NL). D) 0 minutos de desecación de los embriones (+NL). E) 30 minutos de desecación de los embriones (+NL) y F) 60 minutos de desecación de los embriones (+NL).

4.3.3 Técnica de vitrificación

Los embriones cigóticos de *J. curcas* no sobrevivieron a la congelación en nitrógeno líquido después de ser tratados con la técnica de vitrificación. Sin embargo, los datos observados en cada uno de los testigos no congelados (-NL) para cada una de las fases de la vitrificación muestran una evolución gradual en la supervivencia de los embriones cigóticos, posiblemente influenciada, por lo menos en parte, por las altas concentraciones de las sustancia crioprotectoras utilizadas en esta técnica. En este sentido, tanto los embriones testigos, es decir aquellos que no fueron tratados, como los que si fueron sometidos al precultivo (0,3 M de sacarosa, 15 días) y al pretratamiento en diferentes concentraciones de sacarosa (0,3 - 0,5 - 0,75 M), presentaron un 100% de supervivencia. No obstante, el efecto de las altas

concentraciones de sacarosa durante el pretratamiento es reflejado en los porcentajes de supervivencia, clorosis y necrosis observados en los embriones después de haber sido sometidos a la solución loading (Glicerol 2 M-Sacarosa 0,4 M) por 20 minutos (Cuadro 13).

Los embriones pretratados con 0,3 M de sacarosa presentaron 100% de supervivencia después del Loading, aquellos que pasaron por el pretratamiento de 0,5 M de sacarosa lograron una supervivencia del 93%; mientras que en los ejes sometidos a la más alta concentración de sacarosa (0,75 M) no hubo desarrollo, el 17% de los embriones manifestaron clorosis y el 83% necrosis de tejidos. El impacto de estas respuestas también es observado en la supervivencia de los embriones después de ser sometidos a la solución vitrificadora (PVS2) en diferentes concentraciones (60 – 80 – 100%).

Los embriones que proceden del pretratamiento con 0,3 M de sacarosa presentaron los porcentajes de desarrollo más altos en concentraciones diluidas de PVS2-60% (Supervivencia 70%) y en PVS2-80 (Supervivencia 60%); en tanto que, los embriones que fueron sometidos a un pretratamiento de 0,75 M de sacarosa mostraron los porcentajes más altos de necrosis, 60 (PVS2-60%), 87 (PVS2-80%) y 80% (PVS2-100%) (Cuadro 13).

Cuadro 13. Efecto del pretratamiento y de las soluciones vitrificadoras Loading y PVS2 sobre la supervivencia de los embriones de *J. curcas* antes de la inmersión en NL (-196 °C).

Tratamientos		Respuesta de embriones cigóticos			
Pretratamiento Sacarosa (M)	Solución vitrificadora	Desarrollo (%)	Longitud (mm)	Clorosis (%)	Necrosis (%)
0,3	Loading	100,0	24,5	-	-
0,5	Loading	93,0	12,3	-	7,0
0,75	Loading	0,0	9,7	17,0	83,0
0,3	PVS2 60%	70,0	12,6	10,0	20,0
0,3	PVS2 80%	60,0	15,0	13,0	27,0
0,3	PVS2 100%	47,0	15,8	23,0	30,0
0,5	PVS2 60%	53,0	17,1	-	47,0
0,5	PVS2 80%	10,0	12,1	37,0	53,0
0,5	PVS2 100%	47,0	17,9	40,0	13,0
0,75	PVS2 60%	27,0	13,6	13,0	60,0
0,75	PVS2 80%	-	7,6	13,0	87,0
0,75	PVS2 100%	3,0	15,6	17,0	80,0

5. DISCUSIÓN

La importancia actual del cultivo de *J. curcas* como especie productora de biocarburantes requiere la distribución de grandes volúmenes de plantas hacia los productores en cortos periodos de tiempo. Por lo tanto, esas plantas deben ser capaces de producir altos rendimientos en aceite y tener una morfología y fenología homogénea para facilitar su cultivo; esto significa que la propagación de las plantas seleccionadas por estas características debe ser *in vitro* (Samson *et al.* 2011). Sin embargo, para encontrar una aplicación a nivel industrial en la producción de plantas, los protocolos de multiplicación deben ser fiables, simples y reproducibles. De igual forma, la mejora genética en proceso de desarrollo para esta especie en muchos países del mundo, llevará a la liberación de variedades con características deseables, como por ejemplo, genotipos con contenidos de aceite mejorados, o con mayor tolerancia a estreses biótico y abiótico (Sudhakar *et al.* 2011). Estas nuevas variedades además de ser multiplicadas masivamente para ser explotadas de forma comercial deberán ser conservadas.

Siendo la semilla de esta especie la materia prima para la producción de aceite resulta de gran importancia la generación de conocimiento orientado hacia la conservación y almacenamiento de las mismas. No obstante, en la gran mayoría de especies silvestres y poco domesticadas, poco o nada se conoce sobre la biología y más aún del comportamiento de almacenamiento de la semilla. Cuando existe alguna información al respecto, los protocolos de cultivo de tejidos, la germinación y el crecimiento de las plantas, que son necesarios para la regeneración de embriones y ejes embrionarios después de la congelación, a menudo son inexistentes o no son del todo operativos (Engelmann 2001).

A pesar del gran número de publicaciones relacionadas con la micropropagación de *J. curcas*, utilizando todo tipo de explantes y procedimientos (Sujatha y Mukta 1996, Qin *et al.* 2004, Rajore y Batra 2005, Deore y Johnson 2008, Shrivastava y Banerjee 2008, Kumar *et al.* 2010, entre otros), son pocos los estudios que han documentado la aclimatación exitosa de las plantas (Kumar *et al.* 2011) y la transferencia a suelo (Deore *et al.* 2008).

En este estudio, se abordó la micropropagación de *J. curcas* utilizando dos metodologías: 1) *La multiplicación de brotes axilares a partir del cultivo de segmentos nodales de plántulas germinadas in vitro* y; 2) *La inducción de brotes adventicios a partir de segmentos de hoja de plantas establecidas en invernadero*. En ambas metodologías se pudo constatar que la propagación *in vitro* de esta especie aún encierra limitaciones, asociadas principalmente al desarrollo de los brotes que

dificulta la multiplicación y el enraizamiento de los mismos, haciendo difícil la transferencia de las plantas a condiciones *ex vitro* (invernadero y suelo).

La información generada con respecto al número de brotes producidos en ambas metodologías nos revela que mientras en el cultivo de segmentos nodales con 0,5 mg/l de BAP se logró la producción de 2,06 brotes por explante; durante la regeneración de brotes adventicios en presencia de 2,0 mg/l de BAP se obtuvo 4,13 brotes por explante. Por lo tanto, el mayor rendimiento en la formación de brotes se logró a partir de callos formados en hojas semimaduras de la variedad tóxica. En nuestro caso el desarrollo de brotes no fue logrado en la variedad de baja toxicidad. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Rajore y Batra (2005) utilizando 1,0 mg/l de BAP en el cultivo de segmentos nodales. Sujatha *et al.* (2005) lograron 2,3 brotes por nudo utilizando la variedad no tóxica procedente de México. Comparativamente, Koonan *et al.* (2011) lograron la formación de hasta 4 brotes por explante utilizando la misma concentración de BAP. Estos datos indican que posiblemente el genotipo también juega un rol importante en el número de brotes producidos durante la multiplicación (Samson *et al.* 2011).

Durante la inducción de callo organogénico se determinó que al cultivar hojas juveniles y hojas semimaduras con 2,0 mg/l de BAP y 1,0 mg/l de AIB se dio la mejor respuesta en la formación de callo organogénico sin haber diferencias entre los tipos de hoja y la variedad tóxica o no tóxica; sin embargo, la diferencia fue manifiesta en la regeneración de brotes, siendo significativamente mayor en hojas semimaduras. Sin embargo, concentraciones crecientes de BAP y AIB mostraron divergencias no muy claras en la formación de callo organogénico en hojas semimaduras; no se manifiesta una relación directa entre el incremento en la concentración de BAP y la producción de callos. Más de un 80% de callos fueron formados en concentraciones distantes de BAP, es decir, con 2,0 mg/l de BAP en ausencia de AIB y con 10,0 mg/l de BAP y 1,0 mg/l de AIB.

El uso de Kinetina en las mismas concentraciones permitió definir una tendencia más clara en la formación de callo, aunque éste fue formado en menor cantidad y no manifestó organogénesis. En este caso la formación de callo es creciente conforme se aumenta la concentración de Kinetina desde 2,0 a 7,0 mg/l para todas las concentraciones de AIB utilizadas; tomando en cuenta que para todas las concentraciones de Kinetina la mayor formación de callo se dio con 1,0 mg/l de AIB. Tejedor (2010) también encontró que el uso de hojas semimaduras favoreció la regeneración de brotes (3,6 brotes/explante) cuando fueron cultivadas con BAP (2,0 mg/l) y AIB (0,5 mg/l); el cultivo de hojas cotiledonares en el mismo medio permitió la regeneración de 4,1 brotes por explante, después de 4 semanas. También Kumar *et al.* (2010b) encontró diferencias entre la regeneración de brotes adventicios en hojas cotiledonares y hojas verdaderas.

En lo concerniente al desarrollo de los brotes de *J. curcas* producidos por diferentes metodologías *in vitro* la literatura consultada indica el uso de diferentes reguladores del crecimiento solos o en combinación. Así, brotes procedentes de segmentos nodales de hasta 4,8 cm de longitud fueron obtenidos por Datta *et al.* (2007) utilizando una combinación de AIB (0,5 μ M) y Kinetina (2,3 μ M); y brotes del mismo origen alcanzaron una longitud de 2 cm en un medio suplementado con BAP (21,6 μ M), Kinetina (4,4 μ M) y AIB (0,4 μ M) (Koonna *et al.* 2011). Contrariamente, en este estudio el alargamiento de los brotes producidos de explantes nodales no superó los 6,4 mm en un medio MS suplementado con 100,0 mg/l de caseína hidrolizada. Resultados similares fueron obtenidos por Jiménez (2010) para el alargamiento de brotes *de J. curcas* en medio de cultivo semisólido; sin embargo, al cultivar los brotes en recipientes RITA en inmersión temporal logró brotes con una longitud de 1,9 cm.

En el presente estudio, el alargamiento de los brotes producidos por organogénesis fue favorecido cuando se utilizó solamente 0,25 mg/l de AIA donde se logró una longitud promedio de los brotes de 15,8 mm. Un efecto significativo del AIA (8,5 μ M) en el alargamiento de los brotes fue observado por Kumar *et al.* (2011) al obtener brotes de 3,01 cm de longitud. Nosotros observamos que la adición de GA3 no tuvo ningún efecto positivo sobre el alargamiento de los brotes, contrariamente a los resultados presentados por Deore y Sudhakar (2008), quienes lograron el desarrollo de brotes procedentes de organogénesis de hoja, con longitudes de entre 2 y 3 cm utilizando una alta relación auxina – citocinina y la adición de GA3 en el medio de cultivo.

Con respecto al enraizamiento, la inducción de raíces en brotes axilares y brotes adventicios fue favorecida cuando se cambió el tiempo de inducción de 96 horas a 42 horas utilizando el mismo tratamiento auxínico (3,0 mg/l de AIB, 1,0 mg/l de AIA y 3,5 mg/l de ANA). Esta reducción en el tiempo de inducción permitió aumentar el porcentaje de enraizamiento de 8,3% a 50% en brotes axilares y del 50% al 62,5% en brotes adventicios, indicando que los brotes adventicios presentan una mayor aptitud al enraizamiento. Mientras tanto, Kumar *et al.* (2011) al utilizar las mismas auxinas durante 96 horas, lograron un 21,7% de enraizamiento en brotes axilares. En nuestro trabajo el uso de AIB sola (3,0 mg/l) en una inducción de 96 horas en medio líquido resultó en un 25% de enraizamiento de brotes axilares; en tanto que, Datta *et al.* (2007) y Koonna *et al.* (2011) lograron enraizamientos del 52 y 54 % respectivamente, con solo 0,2 mg/l de la misma auxina en brotes axilares. Del mismo modo Deore y Sudhakar (2008) mencionan el 80% de enraizamiento utilizando una baja concentración de AIB (0,1 mg/l) pero en brotes adventicios. Sin embargo, la longitud de las raíces fue similar en todos los casos donde se utilizó una

inducción de 42 horas. En nuestro caso la aclimatación de los brotes enraizados no fue exitosa, posiblemente asociada al pequeño tamaño de los brotes obtenidos.

En lo concerniente a la conservación de germoplasma, Silva *et al.* (2012) mencionan que la criopreservación de material vegetal en la forma de semillas enteras, embriones cigóticos y tejidos reproductores es actualmente muy utilizada. Engelmann (2011) considera que las técnicas de criopreservación para especies propagadas vegetativamente están muy avanzadas y en numerosos casos en experimentación a gran escala. Sin embargo, la investigación es menos avanzada en especies recalcitrantes debido a las características de sus semillas, como su gran tamaño, la alta sensibilidad a la desecación, la complejidad estructural y la heterogeneidad en términos de estados de desarrollo y contenido de agua a la madurez y la falta de funcionamiento de los protocolos de cultivo *in vitro*.

En *J. curcas* la información sobre la biología de las semillas y de tratamientos de conservación es aún limitada y confusa. Mientras algunos autores (Joker y Jepsen 2003, Toral *et al.* 2008) mencionan que las semillas de esta especie no pueden ser almacenadas por más de 15 meses debido a la pérdida de viabilidad; otros (Verma y Gaur 2009) consideran que estas semillas son ortodoxas y que por lo tanto, pueden ser almacenadas con bajos contenidos de humedad. Además, estos autores consideran que el almacenamiento prolongado de estas semillas puede verse limitado por el alto contenido de aceite. Esto permite sugerir que posiblemente las semillas de *J. curcas* presentan una condición de recalcitrancia intermedia. Sin embargo, existe muchas dudas en la clasificación de semillas tropicales, y algunas especies consideradas inicialmente como recalcitrantes, actualmente son agrupadas como intermedias o subortodoxas (Engelmann 2011)

En el presente estudio las semillas de *J. curcas* con un contenido de humedad de 7,4% después de haber sido sometidas a secado (bajo techo y a temperatura ambiente) y posteriormente escarificadas manifestaron una germinación del 100% después de 5 días de inmersión en nitrógeno líquido. De forma similar semillas de esta especie con contenidos de humedad entre 4 y 14% fueron capaces de germinar en un 59,8% después de haber sido almacenadas durante 5 días en nitrógeno líquido (Goldfarb *et al.* 2010). Este autor sugiere que estas semillas con contenidos de agua ideal entre 4 y 8% en base húmeda se pueden almacenar en nitrógeno líquido a -196 °C, manteniendo su calidad fisiológica; siendo el 8% el límite de contenido de agua, que fue el mismo que presentaban las semillas en el momento de colecta en el campo.

Silva *et al.* (2012) utilizando también semilla escarificada observó una germinación del 82%, no obstante, este autor no menciona el CH de las semillas. Semillas de otras especies, como *Swietenia macrophylla* consideradas como recalcitrantes, escarificadas y con un CH de 5,59% lograron un 77% de recuperación del crecimiento después de la congelación lenta y la inmersión en nitrógeno líquido

(Normah *et al.* 2011). Semillas con testa y sin testa de diferentes especies del género *Swietenia* fueron sometidas a inmersión directa en NL después de la desecación a temperatura ambiente (Abdelnour y Aguilar, 2012). En todos los casos la supervivencia fue superior en las semillas escarificadas; las semillas de *S. macrophylla* (CH 6,2%) presentaron un 80% de germinación y un 70% se desarrolló en plántula, *S. humillis* (CH 6,1%) y *S. mahoganii* (CH 5,3%) presentaron altos porcentajes de germinación (67% y 73%, respectivamente) y de plantas desarrolladas (67% y 60%, respectivamente) después de la inmersión directa en nitrógeno líquido. Estas autoras consideran que en la mayoría de los casos, los bajos porcentajes de germinación (7 - 17%) correspondieron a semillas con testa, que se contaminaron fácilmente, lo cual significa que el proceso de escarificación, además de reducir la barrera de germinación permite seleccionar la semilla de mejor calidad. Semillas de *Toona ciliata* “cedro australiano” fueron crioconservadas con el método de vitrificación y congelado rápido en nitrógeno líquido, alcanzando un 35% de desarrollo de plántulas (Scocchi *et al.* 2004a). Sin embargo, la crioconservación de frutos o semillas de *Melia azedarach*, también Meliaceae, no permitió la ulterior obtención de plantas (Scocchi *et al.* 2004b).

En *J. curcas* las semillas que lograron una supervivencia a la inmersión en nitrógeno líquido, presentaron un desarrollo del 100% usando arena como sustrato, y un 86,6% en aquellas que fueron germinadas *in vitro*. Asimismo, se observó un crecimiento en longitud de las plántulas de 194 y 28 mm, respectivamente. Por lo anterior, las semillas responden muy bien al uso de arena como sustrato en comparación al cultivo *in vitro*. Contrariamente las semillas de *Leucaena leucocephala* respondieron mejor a la inoculación *in vitro* (24% sobrevivencia) después de la congelación directa en nitrógeno líquido y ninguna supervivencia se dio en invernadero (Abdelnour y Aguilar 2012).

El primer criobanco mundial de semillas de café (*Coffea arabica*) fue establecido en el CATIE mediante la deshidratación de las semillas con una solución saturada de NH₄Cl y la congelación directa en nitrógeno líquido (Dussert *et al.* 1999; 2007). Las semillas fueron almacenadas durante un año a -196 °C y la evaluación de su viabilidad mostró hasta un 90% de sobrevivencia en el mejor de los casos.

La crioconservación de embriones cigóticos de *J. curcas* mediante la técnica de desecación bajo el flujo laminar también fue exitosa en el presente estudio. La sobrevivencia y desarrollo de las plántulas alcanzó el 100% cuando los embriones alcanzaron un CH del 9,7 y 9,4% después de 30 y 60 minutos de desecación, respectivamente. Abdelnour-Esquivel *et al.* (2007) observó que los embriones cigóticos de pilón (*Hieronyma alchorneoides*) no deshidratados (CH 15%) tampoco sobrevivieron al congelamiento, sin embargo, la deshidratación de 15 minutos y hasta los 60 minutos (CH 3 - 4%), permitió la germinación (2,7% y 5,3%) de los embriones

congelados. La deshidratación al flujo laminar de ejes embriónicos de caoba (*S. macrophylla*) durante 4 horas permitió altos porcentajes de germinación y desarrollo de las plántulas (90% y 76%) utilizando la técnica de encapsulación-deshidratación (Aguilar y Abdelnour 2010). Engelmann (1997) destaca la importancia de la deshidratación artificial de los explantes previo a la congelación en nitrógeno líquido ya que ésta permite la protección de los posibles daños que puedan ser causados por la cristalización intracelular del agua en hielo durante la crioconservación. Sin embargo, la deshidratación intensa también puede ocasionar daño a los tejidos debido a la alta concentración de sales intracelulares y los cambios que éstos pueda provocar en la membrana celular (Meryman *et al.* 1977).

Los embriones cigóticos que fueron crioconservados en nitrógeno líquido utilizando la técnica de vitrificación, no mostraron ninguna respuesta de supervivencia después de la inmersión en nitrógeno líquido. No obstante, se observó una tendencia de los embriones a perder su capacidad de sobrevivencia en función de las altas concentraciones de sacarosa utilizadas durante el pretratamiento (0,5 y 0,75 M) y en las fases posteriores de la vitrificación, caracterizadas por el uso de sustancias crioprotectoras altamente concentradas (Glicerol y DMSO) y que por lo tanto pueden resultar tóxicas para los tejidos vegetales. De igual manera, durante la vitrificación de ejes embriónicos de *Lansium domesticum*, se observó que el uso de la solución PVS2 por 20-min no afectó la sobrevivencia cuando los ejes fueron precultivados en un medio MS con 0,3 M de sacarosa por 16 horas; no obstante, los ejes no sobrevivieron al congelamiento en nitrógeno líquido (Normah *et al.* 2011).

González-Arno y Engelmann (2012) consideran que entre los factores más significativos en provocar daños letales durante la crioconservación están la toxicidad química provocada por los agentes crioprotectores que se adicionan, la presión osmótica que se genera, a la pérdida de agua que se induce y, en especial, la formación de cristales de hielo en el medio intracelular.

Un balance de las tres técnicas de crioconservación evaluadas en este estudio para *J. curcas* podríamos decir que la mejor técnica a utilizar va depender del objetivo de la crioconservación y por lo tanto, de la forma de recuperación del crecimiento. En este sentido, la desecación y congelación directa en nitrógeno líquido de semillas escarificadas es una técnica sencilla, fácil de realizar en cualquier laboratorio o banco de semillas sin requerir de equipos sofisticados, con la única necesidad de un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido. La desventaja sería si se tiene por objetivo el almacenamiento de grandes volúmenes de semillas que requieran de mayor espacio y suministro de nitrógeno líquido. La congelación de embriones aislados es una técnica más elaborada y por lo tanto más limitada en términos de tiempo y la necesidad de contar con las facilidades de un laboratorio de cultivo de tejidos. Sin embargo, puede ser una opción interesante ya que permite la

recuperación del crecimiento *in vitro* y puede ser utilizada para estudios posteriores *in vitro*.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con respecto a la inducción de brotes adventicios a partir de explantes foliares no hubo efecto significativo en la variedad T y NT, ni tampoco con respecto al uso de hojas SM y J. Solamente en la variedad T y hojas SM hubo regeneración de brotes adventicios utilizando el protocolo de Tejedor (2010).

Se concluye con este estudio que el incremento en las concentraciones de citocininas (BAP-KINETINA) y AIB no favorecen de manera significativa, ni la inducción de callo organogénico y por tanto, ni la regeneración de brotes. Esto significa, que el protocolo establecido por Tejedor es repetible para la variedad tóxica. En consecuencia, en la variedad NT se requiere de mayor investigación en esta fase de inducción.

Aunque el alargamiento de los brotes adventicios fue favorecido cuando se usó 0,25 mg/l de AIA, es recomendable continuar la investigación en esta fase de cultivo para lograr resultados más repetibles y de mayor alcance en cuanto al crecimiento de los brotes que faciliten el enraizamiento.

La brotación de yemas axilares fue estimulada con 0,5 mg/l BAP y el alargamiento de los brotes fue mejor en el medio MS que en el medio WPM cuando se adicionó 100,0 mg/l de caseína hidrolizada.

Tanto los brotes axilares como los adventicios respondieron de forma similar al enraizamiento al utilizar una combinación de auxinas (AIB, AIA y ANA) durante 42 horas de inducción. Sin embargo, las plantas no sobrevivieron a la aclimatación. Esto indica, que en esta fase se debe realizar experimentación, evaluando diferentes sustratos y condiciones de humedad relativa de la cámara de aclimatación.

Aunque la experimentación entre el desarrollo de brotes adventicios y axilares fue independiente y estadísticamente no puede ser comparada; con este estudio se concluye que la inducción de brotes adventicios es la metodología de mayor alcance para la multiplicación de *J. curcas* a partir de organogénesis.

Los resultados obtenidos en este estudio arrojan datos y conclusiones muy importantes para continuar con la experimentación en crioconservación de *J. curcas*. Tanto las semillas completas como los embriones aislados fueron capaces de sobrevivir a la congelación en NL (-196°C) cuando se utilizó la técnica de desecación y congelamiento.

Resulta muy interesante para los bancos de conservación y almacenamiento de germoplasma que la crioconservación de semillas de *J. curcas* puede realizarse exitosamente bajo las condiciones de desecación y germinación utilizadas de manera

rutinaria por el BSF-CATIE. Lo que significa que la crioconservación de semillas de esta especie puede realizarse de una manera simplificada y económica.

La experimentación realizada con la técnica de vitrificación aunque no dio resultados positivos en términos de la recuperación del crecimiento de los embriones aislados, ofrece información muy interesante con respecto al comportamiento de los tejidos de esta especie a las altas concentraciones de sustancias crioprotectoras y a la congelación posterior.

Estos resultados servirán de punto de partida para investigaciones posteriores sobre la crioconservación de tejido vegetativo de esta especie.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A. 1999. Crioconservación de plantas. Estado actual de la investigación en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. Vol. 23, N° 2. 205-21
- Abdelnour-Esquivel, A; Rojas, G; Alfaro, U. 2007. Estudios preliminares para la crioconservación de especies forestales arbóreas. *Tecnología en Marcha* 20(1): 98-103.
- Abdelnour-Esquivel, A; Aguilar, ME. 2012. Crioconservación de germoplasma vegetal en Costa Rica. In: Eds. M.T. Gonzalez Arnao y F. Engelmann. *Crioconservación de plantas en America Latina y el Caribe*. Editorial Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, Costa Rica. 103-115. En prensa.
- Aguilar, ME; Abdelnour-Esquivel, A. 2010. Desarrollo de modelos para la crioconservación de semillas y material clonal de especies forestales de Costa Rica en peligro de extinción y seleccionadas en los programas de mejoramiento genético. *Boletín de Ciencia y Tecnología* n.º 99. San José, CR, CONICIT. Disponible en <http://163.178.205.6/boletin/boletin99/PalabrasMariaElenaAguilar.html>
- Adolf, W; Opferkuch, H; Hecker, E. 1984. Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. *Phytochemistry*, 23: 129-132
- Aiyelaagbe, O; Adeyeni, B; Fatunsin, O; Arimah, B. 2007. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Jatropha curcas* roots. *Int. J. Pharmacol.*, 3(1): 106-110
- Baena, M; Jaramillo, S; Montoya, J. 2003. Material de apoyo a la citación en conservación *in situ* de la diversidad vegetal en áreas protegidas y en fincas. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali, Colombia. 130 p.
- Basha, D; Sujatha, M. 2007. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* L. Characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica*. 156, 375-386
- Bisse, J. 1988. *Arboles de Cuba*. Editorial Científico-Técnica. La Habana, Cuba. 154 p.

- Carneiro, M. 2000. Estrategias de biotecnología agropecuaria para el Cono Sur/coord. Mauro Carneiro. Montevideo: PROCISUR. 154 p.
- Catherine, A; Carine, B; Alain, B; Francoise, L; Jean-Louis, P; Bernard, B. 1997. Curcacycline B, a cyclic nonapeptide from *Jatropha curcas* enhancing rotamase activity of cyclophilin. *Tetrahedron Lett.*, 38(16):2845-2848
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 2003. Árboles de Centroamérica: un manual para extensionistas. Cordero, J. y Boshier, D. Turrialba, CR. 1079 p.
- Chhabra,S; Mahunnah, R; Mshiu, E. 1990. Plants used in traditional medicine in Eastern Tanzania. III Angiosperms (Euophorbiaceae to Menispermaceae). *J. Ethnopharmacol.*, 28: 255
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivos de tegidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. y Mroginski, L. (eds.). Cali, Colombia. 970 p.
- Cifuentes, M; Fallot, A. 2009. *Jatropha curcas* como biocombustible: estado actual del cultivo en Mesoamérica. *Recursos Naturales y Ambiente CATIE*. CR. 56-57: 165-169
- Cox, T; Glover, J; Van Tassel, D; Cox, C; DeHaan, L. 2006. Prospects for developing perennial-grain crops. *Biociencia* 56. 649-659
- Datta, M; Mukherjee, P; Ghosh, B; Jha, T. 2007. *In vitro* clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.). *Current Science, Reseach communications*. India, Vol. 93, No 10. 1438-1442
- Dalziel, J. 1995. The Useful Plants of West-Tropical Africa. Crown Agents for Oversea Governments and Administration, London, 147 p.
- Deore, A; Johnson, S. 2008. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnol Rep.* 2:7-11
- De Feo, V. 1989. Use of plant action antiinflamatoria Upper Ucayall, eastern Peru. *Fitoterapia*, 62: 481-494.

- Dussert, S; Chabrillange, N; Vásquez, N; Engelmann, F; Anthony, F; Guyot, A. 1999. Beneficial effect of post-thawing osmoconditioning on the recovery of cryopreserved coffee (*Coffea arabica* L.) seeds. *CryoLetters* 21:47-52
- Dussert, S; Vásquez, N; Salazar, K; Anthony, F; Engelmann, F. 2007. Cryopreservation of coffee genetic resources. In: Engelmann, F.; Dulloo, M.E.; Astorga, C.; Dussert, S. & Anthony, F. (eds.). Complementary strategies for ex situ conservation of coffee (*Coffea arabica* L.) genetic resources. A case study in CATIE, Costa Rica. *Tropical reviews in Agricultural Biodiversity*. Bioersivity International, Rome, Italy. 49-58 p.
- Engelmann, F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. Biotechnologies for conserving biodiversity. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* 47:5-16
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germoplasm – a review. *Euphytica*.57: 227-243
- Embrapa Agroenergía. 2012. Culturas oleaginosas e energias renováveis debatidas pela cadeia productiva no mês de julho. Informativo - Agroenergetico, Edição Nº 33. 33 p.
- Fairless, D. 2007. Biofuel: the little shrub that could: maybe. *Nature* 499: 652-655
- Fazwishni, S; Kristiani, I. 2007. Mutagenicity activity of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) latex. *Period. Kedokteran Sci.*, 39(1): 23-26
- Font, F. 2003. Las especies del género *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae, Crotonoideae) en Argentina. *Revista del Círculo de Coleccionistas de Cactus y Crasas de la Republica de Argentina*. 2(1): 4-20
- Frankel, O; Soule, M. 1992. Conservation and evolution. Cambridge University Press, Cambridg, UK. 327 p.
- Goldfarb, M; Duarte, M; Mata, M. 2010. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. *Revista Biotemas*, 23(1), Brasil, págs. 27-33

- Gonzalez Arnao, MT; Engelmann, F. 2012. Introducción a la conservación ex situ de los recursos genéticos vegetales. Eds. M.T. Gonzalez Arnao y F. Engelmann, In: Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe. Editorial Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José, Costa Rica. 39-48. En prensa.
- Grainge, M; Ahmed, S. 1988. Handbook of plants with pest-control Propieties. *John Wiley & Sons*. 470 p.
- Heller, J. 1996. Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Researchs, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute. Rome. 66 p.
- Henning, K. 1997. Fuel production improves food production: The *Jatropha* project in Mali. In: Biofuels and Industrial products from *Jatropha curcas*. Gubitz G.M., Mittelbach M., Trabi M., (Eds.). DBV Graz. 92-97
- Hufford, C; Oguntimein, B. 1978. Non-polar constituents of *Jatropha curcas*. *Lloydia*, 41: 161-165
- Igbinosa, O; Igbinosa, E; Aiyegoro, O. 2009. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 3(2): 58-62
- Irigoyen, J; Cruz, M. 2005. Guía técnica de semilleros y viveros frutales. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Programa nacional de frutas de el Salvador. El Salvador. 38 p.
- Irvine, F. 1961. Woody Plants of Ghana (With Special Reference to Their Uses). 2nd Edition, OUP, London. 233-237
- Jara, L. 1998. Selección y manejo de Fuentes semilleras en América Central y Republica Dominicana/ Luis Fernando Jara, Comp,. Proyecto de Semillas Forestales. CATIE, Turrialba, CR. 85 p.
- Jayasingh, M. 2004. The use of biodiesel by the Indian railways. *Jatropha* and Other Perennial Oilseed Crops. BAUF. Development Research Foundation, Pune, India, págs. 31-33

- Jha, T; Mukherjee, P; Datta, M. 2007. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnol Rep.*, India. 1:135-140
- Jiménez, M. 2010. Potencial del cultivo en inmersión temporal usando recipientes rita para la multiplicación *in vitro* de especies leñosas tropicales. Escuela de biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago. CR. 96 p.
- Jiménez, R; Martínez, G. 1994. Redescrición de *Jatropha andrieuxii* Muell. Arg. (Euphorbiaceae), una especie endémica del sur de México. *Acta Botánica Mexicana*. 26:27-32
- Joker, D. y Jepsen, J. 2003. *Jatropha curcas* L. seed leaflet, No 83 August Danida Forest Seed Centre. Demark, págs. 81-108
- Jongschaap, R; Corre, W; Bindraban, P; Brandenburg, W. 2007. Claim and facts on *Jatropha curcas* L.: Global *Jatropha curcas* evaluation, breeding and propagation programme. Plant Research International. Wageningen UR. Stichting Het Groene Woudt, Laren. 42 p.
- Joshi, P. 1995. Ethnobotany of the Primitive Tribes in Rajasthan. Printwell, Jaipur, India. 89 p.
- Kaewpoo, M; Te-Chato, S. 2010. Study on ploidy level of micropropagated *Jatropha curcas* L. via flow cytometry. *J. Agric. Tech.* 6:391-400
- Kalimuthu, K; Paulsamy, S; Senthikumar, R; Sathya, M. 2007. *In vitro* propagation of the biodiesel plant *Jatropha curcas* L. *Plant Tissue Cult Biotech* 17:137-147
- King, A; He, W; Cuevas, J; Freudenberg, M.; Ramiarmanana, D; Graham, L. 2009. Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No 10, 2897-2905
- Koona, S; Kondeti, S; Doulathabadh, M; Pinnamaneni, R. 2011. *In vitro* clonal propagation of *Jatropha curcas* (L.) using nodal explant and assessment of genetic fidelity through RAPD markers. *Current Biotica*, India, 5(1):1-16
- Kone-Bamba, D; Pelissier, Y; Ozouko, Z; Ouao, D. 1987. Etude de l'activité hémostatique de quinze plantes médicinales de la "Pharmacopée Traditionnelle Ivoirienne". *Plant. Med. Phytother.*, 21:121-130

- Khafagy, S; Mohamed, Y; Abdel, S; Mahmoud, Z. 1977. Phytochemical study of *Jatropha curcas*. *Planta Med.*, 31: 274-277
- Khurana-Kaul, V; Kachhwaha, S; Othari, S. 2010. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to Thidiazuron and high copper contents in the medium. *Biol. Plant.* 54(2): 369-372
- Kumar, N; Anand, V; Reddy, M. 2011. Plant regeneration of non-toxic *Jatropha curcas* – impacts of plant growth regulator, source and type of explants. *Plant Biochem. Biotechnol.* 20(1):125-133
- Kumar, N; Reddy, M. 2010. Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant. *Ann Appl Biol.* 156: 367-375
- Kumar, N; Anand, V; Reddy, M. 2010a. Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodiesel plant. *Acta Physiol Plant.* Polish Academy of Sciences, Kraków. 8 p.
- Kumar, N; Anand, V; Reddy, M. 2010b. *In vitro* plant regeneration of non-toxic *Jatropha curcas* L.: Direct shoot organogenesis from cotyledonary petiole explants. *Crop Sci. Biotech.* 13(3): 189-194
- List, P; Horhammer, L. 1979. Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Springer, Berlin.
- Lloyd, G; McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30:421-427
- Machado, R; Suárez, J. 2009. Performance of three provenances of *Jatropha curcas* in the germoplasm bank of the EEPF "Indio Hatuey". *Pastos y Forrajes*, Vol. 32, No 1. 29-37
- Martínez, J. 2008. El piñón mexicano: como fuente de energía renovable en el estado de Morelos. Foro nacional sobre cultivos productores de biodiesel (*Jatropha curcas*, *ricinus communis*). *Memorias*. Aguascalientes, México, págs.13-23

- Martínez, J; Evangelista, S; Martinez, A. 2007. Perfil nutricional de semillas de *Jatropha curcas* L. provenientes de Michoacán. Alimentos Ciencia e Ingeniería. 16:313-314
- Martínez, J; Siddhuraju, P; Francis, G; Davila, G; Becker, K. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from México. Food Chemistry. 96:80-89
- Martínez, G; Jiménez, R; Cruz, R; Juárez, A; Garcia, R; Cervantes, A; Mejía, R. 2002. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. Anales del Instituto de Biología, UNAM, Ser. Bot. 73(2):155-281
- Maxted, F; Ford-Lloyd, B; Hawkes, J. 1997. Plant Genetic Conservation: The *In Situ* Approach. London, Chapman and Hall. 425 p.
- Mesén, F. 1997. Enraizamiento de estacas juveniles de especies forestales: uso de propagadores de sub-irrigación/Francis Mesén. Turrialba, CR : CATIE. Proyecto de Semillas Forestales, (Serie técnica. Manual técnico/CATIE; No 30). 36 p.
- Meryman H. T.; Williams R. J.; Douglas, S. J. 1977. Freezing injury from solution effects and its prevention by natural or artificial cryoprotection. Cryobiology 14: 287–302
- Montagnini, F. 1992. Sistemas agroforestales: principios y aplicaciones en los trópicos. 2 ed. San José, CR. Organización para Estudios Tropicales (OET). 622 p.
- Mujumdar, A; Upadyhe, A; Misar, A. 2000. Studies on antidiarrhoeal activity of *Jatropha curcas* root extract in albino mice. J. Ethnopharmacol., 70: 183-187
- Mukherjee, P; Varhney, A; Johnson, T; Jha, T. 2011. *Jatropha curcas*: A review on Biotechnological Status and Challenges, Plant Biotech Rep. doi: 10.1007/s11816-011-0175-2
- Muñoz, M. 2009. Caracterización morfométricas de cuatro ecotipos de piñón (*Jatropha curcas*), asociado con teca (*Tectona grandis*). Tesis de grado, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la producción. Guayaquil, Ecuador, Escuela Superior Politécnica del Litoral. 78 p.

- Nath, L; Dutta, S. 1991. Extraction and purification of curcain, a protease from the latex of *Jatropha curcas* Linn. *Ind. J. Pharmacol.*, 43: 111-114
- Neuwinger, H. 1994. African Arzneip ances and huntingpoisons. WV Gesmb H, Germany. 450 p.
- Normah, N; Choo, K; Yap, V; Zeti, M. 2011. *In vitro* conservation of Malaysian biodiversity-achievements, challenges and future directions. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Malaysia*. 47:26-36
- Nunes, L. 2007. Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Brasil, 78 p.
- Oliver, B. 1986. Medicinal Plants in Tropical West Africa, Cambridge University Press, London. 355 p.
- Pabón, L; Hernández, P. 2012. Importancia química de *Jatropha curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Universidad de la Salle. Bogota, Col. 17(2): 194-209
- Parveen, B; Shikha, R; Ashawani, K. 2007. Traditional uses of medicinal plants among the rural communities of Churu district in the Thar Desert, India. *J. Ethnopharmacol.*, 113: 387-399
- Parsons, K. 2005. *Jatropha* in Africa: fighting the desert & creating wealth. EcoWorld. Disponible en: <http://www.ecoworld.org/home/Articles2.cfm?TID=367>.
- Pedraza, E; Cayón, D. 2010. Caracterización morfofisiológica de *Jatropha curcas* L. Variedad Brasil cultivada en dos zonas de Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Vol. 59, N° 1.
- Perry, L; Metzger, J. 1980. Medicinal Plants of East and Southeast Asia. MIT Press, Cambridge. 246-247
- Prasad, D; Izam, A; Khan, M. 2012. *Jatropha curcas*: Plan of medical benefits. *Journal of Medicinal Plants Research*. Pahang, Malaysia. Vol. 6(14), 2691-2699

- Purkayastha, A; Sugla, T; Solleti, S; Mazumdar, P; Basu, A; Mohommad, A; Ahmed, Z; Sahoo, L. 2010. Efficient *in vitro* plant regeneration from shoot apices and gene transfer by particle bombardment in *Jatropha curcas*. Biol. Plant. 54(1):13-20
- Qin, W; Wei-Da, L; Yi, L; Shu-Lin, P; Ying, X; Lin, T; Fang, C. 2004. Plant regeneration from epicotyls explant of *Jatropha curcas*. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, China. 30(4):475-478
- Quimbayo, A. 2010. El uso del cultivo de la *Jatropha curcas* L. en sistemas agroforestales y silvopastoriles y su potencial para contribuir al desarrollo social y económico de un cultivo de expansión mundial. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica). Villavicencio, Col. 35 p.
- Rajore, S; Batra, A. 2005. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. Plant Biochem Biotech 14:73-75
- Salinas, N; Armijos, V; Jimenez, P; Proaño, K. 2011. Caracterización y estudio de la diversidad genética del piñón (*Jatropha curcas*) mediante el uso de marcadores moleculares. Revista Ciencia. Vol. 14,1. 31-40
- Samson, M; Mergear, G; Baudoin, J; Toussaint, A. 2011. Culture *in vitro* de *Jatrpha curcas* L. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 15(4) 657-574
- Sánchez, D. 2008. Obtención, análisis y germinación de semillas de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae Juss.) no tóxica de Veracruz, México. Tesis Trabajo de experiencia recepcional, Xalapa, Veracruz, México, Universidad Veracruzana. 57 p.
- Sanhueza, E. 2009. Agroetanol ¿un combustibles ambientalmente amigable? INCI, ISSN 0378-1844. Venezuela. Vol. 34, No 2. 106-112
- Sardana, J; Batra, A; Ali, D. 2000. An expeditious method for regeneration of somatic embryos in *Jatropha curcas* L. Phytomorphology 50:239-242
- Schmook, B; Sánchez, S. 2000. Uso potencial de *Jatropha curcas* L. en la península de Yucatán, México. Foresta Veracruzana 2(2):7-11

- Schmook, B; Seralta, L. 1997. *J. curcas*: distribution and uses in the Yucatan Peninsula of Mexico. In: Biofuels and industrial products from *Jatropha curcas*. (Gübitz G M; Mittelbach M; Trabi M, eds), DBV Graz. 53–57
- Shrivastava, S; Banerjee, M. 2008. *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Onfluence de additives. International Journal of Integrative Biology. A journal for biology borders, Bhopal, India. Vol. 3 No. 1, 73 p.
- Silva, R; Camillo, J; Pereira, s. 2012. A method for seedling recovery in *Jatropha curcas* after cryogenic exposure of the seeds. Rev. Biol. Trop. Vol. 60 (1):473-482.
- Singh, Y; Ika hifo, T; Panuve, M; Slatter, C. 1984. Folk medicine in Tongga. A study on the use of herbal medicines for obstetric and gynecological conditions and disorders. J. Ethnopharmacol. 12: 305-329
- Scocchi, A; Dieringer, E; Mroginski, E; Mroginski, L. 2004a. Conservación de semillas de cedro australiano (*Toona ciliata*). Plant Genetic Resources Newsletter 137:1-4
- Scocchi, AM; Rey, HY. 2004b. Conservación de germoplasma *in vitro*. In Biotecnología y mejoramiento vegetal. Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. eds. Buenos Aires, AR, Ediciones INTA. 179-185
- Somarriba, E. 1992. Revisiting the past: an essay on agroforestry definition. Agroforestry Systems. 19:233-240
- Soomro, R; Memon, R. 2007. Establishment of callus and suspensión culture in *Jatropha curcas*. Pak. J. Bot. 39:2431-2441
- Sordo, L; Sordo, V. 2007. Especies utilizadas como cercas vivas por los productores en la agricultura urbana. Que hacer orgánico. O.B.ACTAE, Instituto de Investigaciones Forestales. Cuba.
- Staubmann, R; Manfred, S; Alois, H; Theodor, K. 1999^a. A complex of 5-hydroxypyrrolidin-2-one and pyrimidine-2,4-dione isolated from *Jatropha curcas*. Phytochemistry, 50: 337-338.
- Staubmann, R; Neube, I; Gubitz, G; Steiner, W; Read, J. 1999^b. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds. J. Biotechnol., 75: 117-126

- Stirpe, B; Pession-Brizzi, A; Lorenzoni, P; Montanaro, L; Sperti, Simonetta. 1976. Studies on the from the seeds of *Croton tiglium* y *Jatropha curcas*. Biochen. J. Bologna, Italy Vol. 156, 1-6
- Sudhakar, J; Eswaran, N; Sujatha, M. 2011. Molecular approaches to improvement of *Jatropha curcas* Linn. As a sustainable energy crop. Plant Cell Rep. 30:1573-1591
- Sujatha, M; Makkar, H; Becker, K. 2005. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. Plant Growth Regulation. Vol. 47. No 1, 83-90
- Sujatha, M; Reddy, N. 2000. Morphogenic responses of *Jatropha integerrima* explants to cytokinins. *Biologia*,55: 99-104
- Sujatha, M; Mukta, N. 1996. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 44: 135-141
- Tejedor, B. 2010. Micropropagación de *Jatropha curcas* L. Trabajo final de carrera, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. 72 p.
- Thepsamran, N; Thepsithar, C; Thongpukdee, A. 2007. *In vitro* multiple shoot induction of physic nut (*Jatropha curcas*). http://www.scisoc.or.th/stt/32/sec_f/paper/stt32_F_F0007.pdf
- Thomas, O. 1989. Reexamination of the antimicrobial activities of *Xilopia aethiopica*, *Carica papaya*, *Ocimum gratissimum* and *Jatropha curcas*. Fitoterapia. 60 (2): 147 p.
- Toral, O; Igelsias, J; Oca, S; Sotolongo, J; Garcia, S; Torsti, M. 2008. *Jatrpaha curcas* L., a tree species with energetic potential in Cuba. Pastos y Forrajes, Cuba. Vol. 31 (3) 191-207
- Van den Berg, A; Horsten, S; Ketteness van den, B; Kroes, B; Beukelman, C; Leeftang, B; Labadie, R. 1995. Curcacycline A, a novel cyclic octapeptide isolated from the latex of *Jatropha curcas* L. F.E.B.S. Lett., 358: 215-218

- Varshney, A; Johnson, T. 2010. Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant. *Plant Biotech Rep.* 4:139-148
- Verma, K; Gaur, A. 2009. *Jatropha curcas* L.: Substitute for Conservation Energy. *World Journal of Agricultural Sciences, India.* 5(5): 552-556
- Veen, M. 2011. Promoción de *Jatropha* en sistemas agroforestales en San Martín, Perú. Informe de evaluación. SNS (Netherlands Development Organisation), Perú. 37 p.
- Zhijun, D; ZhenYong, X; HongYan, C; YanJun, L; SongQuan, S. 2008. Preliminary study on development, germination and desiccation tolerance of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). *Acta Botanica Yunnanica, Mengla* 666303, China. 30(3): 355-359

ANEXO

Anexo 1. Modelos lineales generalizados mixtos para la interacción entre las variedades tóxica (T) y de baja toxicidad (NT) y tipo de explante semimaduro (SM) y juvenil (J) evaluado en la fase de formación de callo organogénico.

Tipo explante	Variedad	PredLin	E.E.	Media	E.E.
J	NT	92,0	1,5	71,0 a	0,3
SM	NT	92,0	1,5	71,0 a	0,3
SM	T	82,0	1,5	71,0 a	0,3
J	T	67,0	1,5	66,0 a	0,3

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).

Anexo 2. Efecto de la AIA y la BAP solas y en combinación de GA3 en el crecimiento de los brotes provenientes de callos organogénicos de *J. curcas*.

GA₃	Reguladores	Medias	E.E.
0,0	AIA	15,8 a	1,18
0,0	BAP	8,40 b	1,18
0,5	AIA	3,40 c	1,18
0,5	BAP	2,00 c	1,18
0,25	BAP	1,20 c	1,18
0,25	AIA	1,00 c	1,18

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).

Anexo 3. Pruebas de hipótesis marginales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	301,76	<0,0001
Medio cultivo	1	11,01	0,0016
Caseína hidrolizada	1	10,16	0,0023
Medio cultivo: cas.hid.	1	1,22	0,2734

Medias ajustadas y errores estándares para medios de cultivo

Medio cultivo	Medias	E.E.
MS	5,30 a	0,47
WPM	3,60 b	0,21

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).

Medias ajustadas y errores estándares para caseína hidrolizada (cas.hid)

Cas.hid. (mg/l)	Medias	E.E.
100	5,27 a	0,46
200	3,63 b	0,22

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).

Anexo 4. Análisis de varianza para las variables evaluadas en la fase de regeneración de brotes de *J. curcas*.

	Valor	E.E.	t-valor	p-valor
(Intercept)	0,40	0,21	1,95	0,0566
Variedad	0,07	0,29	0,23	0,8194
Tipo explante	-0,20	0,29	-0,69	0,4941
Variedad : Tipo explante	3,87	0,41	9,41	<0,0001

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (LSD Fisher; $p \leq 0,05$).

Anexo 5. Determinación del contenido de humedad de semillas de *J. curcas*

No ensayo	Peso inicial (gr.)	Peso final (gr.)	C.H. (%)	Promedio C.H. (%)
1	5,02	4,63	7,68	7,4
2	5,28	4,89	7,39	
3	5,46	5,07	7,20	
4	5,43	5,04	7,23	
5	5,22	4,83	7,40	

Anexo 6. Determinación del contenido de humedad de los embriones cigóticos de *J. curcas*.

No ensayo	Tiempo de secado	Peso inicial (gr.)	Peso final (gr.)	C.H. (%)	Promedio C.H. (%)
1	0	136,3	120,7	11,4	11,6
2	0	135,1	119,5	11,5	
3	0	132,8	117,2	11,7	
1	30	123,8	111,7	9,8	9,7
2	30	122,2	110,4	9,7	
3	30	130,3	117,8	9,6	
1	60	130,2	118,1	9,3	9,4
2	60	134,5	121,8	9,4	
3	60	132,6	120,2	9,4	