



**Caracterización molecular de *vitro* plantas de Piñón (*Jatropha curcas* L.)  
provenientes de semillas irradiadas de un clon promisorio del INIAP**

Borja Moreta, Gabriela Estefania

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

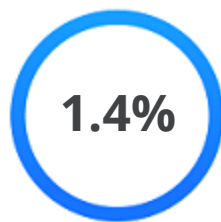
Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Proaño Tuma , Karina Isabel PhD.

28 de enero del 2022

## Tesis Copyleaks\_Borja Gabriela.docx

Scanned on: 1:51 January 26, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	99
Words with Minor Changes	25
Paraphrased Words	116
Ommited Words	0



Firmado electrónicamente por:

**KARINA  
ISABEL**

**Proaño Tuma Karina Isabel Ph.D.**  
C.C. 1707245104



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, “**Caracterización molecular de *vitro* plantas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) provenientes de semillas irradiadas de un clon promisorio del INIAP**” fue realizado por la señorita **Borja Moreta, Gabriela Estefania** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 27 de enero del 2022



Firmado electrónicamente por:

**KARINA**  
**ISABEL**

---

**Proaño Tuma Karina Isabel Ph.D.**

C. C. 1707245104



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA**

Yo, **Borja Moreta, Gabriela Estefanía**, con cédula de ciudadanía n° 1726644865, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Caracterización molecular de *vitro* plantas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) provenientes de semillas irradiadas de un clon promisorio del INIAP”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Sangolquí, 27 de enero del 2022**

---

**Borja Moreta Gabriela Estefanía**

C.C.: 1726644865



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN**

Yo **Borja Moreta, Gabriela Estefania**, con cédula de ciudadanía n° 1726644865, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Caracterización molecular de *vitro* plantas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) provenientes de semillas irradiadas de un clon promisorio del INIAP”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 27 de enero del 2022**

---

**Borja Moreta Gabriela Estefanía**

C.C.: 1726644865

## Dedicatoria

*“No vayas por donde guía el camino. Ve, en cambio, donde no hay camino y deja rastro”*

Ralph Waldo Emerson

A mis padres Ana y Pedro, por su amor y apoyo incondicional en cada paso que he dado.

A mi hermano Andrés, por acompañarme y alentarme siempre a seguir adelante.

A mi querida amiga Andrea, por su amistad y apoyo en todo este camino.

A mis mascotas Luna y Mango, por siempre estar a mi lado.

*Gabriela*

## **Agradecimientos**

A mi madre Ana, por ser mi pilar y enseñarme a trabajar duro para alcanzar mis metas.

Gracias, por tu esfuerzo diario para que pueda culminar cada objetivo que me he planteado.

A mi padre Pedro, por enseñarme a salir adelante a pesar de los obstáculos que se pueden presentar en la vida. Gracias. por tu apoyo incondicional en cada pequeño paso que he dado.

A mi hermano Andrés, por los consejos y enseñanzas que me has brindado. Gracias, por ser mi ejemplo y estar presente en cada momento que he necesitado.

Al Doctor Eduardo Morillo, jefe del Departamento Nacional de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), por confiar en mí y brindarme la oportunidad de realizar mi proyecto de titulación en la institución.

Al Ingeniero Santiago Meneses, M.Sc. Johanna Buitrón y M.Sc. Lizabeth Ojeda, por su guía y enseñanzas en la elaboración del proyecto. Gracias, por la paciencia y apoyo brindado. Al Ingeniero Pablo Llumiquinga, por su orientación en la parte estadística. A seño Geito por ser como una madre para todos los tesisistas.

A la Doctora Karina Proaño, mi directora de tesis, por su asesoría y orientación.

A mis amigas, Andrea, Pamela y Lesly, por ser parte de este largo camino. Gracias, por su amistad sincera y el apoyo que me han dado.

A Juan Carlos, por su apoyo incondicional cuando más lo necesite.

A Brandon y Lorey, por ser parte de este camino y acompañarme con una risa, un abrazo, un consejo en el laboratorio.

A todas las personas que han sido parte de este camino y han contribuido a mi crecimiento personal y académico. Muchas Gracias.

## Índice de Contenidos

Dedicatoria .....	6
Agradecimientos .....	7
Resumen.....	17
Abstract .....	18
Capítulo I: Introducción.....	19
Antecedentes .....	19
Planteamiento del problema .....	22
Justificación e Importancia.....	23
Área de Influencia .....	23
Objetivos.....	24
<i>Objetivo General</i> .....	24
<i>Objetivos Específicos</i> .....	24
Hipótesis.....	24
Capítulo II: Marco Teórico .....	25
Piñón ( <i>Jatropha curcas</i> L.).....	25
<i>Características Taxonómicas</i> .....	25
<i>Características Botánicas</i> .....	26
<i>Distribución Geográfica</i> .....	31
<i>Métodos de Propagación Convencional</i> .....	32
<i>Propagación <u>in vitro</u></i> .....	34



<i>Usos y Aplicaciones</i> .....	37
Mejoramiento Genético .....	41
<i>Mutagénesis</i> .....	42
Radiación Gamma.....	46
Marcadores Moleculares.....	47
<i>Microsatélites (SSR)</i> .....	49
<i>M13 - Tailed</i> .....	51
Capítulo III: Materiales y Métodos .....	53
Ubicación.....	53
Material Vegetal .....	53
Establecimiento <i>in vitro</i> de Semillas de Piñón ( <i>Jatropha curcas</i> L.) Irradiadas y No Irradiadas .....	54
<i>Aplicación de Radiación Gamma a Semillas de Piñón</i> .....	54
<i>Fase de Introducción de Semillas de Piñón</i> .....	54
<i>Fase de Multiplicación de Embriones Germinados de Piñón</i> .....	56
Optimización del proceso de Multiplicación en <i>vitro</i> Plantas de Piñón ( <i>Jatropha curcas</i> L.) provenientes de Semillas No Irradiadas .....	57
Determinación de variabilidad genética en <i>vitro</i> Plantas de Piñón ( <i>Jatropha curcas</i> L.) provenientes de Semillas Irradiadas y No Irradiadas utilizando marcadores microsatélites ..	58
<i>Extracción de ADN a partir de Tejido Foliar de <u>vitro</u> Plantas</i> .....	58
<i>Cuantificación de ADN extraído a partir de Tejido Foliar de <u>vitro</u> Plantas</i> .....	59
<i>Validación de ADN extraído a partir de Tejido Foliar de <u>vitro</u> Plantas</i> .....	59

	10
<i>Limpieza de ADN extraído a partir de Tejido Foliar de <u>in vitro</u> Plantas</i> .....	61
<i>Metodología M13 - Tailed con ADN extraído a partir de Tejido Foliar de <u>in vitro</u> Plantas</i> .....	62
<i>Preparación del Gel de Acrilamida para Corrida en LI-COR 4300</i> .....	66
<i>Preparación de las muestras para Corrida en LI-COR 4300</i> .....	67
<i>Análisis de la Imagen del Gel en el software SAGA GT-SSR</i> .....	68
Análisis Estadístico .....	68
<i>Establecimiento <u>in vitro</u> de Semillas de Piñón (<u>Jatropha curcas</u> L.) Irradiadas y no</i>	
<i>Irradiadas</i> .....	68
<i>Optimización del proceso de Multiplicación en <u>in vitro</u> Plantas de Piñón (<u>Jatropha curcas</u> L.)</i>	
<i>provenientes de Semillas No Irradiadas</i> .....	70
<i>Determinación de la variabilidad genética en <u>in vitro</u> Plantas de Piñón (<u>Jatropha curcas</u> L.)</i>	
<i>provenientes de Semillas Irradiadas y No Irradiadas utilizando marcadores microsatélites</i>	73
Capítulo IV: Resultados .....	74
<i>Establecimiento <u>in vitro</u> de Semillas de Piñón (<u>Jatropha curcas</u> L.) Irradiadas y No Irradiadas</i>	
.....	74
<i>Porcentaje de Semillas Germinadas y No Germinadas</i> .....	74
<i>Porcentaje de Contaminación por Bacteria</i> .....	77
<i>Porcentaje de Contaminación por Hongo</i> .....	79
<i>Optimización del proceso de Multiplicación en <u>in vitro</u> Plantas de Piñón (<u>Jatropha curcas</u> L.)</i>	
<i>provenientes de Semillas No Irradiadas</i> .....	81
<i>Porcentaje de Supervivencia</i> .....	82
<i>Longitud del Brote Inicial</i> .....	82

	11
<i>Número de Hojas Verdaderas</i> .....	84
<i>Porcentaje de Brotación</i> .....	86
<i>Número de Brotes</i> .....	88
<i>Longitud de Brotes Nuevos</i> .....	90
<i>Porcentaje de vitro Plantas que presentan Callo</i> .....	92
<i>Diámetro del Callo</i> .....	93
Determinación de la variabilidad genética en <i>vitro</i> Plantas de Piñón ( <i>Jatropha curcas</i> L.) provenientes de Semillas Irradiadas y No Irradiadas utilizando marcadores microsatélites ..	94
<i>Porcentaje de similitud</i> .....	101
Capítulo V: Discusión .....	103
Establecimiento <i>in vitro</i> de semillas de Piñón ( <i>Jatropha curcas</i> L.) Irradiadas y No Irradiadas .....	103
<i>Porcentaje de Semillas Germinadas y No germinadas</i> .....	103
<i>Porcentaje de Contaminación por Bacteria</i> .....	104
<i>Porcentaje de Contaminación por Hongo</i> .....	104
Optimización del proceso de Multiplicación en <i>vitro</i> Plantas de Piñón ( <i>Jatropha curcas</i> L.) provenientes de Semillas No Irradiadas.....	105
<i>Porcentaje de Supervivencia</i> .....	105
<i>Longitud del Brote Inicial</i> .....	106
<i>Número de Hojas Verdaderas</i> .....	106
<i>Porcentaje de Brotación</i> .....	107
<i>Número de Brotes</i> .....	108

<i>Longitud de Brotes Nuevos</i> .....	109
<i>Porcentaje de vitro Plantas que presentan Callo</i> .....	109
<i>Diámetro del Callo</i> .....	110
Determinación de la variabilidad genética en <i>vitro</i> Plantas de Piñón ( <i>Jatropha curcas</i> L.) provenientes de Semillas Irradiadas y No Irradiadas utilizando marcadores microsatélites	111
<i>Porcentaje de similitud</i> .....	111
Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones .....	113
Conclusiones.....	113
Recomendaciones .....	113
Capítulo VII: Referencias.....	115
Capítulo VIII: Anexos .....	144

## Índice de Tablas

Tabla 1. <i>Taxonomía del Piñón (<u>Jatropha curcas</u> L.)</i> .....	25
Tabla 2. <i>Comparación de precios de biodiésel a partir de diferentes materias prima</i> .....	40
Tabla 3. <i>Clasificación de los Microsatélites</i> .....	50
Tabla 4. <i>Ubicación de la Estación Experimental Santa Catalina</i> .....	53
Tabla 5. <i>Ubicación de la Estación Experimental Portoviejo</i> .....	54
Tabla 6. <i>Buffer de Extracción 2X CTAB</i> .....	58
Tabla 7. <i>Mezcla para amplificación de ADN de <u>vitro</u> plantas de Piñón</i> .....	60
Tabla 8. <i>Condiciones de PCR para amplificación de ADN de <u>vitro</u> plantas de Piñón</i> .....	61
Tabla 9. <i>Combinaciones múltiplex de 18 primers microsatélites</i> .....	63
Tabla 10. <i>Mezcla para amplificación utilizando las combinaciones dúplex de primers microsatélites</i> .....	64
Tabla 11. <i>Mezcla para amplificación utilizando las combinaciones tríplex de primers microsatélites</i> .....	65
Tabla 12. <i>Condiciones de PCR para amplificación con Metodología M13 – Tailed</i> .....	66
Tabla 13. <i>Gel de Acrilamida</i> .....	67
Tabla 14. <i>Azul de Parada 1X</i> .....	67
Tabla 15. <i>Tratamientos aplicados a las semillas del clon promisorio de Piñón CP041</i> .....	69

Tabla 16. <i>Tratamientos aplicados a <u>in vitro</u> plantas del clon promisorio de Piñón CP041</i> .....	71
Tabla 17. <i>Efecto de la dosis de radiación en la fase de introducción de semillas</i> .....	74
Tabla 18. <i>ANOVA realizado para la variable porcentaje de semillas germinadas y no germinadas</i> .....	75
Tabla 19. <i>ANOVA realizado para la variable porcentaje de contaminación por bacteria</i> .....	78
Tabla 20. <i>Prueba de Kruskal – Wallis realizada para la variable porcentaje de contaminación por hongo</i> .....	80
Tabla 21. <i>Efecto de la combinación de BAP y AIA en la multiplicación de <u>in vitro</u> plantas de Piñón</i> .....	82
Tabla 22. <i>Prueba de Kruskal – Wallis realizada para la variable longitud de brote inicial</i> .....	83
Tabla 23. <i>Prueba de Kruskal – Wallis realizada para la variable número de hojas verdaderas</i> . 85	
Tabla 24. <i>Prueba de Kruskal – Wallis realizada para la variable número de brotes</i> .....	88
Tabla 25. <i>Prueba de Kruskal – Wallis realizada para la variable longitud de brotes nuevos</i> .....	91
Tabla 26. <i>Prueba de Kruskal – Wallis realizada para la variable diámetro de callo</i> .....	93
Tabla 27. <i>Comparación de los alelos encontrados en las muestras irradiadas y no irradiadas.</i> .....	101

## Índice de Figuras

Figura 1. <i>Haz de las hojas de <u>Jatropha curcas</u> L.</i> .....	27
Figura 2. <i>Inflorescencia de <u>Jatropha curcas</u> L. constituida por flores masculinas</i> .....	28
Figura 3. <i>Inflorescencia de <u>Jatropha curcas</u> L. constituida por flores femeninas</i> .....	29
Figura 4. <i>Frutos de <u>Jatropha curcas</u> L. en estado inmaduro</i> .....	30
Figura 5. <i>Semillas de <u>Jatropha curcas</u> L.</i> .....	31
Figura 6. <i>Distribución geográfica de <u>Jatropha curcas</u> L.</i> .....	32
Figura 7. <i>Método M13 - Tailed</i> .....	52
Figura 8. <i>Embrión extraído de la semilla de Piñón (<u>Jatropha curcas</u> L.)</i> .....	56
Figura 9. <i>Brotos apicales con hojas verdaderas desarrollados en los embriones germinados.</i> ..	57
Figura 10. <i>Efecto de la dosis de radiación en el porcentaje de semillas germinadas y no germinadas</i> .....	76
Figura 11. <i>Embriones germinados provenientes de semillas irradiadas y no irradiadas</i> .....	77
Figura 12. <i>Efecto de la dosis de radiación en el porcentaje de contaminación por bacteria</i> .....	79
Figura 13. <i>Efecto de la dosis de radiación en el porcentaje de contaminación por hongo</i> .....	81
Figura 14. <i>Efecto de la combinación de BAP y AIA en la longitud de brote inicial</i> .....	84
Figura 15. <i>Efecto de la combinación de BAP y AIA en el número de hojas verdaderas</i> .....	86
Figura 16. <i>Brotación observada en los diferentes medios de cultivo</i> .....	87

Figura 17. <i>Efecto de la combinación de BAP y AIA en el número de brotes</i> .....	89
Figura 18. <i>Brotos nuevos observados en el estereomicroscopio</i> .....	90
Figura 19. <i>Efecto de la combinación de BAP y AIA en la longitud de brotes nuevos</i> .....	92
Figura 20. <i>Efecto de la combinación de BAP y AIA en el diámetro de callo</i> .....	94
Figura 21. <i>Gel correspondientes a la placa 1 amplificada con combinación dúplex 3</i> .....	95
Figura 22. <i>Gel correspondientes a la placa 1 amplificada con combinación tríplex 1</i> .....	96
Figura 23. <i>Gel correspondientes a la placa 1 amplificada con combinación dúplex 2</i> .....	97
Figura 24. <i>Gel correspondientes a la placa 2 amplificada con combinación dúplex 4</i> .....	97
Figura 25. <i>Gel correspondientes a la placa 2 amplificada con combinación dúplex 1</i> .....	98
Figura 26. <i>Gel correspondientes a la placa 2 amplificada con combinación tríplex 2</i> .....	99
Figura 27. <i>Gel correspondientes a la placa 3 amplificada con combinación dúplex 6</i> .....	100
Figura 28. <i>Gel correspondientes a la placa 3 amplificada con combinación dúplex 5</i> .....	101



## Resumen

El Piñón (*Jatropha curcas* L.) se encuentra principalmente en la provincia de Manabí donde es tradicionalmente utilizado como cerca viva. Su uso se ha visto limitado por los bajos rendimientos que presenta y su reducida variabilidad genética. INIAP plantea una estrategia para incrementar los niveles de producción sin necesidad de ampliar la frontera agrícola o hacer uso de tierras destinadas a la alimentación, que incluye el mejoramiento genético por mutaciones inducidas que debe ir acompañado de un proceso de propagación adecuado. Previo a su introducción, las semillas del clon promisorio fueron irradiadas a dos dosis de radiación (100 y 200 Gy). Para la fase multiplicación, se establecieron tres medios de cultivo MS con diferentes concentraciones de BAP (0.5, 1 y 2 ppm) en combinación con 0.1 ppm de AIA y un medio MS sin hormonas. Una vez que las *in vitro* plantas provenientes de semillas se encontraban en generación MV2 se procedió a realizar el genotipaje con 18 primers microsatélites. Las semillas irradiadas presentaron un aumento del 20% en el porcentaje de germinación. Por otro lado, se evidenció que las semillas irradiadas presentaban un menor porcentaje de contaminación por hongo y bacteria en comparación con las no irradiadas. El medio MS suplementado con 2 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA dio los mejores resultados para número de brotes con 4.69 brotes por explante, longitud del brote inicial con 1.69 cm y longitud de brotes nuevos con 5 mm. Sin embargo, también se evidenció la formación de callo con un diámetro de 4.42 cm. Finalmente, el porcentaje de similitud de los 36 alelos encontrados en las muestras irradiadas y no irradiadas fue del 100%, es decir, no se detectó variabilidad genética.

### Palabras clave

- **BIODIÉSEL**
- **MUTACIONES**
- **RAYOS GAMMA**

## Abstract

Piñón (*Jatropha curcas* L.) is found mainly in the province of Manabí where it is traditionally used as a living fence. Its use has been limited by its low yields and reduced genetic variability. INIAP proposes a strategy to increase production levels without the need to expand the agricultural frontier or make use of land used for food, which includes genetic improvement by induced mutations that must be accompanied by an adequate propagation process. Prior to its introduction, the seeds of the promising clone were irradiated at two radiation doses (100 and 200 Gy). For the multiplication phase, three MS culture media were established with different concentrations of BAP (0.5, 1 and 2 ppm) in combination with 0.1 ppm AIA and a MS medium without hormones. Once the vitro plants from seeds were in MV2 generation, genotyping with 18 microsatellite primers was performed. Irradiated seeds showed a 20% increase in germination percentage. On the other hand, irradiated seeds showed a lower percentage of fungal and bacterial contamination compared to non-irradiated seeds. The MS medium supplemented with 2 ppm BAP and 0.1 ppm AIA gave the best results for number of shoots with 4.69 shoots per explant, length of the initial shoot with 1.69 cm and length of new shoots with 5 mm. However, callus formation was also evident with a diameter of 4.42 cm. Finally, the percentage of similarity of the 36 alleles found in irradiated and non-irradiated samples was 100%, i.e., no genetic variability was detected.

### Key words

- **BIODIESEL**
- **MUTATIONS**
- **GAMMA RAYS**

## Capítulo I: Introducción

### Antecedentes

El elevado precio de los productos derivados del petróleo y el impacto negativo que pueden tener en el medio ambiente ha llevado al desarrollo de combustibles alternativos, como es el caso del biodiésel (Ma & Hanna, 1999). Después de siglos de quema de combustibles fósiles, el mundo se encuentra al borde de una disminución del suministro de combustible (Mishra & Goswami, 2018). Actualmente, las comunidades del mundo luchan por reducir su dependencia de los combustibles fósiles y generar soluciones energéticas alternativas (Bhattarai et al., 2011).

El biodiésel es un combustible alternativo que generalmente se desarrolla a partir del aceite comestible (Dhillon et al., 2014). Debido a la baja disponibilidad de este en países en desarrollo se ha empezado a utilizar el aceite no comestible presente en plantas como el Piñón (Torral et al., 2008). El uso de esta planta para la producción de biocombustibles ha llamado la atención debido a su alto contenido de aceite (Divakara et al., 2010).

Las semillas de Piñón contienen del 30-50% en peso de aceite, por lo que es una fuente potencial de aceite no comestible para la producción de biodiésel mediante transesterificación (Kumar Tiwari et al., 2007). El alto contenido de aceite es prometedor para su uso agroindustrial porque el biodiésel obtenido tiene propiedades físicas y químicas similares al convencional (Kashe et al., 2018).

En el año 2007, el Ministerio de Energía y Minas del Ecuador presenta la iniciativa cero combustibles fósiles en las Islas Galápagos (EFEverde, 2010). Con este precedente, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) busca obtener variedades y tecnologías adecuadas para la producción, procesamiento e industrialización de las semillas de Piñón para la generación de biocombustible (Poveda et al., 2017).

El Piñón o Tempate es utilizado tradicionalmente como cerca viva y sus frutos se utilizan para fabricar jabones caseros (Poveda et al., 2017). Las semillas son recolectadas por pequeños agricultores o recolectores de bajos ingresos pertenecientes a las zonas más secas de Manabí, en donde existe alrededor de 7000 km de cercas vivas de Piñón (IICA, 2010).

En el estudio realizado por Mejía et al. (2015) se evaluó el rendimiento en la producción de semillas en nueve líneas de Piñón. Los resultados indicaron que la línea CP041 tenía las mejores características con respecto al peso de 100 semillas que fue de 76.63 g y el rendimiento promedio de semillas que fue de 604.58 g por planta, con un total de 1511.41 kg de semillas por hectárea. Con estos resultados, la línea CP041 es de interés para usarla en estudios posteriores.

Una de las finalidades del proyecto es mejorar la producción de semillas en Piñón de tal manera que se logre contar con la materia prima necesaria para la producción de biodiésel a gran escala que permita cubrir la demanda de energía que se requiere en las Islas Galápagos (Galindo & Elizabeth, 2016). En el año 2012, se logró extraer 48.500 litros de aceite vegetal para el funcionamiento de los generadores de la Isla Floreana (EFEverde, 2018). Sin embargo, el volumen de biocombustible obtenido fue insuficiente para suplir la demanda de diésel que tiene la Empresa Eléctrica Provincial Galápagos (IICA, 2020).

Una de las posibles soluciones para incrementar la producción, sin necesidad de ampliar la frontera agrícola o el uso de tierras destinadas para la producción de cultivos para la alimentación, es un eficiente método de propagación y el mejoramiento genético por medio de mutaciones inducidas por irradiación (Prina et al., 2010). Esto forma parte del proyecto planteado por el INIAP “Generación de variabilidad genética en Piñón aplicando mutagénesis” que busca generar materiales irradiados de Piñón que presenten un incremento en la productividad.

Como parte de este proyecto, el INIAP ha venido trabajando en la propagación *in vitro* de Piñón a partir de semillas, logrando establecer un protocolo de introducción de semillas adecuado (Peña, 2009), sin embargo, la fase de multiplicación no se encuentra bien definida, con valores de brotación menores a dos para el clon utilizado (Gordillo, 2020). De igual manera, el INIAP ya comenzó a trabajar en el año 2020 con semillas irradiadas de Piñón determinando las dosis óptimas para inducir mutaciones en semillas y observando los efectos de la radiación gamma en la morfogénesis de estas (Maldonado, 2020). También, También, se realizó un estudio de diversidad genética en accesiones de Piñón con primers microsatélites, en donde se identificó los primers más polimórficos e informativos para las diferentes accesiones de Piñón utilizados (Lascano, 2020).

El mejoramiento genético de Piñón para mejorar la producción de semillas y aceite, ha involucrado la recolección y selección del germoplasma local (Divakara *et al.*, 2010). Con la integración de técnicas biotecnológicas se puede reducir el tiempo y mejorar la eficiencia del mejoramiento (Mulpuri & Nithiyantham, 2020). Se pueden enfatizar en diferentes técnicas, una de ellas la inducción de mutaciones (Divakara *et al.*, 2010).

Las mutaciones son el origen primario de la variabilidad genética y el control sobre su frecuencia permite tener una herramienta para el mejoramiento genético de plantas (Prina *et al.*, 2010). Junto con la genómica funcional y técnicas de edición de genes se podrá acelerar el desarrollo de germoplasma que cuente con las características deseadas en la plantas (Mulpuri & Nithiyantham, 2020).

La inducción de mutaciones para el mejoramiento genético de especies vegetales es un método eficiente y barato. Estas mutaciones pueden inducirse a través del uso de radiación y ciertas sustancias químicas. (Khawale *et al.*, 2007). Dwimahyani & Ishak, (2011) indujeron mutaciones en *Jatropha curcas* L. con dosis de irradiación de 10 Gy logrando identificar plantas mutantes con madurez temprana y con un 30% de peso de 100 semillas superior al control. De

igual manera, Dhillon *et al.*, (2014) indujeron mutaciones en *Jatropha curcas* L. con diferentes dosis de radiación gamma observándose un efecto en la germinación de las semillas.

La mejora genética del cultivo de Piñón apunta a un mayor número de flores femeninas o plantas pistiladas, alto rendimiento de semillas con alto contenido de aceite, entre otras (Divakara *et al.*, 2010). Además, se busca una mejora genética en las características generales y la composición del éster metílico para hacerlo más adecuado para la producción de biodiésel (Divakara *et al.*, 2010). En este sentido, existen estudios que demuestran la posibilidad de inducir mutaciones en materiales promisorios de Piñón para el mejoramiento genético (Maghuly & Laimer, 2013).

### **Planteamiento del problema**

La demanda de biocombustible en un futuro será alta por lo que es necesario desarrollar una técnica para una propagación rápida de Piñón (Kalimuthu *et al.*, 2007). Los métodos de propagación convencionales presentan una baja productividad, haciendo que el cultivo sea insostenible (Mukherjee *et al.*, 2011). En este sentido, la propagación *in vitro* proporciona una tasa de multiplicación más alta que los métodos convencionales, por lo que permite obtener una mayor cantidad de plantas en poco tiempo y también reduce el riesgo de infecciones por microbios o plagas (Olomola *et al.*, 2014). La propagación *in vitro* de Piñón ha permitido obtener plantas con un mejor rendimiento en comparación a las plantas propagadas por semilla (Sujatha *et al.*, 2005).

El Piñón al ser una especie monoica con fecundación cruzada debería tener un alto grado de variabilidad genética, que es importante para una reproducción adecuada de la especie (Basha & Mulpuri, 2009). Sin embargo, los estudios realizados en *Jatropha curcas* L. con marcadores moleculares indican una baja variabilidad genética en las colecciones de germoplasma (Kalimuthu *et al.*, 2007). De igual manera, Mendoza *et al.* (2011) determinaron que la diversidad genética de Piñón en la colección de germoplasma del Ecuador es bastante

limitada, encontrándose un alto grado de duplicación entre las accesiones estudiadas. Esto se atribuye a que el Piñón se encuentra principalmente en la provincia de Manabí donde es utilizado como cerca viva y se multiplica a través de estacas.

### **Justificación e Importancia**

La creciente preocupación por el agotamiento de las reservas de combustibles fósiles ha llevado a que se dé más importancia a fuentes de combustibles alternativas como el biodiésel producido a partir de aceites vegetales (Zhang et al., 2010). El Piñón es una fuente potencial para la producción de biocombustibles debido a que sus semillas contienen aceite que puede ser utilizado para la producción de biodiésel (Abdulla et al., 2011). Sin embargo, la limitada diversidad genética que presenta y bajos rendimiento han limitado el aprovechamiento de esta especie (Dhillon et al., 2014).

El presente proyecto se desarrolló con el objetivo de mejorar la propagación *in vitro* de un clon promisorio de Piñón (*Jatropha curcas* L.) y aumentar su diversidad genética mediante mutaciones inducidas por irradiación. De esta manera, se espera mejorar los niveles de producción del Piñón sin necesidad de incrementar la frontera agrícola o hacer uso de tierras destinadas a cultivos para alimentación.

### **Área de Influencia**

El desarrollo del presente proyecto beneficiará al sector de producción de combustibles renovables, ya que surge como parte de la iniciativa cero combustibles fósiles en las Islas Galápagos (Isla Floreana). La generación de energía eléctrica limpia a partir del biocombustible obtenido del aceite de Piñón (*Jatropha curcas* L.) es una alternativa al uso únicamente del cultivo en cercas vivas, principalmente en la región del Litoral de Manabí.

## Objetivos

### **Objetivo General**

Caracterizar a nivel molecular *in vitro* plantas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) provenientes de semillas irradiadas de un clon promisorio del INIAP.

### **Objetivos Específicos**

- Establecer *in vitro* semillas irradiadas y no irradiadas de un clon promisorio de Piñón.
- Evaluar diferentes medios de cultivo *in vitro* para optimizar el proceso de multiplicación de *in vitro* plantas obtenidas en la fase de germinación.
- Determinar la variabilidad genética en *in vitro* plantas provenientes de semillas irradiadas utilizando marcadores microsatélites.

### **Hipótesis**

Las *in vitro* plantas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) provenientes de semillas irradiadas presentan variabilidad genética significativa.



## Capítulo II: Marco Teórico

### Piñón (*Jatropha curcas* L.)

#### **Características Taxonómicas**

El nombre científico del Piñón es *Jatropha curcas* Linnaeus. Derivado del griego jatr'os que significa médico y troph'e que significa comida. Debido a que tradicionalmente la planta era usada como medicina (Divakara et al., 2010). En la Tabla 1 se detallan las características taxonómicas del Piñón.

**Tabla 1**

#### *Taxonomía del Piñón (Jatropha curcas L.)*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Viridiplantae
<b>Infrareino</b>	Streptophyta
<b>Superdivisión</b>	Embryophyta
<b>División</b>	Tracheophyta
<b>Subdivisión</b>	Spermatophytina
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Rosidae
<b>Orden</b>	Malpighiales
<b>Familia</b>	Euphorbiaceae
<b>Género</b>	<i>Jatropha</i> L.
<b>Especie</b>	<i>Jatropha curcas</i> L. 1753

*Nota.* En la presente tabla se muestran las características taxonómicas del Piñón (*Jatropha curcas* L.). Tomado de ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*).

*Jatropha curcas* L. pertenece a la familia Euphorbiaceae. una familia de plantas conformada por aproximadamente 8 000 especies agrupadas en 317 géneros. Estas especies están distribuidas principalmente en la región tropical y subtropical. Caracterizándose por sus variaciones morfológicas, que van desde árboles, hasta arbustos, hierbas y lianas. El género *Jatropha* cuenta con más de 70 especies, que se destacan por su dureza, rápido crecimiento y fácil propagación (Oliveira et al., 2009; Abobatta, 2019).

La especie *Jatropha curcas* L. es originaria de América tropical, pero es ampliamente cultivada en Asia y África (Heller, 1996). Puede ser considerada como un árbol perenne pequeño o un arbusto grande. Generalmente alcanza una altura de 3 a 5 m, pero en condiciones favorables puede llegar a tener una altura de 10 m (Divakara et al., 2010).

Los estudios moleculares realizados en esta especie indican que es una especie diploide con 22 cromosomas (Dehgan, 1984). El tamaño del genoma de 416 millones de pares de bases (Mbp) es considerado pequeño, lo cual hace que esta planta sea atractiva para secuenciación (Zamarripa & Solís, 2013).

### **Características Botánicas**

El tallo de la planta es cilíndrico, verde y robusto con ramas que producen savia (Zamarripa & Solis, 2013). Las hojas presentan una coloración verde oscuro con una longitud de 8.55 cm y un ancho de 5 cm. Tienen forma de corazón con cuello largo que puede alcanzar los 15 cm de largo. Son cordadas o redondas, y presentan 5 lóbulos. El haz de las hojas es verde claro con glabro o pelillos finos (Toral et al., 2008; Abdelgadir & Van Staden, 2013; Abobatta, 2019). En la Figura 1 se visualiza el haz de las hojas de *Jatropha curcas* L.

**Figura 1**

*Haz de las hojas de Jatropha curcas L.*



*Nota.* Tomado de *Jatropha curcas L.: Alternativa Bioenergética en México* por A. Zamarripa & J. Solís, 2013.

La planta muestra un crecimiento articulado con una discontinuidad morfológica en cada incremento. Puede presentar dormancia inducida por fluctuaciones en la lluvia, luz y temperatura. Es una planta monoica, cuyas inflorescencias en forma de capítulos o racimos crecen en las extremidades de las ramas. Estas inflorescencias aparecen cuando empieza la temporada de lluvias y presentan un coloración verde amarillenta. Se producen flores masculinas y femeninas unisexuales, en ciertas ocasiones suelen aparecer flores hermafroditas ( Heller, 1996; Días et al., 2012; Abdelgadir & Van Staden, 2013).

Las flores masculinas de la planta tienen 5 sépalos ovado-elípticos, con menos de 4 mm de largo y 5 pétalos oblongos-obovados unidos a la mitad inferior. Estos pétalos son densamente pilosos en el interior y poseen 8 estambres (Abdelgadir & Van Staden, 2013). En la Figura 2 se visualiza una inflorescencia de *Jatropha curcas L.* conformada por flores masculinas.

**Figura 2**

*Inflorescencia de Jatropha curcas L. constituida por flores masculinas*



*Nota.* Tomado de *Jatropha curcas L.: Alternativa Bioenergética en México* por A. Zamarripa & J. Solís, 2013.

Las flores femeninas poseen pétalos oblongos libres y sépalos más grandes, de alrededor de 4 mm (Abdelgadir & Van Staden, 2013). Estos se agrandan gradualmente tras la fertilización para proteger al embrión de las condiciones ambientales (Zamarripa & Solís, 2013). En la Figura 3 se visualiza una inflorescencia de *Jatropha curcas L.* conformada por flores femeninas.

**Figura 3**

*Inflorescencia de Jatropha curcas L. constituida por flores femeninas*



*Nota.* Tomado de *Jatropha curcas L.: Alternativa Bioenergética en México* por A. Zamarripa & J. Solís, 2013.

Esta planta presenta una polinización mediada por insectos. Cuando hay la ausencia de estos, se requiere una polinización manual o puede existir una polinización cruzada (Zamarripa & Solís, 2013). Por otro lado, las pocas flores hermafroditas que suelen aparecer pueden tener una autopolinización (Abdelgadir & Van Staden, 2013).

Tras la polinización se forma un fruto elipsoidal trilocular de 3 a 4 cm de largo (Heller, 1996). Estos frutos poseen un promedio de tres semillas y maduran de manera no uniforme en 60 días. Presentan una coloración amarillenta, pero conforme van madurando adquieren una coloración marrón oscura (Dias et al., 2012). En la Figura 4 se visualiza frutos de *Jatropha curcas L.* en estado inmaduro.

**Figura 4**

*Frutos de Jatropha curcas L. en estado inmaduro*



*Nota.* Tomado de *Jatropha curcas* L.: Alternativa Bioenergética en México por A. Zamarripa & J. Solís. 2013.

Las semillas de la planta presentan una forma oblonga de 2 cm de largo y una coloración negra. Su sabor es dulce, pero tienen la presencia de una toxina llamada curcina. Contiene otros compuestos tóxicos que incluyen los ésteres de forbol, saponinas, fitatos y tripsina ( Kochhar et al., 2008; Días et al., 2012; Abdelgadir & Van Staden, 2013). Además, tiene un contenido de aceite que puede ir desde 32 al 40% en dependencia de las condiciones y el genotipo (Abobatta, 2019). En la Figura 5 se visualiza las semillas de *Jatropha curcas* L.

## Figura 5

*Semillas de Jatropha curcas L.*



*Nota.* Tomado de *Jatropha curcas L.: Alternativa Bioenergética en México* por A. Zamarripa & J. Solís. 2013.

### **Distribución Geográfica**

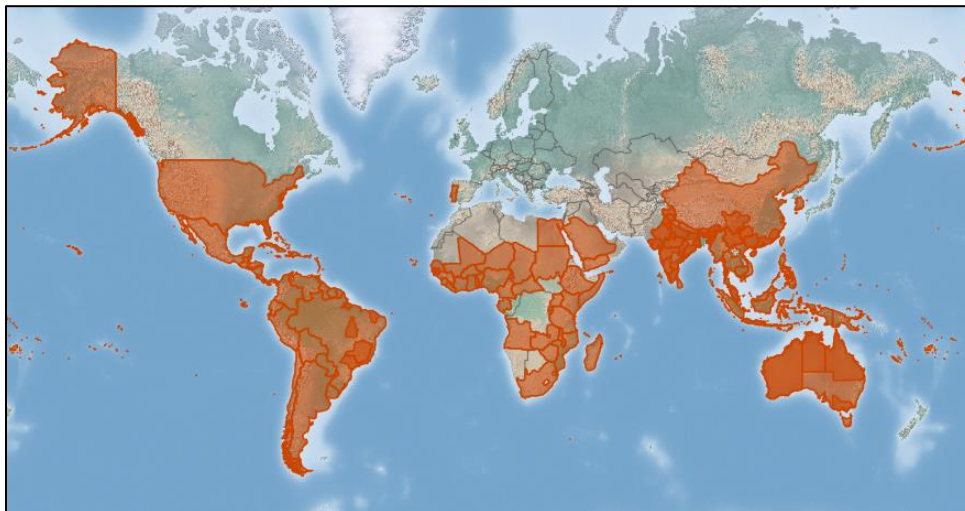
*Jatropha curcas L.* es nativa de América Central y el norte de América del Sur (Islam et al., 2015). Actualmente se encuentra ampliamente distribuida en regiones tropicales y subtropicales de África y Asia (Jongschaap et al., 2012). Su capacidad para crecer en todo tipo de suelos y una mayor tolerancia al estrés abiótico y biótico, ha facilitado su introducción y adaptación en el mundo (Islam et al., 2015). Se han cultivado alrededor de 1.000.000 de hectáreas de *Jatropha curcas L.*, siendo India el país que más cultiva la planta (Edrisi et al., 2015).

Se encuentra en todos los países de Centroamérica: Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá. También existen registros en el Caribe: Bahamas, Cuba, Dominica, República Dominicana, Haití, Puerto Rico, Santa Lucía, Santo Domingo, St. Croix, Trinidad y otros países antillanos. En los países sudamericanos como Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador y las Islas Galápagos, Paraguay, Perú y Venezuela, se encuentra en menor medida (Heller, 1996). *Jatropha curcas L.* también puede encontrarse en países como

Portugal y Estados Unidos (Funk et al., 2007). En la Figura 6 se visualiza la distribución geográfica de *Jatropha curcas* L.

### Figura 6

*Distribución geográfica de Jatropha curcas* L.



*Nota.* La coloración naranja indica los lugares en donde se puede encontrar *Jatropha curcas* L. Tomado de CABI (*Invasive Species Compendium*).

### **Métodos de Propagación Convencional**

**Propagación a través de semillas.** Este método de propagación genera una gran cantidad de plántulas a partir de las semillas obtenidas mediante el proceso de polinización y fertilización (Poincelot, 1980). Sin embargo, genera inconsistencias en el material genético (Islam et al., 2015) y la producción inicia tardíamente (Garay & Echeverría, 2013).

El Piñón llega a producir entre 1 a 2 kg de semillas por planta/año cuando llega a la edad de 2 y 3 años (Mukherjee et al., 2011). Teniendo en cuenta que la tasa de germinación refleja el estado de las semillas. Para una propagación adecuada se requieren semillas de alta



calidad, saludables y viables (Islam et al., 2015). Generalmente, la semilla fresca tiene porcentajes de germinación altos de alrededor del 80% (Zamarripa & Solís, 2013).

Las semillas de Piñón deben ser limpiadas y secas a la sombra para evitar afectaciones en la viabilidad y germinación (Islam et al., 2011). Las semillas más grandes son las que se seleccionan para la propagación y el resto son desechadas (Islam et al., 2011). El almacenamiento no debe superar los seis meses tras la cosecha, debido a que son semillas ortodoxas que pierden viabilidad con el tiempo existiendo un retraso en la germinación (Kumar & Sharma, 2008).

La cubierta de la semilla provoca una latencia física exógena impidiendo la imbibición del agua y la germinación (Islam et al., 2011). Por tanto, las semillas requieren de un pretratamiento para lograr una germinación rápida, regular y elevada (Feike et al., 2008). Estos tratamientos previos mejoran el porcentaje de germinación, velocidad e índice de vigor de las plantas (Islam et al., 2009).

Las semillas pueden ser sembradas directamente en el suelo (Islam et al., 2015). Si se quiere establecer una plantación, esta forma es la más rentable (Neupane et al., 2021). También pueden ser sembradas en bolsas que contengan una mezcla de tierra, arena y abono, en una proporción 1:1:1 (Islam et al., 2015). Sin embargo, la germinación es bastante baja debido a drenaje o riego ineficiente (Neupane et al., 2021).

La propagación por semillas proporciona variabilidad genética en términos de crecimiento, biomasa, rendimiento de semillas y contenido de aceite (Neupane et al., 2021). Sin embargo, presenta ciertas desventajas como la heterocigosidad en las nuevas plantas y falta de uniformidad genética en las plantaciones. Además, las enfermedades que presentan las semillas pueden transmitirse a las plántulas (Mukherjee et al., 2011).

**Propagación a través de esquejes.** Este método de propagación permite obtener una producción más temprana y plantas con características similares a la planta madre (Garay & Echeverría, 2013). Requiere una gran cantidad de material propagativo (Severino et al., 2011). Se recomienda recolectar los esquejes de plantas de al menos ocho meses de edad que incluyan entrenudos cortos con muchos ojos (Islam et al., 2009). Las plantas de donde se obtengan los esquejes deben estar saludables, es decir libres de plagas y enfermedades (Kochhar et al., 2005).

La viabilidad de los esquejes dependerá de la capacidad de enraizamiento de la especie y de la calidad del sistema radicular que se forma (Garay & Echeverría, 2013). Pueden colocarse directamente en el suelo sobresaliendo 15 cm o más por encima del mismo (Garay & Echeverría, 2013). También, pueden plantarse en bolsas de polietileno que contengan suelo, arena y compost en una proporción 1:1:1 (Islam et al., 2011). Generalmente, no requieren del suplemento de hormonas para inducir enraizamiento (Severino et al., 2011).

Las plantaciones de *Jatropha* generadas a partir de estacas son susceptibles a la infestación de insectos y enfermedades (Mukherjee et al., 2011). Además, el rendimiento de semillas es bastante bajo (Shrivastava & Banerjee, 2008). Sin embargo, es una alternativa para la obtención temprana de plántulas con características deseadas que conserven homogeneidad genética (Salazar et al., 2021).

### **Propagación *in vitro***

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales permite regenerar una planta completa a partir de un segmento de una planta madre sembrado en un medio nutritivo bajo condiciones asépticas (Zamarripa & Solís, 2013). Este método de propagación produce un mayor número de plantas en corto tiempo (Kalimuthu et al., 2007).

El uso de reguladores de crecimiento de plantas (PGR) es vital en el desarrollo de un protocolo para propagación *in vitro* (Miller *et al.*, 1956). Auxinas y citoquininas son reguladores esenciales para lograr una respuesta celular en el explante (Herrera *et al.*, 2019). Las auxinas promueven el engrosamiento y elongación celular (Bhojwani, 2012). En muchos casos, la adición de auxinas a un medio basal induce la formación de callo (Krikorian, 1988). Por otro lado, las citoquininas promueven la división y diferenciación celular (Krikorian, 1995).

Los múltiples usos de *Jatropha curcas* L. especialmente el potencial para la producción de biodiésel, han incentivado el cultivo de la especie en diferentes partes del mundo (Kumar, 2001). Los métodos de propagación convencional son insuficientes para satisfacer la demanda de cultivo que se requiere. Por tanto, las técnicas de propagación *in vitro* se convierten en una alternativa viable para superar estos problemas (Kalimuthu *et al.*, 2007).

La propagación *in vitro* de *Jatropha curcas* L. se ha logrado tanto por el método de regeneración directa como el indirecto (Sujatha *et al.*, 2005). Además, está fuertemente influenciada por las hormonas vegetales presentes en el medio nutritivo (Mukherjee *et al.*, 2011). Se ha observado que la incorporación de dos o más reguladores de crecimiento al medio generan una mayor proliferación y multiplicación (Deore & Johnson, 2008). Hay que tener en cuenta que en dependencia del genotipo la respuesta *in vitro* del explante podría variar (Mukherjee *et al.*, 2011).

**Organogénesis directa.** Este método conduce a la regeneración de la planta sin una fase intermedia de callo, permitiendo tener una mayor estabilidad genética (Phillips *et al.*, 1994). Los reguladores de crecimiento más usados en la regeneración directa son TDZ (Tidiazurón), BAP (6 – Bencilaminopurina), IBA (Ácido Indol Butírico) y NAA (Ácido Naftalenacético) que pueden usarse solos o en combinación para inducir la regeneración de brotes (Sujatha & Mukta, 1996).

Para *Jatropha curcas* L. se ha reportado la regeneración directa de brotes a partir de nodos axilares y segmentos de hojas, utilizando una combinación de BAP e IBA (Sujatha et al., 2005). Otros autores, han reportado una alta frecuencia de brotación al sembrar puntas de brotes en medio suplementado con BAP, AIA (Ácido Indol Acético), sulfato de adenina, glutamina y carbón activado (Rajore & Batra, 2005).

La combinación de BAP e IBA induce la regeneración de brotes, pero también la formación de callo (Khurana et al., 2010). Sin embargo, autores reportan que esta combinación promueve la mejor regeneración de brotes a partir de yemas axilares (Thepsamran *et al.*, 2008). En el caso de explantes de epicótilo, la combinación de ambas hormonas promueven la regeneración de brotes adventicios (Wei et al., 2004). Otros explantes como hipocótilos y hojas cotiledonares han sido utilizados con éxito para regenerar brotes de forma directa usando las dos hormonas (Sujatha & Mukta, 1996).

La inducción de brotes adventicios a partir de segmentos de hojas se ve fuertemente influenciada por la presencia de TDZ en el medio de cultivo (Deore & Johnson, 2008). Varios autores han determinado que el TDZ induce una mayor regeneración de brotes en comparación al BAP (Khurana et al., 2010).

**Organogénesis indirecta.** Este método consiste en la regeneración de brotes con una fase intermedia de callo (Sujatha & Mukta, 1996). Cotiledones inmaduros, embriones y hojas embrionarias maduras se han utilizado en la regeneración indirecta debido a su capacidad morfogénica (Varshney et al., 2011). Una de las mejores estrategias para inducir callo es la adición de bajas concentraciones de auxina en combinación con citoquininas y ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (Shamsiah et al., 2011).

La edad, tamaño del explante y la combinación de auxinas con citoquininas influyen en la inducción de callo y posterior regeneración de plantas (Rodríguez et al., 2014). La

combinación de IBA, BAP y sulfato de cobre generó los mejores resultados de regeneración de callo partiendo de embriones y cotiledones de *Jatropha curcas* L. (Varshney et al., 2011). Se ha reportado también la inducción de callos y suspensiones celulares a partir de hipocótilos (Memon & Soomro, 2007).

**Embriogénesis somática.** Consiste en la obtención de una estructura bipolar a partir de una célula genéticamente estable (George et al., 2008). Debido a esto las poblaciones de plantas obtenidas son quiméricas y clonales (Schmidt et al., 1997). Las células embriogénicas generadas a partir de células somáticas dan lugar a la formación de embriones somáticos o no cigóticos capaces de regenerar una planta (Yang & Zhang, 2010).

El uso de reguladores de crecimiento sumado el estrés pueden desencadenar señales de transducción que conducen a la embriogénesis somática en *Jatropha curcas* L. (Jha et al., 2007). Zhang *et al.*, (2010) ha reportado la inducción de embriones somáticos en explantes cotiledonares de *Jatropha curcas* L. usando BAP, sin embargo, el protocolo es considerado inadecuado.

Partiendo de hojas como explante se puede obtener un callo embriogénico en un medio suplementado con KIN (Kinetina) e IBA (Sardana et al., 2000). La presencia de la auxina promueve la división celular en células epidérmicas dando lugar a embriones somáticos (Kumar et al., 2015). La adición de sulfato de adenina mejora la eficiencia de maduración aumentando así la frecuencia de embriones somáticos maduros (Kottackal, 2003).

### **Usos y Aplicaciones**

Los usos y aplicaciones a los cuales se podría destinar la producción de Piñón (*Jatropha curcas* L.) son diversos y aun sin explotar adecuadamente. Montes & Melchinger (2016) afirman que esta planta tiene un potencial elevado para una producción sustentable de energía y alimentos, rehabilitación de suelos y reducción de emisiones de CO<sub>2</sub>. Otros estudios

sugieren que los usos de esta planta pueden enfocarse al tratamiento de aguas residuales (Abidin et al., 2011). Además de ser usada tradicionalmente para terapias alternativas a diversas afecciones (Sharma et al., 2012).

**Producción de energía sustentable.** En el mundo, la elevada demanda de energía es cubierta por petróleo, carbón y gas natural, continuamente se están buscando fuentes de energía que sean renovables (Koh & Ghazi, 2011). Uno de los sectores que más consumen combustibles fósiles es la transportación (60 – 65 % de la producción total) y su demanda aumenta continuamente (Ewunie et al., 2021) por esta razón, la producción de biodiésel y otros derivados a partir de soya, palma y otras semillas permanece en constante debate principalmente por la competencia con la alimentación (Kamel et al., 2018).

La producción de biocombustibles actualmente tiene gran importancia debido a factores tanto ambientales como económicos (Neupane et al., 2021). Entre los factores destacables del biodiesel es su biodegradación, no son tóxicos y producen menos gases de efecto invernadero (Gebremariam & Marchetti, 2018), otros beneficios de la producción de biocombustibles son tener un mejor octanaje, una mejor lubricación traduciéndose en mejor eficiencia y menos contaminación ambiental (Eboibi et al., 2018).

*Jatropha curcas* L. tiene un alto potencial para la producción de biodiésel, pero está condicionado a la innovación para los procesos de siembra, cosecha y la extracción del aceite (Gebremariam & Marchetti, 2018). Los factores agronómicos y técnicos para la producción a partir de semillas de Piñón se ven afectados por la poca variabilidad genética de la especie, resultando en una gran limitante para la producción de biocombustibles (Lama et al., 2018). La poca domesticación de la especie genera está baja variabilidad pese a tener un alto potencial para el mejoramiento genético enfocado en obtener mayor producción de semillas y altos contenidos de aceites (Ha et al., 2019).

Otro de los principales problemas en la producción de *Jatropha curcas* L. es la fructificación, indispensable para su conversión en biodiesel. Gonzáles & Fabiola (2016) afirmó que la producción inicia al segundo año y de forma limitada, además, otro factor destacable es el contenido de aceite que tiene una alta variabilidad entre las diferentes zonas agroecológicas de cultivo (Ewunie et al., 2021). Sin embargo, Kamel et al. (2018) cita características importantes para la producción como crecimiento rápido, fácil cultivo, resistencia a pesticidas e insectos además del alto contenido de aceite.

El biodiésel producido a partir de semillas de *Jatropha curcas* L. tiene un alto potencial para su utilización a gran escala, sus características lo convierten en un combustible amigable de gran interés energético (Gebremariam & Marchetti, 2018). En Sudamérica se ha llevado a cabo experiencias con el cultivo de Piñón, países como Argentina, Brasil, Bolivia y Perú han fomentado la producción de esta especie destinado a la producción de biodiésel (Gonzáles & Fabiola, 2016).

Uno de los principales problemas para el uso extensivo de biodiésel es el costo de producción que tiene frente al combustible convencional y está influenciado directamente por los costos de la materia prima (Gebremariam & Marchetti, 2018). Pese a este gran problema, el biodiésel producido a partir de *Jatropha curcas* L. es el más barato por tonelada en comparación con otros cultivos destinados al mismo fin (Kamel et al., 2018) como se puede visualizar en la Tabla 2.

**Tabla 2**

*Comparación de precios de biodiésel a partir de diferentes materia primas*

<b>Materia prima</b>	<b>Precio de Biodiésel (USD/Tn)</b>
<i>Jatropha</i>	400 – 500
Palma	720 – 750
Soya	800 – 805
Colza	940 – 965

*Nota.* En la presente tabla se muestra una comparación del precio de biodiésel proveniente de diferentes fuentes vegetales. Tomado de Smart utilization of *Jatropha* (*Jatropha curcas* Linnaeus) seeds for biodiesel production: Optimization and mechanism por Kamel et al., 2018.

**Rehabilitación de suelos.** La contaminación de los suelos por metales pesados (As, Pb, Cr, Hg) es considerado como uno de los mayores problemas medioambientales causados por las actividades humanas (Álvarez et al., 2019). La fitorremediación de suelos es una técnica ampliamente estudiada. García Martín et al. (2020) y Chinmayee et al. (2014) reportaron en sus estudios que utilizando *Jatropha curcas* L. existe captura y extracción de metales pesados del suelo obteniendo resultados promisorios al reportar acumulación de estos en las raíces y órganos aéreos.

Una de las características fundamentales para la utilización de especies de tipo herbácea para la fitorremediación es la capacidad de retener estos contaminantes en la biomasa (Mohammed et al., 2021). En Colombia se condujo un estudio piloto con el uso de *Jatropha curcas* L. en áreas de minería a baja escala y artesanal con una reducción significativa de la concentración de Hg en el suelo medidos en periodos de 4 meses (Marrugo et al., 2021). Estudios aplicados en esta especie no muestra signos de toxicidad cuando es



expuesta directamente a 10 µg de mercurio, lo cual es un indicador promisorio para su utilización (Marrugo et al., 2015).

El uso de *Jatropha curcas* L. para remediación de suelos está ligado también a su capacidad para el secuestro de carbono (Mohammed et al., 2021). Este secuestro está íntimamente ligado a la producción de biomasa que está afectada por diversos factores ambientales como de cultivo (Bayen et al., 2016). Esta planta también tiene como beneficio el aumentar los contenidos de nutrientes a nivel edáfico lo cual es una característica importante a fin de recuperar suelos afectados por actividades humanas (Abdulla et al., 2011).

**Usos Medicinales.** Las plantas medicinales se han utilizado extensivamente y el Piñón no es la excepción. Esta planta es utilizada para tratar enfermedades causadas por bacterias y hongos en el sudeste asiático (Prasad et al., 2012). En el noreste de Brasil los habitantes utilizan el té de esta planta para aliviar la fatiga muscular y como tratamiento para la diarrea (Paulillo et al., 2012).

Rampadarath et al. (2016) determinaron que los extractos de *J. curcas* tienen efectos inhibitorios sobre patógenos que afectan al ser humano, así mismo, estos efectos son reportados por (Kumar et al., 2015) como actividades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias y antioxidante entre otras. El potencial de esta planta también es descrita por Prasad et al. (2012) quienes afirman que tiene muchos componentes que pueden tener usos medicinales.

### **Mejoramiento Genético**

El mejoramiento genético en plantas permite mejorar la genética de poblaciones de plantas domésticas (Goldman, 2018). Inicialmente, este mejoramiento consistía en la selección y cruce de plantas con las mejores características, de tal manera que las características deseables aparecían en la descendencia (Varshney et al., 2005). Desde el siglo XX se han

introducido nuevas técnicas para el mejoramiento de especies vegetales (ISAAA, 2014). Una de ellas, la mutagénesis inducida por sustancias químicas o radiación (Lusser et al., 2012).

### ***Mutagénesis***

Una mutación se define como un cambio en la estructura genética de un individuo, que es en general hereditario y ocurre de manera espontánea. Las mutaciones ocurren frecuentemente de forma natural y constituyen una de las fuerzas impulsoras centrales de la evolución (Mba, 2013).

En el campo de fitomejoramiento, la mutagénesis inducida se ha convertido en una técnica de gran relevancia para el desarrollo de nuevas variedades de plantas (Holme et al., 2019). El aprovechamiento de la mutagénesis en los programas de mejoramiento se basa en la capacidad de inducir una variación genética heredable, que permite la introducción de nuevos rasgos a cultivos de interés comercial (Oladosu et al., 2016).

Para inducir mutagénesis en plantas, se exponen órganos de propagación, como semillas y células meristemáticas, a agentes físicos y químicos con propiedades mutagénicas que permiten incrementar la frecuencia de mutaciones, acelerando la selección de variedades con propiedades agronómicas clave (Mullins et al., 2021; Oladosu et al., 2016). De este modo, la inducción de mutaciones tiene gran utilidad para ampliar la base genética de cultivos comerciales, y además se utiliza como herramienta para disciplinas de investigación como la genómica funcional (Schaart et al., 2016).

El mejoramiento tradicional basado en el cruzamiento y la selección sigue siendo una actividad importante para el mejoramiento de cultivos, pero el fitomejoramiento mediado por mutagénesis ha tomado una gran importancia debido a la generación acelerada de numerosas variedades mejoradas de cultivos alimentarios, forrajeros, ornamentales e industriales (Woo et al., 2015). Los programas de fitomejoramiento de todo el mundo han utilizado el mejoramiento

por mutaciones desde la década de 1920 con el descubrimiento de que mutaciones hereditarias podían inducirse en las plantas mediante irradiación o tratamientos químicos (Kipp et al., 2000).

En las últimas décadas se han desarrollado numerosas técnicas precisas para la modificación *in vitro* o *in vivo* de plantas a nivel genético y su mejoramiento por estos medios (Lusser et al., 2012). De igual modo, se han hecho grandes esfuerzos para regular los programas de fitomejoramiento basados en técnicas no tradicionales y se han formado múltiples organismos de control para su vigilancia (Mullins et al., 2021).

La importancia que tiene la mutagénesis dirigida se refleja en su aplicación a cultivos que no pueden ser manejados por técnicas tradicionales, como aquellos que no producen semillas. En el caso de estos cultivos, la inducción de mutaciones puede ser la única forma productiva de aumentar la variabilidad para el desarrollo de nuevos cultivares (Ahloowalia & Maluszynski, 2001). Esto también se aplica al mejoramiento en cultivos de raíces y tubérculos, y al desarrollo de nuevas variaciones en especies de plantas ornamentales propagadas vegetativamente (Oladosu et al., 2016). En especies de cultivos perennes propagados vegetativamente, se aplica mutagénesis para superar limitaciones de tiempo, espacio de cultivo e identidad clonal (Hemming, 2011).

De forma general, el proceso de mutagénesis inicia con la selección de una parte vegetativa que va a ser expuesta al mutágeno, que frecuentemente consiste en un material propagativo o semilla. Posteriormente se expone el material vegetal al mutágeno por un determinado tiempo y en condiciones controladas (Chaudhary et al., 2019).

Para la evaluación de resultados tras la aplicación de mutagénesis, se realiza un cribado de mutantes, que implica la selección de individuos de una gran población mutada, en base a criterios de selección específicos (Glenn et al., 2017). Sin embargo, dentro del proceso

de selección a menudo se pueden incluir mutantes putativos o mutantes falsos. Es necesario llevar a cabo una confirmación de mutantes, mediante un proceso de reevaluación de los supuestos mutantes en un entorno controlado y replicado, utilizando muestras grandes (Fasoula et al., 2020).

**Mutagénesis Dirigida.** Casi todas estas técnicas llevan a la producción de plantas que, al ser expuestas al entorno abierto, no tienen ADN extraño. Esto se debe a que las construcciones de vectores nunca se integran en el genoma de la planta o se segregan en la siguiente generación (Bezie et al., 2020). Las excepciones son cogenesis e intragénesis, y herramientas para insertar fragmentos de ADN más largos en sitios preseleccionados en el genoma de la planta (Gurushidze et al., 2017).

La herramienta de mutación dirigida más utilizada en plantas es CRISPR / Cas9, debido a su alta eficiencia y fácil diseño. Mediante esta técnica es posible realizar más de una mutación dirigida a la vez (Bortesi & Fischer, 2015). El sistema consiste en una nucleasa Cas, que induce una ruptura de doble cadena en el ADN y un ARN quimérico (ARNg), cuyos primeros 20 nucleótidos son complementarios a una secuencia genómica de 20 nucleótidos ubicada donde se pretende la mutación (Jankowicz et al., 2017).

Una diferencia clave entre la reproducción por mutaciones convencionales y las mutaciones dirigidas, es que las herramientas de mutación dirigida deben administrarse a las células (Chaudhary et al., 2019). Aunque los transformantes primarios contienen el constructo de ADN, lo más frecuente es que no haya enlace entre el sitio de inserción del constructo y el sitio de la mutación. Esto provoca que se introduzca solo los cambios de interés, sin que haya una inserción de ADN proveniente del sistema de mutación (Shan & Voytas, 2018).

Los cultivos de OGM (Organismos Genéticamente Modificados) desarrollados a partir de mutaciones dirigidas con técnica de ingeniería genética son considerados aún como un

riesgo ambiental y una amenaza a la economía tradicional. Su aplicación comercial se ve fuertemente limitada y su uso es exclusivo para investigación, teniendo una baja presencia de mercado en la mayoría de regiones (Tang et al., 2020).

**Mutagénesis Al Azar.** Las mutaciones inducidas al azar son eventos aleatorios que se utilizan para mejorar la viabilidad de un cultivo y su capacidad productiva. Este proceso de mutagénesis implica una selección de los mutantes en base a sus características fenotípicas (Sikora et al., 2011). La ventaja que presenta este tipo de mutagénesis es la capacidad de desarrollar un cultivo de mayor interés comercial, en menor tiempo y sin mayores restricciones de distribución (Bezie et al., 2020).

Este tipo de metodologías son poco reproducibles por sus eventos aleatorios característicos, lo que implica que incluso el cumplimiento de las condiciones de irradiación publicadas podría no resultar en los mismos eventos de mutación (Bezie et al., 2020). Una forma de mitigar esta incertidumbre es confiar en la probabilidad estadística y trabajar con poblaciones de gran tamaño (Acquaah, 2020).

La dosis de un mutágeno que alcanza la frecuencia de mutación óptima, con el menor daño no intencionado posible, se considera como la dosis óptima para la mutagénesis inducida (Mba, 2013). En el caso de mutágenos físicos, la dosis óptima se estima mediante la realización de pruebas de radiosensibilidad, que indica la cantidad de efectos reconocibles de la exposición a la radiación en el sujeto irradiado (Datta, 2019). Cuando se utilizan mutágenos químicos, las dosis óptimas se infieren utilizando los mismos principios subyacentes de cuantificación del daño observado (Jo & Kim, 2019).

Los mutágenos físicos más comunes son la radiación electromagnética, que incluye a rayos gamma, rayos X y luz ultravioleta. También se incluye radiación de partículas con neutrones rápidos y térmicos, partículas beta y partículas alfa (Sikora et al., 2011). Los

mutágenos químicos incluyen agentes alquilantes, como el metanosulfonato de etilo (EMS), agentes intercalantes, como bromuro de etidio y análogos de bases, que se incorporan al ADN durante la replicación en lugar de las bases normales (Wani et al., 2014).

Estos agentes provocan cambios en las secuencias de ADN y, en consecuencia, modifican el aspecto los rasgos y las características del organismo tratado (Mba et al., 2007). La ventaja de los mutágenos químicos y físicos es que se pueden usar para preparar poblaciones mutantes con altas densidades de mutaciones, lo que facilita la detección de mutaciones específicas en una población (Leitao, 2012; Szarejko et al., 2017).

Las técnicas basadas en radiación son frecuentemente utilizadas en semillas para generar mutantes aleatorios (Sikora et al., 2011). Con frecuencia se utilizan rayos X y rayos gamma para generar radicales libres que causan deleciones en el ADN. Los rayos ultravioleta se utilizan de igual forma para inducir la dimerización de pirimidinas y de este modo alterar la replicación del ADN (Beyaz et al., 2016).

### **Radiación Gamma**

Los rayos gamma son ondas electromagnéticas emitidas por transiciones gamma en núcleos atómicos (Humans, 2000). Son considerados la transición más común en la que el núcleo pierde su energía de excitación y pasa a un nivel fundamental (Erramli & Asri, 2019). Cuando el núcleo atómico es desintegrado se obtienen radiaciones electromagnéticas ionizantes conocidas como radiación gamma (Peterson et al., 2003). Por ejemplo, en la desintegración del  $^{60}\text{Co}$  a  $^{60}\text{Ni}$  se produce una doble emisión de radiación gamma (Marion, 1981).

La radiación gamma puede originarse también por el fenómeno conocido como aniquilación. En el cual un positrón encuentra su antipartícula, un electrón y las dos partículas

son aniquiladas, dando como resultado la conversión de la masa en energía como radiación gamma (L'Annunziata, 2007).

Considerada el tipo de radiación más energética y penetrante en comparación a los rayos alfa y beta (Kovács & Keresztes, 2002). Su alta frecuencia, longitud de onda corta y fotones de alta energía que presenta facilita su interacción con la materia biológica (Vanhoudt *et al.*, 2014). Estudios han demostrado que daña el ADN y tiene efectos sobre el crecimiento, reproducción y morfología (Dallas *et al.*, 2012).

Los rayos gamma son el tipo de radiación que ha sido mayoritariamente aplicada para la generación de mutantes en plantas (Beyaz *et al.*, 2016). Se caracterizan por ser radiaciones ionizantes capaces de provocar la liberación o captura de electrones y romper directamente los enlaces químicos de las moléculas (Li *et al.*, 2019).

Los radicales libres que se producen en las células en presencia de la radiación gamma pueden dañar o modificar componentes de la célula vegetal (Kim *et al.*, 1998). Dependiendo del nivel radiación pueden afectar la morfología, anatomía, bioquímica y fisiología de las plantas de manera diferencial (Jan *et al.*, 2012). Cuando los materiales vegetales son irradiados con dosis altas en minutos u horas se produce una irradiación aguda, en cambio cuando son irradiados con dosis bajas en semanas o meses se produce una irradiación crónica (Kang, 2010).

Su aplicación se ha dado para el mejoramiento de manzanas (*Malus domestica*), piñas (*Ananas comosus*), frutillas (*Fragaria spp.*), jengibre (*Zingiber officinale*), papa (*Solanum tuberosum*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), café (*Coffea arabica*), platáno (*Musa acuminata Cavendish*), entre otras especies (Kashtwari *et al.*, 2021).

### **Marcadores Moleculares**

Estas secuencias de nucleótidos se investigan a través del polimorfismo entre las secuencias de diferentes individuos (Mondinini *et al.*, 2009). La base de estos polimorfismos se

debe a inserciones, deleciones, mutaciones puntuales, duplicación y traslocación (Spooner et al., 2010). Un marcador ideal deber ser codominante, distribuirse uniformemente en el genoma, ser altamente reproducible y polimórfico (Nadeem et al., 2018). El uso de marcadores moleculares para polimorfismos informativos es esencial, teniendo en cuenta que la composición genética para cada especie es única y no esta influenciada por la edad, condiciones fisiológicas o ambientales (Chan, 2003).

La detección del polimorfismo de ADN con el desarrollo y uso de marcadores moleculares es uno de los logros más importantes en la genética molecular (Caenato, 1997). Ha permitido mejorar especies de plantas utilizando una reproducción asistida por marcadores (Joshi et al., 2004). Esta mejora ha sido acelerada con el desarrollo de huellas dactilares moleculares para accesiones divergentes (Caenato, 1997).

Los marcadores moleculares pueden mostrar homocigosidad (marcador dominante) o heterocigosidad (marcador codominante) (Hartl & Clark, 2006). Para detectar diversidad genética en plantas los marcadores dominantes más usados son: ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), Huella digital de amplificación (DAF), Repetición de secuencia Inter simple (ISSR) y Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Williams et al., 1990; Welsh & McClelland, 1991; Vos et al., 1995; Caenato, 1997). Mientras que los marcadores codominantes más usados son: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), Microsatélites (SSR), Secuencias polimórfica amplificada escindida (CAPS), Etiqueta de secuencia expresada (EST), Polimorfismo de nucleótido único (SNP) y Sitios marcados con secuencias (STS) (Botstein et al., 1980; Adams et al., 1991; Akkaya et al., 1992; Paran & Michelmore, 1993; Jordan & Humphries, 1994).

El establecimiento de una relación genética entre miembros del género *Jatropha* y *Ricinus* sp. se ha logrado con el uso de marcadores de isoenzimas (Sujatha et al., 2008). Por otro lado, el uso de marcadores RAPD ha permitido confirmar hibridación de híbridos entre



*Jatropha curcas* L. y *Jatropha integerrima* (Ram et al., 2008). Además, se ha determinado la variabilidad entre poblaciones de *Jatropha curcas* L. con el uso de marcadores ISSR (Basha & Mulpuri, 2009).

### **Microsatélites (SSR)**

Los microsatélites (SSRs) son repeticiones cortas en tándem de 1 a 6 nucleótidos que se encuentran en el genoma de varias especies en una frecuencia alta (Beckman & Weber, 1992). Los locus microsatélites pueden variar entre 5 a 40 repeticiones (Kantety et al., 2002). Generalmente las repeticiones de tres nucleótidos son las más comunes en plantas, mientras que las de dos nucleótidos están presentes en vertebrados (Chen et al., 2006).

Este tipo de marcadores pueden ser encontrados tanto en regiones codificantes como no codificantes, incluso se han encontrado en genomas cloroplásticos y mitocondriales (Provan et al., 2001; Soranzo et al., 1999). Pueden ser detectados fácilmente utilizando PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) debido al alto grado de polimorfismos de longitud que presentan (Zane *et al.*, 2002).

Los SSRs pueden clasificarse en función de su tamaño, tipo de unidad de repetición y su ubicación en el genoma (Weber & May, 1989; Weising & Gardner, 1999; Wang et al., 2009;). En la Tabla 3 se describe la clasificación de estos marcadores moleculares en función a los criterios mencionados.

**Tabla 3***Clasificación de los Microsatélites*

<b>Basado en su tamaño</b>	
<b>Mono nucleótidos</b>	$(A)_n$
<b>Di nucleótidos</b>	$(CA)_n$
<b>Tri nucleótidos</b>	$(CGT)_n$
<b>Tetra nucleótidos</b>	$(CAGA)_n$
<b>Penta nucleótidos</b>	$(AAATT)_n$
<b>Hexa nucleótidos</b>	$(CTTTAA)_n$
<b>Basado en el tipo de unidad de repetición</b>	
<b>Simple perfecto</b>	$(CA)_n$
<b>Simple imperfecto</b>	$(AAC)_n$ ACT $(AAC)_n + 1$
<b>Simple compuesto</b>	$(CA)_n$ $(GA)_n$
<b>Compuesto imperfecto</b>	$(CCA)_n$ TT $(CGA)_n + 1$
<b>Basado en la localización</b>	
<b>Nuclear</b>	nuSSRs
<b>Cloroplástico</b>	cpSSRs
<b>Mitocondrial</b>	mtSSRs

*Nota.* En la presente tabla se muestra la clasificación de microsatélites en función a tres criterios. Modificado de Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants por R. Kalia, 2010.

Este tipo de marcadores moleculares se presenta con frecuencia dentro o cerca de genes en las plantas (Morgante et al., 2002). Estudios en diferentes especies de plantas han

demostrado que los *motifs* de microsatélites de tri y tetra nucleótidos son comunes en intrones. en cambio el resto son comunes en exones (Varshney et al., 2005).

Los estudios genéticos de procesos con escalas de tiempo ecológicas se realizan con marcadores microsatélites debido a la alta tasa de mutación que presentan (Chambers & MacAvoy, 2000). El rango de mutación de estos marcadores se encuentra entre  $10^3$  a  $10^6$  por generación (Gemayel et al., 2012). Estos marcadores no requieren de una calidad de ADN alta pero para ser utilizados la secuencia debe ser conocida (Weising, 2005).

Las mutaciones que no han sido reparadas por el sistema de reparación de errores forman nuevos alelos en los loci SSR haciendo que estos marcadores sean más informativos (Oliveira et al., 2006). Sumado al hecho de que son codominantes y multi alélicos se han convertido en los marcadores más utilizados en el genotipaje de plantas (Mason, 2015).

### ***M13 - Tailed***

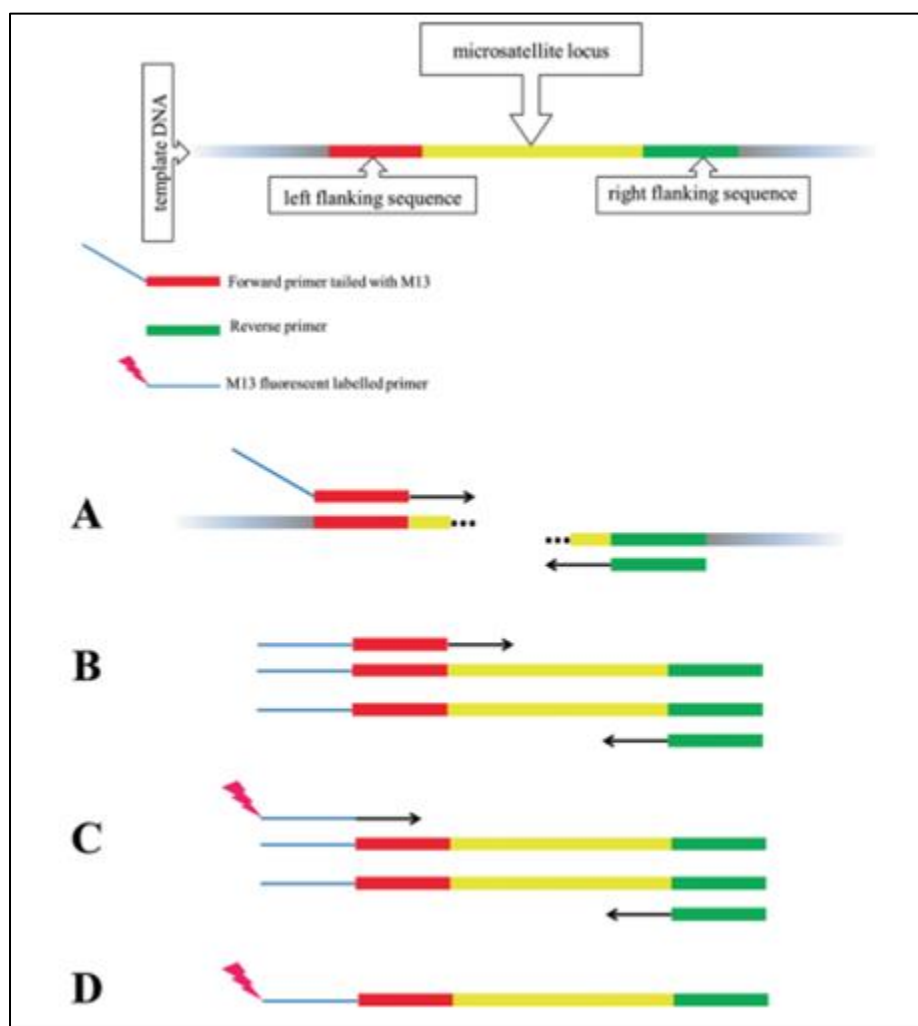
En los ensayos con marcadores SSR se utiliza con frecuencia el método M13 - Tailed con el fin de reducir costos de etiquetado de primers fluorescentes (Ablett et al., 2006). Este método consiste en utilizar un primer forward que contenga una extensión de nucleótidos en el extremo 5' que será idéntica a un primer de secuenciación M13 marcado con fluorescencia (Wang et al., 1998). De esta forma se requiere únicamente un primer fluorescente en lugar de sintetizar primers marcados con fluorescencia para cada loci SSR (Arruda et al., 2009).

En este caso las condiciones de la PCR son diferentes a una normal, debido a que el uso del primer forward con la extensión de nucleótidos y el primer reverse de longitud estándar puede promover la amplificación de productos inespecíficos (Donini et al., 1998). En los ciclos iniciales de la PCR, los primers forward con la extensión de nucleótidos y los primers reverse amplifican un locus microsatélite. Mientras que, en los ciclos finales de la PCR se reduce la temperatura para permitir la hibridación del primer fluorescente universal (Onysk &

Boczowska, 2017). Tras la amplificación, el producto SSR se encuentra marcado con fluorescencia (Ablett et al., 2006). En la Figura 7, se puede visualizar lo que sucede durante la PCR usando el método M13 -Tailed.

**Figura 7**

*Método M13 - Tailed*



*Nota.* Tomado de M13 - Tailed Simple Sequence Repeat (SSR) Markers in Studies of Genetic Diversity and Population Structure of Common Oat Germplasm por A. Onyśk, 2017.

### Capítulo III: Materiales y Métodos

#### Ubicación

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Laboratorio de Biología Molecular pertenecientes al Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) – Estación Experimental Santa Catalina, cuya ubicación se describe en la Tabla 4.

**Tabla 4**

*Ubicación de la Estación Experimental Santa Catalina*

<b>Provincia</b>	Pichincha
<b>Cantón</b>	Mejía
<b>Parroquia</b>	Cutuglagua
<b>Altitud</b>	3100 msnm
<b>Latitud UTM</b>	0° 22' 8'' S
<b>Longitud UTM</b>	78 ° 33' 24'' O

*Nota.* msnm: metros sobre el nivel del mar. S: Sur. O: Oeste.

#### Material Vegetal

El material vegetal (semillas) del clon promisorio CP041 se obtuvo de las colecciones de campo localizadas en la Estación Experimental Portoviejo, cuya ubicación se describe en la Tabla 5.

Las semillas se cosecharon al término del desarrollo reproductivo, y se conservaron por cuatro semanas a temperatura ambiente en el laboratorio previo al inicio del ensayo.

**Tabla 5***Ubicación de la Estación Experimental Portoviejo*

<b>Provincia</b>	Manabí
<b>Cantón</b>	Portoviejo
<b>Parroquia</b>	Santa Ana
<b>Altitud</b>	50 msnm
<b>Latitud UTM</b>	1° 07' 26.6'' S
<b>Longitud UTM</b>	80° 24' 58.9'' O

*Nota.* msnm: metros sobre el nivel del mar. S: Sur. O: Oeste.

### **Establecimiento *in vitro* de Semillas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) Irradiadas y No Irradiadas**

#### ***Aplicación de Radiación Gamma a Semillas de Piñón***

Se seleccionaron semillas de un clon promisorio de Piñón (*Jatropha curcas* L.) CP041 proveniente del banco de germoplasma del INIAP. Las semillas seleccionadas se enviaron al irradiador de Cobalto - 60 a cargo de la Subsecretaría de Control, Investigación y Aplicaciones Nucleares, del Ministerio de Electricidad y Energía Renovable (SCAN-MERNNR), donde fueron irradiadas a dos niveles de irradiación (100 y 200 Gy).

#### ***Fase de Introducción de Semillas de Piñón***

**Proceso de Desinfección de Semillas con Tegumento.** Las semillas se colocaron en una solución de yodo povidina al 1% durante 15 minutos. Después, se realizaron tres lavados con agua autoclavada. Finalmente, se colocaron en una solución fungicida de Carbendazim (1%) y Sulfato de cobre pentahidratado (1%) durante 2 horas (Peña, 2009).

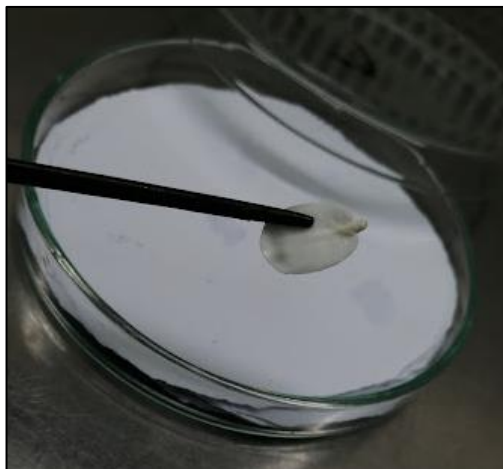
**Proceso Pre Germinativo de Imbibición de Semillas.** Las semillas previamente desinfectadas fueron sometidas a un proceso de escarificación donde se procedió a retirar el tegumento. Posteriormente fueron colocadas en agua destilada estéril durante 24 horas a temperatura ambiente y oscuridad.

**Proceso de Desinfección de Semillas sin Tegumento.** Dentro de Cabina de Flujo Laminar, las semillas se colocaron en una solución fungicida de Carbendazim (1%) y Sulfato de cobre pentahidratado (1%) durante 90 minutos. Después, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Finalmente, se colocaron en una solución de Hipoclorito de Sodio (0.3%) más 5 gotas de Tween20 durante 3 horas (Peña, 2009).

**Siembra de Embriones de Semillas.** Dentro de Cabina de Flujo Laminar se extrajo el embrión de las semillas, el cual puede visualizarse en la Figura 8. Los embriones extraídos se sembraron individualmente en medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) con vitaminas suplementado con 150 mL.L<sup>-1</sup> de agua de coco, 1 g.L<sup>-1</sup> de carbón activado, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa y 5.8 g.L<sup>-1</sup> de agar (Peña, 2009). El pH del medio se ajustó a 5.7. Los embriones sembrados se mantuvieron por dos meses en el cuarto de crecimiento con 16 horas luz de fotoperiodo, 28 ± 2 °C de temperatura y 40% de humedad relativa.

**Figura 8**

*Embrión extraído de la semilla de Piñón*



*Nota.* Embrión fotografiado en cámara de flujo laminar.

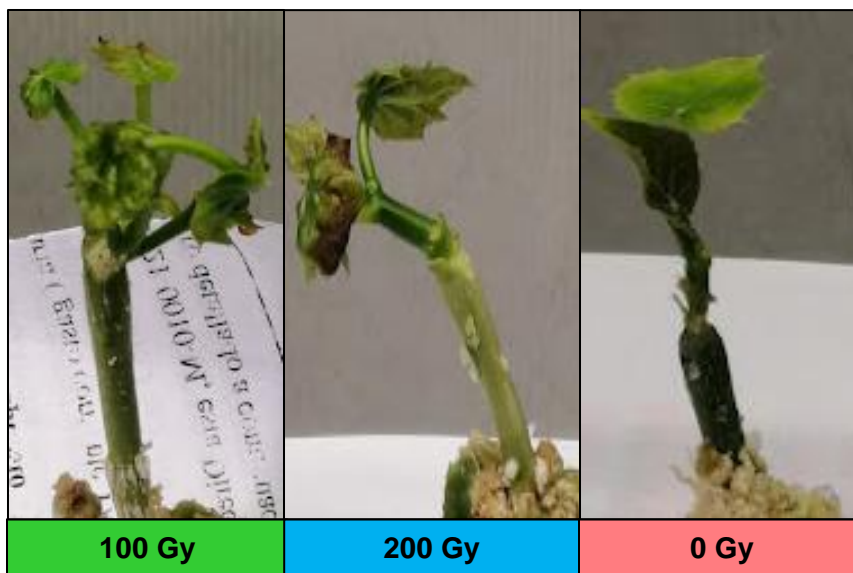
***Fase de Multiplicación de Embriones Germinados de Piñón*****Establecimiento de *in vitro* Plantas en Generación MV1 a partir de los Embriones**

**Germinados.** Los brotes apicales con hoja verdadera, que se pueden visualizar en la Figura 9, presentes en los embriones germinados se sembraron en medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) con vitaminas suplementado con 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa, 10.24 mg.L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, 0.1 ppm de IBA, 0.5 ppm de Kin y 7 g.L<sup>-1</sup> de agar. El pH del medio se ajustó a 5.7. Las condiciones del cuarto de crecimiento fueron 16 horas luz de fotoperiodo, 28 ± 2 °C de temperatura y 40% de humedad relativa.



**Figura 9**

Brotos apicales con hojas verdaderas desarrollados en los embriones germinados



Nota. Brotos apicales fotografiados en Cámara de Flujo Laminar.

**Establecimiento de *in vitro* Plantas en Generación MV2 a partir del Brote Apical de los Embriones Germinados.** Los brotes sembrados en la fase anterior fueron trasplantados a un medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) con vitaminas suplementado con 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa, 0.1 ppm de AIA, 0.5 ppm de BAP y 7 g.L<sup>-1</sup> de agar. El pH del medio se ajustó a 5.7. Las condiciones del cuarto de crecimiento fueron 16 horas luz de fotoperiodo, 28 ± 2 °C de temperatura y 40% de humedad relativa.

**Optimización del proceso de Multiplicación en *in vitro* Plantas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) provenientes de Semillas No Irradiadas**

*In vitro* plantas de Piñón provenientes de semillas sin irradiar se trasplantaron a medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) sin vitaminas suplementado con 30 g.L<sup>-1</sup> y 7 g.L<sup>-1</sup> de agar. El pH del medio se ajustó a 5.7. Las condiciones del cuarto de crecimiento fueron 16 horas luz de fotoperiodo, 28 ± 2 °C de temperatura y 40% de humedad relativa.

Luego de un mes, las *vitro* plantas de Piñón sin irradiar se traspasaron a medio de cultivo MS (Murashige & Skoog) sin vitaminas suplementado con 30 g.L-1, 7 g.L-1 de agar, 0.1 ppm de AIA y BAP a diferentes concentraciones (0.5, 1 y 2 ppm). El pH del medio se ajustó a 5.7. Las condiciones del cuarto de crecimiento fueron 16 horas luz de fotoperiodo,  $28 \pm 2$  °C de temperatura y 40% de humedad relativa. En control del ensayo consistió en medio MS (Murashige & Skoog) sin vitaminas suplementado con 30 g.L-1 y 7 g.L-1 de agar.

**Determinación de variabilidad genética en *vitro* Plantas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) provenientes de Semillas Irradiadas y No Irradiadas utilizando marcadores microsatélites**

***Extracción de ADN a partir de Tejido Foliar de vitro Plantas***

En cámara de Flujo Laminar se tomó tejido foliar a partir de *vitro* plantas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) en generación MV2. El tejido foliar se colocó en tubos para microcentrífuga de 2 mL y se añadió 600 µL de buffer de extracción CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio), el cual se describe en la Tabla 6.

**Tabla 6**

*Buffer de Extracción 2X CTAB*

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad (100 mL)</b>	<b>Concentración</b>
<b>CTAB</b>	2 g	2%
<b>Tris HCl 1 M (pH 8)</b>	10 mL	100 mM
<b>NaCl</b>	8.12 g	1.4 M
<b>EDTA 0.5 M</b>	4 mL	20 mM
<b>PVP</b>	1 g	1%

*Nota.* Esta tabla muestra los componentes del buffer de extracción basado en lo descrito por Ferreira & Grattapagil (1998). NaCl (Cloruro de Sodio), EDTA (Ácido etildiaminotetraacético) y PVP (Polivinilpirrolidona).

Se añadió 2  $\mu\text{L}$  de 2-mercaptoetanol a cada muestra de tejido foliar. Se maceró la muestra con la ayuda de un pistilo. Se añadió 400  $\mu\text{L}$  de buffer de extracción CTAB y se homogenizó. Las muestras maceradas se incubaron a 65°C durante 1 hora, agitando cada 30 minutos.

Una vez culminada la incubación, las muestras se centrifugaron a 13200 rpm durante 15 minutos. Se tomó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo. Se añadió 600  $\mu\text{L}$  de CIA (Cloroformo: Alcohol Isoamílico) en una proporción 24:1. Se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. Este proceso se repitió una segunda vez.

Se añadió 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol y se agitó por inmersión. Las muestras con isopropanol se colocaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Se centrifugó a 13000 rpm durante 4 minutos. La pastilla de ADN formada se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 70% y una vez con 1 mL de etanol absoluto.

Se llevaron las muestras a la micro estufa durante 30 minutos a 37°C. El ADN se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de buffer TE (Tris HCl – EDTA), se añadió 2  $\mu\text{L}$  de RNAsa y se incubó durante 15 minutos en el termobloque.

### ***Cuantificación de ADN extraído a partir de Tejido Foliar de vitro Plantas***

El ADN extraído se cuantificó en el espectrofotómetro para Microplacas Epoch de BioTek Instruments©. Donde se colocó 2  $\mu\text{L}$  de buffer TE como blanco y 2  $\mu\text{L}$  de cada muestra. Con la información obtenida se realizó la dilución del ADN a una concentración final de 30 ng/ $\mu\text{L}$  en 100  $\mu\text{L}$ . La concentración de ADN obtenida se puede visualizar en el Anexo 1 al 3.

### ***Validación de ADN extraído a partir de Tejido Foliar de vitro Plantas***

Para la validación se evaluó el producto de amplificación del ADN extraído mediante una PCR con el primer microsatélite JcSSR-26. Los geles de validación se pueden visualizar en

el Anexo 4 al 6. Los componentes de la mezcla para amplificación de ADN extraído a partir de tejido foliar de *vitro* plantas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) se describen en la Tabla 7.

**Tabla 7**

*Mezcla para amplificación de ADN de vitro plantas de Piñón*

	Concentración Final	1X (µL)
<b>Agua UP</b>		2.18
<b>Buffer PCR</b>	1	1.5
<b>MgCl<sub>2</sub> (mM)</b>	2	0.6
<b>dNTPs (mM)</b>	0.253	0.38
<b>Primer F (µM)</b>	0.5	0.38
<b>Primer R (µM)</b>	0.5	0.38
<b>Taq (U/µL)</b>	0.067	0.1
<b>Muestra ADN (ng/µL)</b>	1.33	2
<b>Total</b>	-	7.5

*Nota.* MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de Magnesio. F: Forward. R: Reverse. Taq: Polimerasa Taq. mM: millimolar. µM: micromolar. µL: microlitros. ng: nanogramos.

Las condiciones de la PCR para amplificación de ADN extraído a partir de tejido foliar de *vitro* plantas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) se describen en la Tabla 8, donde se puede visualizar las diferentes fases de la PCR, temperaturas y el tiempo que se requiere en cada fase para la amplificación.

**Tabla 8**

*Condiciones de PCR para amplificación de ADN de in vitro plantas de Piñón*

<b>Fases</b>	<b>Temperatura (T°)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	
Desnaturalización Inicial	94	5 min	
Desnaturalización	94	45 s	
Alineamiento	55	1 min	<b>30 ciclos</b>
Elongación	72	1.30 s	
Elongación Final	72	7 min	
Enfriamiento	10	5 min	

*Nota.* min: minutos. s: segundos.

Para visualizar la banda de amplificación se preparó gel de agarosa al 2% v/v. La agarosa se disolvió en buffer TAE 1X (Tris – Acetato – EDTA) y se agregó 2 µL del colorante de tinción SafeView™ Classic. El gel fue cargado con 5 µL de los productos PCR y 3 µL del marcador de talla TrackIt™ 1 Kb Plus DNA Ladder. La corrida electroforética se realizó en 30 minutos a 100 V.

#### ***Limpieza de ADN extraído a partir de Tejido Foliar de in vitro Plantas***

El ADN extraído no validado se sometió a una limpieza con acetato de amonio. Se colocó 350 µL de Acetato de Amonio (7.5 M) al ADN resuspendido en buffer TE. Se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se añadió 700 µL de isopropanol. Las muestras se colocaron a -20°C durante 1 hora. Se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm. La pastilla de ADN formada se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 70% y una vez con 1 mL de etanol absoluto.

Se llevaron las muestras a la microestufa durante 30 minutos a 37°C. El ADN se resuspendió en 50 µL de buffer TE, se añadió 1 µL de RNAsa y se incubó durante 15 minutos en el termobloque.

Tras la limpieza se repitió el proceso de cuantificación y validación descrito en los apartados anteriores.

***Metodología M13 - Tailed con ADN extraído a partir de Tejido Foliar de vitro Plantas***

Se procedió a armar tres placas utilizando el ADN validado, las cuales se pueden visualizar en el Anexo 7 al 9. De un estudio anterior realizado en Piñón, se seleccionaron 18 primers microsatélites que mostraban mayor polimorfismo. Estos primers se pasaron en 8 combinaciones multiplex, que se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9***Combinaciones multiplex de 18 primers microsatélites*

<b>Combinación</b>	<b>Primers</b>	<b>Tamaño (pb)</b>	<b>Temperatura Annealing</b>
<b>Tríplex 1</b>	JAT-23	260	55 °C
	JAT-43	210	
	JAT-45	160	
<b>Tríplex 2</b>	JAT-132	265	55°C
	JAT-131	215	
	JAT-141	160	
<b>Dúplex 1</b>	JAT-158	180	55°C
	JAT-176	230	
<b>Dúplex 2</b>	JAT-73	245	55°C
	JAT-259	170	
<b>Dúplex 3</b>	pJcSSR3342	175	56°C
	pJcSSR2760	230	
<b>Dúplex 4</b>	pJcSSR3401	180	56°C
	pJcSSR2767	240	
<b>Dúplex 5</b>	pJcSSR2628	229	56°C
	pJcSSR2806	189	
<b>Dúplex 6</b>	JAT-209	180	55°C
	JAT-223	235	

*Nota.* pb: pares de base. °C: grados Celsius.

Los componentes de la mezcla para amplificación del ADN validado utilizando las combinaciones dúplex de primers microsatélites se describen en la Tabla 10, donde se puede visualizar la concentración final y el volumen requerido para una sola reacción. A diferencia de

la mezcla para amplificación descrita con anterioridad, en este caso se incluye el marcaje M13 utilizado.

**Tabla 10**

*Mezcla para amplificación utilizando las combinaciones dúplex de primers microsatélites*

	<b>Concentración Final</b>	<b>1 Rx (<math>\mu</math>L)</b>
<b>Agua UP</b>		0.19
<b>Buffer PCR</b>	1	1
<b>MgCl<sub>2</sub> (mM)</b>	2.5	0.5
<b>dNTPs (mM)</b>	0.2	0.2
<b>M13 700/800</b>	0.16	0.8
<b>Primer F (<math>\mu</math>M)-M13</b>	0.01	0.05
<b>Primer R (<math>\mu</math>M)</b>	0.16	0.08
<b>Primer F (<math>\mu</math>M)-M13</b>	0.01	0.05
<b>Primer R (<math>\mu</math>M)</b>	0.16	0.08
<b>Taq (U/<math>\mu</math>L)</b>	0.05	0.05
<b>Muestra ADN (ng/<math>\mu</math>L)</b>	2	2
<b>Total</b>	-	5

*Nota.* MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de Magnesio. F: Forward. R: Reverse. Taq: Polimerasa Taq. mM: millimolar.  $\mu$ M: micromolar.  $\mu$ L: microlitros. ng: nanogramos. M13 700/800: M13 forward marcado con IRDye 700 – 800.

Los componentes de la mezcla para amplificación del ADN validado utilizando las combinaciones tríplex de primers microsatélites se describen en la Tabla 11, donde se puede visualizar la concentración final y el volumen requerido para una sola reacción. A diferencia de



la mezcla para amplificación descrita con anterioridad, en este caso se incluye el marcaje M13 utilizado.

**Tabla 11**

*Mezcla para amplificación utilizando las combinaciones tríplex de primers microsátélites*

	Concentración Final	1 Rx ( $\mu\text{L}$ )
<b>Agua UP</b>		0.88
<b>Buffer PCR</b>	1	1.4
<b>MgCl<sub>2</sub> (mM)</b>	2.5	0.7
<b>dNTPs (mM)</b>	0.2	0.28
<b>M13 700/800</b>	0.16	1.12
<b>Primer F (<math>\mu\text{M}</math>)-M13</b>	0.01	0.07
<b>Primer R (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	0.16	0.11
<b>Primer F (<math>\mu\text{M}</math>)-M13</b>	0.01	0.07
<b>Primer R (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	0.16	0.11
<b>Primer F (<math>\mu\text{M}</math>)-M13</b>	0.01	0.07
<b>Primer R (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	0.16	0.11
<b>Taq (U/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	0.05	0.07
<b>Muestra ADN (ng/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	1.43	2
<b>Total</b>	-	7

*Nota.* MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de Magnesio. F: Forward. R: Reverse. Taq: Polimerasa Taq. mM: millimolar.  $\mu\text{M}$ : micromolar.  $\mu\text{L}$ : microlitros. ng: nanogramos. M13 700/800: M13 forward marcado con IRDye 700 – 800.

Las condiciones de la PCR para amplificación del ADN validado utilizando la técnica M13 - Tailed se describen en la Tabla 12, donde se puede visualizar las diferentes fases de la

PCR, temperaturas y el tiempo que se requiere en cada fase para la amplificación. A diferencia de las condiciones de PCR descritas con anterioridad, en este caso hay dos fases de desnaturalización inicial a temperaturas diferentes.

**Tabla 12**

*Condiciones de PCR para amplificación con Metodología M13 - Tailed*

<b>Fases</b>	<b>Temperatura (T°)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	
Desnaturalización	94	2 min	
Inicial	95	4 min	
Desnaturalización	94	1 min	
Alineamiento	TA	2 min	<b>25 ciclos</b>
Elongación	72	2 min	
Elongación Final	72	10 min	
Enfriamiento	4	10 min	

*Nota.* min: minutos. s: segundos.

### ***Preparación del Gel de Acrilamida para Corrida en LI-COR 4300***

Se colocó 20 mL de gel de Acrilamida. cuyos componentes se muestran en la Tabla 13. Posteriormente, se añadió 150 µL de APS (persulfato de amonio) y 15 µL de Temmed (NNNN-Tetramethylethylene-dianime 99%). Se procedió a verter 0.25 mm del gel en las placas de vidrio limpias. verificando que no se formen burbujas. Se insertó el peine y dejó polimerizar el gel durante 1 hora. El gel polimerizado se colocó en el equipo LI-COR 4300 junto con buffer TBE 1X. Se realizó un precorrida en el equipo durante 25 minutos.

**Tabla 13***Gel de Acrilamida*

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad (100 mL)</b>
Urea	40 g
Buffer TBE 10X	10 mL
Acrilamida al 40%	8.8 mL
Agua destilada estéril	Aforar a 100 mL

*Nota.* TBE: Tris, borato y EDTA. mL: mililitros. g: gramos.

***Preparación de las muestras para Corrida en LI-COR 4300***

Las muestras amplificadas se diluyeron con 5  $\mu$ L de azul de parada, cuya composición se puede visualizar en la Tabla 14. Se desnaturalizaron en un termociclador a 94°C por 3 minutos. Finalmente, fueron cargadas en el gel junto con los marcadores de talla correspondientes 4200 – 44 (IRDye 700®) y 4000 – 44B (IRDye 800). La corrida se realizó a 1500 V durante 1 hora y 30 minutos.

**Tabla 14***Azul de Parada 1X*

<b>Componentes</b>	<b>Concentración Final</b>
<b>Formamida</b>	98%
<b>EDTA</b>	10 mM
<b>Bromofenol</b>	0.3%
<b>Xylene cyanol</b>	-
<b>Agua destilada</b>	-

*Nota.* Esta tabla muestra los componentes para la preparación de Azul de Parada basado en lo descrito por Morillo & Miño (2011). EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

### ***Análisis de la Imagen del Gel en el software SAGA GT-SSR***

Las imágenes obtenidas tras la corrida en el equipo LI-COR 4300 se exportaron al software SAGA GT-SSR en formato tif., donde se procedió a realizar el genotipaje. Se creó un nuevo proyecto llamado Piñón 2021. Se ingresaron las tallas del marcador de peso molecular IRDye 700 e IRDye 800 nm que van desde 50 a 350 pb. Se procedió a ingresar el nombre de las muestras en el orden en el que se encontraban en la placa. También, se ingresó las combinaciones de los primers microsatélites utilizados. Finalmente, se creó un gel donde se realizó el genotipaje marcando con un “x” los alelos que se podían visualizar para cada muestra.

### **Análisis Estadístico**

#### ***Establecimiento in vitro de Semillas de Piñón (Jatropha curcas L.) Irradiadas y no Irradiadas***

**Unidad Experimental.** 40 semillas sembradas en un tubo de ensayo de 15x20 con 5 mL de medio de cultivo y un embrión por cada tubo.

**Tratamientos.** En la Tabla 15 se describen los tratamientos aplicados a las semillas de Piñón.

**Tabla 15**

*Tratamientos aplicados a las semillas del clon promisorio de Piñón CP041*

<b>Tratamientos</b>	<b>Dosis de Radiación</b>
<b>T1</b>	100 Gy
<b>T2</b>	200 Gy
<b>T3</b>	0 Gy

*Nota.* Gy: Gray unidad derivada de la dosis de radiación ionizante.

**Diseño Experimental.** Se aplicó un Diseño Completamente al azar (DCA). Se utilizaron 400 semillas por cada tratamiento con un total de 1200 semillas. Para el análisis estadístico se realizaron 10 observaciones de 40 semillas por cada tratamiento.

Para el análisis de los resultados se evaluaron las siguientes variables:

**Porcentaje de Semillas Germinadas (%).** Se contó el número de semillas establecidas *in vitro* que han germinado y se comparó con el número total de semillas. Las observaciones se realizaron a los 15 días, aproximándose al periodo tardío de germinación.

**Porcentaje de Semillas No Germinadas (%).** Se contó el número de semillas establecidas *in vitro* que no germinaron y se comparó con el número total de semillas. Las observaciones se realizaron a los 15 días, aproximándose al periodo tardío de germinación.

**Porcentaje de Contaminación por Hongo (%).** Se contó el número de semillas establecidas *in vitro* contaminadas por hongo y se comparó con el número total de semillas. Las observaciones se realizaron a los 15 días, aproximándose al periodo tardío de germinación.

**Porcentaje de Contaminación por Bacteria (%).** Se contó el número de semillas establecidas *in vitro* contaminadas por bacteria y se comparó con el número total de semillas. Las observaciones se realizaron a los 15 días. aproximándose al periodo tardío de germinación.

Los datos fueron sometidos a la prueba de normalidad Shapiro-Wilks. Se realizó el análisis estadístico de los resultados mediante un ANOVA (Análisis de la Varianza) con un nivel de significancia del 5%. Además, se procedió a realizar una comparación de medias Tukey con significancia del 0.05%.

En el caso de los datos que no presentaron normalidad, se procedió a aplicar la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Además, se realizó la comparación entre grupos para lo cual se aplicó la prueba de Dunn con significancia del 0.05%.

**Error Experimental.** El error experimental se debe a la manipulación de las unidades experimentales o de los equipos que se utilizarán en el proyecto.

**Error Aleatorio.** El error aleatorio se debe al proceso de conservación de las semillas en el banco de germoplasma.

**Análisis de datos.** Los datos fueron analizados en el software R.

### ***Optimización del proceso de Multiplicación en in vitro Plantas de Piñón (Jatropha curcas L.) provenientes de Semillas No Irradiadas***

**Unidad Experimental.** 1 *in vitro* planta proveniente de semillas germinadas *in vitro* en un frasco de vidrio de 250 mL con 30 mL de medio de cultivo.

**Tratamientos.** En la Tabla 16 se describen los tratamientos aplicados a las *in vitro* plantas de Piñón sin irradiar.

**Tabla 16**

*Tratamientos aplicados a vitro plantas del clon promisorio de Piñón CP041*

<b>Tratamientos</b>	<b>BAP</b>	<b>AIA</b>
<b>mIBJ1</b>	0 ppm	0.1 ppm
<b>mIBJ2</b>	0.5 ppm	0.1 ppm
<b>mIBJ3</b>	1 ppm	0.1 ppm
<b>mIBJ4</b>	2 ppm	0.1 ppm

*Nota.* mIBJ: medio de cultivo. ppm: partes por millón. BAP: 6-bencilaminopurina. AIA: Ácido Indol Acético.

**Diseño Experimental.** Se aplicó un Diseño Completamente al azar (DCA). Se utilizaron 10 *vitro* plantas por cada tratamiento con un total de 40 *vitro* plantas. Para el análisis estadístico se realizaron 10 observaciones de 1 *vitro* planta por cada tratamiento.

Para el análisis de los resultados se evaluaron las siguientes variables:

**Porcentaje de Supervivencia (%).** Se realizó una relación porcentual entre el número de *vitro* plantas sembradas y el número de *vitro* plantas sobrevivientes. Esta evaluación se realizó a los 30 días después de la siembra en cada subcultivo.

**Porcentaje de Brotación (%).** Se realizó una relación porcentual entre el número de *vitro* plantas sembradas y el número de *vitro* plantas que presenten brotes. Esta evaluación se realizó 30 días después de la siembra de cada subcultivo

**Número de Brotes por Explante (#).** Se realizó un conteo de cada brote por cada *vitro* explante sembrado. Esta evaluación se realizó 30 días después de la siembra de cada subcultivo.

**Longitud de Brote Inicial (cm).** Se midió la longitud de cada brote inicial. Esta evaluación se realizó 30 días después de la siembra de cada subcultivo.

**Longitud de Brotes Nuevos (mm).** Se midió la longitud de cada brote nuevo. Esta evaluación se realizó 30 días después de la siembra de cada subcultivo.

**Número de Hojas Verdaderas (#).** Se realizó un monitoreo con la finalidad de contabilizar las hojas verdaderas en cada *vitro* explante sembrado.

**Porcentaje de Vitro Plantas que presentan Callo (%).** Se realizó una relación porcentual entre el número de *vitro* plantas sembradas y el número de *vitro* plantas que presentan callos. Esta evaluación se realizó 30 días después de la siembra de cada subcultivo.

**Diámetro de Callos (cm).** Se realizó un monitoreo con la finalidad de determinar el diámetro del callo en cada *vitro* explante sembrado.

Los datos fueron sometidos a la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Al no presentar normalidad, se procedió a aplicar la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Finalmente, para realizar la comparación entre grupos se llevó a cabo la prueba de Dunn con significancia del 0.05%.

**Error Experimental.** El error experimental se debe a la manipulación de las unidades experimentales o de los equipos que se utilizarán en el proyecto.

**Error Aleatorio.** El error aleatorio se debe al estado de las *vitro* plantas de Piñón.

**Análisis de datos.** Los datos fueron analizados en el software R.



***Determinación de la variabilidad genética en vitro Plantas de Piñón (Jatropha curcas L.) provenientes de Semillas Irradiadas y No Irradiadas utilizando marcadores microsatélites***

Los datos obtenidos a partir del genotipaje en el software SAGA GT-SSR se importaron a Microsoft Excel, donde se elaboró una matriz genotípica, la cual se puede visualizar en el Anexo 10 al 12. Con los datos de esta matriz se procedió a realizar el análisis en los diferentes programas de análisis genético. Se utilizaron en total 223 muestras de ADN extraído de tejido foliar de *vitro* plantas de Piñón irradiadas y no irradiadas.

**Análisis de Muestras Genéticamente Idénticas.** Para el análisis de los resultados se evaluó el siguiente parámetro:

***Porcentaje de similitud.*** Se determinó el porcentaje de similitud que existía entre las muestras irradiadas y no irradiadas, en función a los alelos encontrados para cada marcador microsatélite utilizado.

Para determinar este parámetro se utilizó el programa Microsatellite Toolkit (Seok & Sappington, 2013).

## Capítulo IV: Resultados

### Establecimiento *in vitro* de Semillas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) Irradiadas y No Irradiadas

Al evaluar las variables se obtuvieron dos subconjuntos para cada una de ellas. En la Tabla 17, se puede visualizar los resultados obtenidos para cada variable en función de la dosis de radiación aplicada. Se puede observar que las semillas irradiadas presentan un mayor porcentaje de germinación y por tanto existe un menor porcentaje de semillas germinadas. Por otro lado, la contaminación por bacteria y hongo en la semillas irradiadas es menor.

**Tabla 17**

*Efecto de las dosis de radiación en la fase de introducción de semillas*

Dosis	Semillas (%)		Contaminación (%)	
	Germinadas	No Germinadas	Bacteria	Hongo
0 Gy	40.25 <sup>b</sup>	22.05 <sup>b</sup>	35.25 <sup>b</sup>	6.00 <sup>b</sup>
100 Gy	63.50 <sup>a</sup>	17.80 <sup>a</sup>	16.25 <sup>a</sup>	0.25 <sup>a</sup>
200 Gy	66.25 <sup>a</sup>	16.50 <sup>a</sup>	17.25 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>

*Nota.* Los valores medios designados con letra diferente expresan diferencias estadísticamente significativas al nivel de 0.05 y la misma letra indica que la diferencia es estadísticamente insignificante.

#### **Porcentaje de Semillas Germinadas y No Germinadas**

La prueba de Normalidad Shapiro – Wilks aplicada a los datos de porcentaje de semillas germinadas y no germinadas dio como resultado un valor *p* mayor a 0.05, concluyéndose que los datos siguen una distribución normal. En la Tabla 18, se presenta el ANOVA donde se

puede evidenciar que el valor Pr (>F) es menor a 0.05. Por lo tanto, las medias obtenidas son significativamente diferentes entre cada dosis.

**Tabla 18**

*ANOVA realizado para la variable porcentaje de semillas germinadas y no germinadas*

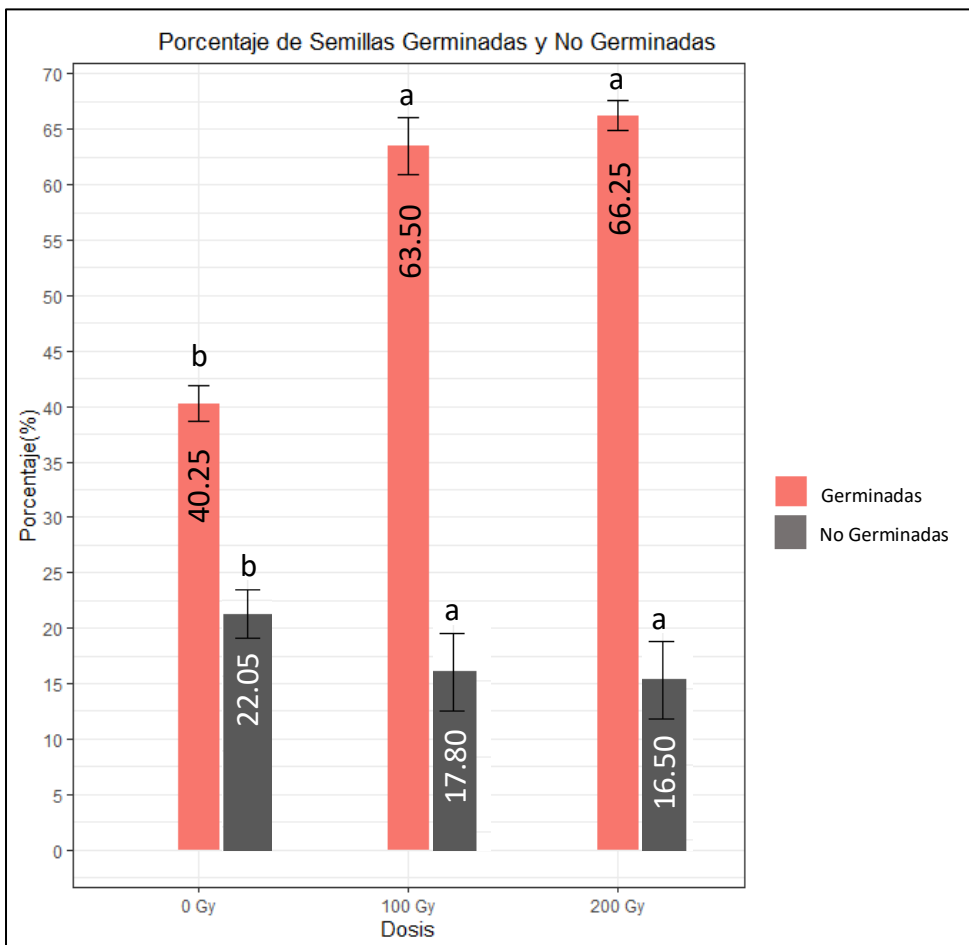
	Grados de Libertad	Semillas Germinadas		Semillas No Germinadas	
		Valor F	Pr (>F)	Valor F	Pr (>F)
<b>Dosis</b>	2	55.83	2.56e-10	55.83	2.56e-10
<b>CV</b>		10.67		19.08	

*Nota.* CV: Coeficiente de variación.

Los resultados obtenidos indican que las semillas irradiadas (100 y 200 Gy) presentan un mayor porcentaje de germinación en comparación a las no irradiadas (0 Gy). En la Figura 10, se puede observar que el mayor porcentaje de germinación obtenido fue para la dosis de 200 Gy con 66.25%, mientras que el menor porcentaje fue para la dosis de 0 Gy con 40.25%. Esto es un indicio de los efectos positivos que tiene la radiación gamma en la germinación de semillas. De igual manera, se puede observar que el porcentaje de semillas no germinadas es menor en aquellas que han sido irradiadas. Mientras que, en el caso de las semillas no irradiadas este porcentaje es mayor, con un valor de 22.05%.

**Figura 10**

*Efecto de la dosis de radiación en el porcentaje de semillas germinadas y no germinadas*

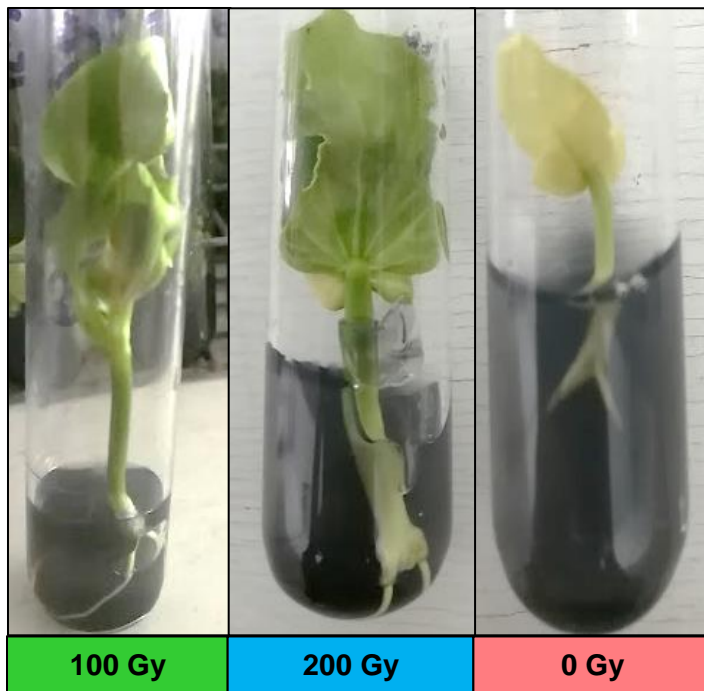


*Nota.* Gy: Gray unidad derivada de la dosis de radiación ionizante.

En la Figura 11, se puede observar los embriones germinados provenientes de semillas irradiadas y no irradiadas. Los embriones germinados están formados por las hojas cotiledonares y el hipocótilo. Se puede evidenciar que los embriones provenientes de semillas no irradiadas presentan un desarrollo menor en comparación a los proveniente de semillas irradiadas.

**Figura 11**

*Embriones germinados provenientes de semillas irradiadas*



*Nota.* Gy: Gray unidad derivada de la dosis de radiación ionizante. Los embriones germinados fueron fotografiados a los 7 días tras la introducción.

### ***Porcentaje de Contaminación por Bacteria***

La prueba de Normalidad Shapiro – Wilks aplicada a los datos de porcentaje de contaminación por bacteria dio como resultado un valor  $p$  igual a 0.08201. Como este valor es mayor a 0.05 se concluye que los datos siguen una distribución normal. En la Tabla 19, se presenta el ANOVA donde se puede evidenciar que el valor  $Pr(>F)$  es menor a 0.05. Por lo tanto, las medias obtenidas son significativamente diferentes entre cada dosis.

**Tabla 19**

*ANOVA realizado para la variable porcentaje de contaminación por bacteria*

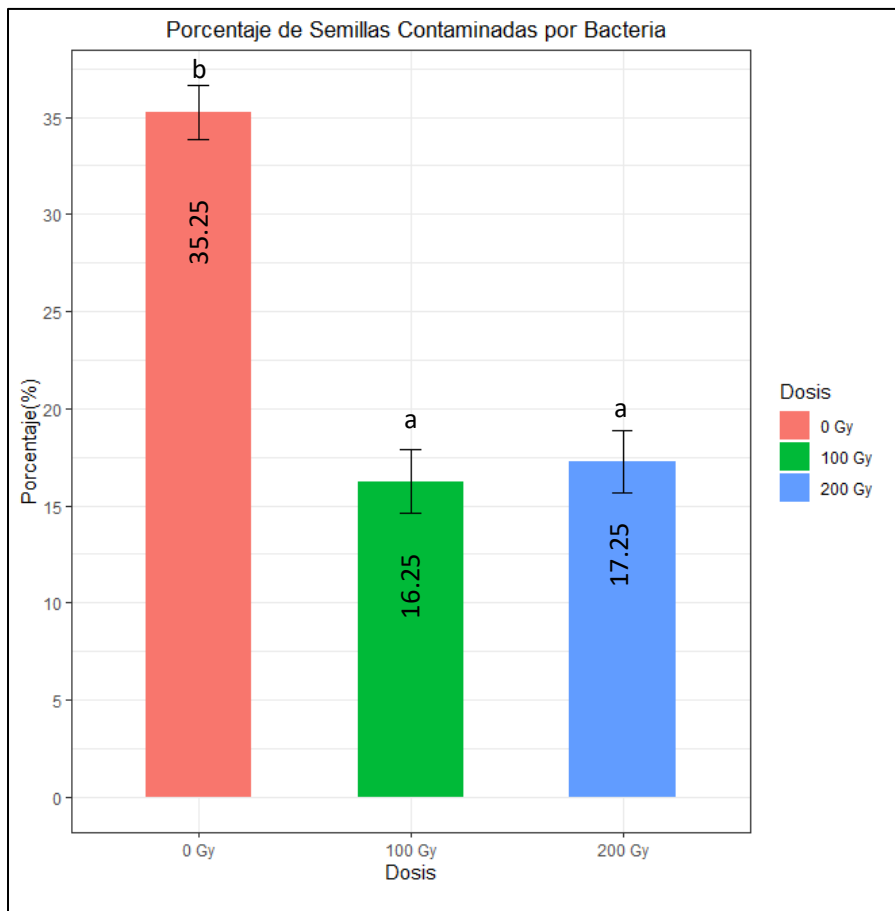
	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Valor F</b>	<b>Pr (&gt;F)</b>
<b>Dosis</b>	2	48.28	1.21e-09
<b>CV</b>		21.23	

*Nota.* CV: Coeficiente de variación.

Los resultados observados en la Figura 12 indican que las semillas irradiadas (100 y 200 Gy) presentan un menor porcentaje de contaminación por bacteria, con valores de 16.25% y 17.25%. Mientras que las semillas no irradiadas presentan un porcentaje mayor con un valor de 35.25%. Con esto se evidencia que la radiación tiene un efecto en la proliferación de microorganismos como las bacterias.

**Figura 12**

*Efecto de la dosis de radiación en el porcentaje de contaminación por bacteria*



*Nota.* Gy: Gray unidad derivada de la dosis de radiación ionizante.

### **Porcentaje de Contaminación por Hongo**

La prueba de Normalidad Shapiro – Wilks aplicada a los datos de porcentaje de contaminación por hongo dio como resultado un valor  $p$  igual a  $1.686e-07$ . Como este valor es menor a 0.05 se concluye que los datos no siguen una distribución normal. En la Tabla 20, se presentan los estadísticos de la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis donde se puede evidenciar que el valor  $p$  es menor a 0.05. Por lo tanto, las medianas obtenidas son significativamente diferentes entre cada dosis.

**Tabla 20**

*Prueba de Kruskal - Wallis realizada para la variable porcentaje de contaminación por hongo*

	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Chi cuadrado</b>	<b>Valor p</b>	<b>Valor t</b>	<b>MSD</b>
<b>Dosis</b>	2	25.22	3.34e-06	2.05	2.60

*Nota.* MSD: Error Cuadrático Medio.

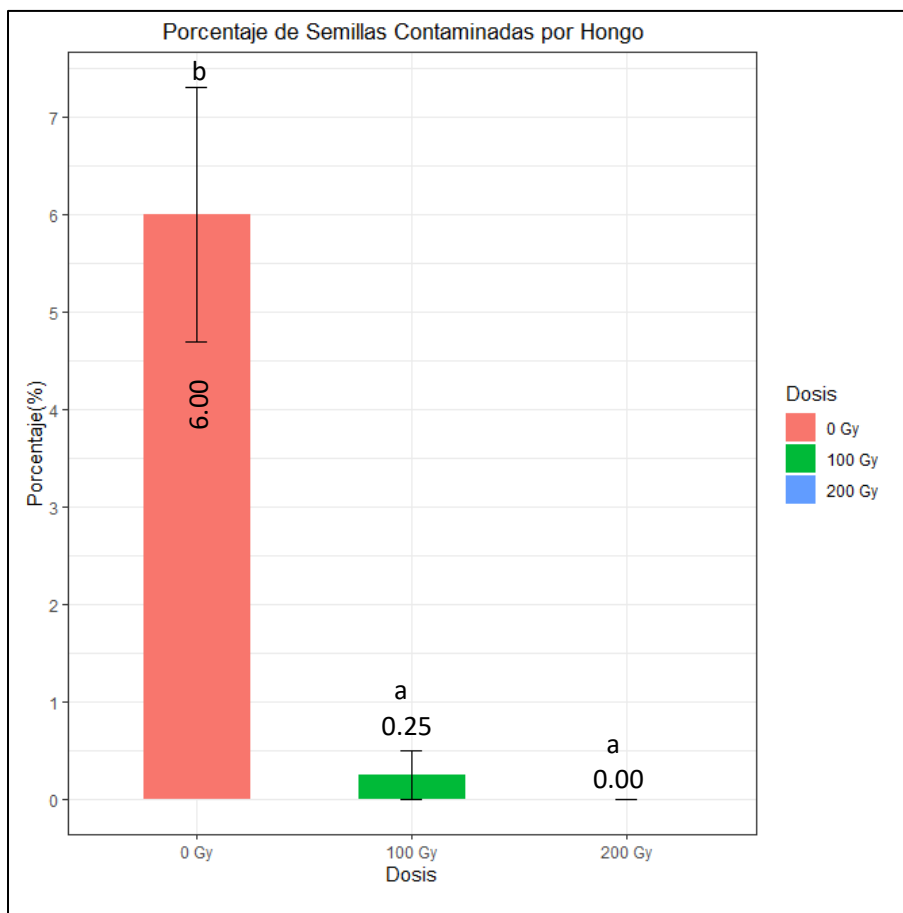
Los resultados observados indican que las semillas irradiadas (100 y 200 Gy) presentan un porcentaje de contaminación por hongo cercano al 0.00%. En contraste, las semillas no irradiadas (0 Gy) tienen el mayor porcentaje de contaminación por hongo, con un valor de 6.00%. Con esto se evidencia que la radiación tiene un efecto en la proliferación de comunidades fúngicas.

Por otro lado, en la Figura 13 se observa que las semillas irradiadas a 200 Gy no presentan contaminación por hongo. En comparación a las semillas irradiadas a 100 Gy, donde se observa contaminación por hongo en una proporción baja. Dando un indicio de que a una mayor dosis se inhibe por completo el crecimiento de hongos.



**Figura 13**

*Efecto de la dosis de radiación en el porcentaje de contaminación por hongo*



*Nota.* Gy: Gray unidad derivada de la dosis de radiación ionizante

### **Optimización del proceso de Multiplicación *in vitro* Plantas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) provenientes de Semillas No Irradiadas**

Las variables longitud de brote inicial, número de brotes, longitud de brotes nuevos y diámetro del callo presentan cuatro subconjuntos. Mientras que, en el caso del número de hojas verdaderas se presentan dos subconjuntos. Además, en la Tabla 21 se puede visualizar las medias obtenidas para cada variable en función de la concentración de hormona presente en el medio de cultivo.

**Tabla 21**

*Efecto de la combinación de BAP y AIA en la multiplicación de in vitro plantas de Piñón*

Hormona		Brote <sub>0</sub>	Hojas	Brotos <sub>N</sub>		Callo
BAP	AIA	L (cm)	N° (#)	N° (#)	L (mm)	D (cm)
0	0	0 <sup>d</sup>	1.5 <sup>b</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
0.5	0.1	0.43 <sup>c</sup>	6.2 <sup>a</sup>	1.23 <sup>c</sup>	1.78 <sup>c</sup>	1.35 <sup>c</sup>
1	0.1	0.86 <sup>b</sup>	6.3 <sup>a</sup>	2.69 <sup>b</sup>	3.47 <sup>b</sup>	2.63 <sup>b</sup>
2	0.1	1.29 <sup>a</sup>	6.5 <sup>a</sup>	4.69 <sup>a</sup>	5.07 <sup>a</sup>	4.42 <sup>a</sup>

*Nota.* Brote<sub>0</sub>: Brote Inicial. Brotos<sub>N</sub>: Brotos Nuevos. L: Longitud. N°: Número. D: Diámetro.

Los valores medios designados con letra diferente expresan diferencias estadísticamente significativas al nivel de 0.05 y la misma letra indica que la diferencia es estadísticamente insignificante.

### **Porcentaje de Supervivencia**

El porcentaje de supervivencia de los explantes fue del 100%. Estos resultados indican que los explantes utilizados en el ensayo se adaptaron al medio de cultivo MS, independientemente de si estaba suplementado con hormona y de la concentración de hormona utilizada.

### **Longitud del Brote Inicial**

La prueba de Normalidad Kolmogorov-Smirnov aplicada a los datos de longitud de brote inicial dio como resultado un valor  $p$  igual a 0.021. Como este valor es menor a 0.05 se concluye que los datos no siguen una distribución normal. En la Tabla 22, se presentan los estadísticos de la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis donde se puede evidenciar que las medianas son significativamente diferentes entre los medios de cultivo aplicados.

**Tabla 22**

*Prueba de Kruskal - Wallis realizada para la variable longitud del brote inicial*

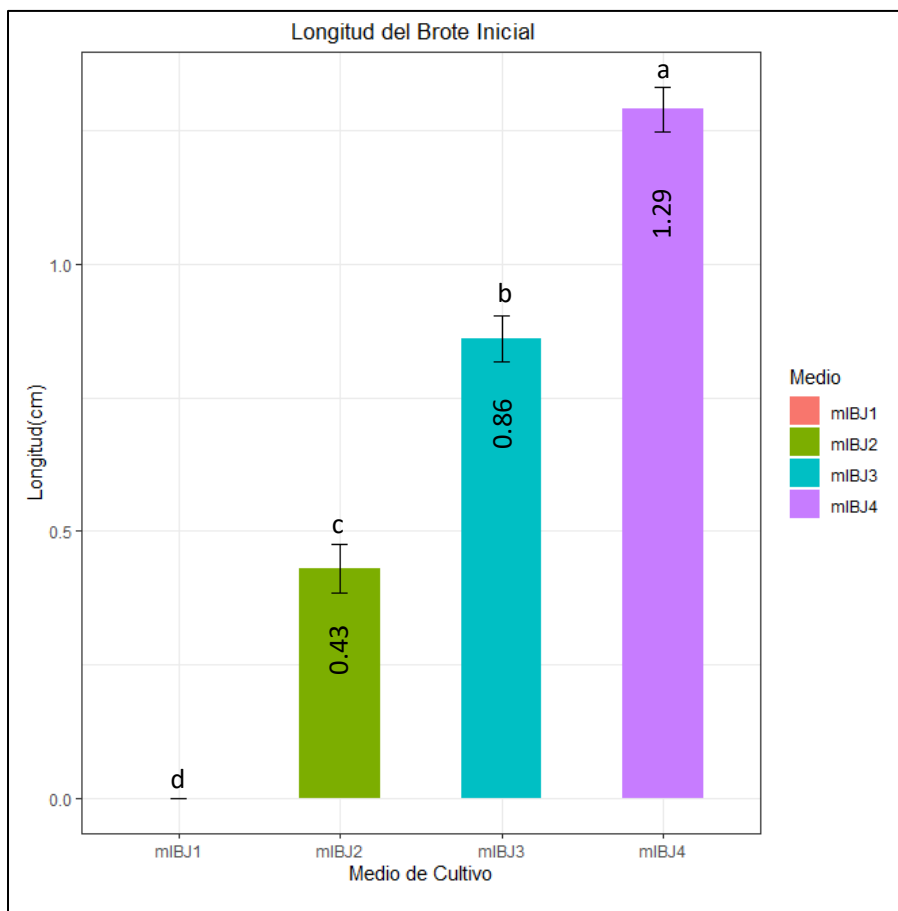
	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Chi cuadrado</b>	<b>Valor p</b>	<b>Valor t</b>	<b>MSD</b>
<b>Medio</b>	3	37.39	3.79e-08	2.02	2.21

*Nota.* MSD: Error Cuadrático Medio.

Los resultados observados indican que en el medio suplementado con BAP a 2 ppm y AIA a 0.1 ppm se obtiene la mayor elongación de brote con una media de longitud de 1.29 cm. En contraste, el medio sin hormonas presenta una media de longitud de brote inicial de 0 cm, es decir no se evidenció elongación del brote. Además, se puede observar en la Figura 14, que la elongación es proporcional a la concentración de hormona presente en el medio de cultivo.

Figura 14

*Efecto de la combinación de BAP y AIA en la longitud de brote inicial*



*Nota.* mIBJ1 medio sin hormonas. mIBJ2 medio suplementado con 0.5 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA. mIBJ3 medio suplementado con 1 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA. mIBJ4 medio suplementado con 2 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA.

### **Número de Hojas Verdaderas**

La prueba de Normalidad Kolmogorov-Smirnov aplicada a los datos de longitud de brote inicial dio como resultado un valor  $p$  igual a 0.014. Como este valor es menor a 0.05 se concluye que los datos no siguen una distribución normal. En la Tabla 23, se presentan los estadísticos de la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis donde se puede evidenciar que las medianas son significativamente diferentes entre los medios de cultivo aplicados.

**Tabla 23**

*Prueba de Kruskal - Wallis realizada para la variable número de hojas verdaderas*

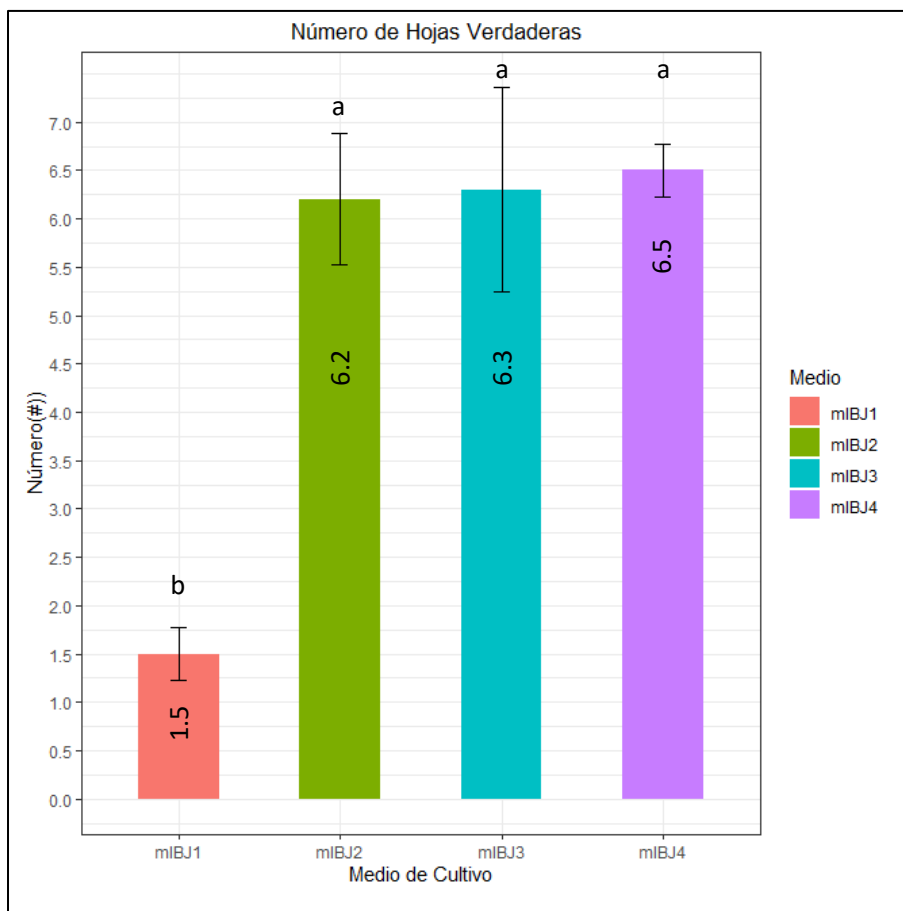
	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Chi cuadrado</b>	<b>Valor p</b>	<b>Valor t</b>	<b>MSD</b>
<b>Medio</b>	3	24.32	2.14e-05	2.03	6.68

*Nota.* MSD: Error Cuadrático Medio.

Los resultados observados indican el crecimiento de hojas verdaderas no está influenciado por la presencia de hormonas en el medio de cultivo. Se puede evidenciar que en todos los medios hubo crecimiento de hojas verdaderas independientemente de la presencia de hormonas. Sin embargo, el número de hojas varía en función de la concentración de hormona en el medio. En la Figura 15, se observa que en el medio mIBJ1 (0 ppm de BAP) se obtuvo alrededor de 1.5 hojas verdaderas por explante, mientras que en el resto de medios (0.5, 1 y 2 ppm de BAP) el número de hojas verdaderas se mantiene entre 6.2 a 6.5.

Figura 15

*Efecto de la combinación de BAP y AIA en el número de hojas verdaderas*



*Nota.* mIBJ1 medio sin hormonas. mIBJ2 medio suplementado con 0.5 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA. mIBJ3 medio suplementado con 1 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA. mIBJ4 medio suplementado con 2 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA.

### **Porcentaje de Brotación**

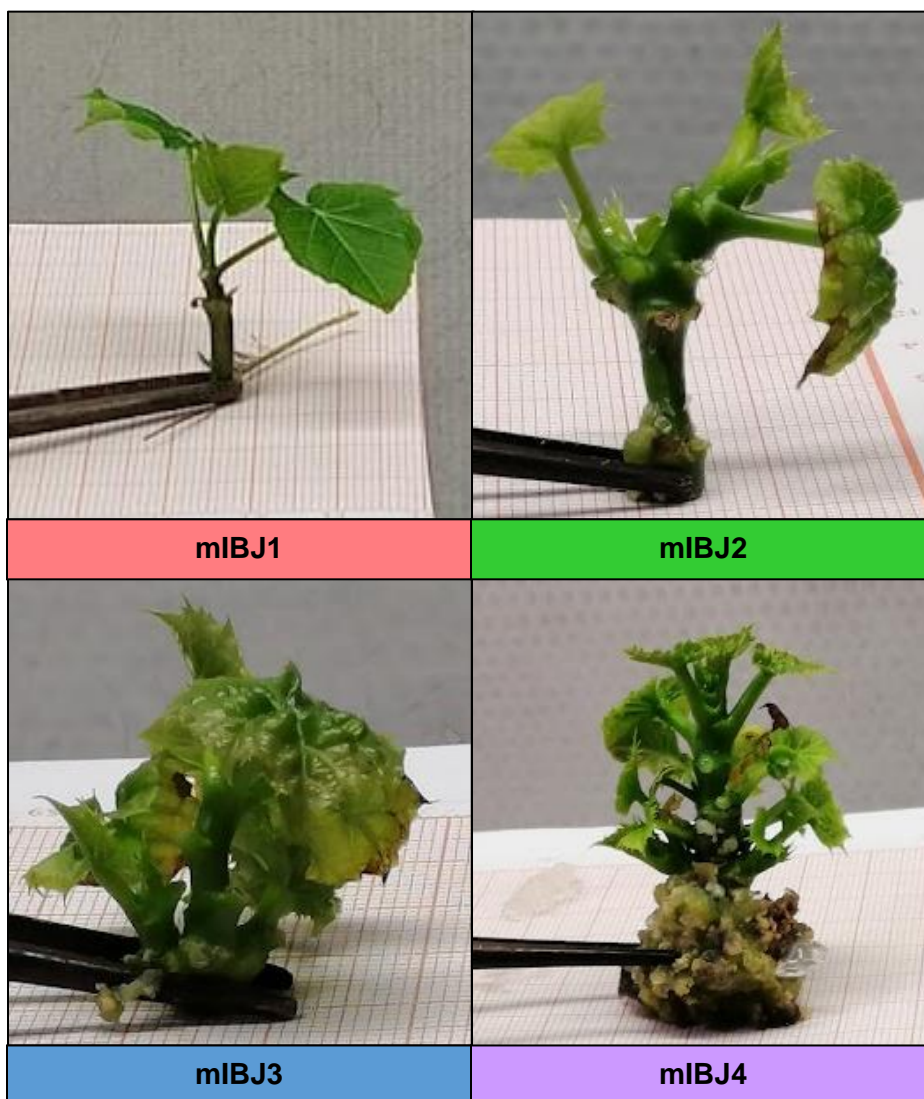
El porcentaje de brotación de los explantes fue del 100% en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de BAP en combinación con AIA. Mientras que, en el medio sin hormonas no se evidenció brotación en el explante. Estos resultados indican que la brotación del explante se ve influenciada por la presencia de hormonas en el medio

cultivo. Estos resultados dan indicio de los efectos sinérgicos de la combinación de BAP y AIA en la brotación.

En la Figura 16 se puede observar los brotes inducidos en cada medio de cultivo utilizado en el estudio. Se puede observar que en el medio sin hormonas se mantiene el brote inicial, mientras que el resto de medios que contienen BAP en combinación con AIA, existe la formación de nuevos brotes.

**Figura 16**

*Brotación observada en los diferentes medios de cultivo*



*Nota.* mlBJ1 medio sin hormonas. mlBJ2 medio suplementado con 0.5 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA. mlBJ3 medio suplementado con 1 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA. mlBJ4 medio suplementado con 2 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA. Las *vitro* plantas fueron fotografiadas a las 4 semanas tras el inicio del ensayo.

### **Número de Brotes**

La prueba de Normalidad Kolmogorov-Smirnov aplicada a los datos de número de brotes dio como resultado un valor  $p$  igual a 0.013. Como este valor es menor a 0.05 se concluye que los datos no siguen una distribución normal. En la Tabla 24, se presentan los estadísticos de la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis donde se puede evidenciar que las medianas son significativamente diferentes entre los medios de cultivo aplicados.

**Tabla 24**

*Prueba de Kruskal - Wallis realizada para la variable número de brotes*

	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Chi cuadrado</b>	<b>Valor p</b>	<b>Valor t</b>	<b>MSD</b>
<b>Medio</b>	3	37.88	2.99e-08	2.03	1.84

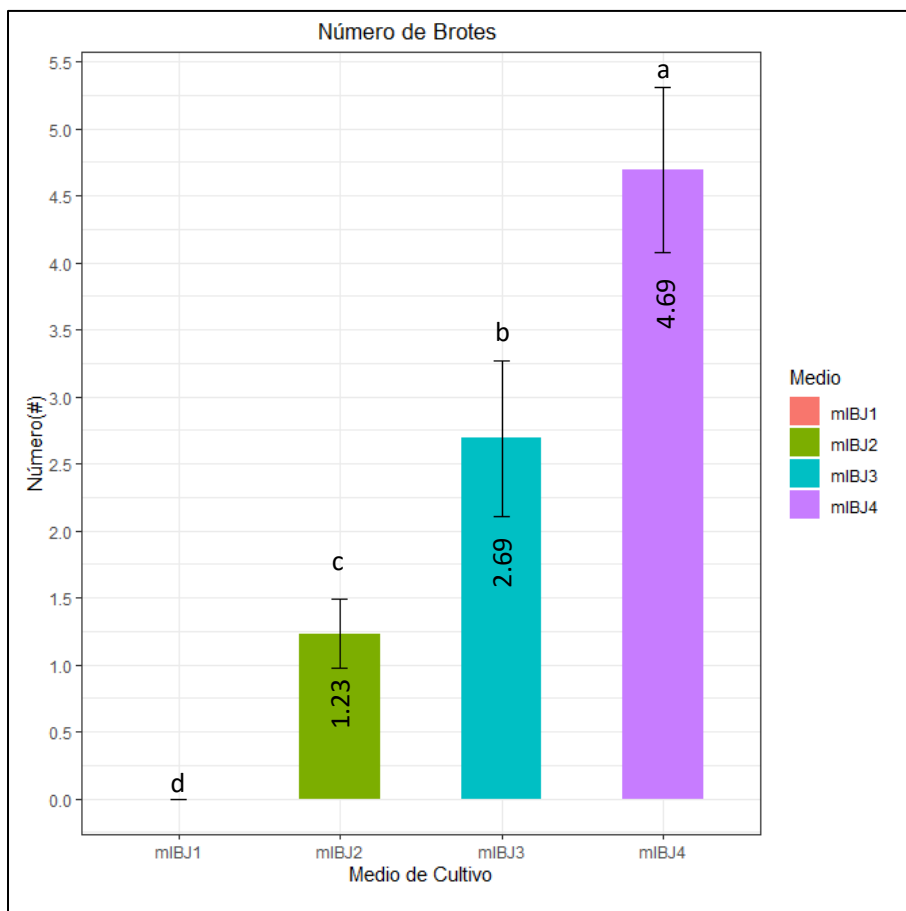
*Nota.* MSD: Error Cuadrático Medio.

Los resultados obtenidos indican que el número de brotes por explante se ve influenciado por la concentración de hormona en el medio de cultivo. Se puede observar en la Figura 17, que el medio mlBJ4 suplementado con 2 ppm de BAP en combinación con 0.1 ppm de AIA presenta el mayor número de brotes por explante, con 4.69 brotes. Mientras que el medio con la concentración de 0.5 ppm de BAP en combinación con 0.1 ppm de AIA presenta un menor número, con 1.63 brotes por explante. Se puede evidenciar que el número de brotes por explante está influenciado por la concentración de hormona en el medio de cultivo y es directamente proporcional a esta concentración.



**Figura 17**

*Efecto de la combinación de BAP y AIA en el número de brotes*

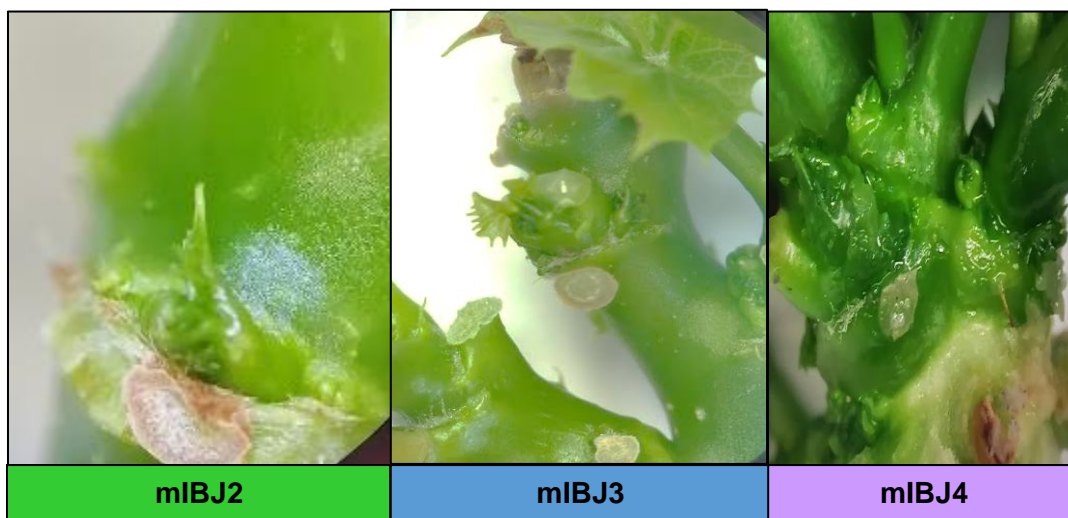


*Nota.* mIBJ1 medio sin hormonas. mIBJ2 medio suplementado con 0.5 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA. mIBJ3 medio suplementado con 1 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA. mIBJ4 medio suplementado con 2 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA.

En la Figura 18, se pueden visualizar los nuevos brotes observados en el estereomicroscopio para los diferentes medios de cultivo utilizados. Se puede evidenciar que los nuevos brotes obtenidos son bastante pequeños por lo que se tuvo que visualizar en un estereomicroscopio.

## Figura 18

*Brotos nuevos observados en el estereomicroscopio*



*Nota.* mIBJ2 medio suplementado con 0.5 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA. mIBJ3 medio suplementado con 1 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA. mIBJ4 medio suplementado con 2 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA. Los brotes fueron fotografiados a las 4 semanas tras el inicio del ensayo.

### ***Longitud de Brotes Nuevos***

La prueba de Normalidad Kolmogorov-Smirnov aplicada a los datos de longitud de brotes nuevos dio como resultado un valor  $p$  igual a 0.015. Como este valor es menor a 0.05 se concluye que los datos no siguen una distribución normal. En la Tabla 25, se presentan los estadísticos de la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis donde se puede evidenciar que las medianas son significativamente diferentes entre los medios de cultivo aplicados.

**Tabla 25**

*Prueba de Kruskal - Wallis realizada para la variable longitud de brotes nuevos*

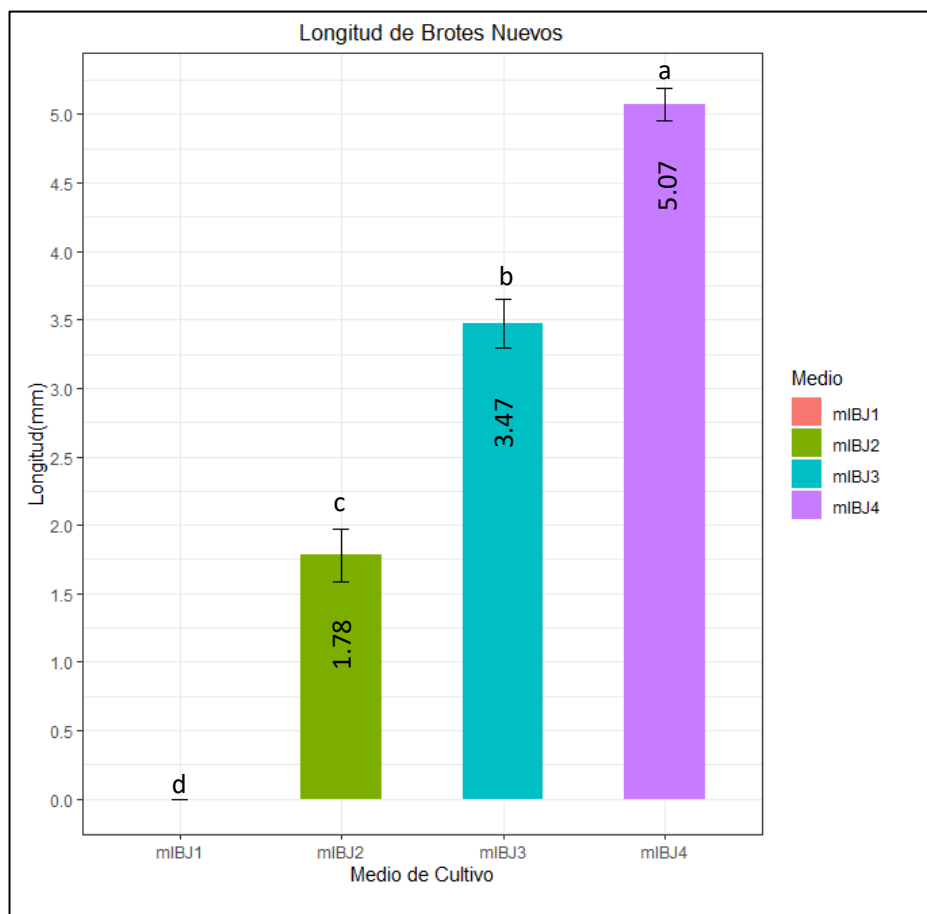
	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Chi square</b>	<b>Valor p</b>	<b>Valor t</b>	<b>MSD</b>
<b>Medio</b>	3	37.24	4.08e-08	2.03	2.32

*Nota.* MSD: Error Cuadrático Medio.

Los resultados observados en la Figura 19 indican que la mayor longitud de los brotes nuevos se obtiene en el medio mIBJ4 suplementado con 2 ppm de BAP, con una longitud de 5.07 mm. Conforme baja la concentración de hormona se evidencia que la longitud de los brotes nuevos es menor. De tal manera, que en el medio mIBJ3 con la menor concentración de BAP tiene una media de longitud de brote de 1.78 mm. Se puede evidenciar que la longitud de brotes se ve influenciada por la concentración de hormona en el medio de cultivo y es directamente proporcional a esta concentración.

**Figura 19**

*Efecto de la combinación de BAP y AIA en la longitud de brotes nuevos*



*Nota.* mIBJ1 medio sin hormonas. mIBJ2 medio suplementado con 0.5 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA. mIBJ3 medio suplementado con 1 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA. mIBJ4 medio suplementado con 2 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA.

### **Porcentaje de vitro Plantas que presentan Callo**

El porcentaje de *vitro* plantas que presenta callo es del 100% en los medios de cultivo suplementados con hormona. En contraste, las *vitro* plantas presentes en el medio sin hormonas no desarrollan callo. Estos resultados indican que las hormonas presentes en el medio de cultivo llevan a la inducción de callos en el explante. Algo que no es deseable en la micropropagación.

### **Diámetro del Callo**

La prueba de Normalidad Kolmogorov-Smirnov aplicada a los datos de longitud de brote inicial dio como resultado un valor  $p$  igual a 0.027. Como este valor es menor a 0.05 se concluye que los datos no siguen una distribución normal. En la Tabla 26, se presentan los estadísticos de la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis donde se puede evidenciar que las medianas son significativamente diferentes entre los medios de cultivo aplicados.

**Tabla 26**

*Prueba de Kruskal - Wallis realizada para la variable diámetro del callo*

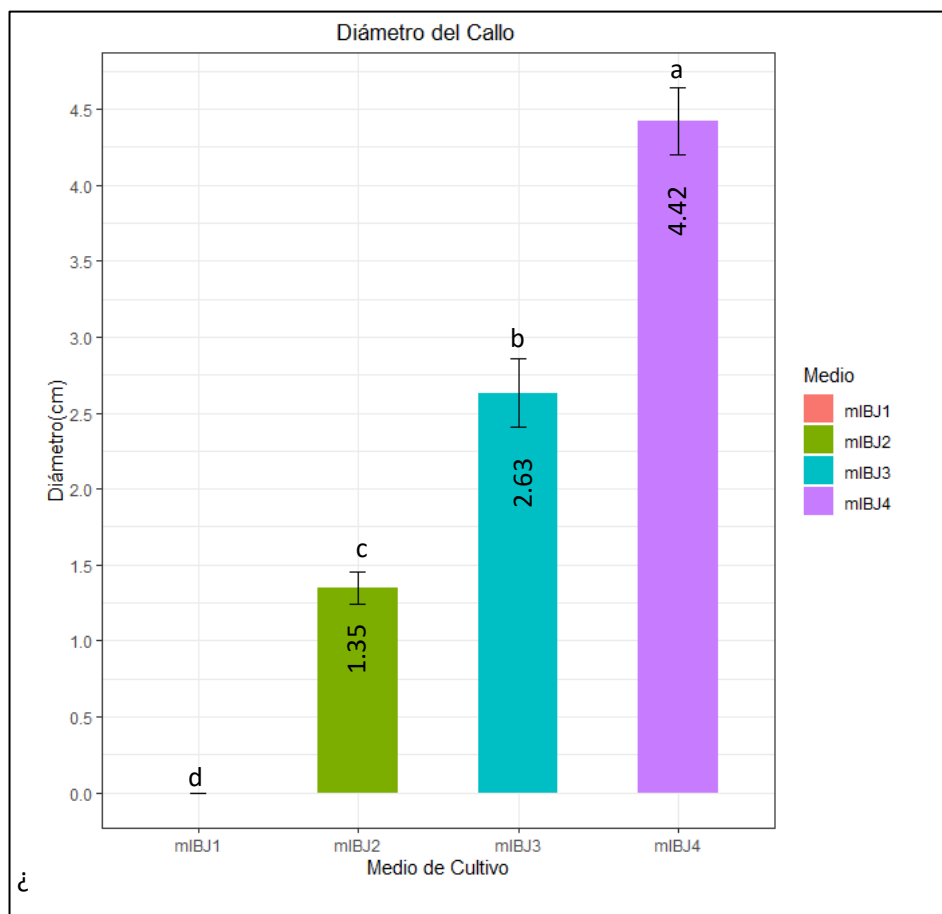
	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Chi square</b>	<b>Valor p</b>	<b>Valor t</b>	<b>MSD</b>
<b>Medio</b>	3	37.17	4.23e-08	2.03	2.36

*Nota.* MSD: Error Cuadrático Medio.

Los resultados observados en la Figura 20 indican que el mayor diámetro de callo se obtiene en el medio mIBJ4 suplementado con 2 ppm de BAP, con un diámetro de 4.42 cm. Mientras que en el medio mIBJ3 suplementado con 0.5 ppm de BAP, se forma un callo con un diámetro de 1.35 cm. Siendo un indicio de que el diámetro del callo es directamente proporcional a la concentración de hormona en el medio de cultivo.

Figura 20

Efecto de la combinación de BAP y AIA en el diámetro del callo



Nota. mIBJ1 medio sin hormonas. mIBJ2 medio suplementado con 0.5 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA. mIBJ3 medio suplementado con 1 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA. mIBJ4 medio suplementado con 2 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA.

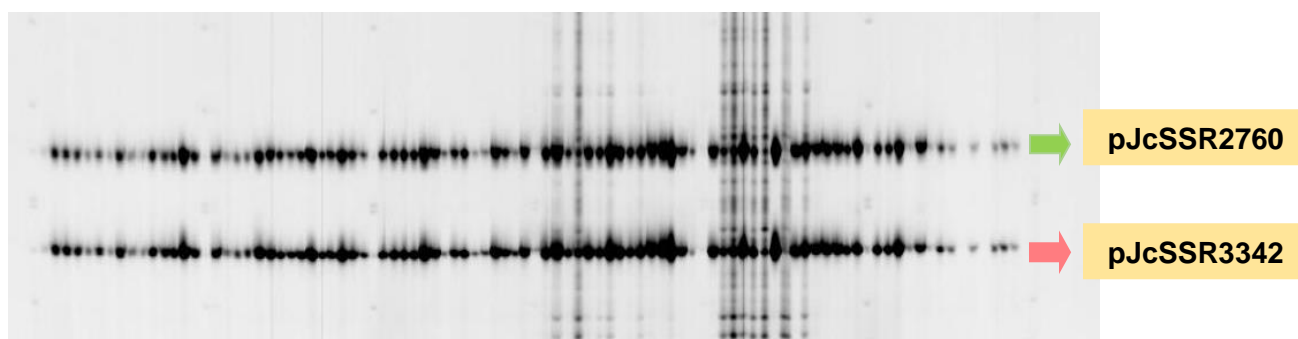
### Determinación de la variabilidad genética *in vitro* Plantas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) provenientes de Semillas Irradiadas y No Irradiadas utilizando marcadores microsatélites

El genotipaje de las muestras provenientes de semillas irradiadas y no irradiadas dio como resultado un solo alelo en cada primer microsatélite utilizado, indicando que no se detectó variabilidad genética con los 18 primers microsatélites. En la Figura 21, se puede

observar que todas las muestras amplificadas correspondientes a la placa 1 con la combinación dúplex 3 de primers microsatélites, presentan el mismo alelo. Esto nos indica que las muestras irradiadas y no irradiadas son iguales para esta combinación de primers.

### Figura 21

*Gel correspondiente a la placa 1 amplificada con la combinación dúplex 3*

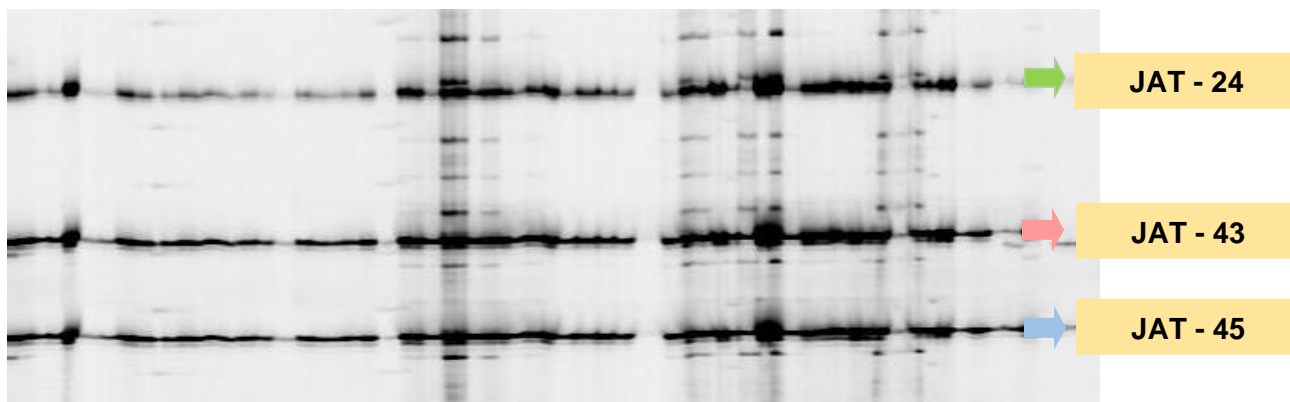


*Nota.* La flecha verde indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer pJcSSR2760. La flecha rosada indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer pJcSSR3342.

De igual manera, en la Figura 22, se puede visualizar las muestras amplificadas correspondientes a la placa 1 con la combinación tríplex 1 de primers microsatélites, donde se puede evidenciar que las muestras irradiadas y no irradiadas presentan el mismo alelo. Estos resultados nos indican que no se ha determinado variabilidad genética con esta combinación de primers.

**Figura 22**

*Gel correspondiente a la placa 1 amplificada con la combinación tríplex 1*



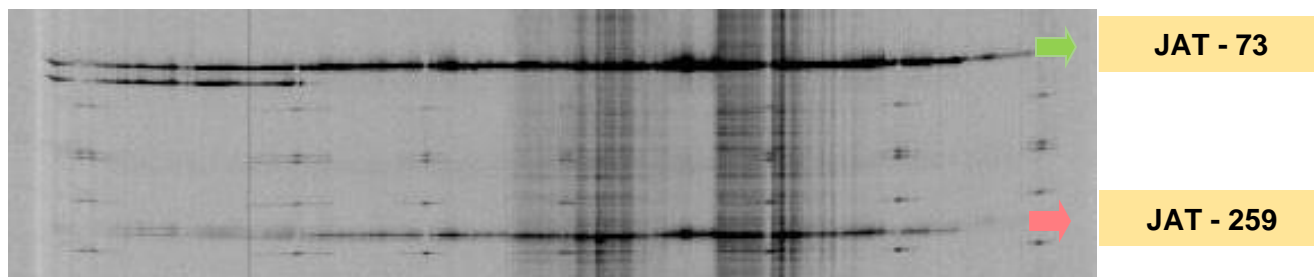
*Nota.* La flecha verde indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer JAT - 24. La flecha rosada indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer JAT – 43. La flecha azul indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer JAT – 45.

En la Figura 23, se puede observar las muestras amplificadas correspondientes a la placa 1 con la combinación dúplex 2 de primers microsatélites, donde se puede visualizar un solo alelo en las muestras irradiadas y no irradiadas. Con estos resultados se evidencia que no se detecta variabilidad genética con la combinación de primers utilizados.



### Figura 23

*Gel correspondiente a la placa 1 amplificada con la combinación dúplex 2*

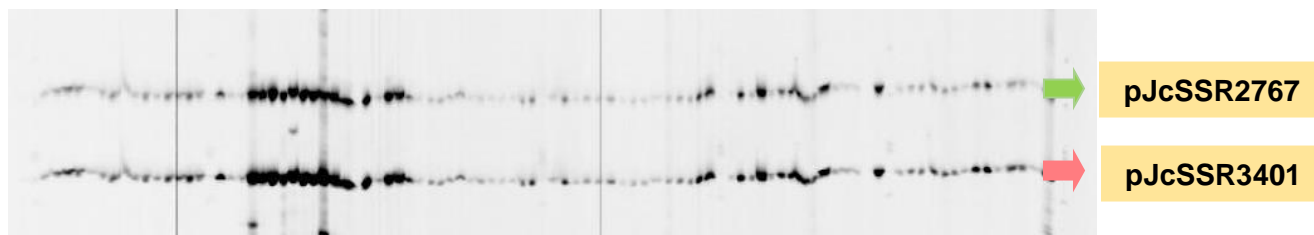


*Nota.* La flecha verde indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer JAT - 73. La flecha rosada indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer JAT – 259.

Por otro lado, en la Figura 24, se puede visualizar las muestras amplificadas correspondientes a la placa 2 con la combinación dúplex 4 de primers microsatélites, donde se puede evidenciar que las muestras irradiadas y no irradiadas presentan el mismo alelo. Estos resultados nos indican que la combinación de primers no detectó variabilidad genética entre las muestras.

### Figura 24

*Gel correspondiente a la placa 2 amplificada con la combinación dúplex 4*

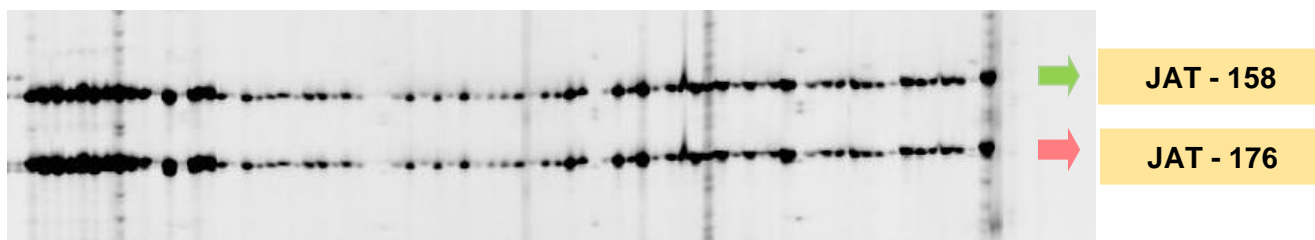


*Nota.* La flecha verde indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer pJcSSR2767. La flecha rosada indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer pJcSSR3401.

En la Figura 25, se visualizan las muestras amplificadas correspondientes a la placa 2 con la combinación dúplex 1 de primers microsátélites, donde se puede evidenciar que las muestras irradiadas y no irradiadas presentan el mismo alelo. Estos resultados indican que no se evidencia variabilidad genética con esta combinación de primers.

### Figura 25

*Gel correspondiente a la placa 2 amplificada con la combinación dúplex 1*

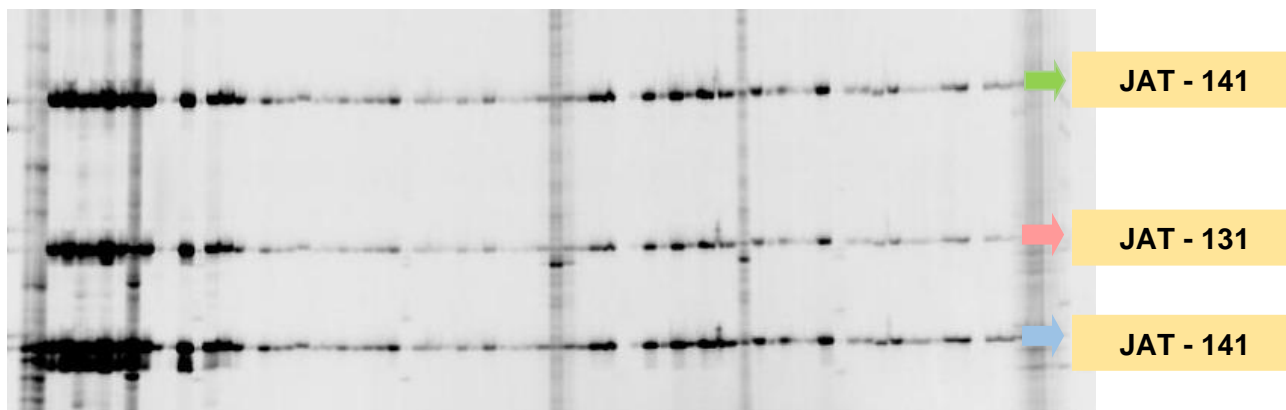


*Nota.* La flecha verde indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer JAT - 158. La flecha rosada indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer JAT - 176.

De igual manera, en la Figura 26, se puede observar las muestras amplificadas correspondientes a la placa 2 con la combinación tríplex 2 de primers microsátélites, donde se puede evidenciar un solo alelo en las muestras irradiadas y no irradiadas para cada primer microsátélite utilizado. Estos resultados indican que con esta combinación de primers no se detecta variabilidad genética.

**Figura 26**

*Gel correspondiente a la placa 2 amplificada con la combinación tríplex 2*

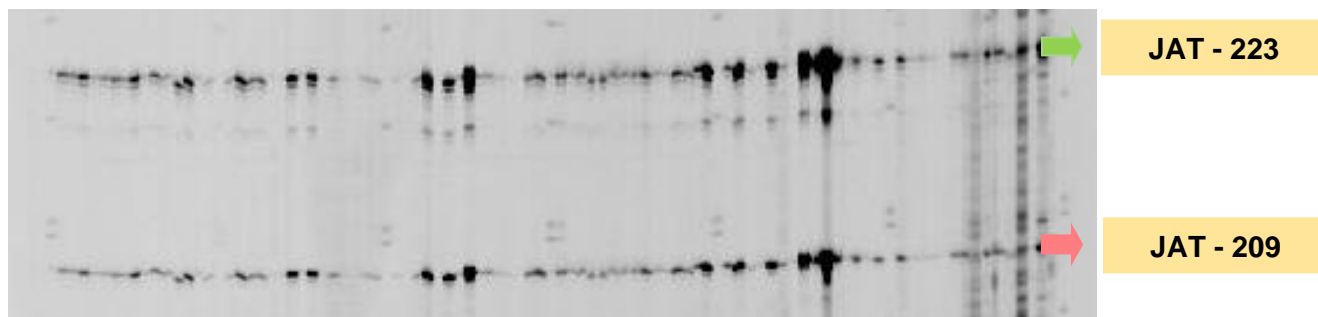


*Nota.* La flecha verde indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer JAT - 141. La flecha rosada indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer JAT - 131. La flecha azul indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer JAT – 141.

Por otro lado, en la Figura 27, se puede observar las muestras amplificadas correspondientes a la placa 3 con la combinación dúplex 6 de primers microsatélites, donde se visualiza un solo alelo tanto en las muestras irradiadas como no irradiadas para cada primer utilizado. Estos resultados indican que la combinación de primers no detectó variabilidad genética entre las muestras.

**Figura 27**

*Gel correspondiente a la placa 3 amplificada con la combinación dúplex 6*

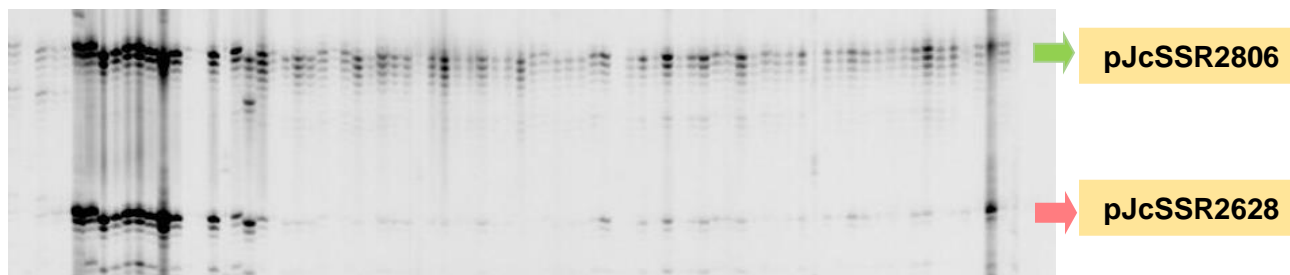


*Nota.* La flecha verde indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer JAT - 223. La flecha rosada indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer JAT - 209.

De igual manera, en la Figura 28, se puede observar las muestras amplificadas correspondientes a la placa 3 con la combinación dúplex 5 de primers microsatélites. Se evidencia la presencia de un único alelo tanto en las muestras irradiadas como no irradiadas, indicando que no se detectó variabilidad genética con la combinación de primers utilizada.

## Figura 28

*Gel correspondiente a la placa 3 amplificada con la combinación dúplex 5*



*Nota.* La flecha verde indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer pJcSSR2628. La flecha rosada indica la amplificación de las muestras con la metodología M13 – Tailed para el primer pJcSSR2806.

### **Porcentaje de similitud**

En la Tabla 27, se presenta los porcentajes de similitud obtenidos al comparar los alelos de las muestras irradiadas y no irradiadas encontrados para los 18 primers microsatélites. Como se puede ver en cada muestra se identificaron 36 alelos y al comparar las muestras, estos 36 alelos son iguales, de manera que se obtiene un porcentaje de similitud del 100%. Es decir, las muestras irradiadas y no irradiadas son idénticas entre sí.

**Tabla 27**

*Comparación de los alelos encontrados en las muestras irradiadas y no irradiadas*

<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>	<b>Similitud (%)</b>	<b>No. Alelos</b>	<b>No. Coincidencias</b>
PN2	PN3	100,00%	36	36
PN2	PN4	100,00%	36	36
PN2	PN5	100,00%	36	36
PN2	PN6	100,00%	36	36
PN2	PN7	100,00%	36	36
PN2	PN8	100,00%	36	36
PN2	PN9	100,00%	36	36
PN2	PN10	100,00%	36	36

PN3	PN23	100,00%	36	36
PN3	PN30	100,00%	36	36
PN3	PN31	100,00%	36	36
PN3	PN32	100,00%	36	36
PN3	PN33	100,00%	36	36
PN3	PN34	100,00%	36	36
PN3	PN35	100,00%	36	36
PN4	PN26	100,00%	36	36
PN4	PN27	100,00%	36	36
PN5	PN32	100,00%	36	36
PN5	PN33	100,00%	36	36
PN5	PN34	100,00%	36	36
PN5	PN35	100,00%	36	36

---

*Nota.* En la tabla se presenta la comparación de alelos de una cierta cantidad de muestras irradiadas y no irradiadas. PN: Piñón

## Capítulo V: Discusión

### Establecimiento *in vitro* de semillas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) Irradiadas y No Irradiadas

#### **Porcentaje de Semillas Germinadas y No germinadas**

Charbaji & Nabulsi (1999) reportó que el uso de dosis bajas de radiación gamma entre 30 a 150 Gy puede aumentar la proliferación celular, germinación y crecimiento celular. En el presente proyecto se usaron dos dosis de radiación que no afectan al crecimiento de *Jatropha curcas* L., según lo establecido por Maldonado, (2020) que evaluó el efecto de las dosis de radiación gamma entre 50 a 250 Gy, observando que las dosis óptimas se encontraban entre 100 y 200 Gy. Como se puede observar en el presente estudio, las dos dosis de radiación tuvieron efectos positivos en la germinación.

En el estudio realizado por Beyaz et al. (2016) se evaluó el efecto de diferentes dosis de radiación gamma (0 a 250 Gy) en la germinación de semillas de *Lathyrus chrysanthus* Boiss. Se determinó que las semillas no irradiadas presentaban un porcentaje de germinación de alrededor del 35% en comparación a las irradiadas a 100, 150 y 200 Gy, donde se observó un porcentaje de germinación superior al 60%. De igual manera, Maldonado, (2020) observó que a las dosis de 50, 100 y 150 Gy las semillas de *Jatropha curcas* L presentaban un porcentaje de germinación superior al 60%. Sin embargo, a la dosis de 200 Gy, observó una disminución en el porcentaje de germinación. A comparación, de lo obtenido en el presente estudio, donde el mayor porcentaje de germinación se obtuvo a la dosis de 200 Gy.

Asif et al. (2020) observó que el máximo porcentaje de germinación en semillas de *Prosopis juliflora* y *Dalbergia sissoo* se obtenía en la dosis de 200 Gy, con un porcentaje superior al 80%. Similar a lo obtenido en el presente estudio. De igual manera, en el estudio realizado por Songsri et al. (2011) se probaron diferentes dosis de radiación gamma en

semillas de *Jatropha curcas* L. y se evidenció que conforme se aumentaba la dosis de radiación aumentaba el porcentaje de germinación, siendo el máximo porcentaje obtenido a 200 Gy. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de germinación entre las semillas irradiadas a las diferentes dosis. Abdel et al. (2018) atribuye el aumento en la germinación al efecto de la radiación en la síntesis de ARN y proteínas.

### ***Porcentaje de Contaminación por Bacteria***

Darfour et al. (2012) demostró que la irradiación puede evitar la proliferación de ciertos agentes biológicos como bacterias, mejorando así la calidad de las semillas almacenadas. En el presente estudio se evidenció que las semillas irradiadas presentaban un porcentaje de contaminación por bacteria menor en comparación a las no irradiadas.

En un estudio realizado por Toukhy et al. (2019) se observó que al irradiar las semillas de *Medicago sativa* se lograba reducir la carga microbiana presente en comparación a las no irradiadas. Esta reducción se atribuye al daño del ADN generado por la irradiación que provoca un bloqueo en la transcripción y replicación del ADN. Conduciendo a la muerte celular de los microorganismos (Unluturk et al., 2008).

En el estudio realizado por Bachir (2016) se evidenció una reducción de la carga microbiana en las semillas irradiadas a diferentes dosis. Sin embargo, la reducción observada no difería significativamente entre las dosis aplicadas. De igual manera, los resultados obtenidos en el presente estudio no difieren significativamente entre las dosis aplicadas, siendo un indicio de que a las dosis de 100 y 200 Gy se logra una inhibición de la proliferación de bacterias en semillas.

### ***Porcentaje de Contaminación por Hongo***

En el estudio realizado por Costa et al. (2013) se observaron resultados similares a los obtenidos en el presente estudio. Las semillas irradiadas no presentaban contaminación por



hongo, llegando a concluir que la irradiación inhibía el crecimiento de estos. En contraste, las semillas no irradiadas presentaban un mayor porcentaje de contaminación por hongo.

Autores como Maity et al., (2009) reportan resultados similares a los observados, donde se evidencia que al aumentar la radiación se puede inhibir por completo el crecimiento fúngico en la superficie de las semillas. En cambio, en las semillas no irradiadas las comunidades fúngicas se mantienen e incluso siguen aumentando con el tiempo.

En el estudio realizado por Ferreira et al. (2007) se evaluaron dos dosis de radiación y se observó que la dosis más alta eliminaba por completo la microflora fúngica, mientras que la dosis más baja inhibía el crecimiento de esta, pero existía aún contaminación fúngica. De igual manera, en el presente estudio se observó algo similar, debido a que las semillas a la dosis de 100 Gy presentaban contaminación por hongo.

### **Optimización del proceso de Multiplicación en *vitro* Plantas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) provenientes de Semillas No Irradiadas**

#### ***Porcentaje de Supervivencia***

Olomola et al. (2014) probaron tres medios de cultivo sin hormonas: MS, WPM (Woody Plant Medium) y Preece. Concluyendo que los explantes de *Jatropha curcas* L. utilizados crecían bien en el medio MS sin evidenciar mortalidad. De igual manera, Kumar & Sharma (2008) observaron que el medio MS suplementado con BAP y AIA promueve el crecimiento de *Jatropha curcas* L.

En otro estudio realizado por Rathore et al. (2015) la respuesta de los explantes sembrados en medio MS sin hormonas es bajo pero no existe mortalidad del mismo. De igual forma la incorporación de hormonas como BAP incrementa la respuesta del explante significativamente, de tal forma que el explante se mantiene bien en el medio de cultivo. Por otro lado, Pequeño et al. (2015) introdujeron explantes de *Jatropha curcas* L. en medio MS

basal suplementado con BAP e IBA, observando que los explantes crecían bien y se mantenían viables en el medio de cultivo.

### ***Longitud del Brote Inicial***

Herrera et al., (2019) obtuvieron resultados similares al combinar BAP a 1.5 ppm y AIA a 0.3 ppm, logrando una elongación de brote de hasta 1.67 cm. Por otro lado, Shamsiah et al. (2011) observó que en el medio sin hormonas no existió elongación del brote, mientras que al suplementar el medio con BAP (2 ppm) y AIA (0.5 ppm) se alcanzó una longitud de brote de 1.44 cm. De igual manera, en el presente estudio el medio mIBJ1 sin hormonas no presentó elongación del brote a diferencia del resto de medio que estaban suplementados con hormonas.

Shamsiah et al. (2011) probó diferentes concentraciones de BAP (0, 0.1, 0.5, 1, 1.5 y 2 ppm) y observó que la longitud del brote aumentaba conforme aumentaba las concentraciones de BAP. En el medio con 0 ppm de BAP la longitud del brote era 0 cm y conforme aumentaba la concentración esta longitud incrementaba. En otro estudio realizado por Singh et al. (2010) se probaron tres concentraciones de BAP (0.1, 0.5 y 1 ppm) en combinación con AIA y se observó que esta combinación mejoraba la elongación de brotes significativamente. También, se evidencia que la longitud del brote es directamente proporcional a la concentración de hormona.

### ***Número de Hojas Verdaderas***

En el estudio realizado por Herrera et al. (2019) se concluyó que el aumento de la concentración de hormona en el medio no conduce a un aumento significativo del número de hojas en el explante. Cuando se combinó 2 ppm de BAP con 0.7 ppm de AIA, se obtuvo 6.67 hojas. Sin embargo, al comparar con las concentraciones más bajas de BAP utilizadas en el estudio, el número de hojas obtenido no difería mucho entre ellas. De igual manera, en el estudio realizado por Abd et al. (2019) se probaron tres concentraciones de BAP (1.5, 3 y 4.5

ppm) y se observó que existía un aumento en el número de hojas generadas en el explante. Sin embargo, la diferencia entre las concentraciones de hormona no era significativa entre sí, manteniéndose en valores de 6.36 a 6.44 hojas por explante.

Daryani et al. (2017) determinó que la presencia de hormona en el medio aumentaba el número de hojas por explante, obteniendo un valor de 5.33 hojas en un medio suplementando con BAP e IBA. Por otro lado, Franco et al. (2014) obtuvieron un mayor número de hojas por explante al combinar BAP (0.5 ppm) e IBA (0.2 ppm), con un valor de 3.6 hojas. En este mismo estudio, se determina que en función del genotipo que se esté utilizando, el número de hojas obtenido será diferente. Esto explicaría las variaciones que se encuentran con respecto al número de hojas obtenidas por diferentes autores.

En el estudio realizado por Abd et al. (2019) probaron un medio sin hormonas y se evidenció que el número de hojas aumentaba pero era menor en comparación con aquellos medios suplementados con BAP, con un valor de 1.63 hojas. Similar, a lo obtenido en el presente estudio.

### **Porcentaje de Brotación**

En el estudio realizado por Shamsiah et al. (2011) se probaron diferentes concentraciones de BAP y se observó brotación en todos los medios que contenían BAP, mientras que, en el medio sin BAP, no hubo indicios de brotación. Concluyéndose que el regulador de crecimiento BAP es necesario para inducir brotación en *Jatropha curcas* L.

Por otro lado, Rajore & Batra (2005) indicaron que la combinación de BAP con AIA mejora significativamente la proliferación de brotes, como se puede observar en el presente estudio. Según, Singh et al. (2010) la acción sinérgica del BAP con el AIA tienen efecto en la multiplicación de brotes en *Jatropha curcas* L. De igual manera, Kumar et al. (2012) probaron diferentes concentraciones de BAP observando brotación en cada concentración.

### **Número de Brotes**

Gordillo, (2020) obtuvo el mayor número de brotes de 1.8 brotes por explante para el clon CP041 en un medio suplementado con BAP y sulfato de adenina. El mismo número de brotes se obtuvo en un medio suplementado con IBA, sulfato de adenina y kinetina. Mientras que, en el presente estudio, se mejoró la brotación al combinar BAP con AIA en el medio de cultivo.

En el estudio realizado por Singh et al. (2010) se obtuvieron entre 5 a 6 brotes por explante al utilizar una combinación de BAP con AIA, concluyéndose que estas dos hormonas tienen un efecto sinérgico en la brotación. De igual manera, en el estudio realizado por Shamsiah et al. (2011) obtuvieron el mayor número de brotes a la concentración de 2 ppm de BAP en combinación con 0.5 ppm de AIA, con un número de 3.65 brotes. Se puede ver que el número de brotes difiere entre los diferentes estudios realizados. Se ha demostrado que la respuesta de los explantes a los reguladores de crecimiento es dependiente del genotipo (Sarker & Mustafa, 2002).

Kumar et al. (2012) evidenciaron que al aumentar la concentración de BAP en el medio aumentaba también el número de brotes por explante, logrando obtener entre 4.1 a 6.8 brotes. Con estos resultados, se evidencia que el uso de BAP mejora significativamente la multiplicación. Esto coincide con lo mencionado por Nogueira et al. (2011) que aseguran que la combinación de BAP con bajas concentraciones de auxinas promueven la brotación en *Jatropha curcas* L. Otros autores, evidencian una mayor brotación al combinar BAP con concentraciones altas de auxina, como es el caso de Shrivastava & Banerjee (2008) que obtuvieron 6.90 brotes por explante utilizando 1 ppm de IBA.

En el estudio realizado por Valdez & Gatica, (2009) se probaron concentraciones de BAP entre 0.1 a 1 ppm y de AIA entre 0 a 0.5 ppm. Los resultados del estudio indicaron que en el medio suplementado con concentraciones de BAP de 0.5 y 1 ppm combinado con AIA, se

presentaba un mayor número de brotes por explante. Existiendo un rol importante de la combinación de BAP con AIA en la inducción de brotes. Gaspar et al., (2003) asegura que al tener un buen equilibrio entre citoquininas y auxinas exógenos se podría favorecer el desarrollo de brotes en los explantes. Teniendo en cuenta que las auxinas estimulan la división celular mientras que las citoquininas favorecen la formación de órganos definidos como brotes.

### ***Longitud de Brotes Nuevos***

Franco et al. (2014) observó resultados similares a los obtenidos en el presente estudio. Probaron tres concentraciones de BAP combinado con IBA y evidenciaron que conforme aumentaba la concentración de hormona también aumentaba la longitud del brote, con un máximo de longitud de 7 mm, obtenido a la concentración de BAP más alta. De igual manera, Shrivastava & Banerjee (2008) obtuvieron la máxima longitud de brote a la concentración de 2 ppm de BAP, con una longitud de 7 mm.

Zhang et al., (2013) determinaron que el mejor medio para proliferación de brotes y elongación de estos estaba suplementado con 0.3 ppm de BAP y 0.01 ppm de AIA, llegando a tener una longitud de brote mayor a 5 mm. En otro estudio realizado por Thepsamran *et al.*, (2008) se observó que la longitud de los brotes inducidos en *Jatropha curcas* L. era mayor conforme aumentaba la concentración de BAP en el medio de cultivo, de tal manera, que a la concentración de 4.44  $\mu$ M se obtenía un longitud de brote de 6 mm. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente estudio, en donde se obtuvo la mayor longitud de brote a la concentración de BAP más alta, esta longitud fue de 5 mm.

### ***Porcentaje de vitro Plantas que presentan Callo***

González (2013) probó dos concentraciones de BAP (0.5 y 2 ppm) y observó una respuesta del explante similar, debido a que a las dos concentraciones había la formación de callo, lo que difería era el tamaño de callo formado. De igual manera, Kumlay & Ercisli (2015)

observó que la combinación de BAP con NAA induce la formación de callo en un porcentaje del 80%. Mientras que, la combinación con AIA induce la formación de callo en un porcentaje de tan solo el 40%. En otro estudio realizado por Matos & Sánchez (2011) el porcentaje de formación de callo fue del 95% al combinar BAP y AIA.

Kumlay & Ercisli (2015) no observaron formación de callo en el medio de control que contenía únicamente MS, concluyendo que para la formación de callo se requiere la acción de hormonas. Por otro lado, en el estudio realizado por Matos & Sánchez (2011) no se observó inducción de callo en medio MS sin hormonas. Esto nos indica que la combinación y concentraciones de reguladores de crecimiento influyen en la formación de callo.

### ***Diámetro del Callo***

En el estudio realizado por Coutiño et al., (2013) se observó que además de la proliferación de brotes también se induce la formación de callos friables y compactos en *Jatropha curcas* L.. Esta formación se atribuye a la presencia de la auxina en el medio de cultivo debido a que aumenta la proliferación celular. En este caso los medios donde se dio la formación de callo estaban suplementados con 2,4 – D (Ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

En otros estudios realizados en *Jatropha curcas* L. se observa la formación de callo con el uso de otras auxinas. Por ejemplo, en el estudio realizado por Rajore & Batra, (2005) se utilizó AIA a una concentración de 0.5 ppm y se evidenció la formación de callo en un 100%. De igual manera, Wei et al., (2004) observaron la formación de callo en explantes provenientes de epicótilo en medio suplementado con IBA y BAP.

De igual manera, en el estudio realizado por Nogueira et al., (2011) se observa la formación de callo en embriones cigóticos de *Jatropha curcas* L.. El inicio de la callogénesis observada se atribuye a las lesiones o daños causados en el explante al momento de realizar el corte. En el presente estudio, la formación del callo se produce en la parte inferior del

explante, que es el lugar donde se realiza el corte. Por otro lado, Wei et al., (2004) observaron que el callo se formaba en la parte superior del explante, que era el lugar donde se realizaba el corte.

### **Determinación de la variabilidad genética en *vitro* Plantas de Piñón (*Jatropha curcas* L.) provenientes de Semillas Irradiadas y No Irradiadas utilizando marcadores microsatélites**

Según McCallum et al. (2000) en las mutaciones inducidas los eventos de mutación ocurren en frecuencias muy bajas, que dificulta la detección de mutaciones útiles, siendo necesario contar con una población de miles de plantas para lograr identificar aquellas plantas mutantes que pueden haber desarrollado el carácter deseado. En el presente estudio, se utilizó una población de 220 *vitro* plantas que resulto insuficiente para detectar algún cambio a nivel genético.

Generalmente, el método de selección por características fenotípicas es el más común para la selección de mutantes generados por mutagénesis inducida. Actualmente, existen otros métodos que incluyen la secuenciación o la técnica TILLING (*Targeting Induced Local Lesions In Genomes*) que permite la detección directa de mutaciones (Rigola et al., 2009).

### **Porcentaje de similitud**

En el estudio realizado por Dhakshanamoorthy et al. (2011) se indujeron mutaciones en *Jatropha curcas* L. mediante irradiación con rayos gamma. La detección se realizó con los marcadores RAPD que además del mapeo genético, estudios taxonómicos y filogenéticos, permiten detectar daños en el ADN o cambios en algunos oligonucleótidos, que son los efectos más comunes de la irradiación. De igual manera, Dhillon et al. (2014) utilizó la detección de mutaciones inducidas mediante RAPD debido a que la irradiación conduce a la formación de roturas en el ADN, las cuales pueden detectarse por cambios en los perfiles de RAPD. En el caso de los SSR, en muchas ocasiones no se pueden amplificar mediante PCR debido a

mutaciones puntuales o falsos emparejamientos de bases y los polimorfismos esperados no suelen ser visibles por la presencia de alelos nulos que no logran amplificar a niveles detectados por la PCR (Baydar et al., 2021).



## Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones

### Conclusiones

- La irradiación de las semillas con rayos gamma mejoró el porcentaje de germinación en un 20% disminuyendo el número de semillas no germinadas y redujo el porcentaje de contaminación por bacteria y hongo.
- La acción de las hormonas BAP y AIA fue sinérgica, presentando efectos significativos en el incremento de la brotación, elongación de brotes y tamaño de callo. Sin embargo, en el crecimiento de hojas verdaderas no hubo un efecto significativo.
- Los explantes en el medio mIBJ4 suplementado con 2 ppm de BAP y 0.1 ppm de AIA presentaron un mayor número de brotes con una media de 4.69 brotes por explante y una mayor longitud con una media de 5 mm.
- El medio mIBJ4 al presentar los mejores resultados en multiplicación se utilizó para el establecimiento de la generación MV3, con un total de 266 *vitro* plantas irradiadas y 114 *vitro* plantas no irradiadas.
- Los alelos encontrados en las muestras de *vitro* plantas provenientes de semillas irradiadas y no irradiadas presentaron un porcentaje de similitud del 100%, lo que mostró que los 18 primers microsatélites utilizados en el estudio no detectaron cambios a nivel genético producto de la irradiación o la utilización de semillas en el ensayo.

### Recomendaciones

- Se recomienda probar diferentes concentraciones de AIA en el medio de cultivo para evaluar los efectos que puede tener en la brotación, elongación de brotes y formación de callo.
- Es necesario evaluar el efecto de diferentes auxinas en combinación con BAP, para ver si existe una mejora en los parámetros evaluados o si se reduce la formación de callo en el explante.

- Se sugiere establecer en el campo las *in vitro* plantas obtenidas con el fin de seleccionar las plantas mutantes a través de las características fenotípicas observadas.
- Se recomienda utilizar otras técnicas para determinar la variabilidad genética en materiales irradiados de *Jatropha curcas* L. como la secuenciación.

## Capítulo VII: Referencias

Abd El-kafie, O. M., El-Saka, M. M., Abd El-Baset, M. M., & Khalil, S. M. M. E. I. (2019). Impact of Explants, Plant Growth Regulators and their Interaction on Micropropagation of *Impatiens balsamina*, L. *Journal of Plant Production*, 10(7), 495–501.

<https://doi.org/10.21608/jpp.2019.53543>

Abdel Moneim Kamel, D., Farag, H., Amin, N., Zatout, A., & Ali, R. (2018). Smart utilization of jatropha (*Jatropha curcas* Linnaeus) seeds for biodiesel production: Optimization and mechanism. *Smart utilization of jatropha (Jatropha curcas* Linnaeus) seeds for biodiesel production: Optimization and mechanism, 111, 407–413.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.029>

Abdelgadir, H. A., & Van Staden, J. (2013). Ethnobotany, ethnopharmacology and toxicity of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae): A review. *South African Journal of Botany*, 88, 204–218. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.07.021>

Abdulla, R., Chan, E. S., & Ravindra, P. (2011). Biodiesel production from *Jatropha curcas*: A critical review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 31(1), 53–64.

<https://doi.org/10.3109/07388551.2010.487185>

Abidin, Z. Z., Ismail, N., Yunus, R., Ahamad, I. S., & Idris, A. (2011). A preliminary study on *Jatropha curcas* as coagulant in wastewater treatment. *Environmental Technology*, 32(9–10), 971–977. <https://doi.org/10.1080/09593330.2010.521955>

Ablett, G., Hill, H., & Henry, R. J. (2006). Sequence Polymorphism Discovery in Wheat Microsatellite Flanking Regions using Pyrophosphate Sequencing. *Molecular Breeding*, 17(3), 281–289. <https://doi.org/10.1007/s11032-006-6262-3>

- Abobatta, W. (2019). *Jatropha curcas*: An overview. *JOURNAL OF ADVANCES IN AGRICULTURE*, 10, 1650–1656. <https://doi.org/10.24297/jaa.v10i0.8145>
- Acquaah, G. (2020). *Principles of Plant Genetics and Breeding, 3rd Edition* | Wiley. <https://www.wiley.com/en-us/Principles+of+Plant+Genetics+and+Breeding%2C+3rd+Edition-p-9781119626329>
- Adams, M. D., Kelley, J. M., Gocayne, J. D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Merril, C. R., Wu, A., Olde, B., & Moreno, R. F. (1991). Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project. *Science (New York, N. Y.)*, 252(5013), 1651–1656. <https://doi.org/10.1126/science.2047873>
- Ahloowalia, B. S., & Maluszynski, M. (2001). Induced mutations – A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, 118(2), 167–173. <https://doi.org/10.1023/A:1004162323428>
- Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A., & Cregan, P. B. (1992). Length Polymorphisms of Simple Sequence Repeat DNA in Soybean. *Genetics*, 132(4), 1131–1139.
- Al-Bachir, M. (2016). Evaluation the effect of gamma irradiation on microbial, chemical and sensorial properties of peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 15(2), 171–179. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2016.2.17>
- Álvarez-Mateos, P., Alés-Álvarez, F.-J., & García-Martín, J. F. (2019). Phytoremediation of highly contaminated mining soils by *Jatropha curcas* L. and production of catalytic carbons from the generated biomass. *Journal of Environmental Management*, 231, 886–895. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.052>
- Arruda, M., Gonçalves, E., Paula Cruz Schneider, M., Silva, A., & Morielle-Versute, E. (2009). An alternative genotyping method using dye-labeled universal primer to reduce

unspecific amplifications. *Molecular biology reports*, 37, 2031–2036.

<https://doi.org/10.1007/s11033-009-9655-7>

Asif, J. M., Ali, A., Mazhar, M. Z., Tanvir, A., Zia, B., Anmbreen, I., Anjum, M. Z., & Mahr, M. S. (2020). Effect of different pre-treatments on seed germination of *Prosopis juliflora* and *Dalbergia sissoo*: A step towards mutation breeding. *Journal of Forest Science*, 66 (2020)(No. 2), 80–87. <https://doi.org/10.17221/64/2019-JFS>

Basha, S., & Mulpuri, S. (2009). Genetic analysis of *Jatropha* species and interspecific hybrids of *Jatropha curcas* using nuclear and organelle specific markers. *Euphytica*, 168, 197–214. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-9900-0>

Baydar, H., Akçay, U. Ç., Kazaz, S., Erbaş, S., & Baydar, N. G. (2021). *Floral and Molecular Characterization of Gamma Rays Induced Mutants in Oil-Bearing Rose (Rosa damascena Mill.)*. 13.

Bayen, P., Bognounou, F., Lykke, A. M., Ouédraogo, M., & Thiombiano, A. (2016). The use of biomass production and allometric models to estimate carbon sequestration of *Jatropha curcas* L. plantations in western Burkina Faso. *Environment, Development and Sustainability*, 18(1), 143–156. <https://doi.org/10.1007/s10668-015-9631-4>

Beckman, J. S., & Weber, J. L. (1992). Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, 12(4), 627–631. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90285-z](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90285-z)

Beyaz, R., Kahramanogullari, C. T., Yildiz, C., Darcin, E. S., & Yildiz, M. (2016). The effect of gamma radiation on seed germination and seedling growth of *Lathyrus chrysanthus* Boiss. Under in vitro conditions. *Journal of Environmental Radioactivity*, 162–163, 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2016.05.006>

Bezie, Y., Atnaf, M., & Taye, M. (2020). *The Potential Applications of Site-Directed Mutagenesis for Crop Improvement: A review* | bioRxiv.

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.10.01.321984v1>

Bhattarai, K., Stalick, W. M., McKay, S., Geme, G., & Bhattarai, N. (2011). Biofuel: An alternative to fossil fuel for alleviating world energy and economic crises. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 46(12), 1424–1442. <https://doi.org/10.1080/10934529.2011.607042>

Bhojwani, S. S. (2012). *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*. Elsevier.

Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1), 41–52.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3), 314–331.

Caenato, G. (1997). *DNA Markers: Protocols, Applications, and Overviews* | Wiley. Wiley.Com. <https://www.wiley.com/en-gb/DNA+Markers%3A+Protocols%2C+Applications%2C+and+Overviews-p-9780471160670>

Chambers, G., & MacAvoy, E. (2000). Microsatellites: Consensus and controversy. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 126, 455–476. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(00\)00233-9](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(00)00233-9)

Chan, K. (2003). Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere*, 52(9), 1361–1371. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00471-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00471-5)

Charbaji, T., & Nabulsi, I. (1999). Effect of low doses of gamma irradiation on *in vitro* growth of grapevine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.  
[https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Effect+of+low+doses+of+gamma+irradiation+on+in+vitro+growth+of+grapevine&author=Charbaji%2C+T.&publication\\_year=1999](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Effect+of+low+doses+of+gamma+irradiation+on+in+vitro+growth+of+grapevine&author=Charbaji%2C+T.&publication_year=1999)

Chaudhary, J., Deshmukh, R., & Sonah, H. (2019). Mutagenesis Approaches and Their Role in Crop Improvement. *Plants*, 8(11), 467. <https://doi.org/10.3390/plants8110467>

Chen, C., Zhou, P., Choi, Y. A., Huang, S., & Gmitter, F. G. (2006). Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik*, 112(7), 1248–1257. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0226-1>

Chinmayee, D., S, A., B, M., A, M., Mini, I., & ts, S. (2014). A comparative study of heavy metal accumulation and antioxidant responses in *Jatropha curcas* L. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8, 58–67.  
<https://doi.org/10.9790/2402-08735867>

Costa, L. F., Silva, E. B. da S., & Oliveira, I. S. (2013). Effect of gamma radiation as a method of storing brown flaxseed after 6 months of storage, inhibiting contamination by aflatoxigenic fungi. INAC 2013: international nuclear atlantic conference, Brazil.

Coutiño, A. G., Ovando-Medina, I., Adriano-Anaya, M. de L., & Salvador-Figueroa, M. (2013). Organogénesis de *Jatropha curcas* a partir de plantas adultas: Estudio de fitohormonas y factores físico-químicos. 9.

Dallas, L. J., Keith-Roach, M., Lyons, B. P., & Jha, A. N. (2012). Assessing the impact of ionizing radiation on aquatic invertebrates: A critical review. *Radiation Research*, 177(5), 693–716. <https://doi.org/10.1667/rr2687.1>

Darfour, B., Ocloo, F. C. K., & Wilson, D. (2012). Effects of irradiation on cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* F.) and moisture sorption isotherm of cowpea seed (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Arthropods*, 1, 24–34.

Daryani, P., Zare, N., Chamani, E., Mossadeg, P. eikhzadeh, & Mojaddad, D. J. (2017). Evaluation of the Effects of Different Basal Medium and Plant Growth Regulators on *in vitro* Growth of Hazelnut. *Majallah-i 'Ulum-i Bāghbānī*, 30(3), 417–422.  
<https://doi.org/10.22067/jhorts4.v30i3.37852>

Datta, S. K. D. (2019). Determination of Radiosensitivity: Prerequisite Factor for Induced Mutagenesis (pp. 51–70).

de Oliveira, J., Leite, P., de Souza, L., Mello, V., Silva, E., Rubim, J., Meneghetti, S., & Suarez, P. (2009). Characteristics and composition of *Jatropha gossypifolia* and *Jatropha curcas* L. oils and application for biodiesel production—*ScienceDirect*.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0961953408002171>

Dehgan, B. (1984). Phylogenetic Significance of Interspecific Hybridization in *Jatropha* (*Euphorbiaceae*) | *Semantic Scholar*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Phylogenetic-Significance-of-Interspecific-in-Dehgan/94d3456c878201f997b5baa2b350d8738ffd584f>

Deore, A., & Johnson, T. (2008). High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: An important biodiesel plant.  
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20083164672>

Dhakshanamoorthy, D., Selvaraj, R., & Chidambaram, A. L. A. (2011). Induced mutagenesis in *Jatropha curcas* L. using gamma rays and detection of DNA polymorphism through RAPD marker. *Comptes Rendus Biologies*, 334(1), 24–30.  
<https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.11.004>



Dhillon, R., Saharan, R., Jattan, M., Rani, T., & Wuehlisch, G. (2014). Molecular characterization of  $\gamma$ -rays induced mutants in *Jatropha curcas* L. *Indian Journal of Biotechnology*, 13, 67–74.

Dias, L. a. S., Missio, R. F., & Dias, D. C. F. S. (2012). Antiquity, botany, origin and domestication of *Jatropha curcas* (*Euphorbiaceae*), a plant species with potential for biodiesel production. <https://doi.org/10.4238/2012.June.25.6>

Divakara, B. N., Upadhyaya, H. D., Wani, S. P., & Gowda, C. L. L. (2010). Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A review. *Applied Energy*, 87(3), 732–742. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.07.013>

Donini, P., Stephenson, P., Bryan, G., & Koebner, R. (1998). The potential of microsatellites for high throughput genetic diversity assessment in wheat and barley. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45, 415–421. <https://doi.org/10.1023/A:1008612917967>

Dwimahyani, I., & Ishak. (2011). Induced Mutation on *Jatropha* (*Jatropha Curcas* L.) for Improvement of Agronomic Characters Variability. *Atom Indonesia*, 30(2), 53–60. <https://doi.org/10.17146/aij.2004.215>

Eboibi, B., Eboibi, O., Okputu, J., & Okpohwo, K. A. (2018). Production and analysis of biodiesel from *Jatropha curcas* seed. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 22, 26. <https://doi.org/10.4314/jasem.v22i1.6>

Edrisi, S. A., Dubey, R. K., Tripathi, V., Bakshi, M., Srivastava, P., Jamil, S., Singh, H. B., Singh, N., & Abhilash, P. C. (2015). *Jatropha curcas* L.: A crucified plant waiting for resurgence. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 855–862. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.08.082>

EFEverde. (2010). *Las islas Galápagos prueba aceite de piñón para reemplazar al diesel*. EFEverde. <https://www.efeverde.com/noticias/islas-galapagos-aceite-pinon-diesel/>

EFEverde, +Redacción. (2018). *Las islas Galápagos prueba aceite de piñón para reemplazar al diesel*. EFEverde. <https://www.efeverde.com/noticias/islas-galapagos-aceite-pinon-diesel/>

Erramli, H., & Asri, J. E. (2019). Gamma Rays: Applications in Environmental Gamma Dosimetry and Determination Samples Gamma-Activities Induced by Neutrons. *Use of Gamma Radiation Techniques in Peaceful Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85503>

Ewunie, G. A., Morken, J., Lekang, O. I., & Yigezu, Z. D. (2021). Factors affecting the potential of *Jatropha curcas* for sustainable biodiesel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 137, 110500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110500>

Fasoula, D. A., Ioannides, I. M., & Omirou, M. (2020). Phenotyping and Plant Breeding: Overcoming the Barriers. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1713. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01713>

Feike, T., Mueller, J., & Claupein, W. (2008). Examining Germination Rates of Seeds of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) from Philippines and Viet Nam. <https://www.tropentag.de/2008/abstract.php?code=6hpCnOlt>

Ferreira, F. L., Aquino, S., Greiner, R., Ribeiro, D. H. B., Reis, T. A., & Corrêa, B. (2007). Effects of gamma radiation on maize samples contaminated with *Fusarium verticillioides*. *Applied Radiation and Isotopes: Including Data, Instrumentation and Methods for Use in Agriculture, Industry and Medicine*, 65(8), 927–933. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2007.03.011>

Franco, M., Argollo, D., Siqueira, W., & Latado, R. (2014). (PDF) Micropropagation of *Jatropha curcas* superior genotypes and evaluation of clonal fidelity by target region amplification polymorphism (TRAP) molecular marker and flow cytometry. [https://www.researchgate.net/publication/272506044\\_Micropropagation\\_of\\_Jatropha\\_curcas\\_superior\\_genotypes\\_and\\_evaluation\\_of\\_clonal\\_fidelity\\_by\\_target\\_region\\_amplification\\_polymorphism\\_TRAP\\_molecular\\_marker\\_and\\_flow\\_cytometry](https://www.researchgate.net/publication/272506044_Micropropagation_of_Jatropha_curcas_superior_genotypes_and_evaluation_of_clonal_fidelity_by_target_region_amplification_polymorphism_TRAP_molecular_marker_and_flow_cytometry)

Funk, V., Hollowell, T., Berry, P., Kelloff, C., & Alexander, S. (2007). *Checklist of the plants of the Guiana Shield (Venezuela: Amazonas, Bolívar, Delta Amacuro; Guyana, Surinam, French Guiana)*. Department of Systematic Biology - Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution. <https://www.cabi.org/isc/abstract/20073209944>

Galindo, R., & Elizabeth, P. (2016). *Sistematización de la experiencia, producción de aceite de piñón para plan piloto de generación eléctrica en Galápagos*. <http://repositorio.puce.edu.ec:80/xmlui/handle/22000/12495>

Garay, C. R. E., & Echeverría, F. M. C. (2013). Propagación vegetativa de *Jatropha curcas* L. por estacas. *Investigación Agraria*, 12(2), 69–73.

García Martín, J. F., González Caro, M. del C., López Barrera, M. del C., Torres García, M., Barbin, D., & Álvarez Mateos, P. (2020). Metal Accumulation by *Jatropha curcas* L. Adult Plants Grown on Heavy Metal-Contaminated Soil. *Plants*, 9(4), 418. <https://doi.org/10.3390/plants9040418>

Gaspar, Th., Kevers, C., Faivre-Rampant, O., Crèvecoeur, M., Penel, Cl., Greppin, H., & Dommes, J. (2003). Changing Concepts in Plant Hormone Action. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 39(2), 85–106.

Gebremariam, S. N., & Marchetti, J. M. (2018). Economics of biodiesel production: Review. *Energy Conversion and Management*, 168, 74–84.  
<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.05.002>

Gemayel, R., Cho, J., Boeynaems, S., & Verstrepen, K. J. (2012). Beyond Junk-Variable Tandem Repeats as Facilitators of Rapid Evolution of Regulatory and Coding Sequences. *Genes*, 3(3), 461–480. <https://doi.org/10.3390/genes3030461>

George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G.-J. D. (2008). Plant Tissue Culture Procedure—Background. E. F. George, M. A. Hall, & G.-J. D. Klerk (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background* (pp. 1–28). Springer Netherlands.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_1)

Glenn, K. C., Alsop, B., Bell, E., Goley, M., Jenkinson, J., Liu, B., Martin, C., Parrott, W., Souder, C., Sparks, O., Urquhart, W., Ward, J. M., & Vicini, J. L. (2017). Bringing New Plant Varieties to Market: Plant Breeding and Selection Practices Advance Beneficial Characteristics while Minimizing Unintended Changes. *Crop Science*, 57(6), 2906–2921.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci2017.03.0199>

Goldman, I. (2018). *Plant Breeding Reviews, Volume 42 | Wiley*. Wiley.Com.  
<https://www.wiley.com/en-us/Plant+Breeding+Reviews%2C+Volume+42-p-9781119521341>

González, C., & Fabiola, N. (2016). International experiences with the cultivation of *Jatropha curcas* for biodiesel production. *Energy*, 112(C), 1245–1258.

Gonzalez, B. Y. R. (2013). Evaluación de tres medios de cultivo para la inducción de brotes en *Jatropha curcas* -variedad hindú- a partir de callo. 20.

Gordillo López, E. V. (2020). Establecimiento de las condiciones óptimas para la micropropagación por fases de clones promisorios de piñón (*Jatropha curcas* L.) del Instituto

Nacional de Investigaciones Agropecuarias con fines de mejoramiento genético vía irradiación.

<http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/12247>

Gurushidze, M., Hiekel, S., Otto, I., Hensel, G., & Kumlehn, J. (2017). Site-Directed Mutagenesis in Barley by Expression of TALE Nuclease in Embryogenic Pollen. En J. Jankowicz-Cieslak, T. H. Tai, J. Kumlehn, & B. J. Till (Eds.), *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding: Protocols* (pp. 113–128). Springer International Publishing.

[https://doi.org/10.1007/978-3-319-45021-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45021-6_7)

Ha, J., Shim, S., Lee, T., Kang, Y. J., Hwang, W. J., Jeong, H., Laosatit, K., Lee, J., Kim, S. K., Satyawat, D., Lestari, P., Yoon, M. Y., Kim, M. Y., Chitikineni, A., Tanya, P., Somta, P., Srinives, P., Varshney, R. K., & Lee, S.-H. (2019). Genome sequence of *Jatropha curcas* L., a non-edible biodiesel plant, provides a resource to improve seed-related traits. *Plant Biotechnology Journal*, 17(2), 517–530. <https://doi.org/10.1111/pbi.12995>

Hartl, D., & Clark, A. (2006). *Principles of Population Genetics—Hardcover—Daniel L. Hartl; Andrew G. Clark—Oxford University Press*. [//global.oup.com/ushe/product/principles-of-population-genetics-9780878933082](https://global.oup.com/ushe/product/principles-of-population-genetics-9780878933082)

Heller, J. (1996). Physic Nut, *Jatropha Curcas* L. Bioversity International.

Hemming, D. (2011). Plant Sciences Reviews 2010. *CABI.Org*.

<https://www.cabi.org/bookshop/book/9781845938789/>

Herrera Cool, G., Loureiro, J., Rodriguez Buenfil, I., Uc Varguez, A., Iglesias Andreu, L., Gongóra-Canul, C., Martínez-Sebastian, G., Aguilera-Cauich, E., & Lopez Puc, G. (2019). Indirect organogenesis and estimation of nuclear DNA content in regenerated clones of a non-toxic variety of *Jatropha curcas*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22, 451–463.

Herrera, G., Rodriguez, I., Iglesias, L., & Lopez, G. (2019). Optimization of in vitro adventitious shoot induction in *Jatropha curcas* L. by response surface methodology.

*International Journal of Advanced Research*. <https://www.journalijar.com/article/>

Holme, I. B., Gregersen, P. L., & Brinch-Pedersen, H. (2019). Induced Genetic Variation in Crop Plants by Random or Targeted Mutagenesis: Convergence and Differences. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1468. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01468>

Humans, I. W. G. on the E. of C. R. to. (2000). X-radiation and  $\gamma$ -radiation. *Ionizing Radiation, Part 1: X- and Gamma ( $\gamma$ )-Radiation, and Neutrons*. International Agency for Research on Cancer. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK401331/>

IICA. (2010). *Proyecto Piñón en Ecuador—Galápagos el gran beneficiario*. IICA.INT. <https://www.iica.int/es/prensa/noticias/proyecto-pinon-en-ecuador-galapagos-el-gran-beneficiario>

IICA. (2020). *Aceite de piñón, una oportunidad para el medio ambiente y para cientos de familias rurales de Ecuador en tiempos de pandemia*. IICA.INT. <https://www.iica.int/es/prensa/noticias/aceite-de-pinon-una-oportunidad-para-el-medio-ambiente-y-para-cientos-de-familias-0>

ISAAA. (2014). *Agricultural Biotechnology (A Lot More than Just GM Crops)*. [https://www.isaaa.org/resources/publications/agricultural\\_biotechnology/download/default.asp](https://www.isaaa.org/resources/publications/agricultural_biotechnology/download/default.asp)

Islam, A., Anuar, N., & Yaakob, Z. (2009). Effect of Genotypes and Pre-Sowing Treatments on Seed Germination Behavior of *Jatropha*.

<https://doi.org/10.3923/ajps.2009.433.439>

Islam, A., Anuar, N., Yaakob, Z., Ghani, J., & Osman, M. (2011). Improvement of biodiesel production through genetic studies of *Jatropha curcas*.

[http://www.ukm.my/jsm/malay\\_journals/jilid44bil7\\_2015/Jilid44Bil7\\_2015ms979-986.htm](http://www.ukm.my/jsm/malay_journals/jilid44bil7_2015/Jilid44Bil7_2015ms979-986.htm)

Islam, A., Islam, M., Md Nasir, N. A., Anuar, N., & Yaakob, Z. (2015). Propagation of *Jatropha curcas* through Seeds, Vegetative Cuttings and Tissue Culture (pp. 131–158).

Jan, S., Parween, T., Siddiqi, T. O., & Mahmooduzzafar. (2012). Effect of gamma radiation on morphological, biochemical, and physiological aspects of plants and plant products. *Environmental Reviews*, 20(1), 17–39. <https://doi.org/10.1139/a11-021>

Jankowicz, J., Mba, C., & Till, B. J. (2017). Mutagenesis for Crop Breeding and Functional Genomics. En J. Jankowicz-Cieslak, T. H. Tai, J. Kumlehn, & B. J. Till (Eds.), *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding: Protocols* (pp. 3–18). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45021-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45021-6_1)

Jha, T. baran, Mukherjee, P., & Datta, M. (2007). Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnology Reports*, 1, 135–140. <https://doi.org/10.1007/s11816-007-0027-2>

Jo, Y. D., & Kim, J.-B. (2019). Frequency and Spectrum of Radiation-Induced Mutations Revealed by Whole-Genome Sequencing Analyses of Plants. *Quantum Beam Science*, 3(2), 7. <https://doi.org/10.3390/qubs3020007>

Jongschaap, R., Corré, W., Bindraban, P., & Brandenburg, W. (2012). Claims and facts on *Jatropha curcas* L.: Global *Jatropha curcas* evaluation. *breeding and propagation programme*. WUR. <https://www.wur.nl/en/Publication-details.htm?publicationId=publication-way-333538353439>

Jordan, S. A., & Humphries, P. (1994). Single nucleotide polymorphism in exon 2 of the BCP gene on 7q31-q35. *Human Molecular Genetics*, 3(10), 1915.

<https://doi.org/10.1093/hmg/3.10.1915>

Joshi, K., Chavan, P., Warude, D., & Patwardhan, B. (2004). Molecular markers in herbal drug technology. *Current Science*, 87(2), 159–165.

Kalimuthu, K., Paulsamy, S., Senthilkumar, R., & Sathya, M. (2007). In vitro Propagation of the Biodiesel Plant *Jatropha curcas* L. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 17(2), 137–147. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v17i2.3234>

Kang, S.-Y. (2010). *Gamma Phytotron: A New Chronic Gamma Irradiation Facility* (Núm. 1011-260X; p. 60). IAEA.

Kantety, R. V., La Rota, M., Matthews, D. E., & Sorrells, M. E. (2002). Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology*, 48(5), 501–510. <https://doi.org/10.1023/A:1014875206165>

Kashe, K., Kgathi, D. L., Murray-Hudson, M., & Mfundisi, K. B. (2018). Assessment of benefits and risks of growing *Jatropha* (*Jatropha curcas*) as a biofuel crop in sub-Saharan Africa: A contribution to agronomic and socio-economic policies. *Journal of Forestry Research*, 29(1), 1–12.

Khawale, R. N., Yerramilli, V., & Singh, S. K. (2007). Molecular marker-assisted selection of in vitro chemical mutagen-induced grapevine mutants. *Current Science*, 92(8), 1056–1060.

Khurana-Kaul, V., Kachhwaha, S., & Kothari, S. L. (2010). Direct shoot regeneration from leaf explants of *Jatropha curcas* in response to thidiazuron and high copper contents in the medium. *Biologia Plantarum*, 54(2), 369–372. <https://doi.org/10.1007/s10535-010-0066-3>



Kim, J.-S., Kim, J., Young-Keun, L., Back, M.-W., & Kim, J.-G. (1998). Effects of low dose gamma radiation on the germination and yield components of chinese cabbage. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 17.

Kipp, P. B., Van Eck, J. M., Beetham, P. R., & May, G. D. (2000). Gene targeting in plants via site-directed mutagenesis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 133, 213–221. <https://doi.org/10.1385/1-59259-215-5:213>

Kochhar, S., Kochhar, V. K., Singh, H. B., & Katiyar, R. (2005). Differential rooting and sprouting behaviour of two *Jatropha* species and associated physiological and biochemical changes | *Request PDF*.  
[https://www.researchgate.net/publication/286992249\\_Differential\\_rooting\\_and\\_sprouting\\_behaviour\\_of\\_two\\_Jatropha\\_species\\_and\\_associated\\_physiological\\_and\\_biochemical\\_changes](https://www.researchgate.net/publication/286992249_Differential_rooting_and_sprouting_behaviour_of_two_Jatropha_species_and_associated_physiological_and_biochemical_changes)

Kochhar, S., Singh, S. P., & Kochhar, V. K. (2008). Effect of auxins and associated biochemical changes during clonal propagation of the biofuel plant—*Jatropha curcas*. *Biomass and Bioenergy*, 32(12), 1136–1143. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.02.014>

Koh, M. Y., & Mohd. Ghazi, T. I. (2011). A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(5), 2240–2251.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.02.013>

Kottackal, M. (2003). Plant regeneration through direct somatic embryogenesis on seed coat explants of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Scientia Horticulturae*, 98, 299–304.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(03\)00005-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(03)00005-0)

Kovács, E., & Keresztes, Á. (2002). Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. *Micron*, 33(2), 199–210. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(01\)00012-9](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(01)00012-9)

- Krikorian, A. (1988). *Plant tissue culture: Perceptions and realities* | SpringerLink. <https://link.springer.com/article/10.1007%2F03053401>
- Krikorian, A. D. (1995). Hormones in Tissue Culture and Micropropagation. En P. J. Davies (Ed.), *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 774–796). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-0473-9\\_35](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0473-9_35)
- Kumar, A. (2001). *Bioengineering of Crops for Biofuels and Bioenergy*.
- Kumar, A., & Sharma, S. (2008). An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Industrial Crops and Products*, 28(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.01.001>
- Kumar, N., Singh, A., Kumari, S., & Reddy, M. (2015). Biotechnological approaches for the genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: A biodiesel plant. *Industrial Crops and Products*, 76, 817–828. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.028>
- Kumar, S., Kumaria, S., & Tandon, P. (2012). Efficient In vitro Plant Regeneration Protocol from Leaf Explant of *Jatropha curcas* L — A Promising Biofuel Plant. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/BF03263356>
- Kumlay, A. M., & Ercisli, S. (2015). Callus induction, shoot proliferation and root regeneration of potato (*Solanum tuberosum* L.) stem node and leaf explants under long-day conditions. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(6), 1075–1084. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1077685>
- Lama, A. D., Klemola, T., Saloniemi, I., Niemelä, P., & Vuorisalo, T. (2018). Factors affecting genetic and seed yield variability of *Jatropha curcas* (L.) across the globe: A review. *Energy for Sustainable Development*, 42, 170–182. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2017.09.002>

L'Annunziata, M. F. (2007). 3—Gamma- and X-Radiation—Photons. En M. F. L'Annunziata (Ed.), *Radioactivity* (pp. 187–215). Elsevier Science B.V.  
<https://doi.org/10.1016/B978-044452715-8.50006-2>

Lascano, L. F. (2020). Análisis de la variabilidad genética de la colección del piñón (*Jatropha curcas* L.) del INIAP con marcadores SSR-EST.  
<http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/1192>

Leitao, J. (2012). Chemical mutagenesis. En *Plant Mutation Breeding and Biotechnology* (pp. 135–158). <https://doi.org/10.1079/9781780640853.0135>

Lusser, M., Parisi, C., Plan, D., & Rodríguez-Cerezo, E. (2012). Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nature Biotechnology*, 30(3), 231–239.  
<https://doi.org/10.1038/nbt.2142>

Ma, F., & Hanna, M. A. (1999). Biodiesel production: A review. *Bioresource Technology*, 70(1), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00025-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00025-5)

Maghuly, F., & Laimer, M. (2013). *Jatropha curcas*, a biofuel crop: Functional genomics for understanding metabolic pathways and genetic improvement. *Biotechnology Journal*, 8(10), 1172–1182. <https://doi.org/10.1002/biot.201300231>

Maity, J., Kar, S., Banerjee, S., Anindita, C., & Santra, S. (2009). Effects of gamma irradiation on long-storage seeds of *Oryza sativa* (cv. 2233) and their surface infecting fungal diversity. *Radiation Physics and Chemistry*, 78, 1006–1010.  
<https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2009.06.002>

Maldonado, A. (2020). Establecimiento de la dosis letal media y dosis óptima de radiación gamma con fuente de Co60 para la germinación in vitro de semillas irradiadas de los clones CP041 y CP052 de piñón.

Marion, J. B. (1981). 21—Radiation — effects and uses. En J. B. Marion (Ed.), *Physics in the Modern World (Second Edition)* (pp. 603–631). Academic Press.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-472280-4.50024-1>

Marrugo, S., Turull, M., Montes, G. E., Pico, M. V., Marrugo-Negrete, J. L., & Díez, S. (2021). Chapter 7 - Phytoremediation of mercury in soils impacted by gold mining: A case-study of Colombia. En G. Saxena, V. Kumar, & M. P. Shah (Eds.), *Bioremediation for Environmental Sustainability* (pp. 145–160). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820524-2.00007-9>

Marrugo, J., Durango-Hernández, J., Pinedo-Hernández, J., Olivero-Verbel, J., & Díez, S. (2015). Phytoremediation of mercury-contaminated soils by *Jatropha curcas*. *Chemosphere*, 127, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.12.073>

Mason, A. S. (2015). SSR genotyping. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1245, 77–89. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6_6)

Matos, A., & Sánchez, A. (2011). Evaluación de reguladores de crecimiento para la inducción de callo en *Aloe vera* L. *Multiciencias*, 11(1), 7–14.

Mba, C. (2013). Induced Mutations Unleash the Potentials of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. *Agronomy*, 3(1), 200–231. <https://doi.org/10.3390/agronomy3010200>

Mba, C., Afza, R., Jain, S., Gregorio, G., & Zapata Arias, F. J. (2007). Induced Mutations For Enhancing Salinity Tolerance in Rice. *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops* (pp. 413–454). [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5578-2\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5578-2_17)

McCallum, C. M., Comai, L., Greene, E. A., & Henikoff, S. (2000). Targeted screening for induced mutations. *Nature Biotechnology*, 18(4), 455–457. <https://doi.org/10.1038/74542>

Memon, R., & Soomro, R. (2007). Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas*. *Pakistan Journal of Botany*, 39.

- Miller, C. O., Skoog, F., Okumura, F. S., Von Saltza, M. H., & Strong, F. M. (1956). Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division<sup>1,2</sup>. *Journal of the American Chemical Society*, 78(7), 1375–1380. <https://doi.org/10.1021/ja01588a032>
- Mishra, V. K., & Goswami, R. (2018). A review of production, properties and advantages of biodiesel. *Biofuels*, 9(2), 273–289. <https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1336350>
- Mohammed, A. T., Jaafar, M. N. M., Othman, N., Veza, I., Mohammed, B., Oshadumi, F. A., & Sanda, H. Y. (2021). Soil fertility enrichment potential of *Jatropha curcas* for sustainable agricultural production: A case study of Birnin Kebbi, Nigeria. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 21061–21073.
- Mondinini, L., Noorani, A., & Pagnotta, M. (2009). *Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools*. <https://www.mdpi.com/1424-2818/1/1/19>
- Montes, J. M., & Melchinger, A. E. (2016). Domestication and Breeding of *Jatropha curcas* L. *Trends in Plant Science*, 21(12), 1045–1057. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.008>
- Morgante, M., Hanafey, M., & Powell, W. (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics*, 30(2), 194–200. <https://doi.org/10.1038/ng822>
- Mukherjee, P., Varshney, A., Tangirala, S. J., & Jha, T. baran. (2011). *Jatropha curcas*: A review on biotechnological status and challenges. *Plant Biotechnology Reports*, 5, 197–215. <https://doi.org/10.1007/s11816-011-0175-2>
- Mullins, E., Bresson, J., Dalmay, T., Dewhurst, I., Epstein, M., Firbank, L., Guerche, P., Hejatko, J., Moreno, F. J., Naegeli, H., Nogue, F., Serrano, J., Savoini, G., Veromann, E., Veronesi, F., Casacuberta, J., Lenzi, P., Guajardo, I., Raffaello, T., & Rostoks, N. (2021). *In vivo*

and *in vitro* random mutagenesis techniques in plants. *EFSA Journal*, 19.

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6611>

Mulpuri, S., & Nithiyantham, S. (2020). Genetic Improvement of *Jatropha curcas* L. Through Conventional and Biotechnological Tools. En A. Kumar, Y.-Y. Yau, S. Ogita, & R. Scheibe (Eds.), *Climate Change, Photosynthesis and Advanced Biofuels: The Role of Biotechnology in the Production of Value-added Plant Bio-products* (pp. 425–460). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-5228-1\\_18](https://doi.org/10.1007/978-981-15-5228-1_18)

Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G., & Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: Current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261–285. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>

Neupane, D., Bhattarai, D., Ahmed, Z., Das, B., Pandey, S., Solomon, J. K. Q., Qin, R., & Adhikari, P. (2021). Growing *Jatropha (Jatropha curcas* L.) as a Potential Second-Generation Biodiesel Feedstock. *Inventions*, 6(4), 60. <https://doi.org/10.3390/inventions6040060>

Nogueira, A. R. C., Soares, A. A., Ibrahim, A. B., & Campos, F. a. P. (2011). Analysis of organogenic competence of cotyledons of *Jatropha curcas* and their *in vitro* histological behavior. *African Journal of Biotechnology*, 10(54), 11249–11258. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i54>

Oladosu, Y., Rafii, M. Y., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., Rahim, H. A., Miah, G., & Usman, M. (2016). Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: A review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1), 1–16. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1087333>

Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., & Vieira, M. L. C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 294–307. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000200018>

Olomola, D., Dora, A., Nwogwugwu, J. O., Adekunle, A., & Osunlaja, O. (2014). *In-vitro* Propagation of *Jatropha curcas* L. Through The Embryo Culture Technique. *Journal of Forestry Research and Management*. Vol.9 2012.pp45-50.

Onysk, A., & Boczkowska, M. (2017). *M13-Tailed Simple Sequence Repeat (SSR) Markers in Studies of Genetic Diversity and Population Structure of Common Oat Germplasm | Springer Nature Experiments*. [https://experiments.springernature.com/articles/10.1007/978-1-4939-6682-0\\_12](https://experiments.springernature.com/articles/10.1007/978-1-4939-6682-0_12)

Paran, I., & Michelmore, R. W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85(8), 985–993. <https://doi.org/10.1007/BF00215038>

Paulillo, L. C., Paulillo, Mo, C., Isaacson, J., Lessa, L., Lopes, E., Romero-Suarez, S., Brotto, L., Abreu, E., Gutheil, W., & Brotto, M. (2012). *Jatropha curcas*: From Biodiesel Generation to Medicinal Applications. *Recent Patents on Biotechnology*, 6.

Peña, C. J. (2009). Establecimiento y evaluación de protocolos de desinfección, introducción y multiplicación in vitro de piñón (*Jatropha curcas* L.) a partir de semillas y yemas apicales obtenidas de plantas adultas con miras a una propagación masiva de plantas élite. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/handle/21000/779>

Pequeño, I. L., Vázquez-Alvarado, R. E., Santos-Haliscak, J. A., Luna-Maldonado, A. I., Moreno-Degollado, G., Iracheta-Donjuan, L., López-Gómez, P., Castellanos-Juárez, M., & Ojeda-Zacarías, M. C. (2015). Inducción organogénica de *Jatropha curcas* L. a partir de hojas jóvenes. *Polibotánica*, 39, 79–89.

Peterson, B. M., Mathur, S., Osmer, P. S., & Vestergaard, M. (2003). Quasars. En R. A. Meyers (Ed.), *Encyclopedia of Physical Science and Technology (Third Edition)* (pp. 465–480). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00629-3>

Phillips, R. L., Kaepler, S. M., & Olhoft, P. (1994). Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(12), 5222–5226.

Poincelot, R. P. (1980). *Horticulture: Principles and Practical Applications*. Prentice-Hall.

Poveda, G., Erazo, E., & González, J. (2017). *Oportunidad del cultivo del Piñón como propuesta para el desarrollo*. <https://www.eumed.net/coursecon/ecolat/ec/2017/cultivo-pinon-ecuador.html>

Prasad, D. M. R., Izam, A., & Khan, M. M. R. (2012). *Jatropha curcas*: Plant of medical benefits. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*(14), 2691–2699. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.977>

Prina, A., Landau, A., MG, P., & Hopp, H. (2010). *Mutagénesis, TILLING y EcoTILLING. Capítulo 4, Parte II* (pp. 217–228).

Provan, J., Powell, W., & Hollingsworth, P. M. (2001). Chloroplast microsatellites: New tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, *16*(3), 142–147. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)02097-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)02097-8)

Rajore, S., & Batra, A. (2005). Efficient Plant Regeneration via Shoot Tip Explant in *Jatropha curcas* L | *SpringerLink*. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03263231>

Ram, G., Parthiban, K., Rathinam, S., Thiruvengadam, V., & Paramathma, M. (2008). Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *55*, 803–809. <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9285-7>



Rampadarath, S., Puchooa, D., & Jeewon, R. (2016). *Jatropha curcas* L: Phytochemical, antimicrobial and larvicidal properties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(10), 858–865. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.01.019>

Rathore, M. S., Yadav, S., Yadav, P., Kheni, J., & Jha, B. (2015). Micropropagation of elite genotype of *Jatropha curcas* L. through enhanced axillary bud proliferation and ex vitro rooting. *Biomass and Bioenergy*, 83, 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.10.023>

Rigola, D., van Oeveren, J., Janssen, A., Bonn e, A., Schneiders, H., van der Poel, H. J. A., van Orsouw, N. J., Hogers, R. C. J., de Both, M. T. J., & van Eijk, M. J. T. (2009). High-Throughput Detection of Induced Mutations and Natural Variation Using KeyPoint™ Technology. *PLoS ONE*, 4(3), e4761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004761>

Rodríguez Beraud, M. M., Latsague Vidal, M. I., Chac n Fuentes, M. A., & Astorga Brevis, P. K. (2014). Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 111–118. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>

Salazar-Villa, E., Angulo-Escalante, M. A., Castro-Valenzuela, J. D., B ez-Parra, K. M., Soriano-Melgar, L. de A. A., & Soto-Landeros, F. (2021). Rooting of Stem Cuttings of *Jatropha platyphylla* (Euphorbiaceae) in the Obtaining of Axillary Buds for Grafting. *American Journal of Plant Sciences*, 12(12), 1880–1893. <https://doi.org/10.4236/ajps.2021.1212130>

Sardana, J., Batra, A., & Ali, D. J. (2000). An expeditious method for regeneration of somatic embryos in *Jatropha curcas* L. *Phytomorphology: An International Journal of Plant Morphology*, 50, 239–242.

Schaart, J. G., van de Wiel, C. C. M., Lotz, L. A. P., & Smulders, M. J. M. (2016). Opportunities for Products of New Plant Breeding Techniques. *Trends in Plant Science*, 21(5), 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.006>

Schmidt, E. D., Guzzo, F., Toonen, M. A., & de Vries, S. C. (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development (Cambridge, England)*, *124*(10), 2049–2062.

Seok, K., & Sappington, T. (2013). *Microsatellite Data Analysis for Population Genetics* | Springer Nature Experiments. [https://experiments.springernature.com/articles/10.1007/978-1-62703-389-3\\_19](https://experiments.springernature.com/articles/10.1007/978-1-62703-389-3_19)

Severino, L. S., Lima, R. L. S., Lucena, A. M. A., Freire, M. A. O., Sampaio, L. R., Veras, R. P., Medeiros, K. A. A. L., Sofiatti, V., & Arriel, N. H. C. (2011). Propagation by stem cuttings and root system structure of *Jatropha curcas*. *Biomass and Bioenergy*, *35*(7), 3160–3166. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.031>

Shamsiah, A., Nurathrah, S., Azmir, M., & Norriza, J. (2011). Effects of bap concentration on in vitro shoot multiplication and callus induction of *Jatropha curcas* L. *International Society for Horticultural Science*. [http://www.actahort.org/books/923/923\\_30.htm](http://www.actahort.org/books/923/923_30.htm)

Shan, Q., & Voytas, D. F. (2018). Editing plant genes one base at a time. *Nature Plants*, *4*(7), 412–413. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0177-y>

Sharma, S., Dhamija, H. K., & Parashar, B. (2012). *Jatropha curcas*: A Review. *Asian Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, *2*(3), 107–111.

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

Sikora, P., Chawade, A., Larsson, M., Olsson, J., & Olsson, O. (2011). Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. *International Journal of Plant Genomics*, *2011*, 314829. <https://doi.org/10.1155/2011/314829>

Singh, A., Reddy, M. P., Chikara, J., & Singh, S. (2010). A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas*—A biodiesel plant. *Industrial Crops and Products*, 31(2), 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.10.007>

Songsri, P., Suriham, B., Sanitchon, J., Srisawangwong, S., & Kesmala, T. (2011). *Effects of Gamma Radiation on Germination and Growth Characteristics of Physic Nut (Jatropha curcas L.)*. <https://doi.org/10.3923/jbs.2011.268.274>

Soranzo, N., Provan, J., & Powell, W. (1999). An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome*, 42(1), 158–161.

Spooner, D., van Treuren, R., & de Vicente, M. (2010). Molecular markers for genebank management. <https://www.biodiversityinternational.org/e-library/publications/detail/molecular-markers-for-genebank-management/>

Sujatha, M., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2005). Shoot Bud Proliferation from Axillary Nodes and Leaf Sections of Non-toxic *Jatropha curcas* L. *Plant Growth Regulation*, 47(1), 83–90.

Sujatha, M., & Mukta, N. (1996). Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas* | *Semantic Scholar*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Morphogenesis-and-plant-regeneration-from-tissue-of-Sujatha-Mukta/b217265df47e032fbb39be253b38c032a9d24fd1>

Sujatha, M., Reddy, T. P., & Mahasi, M. J. (2008). Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. *Biotechnology Advances*, 26(5), 424–435. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.004>

Szarejko, I., Szurman-Zubrzycka, M., Nawrot, M., Marzec, M., Gruszka, D., Kurowska, M., Chmielewska, B., Zbieszczyk, J., Jelonek, J., & Maluszynski, M. (2017). Creation of a

TILLING Population in Barley After Chemical Mutagenesis with Sodium Azide and MNU. En J. Jankowicz-Cieslak, T. H. Tai, J. Kumlehn, & B. J. Till (Eds.), *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding: Protocols* (pp. 91–111). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45021-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45021-6_6)

Tang, Q., Xia, H., Liang, W., Huo, X., & Wei, X. (2020). Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles from *Morus nigra* and its anticancer activity of AGS gastric cancer cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *202*, 111698.

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111698>

Thepsamran, N., Thepsithar, C., & Thongpukdee, A. (2008). In vitro induction of shoots and roots from *Jatropha curcas* L. explants. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *83*, 106–112. <https://doi.org/10.1080/14620316.2008.11512354>

Toral, O. C., Iglesias, J. M., Montes de Oca, S., Sotolongo, J. A., García, S., & Torsti, M. (2008). *Jatropha curcas* L., una especie arbórea con potencial energético en Cuba. *Pastos y Forrajes*, *31*(3), 1–1.

Toukhy, E. A., Swailam, H. M., Elshenawy, M. Z., & Fawzi Abdallah, M. M. (2019). Effect of germination and irradiation treatments on quality and storability of clover sprout. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, *27*(5), 2641–2651.

<https://doi.org/10.21608/ajs.2019.18559.1104>

Unluturk, S., Atilgan, M., Baysal, A., & Tari, C. (2008). Use of UV-C radiation as a non-thermal process for liquid egg products (LEP). *Journal of Food Engineering - J FOOD ENG*, *85*, 561–568. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.08.017>

Valdez, M., & Gatica-Arias, A. M. (2009). Effect of BAP and IAA on shoot regeneration in cotyledonary explants of Costa Rican melon genotypes. *Agronomía Costarricense*.

<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/6740>

Vanhoudt, N., Horemans, N., Wannijn, J., Nauts, R., Van Hees, M., & Vandenhove, H. (2014). Primary stress responses in *Arabidopsis thaliana* exposed to gamma radiation. *Journal of Environmental Radioactivity*, 129, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2013.11.011>

Varshney, A., Sangapillai, R., Patil, M. S., & Johnson, T. S. (2011). Histological evidence of morphogenesis from various explants of *Jatropha curcas* L. *Trees*, 25(4), 689–694. <https://doi.org/10.1007/s00468-011-0546-x>

Varshney, R. K., Graner, A., & Sorrells, M. E. (2005a). Genic microsatellite markers in plants: Features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23(1), 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.11.005>

Varshney, R. K., Graner, A., & Sorrells, M. E. (2005b). Genomics-assisted breeding for crop improvement. *Trends in Plant Science*, 10(12), 621–630. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.10.004>

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., & Kuiper, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407–4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>

Wang, D. G., Fan, J. B., Siao, C. J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M. S., Shen, N., ... Lander, E. S. (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5366), 1077–1082. <https://doi.org/10.1126/science.280.5366.1077>

Wang, M., Barkley, N., & Jenkins, T. (2009). Microsatellite Markers in Plants and Insects. Part I: Applications of Biotechnology. *Genes Genomes Genomics*, 3.

Wani, M., Kozgar, M., Tomlekova, N., Khan, S., Gul, A., Sheikh, A., Ahmad, P., Wani, M., Sheikh, S., Tomlekova, N., Khan, S., Kazi, A., Ur, A., & Ahmad, P. (2014). *Mutation Breeding: A Novel Technique for Genetic Improvement of Pulse Crops Particularly Chickpea (Cicer arietinum L.)*. 2. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8824-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8824-8_9)

Weber, J. L., & May, P. E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, *44*(3), 388–396.

Wei, Q., Lu, W.-D., Liao, Y., Pan, S.-L., Xu, Y., Tang, L., & Chen, F. (2004). Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas*. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao = Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, *30*(4), 475–478.

Weising, K. (2005). *DNA fingerprinting in plants: Principles, methods, and applications / by Kurt Weising ... [and others]*. (Second edition). Taylor & Francis Group.

Weising, K., & Gardner, R. C. (1999). A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, *42*(1), 9–19.

Welsh, J., & McClelland, M. (1991). Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nucleic Acids Research*, *19*(19), 5275–5279. <https://doi.org/10.1093/nar/19.19.5275>

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, *18*(22), 6531–6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>

Woo, J. W., Kim, J., Kwon, S. I., Corvalán, C., Cho, S. W., Kim, H., Kim, S.-G., Kim, S.-T., Choe, S., & Kim, J.-S. (2015). DNA-free genome editing in plants with preassembled

CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology*, 33(11), 1162–1164.

<https://doi.org/10.1038/nbt.3389>

Yang, X., & Zhang, X. (2010). Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(1), 36–57. <https://doi.org/10.1080/07352680903436291>

Zamarripa, A., & Solis, J. L. (2013). (PDF) *Jatropha curcas* L. *Alternativa Bioenergética en Mexico*.

[https://www.researchgate.net/publication/294873398\\_Jatropha\\_curcas\\_L\\_Alternativa\\_Bioenergetica\\_en\\_Mexico](https://www.researchgate.net/publication/294873398_Jatropha_curcas_L_Alternativa_Bioenergetica_en_Mexico)

Zane, L., Bargelloni, L., & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: A review. *Molecular Ecology*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x>

Zhang, C., Fu, S., Tang, G., Hu, X., & Guo, J. (2013). Factors influencing direct shoot regeneration from mature leaves of *Jatropha curcas*, an important biofuel plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 49(5), 529–540.

Zhang, J., Chen, S., Yang, R., & Yan, Y. (2010). Biodiesel production from vegetable oil using heterogenous acid and alkali catalyst. *Fuel*, 89(10), 2939–2944.

<https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.05.009>

## Capítulo VIII: Anexos