

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del Problema

La utilización de combustibles fósiles como fuente de energía causa una gran cantidad de gases contaminantes y de efecto invernadero, los cuales conllevan al deterioro del medio ambiente y además pueden causar graves enfermedades a los seres humanos. Por tal razón la humanidad se ha visto en la necesidad de buscar fuentes de energía alternativas para disminuir los índices de contaminación ambiental y a los seres humanos (De La Vega, 2008).

Actualmente una nueva alternativa para la fabricación de biocombustibles es la utilización productos vegetales como por ejemplo cultivos de maíz, soya, caña de azúcar, entre otros, pero debido a que también son productos de consumo humano se han originado problemas de tipo ético ya que estas prácticas atentan contra la seguridad alimentaria de los seres vivos. Otro problema es el destinar tierras fértiles para cultivos con fines de producción de biocombustibles, lo cual se puede solucionar con el uso de otras especies vegetales como el piñón, el cual no atenta contra la seguridad alimentaria ya que no es un cultivo comestible y además tiene la característica de adaptarse a tierras áridas, por lo que el piñón se podría aprovechar para ser sembrado en zonas poco productivas (Heller, 1996; De La Vega, 2008).

La utilización de técnicas tradicionales para propagar piñón no es suficiente para establecer cultivos masivos, una de estas técnicas es la propagación por medio de estacas de la cual se obtiene un número reducido de individuos clones,

por lo que es un gran problema satisfacer una alta demanda de plantas. Otro tipo de propagación tradicional es la obtención de plantas por vía cigótica a partir de semilla la cual no garantiza transmitir las características exactas de sus progenitores ya que existe combinación del material genético debido a la fecundación.

Utilizando técnicas de cultivo *in vitro* como la embriogénesis somática se puede solucionar este tipo de problemas ya que se puede obtener una gran cantidad de plantas o individuos clones a partir de pequeñas porciones de tejido en períodos cortos de tiempo (Heller, 1996).

1.2 Justificación del Problema

El aceite que se extrae de las semillas de piñón (*Jatropha curcas*) ha demostrado ser una posible fuente de biodiesel ya que de las semillas, se puede extraer alrededor de un 40% de aceite. Además, los subproductos resultantes de la extracción del aceite, como la pasta y cascarilla de las semillas, pueden ser usados para la obtención de biogás (De La Vega, 2008), lo cual contribuye como fuente de energía alternativa que podría solucionar problemas ambientales en lo que se refiere a disminución de gases de efecto invernadero.

Es importante recalcar que el aceite de piñón es no comestible, por lo que no se atenta contra la seguridad alimentaria, situación que ya se produjo en cultivos como el maíz, soja, caña de azúcar, entre otros. El cultivo de piñón, *Jatropha curcas* podrían evitar este tipo de problemas ya que tiene la capacidad de sobrevivir y crecer en tierras marginales, erosionadas, pobres en nutrientes y requiere un mínimo riego, de aquí la importancia de micropropagar esta especie

vegetal para reactivar la economía en ciertas zonas improductivas del país (Falasca & Ulberich, 2006; De La Vega, 2008).

La técnica de cultivo *in vitro* permitirá obtener gran cantidad de plantas con características de buena producción, resistencia a enfermedades y mejor adaptabilidad a condiciones ambientales. Al propagar por técnicas de cultivo *in vitro* se causaría menos estrés a las plantas seleccionadas y de esta manera se conservaría los recursos fitogenéticos para obtener una mejor calidad de individuos (Heller, 1996). La utilización de la embriogénesis somática como técnica de micropropagación masiva de piñón *Jatropha curcas* nos permite obtener miles de plantas clones en periodos cortos de tiempo además de obtener individuos con toda la información genética para formar una planta clon nueva a partir de cualquier tejido somático vegetal (Heller, 1996).

Se ha revelado además que la embriogénesis somática es la mejor vía de regeneración para crioconservación, es decir preservar clones seleccionados a bajas temperaturas. Además la embriogénesis somática es uno de los caminos mas eficientes para realizar transformación vegetal, siendo por esto un elemento importante en los estudios de genómica funcional, a fin de validar genes relacionados con los procesos embrionarios (Celestino, Hernández, Carneros, López, & Toribio, 2005).

Al establecer embriogénesis somática, por vía indirecta, los callos embrionarios obtenidos se los puede utilizar para realizar suspensiones celulares que forman un embrión somático. Se puede llegar a producir una gran cantidad de plantas en periodos cortos de tiempo y en espacios reducidos por lo cual se reducirá costos de producción (Karami, 2008).

El estudio de los embriones somáticos a nivel histológico brindará un aporte importante en el establecimiento de la embriogénesis somática de la planta de piñón. Se podrá identificar marcadores histológicos relacionados con el proceso embriogénico de *Jatropha curcas* desde la fase inicial de callogénesis hasta la obtención de embriones somáticos en fase cotiledonar, lo que llevaría a buscar genes de interés del proceso embrionario y a una mejor micropropagación *in vitro* de la planta para investigaciones futuras (Cevallos, Sánchez & Montes, 2002).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Establecer embriogénesis somática y realizar la caracterización histológica embrionaria de piñón *Jatropha curcas* a partir de pecíolo.

1.3.2 Objetivos específicos

- Establecer un método de desinfección óptimo en pecíolos para obtener bajos porcentajes de contaminación, tanto fúngica como bacteriana en los medios de cultivo de inducción de callo embrionario.
- Probar diferentes tratamientos para la inducción y desarrollo de callo embriogénico a partir de pecíolo.
- Establecer el mejor medio de cultivo para la maduración de los embriones somáticos.

- Realizar estudios histológicos para caracterizar y diferenciar las fases de la embriogénesis somática.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Características generales de *Jatropha curcas*

Jatropha curcas es una especie que pertenece al reino plantae de la división filogenética magnoliophyta, de la clase magnoliopsida, del orden euphorbiales, de la familia euphorbiaceae y su nombre científico es *Jatropha curcas* que comúnmente se la llama piñón (Gubitz, Mittelbach & Trabi, 1997).

Jatropha curcas es una planta oleaginosa con más de 3500 especies agrupadas en 210 géneros distribuida en los trópicos. Se la encuentra mayormente a bajas elevaciones, por debajo de los 1200 metros sobre el nivel del mar (msnm), en áreas secas o húmedas, en planicies o colinas, con precipitaciones de 300 a 1800 mm por año y temperaturas de 18 a 28 °C, aunque se planta en sitios con temperaturas de hasta 34 °C. Esta planta es nativa de América Central, actualmente se distribuye desde México hasta Argentina. En Guatemala se encuentra principalmente en cercas, por lo que posiblemente no sea nativa de este país, pero sin duda ha sido cultivada por largo tiempo. Además se encuentra en el Sureste de Asia, India y África (Heller, 1996).

El piñón (*Jatropha curcas*) además es una planta perenne cuyo ciclo productivo se extiende de 45 a 50 años posee un crecimiento rápido y con una altura normal de 2 a 3 m, presenta una raíz principal y dos periféricas o secundarias. El tallo es erguido con un diámetro máximo de 20 cm, posee ramas gruesas que crecen de forma discontinua en cada incremento y las hojas se

forman de 5 a 7 lóbulos acuminados, poco profundos y con pecíolos largos de alrededor de 10 a 15 cm (De La Vega, 2008).

Las inflorescencias se forman en la parte terminal de las ramas, tanto flores, femeninas como masculinas, son pequeñas de 6 a 8 mm de diámetro además presentan microvellosidades (pubescentes). La producción de frutos y semillas en los árboles de piñón puede empezar a partir del primer o segundo año de la siembra y se estabiliza a partir del tercer o cuarto año. Estudios en campo indican que el tipo de polinización que ocurre en esta planta es cruzada lo que quiere decir con la ayuda de insectos. Cada inflorescencia puede producir un racimo de aproximadamente 10 frutos de forma ovoide (Figura 1.1). Donde una vez polinizado se va formar tres semillas por cada fruto, de 3 cm de largo y 1 cm de ancho (Heller, 1996).

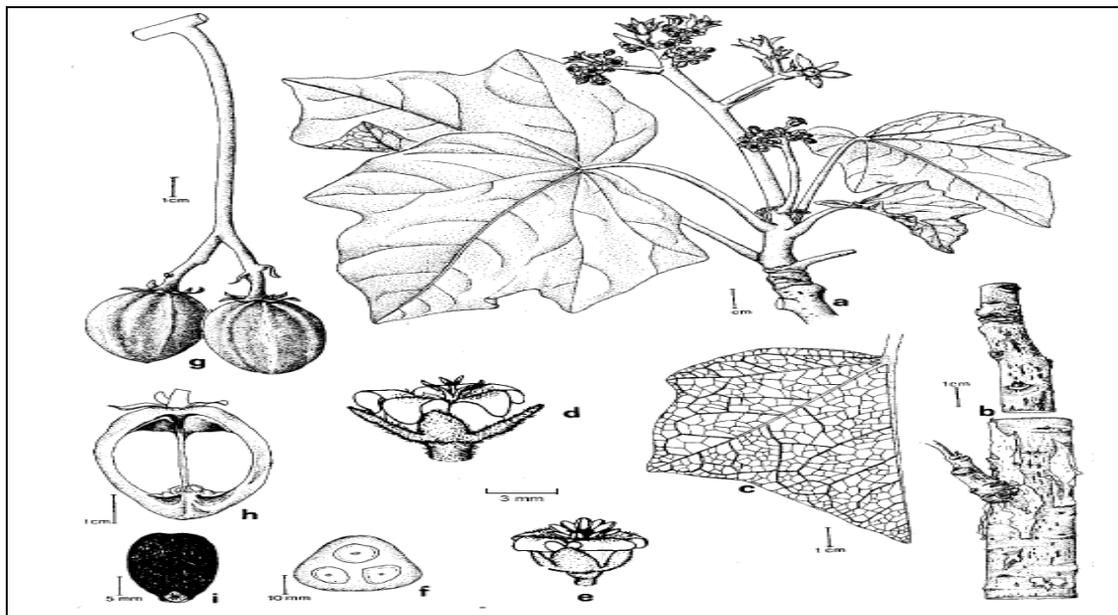


Figura 1.1 Diferentes partes de la planta de piñón *Jatropha curcas*: a) floración en la rama, b) corteza, c) limbo de la hoja, d) pistilo de la flor, e) flores, f) corte transversal de la fruta inmadura, g) frutas, h) corte longitudinal de los frutos, i) semilla (Heller, 1996).

La cantidad de semilla por hectárea con mil árboles en estado de madurez total oscila entre 0.5 y 12.0 toneladas anuales, dependiendo de las condiciones en las cuales se mantengan los cultivos. La cosecha se realiza de dos a tres veces por año debido a que no todos los frutos maduran al mismo tiempo (De La Vega, 2008).

Las plagas y enfermedades más frecuentes que atacan al piñón son debido al insecto *Podagrica spp* y al hongo *Cercospera spp*, las cuales causan principalmente abortos en frutos y malformaciones en las semillas. Sin embargo existen otros insectos y hongos que pueden afectar las plantaciones en monocultivo extensivo e intensivo. Pero en el caso de especies de *Jatropha* tóxicas son menos susceptibles a plagas por razón de su misma toxicidad (De La Vega, 2008).

1.4.2 Importancia y aplicaciones de *Jatropha curcas*

La introducción comercial del cultivo de *Jatropha Curcas L.* como fuente de energía renovable trae consigo los siguientes beneficios: contribución al desarrollo económico, social y ambiental para el ahorro de divisas, la generación de empleos y la reducción de emanaciones de gases contaminantes (Gubitz *et al.*, 1997).

El aceite obtenido del prensado de las semillas de piñón es de uso directo para más de 400 productos en la industria química pero la mayor parte de este aceite es destinado para la producción de biodiesel (Heller, 1996). Por lo cual, una serie de industrias pueden aprovechar este producto en varias formas ya que del aceite se puede obtener ester metílico el cual se utiliza cómo materia prima para la fabricación de una gran cantidad de productos como las pinturas (Gubitz *et al.*, 1997).

Los subproductos resultantes en la extracción del aceite, como la cascarilla y la pasta de la semilla, pueden ser utilizados para la elaboración de otros productos. Por ejemplo estos desechos pueden ser digeridos en biorreactores para la producción y obtención de biogás, además esta pasta puede usarse como alimento para animales previo a un tratamiento, debido a su toxicidad. Sin embargo, si se realiza un proceso de destoxificación puede usarse sin problema para alimentar ganado vacuno, porcino y aves, pues contiene altos niveles de proteína alrededor de 55 al 58%. La pasta sin destoxificar y las hojas tiernas que se desechan después de las podas en los cultivos, también puede ser usada, como abono orgánico pues tiene un alto contenido en nitrógeno (Heller, 1996; De La Vega, 2008).

El extracto de las hojas de piñón poseen alrededor de un 37% de taninos el cual tiñe las telas de un color negro indeleble lo cual puede ser aprovechado para la industria textil, también el látex de esta planta tiene un 10% de taninos el cual puede ser usado como tinta. Además, el látex tiene propiedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Candida albicans*, también posee efectos coagulantes y se aplica directamente en heridas, cortes, sarpullidos, quemaduras como antiséptico (Heller, 1996).

Además otra importancia del piñón a parte de sus propiedades en el uso de la medicina, es su fácil adaptabilidad a terrenos con bajos índices de lluvia y poca cantidad de nutrientes. El piñón no requiere un tipo de suelo especial, se desarrolla normalmente en suelos áridos y semiáridos además el requerimiento de agua es sumamente bajo y puede soportar períodos largos de sequia y responde bien a suelos con pH ácido o básico. También es una especie de un uso

potencial en áreas deforestadas, constituyendo una excelente alternativa para la reforestación (De La Vega, 2008).

1.4.3 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es un proceso morfogénico que se practica cada vez más en el cultivo de tejidos vegetales. La propagación mediante embriogénesis somática dispone de una vía de regeneración de plantas a partir de células, tejidos o porciones de la planta donante que sea fiable, reproducible, aplicable a distintos genotipos y altamente productiva. Se requiere además que genere material exacto al donante sin variabilidad clonal. La embriogénesis somática se da gracias a la totipotencia de las células, la cual es una característica que teóricamente tienen todas las células vegetales para desarrollar nuevos individuos a partir de tejidos u órganos de la planta (Celestino *et al.*, 2005).

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula o grupo de células no sexuales. Son estructuras bipolares con un eje radial-apical que no poseen conexión vascular con el tejido madre, el cual es capaz de crecer y formar individuos totalmente normales (Roca & Mroginski, 1991; Chanatásig, 2004). Los embriones somáticos poseen un tejido organizado que tienen pequeñas células periféricas de 10 – 20 μ de diámetro que se dividen activamente. Estas células tienen la característica de tener núcleos basófilos y prominentes (Muñoz, 2003).

Los embriones somáticos mantienen una similitud con los embriones cigóticos, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* por lo cual puede ocurrir anomalías en el desarrollo normal del embrión, como es la fasciación y la

fusión de los cotiledones. En condiciones *in vivo* la embriogénesis somática puede ocurrir en los integumentos del ovulo o a partir de la nucelas, dentro del ovario como el endospermo y las antípodas o el cigoto. En ciertas especies se puede dar en los ápices de las hojas como es el caso de las orquídeas (Roca *et al.* 1991).

La fase inicial del proceso de la embriogénesis somática consiste en una organizada división y diferenciación celular con patrones definidos que dependen de diversos genes y factores que interactúan en cada etapa de la morfogénesis. Una vez que el medio de cultivo es el adecuado y las condiciones físicas las apropiadas ciertas células dan origen a la embriogénesis somática, incrementado el número de divisiones celulares en el tejido y dando lugar a las diferentes etapas de desarrollo: en la etapa inicial se forma el suspensor que es una estructura compuesta por ocho células, a continuación se forma un embrión preglobular, después las estructuras globulares, a continuación el embrión acorazonado, el embrión torpedo y finalmente el embrión cotiledonar el que tiene toda la información genética para formar una planta completa (Figura 1.2). Una vez formado el embrión en fase cotiledonar se produce la maduración y finalmente se da la germinación y la transformación del embrión somático a una planta completa (Sondahl, Nakamura & Sharp, 1981; Silveira, 1999).

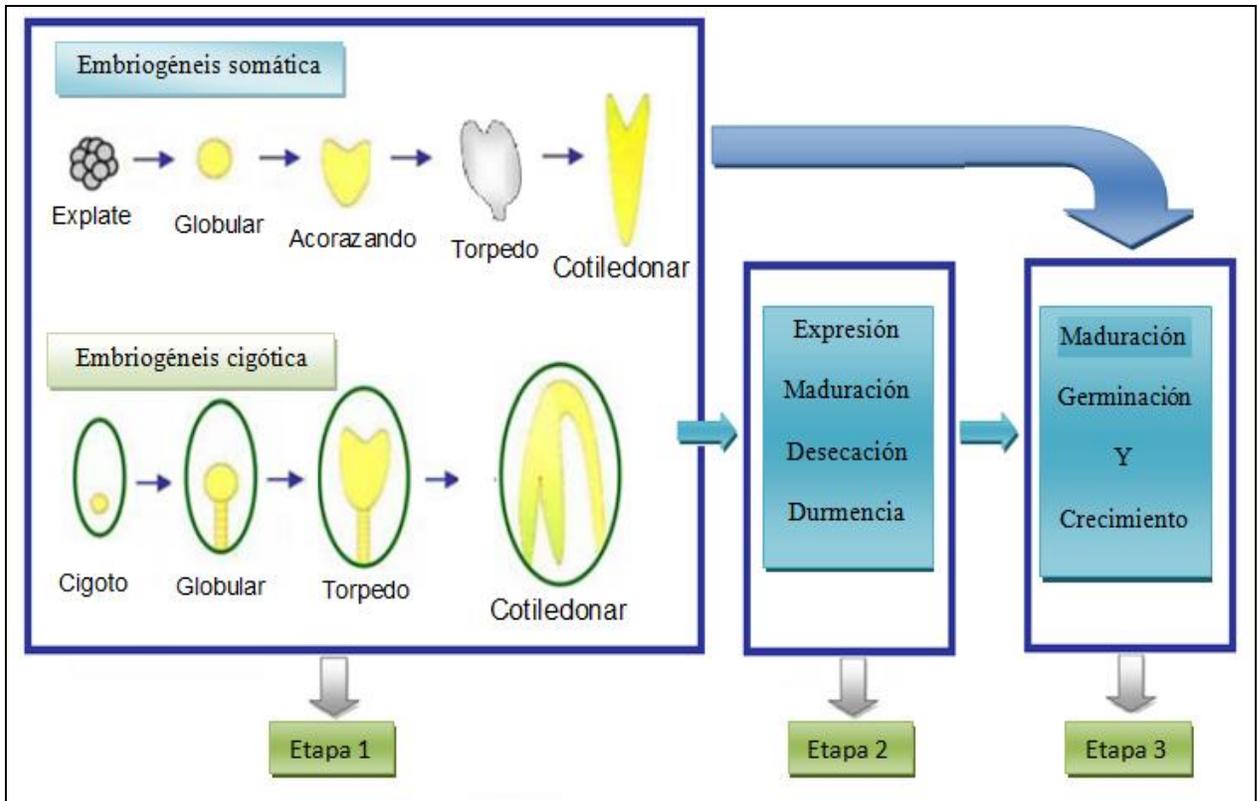


Figura 1.2 Etapas de la embriogénesis somática y cigótica (modificado de Silveira, 1999).

Para que ocurra la embriogénesis somática, se requiere que las células especializadas se encuentren separadas del tejido adyacente y que sea una célula simple. Además, se requiere que estén rodeadas de medio de cultivo que contenga los nutrientes necesarios para el crecimiento del embrión (Trigiano & Gray, 2000; Muñoz, 2003).

La embriogénesis somática se puede dar por dos vías: embriogénesis somática directa y embriogénesis somática indirecta (Figura 1.3). La vía directa, involucra la formación de los embriones somáticos en una parte del tejido sin la formación de callos o un mínimo de proliferación de este. Antes de formar los embriones todas o algunas de las células están predeterminadas como células

embriogénicas, por haber retenido alguna de las propiedades de las células meristemáticas parentales de las que derivaron embriones y semilla. Éstas se conocen como células embriogénicas predeterminadas (Halperin, 1995; Trigiano *et al.*, 2000).

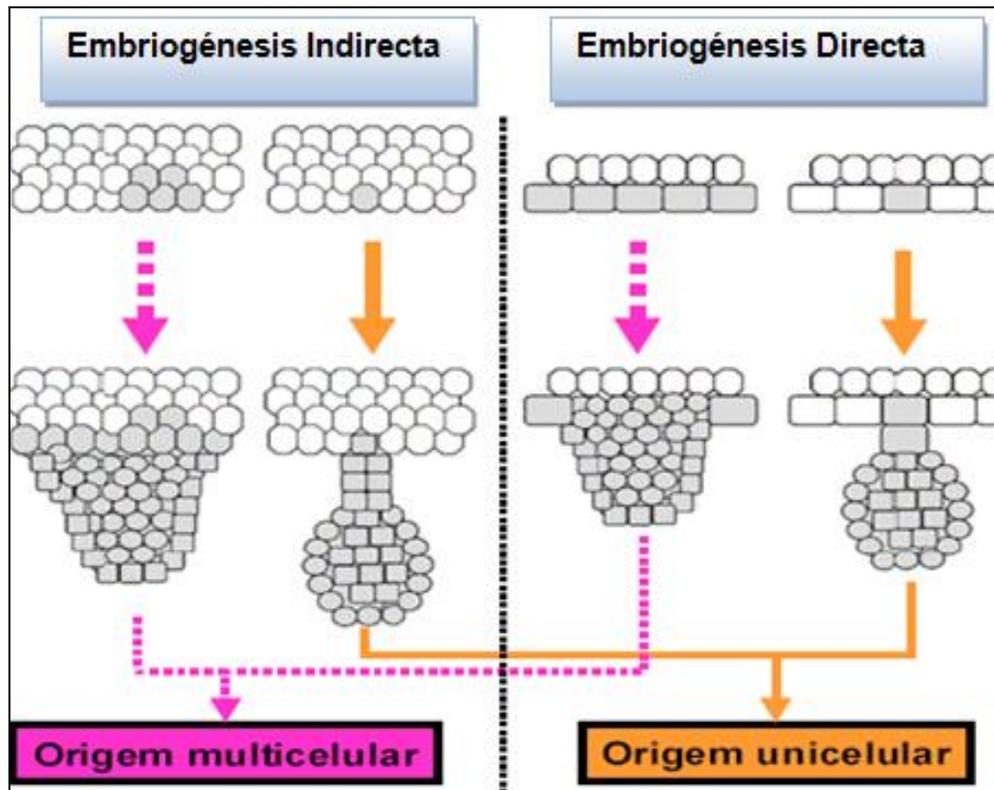


Figura 1.3 Tipos de embriogénesis somática (modificado de Silveira, 1999).

La vía indirecta requiere una fase intermedia de callo, formado por un conjunto de diferentes tipos de células no organizadas y que conservan la capacidad de dividirse. Las células tienen que llevar a cabo varias divisiones mitóticas inducido gracias a reguladores exógenos como auxinas, para dar lugar a la formación de estructuras proembrionarias. A continuación, para el desarrollo óptimo de los embriones somáticos se transfiere el tejido proembrionario a un medio libre de auxinas suplementado con fuentes extras de nitrógeno. El tejido del

cual proviene los embriones somáticos se denomina células embriogénicas determinadas inducidas (Halperin, 1995).

Existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta: una conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia y otra denominada embriogénesis somática de alta frecuencia. En la primera, el número de callos con embriones somáticos es mayor, aunque se forman pocos embriones somáticos por callo; estos embriones aparecen entre las 12 - 14 semanas de cultivo, aislados o en pequeños grupos y se desarrollan completamente pasando por los diferentes estadios de desarrollo. Mientras que en la segunda, aparecen entre las 16 - 20 semanas de cultivo, no se desarrollan completamente y se mantienen en estado globular, agrupados en un número mucho mayor y en un número menor de callos (Halperin, 1995).

1.4.3.1 Origen de los callos y sus tipos

Las células especializadas diferenciadas sufren una desdiferenciación que origina la formación de callos que poseen células con características totipotentes. Este proceso de desdiferenciación es caracterizado por cambios en la actividad metabólica, la disminución de productos de reserva y la rápida división celular lo cual con lleva a una no diferenciación de las células parenquimáticas. Al no poseer estructuras organizadas durante el cultivo de callo se crea una masa homogénea que esta formada principalmente por células parenquimáticas tanto esponjosas como empalizadas, donde se va a producir actividad meristemática la cual no tiene un patrón definido de iniciación (Evans, Coleman & Kearns, 2003).

En zonas del cambium se produce la diferenciación de regiones vasculares formándose y proliferando algunos centros de actividad meristemáticas los cuales son precursores de ápices como: raíz, primordios incipiente y embriones, que en un medio de cultivo adecuado son capaces de desarrollarse (Evans *et al.*, 2003).

El callo proporciona una gran cantidad de células totipotentes, de las cuales pueden regenerarse plantas enteras, ya sea a través de la organogénesis o embriogénesis somática (Evans *et al.*, 2003). Para realizar este tipo de cultivo es necesario lograr una buena masa de callos, esto se logra optimizando diferentes factores (físicos, químicos) que influyen en dicha inducción, como por ejemplo los reguladores del crecimiento. El callo se utiliza a menudo como el tejido diana para la transformación genética y la formación o regeneración de plantas, después de inducir la formación de otros tejidos, lo que se denomina organogénesis. La dispersión de callo friable en células individuales o grupos de células se utiliza universalmente como el método para iniciar los cultivos celulares en medios líquidos (Evans *et al.*, 2003), lo cual puede servir para realizar estudios fisiológicos, bioquímicos y producción de metabolitos secundarios de especies vegetales de interés.

La variación del callo en su aspecto general y en otras características físicas depende del tejido madre, la edad del callo y la condiciones de crecimiento a las que se mantenga. El callo puede variar en su coloración puede ser blanco o verde, esta última se debe a la presencia de un pigmento llamado antocianina. Además, el callo puede ser o no embriogénico, es decir, capaces de formar embriones ya sea de forma espontánea o cuando se encuentra en condiciones adecuadas. En gramíneas monocotiledoneas como el maíz, estas características se han utilizado para definir dos tipos de callo. Callo tipo I es considerado no friable generalmente se desarrolla a partir de hoja, genera embriones somáticos y

organogénesis. Callo tipo II es considerado friable tiene la característica de generar solo embriones somáticos y es el adecuado para el establecimiento de suspensiones celulares (Evans *et al.*, 2003).

1.4.3.2 Fases de la micropropagación por embriogénesis somática en condiciones *in vitro*

Para la regeneración de plantas a partir de la embriogénesis somática se debe seguir los siguientes pasos: Inducción de los embriones somáticos, desarrollo de los embriones somáticos, proliferación, maduración, germinación y conversión en plantas. Si bien este sistema de regeneración *in vitro* brinda procedimientos de propagación eficientes, también deberían garantizar la estabilidad genética de los individuos obtenidos respecto al material vegetal de origen (Medina, Faloci, Solis y Mroginski, 2003).

Fases 0: Selección del explante inicial

La respuesta embriogénica depende del genotipo de la especie vegetal que se este trabajando. Algunas especies responde de manera mas rápida al medio de cultivo, mientras que otras especies no pueden responder de la misma manera, debido a fitohormonas que se encuentran en los tejidos las cuales pueden interferir con las exógenas y crear inhibiciones a nivel fisiológico del tejido (Roca *et al.*, 1991).

El estado de desarrollo de la planta donadora influye en el crecimiento de estructuras embrionarias como por ejemplo, la utilización de tejidos muy jóvenes no permite que se desarrollen embriones a diferencia de tejido maduro como se evidencio en la especie vegetal *Hedera helix* la cual presentó un crecimiento de

estructuras embrionarias a partir de tejido viejo, pero esto no quiere decir que se comporte de igual manera para todas las especies vegetales.

Fases 1: Inducción del cultivo

En esta fase de la micropropagación es importante la activación de la expresión de los genes de la embriogénesis somática. El desarrollo del estado embriogénico incluye la inducción de los mismos mecanismos genéticos que conllevan la embriogénesis cigótica. Contrariamente a los embriones cigóticos los embriones somáticos no contienen un nuevo grupo de genes sino que poseen la misma combinación genética de la planta donadora o planta madre. El empleo de la auxina es la mejor manera de inducir la formación de células embriogénicas desde células somáticas (Muñoz, 2003).

Fases 2: Multiplicación del cultivo

La fase temprana o pre globular de los embriones somáticos son fácilmente reconocidos generalmente por el contenido de citoplasma denso y por no presentar vacuolas (Halperin, 1995).

Una de las características más sobresalientes de la embriogénesis somática es que permite su aplicación en la propagación masiva y la transferencia de genes, los cultivos proliferan se multiplican indefinidamente. El factor más fuerte asociado con la proliferación continua de las células embriogénicas es la auxina. Sin embargo, parece ser que el efecto de este regulador interactúa con la fuente de nitrógeno para la proliferación de estructuras embrionarias. Además, el nivel de auxina necesario para mantener la embriogénesis repetitiva varía de

acuerdo a la especie, incluso en algunas especies para que se desarrolle las células embrionarias a embriones inmaduros se debe eliminar o disminuir la concentración de auxina ya que son inhibitorias de este proceso (Halperin, 1995; Muñoz, 2003).

Fases 3: Maduración de los embriones somáticos

La maduración es el período en el que el embrión somático sufre expansión de sus células, y la acumulación de sustancias de reserva. En esta etapa juega un papel fundamental la presencia de nitrógeno en el medio de cultivo, siendo necesario el suplemento con nitratos de amonio, agua de coco, aminoácidos y caseína hidrolizada. Los carbohidratos entre ellos la sacarosa en concentraciones de 3-6% son esenciales, junto a bajas concentraciones de oxígeno en el medio, lo cual permite una maduración total y evita una germinación precoz (Muñoz, 2003).

Fases 4: Germinación y establecimiento ex vitro

En el desarrollo embrionario se hace una distinción entre la germinación de embriones y la transformación. La germinación es el proceso en que se limita a la formación de raíces y elongación, sin desarrollo inmediato en su conjunto de la plántula. En cambio la transformación es el proceso de diferenciación simultánea de raíces y retoños resultante en el desarrollo completo de las pequeñas plantas (Endress, 1994).

Una vez germinado el embrión somático en condiciones *in vitro* es transferido a condiciones de invernadero para que se produzca la transformación, donde la temperatura, humedad y foto período deben ser similares a las que se

mantenía en condiciones *in vitro*. El sustrato puede variar según la especie generalmente se usa cascarilla de arroz, fibra de coco, carbón vegetal o arena mezclado con tierra fértil o humus en una proporción de 1:1 dependiendo de las necesidades de la especie. Los primeros días se debe regar los embriones con un medio nutriente que puede ser M.S. a la mitad de su fuerza iónica, hasta observar que las plántulas se establezcan en el nuevo sustrato, además el medio de riego y los sustratos que se utilice deben ser estériles para evitar contaminación fúngica (Cañas, 1993).

1.4.3.3 Factores que afectan la embriogénesis somática

Material vegetal

No todas las especies tiene la capacidad de desarrollar embriogénesis somática de una manera fácil y eficiente ya que dependen de su genotipo y su capacidad de regeneración. Estas diferencias podrían reflejar la capacidad de activar los elementos claves para desatar la embriogénesis somática, lo cual varía entre las diferentes especies vegetales (Halperin, 1995).

El material vegetal generalmente empleado en la embriogénesis somática para especies leñosas son partes de plantas como cotiledones, hipocótilos, embriones cigóticos, e inflorescencias, ya que este tipo de tejido joven presenta mejores resultados en condiciones *in vitro* (Kärkönen, 2001). Se han empleado además ápices caulinares de segmentos de tallos, hojas, raíces y pecíolos para este proceso (Roca *et al.*, 1991).

Otro factor importante al elegir el explante es la edad fisiológica y ontogénica del órgano, ya que en las diferentes especies se ha visto que la utilización de explantes jóvenes ayuda a una buena obtención de embriones somáticos. Además es muy importante el tamaño del explante el cual va ser sembrado en el medio y las cualidades globales de la planta de la cual se ha obtenido el tejido (Muñoz, 2003).

Medio nutritivo

Es muy importante suplementar los medios de cultivo donde se va a sembrar el explante con los nutrientes necesarios para el buen desarrollo de las estructuras del tejido que garanticen una forma eficiente de micropropagación (Kärkönen, 2001).

En varias investigaciones realizadas se ha encontrado que los aminoácidos libres glutamina, asparagina y arginina tienen un papel regulador en la embriogénesis somática ya que esta fuente de nitrógeno orgánico es necesario en la etapa de la maduración embrionaria como sustancia de reserva (Kärkönen, 2001). Por lo tanto el nitrógeno es de vital importancia para la obtención de buenos embriones ya que existe gran actividad mitótica en estos procesos embriogénicos. El nitrógeno se lo suministra como nitrato o ion amonio de forma inorgánica y como orgánica a partir de glutamina, alanina, caseína hidrolizada y agua de coco (Roca *et al.*, 1991).

Estudios realizados en embriogénesis somática demuestran que en las etapas tempranas de desarrollo las células embrionarias carecen de nitrato reductasa haciendo muy difícil la reducción de nitratos a nitritos, por lo cual se ha venido utilizando fuentes de nitrógeno orgánico como los aminoácidos que son de

mas fácil absorción. La utilización de la Glutamina (1 mM), ácido glutámico (10 mM), alanina (1 mM) o la urea (3 mM) son compuestos que podrían sustituir en parte al amonio en el medio de inducción de embriones por su difícil reducción y la fuente de nitrógeno orgánico sería un mecanismo de emergencia para la toma de nitrógeno si la reducción del nitrato de amonio es deficiente (Kärkönen, 2001).

La presencia del hierro es también importante ya que se ha observado que en bajas concentraciones o en ausencia de este los embriones globulares no son capaces de desarrollarse hasta la madurez (Halperin, 1995).

El suministro de carbohidratos durante la maduración de los embriones somáticos parece ser importante tanto para la calidad y la cantidad de los embriones. La función principal de los carbohidratos es suministrar hidratos de carbono los cuales son fuente de energía necesaria para la alta actividad celular que ocurre en este proceso. La sacarosa es la fuente de carbono más usada para establecer cultivos *in vitro* para la mayoría de las especies vegetales (Kärkönen, 2001). Aunque existen buen resultado con fructosa y galactosa (Roca *et al.*, 1991).

Papel de los biorreguladores de crecimiento.

La aplicación de hormonas exógenas juega un papel importante en la obtención de clones organogénicos o embriogénicos. A menudo, las auxinas, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), indol-3-ácido acético (AIA), indol-3-butírico (IBA), naftaleno o ácido acético (NAA) se utilizan para reactivar el ciclo celular e iniciar la formación de los embriones somáticos (Kärkönen, 2001).

Las concentraciones de los reguladores de crecimiento en la etapa de inducción de la embriogénesis pueden inducir a la aparición de embriones secundarios, es decir originar un embrión a partir de otro embrión, proceso que podría continuar durante años (Halperin, 1995).

Así mismo las citoquinas contribuyen en la germinación de los embriones cigóticos ya que este regulador promueve o estimula la división celular. Al colocar citoquinas en la fase de maduración de los embriones somáticos genera un buen desarrollo de los mismos. Las citoquinas, como kinetina o benzilaminopurina (BAP), son útiles para iniciar la formación de embriones somáticos de algunas especies leñosas. Por lo general, se suministra combinado con auxinas en el medio de inducción para obtener un mejor desarrollo de la embriogénesis somática (Kärkönen, 2001).

La principal función de las citoquinas es regular las fases tempranas de desarrollo del embrión, además de ayudar en la germinación y el crecimiento de las plántulas. Sin embargo, concentraciones inadecuadas pueden causar cambios en el tejido y sensibilidad a niveles endógenos inhibiendo el crecimiento (Kärkönen, 2001).

El papel que desempeña el ABA en la embriogénesis somática *in vitro* es promover el desarrollo normal de los embriones somáticos mediante la estimulación y acumulación de sustancias de reserva lo cual reduce la germinación precoz y reduce la frecuencia de anomalías de los embriones (Roca *et al.*, 1991).

El ABA desempeña un papel osmótico en el medio basal el cual contribuye a un correcto almacenamiento de proteínas y carbohidratos de reserva que están involucradas en el desarrollo de los embriones somáticos. La utilización del ABA combinado con altas concentración de sacarosa proporciona un efecto favorable en la maduración de los embriones somáticos (Kärkönen, 2001).

Factores Físicos

Para la inducción de callo las condiciones de oscuridad son preferibles para su desarrollo ya que se usa 2,4-D que es un compuesto fotosensible. En cambio para el desarrollo de los embriones somáticos es esencial la alta intensidad lumínica con un foto período según los requerimientos de la especie en estudio (Roca *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 2004).

Se ha observado que el desarrollo de callos en medios semisólidos da como resultado niveles altos de embriones somáticos. Igualmente se demostró que la utilización de medios líquidos para el desarrollo de embriones somáticos tiene efectos muy beneficiosos y además la agitación debe ser suave para evitar anomalías en los embriones (Roca *et al.*, 1991).

En algunas ocasiones se han realizado pretratamientos con frío a los inóculos antes de la formación de callo, generalmente cuando se hacen cultivos a partir de anteras. Los embriones somáticos *in vitro* pueden requerir este tipo de tratamientos para la formación de plántulas (Martínez *et al.*, 2004). Un tratamiento de frío puede ser necesario para romper la dormición es el caso de la azucena que se ha observado que las plantas obtenidas necesitan mantenerse a

una temperatura entre 5 a 9 °C durante 4 a 6 semanas para obtener un buen crecimiento (Pierik, 1990).

La temperatura óptima de incubación o crecimiento para cada cultivo *in vitro* puede ser un proceso largo de determinar para cada especie, afortunadamente para la mayoría de especies mantenidas *in vitro* se puede obtener resultados satisfactorios con temperaturas de incubación de un rango de 20 y 28 °C (Pierik, 1990).

Se asume que las necesidades de luz en el cultivo *in vitro* son menores a las que la planta necesitaría en condiciones *in vivo*, ya que el medio cuenta con una fuente de carbono generalmente sacarosa, además los cultivos *in vitro* se comportan parcialmente de forma autótrofa por lo cual no necesitan irradiaciones altas. Las irradiaciones altas como las de campo acabarían con los cultivos *in vitro* por lo cual se recomienda irradiaciones mucho menores a las de campo (Kyte y Kleyn, 1996).

La cantidad de luz que se suministra por día a los explantes se la llama foto período en general el mejor será el de la región de donde se obtuvo el explante para el cultivo, por lo cual se debería mantener las mismas horas de luz en las condiciones *in vitro*. Ya que el foto período promueve el desarrollo de la germinación, floración, tuberización, etc. Es necesario tomar en cuenta que un exceso en la cantidad de la luz en los cultivos *in vitro* podría ocasionar un desarrollo inadecuado de la planta (Kyte *et al.*, 1996).

Un factor muy importante en la etapa de incubación o crecimiento de cultivos es la concentración de oxígeno presente en los recipientes de

crecimiento, recomendando concentraciones de oxígeno iguales o mayores a las del aire (Pierik, 1990).

1.4.3.4 Histología de la embriogénesis somática

La histología vegetal puede ser definida como el estudio de las estructuras microscópicas o caracterización de las células y su disposición en los tejidos y órganos vegetales. Para el análisis de estas estructuras se ha venido realizando cortes histológico muy delgados alrededor de 7 a 30 μm , para una mejor visualización (Trigiano *et al.*, 2000).

Existen dos tipos de embriogénesis somática la directa y la indirecta, las cuales pueden originarse a partir de una sola célula o de un grupo de estas. Una vez que sea producido la formación o el desarrollo de embriones somáticos estos van a sufrir las mismas transformaciones o pasar por las mismas fases, independientemente cual sea su origen unicelular o multicelular. La mayoría de las especies vegetales poseen las mismas características histológicas de las diferentes fases embrionarias como igual tiempo de formación, como se puede observar en la Figura 1.4 (Endress, 1994).

Horas de diferenciación	No. Células	Diámetro (mm)	Estructura anatómica	Nombre
0	1			Una célula
				Agregados proembrionario
140	420	0.2		Fase Globular
165	1100	0.5		Fase Corazón
195	2500	>1.0		Fase Torpedo

Figura 1.4 Fases de la embriogénesis somática diámetro de las estructuras de las diferentes fases, número de células que la forman las fases y tiempo que tarda en ocurrir cada fase, (modificado de Endress, 1994).

El establecimiento de la base del eje apical es un acontecimiento fundamental en la embriogénesis de las plantas. En las plantas dicotiledóneas el embrión, en las fases tempranas de la embriogénesis tiene una forma globular. El embrión maduro en cambio es de forma bilateral caracterizándose por tener una estructura simétrica a lo largo del eje apical-basal la cual tiene dos cotiledones.

El transporte de auxina en la fase globular es esencial para el establecimiento de la simetría bilateral durante el proceso de la embriogénesis. La inhibición del transporte polar de las auxinas da como resultado la formación de embriones con cotiledones fusionados, demostrando así la auxina esta relacionada en el proceso de cambio de estructura radial a la simetría bilateral (Kärkönen, 2001). La polaridad puede desempeñar un papel importante durante el

desarrollo de los embriones somáticos cuando estos se originan a partir de un grupo de células, así mismo cuando el origen es unicelular los patrones de polaridad van hacer establecidos muy temprano (Kärkönen, 2001).

Cada fase de la embriogénesis somática posee ciertas características importantes que pueden servir como marcadores histológicos para identificar expresiones génicas. El proembrión en la fase globular esta formado por un suspensor que se caracteriza por tener 8 células (Silveira, 1999), como se puede observar en la Figura 1.5

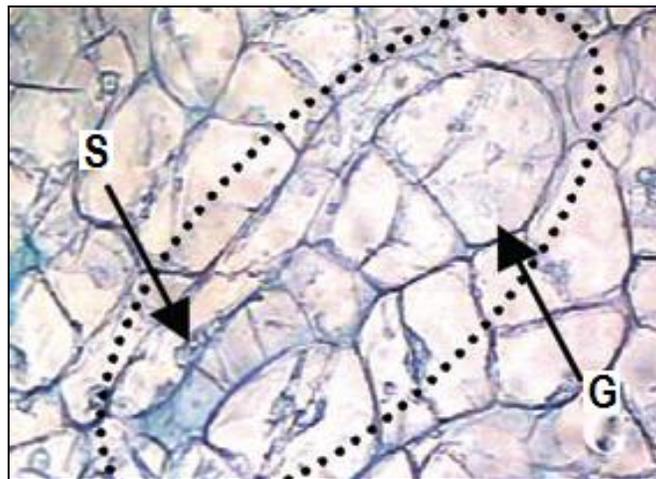


Figura 1.5 Formación de un embrión somático de origen unicelular (250 X). S – Suspensor, G – Estructura globular (Lara *et al.*, 2003).

La función principal del suspensor es mantener el contacto entre el embrión y el tejido madre. También puede apoyar al desarrollo temprano del embrión y a servir como un sitio para la síntesis de las hormonas vegetales como auxinas, citoquinas, ácido giberélico y ácido abscísico (ABA). El suspensor se desarrolla más rápidamente que el embrión, llegando a la madurez durante la fase globular y de torpedo. Al comienzo de la embriogénesis, el suspensor es generalmente

funcional, al servicio de nutrientes para el crecimiento del embrión, que a su vez inhibe el crecimiento de otras células que puedan formar otro suspensor. Las células del suspensor más tarde se vuelven inactivas para dar paso a la formación de la fase acorazonada y el desarrollo en si del embrión (Santanen, 2000).

Al aumentar las divisiones celulares la estructura comienza a tomar una forma acorazonada, a continuación sigue la división celular y empieza a formarse una estructura bipolar con un ápice radical, apicular y cotiledonar como se puede observar en la Figura 1.6. Al presentar bandas procambiales entre los ápices (Muñoz, 2003), esta fase toma el nombre de torpedo.

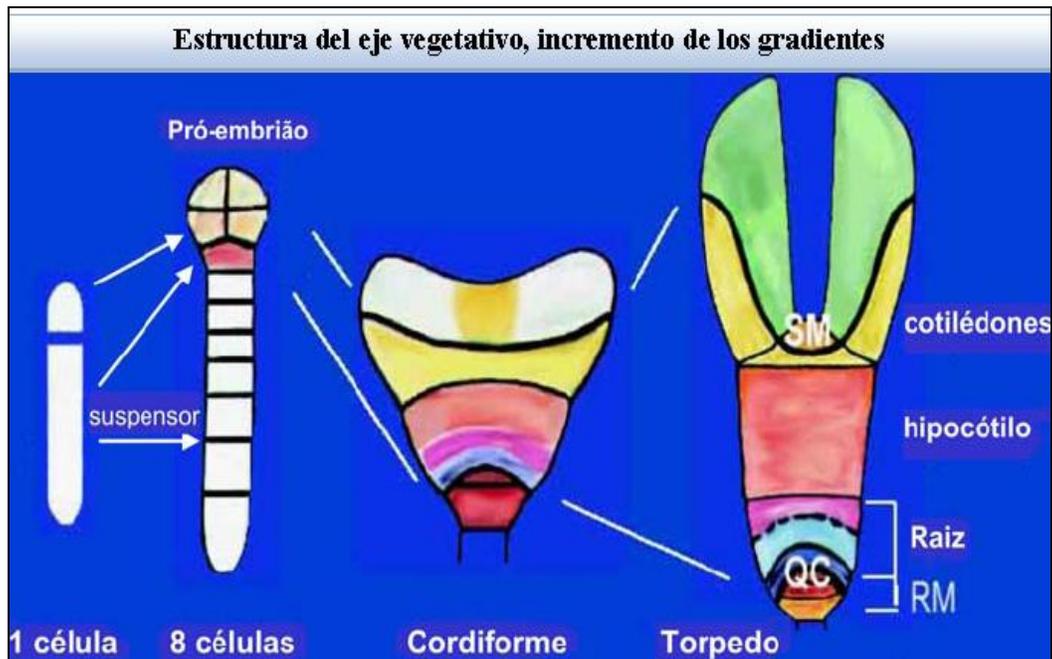


Figura 1.6 Estructuras del eje vegetativo de las diferentes fases de desarrollo de la embriogénesis somática, SM – meristemo caulinar, RM – meristemo radicular, QC – centro quiescente (modificado de Silveira, 1999).

Por último en la fase cotiledonar se puede identificar los cotilédones, meristemas caulinares, hipocótilo y meristemas radicales como se observa en la Figura 1.7

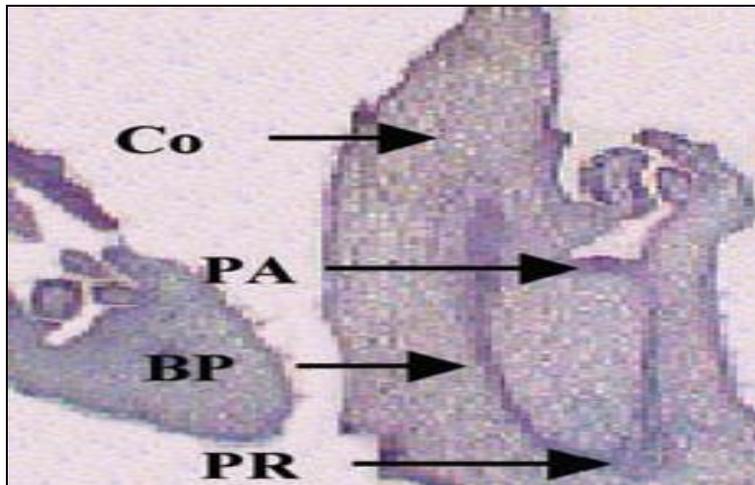


Figura 1.7 Embrión somático con sus polos apical (PA) y radical (PR), los cotiledones (Co), bandas procambiales (PB) observado a (100X) (Lara *et al.*, 2003).

1.4.4 Variación Somaclonal

Este fenómeno llamado variación somaclonal, se define como la variación fenotípica y genética de plantas propagadas clonalmente a partir de un individuo donador simple, muchas de estas modificaciones se presentan como mutaciones heredables a la progenie de las plantas cultivadas y generadas *in vitro* (Roca *et al.*, 1991; Medina, García, Caro & Aristizábal, 2007). Este fenómeno puede resultar beneficioso en cultivos de mejora como una fuente complementaria de la variación genética existente o puede ser perjudicial si lo que se desea es la regeneración del material vegetal asegurando su estabilidad genética (Carrasco, Ruiz & Ritter, 1998).

La variación somaclonal posee una tasa de 15% de ocurrencia de mutación espontánea, lo cual se evidenció en la progenie (Roca *et al.*, 1991). Las mutaciones generalmente aparecen con frecuencia en el cultivo de células,

protoplastos y callos, siendo el cultivo de callos extremadamente estable desde el punto de vista genético como se a podido evidenciar en la palmera del aceite (Pierik, 1990).

El origen de la variación somaclonal no es claro además puede variar según la especie vegetal, este fenómeno puede ocurrir por varios eventos genéticos los cuales son: reordenamiento cromosómico o cambios en el cariotipo, entrecruzamiento (crossing over) somático, intercambio de cromátidas hermanas, a una alteración de los nucleótidos por metilación, defectuosa replicación del ADN a causa de defectos en nucleótidos, traslocaciones, deleciones, inversiones, modificaciones en los cromosomas, elementos trasponibles o también a la activación o silenciamiento de genes por mutaciones en regiones no codificadas (Roca *et al.*, 1991; Carrasco *et al.*, 1998).

Como ya se mencionó anteriormente el origen de este fenómeno es un tanto incierto pero estudios demuestran que la variación somaclonal puede ocurrir por dos caminos: uno genético y el otro epigenético (Evans *et al.*, 2003).

1.4.4.1 Variabilidad genética

Varios mecanismos moleculares son implicados o los responsables de causar la variación genética: cambios en la ploidía, cambios en la estructura del ADN y rearreglos quiméricos de los tejidos (Evans *et al.*, 2003).

Cambios en la ploidía: Uno de los cambios más típicos que ocurre en la variación somaclonal es el cambio del número de cromosomas los cuales son, aneuploidía, poliploidía o mixoploidía. Los cambios en la ploidía se origina de

anormalidades que ocurren en la mitosis, por ejemplo la duplicación cromosómica durante la interfase lo que ocasiona problemas en la división normal de la célula (Evans *et al.*, 2003). Los cultivos que permanecen mucho tiempo en condiciones *in vitro* tienden a aumentar la inestabilidad cromosómica y la utilización de biorreguladores de crecimiento como las auxinas 2,4-D y ANA pueden causar problemas en la ploidía de la planta (Pierik, 1990).

Cambios en la estructura del ADN: Los cambios en la estructura del ADN están considerados como los fenómenos que más frecuentemente se encuentran en la variación somaclonal. Los cambios pueden modificar largas regiones de los cromosomas lo cual puede afectar aun sólo un gen o varios al mismo tiempo. La activación de transposones pueden causar variación somaclonal causando interrupciones a lo largo de las cadenas del ADN, además pueden ocurrir mutaciones puntuales que resultan del cambio de bases o metilación lo cual conlleva a la inactivación de genes (Evans *et al.*, 2003). Además, las cadenas de ADN pueden sufrir los siguientes cambios: deleciones pérdida de genes, inversiones alteración en el orden genético, duplicación de genes y translocaciones segmentos de cromosomas transferidos a nuevas posiciones.

Rearreglos quiméricos de los tejidos: Muchas plantas hortícolas son quiméricas, es decir, la composición genética de las células meristemáticas en cada capa es diferente. Estas capas pueden ser reorganizadas durante una rápida proliferación celular, por lo tanto en condiciones *in vitro* las plantas regeneradas pueden contener una composición quimérica o no, lo que puede llevar a una variación somaclonal (Evans *et al.*, 2003).

1.4.4.2 Variabilidad epigenética

La variación somaclonal también puede presentarse como una variación epigenética como resultado de un cambio en la expresión de los genes. Este tipo de variación es reversible y no hereditaria (Pierik, 1990).

Gracias a cultivos de meristemos existe la posibilidad de obtener plantas libres de virus, debido a esto las plantas que poseen el virus pueden ser diferentes en aspecto a las que si las tienen (Pierik, 1990). Debido a reguladores de crecimiento como auxinas o citoquinas se puede obtener plántulas con un elevado número de ramificaciones, fasciación, engrosamiento, etc. Por lo que estos cambios no sugieren mutaciones aunque tengan la apariencia. Como las plantas presentan enfermedades fisiológicas como vitrificación (Pierik, 1990). También se puede evidenciar cambios en las estructuras de los estomas o en la composición de las ceras cuticulares, debido a las condiciones *in vitro* que se mantiene a los explantes. También puede ocurrir o aparecer fenotipos con características morfológicas diferentes del tejido inicial, los cuales pueden presentar vástagos generativos o vegetativos los cuales pueden desarrollar características juveniles o de adultas (Pierik, 1990).

1.4.4.3 Mejoramiento de plantas mediante la variación somaclonal

La variación somaclonal es un fenómeno que puede contribuir para obtener nuevas características genéticas en aquellas especies vegetales que muestran poca variación de forma natural o que en las variaciones son difíciles o imposibles de inducir. Pero hay que tener en cuenta que la frecuencia de poliploides y aneuploides debe ser mantenida tan baja como sea posible, si se quiere recurrir a la variación somaclonal como herramienta de variación (Roca *et al.*, 1991).

Las variaciones somaclonales pueden brindar características genéticas beneficiosas durante el cultivo *in vitro* se han identificado algunas variaciones útiles como: resistencia a enfermedades y herbicidas, además a la tolerancia al estrés químico o ambiental (Roca *et al.*, 1991; Carrasco *et al.*, 1998). En cultivos de papas se ha observado que mediante el cultivo de explantes de tallos y hojas se ha producido variaciones útiles en lo que se refiere a producción, persistiendo tales variaciones somaclonales durante al menos tres generaciones (Carrasco *et al.*, 1998).

1.4.4.4 Variación somaclonal en la embriogénesis somática

En la embriogénesis somática puede existir una variabilidad genética que se manifiesta debido a la desdiferenciación celular en los cultivos *in vitro*. Como ya se mencionó la variación somaclonal puede ser aprovechada para el mejoramiento de plantas de interés; sin embargo, si el principal objetivo es la propagación clonal *in vitro*, este tipo de variación es un fenómeno no deseado (Medina *et al.*, 2007). Cuando se origina vástagos adventicios, a partir de tejido calloso en gramíneas, existe una mayor probabilidad de variación somaclonal, por lo que es recomendable no replicar o mantener periodos de tiempo largo este tipo de cultivos (Pierik, 1990).

Aquellas plantas que poseen ciclos de vida largos, el fenómeno de variación somaclonal constituye una desventaja para la micropropagación, ya que las mutaciones pueden ser detectadas tardíamente. Durante los estadios de desarrollo del árbol inclusive se pueden presentar en su descendencia. Por lo cual es muy importante implementar o desarrollar métodos moleculares mediante los cuales las plantas o embriones somáticos puedan ser rápidamente evaluados,

mediante el empleo de marcadores moleculares AFLP (Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos Amplificados), para detectar cambios genéticos derivados del cultivo *in vitro* (García, Martínez & Conci, 2005; Medina *et al.*, 2007).

1.5 Hipótesis

Para el establecimiento del cultivo *in vitro* de *Jatropha curcas* los tratamientos evaluados en las fases de desinfección, inducción de callo, proliferación y maduración de los embriones no tendrán diferencias significativas.