

MORFOGÉNESIS *in vitro* DE PECIOLOS DE *Jatropha curcas* L.

In vitro PETIOLE MORPHOGENESIS OF *Jatropha curcas* L.

Iván L. Pequeño-Granado¹, M. Carmen Ojeda-Zacarías^{1*}, Emilio Olivares-Sáenz¹, Francisco Zavala-García¹, Omar G. Alvarado-Gomez¹, Leobardo Iracheta-Donjuan²

¹Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. Unidad Marín, Carretera Zuazua-Marín km 17.5 del municipio de Marín, Nuevo León, México. (ojedacz@yahoo.com.mx). ²Instituto Nacional Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Rosario Izapa, km 18 de la carretera Tapachula a Cacahoatán, 30870 Tuxtla Chico, Chiapas, México.

RESUMEN

Jatropha curcas es una especie con potencial para elaborar biodiésel y el suministro de material elite para siembra es crítico debido a desventajas de propagación tradicional. El cultivo de tejidos vegetales es una alternativa para obtener material vegetal de calidad para siembra. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad de tres edades fenológicas de peciolo (1.^{er}, 2.^o y 3.^{er} nudo), así como el efecto de la polivinilpirrolidona (PVP) sobre la viabilidad de explantes de los genotipos INI-3 e INI-6 de *J. curcas* y la expresión morfogénica de peciolo del genotipo INI-6 en dos medios de cultivos (Yasuda y MS) con diferentes dosis de TDZ, BA y AIB. El establecimiento *in vitro* evaluó la PVP en genotipos INI-3 y INI-6 con un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2x2 y 90 repeticiones por tratamiento. Las variables evaluadas fueron viabilidad y presencia de callo; la viabilidad se evaluó por prueba de Ji-cuadrada (X^2) y el peso del callo por ANDEVA. En la etapa de inducción se analizaron dos medios de cultivo adicionados con TDZ, BA y AIB en explantes del genotipo INI-6 debido a su mayor viabilidad, en un DCA con arreglo factorial 2x2x2x3, tres repeticiones, donde la variable evaluada fue presencia de callo mediante un análisis de regresión logística (ARL). Los resultados mostraron que la viabilidad es independientes del genotipo, de acuerdo al valor de X^2 ($p=0.700$), pero dependiente del tipo de peciolo ($p=0.019$) e incorporación de PVP ($p=0.001$). La presencia y producción de callo fueron influenciadas por el genotipo expresado en el X^2 y peso de callo por un ANOVA. La etapa de inducción mostró que el AIB y TDZ están relacionados con la presencia de callo con base en el ARL.

ABSTRACT

Jatropha curcas is a species with a biodiesel production potential. The supply of elite planting material is critical due to traditional spread disadvantages. Plant tissue culture is an alternative to obtain quality plant material for planting. For these reasons, the objective of this study was to evaluate the feasibility of three phenological ages of petioles (1st, 2nd and 3rd node), and the effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on explants viability of the INI-3 and INI-6 genotypes of *J. curcas* and the petioles morphogenetic expression of the INI-6 genotype in two culture media (Yasuda and MS) with different doses of TDZ, BA and AIB. The *in vitro* establishment evaluated the PVP of the INI-3 and INI-6 genotypes with a completely randomized design (CRD) in a 2x2 factorial arrangement and 90 repetitions per treatment. The evaluated variables were viability and callus presence; viability was assessed with the Chi-square test (X^2) and the callus weight by an ANOVA. During the induction stage, two media culture added with TDZ, BA and AIB were evaluated in the INI-6 genotype due to their increased viability, in a DCA with a 2x2x2x3 factorial arrangement. Three replications, where the evaluated variable was the callus presence, using a logistic regression analysis (LRA). The results show that the viability is independent from the genotype, according to the X^2 value ($p=0.700$), but dependent of the petiole type ($p=0.019$) and PVP addition ($p = 0.001$). The presence and callus production were influenced by the genotype expressed in the X^2 and callus weight by an ANOVA. The induction stage showed that the AIB and TDZ are related to the callus presence based on the LRA.

Keywords: *Euphorbiacea*, plant tissue culture, petiole, PVP, callus.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: julio, 2014. Aprobado: junio, 2015.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 49: 775-785. 2015.

Palabras clave: Euphorbiaceae, cultivo de tejidos vegetales, peciolo, PVP, callo.

INTRODUCCIÓN

El cultivo *in vitro* de plantas o cultivo de tejidos vegetales se utiliza principalmente en estudios celulares y con fines de propagación clonal (Yesil-Celiktas y Vardar-Sukan, 2013), y es factor importante en cultivos agrícolas donde la calidad del material vegetal de siembra es un aspecto significativo en la producción (De Filippis, 2012). En cultivos agrícolas es importante usar material vegetal clonal, como en *Jatropha curcas*, porque el suministro de material elite para siembra es un problema crítico para transformar la especie en un cultivo viable (Jingura, 2012), debido a las desventajas de la propagación clonal mediante el uso de estacas (Sujatha *et al.*, 2005; Brittain y Litaladio, 2010; Mukherjee *et al.*, 2011; Tomar *et al.*, 2014). *Jatropha curcas* es una especie que sobresale en la producción de semillas con 46 a 64 % de aceite (Martinez-Herrera *et al.*, 2010), y con potencial para la elaboración de biodiésel (Ceasar y Ignacimuthu, 2011).

En las técnicas del cultivo *in vitro* se recomienda utilizar peciolo debido a su mayor resistencia a la variación genética (Pierik, 1991), y usar el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) porque estimula y mejora la respuesta de los tejidos de *J. curcas*, por lo cual es el más usado en estudios de regeneración de la especie (Ceasar y Ignacimuthu, 2011; Mukherjee *et al.*, 2011). La regeneración *in vitro* de *J. curcas* se realiza usando peciolo *in vivo* (Sujatha y Mukta, 1996; Kumar y Reddy, 2010) e *in vitro* (Kumar y Reddy, 2010) y peciolo cotiledónares *in vivo* e *in vitro* (Kumar *et al.*, 2010; Kumar y Reddy, 2012). En *J. curcas*, Kumar y Reddy (2010, 2012) reportan una significativa respuesta de brotes adventicios, la cual es directamente proporcional a la concentración de TDZ empleado en el medio de cultivo con una concentración máxima de 9.08 μM . Sin embargo, en arce plateado (*Acer saccharinum* L.), dosis de 0.1 a 10 μM el TDZ produce excesivo crecimiento de callo y detención del desarrollo de brotes (Preece *et al.*, 1991). Además dosis altas de TDZ (1000 μM) en fresno blanco (*Fraxinus americana*) pueden detener el crecimiento de callo y ser letales (Preece y Bates, 1992). El TDZ se usa para inducir la brotación adventicia y lateral en *Cercis candensis*, *Fraxinus*

INTRODUCTION

The *in-vitro* culture of plants or plant tissue culture is mainly used in cell studies and for clonal propagation purposes (Yesil-Celiktas and Vardar-Sukan, 2013). It is an important factor in agricultural crops, where the quality of the plant material for planting constitutes a significant aspect in the production (De Filippis, 2012). In agricultural crops it is important to use clonal plant material, like in *Jatropha curcas*, because the supply of elite planting material is a critical issue to transform the species into a viable crop (Jingura, 2012), due to the disadvantages of clonal propagation through plant cuttings (Sujatha *et al.*, 2005; Brittain and Litaladio, 2010; Mukherjee *et al.*, 2011; Tomar *et al.*, 2014). *Jatropha curcas* is a species that stands out in its seeds production, with 46 to 64 oil percentage (Martinez-Herrera *et al.*, 2010), and potential for biodiesel production (Ceasar and Ignacimuthu, 2011).

The *in vitro* culture techniques recommend to use petioles due to its greater resistance to genetic variation (Pierik, 1991), and use the MS culture media (Murashige and Skoog, 1962) because it stimulates and improves the response of the *J. curcas* tissues, which is why it is the most commonly used in regeneration of the species studies (Ceasar and Ignacimuthu, 2011; Mukherjee *et al.*, 2011). *In vitro* regeneration of *J. curcas* is performed using *in vivo* petioles (Sujatha and Mukta 1996; Kumar and Reddy, 2010) and *in vitro* (Kumar and Reddy, 2012), and *in vivo* and *in vitro* cotyledonary petioles (Kumar *et al.*, 2010; Kumar and Reddy, 2012). In *J. curcas*, Kumar and Reddy (2010, 2012) reported a significant response of adventitious shoots, which is proportional to the TDZ concentration employed in culture medium with a maximum concentration of 9.08 mM. Never the less in silver maple (*Acer saccharinum* L.), a TDZ dose of 0.1 to 10 mM produces excessive callus growth and arrest the sprouts development (Preece *et al.*, 1991). Besides, high doses of TDZ (1000 mM) in white ash (*Fraxinus americana*) can stop the callus growth and be lethal (Preece and Bates, 1992). TDZ is used to induce adventitial and lateral sprouting in *Cercis candensis*, *Fraxinus americana*, *Malus domestica*, *Theobroma cacao*, *Juglans nigra* and *Prunus persica* (Huetteman and Preece, 1993). At the same time, *J. curcas*

americana, *Malus domestica*, *Theobroma cacao*, *Juglans nigra*, y *Prunus persica* (Huetteman y Preece, 1993). Asimismo, *J. curcas* presenta la inducción de brotes mediante el uso de BAP en combinación con AIB (Sujatha y Mukta, 1996). No obstante, la mayoría de estos estudios fueron realizados con genotipos híbridos de *J. curcas* y material proveniente de plántulas con rendimientos desconocidos, por lo cual se deben estudiar los factores que afectan la regeneración de *J. curcas* en genotipos mexicanos de alto rendimiento porque hay amplias variaciones genéticas entre genotipos (Basha y Sujatha, 2007), y la regeneración de esta especie es genotipo-dependiente (Kumar y Reddy, 2010; Mukherjee *et al.*, 2011; Kumar y Reddy, 2012).

De igual importancia, el oscurecimiento de tejidos es una grave problemática en el cultivo *in vitro* de especies leñosas y en particular al evaluar tejidos maduros (De Filippis, 2014). Además, se usa PVP como enjuague al explante o incorporado al medio de cultivo para prevenir el oscurecimiento de tejidos (Krishna *et al.*, 2008; Azofeifa, 2009), y se utiliza en la reducción de oscurecimiento en *Abelmoschus esculentus* (Ganesan *et al.*, 2007) y *Mangifera indica* (Chavan *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2008). Asimismo, Varshney y Johnson (2010) reportan la regeneración vegetal hasta un 90 % en medios adicionados con PVP y ácido cítrico además de reguladores de crecimiento en *J. curcas*.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad de tres edades fenológicas de peciolo (1.º, 2.º y 3.º nudo), el efecto de la polivinilpirrolidona sobre la viabilidad de explantes de los genotipos INI-3 e INI-6 de *J. curcas* y la expresión morfogénica de peciolo del genotipo INI-6 en dos medios de cultivos (Yasuda y MS) adicionados con diferentes dosis de reguladores de crecimiento (TDZ, BA y AIB).

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía, unidad Marín de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), ubicado en la carretera Zuazua-Marín km 17.5 del municipio de Marín, Nuevo León, México (25° 25' 27" N, 100° 03' 19" O, y 393 msnm), desde agosto del 2012 a marzo del 2014. El material vegetal fue recolectado de árboles adultos en producción de *J. curcas* de los genotipos INI-6 y INI-3, del Instituto Nacional de

presents shoot induction by combining BAP with AIB (Sujatha and Mukta 1996). However, most of these studies were carried out with Hindius genotypes material of *J. curcas* from seedlings with unknown yields. Therefore, studying the factors affecting the regeneration of high-yield Mexican genotypes of *J. curcas* must be done, because of the extensive genetic variation among genotypes (Basha and Sujatha, 2007), and the regeneration of this species is genotype-dependent (Kumar and Reddy, 2010; Mukherjee *et al.*, 2011; Kumar and Reddy, 2012).

Of equal importance, tissue darkening is a serious problem in the *in vitro* culture of woody species, particularly at the assessing of mature tissues (De Filippis, 2014). Therefore, PVP is used to rinse the explant or is added to the culture media to prevent tissue darkening (Krishna *et al.*, 2008; Azofeifa, 2009), and is also used in the darkening reduction of *Abelmoschus esculentus* (Ganesan *et al.*, 2007) and *Mangifera indica* (Chavan *et al.*, 2000; Krishna *et al.*, 2008). Also, Varshney and Johnson (2010) report up to 90 % plant regeneration of *J. curcas* in culture media added with PVP, citric acid and growth regulators.

Therefore, the aim of this study is to evaluate the feasibility of three different phenological petiole ages (1st, 2nd and 3rd node), the effect polyvinylpyrrolidone has on the feasibility of the INI-3 and INI-6 *J. curcas* genotypes explants, and the morphogenic expression of petioles of the INI-6 genotype in two culture media (Yasuda and MS) added with different growth regulators (TDZ, BA and AIB) doses.

MATERIALS AND METHODS

This research was conducted at the Plant Biotechnology Laboratory at the Faculty of Agronomy, Marín unit of the Nuevo Leon Autonomous University (UANL), located at the Zuazua- Marín roadway, km 17.5 at the Marín municipality, Nuevo Leon, Mexico (25° 25' 27" N, 100° 03' 19" W, and 393 masl), from August 2012 to March 2014. The plant material was collected from producing adult trees of *J. curcas* from the INI-6 and INI-3 genotypes, provided by the National Research Institute for Forestry, Agricultural and Livestock (INIFAP), Experimental Field Rosario Izapa, km 18 of the road to Tapachula to Cacahoatán, 30870 Tuxtla Chico, Chiapas, Mexico (14° 30' and 15° 00' N, 92° 00' and 92° 30' W, and 435 masl).

Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Rosario Izapa, km 18 de la carretera Tapachula a Cacahoatán, 30870 Tuxtla Chico, Chiapas, México (14° 30' y 15° 00' N, 92° 00' y 92 30' O, y 435 msnm).

Técnica de desinfección del material vegetal

La predesinfección consistió en seleccionar material vegetal de peciolo de hojas en óptimas condiciones de árboles adultos en campo, del primer al tercer nudo tomando como referencia de la parte apical de la rama a la base de esta. Los peciolo fueron clasificados en 1.^{er}, 2.^o y 3.^{er} nudo de edad fenológica, para determinar la capacidad de viabilidad del explante al agente desinfectante. Este material vegetal fue lavado con jabón líquido y agua potable, se transfirió a una solución antioxidante (sacarosa 30 g L⁻¹ y ácido L-ascórbico 100 mg L⁻¹) por 20 min, luego una inmersión en fungicida-bactericida compuesta de Amistar® (azoxistrobin 50 %) 1.0 g L⁻¹, Bavistin® (carbendazim 50 %) 1.0 g L⁻¹, Novobacter® (oxitetraciclina 5 %) 1.0 g L⁻¹ por 20 min, finalizando con un enjuague de agua potable. La desinfección se realizó en una campana de flujo laminar mediante la inmersión de explantes en etanol al 70 %, por 30 s, seguido de la inmersión en hipoclorito de sodio al 3.24% (Cloralex®), adicionado con 0.1 % de tween-20, más tres enjuagues con agua bidestilada estéril.

Etapas de establecimiento aséptico de explantes

Para la siembra se utilizaron secciones de peciolo de 1.5 cm de longitud y establecidos en posición horizontal en medio basal MS más sacarosa 30 g L⁻¹, glutatión reducido (Sigma) 25 mg L⁻¹, ácido ascórbico (Sigma) 20 mg L⁻¹, CuSO₄ 25 mg L⁻¹, BA (Sigma) 3.0 mg L⁻¹, Phytigel (Sigma) 4.5 g L⁻¹, con o sin la adición de 500 mg L⁻¹ de PVP (Sigma), como factor de estudio. El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5.8±0.02 usando 1 N KOH o HCl y esterilizado previamente a 1.2 kg cm⁻² de presión a 121 °C durante 20 min. Concluida la siembra las unidades experimentales fueron incubadas en condiciones controladas de 26±2 °C en oscuridad por 15 d. El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 2x2: factor A, los genotipos INI-3 e INI-6; factor B, las dosis de PVP, testigo y 500 mg L⁻¹; con 90 repeticiones por tratamiento y un explante por unidad experimental.

Las diferencias estadísticas entre explantes viables fueron analizadas mediante una comparación múltiple de proporciones, la cual equivale a una comparación múltiple de medias por Tukey en un análisis de varianza de una vía (Zar, 2010). Las variables evaluadas en la etapa de establecimiento fueron: porcentaje de viabilidad, presencia de callo, peso fresco de callo y su relación con los factores genotipo y PVP. Las variables cualitativas fueron: viabilidad de explantes y presencia de callo, y fueron evaluadas

Disinfection technique of plant material

The pre-disinfection consisted in selecting petioles of sheets in optimum conditions of adult trees in field, from first to third node taking as reference the apical part of the branch to the base. The petioles were classified into 1st, 2nd and 3th phenological node ages, with the purpose of determining the ability of the explant viability to the disinfecting agent. This plant material was washed with liquid soap and water, then transferred to an antioxidant solution (30 g L⁻¹ sucrose and 100 mg L⁻¹ L-ascorbic acid) for 20 min, followed by an immersion in a fungicide-bactericidal composed of 1.0 g L⁻¹ Amistar® (50 % azoxystrobin), Bavistin® (50 % carbendazim) 1.0 g L⁻¹, Novo- bacter® (oxytetracycline 5 %) 1.0 g L⁻¹ for 20 min, ending with a flush of drinking water. Disinfection was performed in a laminar flow hood by a 30 s explants immersion in 70 % ethanol, followed by immersion in 3.24 % of sodium hypochlorite (Cloralex®), added with 0.1 % Tween-20, and three rinses were done with sterile distilled water.

Aseptic explants setting stage

For planting, 1.5 cm length petiole sections were used and laid down in a horizontal position in MS basal media added with 30 g sucrose L⁻¹, 25 mg L⁻¹ reduced glutathione (Sigma), 20 mg L⁻¹ ascorbic acid (Sigma), 25 mg L⁻¹ CuSO₄, 3.0 mg L⁻¹ BA (Sigma), 4.5 g L⁻¹ Phytigel (Sigma), with or without the addition of 500 mg L⁻¹ of PVP (Sigma), as study factor. The culture medium pH was adjusted to 5.8±0.02 using 1 N KOH or HCl previously sterilized at 1.2 kg cm⁻² of pressure at 121 °C for 20 min. After seeding, the experimental units were incubated under controlled dark conditions at 26±2 °C for 15 d. The experimental design was completely random with 2x2 a factorial arrangement: factor-A, genotypes INI-3 and INI-6; factor-B, PVP dose, control and 500 mg L⁻¹; 90 replications per treatment and an explant per experimental unit were included.

Statistical differences between viable explants were analyzed via a multiple comparison of proportions, which is equivalent to a multiple comparison of Tukey in a one-way variance analysis (Zar, 2010). The variables assessed during the establishment stage were: percentage of viability, presence of callus, callus fresh weight and its relationship with the genotype and PVP factors. Qualitative variables were: explant viability and callus presence, and they were evaluated using the Chi-squared test, while the weight of callus was evaluated with an ANOVA. The data was analyzed using SPSS version 20.

Morphogenic induction in *in vitro* cultured explants

INI-6 viable explants without callus were sub-cultured on the basic Yasuda (Yasuda *et al.*, 1985) and MS media added with

mediante una prueba de Ji-cuadrada, mientras que la variable cuantitativa peso de callo se evaluó con un análisis de varianza. Los datos fueron analizados utilizando SPSS versión 20.

Inducción morfológica en explantes cultivados *in vitro*

Los explantes viables sin presencia de callo del genotipo INI-6 fueron subcultivados en los medios básicos Yasuda (Yasuda *et al.*, 1985) y MS enriquecidos 30 g L⁻¹ de sacarosa y 4.5 g L⁻¹ Phytigel™, más TDZ 1.5 y 3.0 mg L⁻¹, BA 1.5 y 3.0 mg L⁻¹ y AIB 0, 0.5 y 1.0 mg L⁻¹. Sólo se usó el genotipo INI-6 por presentar el mayor porcentaje de explantes viables. El medio Yasuda se usó para evaluar la respuesta de tejidos *in vitro* de *J. curcas* sobre una presentación reducida en sales minerales en comparación con el medio MS. Los explantes fueron incubados a 26±2 °C y un fotoperiodo de 16 h luz con lámparas fluorescentes a una intensidad lumínica de 35-40 μmol m⁻² s⁻¹. El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 2x2x2x3, con 24 tratamientos y tres repeticiones, donde el factor A: medios de cultivo, factor B: niveles de TDZ, factor C: niveles de BAP, factor D: niveles de AIB (Cuadro 1). La unidad experimental fue frascos de vidrio (66 mm × 59 mm) con 15 mL de medio de cultivo conteniendo tres explantes por repetición. La variable presencia de callo fue evaluada con un análisis de regresión logística después de ocho semanas *in vitro* del cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapas de establecimiento aséptico de explantes

Relación peciolo-viabilidad

Las frecuencias de explantes viables entre explantes de peciolo del 1.º, 2.º y 3.º nudo en base a la yema terminal presentaron una relación dependiente en el análisis de Ji-cuadrada, por lo cual se realizó una comparación múltiple de proporciones (CMP) que expresó que la mayor proporción de explantes viables se presentó en el segundo nudo con 93.33 %, seguido del primer nudo con 86.95 % de viabilidad, y el tercer nudo con 65.38 % (Figura 1). Estos resultados son similares a los publicados por Misra *et al.* (2010) en explantes de hojas de *J. curcas* donde los explantes del segundo nudo presentaron el mayor porcentaje de respuesta *in vitro*.

Letras distintas en las columnas de la figura muestran diferencias estadísticas significativas entre porcentajes (X², p≤0.05). Las medidas se presentan

30 g L⁻¹ of sucrose and 4.5 g L⁻¹ Phytigel™, TDZ 1.5 and 3.0 mg L⁻¹, BA 1.5 and 3.0 mg L⁻¹ and AIB 0, 0.5 and 1.0 mg L⁻¹. Only the INI-6 genotype was used because it had the highest percentage of viable explants. The Yasuda medium was used to assess the response of *in vitro* tissues of *J. curcas* on a mineral reduced salts sample compared with the MS medium. Explants were incubated at 26±2 °C on a 16 h light photoperiod using fluorescent 35-40 μmol m⁻² s⁻¹ light intensity lamps. The experimental design was a completely random with a 2x2x2x3 factorial arrangement, with 24 treatments and three repetitions, where the factor-A was: culture media, factor-B: levels of TDZ, factor-C: levels of BAP, factor-D : levels of AIB (Table 1). The experimental unit was a glass bottle (66 mm × 59 mm) with 15 mL of culture medium containing three explants by repetition. The callus presence variable was evaluated by means of a logistic regression analysis after 8 weeks of cultivation *in vitro*.

RESULTS AND DISCUSSION

Aseptic establishment stage of explants

Petiole-viability relationship

Frequencies of viable explants between explants petioles of the 1st, 2nd and 3rd node on the basis of the terminal bud had a dependent relationship in the Chi-squared analysis, a multiple comparison of proportions (CMP) was therefore done. This expressed that the largest proportion of viable explants was present in the second node, with 93.33 %. Followed by the first node with 86.95 % of viability, and the third node with 65.38 % (Figure 1). These results are similar to those published by Misra *et al.* (2010) in leaf explants obtained from *J. curcas* where the explants of the second node showed the highest percentage of *in vitro* response. Different letters in the figure columns show statistically significant

Cuadro 1. Factores de estudio en la etapa de inducción *in vitro*.

Table 1. Study factors at the stage of *in vitro* induction.

Nivel	Factor A Medio de cultivo	Factor B TDZ (mg L ⁻¹)	Factor C BAP (mg L ⁻¹)	Factor D AIB (mg L ⁻¹)
1	Yasuda	1.5	1.5	0
2	MS	3.0	3.0	0.5
3	----	----	----	1.0

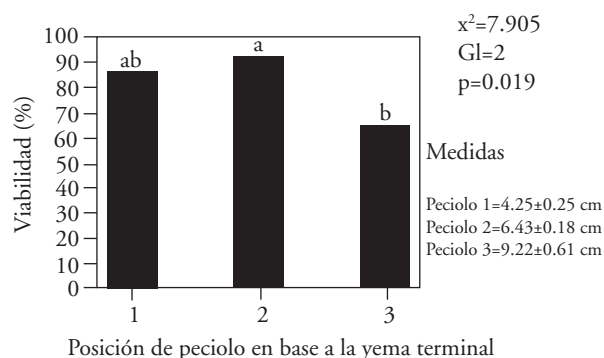


Figura 1. Porcentaje de viabilidad en base al posicionamiento de peciolo en hojas de *Jatropha curcas*.

Figure 1. Percentage of viability based on the positioning of sheet petioles of *Jatropha curcas*.

con media $\pm$ error estándar. Los porcentajes fueron calculados a partir de las frecuencias de explantes viables.

Relación viabilidad-genotipo

El porcentaje de viabilidad de explantes presentó diferencia entre genotipos, mostrando un mayor porcentaje el genotipo INI-6 (40.2 y 82.3 %) en comparación con el genotipo INI-3 (30.4 y 70.9 %) en el testigo y 500 mg L⁻¹ de PVP) (Cuadro 2). Con base en los resultados se realizó una tabla de contingencia con una prueba de Ji-cuadrada para determinar si la viabilidad es dependiente de los genotipos de estudio. El resultado fue que las variables estudiadas son independientes y no hay una relación significativa entre los genotipos y el porcentaje de viabilidad (Cuadro 3).

Relación viabilidad-PVP

Los porcentajes de viabilidad aumentaron en el tratamiento con PVP comparado con el tratamiento testigo (Cuadro 3), por lo cual se realizó una tabla de contingencia con una prueba de Ji-cuadrada para determinar si existe relación entre la viabilidad y la adición de PVP. El resultado fue una relación dependiente entre las variables (Cuadro 4), lo cual indica que la adición de PVP a medio de cultivo favorece las frecuencias de explantes viables en ambos genotipos.

differences between percentages (X^2 , $p \leq 0.05$). The mean values $\pm$ standard error are presented. The percentages were calculated from the frequency of viable explants.

Viability-genotype relationship

The viability percentage of explants presented differences between genotypes. Genotype INI-6 showed a greater percentage (40.2 and 82.3 %) when compared with the INI-3 genotype (30.4 and 70.9 %) in the control and PVP 500 mg L⁻¹ (Table 2). Based on the results, we create a contingency table with a Chi-squared test to determine if the feasibility is dependent on the studied genotypes. Result indicated that the studied variables are not dependent and there is no significant relationship between genotypes and percentage of viability (Table 3).

Viability-PVP relationship

The percentages of viability increased in the PVP treatments compared with the control (Table 3) ones, whereby a contingency table with a Chi-squared test was created to determine the relationship between the viability and PVP. The result show a dependent relationship between variables (Table 4), which indicates that the PVP addition to the culture media favors the frequencies of viable explants in both genotypes.

PVP-callus relationship

PVP is related to the callus presence (Table 3), because of it its incorporation into the establishment medium led to the proliferation of callus in both

Cuadro 2. Porcentaje de viabilidad y presencia de callo derivados de peciolo de *Jatropha curcas*.

Table 2. Percentage of viability and callus presence derived from petioles of *Jatropha curcas*.

PVP	Viabilidad (%)		Inducción de callo (%)	
	Genotipos		Genotipos	
	INI-6	INI-3	INI-6	INI-3
Testigo	40.2	30.4	0	0
500 mg L ⁻¹	82.3	70.9	50.6	70.9

Relación PVP-callos

La PVP se encuentra relacionada con la presencia de callos (Cuadro 3), por lo cual su incorporación al medio de establecimiento provocó la proliferación de callos en ambos genotipos de estudio (Cuadro 3). La presencia de callos blancos fue evidente a los 15 d de cultivo en las áreas de corte de peciolo, lo cual concuerda con lo publicado por Reustle y Natter (1994), quienes muestran que la aplicación de PVP en el inicio del cultivo es esencial para la formación de micro-callos en protoplastos de vid (*Vitis* sp.).

Relación callos-genotipo

Las frecuencias de explantes con presencia de callos difieren entre los genotipos de estudio y el resultado fue un porcentaje mayor de inducción de callos en el genotipo INI-3 (70.9 %), a diferencia del genotipo INI-6 (50.6 %), por lo cual se realizó una tabla de contingencia con una prueba de Ji-cuadrada para comprobar la relación entre genotipo e inducción de callos en explantes, y el resultado fue una relación dependiente (Cuadro 3). Lo anterior es similar a los resultados publicados por Kumar y Reddy (2010) quienes evaluaron peciolo y peciolo cotiledonares, y encontraron diferencias en el porcentaje de inducción de brotes entre genotipos de *J. curcas*.

Efecto de PVP sobre la producción de callos

La producción de callos fue diferente entre los genotipos de estudio a los 15 d de cultivo en medio de establecimiento con PVP. El peso fresco fue mayor en el genotipo INI-3 (90.3 mg) que en el genotipo INI-6 (39.4 mg) y mediante un análisis de varianza se encontró una diferencia significativa ($p \leq 0.01$) entre ellos (Cuadro 4). Estos resultados indican que tanto la inducción como la producción de callos frescos en *J. curcas* son influenciados por el genotipo, lo cual es similar a lo reportado por Basha y Sujatha (2007), quienes mencionan que la dependencia genotípica es uno de los factores más grandes que afectan la regeneración de *J. curcas*.

Inducción morfológica en explantes cultivados *in vitro*

En esta etapa solamente los explantes asépticos del genotipo INI-6 fueron evaluados *in vitro* a las ocho

Cuadro 3. Resultados de tabla de contingencia y prueba de Ji-cuadrada sobre las relaciones entre genotipos y tratamientos de PVP sobre la viabilidad y presencia de callos en peciolo de *Jatropha curcas*.

Table 3. Results of the contingency table and Chi-square test on relationships between genotypes and PVP treatments regard the viability and callus presence in petioles of *Jatropha curcas*.

Fuente	Grados libertad	Viabilidad		Callos	
		X ²	p	X ²	p
Genotipo	1	3.277	0.0700	7.145	0.008
Polivinilpirrolidona	1	59.129	0.001	158.50	0.001

genotipos de estudio (Table 3). The presence of white callus was evident at 15 d of cultivation in the cut areas of the petioles, which accord with that published by Reustle and Natter (1994), who showed that adding PVP in the starting crop is essential for the formation of micro-callus in vine protoplasts (*Vitis* sp.).

Callus-genotype relationship

Explants with callus frequencies differ among studied genotypes and the result was a greater percentage of callus induction in the INI-3 genotype (70.9 %) unlike the INI-6 genotype (50.6 %); whereby a contingency table with a Chi-squared test was created to check the relationship between genotype and callus induction in the explants, the result was a dependent relationship (Table 3). The above is similar to the results published by Kumar and Reddy (2010) who assessed petioles and cotyledonary petioles, and found no differences in the percentage of induction of buds among genotypes of *J. curcas*.

Effect of PVP on the callus production

Callus production was significantly different between genotypes after 15 d in establishment culture medium with PVP. The fresh weight was greater in the INI-3 genotype (90.3 mg) than in the INI-6 genotype (39.4 mg) and through an analysis of variance, we found a significant difference ($p \leq 0.01$) between them (Table 4). These results indicate that both the induction as the production of fresh callus on *J. curcas* are influenced by genotype, which is similar to that reported by Basha and Sujatha (2007),

semanas porque presentaron el mayor porcentaje de viabilidad, con una apariencia hinchada y en algunos tratamientos la presencia de callo (Cuadro 5), y solamente se pudo observar el desarrollo de protuberancias en explantes. Al realizar un análisis de regresión logística sobre las frecuencias de explantes con callo se encontró que los factores AIB y TDZ están relacionados estadísticamente con la variable callo (Cuadro 6), y las estimaciones del modelo se ajustan a un nivel aceptable con base en la prueba de Hosmer y Lemeshow. Además, la prueba de Omnibus sobre los coeficientes del modelo mostró que estos son estadísticamente diferente de cero (Cuadro 6).

Estos resultados son similares a los mencionados por Sujatha y Mukta (1996), quienes evaluaron explantes de hoja en *J. curcas* y muestran que la

Cuadro 4. Comparación de medias de peso del callo entre genotipos de *Jatropha curcas*.

Table 4. Callus weight means comparison between genotypes of *Jatropha curcas*.

Genotipo	Peso fresco de callo explante (mg) [†]
INI-3	90.3 ± 5.4 a
INI-6	39.4 ± 4.8 b

[†] Diferencia significativa ($p \leq 0.01$). Las medidas se presentan con media ± error estándar ♦ Significant difference ($p \leq 0.01$). Mean values ± standard error are presented.

who mentioned that the genotypic dependence is one of the largest factors that affect the regeneration of *J. curcas*.

Cuadro 5. Efecto del medio de cultivo y regulador de crecimiento en la respuesta del explante *in vitro* del genotipo INI-6 de *Jatropha curcas* a ocho semanas de cultivo.

Table 5. Effect of culture medium and growth regulator in the response of the *in vitro* explant of INI-6 genotype of *Jatropha curcas* after eight weeks of cultivation.

Tratamiento	Factores de estudio				Inducción de callo (%)
	Medio	TDZ (mg L ⁻¹)	BA (mg L ⁻¹)	AIB (mg L ⁻¹)	
1	MS	1.5	1.5	0.0	0.0
2	MS	1.5	3.0	0.5	33.3
3	MS	1.5	1.5	1.0	33.3
4	MS	1.5	3.0	0.0	0.0
5	MS	1.5	1.5	0.5	0.0
6	MS	1.5	3.0	1.0	0.0
7	MS	3.0	1.5	0.0	0.0
8	MS	3.0	3.0	0.5	33.3
9	MS	3.0	1.5	1.0	33.3
10	MS	3.0	3.0	0.0	0.0
11	MS	3.0	1.5	0.5	33.3
12	MS	3.0	3.0	1.0	0.0
13	YASUDA	1.5	1.5	0.0	0.0
14	YASUDA	1.5	3.0	0.5	33.3
15	YASUDA	1.5	1.5	1.0	0.0
16	YASUDA	1.5	3.0	0.0	0.0
17	YASUDA	1.5	1.5	0.5	0.0
18	YASUDA	1.5	3.0	1.0	0.0
19	YASUDA	3.0	1.5	0.0	0.0
20	YASUDA	3.0	3.0	0.5	0.0
21	YASUDA	3.0	1.5	1.0	100
22	YASUDA	3.0	3.0	0.0	0.0
23	YASUDA	3.0	1.5	0.5	100
24	YASUDA	3.0	3.0	1.0	100

Cuadro 6. Análisis de regresión logística para los factores de estudio en la etapa de inducción sobre la presencia de callo *in vitro*.
Table 6. Logistic regression analysis for the study factors in the induction stage of the presence of *in vitro* callus.

Factores de estudio	Coefficiente de regresión (B)	Error estándar	Wald	Gl	p	Exp (B)
Medio	-1.433	0.745	3.701	1	0.054	0.239
TDZ	1.272	0.525	5.868	1	0.015	3.570
BAP	-0.320	0.466	0.472	1	0.492	0.726
AIB	2.506	0.982	6.518	1	0.011	12.256
Constante	-4.727	1.848	6.540	1	0.011	0.009
Pruebas sobre el modelo		X ²	Gl	p		
Omnibus		18.068	4	0.001		
Hosmer y Lemeshow		14.126	8	0.079		

ausencia de AIB reduce significativamente la formación de callo. Según Basalma *et al.* (2008), hay capacidad conjunta del AIB y TDZ para la formación de callo en cártamo (*Carthamus tinctorius* L.), mientras que Landi y Mezzetti (2006) reportan 99.3 % de presencia de callo en hojas de diferentes especies de *Fragaria* en medios adicionados con 4.54 μ M de TDZ y 0.98 μ M de AIB. Khurana-Kaul *et al.* (2010) encontraron estructuras nodulares en explantes de hoja de *J. curcas* cultivados en matraces Erlenmeyer de 100 cm³ con medio MS adicionado con 0.90 μ M de TDZ y 0.98 μ M AIB; además, definen estas estructuras como posibles brotes no bien diferenciados.

CONCLUSIONES

El uso de la PVP en el medio de establecimiento aumentó la frecuencia de explantes viables con respecto al testigo en los genotipos INI-6 e INI-3, en tanto que el genotipo INI-6 presentó el mayor porcentaje de viabilidad en comparación al genotipo INI-3. La PVP en esta misma etapa indujo la producción de callo en ambos genotipos, y el genotipo INI-3 mostró un mayor porcentaje de explantes con callo respecto al genotipo INI-6. También la producción de callo es afectada por el genotipo porque el genotipo INI-3 produjo más callo por explante que el genotipo INI-6. Esta respuesta podría ser un método eficiente para aumentar la viabilidad de explantes e inducir la producción de callo en el establecimiento *in vitro*. En la etapa de inducción los factores AIB y TDZ afectan significativamente la presencia de callo en el genotipo INI-6 después de ocho semanas

Morphogenic induction in culture explants *in vitro*

In this stage only the aseptic explants of INI-6 genotype were evaluated *in vitro* after eight weeks because they showed the largest percentage of viability, a swollen appearance in some treatments and presence of callus (Table 5); we observed only the development protuberances in explants. When performing a logistic regression analysis on the frequency of explants with callus, we found that the AIB and TDZ factors are statistically associated with the variable callus (Table 6), and the model estimates are adjusted to an acceptable level based on the Hosmer and Lemeshow tests. In addition, the Omnibus test on the coefficients of the model showed these are statistically different from zero (Table 6).

These results are similar to those reported by Sujatha and Mukta (1996), who evaluated sheet explants of *J. curcas* and show that the AIB absence significantly reduces the callus formation. According to Basalma *et al.* (2008), there is AIB and TDZ joint capacity for callus formation in safflower (*Carthamus tinctorius* L.), whereas Landi and Mezzetti (2006) report 99.3 % of callus leaves presence of different *Fragaria* species in media added with 4.54 mM TDZ and 0.98 μ M AIB. Khurana-Kaul *et al.* (2010) found nodular structures in explants of sheet of *J. curcas* cultivated in Erlenmeyer flasks of 100 cm³ with MS medium added with 0.90 μ M TDZ and 0.98 μ M AIB; further they define these structures as possible buds not well differentiated.

del cultivo *in vitro*, lo cual explica la importancia del manejo de estos reguladores de crecimiento en el control de la producción de callo en este genotipo de *J. curcas*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Autónoma de Nuevo León (PAICYT-UANL) por el apoyo financiero para la realización de esta investigación. Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía (unidad Marín) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por las facilidades y apoyos en infraestructura y equipo científico.

LITERATURA CITADA

- Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agromeso* 20: 153-175.
- Basalma D., S. Uranbey, S. Mirici, and Ö. Kolsarici 2008. TDZ x IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and *in vitro* multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Afr. J. Biotechnol.* 7: 960-966.
- Basha, S. D., and 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.
- Brittaine, R., and N. Litaladio. 2010. *Jatropha*: A smallholder bioenergy crop. The potential for pro-poor development, integr crop manag. FAO. Rome, Italy. 96 p.
- Ceasar, S. A., and S. Ignacimuthu. 2011. Applications of biotechnology and biochemical engineering for the improvement of *Jatropha* and biodiesel: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 15: 5176-5185.
- Chavan S. S., S. S. Ranade, A. C. Deore, R. S. Deshpande and B. L. Dhonukshe 2000. *Ann. Plant Physiol.* 14: 178-181.
- De Filippis, L. F. 2012. Breeding for biotic stress tolerance in plants. *In: Ashraf M., M. Öztürk, M. S. A. Ahmad and A. Aksoy (eds).* Crop Production for Agricultural Improvement. Springer Netherlands. pp: 145-200.
- De Filippis L. F. 2014. Crop improvement through tissue culture. *In: Ahmad P., Wani, M. R., Azooz, M. M. and Tran, L.-S. Ps (eds.).* Improvement of crops in the era of climatic changes. Springer New York. pp: 289-346.
- Ganesan M., R. Chandrasekar, B. D. Ranjitha Kumari and N. Jayabalan 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration of *abelmoschus esculentus* through suspension culture. *Biol. Plant.* 51: 414-420.
- Huettelman C. A. and J. E. Preece 1993. Thidiazuron: A potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33: 105-119.
- Jingura, R. 2012. Socio-economy, agro-ecological zones, agroeconomic practices and farming system of *Jatropha curcas* L. In sub-saharan africa. *In: Carels N., M. Sujatha, and B. Bahadur (eds).* *Jatropha*, Challenges for a New Energy Crop. Springer New York. pp: 53-69.

CONCLUSIONS

The use of PVP in the medium of establishment increased the frequency of viable explants with regard to the control in the INI-6 genotypes and INI-3, whereas INI-6 genotype had the highest percentage of viability in comparison to the INI-3 genotype. In this same stage, PVP induced callus production of in both genotypes, and INI-3 genotype showed a higher percentage of explants with callus respect to the genotype INI-6. Production of callus is also affected by the genotype because the INI-3 genotype produced more callus per explant than the INI-6 genotype. This response could be an efficient method to enhance the viability of explants and induce the production of callus in *in vitro* establishment. In the stage of induction the AIB and TDZ factors significantly affect the presence of callus in the INI-6 genotype after eight weeks of the *in vitro* culture, which explains the importance of managing these growth regulators on the control of the callus production of in this *J. curcas* genotype.

—End of the English version—



- Khurana-Kaul V., S. Kachhwaha and S. L. Kothari 2010. Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium. *Biol. Plant.* 54: 369-372.
- Krishna H., R. K. Sairam, S. K. Singh, V. B. Patel, R. R. Sharma, M. Grover, L. Nain and A. Sachdev 2008. Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pretreatments. *Sci. Hortic.* 118: 132-138.
- Kumar, N., and M. P. Reddy. 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., and M. P. Reddy. 2012. Thidiazuron (TDZ) induced plant regeneration from cotyledonary petiole explants of elite genotypes of *Jatropha curcas*: A candidate biodiesel plant. *Ind. Crop. Prod.* 39: 62-68.
- Kumar, N., K. G. Vijay Anand, and M. P. Reddy. 2010. *In vitro* plant regeneration of non-toxic *Jatropha curcas* L.: Direct shoot organogenesis from cotyledonary petiole explants. *J. Crop Sci. Biotechnol.* 13: 189-194.
- Landi L. and B. Mezzetti 2006. TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. *Plant Cell Rep.* 25: 281-288.
- Martinez-Herrera, J., A. L. Martinez-Ayala, H. Makkar, G. Francis, and K. Becker. 2010. Agroclimatic conditions, chemical

- and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. From Mexico. *Eur. J. Sci. Res.* 3: 396-407.
- Misra, P., N. Gupta, D. Toppo, V. Pandey, M. Mishra, and R. Tuli. 2010. Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. By controlling endophytic bacterial contamination. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 100: 189-197.
- Mukherjee, P., A. Varshney, T. S. Johnson and T. B. Jha. 2011. *Jatropha curcas*: A review on biotechnological status and challenges. *Plant Biotechnol. Rep.* 5: 197-215.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Pierik, R. L. M. 1991. Commercial aspects of micropropagation. *In: Prakash, J., and R. L. M. Pierik (eds). Horticulture — New Technologies and Applications.* Springer Netherlands. pp: 141-153.
- Preece J. and S. Bates. 1992. *In vitro* studies with white ash (*Fraxinus americana*) nodules. *In: Ahuja M. R.s (ed.). Woody plant biotechnology.* Springer US. pp: 37-44.
- Preece J. E., C. A. Huetteman, W. C. Ashby and P. L. Roth 1991. Micro-and cutting propagation of silver maple. I. Results with adult and juvenile propagules. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 116: 142-148.
- Reustle, G., and I. Natter. 1994. Effect of polyvinylpyrrolidone and activated charcoal on formation of microcallus from grapevine protoplasts (*Vitis* sp.). *Vitis* 33: 117-121.
- Sujatha, M., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 2005. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regul.* 47: 83-90.
- Sujatha, M., and N. Mukta. 1996. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44: 135-141.
- Tomar, N. S., M. A. Ahanger and R. M. Agarwal. 2014. *Jatropha curcas*: An overview. *In: Ahmad, P., and M. R.Wani (eds). Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants under Changing Environment.* Springer New York. pp: 361-383.
- Varshney A. and T. S. Johnson 2010. Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant. *Plant Biotechnol. Rep.* 4: 139-148.
- Yasuda, T., Y. Fujii, and T. Yamaguchi. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol.* 26: 595-597.
- Yesil-Celiktas, O., and F. Vardar-Sukan. 2013. Downstream processes for plant cell and tissue culture. *In: Chandra, S., H. Lata, and A. Varma (eds). Biotechnology for Medicinal Plants.* Springer Berlin Heidelberg. pp: 1-27.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis.* 4 th. Ed. Prentice Hall, New Jersey. 944 p.