

INDUCCIÓN ORGANOGÉNICA DE *JATROPHA CURCAS* L. A PARTIR DE HOJAS JÓVENES**ORGANOGENIC INDUCTION OF *JATROPHA CURCAS* L. FROM YOUNG LEAVES**

**I.L. Pequeño-Granado¹, R.E. Vázquez-Alvarado¹, J.A. Santos-Haliscak¹,
A.I. Luna-Maldonado¹, G. Moreno-Degollado³, L. Iracheta-Donjuan²,
P. López-Gómez¹, M. Castellanos-Juárez¹, y M.C. Ojeda-Zacarias¹**

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Campus de Ciencias Agropecuarias, Facultad de Agronomía, Francisco Villa s/n, col. Ex-Hacienda El Canadá, 66054 Escobedo, Nuevo León, México. ²Instituto Nacional Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Rosario Izapa, Km 18 de la carretera Tapachula a Cacahoatan, 30870 Tuxtla Chico, Chiapas, México. ³Centro de Producción Agropecuaria. Universidad Autónoma de Nuevo León. Carretera Nacional Linares-Cd. Victoria Km. 145, cp 67700, ap 93, Linares, Nuevo León, México.

Correo electrónico: ojedacz@yahoo.com.mx

RESUMEN

Jatropha curcas L., conocida en México como piñoncillo, es una especie productora de aceite, la cual ha recibido gran atención en recientes años al ser utilizada como fuente para la elaboración de biodiesel debido que sus semillas llegan a producir de 46 a 64% de aceite. Sin embargo, la producción de *Jatropha* ha demostrado limitado éxito debido al heterogéneo rendimiento de semillas y contenido de aceite. Por tal motivo, se ha impulsado la selección de genotipos con características de rendimiento superiores para ser propagados a gran escala. Por esta razón, la propagación clonal mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales ofrece una alternativa de homogeneidad genética. Por lo que, en esta investigación se estudió la inducción organogénica a partir de hojas jóvenes de piñoncillo de un genotipo mexi-

cano. Logrando el establecimiento aséptico de los explantes en el medio de cultivo Murashige & Skoog 1962 (MS), después de 14 días del establecimiento *in vitro*, existiendo un 70% de explantes asépticos. Con respecto a la inducción de yemas la mayor respuesta se logro en el tratamiento uno, utilizando el mismo medio básico de (MS) suplementado con 1.0 mg L⁻¹ de 6-bencil-aminopurina (BA) y 0.5 mg L⁻¹ de ácido indol-3-butírico (AIB), logrando la formación de yemas después de 60 días, el porcentaje de viabilidad se presentó en un 37.5%, mientras que el número de yemas adventicias fue de 2.2, todos los tratamientos presentaron la asociación de callo. Mientras que en la proliferación de brotes, la mayor respuesta se presento en el tratamiento dos, mas la adición de 0.5 mg L⁻¹ de BA, con un promedio de 5.14 brotes por explante después de cuatro semanas.

Palabras clave: hoja, *in vitro*, yemas, brotes, *Jatropha curcas* L., inducción.

ABSTRACT

Jatropha curcas L., known in Mexico as “piñoncillo”, is an oil producing species, which has received much attention in recent years as a source for biodiesel production because their seed yield from 46 to 64% oil. However, *Jatropha* production has shown limited success due to heterogeneous seed yield and oil content. For this reason, the selection of genotypes with superior performance characteristics to be propagated on a large scale has increased. Therefore, clonal propagation by plant tissue technique offers an alternative for genetic omogeneity. So, in this research, the organogenic induction from young leaves of a Mexican *Jatroppha* genotype was studied. The establishment of *in vitro* aseptic explants in Murashige & Skoog 1962 (MS) culture media was accomplished after 14 days with 70% aseptic explants. With respect to the induction of buds, greater response was achieved in treatment one, using the same basic media supplemented with 1.0 mg L⁻¹ 6-benzyl-aminopurine (BA) and 0.5 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA), achieving bud formation after 60 days, viability was 37.5%, while the number of adventitious buds was 2.2, all treatments showed callus association. In bud proliferation, the greatest response was in treatment two, with the addition of 0.5 mg L⁻¹ BA, with an average of 5.14 shoots per explants after four weeks.

Key words: leaf, *in vitro*, buds, shoots, *Jatropha curcas* L., induction.

INTRODUCCIÓN

Jatropha curcas L. conocida en México como piñoncillo, es una especie perteneciente a la familia de las Euphorbiaceae, que podemos encontrar en climas tropicales y subtropicales de América Latina, África y Asia (Francis *et al.*, 2005; Brittain y Litaladio, 2010). Se considera centro de origen México y Centro América, donde se desarrolla en forma silvestre (Heller, 1996). Es un arbusto grande o árbol pequeño de rápido crecimiento que puede alcanzar más de cinco metros de altura en buenas condiciones, es tolerante a sequías y fácil propagación (Divakara *et al.*, 2010). La planta se utiliza ampliamente como cerco vivo, tutor de otros cultivos, control de erosión, como subproductos en la elaboración de jabones, plaguicidas también es utilizada con fines medicinales (Brittain y Litaladio, 2010); donde sobresale su comprobada actividad antiviral en contra de cepas resistentes del VIH (Dahake *et al.*, 2012). Por otro lado, la producción de semillas con altos contenidos de aceite que varían de 46-64% (Martinez-Herrera *et al.*, 2010); ha recibido gran atención al ser utilizado como materia prima para elaboración de biodiesel (Kumar *et al.*, 2007; Ceasar y Ignacimuthu, 2011).

Tradicionalmente *Jatropha curcas* L., es propagada a partir de semillas y esquejes, las cuales cuentan con múltiples desventajas, entre las principales, se encuentra la gran variabilidad genética presente cuando es propagada por semillas, atribuida a la polinización cruzada de la especie (Ginwal *et al.*, 2005). Por otro lado, la propagación clonal por esquejes es posible, pero tiene múltiples desventajas, por ejemplo, menor longevidad, débil anclaje al suelo, bajo rendimiento de semillas, alta susceptibilidad a

plagas y enfermedades; debido al desarrollo de pseudo-raíces la tolerancia a sequía es baja (Sujatha *et al.*, 2005; Brittain y Lutaladio, 2010; Mukherjee *et al.*, 2011).

Con base en lo anterior, el uso de la técnica del cultivo de tejidos vegetales ofrece una alternativa para producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto (Sujatha *et al.*, 2005; Misra *et al.*, 2010a; Olmos *et al.*, 2010). La inducción organogénica de brotes de novo a partir de explantes cultivados *in vitro* es una vía frecuentemente usada en los métodos de mejoramiento biotecnológico como la micropropagación *in vitro* (Duclercq *et al.*, 2011). La organogénesis de novo se basa en la totipotencia de las células somáticas para generar plantas enteras *in vitro*. (Iliev *et al.*, 2010). El desarrollo de meristemas de novo está influenciado por la aplicación de reguladores de crecimiento exógenos (Sangwan *et al.*, 1997; Iliev *et al.*, 2010). El cultivo de tejidos vegetales, hace uso de la organogénesis directa a través del estímulo de reguladores de crecimiento para impulsar el desarrollo de brotes adventicios (Beyl, 2010).

En estudios de micropropagación de *Jatropha curcas*, el medio más utilizado es el (Murashige y Skoog, 1962) MS, el cual se reporta que estimula y mejora la respuesta de los tejidos (Ceasar y Ignacimuthu, 2011; Mukherjee *et al.*, 2011). En la inducción de organogénesis directa a partir de explantes de hoja los reguladores de crecimiento más empleados han sido N6-bencilaminopurina (BA) y ácido indol-3-butírico (AIB) (Sujatha *et al.*, 2008). Así mismo; Sujatha y Mukta (1996) reportan que utilizando el mismo tipo de explante tuvieron la inducción de brotes mediante el uso de BAP en

combinación con AIB. Existen diversos trabajos relacionados con la regeneración de *Jatropha curcas* L. desarrollados a través de la organogénesis directa, utilizando diferentes tipos de explantes tal es el caso de (Sujatha y Mukta, 1996; Kumar y Reddy, 2010; Kumar *et al.*, 2010a; Sharma *et al.*, 2011, Kumar y Reddy, 2012) que a través de peciolos, cotiledones e hipocotilos lograron la regeneración de la especie. Así mismo, Khurana-Kaul *et al.* (2010); Kumar *et al.* (2010c); Misra *et al.* (2010a); Kumar *et al.* (2011), lograron la regeneración directa a partir de hojar; mientras que, Wei *et al.* (2004) logró buenos resultados a través de epicótilos, por su parte Datta *et al.* (2007); Shrivastava y Banerjee (2008); Misra *et al.* (2010b); Singh *et al.* (2010) trabajando con nudos axilares lograron buenos resultados en la regeneración de la especie; por otro lado, Daud *et al.* (2013) logró la regeneración a través de los ápices *in vivo*. Aunque, la mayoría de los estudios que se reportan en organogénesis se han hecho a partir de genotipos de la India, de modo que es necesario el estudio de los factores que afectan la organogénesis en genotipos mexicanos, ya que se han encontrado amplias variaciones genéticas entre genotipos (Basha y Sujatha, 2007). Por tal motivo, en este estudio se planteó desarrollar una metodología para inducir la organogénesis directa de un genotipo mexicano de piñoncillo, mediante la técnica de cultivo de tejidos. Así como definir el medio de cultivo y dosis de reguladores de crecimiento para el establecimiento e inducción de brotes en el genotipo utilizado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Como material experimental se empleó el genotipo INI-6 de *Jatropha curcas* L.

donado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Rosario Izapa, km 18 de la carretera Tapachula a Cacahoatan, 30870 Tuxtla Chico, Chiapas, México. La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía, unidad Marín de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Ubicado en la carretera Zuazua-Marín Km 17.5 del municipio de Marín, Nuevo León, México.

Técnica de desinfección de los explantes

La predesinfección consistió en la selección de hojas jóvenes en óptimas condiciones de estacas en invernadero de dos meses de edad, obtenidas de árboles adultos en producción. El material vegetal colectado se lavó con jabón líquido y agua potable, para poder llevarlos a condiciones de asepsia bajo una campana de flujo laminar para realizar el proceso de desinfección. Los explantes fueron sumergidos en etanol al 70% por 30 segundos, posteriormente se realizó la inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.0% durante 5, 10 y 15 min (cuadro 1). Los tratamientos fueron adicionados con 0.1% de tween-20, concluido el periodo de inmersión en el agente desinfectante se realizaron tres enjuagues con agua bidestilada estéril, procediéndose a colocar los explantes en una solución antioxidante basada en (Misra *et al.*, 2010b), constituida por sacarosa, 3.0% p/v; glutatión reducido, 25 mg L⁻¹; ácido ascórbico, 10 mg L⁻¹, durante el desarrollo de la siembra.

Inducción de explantes *in vitro*

Con la finalidad de desarrollar la morfogénesis directa en explantes de la especie,

se procedió a realizar cortes de láminas de hojas de 1.0 cm² como fuente de explante los cuales fueron sembrados en medio basal MS en frascos de vidrio con 20 ml de medio de cultivo, adicionados con vitaminas y reguladores de crecimiento: Inositol 100 mg L⁻¹; Tiamina 0.1 mg L⁻¹; Piridoxina 0.5 mg L⁻¹; Glicina 2.0 mg L⁻¹; Sacarosa 30 g L⁻¹; Phytigel® 4.5 g L⁻¹; pH ajustado a 5.60 ± 0.02. Los reguladores de crecimiento fueron Benciladenina, BA, 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ y el Ácido Indolbutírico, AIB, 0.1 y 0.5 mg L⁻¹, en este experimento no se incluyó el uso de un testigo debido a que en bioensayos anteriores no existió desdiferenciación celular en ausencia de fitohormonas en los explantes después de cuatro y seis semanas de permanecer en los medios de cultivo por esta razón no se utilizaron otras fuentes de sales minerales en esta investigación. (cuadro 2). Concluida la siembra las unidades experimentales fueron colocadas en condiciones controladas de temperatura de 26 ± 2°C y bajo condiciones de fotoperiodo de 16 horas luz a 35-40 μmol m⁻² s⁻¹. Se establecieron bajo un modelo estadístico completamente al azar, con 10 repeticiones por tratamiento. Los datos fueron analizados a través de análisis de varianza utilizando el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 20. Las variables a evaluar fueron porcentaje de contaminación, oxidación, viabilidad, número de yemas y presencia de callo. El porcentaje de contaminación y oxidación se evaluara después de 14 días del establecimiento *in vitro*, mientras que las otras hasta los 60 días.

Proliferación de brotes

Concluida la fase de inducción de yemas, los explantes fueron subcultivados al mismo medios de cultivo MS pero con tres dosis del

Cuadro 1. Concentración del hipoclorito de sodio y tiempo de exposición en explantes de hojas de *Jatropha curcas* L.

Tratamiento	T ₁	T ₂	T ₃
1% NaClO	5 min.	10 min.	15 min.

La solución de hipoclorito de sodio fue preparada a partir de Cloralex®, el cual tiene una concentración de 5.4 % de NaClO (Cárdenas-Bahena *et al.*, 2012).

Cuadro 2. Combinación de reguladores de crecimiento en la inducción de yemas adventicias en segmentos de hojas de *Jatropha curcas* L.

Reguladores de crecimiento (mg l ⁻¹)	Tratamiento	
BA 0.5	AIB 0.1	T ₁
BA 1.0	AIB 0.5	T ₂
BA 1.0	AIB 0.1	T ₃
BA 0.5	AIB 0.5	T ₄

regulador de crecimiento, para esta etapa se utilizó el BA a razón de (0.5, 1 y 2 mg L⁻¹). De igual manera que la etapa anterior, las unidades experimentales se establecieron bajo un modelo estadístico completamente al azar, con 10 repeticiones por tratamiento en condiciones controladas similares a la etapa anterior. Los datos fueron analizados a través de análisis de varianza utilizando el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 20. Las variables a evaluar fueron: número de brotes después de cuatro semanas del subcultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Técnica de desinfección de los explantes

La técnica de desinfección utilizada favoreció el establecimiento aséptico de explantes al controlar la contaminación y permitir continuar el desarrollo de los explantes *in vitro*. Después de transcurridos 14 días se logró observar claramente la respuesta con relación al porcentaje de contaminación y oxidación en los tratamientos, los cuales variaron en función de la concentración del NaClO y tiempo de exposición (cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentajes de explantes contaminados y oxidados en los diferentes tratamientos que fueron sometidos segmentos de hojas jóvenes de *Jatropha curcas* L.

Tratamientos	T ₁	T ₂	T ₃
1.0 % NaClO	5 min.	10 min.	15 min.
Contaminación/oxidación	100/50	30/70	20/100

Los resultados mostraron que el tratamiento dos expresó un 70% de explantes asépticos y 30% de explantes sin oxidación y viables, en comparación con los resultados del tratamiento tres, que presentó oxidación en todos los explantes con cero viabilidad y el tratamiento uno contaminación total. Esta respuesta se puede sustentar con lo mencionado por Mroginski *et al.* (2010) que señala que uno de los métodos más empleados para el control de la contaminación microbiana en cultivo de tejidos vegetales consiste en la inmersión de explantes en etanol al 70% durante 20-60 segundos, seguido de la inmersión en NaClO del 1.0 a 3.0%. Así mismo, Daudet *et al.* (2011) mencionan que los principales agentes desinfectantes utilizados en la desinfección de *Jatropha curcas* son el cloruro de mercurio (HgCl₂) y el hipoclorito de calcio (Ca(ClO)₂). Por lo tanto, el NaClO puede ser utilizado en la desinfección de hojas de esta especie.

Con respecto a la oxidación los resultados muestran un aumento en función del tiempo de exposición al agente desinfectante produciendo serios daños en los tejidos, esto conlleva al oscurecimiento de los mismos. Así mismo, He *et al.*, (2009) menciona que el oscurecimiento es producto de la oxida-

ción de fenoles para formar quinonas, los cuales reaccionan generando daño e incluso la muerte de los tejidos vegetales. Por su parte, Olmos *et al.* (2010) y Hernández y González (2010) reportan que en especies leñosas es común la secreción de polifenoles oxidados al medio del cultivo, visibles como pigmentos marrones y/o negros.

Evaluación de la inducción de explantes *in vitro*

El desarrollo de los explantes se logró en medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) en combinación de 1.0 mg L⁻¹ de 6-bencil-aminopurina (BA) y 0.5 mg L⁻¹ de ácido indol-3-butírico (AIB), se observó se y cuantificó la formación de pequeñas estructuras después de 60 días, las variables que se evaluaron fueron porcentaje de viabilidad, número de yemas por explante y formación de callo (cuadro 4). El análisis de varianza mostró una diferencia significativa realizándose una comparación de medias a través de la prueba de Tukey mostrando diferencia en el tratamiento uno, en comparación con el tratamiento tres y cuatro, pero siendo similar estadísticamente al tratamiento dos. De tal manera que lo anterior puede atribuirse a la relación de auxinas y citocininas utilizadas, que

Cuadro 4. Influencia de diferentes tratamientos sobre viabilidad, número de yemas y formación de callo en explantes de hojas jóvenes de *Jatropha curcas* L. después de ocho semanas de permanecer en el medio de cultivo.

Tratamientos	Viabilidad de explantes (%)	Media de yemas adventicias ^a	Asociación de callo	
T ₁	37.5	2.2 ± 0.75	a	+
T ₂	16.6	1.5 ± 0.83	a	b +
T ₃	4.1	0.5 ± 0.54	b	+
T ₄	8.3	0.2 ± 0.51	b	+

Valores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo con la prueba Tukey a una $P \geq 0.05$. Valor de significancia y coeficiente de variación se determinaron después de una transformación con +1. a Media de diez repeticiones. "+" signo denota presencia de callo.

estimulan el desarrollo de brotes (Skoog y Miller, 1957; Che *et al.*, 2002).

Evaluación de proliferación de brotes

La proliferación de brotes fue registrada a las cuatro semanas después de establecidos los explantes en el medio de cultivo MS, con tres dosis de BA, presentándose una mayor respuesta en el tratamiento uno (cuadro 5). El análisis de varianza mostró una diferencia significativa y al realizar la comparación de medias a través de Tukey se encontró diferencia en los tratamientos dependiendo a la dosis al BA, que contenía el medio de cultivo, de acuerdo a los resultados presentados se muestra una tendencia que a medida que se incrementa la dosis del BA disminuye el número de brotes.

CONCLUSIONES

Con respecto a la técnica de desinfección se logró el establecimiento aséptico de los explantes esto permitió continuar con la siguiente etapa de desarrollo *in vitro* de hoja de *Jatropha curcas* L. en condiciones asépticas.

La mayor respuesta de inducción morfogénica se logró en medio de cultivo de MS más la adición de 1.0 mg L⁻¹ de (BA) y 0.5 mg L⁻¹ (AIB), la respuesta fue de un 37.5% de viabilidad y 2.2 yemas adventicias en promedio por explante, mediante la vía de la organogénesis directa.

El mayor número de brotes se presentó en la etapa de proliferación en el mismo medio de cultivo con 0.5 mg L⁻¹ de BA con un promedio de 5.14 brotes por explante.

Recomendaciones

Se recomienda establecer las plantas madres en condiciones de invernadero, para poder tomar varetas como fuente de explantes de una manera más controlada con el saneamiento de las hojas jóvenes de *Jatropha curcas* L. y bajar los índices de contaminación en el establecimiento *in vitro*.

Se recomienda ajustar el medio de cultivo y las dosis de los reguladores de crecimiento en las siguientes etapas de desarrollo de la organogénesis de la especie. Por otro lado, se sugiere hacer uso de antioxidantes en medio de cultivo para disminuir la oxidación en los explantes.

AGRADECIMIENTO

Al Programa de Apoyo de Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT, 2011) otorgado a través de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

LITERATURA CITADA

Basha, S.D., y M. Sujatha, 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.

Beyl, C.A., 2010. "PGRs and their use in micropropagation". *Plant tissue culture, development and biotechnology*. Eds. Trigiano and Gray: CRC Press. 608 p.

Brittaine, R., y N. Lutaladio, 2010. *Jatropha: A smallholder bioenergy crop. The potential for pro-poor development,*

Integr Crop Manag. Rome, Italy: FAO. pp. 96.

Cesar, S.A., y S. Ignacimuthu, 2011. "Applications of biotechnology and biochemical engineering for the improvement of *Jatropha* and Biodiesel: A review". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **15**: 5176-5185.

Che, P.; D.J. Gingerich, S. Lall, y S.H. Howell, 2002. "Global and Hormone-Induced Gene Expression Changes during Shoot Development in Arabidopsis". *Plant Cell*, **14**: 2771-2785.

Dahake, R.; S. Roy, D. Patil, A. Chowdhary, y R. Deshmukh, 2012. "Evaluation of anti-viral activity of *Jatropha curcas* leaf extracts against potentially drug-resistant HIV isolates". *BMC Infectious Diseases*, **12**(Suppl 1): P14.

Datta, M.M.; P. Mukherjee, B. Ghosh, y J. Timir Baran, 2007. "In vitro clonal propagation of biodiesel plant (*Jatropha curcas* L.)". *Current Science* (00113891), **93**: 1438-1442.

Daud, N.; A. Faizal, y D. Geelen, 2013. "Adventitious rooting of *Jatropha curcas* L. is stimulated by phloroglucinol and by red LED light". *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, **49**: 183-190.

Daudet, M.M.S.; G. Mergeai, J.P. Baudoin, y A. Toussaint, 2011. "Culture *in vitro* de *Jatropha curcas* L." *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **15**(4): 567-574.

- Divakara, B.N.; H.D. Upadhyaya, S. P. Wani, y C.L.L. Gowda, 2010. "Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review". *Applied Energy*, **87**: 732-742.
- Francis, G.; R. Edinger, y K. Becker, 2005. "A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socioeconomic development in degraded areas in India Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations". *Natural Resources Forum*, **29**: 12-24.
- Ginwal, H.S.; S.S. Phartyal, P.S. Rawat, y R.L. Srivastava, 2005. "Seed source variation in morphology, germination and seedling growth of *Jatropha curcas* Linn. in Central India. [Erratum: 2006, v. 55, no. 2, p. 92.]" *Silvae genetica*, **54**: 76-80.
- He, Y.; X. Guo, R. Lu, B. Niu, V. Pasapula, P. Hou, F. Cai, Y. Xu, y F. Chen. 2009. "Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC), **98**: 11-17.
- Heller, J., 1996. *Physic nut. Jatropha curcas L. Promoting the conservation and use of underutilised and neglected crops*. Rome, Italy. pp. 66.
- Hernández, Y., y M.E. González, 2010. "Efecto de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales". *Cultivos Tropicales*, **31**: 58-69.
- Iliev, I.; A. Gajdosová, G. Libiaková, y S.M. Jain. 2010. "Plant micropropagation", en *Plant Cell Culture Essential Methods*, eds. Davey and Anthony: Wiley-Blackwell. 358 pp.
- Khurana-Kaul, V.; S. Kachhwaha, y S.L. Kothari, 2010. "Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium". *Biologia Plantarum*, **54**: 369-372.
- Kumar, N., y M.P. Reddy, 2010. "Plant regeneration through the direct induction of shoot buds from petiole explants of *Jatropha curcas*: a biofuel plant". *Annals of Applied Biology*, **156**: 367-375.
- , 2012. "Thidiazuron (TDZ) induced plant regeneration from cotyledonary petiole explants of elite genotypes of *Jatropha curcas*: A candidate biodiesel plant". *Industrial Crops and Products*, **39**: 62-68.
- Kumar, N.; K.G. Vijay Anand, y M. Reddy. 2010a. "*In vitro* plant regeneration of non-toxic *Jatropha curcas* L.: Direct shoot organogenesis from cotyledonary petiole explants". *Journal of Crop Science and Biotechnology*, **13**: 189-194.
- , 2011. "Plant regeneration of non-toxic *Jatropha curcas*—impacts of plant growth regulators, source and type of explants". *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, **20**: 125-133.
- Kumar, S.; S. Kumaria, y P. Tandon, 2010c. "Efficient *in vitro* Plant Regeneration Protocol from Leaf Explant of *Jatropha curcas* L — A Promising Biofuel

- Plant". *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, **19**: 273-275.
- Martínez-Herrera, J.; A.L. Martínez-Ayala, H. Makkar, G. Francis, y K. Becker. 2010. "Agroclimatic Conditions, Chemical and Nutritional Characterization of Different Provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico". *European Journal of Scientific Research*, **3**: 396-407.
- Misra, P.; N. Gupta, D. Toppo, V. Pandey, M. Mishra, y R. Tuli, 2010a. "Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, **100**: 189-197.
- Misra, P.; D.D. Toppo, N. Gupta, D. Chakrabarty, y R. Tuli, 2010b. "Effect of antioxidants and associate changes in antioxidant enzymes in controlling browning and necrosis of proliferating shoots of elite *Jatropha curcas* L". *Biomass and Bioenergy*, **34**: 1861-1869.
- Mroginski, L.; P. Sansberro, y E. Flaschland, 2010. "Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales", en *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*, eds. Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp and Mroginski. Buenos Aires, Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. pp. 17-25.
- Mukherjee, P.; A. Varshney, T.S. Johnson y T. Jha, 2011. "*Jatropha curcas*: a review on biotechnological status and challenges". *Plant Biotechnology Reports*, **5**: 197-215.
- Murashige, T., y F. Skoog, 1962. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum*, **15**: 473-497.
- Olmos, S.; G. Luciani, y E. Galdeano. 2010. "Micropropagación", en: *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*, eds. Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp and Mroginski. Buenos Aires, Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. pp. 353-362.
- Sharma, S.; N. Kumar, y M. P. Reddy, 2011. "Regeneration in *Jatropha curcas*: Factors affecting the efficiency of *in vitro* regeneration." *Industrial Crops and Products*, **34**: 943-951.
- Shrivastava, S., y M. Banerjee, 2008. "*In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Influence of additives." *International Journal of Integrative Biology*, **3**: 73.
- Singh, A.; M.P. Reddy, J. Chikara, y S. Singh, 2010. "A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas*—A biodiesel plant." *Industrial Crops and Products. Elsevier*, **31**(2): 209-213.
- Skoog, F., y C. O. Miller, 1957. "Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*" *Symposia of the Society for Experimental Biology*, **11**: 118-130.
- Sujatha, M.; H.P.S. Makkar, y K. Becker, 2005. "Shoot Bud Proliferation from Axillary Nodes and Leaf Sections of Non-toxic *Jatropha curcas* L." *Plant Growth Regulation*, **47**: 83-90.

- Sujatha, M., y N. Mukta, 1996. "Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*" *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **44**: 135-141.
- Sujatha, M.; T.P. Reddy, y M.J. Mahasi, 2008. "Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L". *Biotechnology Advances*, **26**: 424-435.
- Tiwari, A.K.; A. Kumar, y H. Raheman, 2007. "Biodiesel production from *Jatropha* (*Jatropha curcas*) with high free fatty acids: an optimized process". *Biomass and Bioenergy*, **31**: 569-575.
- Wei, Q.; W.D. Lu, Y. Liao, S.L. Pan, Y. Xu, L. Tang, y F. Chen, 2004. "Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas*". *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao*, **30**: 475-478.

Recibido: 16 marzo 2013. Aceptado: 6 junio 2014.