



Centro de Investigación y de Estudios Avanzados  
del Instituto Politécnico Nacional

Unidad Zacatenco

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

**“Análisis de la expresión de genes de *Jatropha curcas* involucrados  
en la respuesta regenerativa en cultivos *in vitro*”**

TESIS

Que presenta:

Juan José Torres Ruíz

Para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias en la Especialidad de Biotecnología**

Directora de Tesis:

Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia

Ciudad de México

Agosto 2023

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia.

## **Agradecimientos**

A la **Dra. Ana Carmela Ramos Valdivia** por el conocimiento, impulso y apoyo que recibí en todo mi periodo de estudiante en su laboratorio, por todo el tiempo y dedicación que invirtió en mí formación. Gracias Dra. Ana por su paciencia y entrega, quedaré marcado por siempre y espero de todo corazón que sigamos colaborando porque sus estándares siempre exigieron lo mejor de mí.

A la **Dra. Estela Sandoval Zapotitla** del Jardín Botánico de la Universidad Nacional Autónoma de México por su asesoría técnica y teórica en el análisis histológico de los cultivos regenerantes de *Jatropha*. Sin su invaluable apoyo y motivación este trabajo no estaría completo.

A mi comité tutorial **Dra. María Teresa Ponce Noyola** y **Dra. Adriana Garay Arroyo** por sus grandes aportes durante mis evaluaciones tutoriales. Su escrutinio refleja la gran calidad de su trabajo y de las instituciones que las respaldan.

Al **Dr. Edgar Baldemar Sepúlveda García** por sus clases, su paciencia y su tiempo. Gran parte del trabajo en el área de biología molecular está soportado por todo el conocimiento que me transmitió y por los escenarios que planteó. Gracias por tanto, perdón por tan poco.

A la **Dra. Leticia Buendía González** de la Universidad Autónoma del Estado de México quien me formó como biotecnólogo. El conocimiento que obtuve de usted durante toda mi licenciatura me mantuvo a flote en los momentos más exigentes de mi posgrado. Sepa que valoro mucho su amistad y trabajaré por conservarla, el cariño y respeto que me inspira son incomparables.

A **Etni, Gustavo, y Elena** por adoptarme. Amigos míos, yo los amo con toda la fuerza que une a la familia que se elige. He aprendido mucho de ustedes y lucharé por retribuir todos sus aportes a mi vida. Son el mal ejemplo que siempre seguiré. Espero que me acompañen durante el siguiente proceso, el doctorado en medicina veterinaria con énfasis en marsupiales.

A **Harley y Dobas** por su compañía única. Desde la primera tesis me acompañaron en calma y me distraían cuando lo necesitaba. Les ruego que me perdonen por todos esos juegos que no jugamos, esos paseos que no dimos, esas caricias que no les di. Harlita, eres un amor, tan calmada y obediente, gracias por tus apapachos. Dobas, eres la más inteligente y enérgica que conozco, gracias por transmitirme tus ganas y energía.

Agradezco CINESTAV-IPN Zacatenco por el apoyo y al personal académico y administrativo del Departamento de Biotecnología.

Al CONACYT por otorgarme la beca Nacional para Estudios de Posgrado con número de beca 721621 para realizar la Maestría en Ciencias con Especialidad en Biotecnología en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.

## **Dedicatoria**

*A mi hermana Alondra por su recuerdo imborrable*

*A mi madre Verónica por su amor infinito*

*A mi padre Juan Carlos por su apoyo incondicional*

La libertad y confianza que me otorgaron para perseguir mis objetivos desde niño, aunadas a la fortaleza que me transmiten me han traído hasta este punto de mi vida donde me siento muy agradecido por todo lo que tengo, incluyéndolos por supuesto. Los amo.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS .....	11
RESUMEN .....	12
ABSTRACT .....	13
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
2.1 <i>JATROPHA CURCAS</i> .....	15
2.2 RELEVANCIA DE <i>JATROPHA CURCAS</i> : PRODUCCIÓN Y UTILIDAD. ....	17
2.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA .....	18
2.4 PROBLEMAS EN EL CULTIVO Y EN LA PRODUCTIVIDAD DE LAS PLANTAS DE <i>JATROPHA</i> ...	19
2.5 MEJORAMIENTO .....	20
2.6 REGENERACIÓN EN SISTEMAS VEGETALES .....	22
2.6.1 <i>Organogénesis de novo (ODN)</i> .....	25
2.6.1.1 Genes involucrados en la ODN .....	27
2.6.2 <i>Embriogénesis somática (ES)</i> .....	30
2.6.2.1 Genes involucrados en la ES.....	31
2.7 REGENERACIÓN IN VITRO DE <i>JATROPHA CURCAS</i> .....	33
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
4.1 GENERAL .....	36
4.2 ESPECÍFICOS .....	36
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
5.1 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE PLÁNTULAS DE <i>JATROPHA CURCAS</i> .....	37
5.1.1 <i>Inducción de la ODN y ES</i> .....	38
5.1.1.1 Primer ensayo .....	38
5.1.1.2 Segundo ensayo .....	39
5.2 ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE ESTRUCTURAS REGENERADAS .....	41

5.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON ODN Y ES.....	43
5.3.1 <i>Análisis in silico y diseño de oligonucleótidos</i> .....	43
5.3.2 <i>Extracción de RNA total y síntesis de cDNA</i> .....	45
5.3.3 <i>Determinación de los niveles de expresión de JcPLT3, JcWUS, y JcAGL15</i>	47
5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	48
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
6.1 RESPUESTA DE LOS EXPLANTES A LOS MEDIOS DE INDUCCIÓN DE CALLO (MIC). .....	48
6.1.1 <i>Inducción de ODN</i> .....	49
6.2 ALTERACIONES HISTOLÓGICAS DURANTE LA REGENERACIÓN VÍA ODN Y ES.....	58
6.2.1 <i>Histología de la regeneración en cotiledones vía DNSO</i> .....	58
6.2.2 <i>Histología de la regeneración en cotiledones vía ES</i> .....	62
6.3 EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA ODN Y ES .....	67
6.3.1 <i>Especificidad de oligonucleótidos</i> .....	69
6.3.3 <i>Niveles de expresión relativa de JcPLT3, JcWUS, y JcAGL15 durante los procesos de regeneración.</i> .....	72
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>85</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>86</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>97</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Características y distribución de *Jatropha curcas*. A. Árbol de *Jatropha* de aproximadamente 5m de alto. Es una planta que crece en casi cualquier tipo de terreno incluso en terrenos arenosos o pedregosos; las hojas que caen de la *Jatropha* enriquecen el suelo haciéndolo todavía más fértil y es capaz de resistir a las bajas temperaturas. Requiere muy poca agua y resiste periodos largos de sequía deshojándose para reducir la transpiración. (Modificada de NaturaLista.mx) B. Distribución de *Jatropha curcas* alrededor del mundo. Nativa de América Central, fue difundida por Asia y África por comerciantes portugueses como planta para cercar y hoy en día se ha expandido por el mundo entero debido a su gran facilidad para adaptarse a situaciones adversas, tierras degradadas, y clima seco (Modificada de Discovery Life).

..... 16

**Figura 2** Regeneración de plantas *in vitro*. Las células que conforman los explantes comienzan un proceso de desdiferenciación derivado de las señales inducidas por herida y por los RCV presentes en el medio de cultivo inductor de callo. En dependencia del tipo de RCV presentes en el medio regenerante, las células desdiferenciadas iniciarán un proceso de reprogramación donde comenzarán a adquirir las competencias necesarias para formar progenitores que posteriormente se desarrollarán en brotes mediante organogénesis de novo (ODN) o bien en embriones completos mediante embriogénesis somática (ES). .....

**Figura 3** Progresión molecular del proceso de organogénesis de novo. La escisión del explante y su posterior exposición a un medio de cultivo rico en auxinas desencadena vías de señalización que resultan en la activación de CUC1 y 2 mediada por PLT3 y ESR1 lo cual resulta en la formación de callo competente para la organogénesis de novo. La formación de promeristemos y su desarrollo posterior es consecuencia de la exposición de los callos competentes a un medio rico en citocininas que desencadena la vía de señalización que activa y sobreexpresa a WUS. ....

**Figura 4** Vía de regeneración por embriogénesis somática. Cuando el explante es expuesto a un medio rico en auxinas y posteriormente se elimina del medio de cultivo, se inician los procesos moleculares que desencadenan la formación de callos embriogénicos, donde la activación de un circuito de retroalimentación positiva entre LEC1, LEC2, AGL15 y BBM juega un papel fundamental para la formación de embriones somáticos puesto que activa una vía de síntesis de auxinas necesarias para establecer dominios de baja concentración de auxinas donde se expresará WUS y mediará la formación del meristemo apical de brote. ....

**Figura 5** Respuestas de los diferentes explantes de *J. curcas* empleados para la inducción de la regeneración. En A se observa la respuesta del cotiledon tras 21 días de cultivo, en B la de hipocotilo y en C la respuesta de la raíz. La formación de callo es mayormente evidente en las zonas de corte para todos los tratamientos probados. En D

se muestra la evolución del callo generado a partir de cotiledón en E la del hipocótilo y en F la del callo de raíz, todas tras 28 días de cultivo. Los callos se expandieron abarcando toda la superficie del explante excepto en la raíz donde se limita a los sitios de corte, se caracterizaron por ser compactos pero friables. En G se muestra la respuesta de los callos generados a partir de cotiledon ante el cambio de medio de cultivo suplementado con 2,4-D, en H la respuesta del callo de hipocotilo y en I la del callo de raíz ante el mismo cambio. Los callos se volvieron compactos y presentaron niveles importantes de oxidación especialmente los generados a partir de raíz..... 50

**Figura 6.** Respuesta de los cotiledones a los tratamientos TIB1, TIB2, TIE1 y TIE2. En A se muestra el explante de *Jatropha* tras 7d de incubación en TIB1, en B después de 14d en C a los 28d y en D tras 42d donde es posible distinguir los brotes regenerados en fase de dos hojas aunque en este punto también se encontraron estructuras en fases más tempranas de la regeneración. .E muestra la respuesta del explante al tratamiento TIB2 después de 7d de incubación, en F se observa tras 14d y se distingue mayor proliferación de callo que en el caso de TIB1 durante el mismo periodo, en G se muestra la gran capacidad de proliferación del callo después de 28d y en H se muestra que TIB2 no fue capaz de regenerar brotes puesto que no se hallaron primordios o algún otro tipo de estructura. En I se muestra el explante incubado 7d en TIE1, aunueq hay señales de que el explante está repondiendo al tratamiento, evidenciado por la formación de protuberancias, aún no forma callo. En J, tras 14d de cultivo en TIE1, el explante ya muestra formación de callo tras 14d de cultivo. Las características de este callo formado son más evidentes en K donde despues de 28d ha proliferado y tiene textura cremosa y ausencia de pigmentación. En L se hace evidente que a pesar de sus carcaterísticas embriogénicas, el callo generado en TIE1 no regenera embriones pues no hay estructuras que indiquen lo contrario. En M y N se muestran la respuesta del explante al tratamiento TIE2 a los 7d y 14d respectivamente. El desarrollo del callo es muy similar al obserbado en TIE1 aunque las respuestas del explante son más evidentes. En Ñ se observa el callo generado en TIE2 tras 28d con textura cremosa y con presencia de pigmentos morados que probablemente sean antocianinas. En O se distinguen estructuras esféricas similares a un domo que se clasificaron como masas proembriogénicas dadas sus características compatibles con las descripciones realizadas en otros trabajos (Nindita et. Al. 2014)..... 52

**Figura 7** Caracterización anatómica de la organogénesis de novo de brotes de *Jatropha curcas* a partir de cotiledones. Todos los cortes son longitudinales, solo se muestra el lado adaxial de los explantes (extremo que no estaba en contacto con el medio de cultivo) **A.** Organización histológica del callo primario. Las células subepidérmicas readquirieron la capacidad de división y comienzan la formación de una masa de células indiferenciadas delimitadas por el recuadro. **B.** Callo primario compuesto por células con citoplasma denso característica que señala la capacidad de regeneración. **C.** Tras 14 días de incubación en CIM se observó la formación de meristemoides con evidente

vascularización que se señala en **D** con puntas de flechas negras. **E**. Células iniciales con capacidad de formación de brote aparecen tras 28 días de cultivo, señaladas por el recuadro negro. **F**. Primordio de brote (pb) que se originó a partir de las células iniciales. **G**. Brote de *J. curcas* con 42 días de cultivo (b), en **H** se observa la sección central del brote señalada con puntas de flecha negras sin detectar conexión vascular entre el explante y el primordio..... 61

**Figura 8.** Caracterización anatómica de la embriogénesis somática de masas proembriogénicas de *Jatropha curcas* a partir de cotiledones. Todos los cortes son longitudinales, solo se muestra el lado adaxial de los explantes (extremo que no estaba en contacto con el medio de cultivo). **A**. Histología del explante inicial de *Jatropha* donde se observa una protuberancia formada por células con forma isodiamétrica, y núcleo grande señalado por puntas de flecha negras. **B**. Las células de la subepidermis de las protuberancias señaladas en el recuadro mostraron planos de división mezclados, en **C** se señalan divisiones anticlinales y periclinales. **D y E**. Tras 14 días de cultivo las células de las protuberancias se expandieron y formaron estructuras similares a los meristemoides observados en DNSO. **F**. El citoplasma de las células que conforman los meristemoides se tornó denso y el núcleo se hizo muy evidente. En **G** es posible observar que no hay formación de tejido vascular. **H**. Las estructuras proembriogénicas se componen de células que contienen gránulos en su citoplasma (puntas de flecha), hecho que indica su competencia meristemática..... 65

**Figura 9.** Curva melting de productos de qPCR de los genes evaluados en eje embrionario maduro de *Jatropha curcas*. En cada curva se muestran 6 líneas que corresponden a las diferentes temperaturas de añineamiento evaluadas para la optimización de las condiciones de reacción para cada gen. JcWUS, JcPLT3, JcEF1a y JcAGL15 muestran picos delgados a temperaturas superiores a 75° C en todas las temperaturas probadas lo cual es deseable ya que es indicativo de la especificidad de los oligonucleótidos y aunque la altura de los picos varía dentro de las mismas muestras solo es indicativo de la cantidad de copias del amplicón. En JcRKD4 y JcESR1 se observan curvas melting con picos anchos a temperaturas menores a 75 °C y con algunos hombros, lo cual indica que posiblemente la presencia de más de un amplicón y por lo tanto que los oligonucleótidos son inespecíficos. .... 70

**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de qPCR. La flecha roja señala la banda del marcador de peso molecular correspondiente a 200 pb. En A se muestran los productos de la amplificación en muestras del tejido control (eje embrionario). En la parte inferior del gel se indican los genes que se amplificaron. El tamaño de los amplicones esperado para JcESR1 es de 168 pb, para JcPLT3 149 pb, JcWUS 144 pb, JcRKD4 185 pb, JcAGL15 167 pb y para JcEF1a 199 pb. Las bandas de los amplicones de JcESR1, JcAGL15 y JcRKD4 no corresponden al peso esperado ya que en los tres casos la banda se observa por debajo de las 100 pb. En B se muestran los resultados de la amplificación de JcESR1, JcAGL15 y JcRKD4 con nuevos oligonucleótidos diseñados bajo los mismos

parámetros que los empleados para el resto de los genes de interés, pero en una zona diferente de la secuencia codificante. Solo se encontraron resultados favorables en el caso de JcAGL15 con los nuevos oligonucleótidos (reportados en la tabla 7) cuyo producto se esperaba del mismo tamaño que el predicho con los primeros oligonucleótidos diseñados (no reportados), 167 pb. .... 71

**Figura 11.** Expresión de JcPLT3, JcWUS, y JcAGL15. A. Niveles de expresión relativa en tejidos regenerados de *Jatropha curcas* vía organogénesis de novo y embriogénesis somática. En negro se muestran los niveles de expresión de los genes evaluados en tejidos cultivados en medio Murashige y Skoog (MS), en gris los evaluados en el tratamiento que presentó los mejores resultados en la inducción de la organogénesis de novo TIB1 y en blanco los de TIE2 que indujo embriogénesis somática. La expresión de todos los genes de interés se evaluó en eje embrionario (EE) siendo empleado como tejido de referencia. B. Cambios en el nivel de expresión de los genes involucrados en la regeneración de *J. curcas* respecto del inicio del inicio del tratamiento de inducción. La línea negra representa las determinaciones hechas a partir de tejido cultivado en medio MS, la línea gris en medio inductor de organogénesis de novo TIB1 y la línea punteada en medio inductor de embriogénesis somática TIE2. .... 74

**Figura 12.** Representación esquemática que resume las respuestas morfológicas, histológicas y moleculares obtenidas en *Jatropha curcas* bajo las condiciones de cultivo *in vitro* evaluadas durante el desarrollo del presente trabajo. Demostramos que los explantes obtenidos de cotiledones muestran la mejor respuesta regenerativa en *Jatropha curcas* variedad mexicana no tóxica vía organogénesis de novo y también vía embriogénesis somática. El hipocótilo presentan una buena capacidad de generación de callo sin embargo este no muestra las características descritas por diferentes autores para considerarse como competente para la regeneración de tejido. El uso de BA en combinación con IBA en baja concentración resultó efectivo en la inducción de organogénesis de novo logrando regenerar hasta 12 brotes por explante de *Jatropha* empleado. Por otro lado, el 2,4-D fue suficiente para inducir embriogénesis somática en cotiledones de *Jatropha*, pero la remoción del regulador de crecimiento vegetal es necesaria después de 28 días de incubación para que se dé la formación de masas proembriogénicas. Dado que el genotipo de *Jatropha* es un factor muy relevante en el establecimiento de un protocolo de regeneración, las condiciones de cultivo establecidas en este estudio representan un avance significativo en la superación de las limitaciones que presenta esta planta de interés biotecnológico ante la explotación de su potencial. .... 83

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Combinaciones de RCV reportadas en la literatura para la inducción de callo regenerativo en explantes de J. curcas, que fueron empleadas durante el primer ensayo.</i>	39
<b>Tabla 2.</b> <i>Combinaciones de RCV para la inducción de callo en condiciones iniciales de oscuridad (segundo ensayo) a partir de explantes de Jatropha. CIM: medio inductor de callo, SIM: medio inductor de brote, EIM: medio inductor de embriones</i>	40
<b>Tabla 3.</b> <i>Genes de interés de Arabidopsis en la base de datos TAIR. Se presentan además de los nombres de los genes, los dominios característicos de las proteínas que son relevantes en la función que ejecutan.</i>	44
<b>Tabla 4</b> <i>Efecto de los tratamientos de inducción de callo en el porcentaje de respuesta de los explantes evaluados después de 24 días de exposición</i>	51
<b>Tabla 5.</b> <i>Efecto de los tratamientos de inducción de ODN y ES en el porcentaje de respuesta de los explantes evaluados y número de estructuras regenerantes generadas después de 42 días de exposición.</i>	51
<b>Tabla 6.</b> <i>Análisis in silico de las secuencias de interés. Se muestran las accesiones de las secuencias recuperadas a partir de los alineamientos hechos de acuerdo con la sección 5.3.1 así como los dominios conservados en las secuencias de Jatropha vs Arabidopsis.</i>	66
<b>Tabla 7</b> <i>Secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de RT-qPCR. En el anexo se reportan las secuencias completas de los genes analizados, así como las zonas elegidas para el diseño de los oligonucleótidos.</i>	69

## RESUMEN

*Jatropha curcas* es una especie de importancia económica dado su potencial aplicación en la generación de biocombustible. El cultivo tradicional de *Jatropha* ha presentado retos que limitan su explotación, por ejemplo, el alto número de flores masculinas respecto de las femeninas, lo cual afecta la producción de semillas y la propagación. El cultivo de tejidos vegetales ofrece herramientas útiles para superar las limitaciones de propagación y producción de semillas de *Jatropha* ya que se ha logrado cultivar *in vitro* con éxito relativo. Es de destacar que en los reportes existentes del cultivo *in vitro* de *Jatropha* se emplean variedades asiáticas que se distinguen de las mexicanas por su contenido de sustancias tóxicas, por tener una menor producción de los aceites con aplicación biotecnológica y porque las variedades no tóxicas de *Jatropha* resultan ser menos responsivas a los tratamientos de regeneración. En el presente trabajo, establecimos las condiciones de cultivo que permitieron regenerar tejido de una variedad mexicana de *Jatropha curcas* con genotipo no tóxico, analizamos histológicamente las estructuras regeneradas y la expresión de genes clave del proceso de regeneración. Los cotiledones fueron los explantes que mejor respondieron a los tratamientos inductores de organogénesis de novo y de embriogénesis somática. La combinación de BA e IBA en concentración de 1.5 y 0.05 mg/L respectivamente logró los mejores porcentajes de inducción de brotes mientras que 0.8 mg/L de 2,4-D durante 24 días y su posterior remoción indujo con éxito la embriogénesis somática. Los estudios histológicos revelaron que tan pronto como 7 días después de que los explantes son inoculados en los tratamientos inductores, estos forman las primeras estructuras regenerantes a partir de células epidérmicas y subepidérmicas, al tiempo que se observa la sobreexpresión de PLT3 tanto en brotes como en embriones, mientras que otros reguladores clave de la regeneración, WUS y AGL15 se sobreexpresan en etapas tardías del proceso. Los resultados presentados aquí contribuirán al avance del entendimiento de la regeneración en *Jatropha*, así como al aprovechamiento de su potencial biotecnológico.

## ABSTRACT

*Jatropha curcas* is a species of economic importance due to its potential application in biofuel generation. Traditional cultivation of *Jatropha* has faced challenges that limit its exploitation, such as the high number of male flowers compared to female ones, which affects seed production and propagation. Plant tissue culture offers useful tools to overcome these limitations in *Jatropha* propagation and seed production, as it has been successfully cultivated in vitro with relative success. It is worth noting that existing reports on in vitro cultivation of *Jatropha* use Asian varieties that differ from the Mexican ones in their content of toxic substances, lower oil production with biotechnological applications, and the fact that non-toxic *Jatropha* varieties are less responsive to regeneration treatments.

In this study, we established the cultivation conditions that allowed for the regeneration of tissue from a non-toxic Mexican variety of *Jatropha curcas*. We conducted histological analyses of the regenerated structures and the expression of key genes involved in the regeneration process. Cotyledons were the explants that showed the best response to the inducing treatments for de novo organogenesis and somatic embryogenesis. The combination of BA and IBA at concentrations of 1.5 and 0.05 mg/L, respectively, achieved the highest percentages of shoot induction, while 0.8 mg/L of 2,4-D for 24 days and subsequent removal successfully induced somatic embryogenesis.

Histological studies revealed that as early as 7 days after inoculating the explants in the inducing treatments, they formed the first regenerating structures from epidermal and subepidermal cells, coinciding with the overexpression of PLT3 in both shoots and embryos. Other key regulators of regeneration, WUS and AGL15, were overexpressed in later stages of the process. The results presented here will contribute to the advancement of understanding *Jatropha* regeneration and the exploitation of its biotechnological potential.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el mundo ha enfrentado una creciente demanda de fuentes de energía alternativas y sostenibles debido al agotamiento de las reservas de combustibles fósiles, preocupaciones sobre las emisiones de gases de efecto invernadero y la necesidad urgente de mitigar los impactos del cambio climático. La búsqueda de opciones de energía renovable ha llevado a investigadores y científicos a explorar diversos cultivos con aplicación en la síntesis de biocombustibles, y uno de los candidatos prometedores es *Jatropha curcas*. Esta planta perenne, nativa de regiones tropicales y subtropicales, ha ganado una atención significativa como una fuente potencial de biocombustibles debido a su alto contenido de aceite y la idoneidad de su cultivo en tierras marginales.

*Jatropha curcas* ofrece varias ventajas que la convierten en una opción atractiva para la industria de biocombustibles. Sin embargo también presenta algunas limitaciones que han sido abordadas desde diferentes perspectivas para darles solución y poder explotar su potencial entero. Una de las herramientas más exploradas en el estudio de esta especie es el Cultivo de Tejidos Vegetales que aplica las técnicas del cultivo *in vitro* para explorar soluciones a los problemas de *Jatropha*, por ejemplo, el de la producción de material de vegetal de alto valor a través del aprovechamiento de las capacidades regenerativas de los organismos vegetales. La regeneración de plantas completas es una técnica ampliamente utilizada desde hace varias décadas, sin embargo, el proceso de regeneración varía con cada especie y en ocasiones resulta sumamente retador establecer un protocolo altamente efectivo. En años recientes, el estudio de los procesos

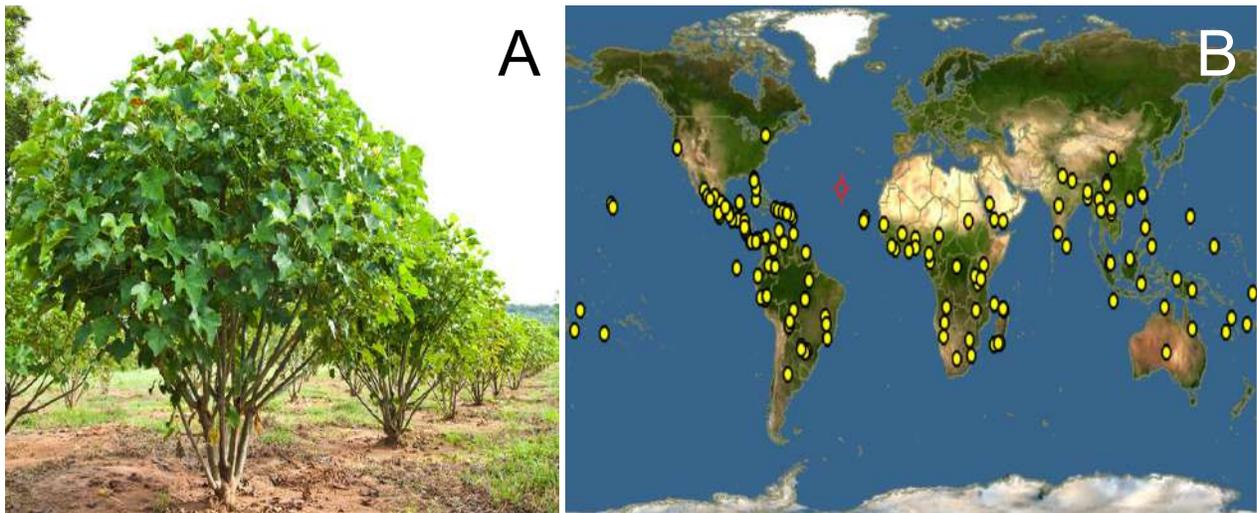
moleculares que gobiernan la regeneración en plantas modelo ha revelado algunos reguladores clave del proceso. Sin embargo, resulta necesario explorar el papel de estos reguladores en plantas no modelo como lo es *Jatropha*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Jatropha curcas*

*Jatropha curcas* conocida también como piñoncillo en algunas regiones de México, es un arbusto grande perene capaz de alcanzar alturas de hasta 10m cuando crece en condiciones favorables. Generalmente estas plantas muestran un crecimiento articulado, con ramas delgadas, madera blanda y una expectativa de vida mayor a los 50 años. Es una especie monoica con sus periodos de floración durante el verano y otoño, aunque en regiones permanentemente húmedas presenta flores todo el año (Divakara et al. 2009). Pertenece a la familia de las Euphorbiaceae que comprende aproximadamente 8000 especies, pertenecientes a 321 géneros donde destacan algunos cultivos de importancia económica como la cassava (*Manihot esculenta*), el ricino (*Ricinus communis*), el laurel chino (*Antidesma bunius*), entre otros (Heller 1996). Se han hecho muchos intentos para definir el centro de origen de *Jatropha curcas*, y todas las evidencias apuntan a México y algunos países de América Central, aunque actualmente se encuentra dispersa a lo largo de los trópicos gracias a la distribución lograda por los navegantes portugueses. Se puede encontrar en regiones de baja elevación, regularmente por debajo de 1200 msnm, y logran soportar una gran variedad de

temperaturas, desde una ligera helada, hasta 34 °C (Toral et al. 2008). Existen variedades tóxicas y no tóxicas, las primeras se distinguen por la producción de ésteres de forbol y otras sustancias antinutricionales como la curcina, fitato, folato, y factores inhibidores de la tripsina, que se confinan en el endospermo, semillas y aceites de la planta (Abdelgadir y Van Staden 2013).



**Figura 1.** Características y distribución de *Jatropha curcas*. A. Árbol de *Jatropha* de aproximadamente 5m de alto. Es una planta que crece en casi cualquier tipo de terreno incluso en terrenos arenosos o pedregosos; las hojas que caen de la *Jatropha* enriquecen el suelo haciéndolo todavía más fértil y es capaz de resistir a las bajas temperaturas. Requiere muy poca agua y resiste periodos largos de sequía deshojándose para reducir la transpiración. (Modificada de NaturaLista.mx) B. Distribución de *Jatropha curcas* alrededor del mundo. Nativa de América Central, fue difundida por Asia y África por comerciantes portugueses como planta para cercar y hoy en día se ha expandido por el mundo entero debido a su gran facilidad para adaptarse a situaciones adversas, tierras degradadas, y clima seco (Modificada de Discovery Life).

Se especula que la función de estos compuestos en la planta es principalmente proteger las reservas del endospermo de los ataques de microorganismos y algunos herbívoros (He et al. 2011). Los efectos de los ésteres de forbol en humanos están asociados con

una fuerte actividad promotora de la generación de tumores (Goel et al. 2007). En México contamos con diversidad genética de esta planta pues existen reportes del hallazgo de variedades tóxicas en el centro y sur de la república. Veracruz es la región del México que cuenta con reportes de presencia de plantas de *J. curcas* con semillas no tóxicas (Makkar et al. 1998, Martínez et al. 2018). En algunos estados como Morelos a las variedades no tóxicas de *Jatropha* se les ha empleado como fuente de alimento para ganado bovino y para equinos, y en algunos otros lugares los frutos se emplean como composta y para la generación de biogás. También se ha observado variación en los contenidos de lípidos y proteínas en las *J. curcas* mexicanas que resultan ser superiores a los que se reportan en variedades de otras regiones del mundo (Martínez Herrera et al. 2010).

## 2.2 Relevancia de *Jatropha curcas*: producción y utilidad.

La mayoría de las partes de la planta de *J. curcas* han sido empleadas con propósitos medicinales en humanos y en animales. Entre los usos más populares se puede mencionar el de las hojas como tratamiento contra infecciones en ganado caprino, decocciones para tratar la diabetes, artritis, la pérdida de cabello, etc. Sin embargo, la mayoría de estas aplicaciones no han sido evaluadas mediante procedimientos estandarizados por lo que no se cuenta con evidencia sustancial que avale los efectos medicinales antes mencionados (Abdelgadir y Van Staden 2013). Adicionalmente, se sabe que diversas partes de las plantas no tóxicas de *J. curcas* se emplean como ingrediente en variedad de alimentos, fertilizante, fuentes de colorantes, fibras textiles,

cosméticos, etc (Toral et al. 2008). En los últimos años esta especie ha llamado la atención mundial por sus aplicaciones en diversos sectores de la industria, ya que se han comenzado a estudiar formalmente las diversas bioactividades de extractos provenientes de diferentes partes de la planta. Los principales intereses por *Jatropha* recaen en al menos cuatro categorías: i) la capacidad biorremediadora de la planta (Chang et al. 2014); ii); tolerancia al estrés provocado por sequía (Mazumdar et al. 2018); iii) contenido de metabolitos secundarios con aplicaciones en la industria farmacéutica y de cosmética (Prasad et al. 2012, Warra et al. 2012); y iv) el potencial de producción de biocombustibles a partir de sus semillas con alto contenido de aceites (Nahar y Ozores-Hampton 2011).

### 2.3 Importancia económica

El contenido de aceite no comestible y altamente aprovechable de *J. curcas* para la elaboración de biocombustibles, que cumplen los estándares estadounidenses y europeos es de arriba del 40%, representando así la fuente primaria de importancia económica de esta planta. *J. curcas* toma un especial interés de quienes buscan cultivos con potencial de explotación en la fabricación de biocombustibles debido a que puede mejorar el desarrollo socioeconómico, mediante la producción de biodiesel mientras controla la erosión del suelo. Así también, podría ser cultivada en suelos degradados y regiones semiáridas, aunado a que no competiría con cultivos alimenticios. La producción de biocombustible a partir de *Jatropha* se valora por ser un árbol generador

de créditos de carbono que recicla el 100% de las emisiones de CO<sub>2</sub> producidas por la quema de biodiesel elaborado a partir de ella (Francis et al., 2005).

En 2009 el interés en la explotación de esta planta llegó a generar tantas expectativas que países como China, India, Brasil, y México implementaron programas de cultivo a gran escala. Sin embargo, pronto se generaron dudas sobre la viabilidad de su cultivo ya que al no ser una planta modelo, no se tenía conocimiento completo de las necesidades nutrimentales, además de que se observó una alta variación en la cantidad y calidad de semillas obtenidas, desbalance en el número de flores femeninas y masculinas, toxicidad de la semilla, susceptibilidad al estrés biótico y abiótico, entre otros problemas de cultivo (Mazumdar et al., 2018). El conocimiento del impacto y los potenciales de las plantaciones de *Jatropha* en países en desarrollo aún se encuentra limitado y requiere de mayor investigación.

#### 2.4 Problemas en el cultivo y en la productividad de las plantas de *Jatropha*

A pesar de la variedad de usos en la medicina tradicional que se han registrado y del gran interés que gira en torno de sus aceites para producción de biocombustibles, antes del año 2000 *Jatropha curcas* no había sido domesticada ni seleccionada para obtener alguna característica específica; como consecuencia la planta aún es silvestre y produce cantidades muy bajas de sus compuestos de interés, entre ellos el aceite de sus semillas. El rendimiento de producción de aceite de plantas de *J. curcas* silvestres es de menos

de 1600 kg/ha/año, lo cual es significativamente menor que cultivos aprovechables para el mismo fin como el coco o la palma (Ong et al. 2013).

Algunos de los mayores retos para adoptar a esta planta de gran potencial como fuente sustentable de biocombustible son principalmente, la susceptibilidad ante patógenos como insectos, hongos, y virus; la toxicidad del aceite de las semillas causada principalmente por los esteroides de forbol y la curcina (proteína inhibidora de ribosomas), así como algunas propiedades de viscosidad; y el alto número de flores masculinas respecto de las femeninas que conlleva problemas en la propagación y obtención de frutos (Mazumdar et al. 2018).

## 2.5 Mejoramiento

Desde el año 2006 países como India, Indonesia, República Dominicana, Zimbabue, Países Bajos y México han dirigido esfuerzos para domesticar, evaluar, mejorar, y propagar plantas de *Jatropha* con fines de explotación económica. Un ejemplo de ello son los esfuerzos por incrementar el rendimiento en la producción de semillas aumentando la cantidad de flores femeninas en las plantas de *Jatropha*. La aplicación de Reguladores del Crecimiento Vegetal (RCV) como giberelinas, citocininas y auxinas han mostrado buenos resultados, sin embargo, esta estrategia no muestra ser una solución económicamente viable para su uso en cultivos a gran escala (Makwana et al., 2010). Por otro lado, se han logrado identificar genes asociados al desarrollo floral en genotipos superiores (con mayor cantidad de flores femeninas) donde destaca la acumulación de

transcritos de *SUP* (Superman), *TAA1* (1-tryptophan-pyruvate aminotransferase 1), *CRY2* (Cryptochrome 2), and *CKX1* (Cytokinin deshydrogenase 1), todos relacionados con el número elevado de flores femeninas explicado por su rol en el arresto del desarrollo del estambre (Gangwar et al., 2016). Aunque aún se requiere una validación funcional, la identificación de estos genes provee de fuertes fundamentos para la futura manipulación de la relación floral en plantas de *Jatropha*.

Todos los retos antes mencionados se han abordado haciendo uso de enfoques de genética tradicional pero también desde la biotecnología. Existen características muy favorables para la aplicación de herramientas biotecnológicas para el mejoramiento de *J. curcas* tales como el genoma relativamente pequeño y completamente secuenciado, aunado a los pocos cromosomas en que se organiza, su facilidad de transformación y de manejo vegetativo (Moniruzzaman et al. 2016). Un preludeo importante e incluso indispensable para la aplicación de la mayoría de las herramientas biotecnológicas es el establecimiento de un sistema apropiado, como lo es un cultivo celular o plantas libres de virus y otros patógenos (Moniruzzaman et al. 2016). Así, el cultivo de tejidos vegetales resulta ser una pieza clave para la obtención de dichos sistemas, pues consiste en una serie de herramientas que permite el cultivo *in vitro* de células, tejidos, órganos, y plantas completas en un ambiente estéril y bajo condiciones controladas de temperatura, luz, y humedad. Por lo anterior, el cultivo de tejidos vegetales se presenta como una herramienta clave para la reproducción de plantas mediante la micropropagación. Este es un método alternativo de propagación *in vitro* que aprovecha la capacidad regenerativa de los organismos vegetales para producir una gran cantidad de individuos

en menor tiempo y espacio que los métodos convencionales. La regeneración de plantas ocurrida en medios de cultivo suplementado con diferentes tipos y concentraciones de RCV varía de acuerdo con el genotipo y el explante empleado. Por lo anterior, las investigaciones sobre la biología del desarrollo y la regeneración en las plantas están íntimamente ligadas con la implementación de este tipo de estrategias que aportan significativamente a la obtención de organismos vegetales altamente aprovechables en diferentes industrias, como el caso de *Jatropha curcas* (Bahadur et al. 2013).

## 2.6 Regeneración en sistemas vegetales

La regeneración es una respuesta fisiológica ampliamente conservada en plantas y animales que puede abarcar desde la reparación o remodelación de un tejido, hasta la formación de un órgano o individuo nuevo, sin embargo, los mecanismos que conducen este proceso varían ampliamente entre taxones (Birnbaum y Sánchez-Alvarado, 2008).

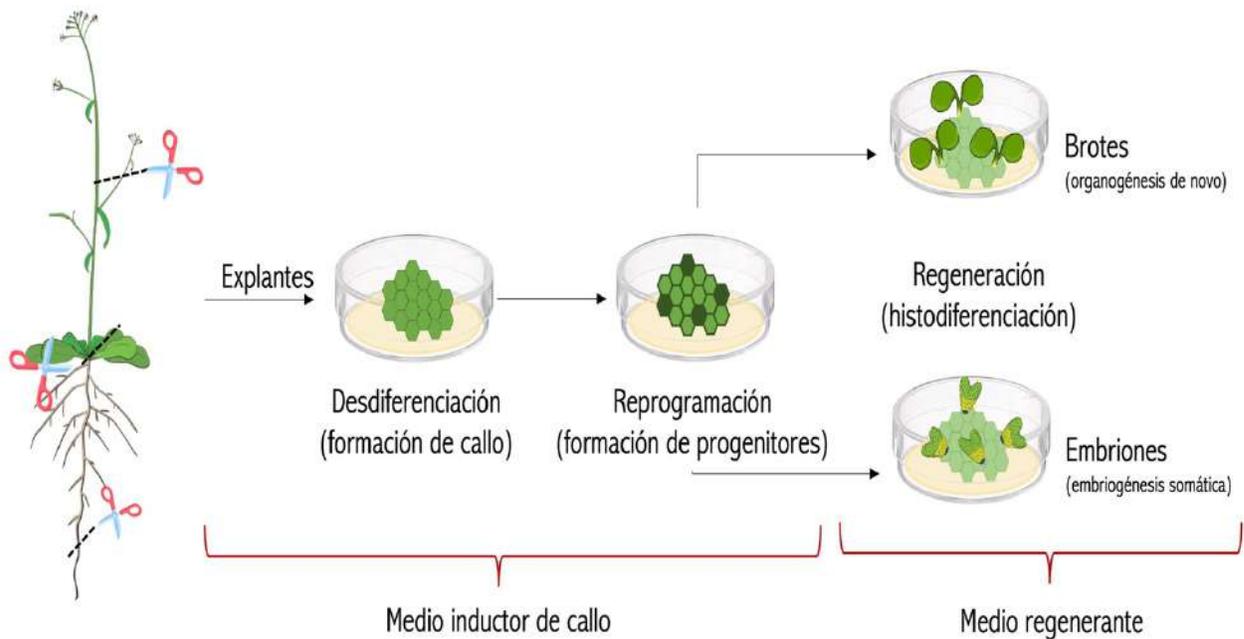
Las plantas poseen una gran capacidad regenerativa que ha sido aprovechada para la propagación de clones a través de esquejes o incluso de injertos. Los cuerpos de las plantas vasculares poseen estructuras complejas que muestran diversos modos de regeneración en dependencia de su contexto ambiental o de desarrollo. Una de dichas estructuras son los meristemas en la parte superior e inferior del cuerpo de la planta, conocidos como meristemo apical de brote y de raíz respectivamente.

Cuando la zona central del meristemo apical de brote es dañada localmente, las células que lo rodean reconstruyen esta estructura dañada mediante una serie de divisiones celulares coordinadas, lo mismo sucede en el caso del meristemo apical de raíz

(Reinhardt et al. 2003). Los tallos de las plantas también exhiben varios tipos de regeneración de tejidos que incluyen la formación de tejido vascular después de la remoción de la corteza o cuando se realizan injertos, así también la reparación de tejido después de una incisión parcial (Melnik et al. 2015). Una característica única de la regeneración en plantas es la formación de órganos nuevos en lugares dónde se ha efectuado un corte. Este proceso es conocido como organogénesis *de novo* (ODN). Otro caso es la formación de embriones a partir de tejido somático en un proceso conocido como embriogénesis somática (ES), donde el producto del proceso son embriones somáticos con la capacidad de crecer y desarrollarse hasta formar una nueva planta (Ikeuchi et al. 2016, Sugimoto et al. 2019). En cualquier proceso de regeneración, las células que conforman los tejidos necesitan abandonar su programa normal de desarrollo e iniciar el de regeneración, es decir, desdiferenciarse. Esto libera la restricción del destino en las células que conforman los tejidos originales y permite que adquieran la competencia necesaria para formar un nuevo tejido de acuerdo con las nuevas señales que reciban conforme a su posición como factores de transcripción, péptidos señalizadores, o RCV (Sugimoto et al. 2019). La capacidad regenerativa de las células vegetales puede potenciarse en sistemas *in vitro* mediante el cultivo de tejidos vegetales, exponiendo secciones de tejido de la planta de interés (explantes) a medios de cultivo con suplemento de RCV (Fig. 2). Los intentos de regenerar individuos completos mediante esta técnica comenzaron desde inicios del siglo XX, y sin duda uno de los descubrimientos de mayor trascendencia en este campo fue que la proporción suplementada de dos RCV (auxinas y citocininas) generalmente, pueden determinar el destino de un tejido regenerativo: proporciones elevadas de auxinas habitualmente

determina la formación de raíces, una proporción elevada de citocininas conducirá al desarrollo de brotes, la exposición inicial del explante a concentraciones elevadas de auxinas y su posterior remoción puede desencadenar la formación de embriones somáticos. Estos mecanismos pueden observarse en un explante primario vía directa o indirecta mediante la formación de callos (Motte et al. 2014, Ikeuchi et al. 2016). Muchos estudios en las recientes décadas han aprovechado estos sistemas *in vitro* para identificar señales y factores clave que guían a las células a someterse a procesos de regeneración, determinando que algunas moléculas son comunes entre los diferentes procesos de regeneración y el desarrollo normal, y otros son exclusivos de cada proceso (Sugimoto et al. 2019).

La regeneración es un fenómeno complejo donde múltiples procesos celulares que incluyen la reactivación del ciclo celular y la reprogramación de las células, se desarrollan en tiempos y espacios específicos dentro de una estructura multicelular (Perez-Garcia y Moreno-Risueno. 2018). Estos procesos se desencadenan principalmente por dos factores: el estrés ocasionado por heridas, y la aplicación de RCV, que a su vez desencadenan procesos moleculares que dirigirán la regeneración de tejidos. Los mecanismos regulatorios mediante los cuales las plantas pueden censar el estrés por herida son mediados principalmente por la alteración de la homeostasis hormonal y por cascadas de señalización, así como modulaciones transcripcionales de reguladores de los meristemas o aquellos embrionarios. Los componentes regulatorios específicos difieren de un tipo de proceso de regeneración a otro (Fehér y Magyar. 2015).



**Figura 2** Regeneración de plantas in vitro. Las células que conforman los explantes comienzan un proceso de desdiferenciación derivado de las señales inducidas por herida y por los RCV presentes en el medio de cultivo inductor de callo. En dependencia del tipo de RCV presentes en el medio regenerante, las células desdiferenciadas iniciarán un proceso de reprogramación donde comenzarán a adquirir las competencias necesarias para formar progenitores que posteriormente se desarrollarán en brotes mediante organogénesis de novo (ODN) o bien en embriones completos mediante embriogénesis somática (ES).

### 2.6.1 Organogénesis de novo (ODN)

La organogénesis *de novo* es un proceso de múltiples pasos que consisten en la adquisición de pluripotencia, la formación de un promeristemo de las partes aéreas, la determinación del progenitor del brote, y el crecimiento de este. Esta secuencia de

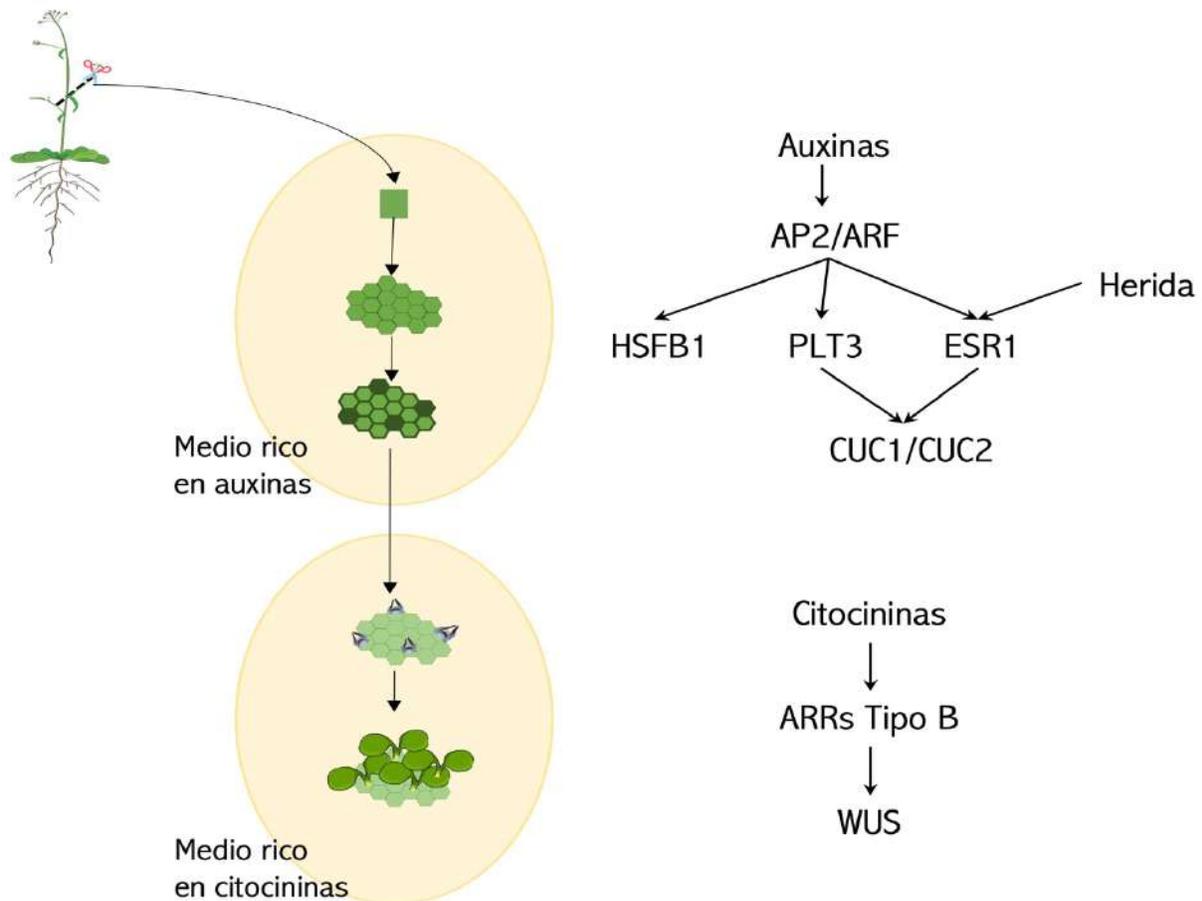
eventos generalmente es acompañada por etapas de incubación subsecuentes: primero el explante es expuesto a un medio de cultivo con concentraciones elevadas de auxinas, conocido como medio inductor de callo (MIC), seguido de la incubación en un medio inductor de brotes con concentraciones altas de citocininas (MIB) (Fig. 3). La especificación de las células fundadoras, el desarrollo del primordio y la adquisición de la competencia organogénica son procesos controlados por las auxinas. La asignación de la identidad de brote al primordio en desarrollo es controlada por las citocininas (Motte et al 2014). Se sabe que en *Arabidopsis thaliana*, durante la incubación en MIC, la especificación de las células fundadoras que darán lugar al nuevo órgano ocurre en el periciclo (Atta et al. 2009). Las divisiones celulares iniciales de las células del periciclo, su diferenciación en células fundadoras, y los eventos morfogénicos subsecuentes que conducen a la formación de un primordio son procesos que se parecen mucho a los que ocurren durante la formación de una raíz lateral en el desarrollo normal de la planta (Efroni et al. 2016). Con anterioridad a estos hallazgos se pensaba que los callos producto de la incubación de explantes en MICs estaban compuestos únicamente de células desdiferenciadas. El nuevo consenso es que los callos derivados de raíces, hojas e hipocótilos están organizados localmente de manera similar a un primordio de raíz (Sugimoto et al. 2010, Atta et al. 2009).

Estos callos o primordios muy jóvenes pueden dar origen en *Arabidopsis* tanto a brotes como a raíces dependiendo de las condiciones de cultivo a los que se expongan: si se continua en un medio similar a MIC (altas concentraciones de auxinas) la identidad del primordio quedará definida en una raíz, mientras que la incubación en MIB, determinarán

la identidad en un brote (Gordon et al. 2009). Durante el desarrollo subsecuente a la determinación de la identidad del brote, la señalización cruzada entre auxinas y citocininas es de gran importancia ya que tiene una gran influencia en la formación de patrones del primordio de brote y del meristemo apical (Cheng et al. 2013).

#### 2.6.1.1 Genes involucrados en la ODN

Algunos factores de transcripción han sido identificados como reguladores clave del inicio del proceso de regeneración en plantas vía organogénesis. Ikeuchi y col. (2018) han analizado, una red reguladora de genes asociadas con la reprogramación celular en plantas, usando un ensayo One Yeast Hybrid mejorado (eY1H), identificando relaciones regulatorias entre 252 factores de transcripción y 48 promotores. Su trabajo sugiere que señales desencadenadas por hormonas o por herida regulan muchos genes asociados a la reprogramación celular mediante cascadas regulatorias de múltiples capas, además de que es posible observar una extensa señalización cruzada. Sus datos muestran que PLETHORA 3 (PLT3), ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1 (ESR1) y HEAT SHOCK FACTOR B 1 (HSFB1) actúan como nodos críticos que probablemente conectan estímulos corriente arriba con decisiones del desarrollo corriente abajo y forman cascadas de retroalimentación. Estos genes estarían controlando los objetivos corriente abajo asociados a la formación de callos y la regeneración de órganos. Adicionalmente y de forma aparente, un grupo de factores de respuesta inducibles APETALA 2/ETHYLENE RESPONSE FACTORS (AP2/ERFs) regulan estos genes principales. (Fig. 3)



**Figura 3** Progresión molecular del proceso de organogénesis de novo. La escisión del explante y su posterior exposición a un medio de cultivo rico en auxinas desencadena vías de señalización que resultan en la activación de CUC1 y 2 mediada por PLT3 y ESR1 lo cual resulta en la formación de callo competente para la organogénesis de novo. La formación de promeristemos y su desarrollo posterior es consecuencia de la exposición de los callos competentes a un medio rico en citocininas que desencadena la vía de señalización que activa y sobreexpresa a WUS.

Lo anterior es consistente con las observaciones reportadas sobre la expresión de PLT3 que es fuertemente inducida tanto por heridas como por la incubación de explantes en medios de cultivo inductores de callo (ricos en auxinas, MIC), además de que también

se ha reportado que este gen está involucrado con la formación de callos inducidos por herida y en la regeneración de brotes derivados del cultivo de explantes en medio inductor de brotes (rico en citocininas, MIB). El análisis de pérdida de función de este gen en *Arabidopsis*, han mostrado que callos con esta particularidad son incapaces de formar brotes (Kareem et al. 2015).

De forma similar, se ha verificado que ESR1 está regulado al alza cuando se infringe herida a un tejido y su expresión se potencia aún más durante la aplicación exógena tanto de auxinas como de citocininas (Matsuo y Banno. 2008). Mutantes *esr1* de *Arabidopsis* muestran defectos en la formación de callos y en la regeneración de brotes, mientras que la sobreexpresión promueve ambos procesos. En el caso de HSF1, si bien no ha sido reportado de este gen algún papel en la reprogramación celular inducida por estrés, si se ha observado que es un factor de transcripción capaz de unirse al promotor de ESR1, formando parte de un circuito regulatorio en conjunto con PLT3 (Ikeuchi et al. 2018). Otro evento molecular clave en la inducción de la regeneración de brotes es la activación transcripcional de WUSCHEL (WUS), que es el regulador maestro de la inducción de meristemas de brote en callos, ya que se ha descrito que su sola sobreexpresión puede inducir la formación de meristemas de brote y que alelos mutantes con pérdida de función pierden la capacidad de generar brotes (Chatfield et al. 2013).

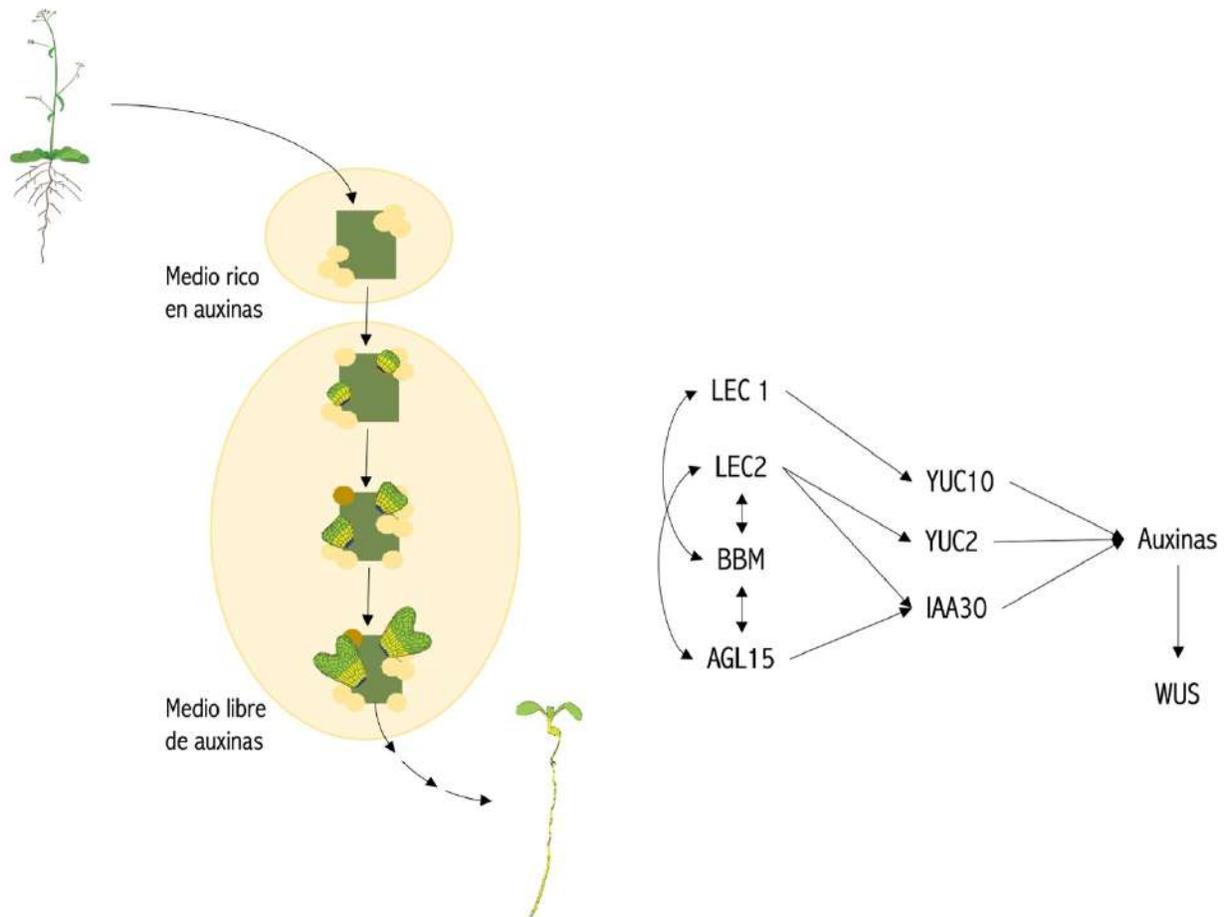
El análisis de la red reguladora de la reprogramación celular detectó que los genes ARR inducidos por citocininas, regulan directamente a la expresión de WUS (Fig. 3). La sobreexpresión de WUS restaura el potencial de regeneración en mutantes *arr*, un hecho que respalda la hipótesis de que la activación transcripcional de WUS es clave en la regeneración inducida por citocininas (Ikeuchi et al. 2019).

### 2.6.2 Embriogénesis somática (ES)

En plantas, algunas células somáticas pueden reiniciar el proceso embriogénico *in vitro* cuando son expuestas a un amplio rango de factores estresantes abióticos severos, por ejemplo, el daño causado por heridas, estrés osmótico, exposición a metales pesados, temperatura, hipoxia, radiación ultravioleta, etc. (Fehér 2015).

Muchas especies vegetales pueden someterse a procesos de embriogénesis somática cuando son cultivadas en medios que contienen auxinas y después se transfieren a medios libres de éstas (Fig. 4) (Ikeda et al. 2002). Uno de los reguladores de crecimiento más eficientes en la generación de embriones somáticos, en muchas plantas es el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) posiblemente porque es capaz de desencadenar una respuesta a auxinas y a estrés de forma simultánea (Gliwicka et al. 2013). El alto nivel de auxinas en el medio de cultivo promueve principalmente la proliferación de las células y la formación de un callo embriogénico.

Un proceso fisiológico clave durante la exposición a un medio libre de auxinas es el establecimiento de gradientes de auxinas endógenas en el callo embriogénico. Esto inicia un programa de desarrollo similar a la embriogénesis cigótica. Los gradientes de auxinas posteriormente conducen a la localización de la expresión de WUS en dominios de baja respuesta a auxinas, marcando así la posición de formación del futuro meristemo de brote (Su et al. 2009).



**Figura 4** Vía de regeneración por embriogénesis somática. Cuando el explante es expuesto a un medio rico en auxinas y posteriormente se elimina del medio de cultivo, se inician los procesos moleculares que desencadenan la formación de callos embriogénicos, donde la activación de un circuito de retroalimentación positiva entre LEC1, LEC2, AGL15 y BBM juega un papel fundamental para la formación de embriones somáticos puesto que activa una vía de síntesis de auxinas necesarias para establecer dominios de baja concentración de auxinas donde se expresará WUS y mediará la formación del meristemo apical de brote.

### 2.6.2.1 Genes involucrados en la ES

Los eventos ocurridos durante la embriogénesis somática han sido mejor explorados y caracterizados usando embriones cigóticos inmaduros de *Arabidopsis thaliana*. Se ha encontrado un claro signo de transición embriogénica cuando LEAFY COTYLEDON 1 y 2 (LEC1 y LEC2) se activan transcripcionalmente en medios libres de auxinas (Gallois et al. 2004). También se ha observado que algunos genes que codifican a reguladores transcripcionales, que funcionan en la embriogénesis cigótica tales como el factor MADS-box AGAMOUS-LIKE 15 (AGL15), el factor AP2/ERF BABY BOOM (BBM) y el factor con dominio RWP-RK (RKD4), inducen embriogénesis somática cuando son sobreexpresados en germinados de *Arabidopsis* (Fehér 2015). Algunos análisis de transcriptoma han descubierto una red transcripcional altamente interconectada entre estos reguladores transcripcionales embrionarios (Ikeuchi et al. 2019). LEC2, por ejemplo, forma un circuito de retroalimentación positiva con AGL15 demostrado por un estudio reciente, dónde se observó que BBM directamente activa LEC1, LEC2 y AGL15, y viceversa, mientras que LEC1, LEC2, y AGL15 son requeridos para la expresión de BBM (Fig. 4), lo que corrobora las mutuas medidas regulatorias entre estos genes involucrados en la embriogénesis.

Muchos de estos genes aparentemente promueven la embriogénesis mediante la modulación de la biosíntesis de auxinas y la señalización. La evidencia sugiere que AGL15 activa la expresión de IAA30 (Zheng et al. 2009). El análisis de pérdida de función en mutantes *iaa30* muestran defectos en la embriogénesis somática mediada por AGL15, mostrando que IAA30 funciona corriente debajo de AGL15 (Zheng et al. 2009). LEC1 y

LEC2 inducen la biosíntesis de auxinas mediante la activación de YUC10, YUC2 y YUC4, lo cual contribuye a la inducción eficiente de la embriogénesis somática, ya que el establecimiento de dominios de respuesta a auxinas en las regiones periféricas dentro de los callos, serán los sitios donde WUS comenzará a expresarse y dirigirá la formación y mantenimiento del meristemo apical de brote. La relación entre la expresión de WUS y la respuesta de auxina no está del todo clara, pero hay evidencia que muestra que se requiere el transporte de auxina para la expresión de WUS, y dado que el establecimiento de dominios de máxima concentración de auxina es esencial para la expresión de genes embriogénicos *in vitro*, las relaciones reguladoras entre estos factores de transcripción y la respuesta de auxina aparentemente son mutuamente dependientes (Su et al. 2009).

## 2.7 Regeneración in vitro de *Jatropha curcas*

Se han reportado varios protocolos de regeneración para *Jatropha* con genotipo tóxico a partir de hipocótilos, peciolos y hojas usando 6-benzilaminopurina (BA) y ácido indol-3-butírico (IBA) (Sujatha et al., 1996), y a partir de yemas axilares expuestas a cinetina (Kin) y thidiazuron (TDZ) (Rajore et al., 2005; Kumar et al., 2010). También se ha reportado que la adición de ácido indol-3-acético (IAA), sulfato de adenina, glutamina e IBA en la regeneración a través de meristemas apicales es exitosa (Rajore et al., 2005). La regeneración vía ES se ha logrado empleando ejes embrionarios cultivados en medios con Kin e IBA (Baran Jha et al., 2007), además de BAP, ácido naftalenacético (ANA) e IBA (Rajore et al., 2007). También se ha reportado la inducción de la embriogénesis somática con el arresto de los regenerantes en la fase pre-globular y globular de *Jatropha*

*curcas* con genotipo no tóxico empleando cultivos en suspensión iniciados a partir de cotiledones en medios adicionados con BA, ANA y ácido ascórbico (Medina Hernández. 2016). De forma general, la ODN se ha logrado usando explantes obtenidos de las partes aéreas de plantas jóvenes como hipocótilo, cotiledones, e incluso hojas y peciolo. En cambio, la ES parece tener éxito cuando se emplean como explantes ejes embrionarios o cotiledones.

Aunque la regeneración de *Jatropha* ha sido reportada muchas veces y bajo diferentes condiciones de cultivo, estos protocolos se han desarrollado principalmente para variedades asiáticas y africanas que registraron un contenido no negligible de esteres de forbol que, aunque se ha visto que pueden ser eliminados de los aceites durante el proceso de transesterificación para obtener el biodiesel, este compuesto permanece presente en los subproductos como la glicerina o el agua utilizada, hecho que limita la aceptación de *Jatropha* como fuente de biocombustible ya que representaría una fuente de contaminación ambiental por la emisión de desechos que contienen compuesto tóxicos (Huy et al. 2016). Por lo tanto, establecer un protocolo de regeneración efectivo para variedades mexicanas de genotipo no tóxico de *Jatropha* es importante para el aprovechamiento de este recurso.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El potencial de aplicación de *Jatropha curcas* alrededor del mundo se encuentra limitado principalmente por los problemas que representa su cultivo en campo y por la presencia

de esteres de forbol en las semillas de las variedades tóxicas ampliamente distribuidas. El cultivo de tejidos vegetales, a través de la regeneración de tejidos mediante organogénesis *de novo* o embriogénesis somática es una opción viable para garantizar el abasto continuo de material vegetal de élite, que permita la explotación de *Jatropha* en las diferentes industrias que encuentran interés en ella. Desarrollar protocolos con alta frecuencia de regeneración para variedades mexicanas no tóxicas de *J. curcas* que presenta mejores características que las variedades asiáticas y africanas representa un avance importante hacia el aprovechamiento de este recurso en nuestro país y en el mundo.

Por otro lado, los mecanismos moleculares involucrados en los diferentes procesos de regeneración de las plantas tanto en los sistemas *in vitro* como en la naturaleza se encuentran actualmente bajo un estudio exhaustivo que busca comprender en profundidad estos procesos. Sin embargo, los estudios se llevan a cabo en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* y a la fecha, hasta donde sabemos, no hay reportes que utilicen a *Jatropha curcas* como organismo de estudio. Pero dados los antecedentes de factores de transcripción que funcionan como conductores críticos de la reprogramación celular durante la respuesta regenerativa, principalmente pertenecientes a las familias AP2/ERS y MADS-box, como PLT3, WUS y AGL15 es relevante observar el comportamiento de estos genes en *Jatropha curcas* cultivada *in vitro* para poder avanzar en el entendimiento de la regulación molecular de la regeneración y así encaminar los mayores esfuerzos para el mejoramiento de esta planta, mediante la aplicación de herramientas biotecnológicas.

Por lo anterior, en el presente trabajo se busca establecer las condiciones para la obtención de respuesta regenerativa de una variedad mexicana no tóxica de *Jatropha curcas*, validando el protocolo con análisis histológicos y establecer un precedente del comportamiento de los genes involucrados en este proceso.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General

Regenerar plántulas de una variedad mexicana de *Jatropha curcas* con genotipo no tóxico mediante ODN y ES *in vitro* validando dichos procesos mediante análisis histológicos y comparar los cambios en la expresión de *PLT3*, *WUS*, y *AGL15* en los procesos de regeneración.

### 4.2 Específicos

- i. Establecer las condiciones de cultivos de *Jatropha curcas* para la inducción de brotes y optimizar aquellas para la inducción de embriones somáticos.
- ii. Realizar un análisis histológico comparativo de brotes y embriones somáticos de *Jatropha curcas*.
- iii. Analizar la expresión de *PLT3*, *WUS*, y *AGL15* involucrados en la inducción de brotes y de embriones somáticos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Cultivo *in vitro* de plántulas de *Jatropha curcas*

Para la obtención de explantes de *Jatropha curcas* libres de microorganismos, se germinaron *in vitro* semillas de una variedad mexicana no tóxica. Las semillas fueron colectadas en 2016 en Tierra Blanca en Veracruz, México en las coordenadas latitud norte 18° 26' y longitud oeste 96° 20'. Estas se sometieron a un proceso de desinfección superficial que se describe a continuación. Las semillas se lavaron con agua y jabón durante 1 min. Y posteriormente se sumergieron en agua bidestilada por 20 min. En campana de flujo laminar se removi6 completamente la testa, despu6s se realiz6 la siguiente secuencia de lavados:

- i) Lavado con etanol al 70% por 5 segundos.
- ii) Lavado con hipoclorito de sodio al 0.2%.
- iii) Lavado con etanol al 70% por 1 min.
- iv) Lavado hipoclorito de sodio al 0.4% + Trit6n al 0.01% por 3 min.
- v) Lavado con hipoclorito de sodio al 0.2% por 9 min.
- vi) 5 lavados con agua bidestilada est6ril por 30 segundos, cada uno.

Una vez realizada la desinfecci6n se colocaron las semillas en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS; 1962) optimizado para la germinaci6n de semillas de *J. curcas*. El medio se compone de las sales inorg6nicas t6picas del medio MS, piridoxina (2 mg/L),

ácido nicotínico (2 mg/L), tiamina (4 mg/L), mioinositol (100 mg/L), cisteína (25 mg/L), sacarosa (30 g/L), y gelrite (2 g/L) (Galáz-Ávalos et al. 2012). Los cultivos se incubaron a 25 °C y fotoperiodo de 16 h de luz y 8h de oscuridad.

### 5.1.2 Inducción de la ODN y ES

El establecimiento de los tratamientos de regeneración se realizó mediante dos ensayos que se describen a continuación.

#### 5.1.2.1 Primer ensayo

Se emplearon raíces, hipocótilos, y cotiledones obtenidos de plantas de *J. curcas* germinadas *in vitro* con 15 días de edad aproximadamente. Estos se inocularon en medios MS de inducción de callo regenerante que fueron suplementados con sacarosa 30 g/L, gelrite 2 g/L, y distintas combinaciones de RCV que se muestran en la tabla 1. Las combinaciones se obtuvieron de autores que reportan la obtención de regenerantes empleando variedades asiáticas y africanas de *J. curcas* (tabla 1). Se realizaron dos subcultivos cada 21 días para renovar el medio de cultivo y se registró la respuesta obtenida como porcentaje de inducción de callo y porcentaje de contaminación. Posteriormente, los explantes fueron expuestos durante otro periodo a medios suplementados con 2,4-D, o con BA en concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 mg/L para inducir la formación de embriones somáticos en el caso de la auxina y de brotes en el

caso de la citocinina. Los resultados se registraron a los 24 días de cultivo como porcentaje de inducción de callo por tratamiento.

**Tabla 1.** Combinaciones de RCV reportadas en la literatura para la inducción de callo regenerativo en explantes de *J. curcas*, que fueron empleadas durante el primer ensayo.

Medio de cultivo	Formulación <sup>1</sup>	Referencia
MIC 1	Picloram (1 mg/L)	Nindita et al. 2014
MIC 2	TDZ (1.0 mg/L), 2,4-D (0.5 mg/L)	Medipally et al. 2014
MIC 3	TDZ (0.5 mg/L) IBA (0.1 mg/L)	Galaz-Avalos et al. 2012
MIC 4	2,4-D (2 mg/L)	Cai et al. 2011
MIC 5	TDZ (1.5 mg/L), IBA (0.2 mg/L)	Baram-Jha et al. 2007

<sup>1</sup> TDZ: Thidiazurón, 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético, IBA: ácido indolbutírico, Kin: cinetina, NAA: ácido naftalenacético, ABA: ácido abscísico, GA: ácido giberélico.

### 5.1.2.2 Segundo ensayo

Los resultados del primer ensayo indicaron que los explantes obtenidos de raíces jóvenes no generan respuestas favorables para la regeneración de plántulas de *Jatropha*, por tal motivo se descartó su uso en los experimentos posteriores. Las combinaciones RCV seleccionadas para este segundo ensayo fueron elegidas a partir de reportes que indican la obtención de brotes o embriones de *J. curcas* en concentraciones definidas de RCV, condiciones de incubación, o tejido inicial distintos a los evaluados durante el primer ensayo. En la tabla 2 se encuentran los tratamientos evaluados en esta segunda etapa, todos los cultivos generados se incubaron a 25 °C y

en oscuridad hasta el primer cambio de medio correspondiente. Posteriormente estos se expusieron a fotoperiodo de 16 h luz y 8 de oscuridad.

**Tabla 2.** Combinaciones de RCV para la inducción de callo en condiciones iniciales de oscuridad (segundo ensayo) a partir de explantes de *Jatropha*. CIM: medio inductor de callo, SIM: medio inductor de brote, EIM: medio inductor de embriones

Medio de cultivo	Formulación <sup>1, 2</sup>	Referencia
TIB 1	<b>CIM:</b> BA (1.5 mg/L) + IBA (0.05 mg/L)  <b>SIM:</b> BA (1.5 mg/L) + IBA (0.05 mg/L) + GA (0.5 mg/L)	Li et al. 2008
TIB 2	<b>CIM:</b> IBA (0.5 mg/L) + BA (1.0 mg/L)  <b>SIM:</b> PVP (500 mg/L) + Ácido cítrico (30 mg/L) + BA (1.0 mg/L) + Kin (0.5 mg/L) + IBA (0.25 mg/L)	Varshney & Johnson. 2010
TIE 1	<b>EIM:</b> Picloram (1 mg/L)	Nindita et al. 2014
TIE 2	<b>EIM:</b> 2,4-D (0.8 mg/L)	Siang.& Yien 2012

1. Medios MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa 30 g/L, gelrite 2 g/L.
2. BA: Benciladenina, 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético, IBA: ácido indolbutírico, Kin: cinetina, NAA: ácido naftalenacético, ABA: ácido absícico, GA: ácido giberélico.

El experimento se realizó por duplicado y se registraron las respuestas de porcentaje de inducción, contaminación y número de brotes o embriones somáticos cada 21 días.

## 5.2 Análisis histológico de estructuras regeneradas

Se cortaron secciones de aproximadamente 0.25 cm<sup>2</sup> de explantes cultivados TIB 1 y TIE 2 que contenían señales de regeneración a los 7, 14, 28 y 42 días en cultivo para su procesamiento histológico que se describe a continuación.

Fijación: se empleó la solución de Navashin por ser adecuada para la fijación de estructuras suaves y delicadas (Sandoval 2005). Este fijador se conforma por dos soluciones: solución A (Trióxido de cromo 10 g/L, Ácido acético glacial 7% (v/v)) y solución B (Formaldehído 30% (v/v)) mezcladas en cantidades iguales justo antes de emplearlo. Los tejidos se sumergieron completamente en el fijador de Navashin y se mantuvieron en agitación constante (100 rpm) y a 25 °C durante 48 hrs. Posteriormente se realizaron enjuagues a los tejidos con agua destilada hasta remover completamente el olor a formaldehído.

Deshidratación: una vez removido el Navashin, se deshidrataron las muestras empleando un tren de alcohol tert-butílico con las siguientes concentraciones: 35, 50, 60, 75, 85, 95 y 100%, manteniendo los tejidos en cada concentración durante 24hrs excepto en la última de las concentraciones donde se mantuvo durante 72 hrs.

Infiltración en Paraplas®: sin remover el alcohol tert-butílico, las muestras se incubaron a 60 °C añadiendo de 7 a 10 hojuelas de Paraplas® cada 30-40 min permitiendo que se

fundan y mezclen con el alcohol para lograr una infiltración en el tejido de forma gradual. Se añadieron hojuelas hasta duplicar el volumen de alcohol tert-butílico inicial. Las muestras se incubaron hasta evaporar el alcohol, se removió el resto de la mezcla y colocó Paraplas® puro donde se mantuvieron las muestras durante 72 hrs.

Inclusión: Para la elaboración de los bloques de corte se colocaron las muestras en cajas de papel bond (1.5 x 1 cm) y se vertió Paraplas® hasta el borde de la caja, con una aguja de disección se removieron las burbujas formadas alrededor del tejido sin tocarlo, una vez solidificado el bloque se mantuvo a 4 °C hasta su posterior procesamiento.

Cortes y tinción: Los bloques obtenidos durante la inclusión se montaron en un soporte de madera y se desbastó hasta dar forma adecuada para la formación de listones. Se cortaron secciones seriales de 5 micras de grosor longitudinales en micrótopo de rotación (American Optical 860) que fueron adheridas a portaobjetos usando grenetina como adhesivo. Para la tinción, se removió el Paraplas® incubando a 60 °C durante 30 min y haciendo dos enjuagues, el primero con xilol por 20 min y el segundo con una mezcla de xilol-etanol (1:1) por 15 min. Tras los enjuagues, las secciones se rehidrataron a través de alcoholes graduales: 100, 95, 70, 50 y 30% durante 15 min en cada uno. Después del etanol al 30%, se colocaron las secciones en safranina durante toda la noche, se lavaron dos veces con agua destilada y se deshidrataron nuevamente mediante etanol al 30, 50, 70, 95 y absoluto con intervalos de exposición de 2 min en cada uno. Se empleó una tinción con verde rápido durante 5 minutos para lograr un contraste en el tejido. Por último, las secciones se colocaron en aceite de clavo y en

citrisolv™ durante 10 min en cada uno. Las secciones se recubrieron con resina sintética y un cubreobjetos y se secaron en horno a 60 °C durante 15 días.

### 5.3 Análisis de la expresión de genes relacionados con ODN y ES

#### 5.3.1 Análisis *in silico* y diseño de oligonucleótidos

Se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de los factores de transcripción de interés en la base de datos The *Arabidopsis* information resource (TAIR, <https://www.arabidopsis.org>), debido a que los principales estudios de dichos factores se han realizado en *A. thaliana*. TAIR mantiene una base de datos de genética y biología molecular de este modelo de estudio. Entre la información disponible se puede encontrar la secuencia completa del genoma, estructura de genes, productos de genes, mapas genómicos, marcadores genéticos y físicos, entre otros. Una vez obtenida la secuencia de aminoácidos cuyas accesiones se reportan en la tabla 3, se procedió a hacer una búsqueda por alineamiento local, con ayuda de la herramienta de uso libre BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information), restringiendo la búsqueda al organismo *Jatropha curcas*; y de la base de datos *Jatropha curcas* Data Base (JCDB) que se distingue de la base de datos de *Jatropha* del NCBI (*Jatropha curcas* Annotation Release) por algunas particularidades como su integración de la información de genes con la anotación funcional, perfiles de expresión, y redes de genes. Lo anterior con propósitos de control de los datos recuperados. De los resultados obtenidos del BLAST, se recuperó la secuencia de aminoácidos de la proteína con mayor identidad respecto a la de *Arabidopsis* y se procedió con el análisis estructural. Este

consistió en la búsqueda de los dominios o motivos más relevantes en la función de los factores de transcripción seleccionados mediante el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína de *Arabidopsis* vs *Jatropha*.

**Tabla 3.** Genes de interés de *Arabidopsis* en la base de datos TAIR. Se presentan además de los nombres de los genes, los dominios característicos de las proteínas que son relevantes en la función que ejecutan.

Gen	Locus TAIR	Dominios de interés
PLT3	<b>AT5G10510</b>	AP2
WUS	<b>AT2G17950</b>	Homeodominio
AGL15	<b>AT5G13790</b>	MADS
ESR1	<b>AT1G12980</b>	AP2
RKD4	<b>AT5G53040</b>	RWP-RK

Una vez que se corroboró que los dominios o motivos de los genes seleccionados, estuvieran conservados en las proteínas de *Jatropha*, se obtuvieron las secuencias codificantes de las proteínas reportadas en NCBI. Las secuencias emplearon para el diseño de los oligonucleótidos con ayuda del software libre Primer3Plus, al que se le ajustaron los parámetros de diseño para oligonucleótidos empleados para qPCR, que rindieran un amplicon de entre 150 y 200 pares de bases (pb), y que la diferencia entre las temperaturas de fusión fuera no mayor a 1 °C entre pares. Una vez obtenidas las secuencias de oligonucleótidos arrojadas por Primer3Plus, se procedió a su análisis que

consistió en la predicción de posibles amplicones, mediante el uso del software libre PrimerBLAST del NCBI, restringiendo la búsqueda al organismo *Jatropha curcas*. Se eligieron los pares de oligonucleótidos que arrojaron como resultado la amplificación de un único producto correspondiente a los genes de los factores de transcripción de interés. Posteriormente se introdujeron las secuencias de los pares de oligonucleótidos seleccionados a la herramienta de uso libre Beacon Designer que permite predecir la formación de estructuras secundarias en los oligonucleótidos, así como la dimerización y la estabilidad de estas estructuras mediante el cálculo de su  $\Delta G$ , y la temperatura de alineamiento. Se verificó que estos datos estuvieran en el rango de -6.0 a 0 y 60 °C respectivamente. Por último, se analizó el amplicón predicho por PrimerBLAST para obtener una predicción de la curva Melt.

### 5.3.2 Extracción de RNA total y síntesis de cDNA

Se obtuvieron muestras de estructuras regeneradas mediante los tratamientos de inducción de ODN TIB1, y ES TIE2. Las muestras de tejido se recolectaron a los 0, 7, 14, 28, y 42 días de cultivo. Como control se empleó tejido obtenido de explantes cultivados en medio MS sin suplemento de RCV. El RNA fue extraído empleando el método descrito por Huded et al. (2018). Se emplearon aproximadamente 300 mg de tejido fresco, se les añadieron 20 mg de PVPP y fueron pulverizados en nitrógeno líquido, se añadieron 750 uL de buffer de extracción precalentado a 65 °C (SDS 2%, Tris-HCl pH 8 100mM, EDTA pH 8 25mM, y b-mercaptoetanol 1%), se continuó la molienda y se transfirió el contenido del mortero a dos tubos de 2 ml. Se incubaron las muestras a 65 °C durante 20 min con

agitación cada minuto. Se añadió un volumen de fenol:cloroformo (1:1) a los tubos que contenían las muestras, se mezcló vigorosamente, se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 15,000 G a 4 °C durante 10 minutos. Posteriormente se recuperó la fase acuosa, se añadieron 0.3 volúmenes de acetato de potasio 5M pH 5 y 0.7 volúmenes de fenol:cloroformo, se agitó vigorosamente; se incubaron a -20 °C por 10 min, después se centrifugó a 15,000 g a 4 °C durante 10 min. Nuevamente se recolectó la fase superior en tubos nuevos, se añadieron 0.1 volúmenes de acetato de potasio 3M y un volumen de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se incubó a -20 °C durante una hora. Las muestras se centrifugaron a 15,000 G, 4 °C durante 10 minutos, se observó la formación de un pellet y se decantó el sobrenadante. Se realizó un lavado con 1 ml de etanol al 70% despegando el pellet del fondo del tubo y centrifugando a 7,500 G, 4 °C durante 15 minutos, se decantó el sobrenadante y se permitió que se evaporaran los restos de etanol que permanecieron en el tubo. El pellet se resuspendió en 25 µL de agua Mili-Q estéril.

La concentración y pureza del RNA obtenido se determinó mediante un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y su integridad se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante con tinción de bromuro de etidio. La contaminación por DNA genómico se eliminó con el kit de DNAsa IHENo521 (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El cDNA fue sintetizado a partir de 2 µg de RNA total utilizando el kit RevertAid K1641 (Thermo Scientific) y con un pool de oligonucleótidos específicos (oligonucleótido 3' de cada gen de interés) en concentración de 0.2 µM.

### 5.3.3 Determinación de los niveles de expresión de *JcPLT3*, *JcWUS*, y *JcAGL15*

Cada reacción de qPCR se preparó con 8  $\mu$ L de Maxima SYBR Green qPCR Máster Mix (2X) (Thermo Scientific, EE. UU.), 100 nM de cada primer (tabla 7) según correspondía, y 256 ng de cDNA; para un volumen total de 16  $\mu$ L. Se incluyó un control sin templado para cada par de primers. Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo usando un equipo CFX96 Touch Real-Time PCR detection system (Bio-Rad, EE. UU.), con un protocolo de ciclado de dos pasos: pretratamiento UDG (uracil DNA glicosidasa) a 50°C por 2 min, desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 seg, y alineación/extensión a 60°C por 30 seg, y una curva melting desde 65 hasta 95°C con incrementos de 0.5°C. El equipo realizó las mediciones de concentración de DNA en cada ciclo cuando la temperatura era de 60°C. Este análisis se realizó con dos réplicas técnicas por cada réplica biológica. Para el análisis de los datos se empleó el software Bio-Rad CFX Manager 2.1, con el que se determinó el Cq para cada reacción, el Cq promedio y la desviación estándar. Se empleó el método de  $\Delta\Delta Cq$  para la cuantificación relativa de la expresión de los genes seleccionados usando el factor de elongación  $1\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ) como referencia ya que de acuerdo con Zhang y colaboradores (2010), en *Jatropha curcas* es uno de los mejores genes de referencia junto con *actin* y *GAPDH* para la determinación de perfiles de expresión de genes en todas las etapas de desarrollo de la planta.

#### 5.4 Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron desarrollados por triplicado, reportando los valores de la media y su desviación estándar. Los resultados fueron sujetos a un análisis de varianza a una sola vía (ANOVA). Las diferencias significativas de los parámetros fueron determinados aplicando una prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

### 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

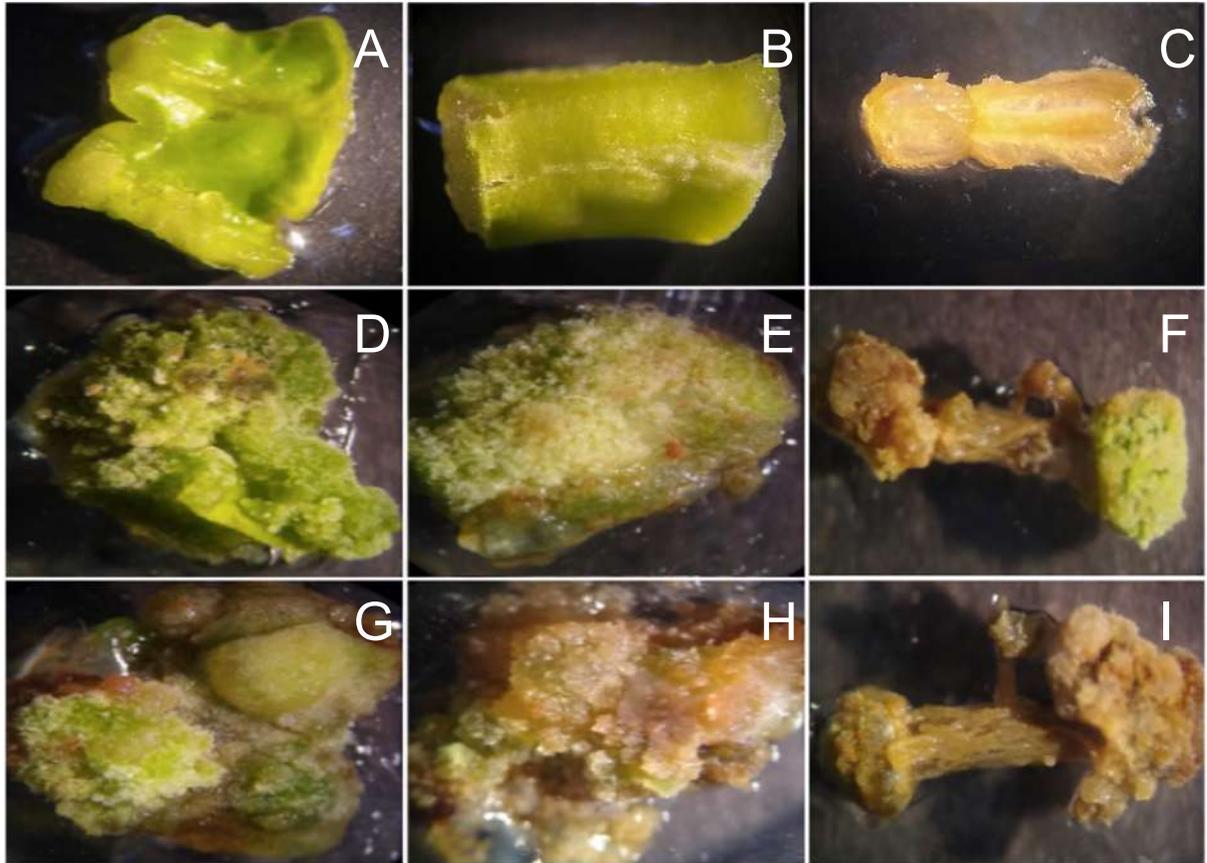
#### 6.1 Respuesta de los explantes a los medios de inducción de callo (MIC).

Después de 24 días de incubación de los explantes en las condiciones evaluadas en el primer ensayo de regeneración (tabla 1), se registró formación de callo de los explantes en los diferentes tratamientos. El tratamiento con el porcentaje de inducción de callo más elevado fue MIC1 a partir de hipocótilos con  $90.2 \pm 4.4\%$  aunque no fue significativamente diferente a los porcentajes registrados para raíz y para cotiledón (tabla 4). Durante este periodo, la formación de callo se dio principalmente en las regiones dónde se realizaron cortes para separar el explante de la planta de origen (Fig 5A, 5B, 5C), posteriormente, a los 28d de cultivo comenzó a expandirse para cubrir todo el explante inicial en el caso de hipocótilos (Fig. 5E) y cotiledones (Fig. 5D); en raíces la proliferación del callo se limitó a los extremos del explante donde se practicó corte (Fig. 5F). El aumento de tamaño sugiere que, para todos los tratamientos probados, las células se encuentran en constante división, aunque no se detectaron estructuras que

indiquen la inducción de la respuesta regenerativa. Las características de la mayoría de los callos son similares: compactos pero friables y con proliferación constante. Tras 42 días de cultivo, los callos fueron transferidos a medios suplementados con citocinina (BA) o auxina (2,4-D) en distintas concentraciones para favorecer la inducción de brotes y embriones, respectivamente. No hubo cambio significativo en el tamaño del callo ni en la masa y ningún signo de regeneración fue detectado en alguno de los callos (Fig 5G). En el caso de los callos inducidos a partir de segmentos de raíz, sufrieron oxidación tras la exposición a los medios enriquecidos con BA o 2,4-D (Fig. 5I), reduciendo aún más su crecimiento y cambiando la textura del tejido de friable a duro en el 100% de los callos. Debido a que la respuesta observada al emplear secciones de raíz como explante para la inducción de callos regenerantes mostró una respuesta proliferativa significativamente menor, en comparación con los callos generados a partir de hipocótilo y cotiledón, además de problemas severos de oxidación, se descartó su uso para el segundo ensayo de inducción de la regeneración.

### 6.1.2 Inducción de ODN

Para el segundo ensayo, los explantes fueron expuestos inicialmente a citocinina (BA) y una concentración baja de auxina (IBA) para inducir ODN (medios TIB, tabla 2) y a auxinas (2,4-D o Picloram) para la inducción de ES (medios TIE, tabla 2) ambos tratamientos en ausencia de luz.



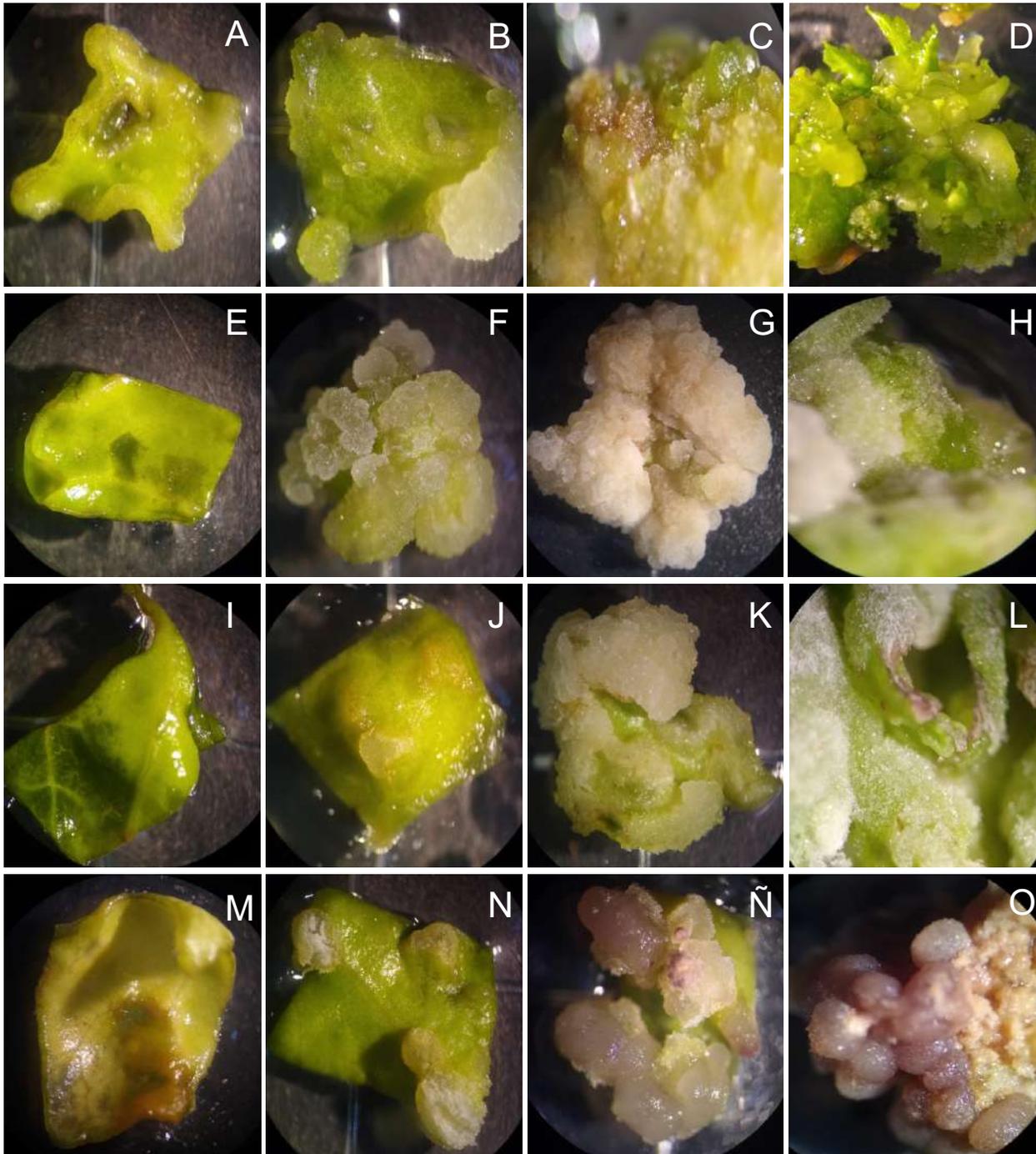
**Figura 5** Respuestas de los diferentes explantes de *J. curcas* empleados para la inducción de la regeneración. En A se observa la respuesta del cotiledon tras 21 días de cultivo, en B la de hipocotilo y en C la respuesta de la raíz. La formación de callo es mayormente evidente en las zonas de corte para todos los tratamientos probados. En D se muestra la evolución del callo generado a partir de cotiledón en E la del hipocótulo y en F la del callo de raíz, todas tras 28 días de cultivo. Los callos se expandieron abarcando toda la superficie del explante excepto en la raíz donde se limita a los sitios de corte, se caracterizaron por ser compactos pero friables. En G se muestra la respuesta de los callos generados a partir de cotiledon ante el cambio de medio de cultivo suplementado con 2,4-D, en H la respuesta del callo de hipocotilo y en I la del callo de raíz ante el mismo cambio. Los callos se volvieron compactos y presentaron niveles importantes de oxidación especialmente los generados a partir de raíz.

**Tabla 4** Efecto de los tratamientos de inducción de callo en el porcentaje de respuesta de los explantes evaluados después de 24 días de exposición

Porcentaje de inducción de callo						
Explantes	MIC1	MIC2	MIC3	MIC4	MIC5	MS
<b>Hipocótilo</b>	90.2±4.4	81.5±2.1	61.6±1.4	75.1 ± 1.9	55.1 ± 3.2	5.9 ± 0.1
<b>Cotiledón</b>	88.8 ± 3.2	78.2 ± 1.6	59.0 ± 1.5	70.0 ± 2.2	54.9 ± 1.7	5.1 ± 0.8
<b>Raíz</b>	88.1 ± 1.6	77.3 ± 1.9	60.3 ± 1.4	74.3 ± 2.8	49.5 ± 1.7	5.3 ± 0.10

**Tabla 5.** Efecto de los tratamientos de inducción de ODN y ES en el porcentaje de respuesta de los explantes evaluados y número de estructuras regenerantes generadas después de 42 días de exposición.

Porcentaje de inducción de callo regenerante						No. de estructuras regenerantes por explante				
Explantes	TIB1	TIB2	TIE1	TIE2	MS	TIB1	TIB2	TIE1	TIE2	MS
<b>Hipocótilo</b>	53.5±3.1	40.8±4.4	45.8±2.4	27.4±3.3	0	0	0	0	0	0
<b>Cotiledón</b>	72.2±7.8	50.8±2.8	62.4±3.2	90.4±7.8	0	10.8±2.1	0	0	19±2.8	0



**Figura 6.** Respuesta de los cotiledones a los tratamientos TIB1, TIB2, TIE1 y TIE2. En A se muestra el explante de *Jatropha* tras 7d de incubación en TIB1, en B después de 14d en C a los 28d y en D tras 42d donde es posible distinguir los brotes regenerados en fase de dos hojas aunque en este punto también se encontraron estructuras en fases más tempranas de la regeneración. .E muestra la respuesta del explante al tratamiento TIB2 después de 7d de incubación, en F se observa tras 14d y se distingue mayor proliferación de callo que en el caso de TIB1 durante el mismo periodo, en G se muestra la gran capacidad de proliferación del callo después de 28d y en H se muestra que TIB2 no fue capaz de regenerar brotes puesto que no se hallaron primordios o algún otro tipo de estructura. En I se muestra el explante incubado 7d en TIE1, aunque hay señales de que el explante está respondiendo al tratamiento, evidenciado por la formación de protuberancias, aún no forma callo. En J, tras 14d de cultivo en TIE1, el explante ya muestra formación de callo tras 14d de cultivo. Las características de este callo formado son más evidentes en K donde después de 28d ha proliferado y tiene textura cremosa y ausencia de pigmentación. En L se hace evidente que a pesar de sus características embrionarias, el callo generado en TIE1 no regenera embriones pues no hay estructuras que indiquen lo contrario. En M y N se muestran la respuesta del explante al tratamiento TIE2 a los 7d y 14d respectivamente. El desarrollo del callo es muy similar al observado en TIE1 aunque las respuestas del explante son más evidentes. En Ñ se observa el callo generado en TIE2 tras 28d con textura cremosa y con presencia de pigmentos morados que probablemente sean antocianinas. En O se distinguen estructuras esféricas similares a un domo que se clasificaron como masas proembrionarias dadas sus características compatibles con las descripciones realizadas en otros trabajos (Nindita et. Al. 2014)

En los TIB, la presencia de citocinina en mayor proporción que la auxina tuvo un efecto observable en la inducción de callo regenerante, presentando características compatibles con las descritas en otros trabajos (El-Sayed et al. 2020). El tratamiento TIB1 que contenía la concentración más alta de BA, mostró los mayores porcentajes de inducción de callos regenerantes registrando  $72.2 \pm 7.85\%$  después de 42 días de incubación y en cada uno de los callos se encontraron  $10.8 \pm 2.01$  brotes en diferentes etapas de desarrollo que van desde primordios hasta la etapa de dos hojas (Fig. 6D). En este punto no se observó formación de brotes en TIB2 en ninguno de los explantes, aunque su capacidad de proliferación era mucho mayor que la de los explantes expuestos a TIB1 (Fig. 6G).

### 6.1.3 Inducción de ES

La presencia de las auxinas en los respectivos tratamientos tuvo efecto en la formación de callo con características embriogénicas. Ambos tratamientos fueron capaces de inducir la formación de callo embriogénico siendo TIE2 el más efectivo registrando inducción de ES en el  $90.44 \pm 7.85\%$  de los explantes (tabla 5). Los callos de TIE1 presentaron textura cremosa (Fig. 6K) y carecían de pigmentación a diferencia de TIE2 que presentó zonas pigmentadas de color morado (Fig. 6Ñ). El tipo de explante sin embargo fue determinante para la formación de estructuras regenerantes características de la embriogénesis somática: estructuras esféricas similares a un domo denominadas masas proembriogénicas dadas sus características compatibles con las descritas por Nindita y col. (2014) (Fig. 6O). Tras la remoción de la auxina del medio, los cotiledones

en el tratamiento TIE2 las masas proembriogénicas se encontraban en una densidad de  $19 \pm 2.8$  masa por explante siendo la combinación de explante-tratamiento más efectiva para la inducción de ES. Los callos embriogénicos generados a partir de hipocótilos no mostraron formación de masas proembriogénicas. Por otro lado, fue posible distinguir una leve pigmentación de las masas proembriogénicas obtenidas que probablemente correspondía a la síntesis de antocianinas como respuesta al fotoperiodo (Fig. 6O).

En el presente estudio la presencia de auxinas y citocininas en el medio de cultivo, así como el explante utilizado influenciaron de forma significativa la inducción de ODN y ES. La bencilaminopurina (BA) es una citocinina sintética conocida por su capacidad para promover la proliferación celular, la formación de brotes y la organogénesis en diversos sistemas de cultivo de tejidos vegetales incluida *Jatropha curcas*. Sin embargo, la mayoría de los estudios en donde se induce ODN en *Jatropha*, la citocinina más recurrida es el TDZ, pues es generalmente más potente en términos de su capacidad para inducir la proliferación celular y la regeneración de tejidos. Kumar et al. (2011) por ejemplo reporta que la formación de brotes en diferentes explantes de *Jatropha* de genotipo tóxico fue proporcional al incremento de la concentración de TDZ entre 0.22 y 9.08  $\mu\text{M}$  en el medio de cultivo, esto es, a mayor concentración de TDZ, mayor porcentaje de inducción de brotes. No obstante, en esta investigación el empleo de TDZ como inductor de la ODN (MIC2, 3 y 5) no mostró resultados favorables puesto que fue efectivo en la inducción de callo en tres explantes diferentes, pero ninguno mostró señales de regeneración. En cambio, el BA si fue capaz de inducir la formación de brotes, hecho que es consistente con el estudio realizado por Nogueira et al. (2011) quienes evaluaron la eficacia de

diferentes reguladores de crecimiento, incluyendo la BA y el TDZ, en la multiplicación de brotes de *Jatropha curcas*. Sus resultados mostraron, que tanto la BA como el TDZ fueron efectivos en la formación de brotes, pero la BA demostró ser más eficiente en términos de mayor número de brotes por explante.

Por otro lado, la ES fue exitosamente inducida en cotiledones cultivados con suplemento de 2,4-D. El 2,4-D es una auxina sintética ampliamente usada en la inducción de la embriogénesis somática tanto en especies modelo como en *Jatropha*. Laguna et al. (2018) reportó que la adición de 2,4-D promovió la formación de callos embriogénicos y la posterior regeneración de embriones en *Jatropha curcas*, observando la misma tendencia que se reporta para el TDZ y la ODN, a mayor concentración de 2,4-D mayor inducción de embriones en un rango de 67.87 a 26.24  $\mu\text{M}$ .

El tipo de explante empleado fue otro factor determinante en la respuesta regenerativa obtenida en el presente trabajo y suele ser un factor muy importante en el establecimiento de un protocolo de regeneración eficiente. Sharma et al. (2011) reporta por ejemplo que el uso de explantes obtenidos de plántulas germinadas *in vitro* resulta en un mayor porcentaje de regeneración y número de plántulas regeneradas que cuando se usan explantes obtenidos de fuentes *ex vitro*. Además, se ha visto que incluso la posición del explante colectado en la planta madre influye también en la regeneración. Los segmentos de hipocótilo que están más cercanos al nodo cotiledonar responden mejor a tratamientos de regeneración que aquellos segmentos que existen más cerca del nodo de la raíz (Mundhara y Rashid 2006). Lo que posiblemente se explica debido al efecto inhibitor del meristemo de la raíz primaria y de los meristemas de raíces laterales

presentes en el extremo del hipocótilo. Tendencias similares han sido observados en la especie *Paulownia tomentosa Steud* (Ozaslan et al. 2005). También cabe señalar que el potencial de regeneración de las células vegetales varía entre diferentes tipos de tejido y órganos. Algunos tejidos vegetales como los explantes de hipocótilo y cotiledón tienen una mayor capacidad de desdiferenciación y proliferación, lo que facilita la regeneración en contraste con los explantes de raíz. El hipocótilo es la región que se encuentra entre la raíz y los cotiledones de una planta en desarrollo. Los explantes de hipocótilo contienen a menudo células menos especializadas y por lo tanto tienen un alto potencial regenerativo. Estas células tienen la capacidad de desdiferenciarse y adquirir un nuevo programa de desarrollo que les permitirá formar nuevos tejidos y órganos. Los cotiledones por otro lado son estructuras de almacenamiento de nutrientes en las semillas y son cruciales para el crecimiento inicial de la planta. Los explantes provenientes de este tejido también poseen células con alto potencial regenerativo. En contraste, las células de la raíz suelen estar más diferenciadas y especializadas en su función principal de absorción de agua y nutrientes. Esto puede limitar su capacidad de proliferación en comparación con otras células, aunque algunas regiones de la raíz como el meristemo apical contienen células con mayor potencial regenerativo en comparación con regiones más maduras y diferenciadas halladas por encima del primer pelo radicular (Long et al. 2022). En el presente trabajo, los explantes de cotiledones que obtenidos a partir de plántulas germinadas *in vitro* con 7 días de edad fueron los únicos explantes capaces de regenerar brotes y embriones somáticos.

Además de los factores relacionados con el explante, el genotipo de *Jatropha curcas* también desempeña un papel crucial en la capacidad regenerativa. Se ha observado que las variedades tóxicas de *Jatropha* exhiben una mayor capacidad de regeneración en comparación con las variedades no tóxicas (Zhou et al. 2022). Esta disparidad en la eficiencia de regeneración podría estar relacionada con la presencia de compuestos tóxicos, como la curcina y la curcasina, en las variedades tóxicas. Estos compuestos pueden influir en la regulación del metabolismo de los reguladores de crecimiento vegetal y en la respuesta del tejido a los mismos. Los genotipos tóxicos tienden a tener una mayor habilidad para la formación de callos y la inducción de embriones somáticos en comparación con los genotipos no tóxicos debido a que los compuestos tóxicos pueden desencadenar respuestas fisiológicas y morfológicas específicas en las células vegetales (Sharma et al. 2011). Se ha demostrado que estos compuestos pueden alterar la biosíntesis y el transporte de auxinas, citoquininas y otras hormonas vegetales, lo que puede tener un impacto significativo en la capacidad de los tejidos para desdiferenciarse, proliferar y regenerar. (García-Rojas et al. 2014). El presente estudio ha permitido encontrar las condiciones necesarias para lograr la regeneración mediante dos vías diferentes de *Jatropha curcas* a pesar de que la variedad empleada no contiene los compuestos tóxicos que influyen positivamente en la respuesta a los reguladores de crecimiento vegetal.

## 6.2 Alteraciones histológicas durante la regeneración vía ODN y ES

Para estudiar los eventos celulares que conducen a la regeneración vía organogénesis *de novo* y embriogénesis somática, se dio seguimiento a las respuestas morfogénicas desde el explante inicial hasta que la formación de brotes o de masas proembriogénicas se distinguían a simple vista.

### 6.2.1 Histología de la regeneración en cotiledones vía DNSO

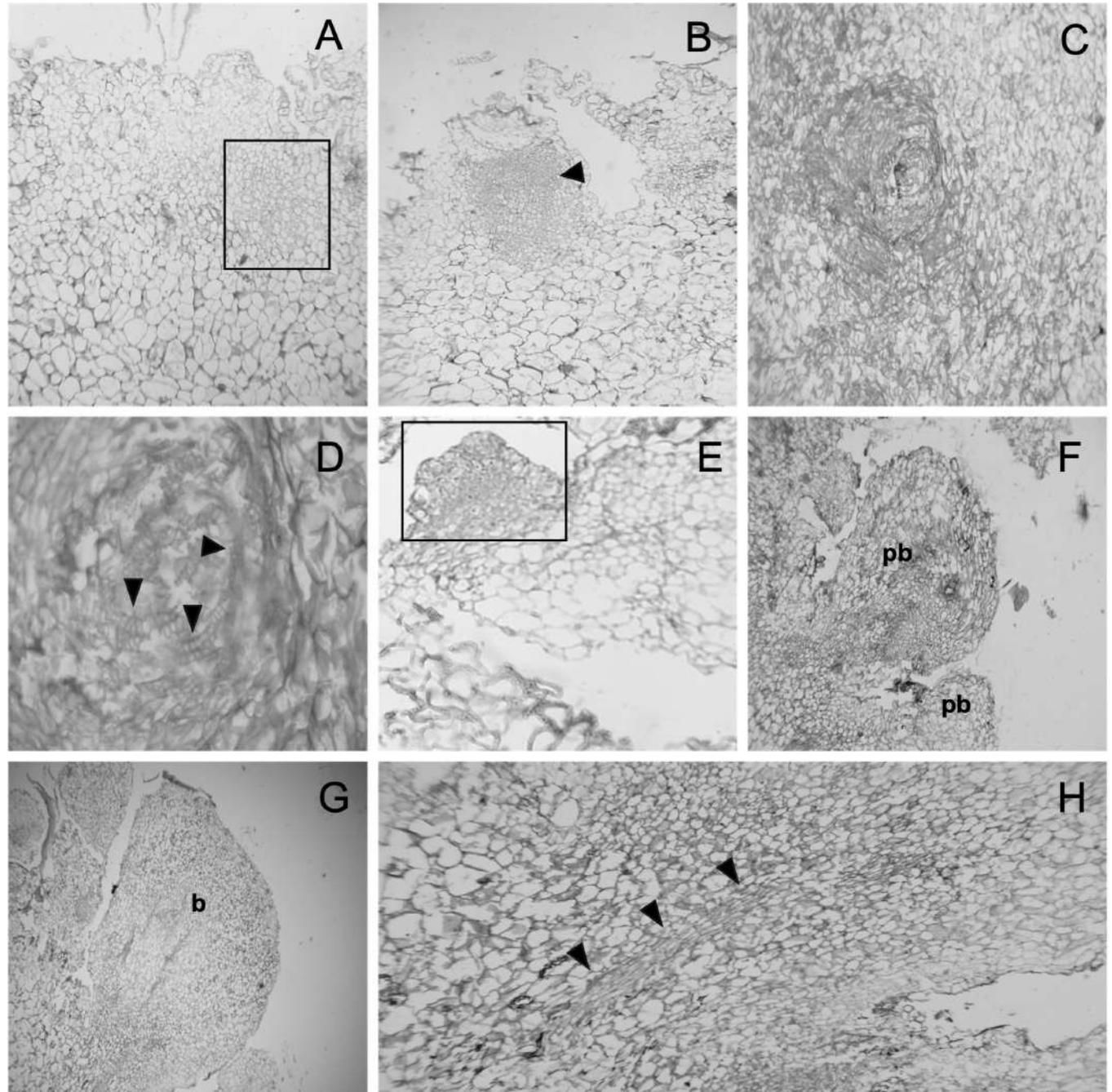
Después de 7 días de cultivo en TIB1 CIM, las secciones de cotiledones cultivadas exhibieron hipertrofia en la región vascular con la diferenciación de un gran número de elementos similares a traqueidas. Durante las etapas iniciales de la formación de callos, las células parenquimáticas en la región subepidérmica readquirieron su capacidad de división y produjeron una masa indiferenciada de células llamada callo primario (Fig. 7A). Las células del callo primario se caracterizan por tener un citoplasma denso. La división y el crecimiento de las células del callo continuaron, lo que resultó en el aumento de tamaño del callo primario después de 14 días en CIM (Fig. 7B). La transferencia del callo a condiciones que favorecen el crecimiento organizado (TIB1 SIM) llevó a la formación de meristemoides (Fig. 7C). Los meristemoides son grupos localizados de células similares al cambium que pueden vascularizarse debido a la aparición de traqueidas en el centro (Fig. 7D). La formación de meristemoides en cultivos de callos puede representar su asociación con una etapa temprana del desarrollo de brotes vegetativos (Kulchetsckiet al., 1995). Se ha reportado que en cultivos de callos derivados de

cotiledones de *J. curcas*, la formación de meristemoides se da dentro de 3-4 semanas de cultivo en CIM (Varshney et al. 2011). Se encontró que los meristemoides se originan en la región periférica de las células del callo organogénico. A medida que aumentaba el volumen del callo primario, los derivados comenzaron a diferenciarse en grandes células parenquimatosas, mientras que las células iniciales aparecían teñidas oscuras a los 28 días totales de cultivo (Fig. 7E). Posteriormente, las células del callo crecieron más en SIM y se observó la formación de primordios de brotes pequeños que fueron aumentando su tamaño hasta convertirse en brotes tras 42 días de cultivo (Fig. 7F y G). Dado que no se pudo observar ninguna conexión vascular entre el explante del cotiledón y los primordios de brotes, se puede concluir que el origen de los brotes vegetativos fue adventicio (Fig. 7H).

Kulchetscki et al. (1995) informaron sobre la formación de promeristemoides en la región subepidérmica que posteriormente se desarrollaron en meristemoides y primordios de brotes. Un patrón similar de formación de meristemoides también fue observado por Sujatha et al. (2000) en *J. integerrima*. Kumar et al. (2018) mostraron que los brotes vegetativos diferenciados se originaron a lo largo de la porción de nervadura central de la hoja en *J. curcas*. En el presente estudio, el origen de la mayoría de los meristemoides en los cultivos de *J. curcas* parecía ser de la región periférica de las células del callo organogénico. Mitrofanova et al. (2019) observaron que cuando los meristemoides se originaban en tejidos internos, la formación de brotes vegetativos se daba de forma anormal. Los meristemoides que se originaron a partir de células profundamente ubicadas se vieron limitados en su desarrollo, lo cual podría ser resultado de la supresión

ejercida por las células periféricas. En nuestro estudio, se observaron domos meristemáticos en la superficie del callo en regeneración (Fig. 6E). Después de 8 semanas de cultivo en SIM,. Estos meristemas de brote desarrollados a partir del callo posteriormente se convirtieron en brotes (Fig. 6F). En conjunto las observaciones realizadas constituyen una sólida evidencia histológica de la inducción de callo y los pasos subsiguientes en la regeneración de brotes a partir de explantes de cotiledones vía ODN.

**Figura 7** Caracterización anatómica de la organogénesis de novo de brotes de *Jatropha curcas* a partir de cotiledones. Todos los cortes son longitudinales, solo se muestra el lado adaxial de los explantes (extremo que no estaba en contacto con el medio de cultivo) **A.** Organización histológica del callo primario. Las células subepidérmicas readquirieron la capacidad de división y comienzan la formación de una masa de células indiferenciadas delimitadas por el recuadro. **B.** Callo primario compuesto por células con citoplasma denso característica que señala la capacidad de regeneración. **C.** Tras 14 días de incubación en CIM se observó la formación de meristemoides con evidente vascularización que se señala en **D** con puntas de flechas negras. **E.** Células iniciales con capacidad de formación de brote aparecen tras 28 días de cultivo, señaladas por el recuadro negro. **F.** Primordio de brote (pb) que se originó a partir de las células iniciales. **G.** Brote de *J. curcas* con 42 días de cultivo (b), en **H** se observa la sección central del brote señalada con puntas de flecha negras sin detectar conexión vascular entre el explante y el primordio.

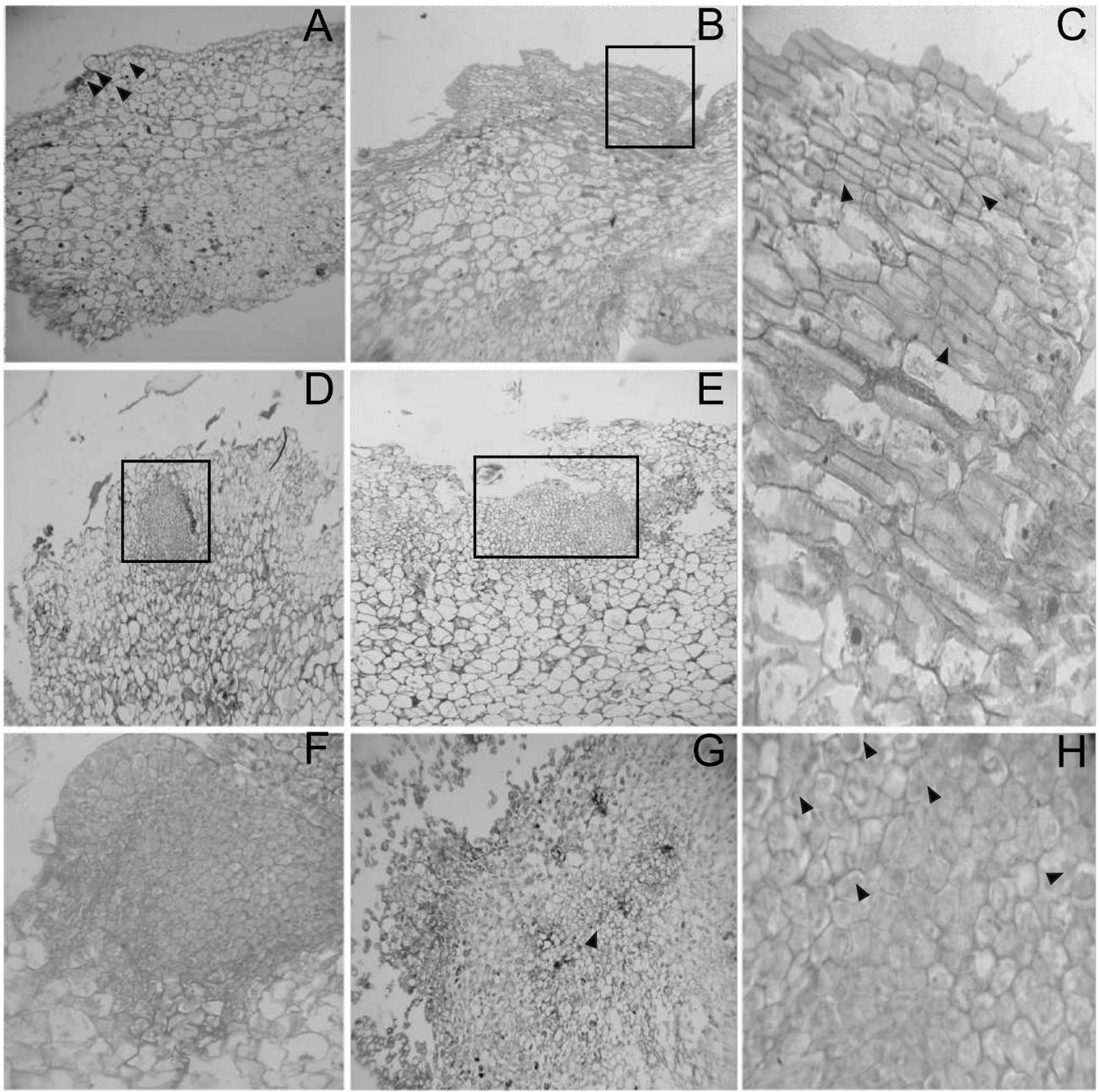


## 6.2.2 Histología de la regeneración en cotiledones vía ES

Los explantes cultivados en medios MS suplementado con tratamiento inductor de ES también formaron protuberancias tras 7 días de cultivo, mismas que en la embriogénesis somática de *Passiflora cincinnata* ocurren gracias a divisiones anticlinales de las células de la epidermis del lado abaxial de los explantes (cotiledones) (Rocha et al., 2016). Las células del explante de *Jatropha* en esta etapa tenían forma isodiamétrica con citoplasma denso y con núcleo grande con forma esférica (Fig.8A) . En el estudio de Rocha et al. (2016) las células subepidérmicas del mesófilo mostraron planos de división mezclados y las células del lado adaxial se dividieron de forma periclinal preferencialmente. En el caso de *Jatropha*, las células epidérmicas del lado adaxial mostraron también planos de división mezclados (Fig. 8B y C). Después de 14 días de cultivo, las células epidérmicas del lado abaxial se expandieron formando estructuras similares a los meristemoides observados en DNSO pero sin formación de tejido vascular (Fig 8D y E). Al igual que en los meristemoides formados durante la organogénesis, las células epidérmicas de las protuberancias formadas muestran citoplasma denso y núcleos muy evidentes que concuerdan con las descripciones realizadas para *P. cincinnata* y *P. edulis* de células que conforman las masas proembriogénicas (Fig. 8F y G). En contraste con lo anterior, en *Quercus suber* la división y proliferación de las células epidérmicas y del mesófilo durante ensayos de regeneración de embriones somáticos a partir de cotiledones no resultó en la formación de estructuras embriogénicas, sin embargo, protuberancias debidas a la división de células del parénquima y de los tejidos vasculares si mostraron características meristemáticas (Puigderrajols et al. 2001).

Transcurridos 28 días de cultivo, el desarrollo de las protuberancias resultó en estructuras callosas fácilmente disgregables y de forma similar a un domo. El análisis de este tipo de estructuras permitió determinar que estaban compuestas por células libres proliferantes que fueron envueltas por células derivadas de la epidermis, y se catalogaron como zonas proembriogénicas ya que concuerda con las características observadas también en *Theobroma cacao* y *Arabidopsis thaliana* (García et al., 2018; Kurczyńska et al., 2007). Tras 42 días de cultivo, estas zonas formaron estructuras globulares compuestas de agregados de células meristemáticas sin ninguna conexión vascular con el tejido del explante (Fig. 8G). Este tipo de estructuras halladas durante la ES en *P. cincinnata* mostraron una capa de células tipo protodermo y por lo tanto fueron catalogadas como embriones globulares. En el caso de *Jatropha curcas*, en las estructuras globulares no se observa la capa de protodermo, sin embargo, se observó que dichas estructuras estaban conformadas por células que contenían gránulos en su citoplasma (Fig.8H). En distintos estudios en los que se intenta seguir de forma sistemática el desarrollo de estructuras regenerantes vía ES u ODN, el inicio se da con la división de células dentro de las capas de la epidermis o subepidermis del explante (cuando se emplean cotiledones). Las características anatómicas que adquieren estas células del lado abaxial como núcleo grande con varios nucléolos, citoplasma denso y la aparición de agregados de almidón, son considerados marcadores de competencia meristemática (Verdeil et al. 2007), lo que sugiere su potencial de proliferar y diferenciarse en embriones somáticos de acuerdo con el estímulo proporcionado mediante los RCV.

Una variedad de estudios descriptivos anatómicos y estructurales han proporcionado una caracterización detallada de la morfogénesis in vitro subyacente a la progresión desde células somáticas hasta la formación de embriones o meristemas vegetativos de diferentes especies, entre ellas *Passiflora edulis*, *Arabidopsis thaliana*, *Jatropha curcas*, etc. (Rocha et al. 2016; Kurczyńska et al., 2007, García-Rojas et al. 2014). En casi todos los casos, la respuesta morfogénica se inició en la periferia de los explantes (células epidérmicas y subepidérmicas), tal como se describe en *P. cincinnata* (Rocha et al. 2018) y en *P. foetida* (Rosa y Dornelas 2012). Estas observaciones concuerdan con informes recientes sobre la regulación molecular de la morfogénesis in vitro, donde se describe que las células epidérmicas son inherentemente propensas a seguir diferentes vías morfogénicas (Sugimoto et al. 2010). En concordancia con lo anterior, tanto los procesos de ES como de ODN descritos aquí se iniciaron con divisiones celulares en las capas epidérmicas y/o subepidérmicas de los cotiledones. Tanto en ES como en ODN, estas divisiones se pudieron observar tan pronto como 7 días después del inicio del cultivo. Tanto los embriones somáticos como los brotes vegetativos se diferenciaron a partir de zonas preembriogénicas y meristemoides, respectivamente, que a su vez se formaron a partir de las células epidérmicas y subepidérmicas periféricas de los explantes. Con base en esto, el origen tanto de SE como de DNSO en *Jatropha* se podría interpretar como pluricelular, comenzando a partir de grupos fundadores de células meristemáticas similares (aunque anatómicamente distinguibles).



**Figura 8.** Caracterización anatómica de la embriogénesis somática de masas proembriogénicas de *Jatropha curcas* a partir de cotiledones. Todos los cortes son longitudinales, solo se muestra el lado adaxial de los explantes (extremo que no estaba en contacto con el medio de cultivo). **A.** Histología del explante inicial de *Jatropha* donde se observa una protuberancia formada por células con forma isodiamétrica, y núcleo grande señalado por puntas de flecha negras. **B.** Las células de la subepidermis de las protuberancias señaladas en el recuadro mostraron planos de división mezclados, en **C** se señalan divisiones anticlinales y periclinales. **D y E.** Tras 14 días de cultivo las células de las protuberancias se expandieron y formaron estructuras similares a los meristemoides observados en DNSO. **F.** El citoplasma de las células que conforman los meristemoides se tornó denso y el núcleo se hizo muy evidente. En **G** es posible observar que no hay formación de tejido vascular. **H.** Las estructuras proembriogénicas se componen de células que contienen gránulos en su citoplasma (puntas de flecha), hecho que indica su competencia meristemática.

**Tabla 6.** Análisis in silico de las secuencias de interés. Se muestran las accesiones de las secuencias recuperadas a partir de los alineamientos hechos de acuerdo con la sección 5.3.1 así como los dominios conservados en las secuencias de *Jatropha* vs *Arabidopsis*.

Gen	Accesión NCBI	Cobertura (%)	Identidad (%)	Dominio identificado	
<i>JcPLT3</i>	XM_037641768.1	99	59.6	<i>AtPLT3</i> 236	SDCSNKKIADTFGQRFSIYRGVTRHRWTGRYEHLWDNSCRREGQARKGRQVYLGGYDKE 295
				<i>JcPLT3</i> 205	SDC KKIADTFGQRFSIYRGVTRHRWTGRYEHLWDNSCRREGQARKGRQVYLGGYDKE 263
				<i>AtPLT3</i> 296	DKAARAYDLAALKYWNATATTNFPITNYSKEVEEMKHMTKQEFIASLRRKSSGFSRGASI 355
				<i>JcPLT3</i> 264	+KAARAYDLAA+KYW TATTNFP++NY+KE+EEMK+++KQEFIASLRRKSSGFSRGASI 323
<i>JcWUS</i>	XM_012210371.3	83	39.5	<i>AtWUS</i> 25	SGSGGYTCRQTSRWTPPTTEQIKILKELYNNAIRSPTADQIQKITARLRQFGKIEGKNV 84
				<i>JcWUS</i> 26	S G + CRQ+STRWTPPT+QI+ILK+LYN+ +RSP ADQIQ+I+ARLRQ+GKIEGKNV 85
				<i>AtWUS</i> 85	FYWFQNHKARERQKKRFNGTNMTPSSSPNSVMAANDHYHPLLHHHGVPMPQRPANSVN 144
				<i>JcWUS</i> 86	FYWFQNHKARERQKKRF-----TDDVPMQQQQQQQQQQRTA-SAT 126
<i>JcAGL15</i>	XM_012210244.3	88	59.6	<i>AtESR1</i> 1	MGRGKIEIKRIENANSRQVTFSKRRSGLLKKARELSVLCDAEVAVIVFSKSGKLFYSSST 60
				<i>AtESR1</i> 1	MGRGKIEIKRIENANSRQVTFSKRR+GLLKA+EL++LCDAEVAVI+FS +GKLF+SS 60
<i>JcESR1</i>	XM_012230490.3	96	35.5	<i>AtESR1</i> 58	YRGVRRRPWGRYAAEIRDPLSKERRWLGTFDTAEAAACAYDCAARAMRGLKARTNFVYPM 117
				<i>JcESR1</i> 61	YRGVRRRPWGRYAAEIRDPSKERRWLGTFDTAEAAACAYDCAARAMRGLKARTNFVYPT 120
<i>JcRKD4</i>	XM_012231078.1	89	43.1	<i>AtRKD4</i> 136	KRNLLKKRQKLEMSEIKQFFDRPIMKAAKELNVGLTVLKKRCRELGIYRWPHRKLSL 195
				<i>JcRKD4</i> 98	+ RN +K LEM EIK++FD PI KAAKE+NVGLTVLKKRCREL I RWPHRKLSL 156

Esta observación también se informó para callos embriogénicos y organogénicos de *Cyclamen persicum* que se originaron a partir de pequeños grupos de células con características similares (Savona et al. 2012).

### 6.3 Expresión de genes involucrados en la ODN y ES

Las secuencias de aminoácidos obtenidas mediante el alineamiento local de las proteínas codificadas por los genes *JcPLT3*, *JcWUS*, *JcAGL15*, *JcESR1* y *JcRKD4* se reportan en la tabla 6. Para *JcPLT3*, el alineamiento tuvo una cobertura del 99% con un porcentaje de identidad de 59.61% donde se identificó el dominio AP2/ERF, el cual es el responsable de unión al DNA, compuesto por 60-70 aminoácidos (Okamuro et al. 1997). El alineamiento de *JcWUS* arrojó un valor de cobertura de 83% con una identidad del 35%. En este caso se lograron identificar dos dominios relevantes relativamente conservados en la proteína de *Jatropha*. El homeodominio, responsable de la interacción directa con el DNA (tabla 6), y un motivo denominado motivo ácido en el extremo C-terminal que se asocia con la función de activación de la transcripción (información no mostrada) (Kieffer et al. 2006). *JcAGL15* mostró un 88% de cobertura y 59.6% de identidad, dentro de la cual se localizó la caja MADS, que está comprendida por 55 aminoácidos y su función es la de unión al DNA (Hill et al. 2008).

Adicionalmente se analizaron las secuencias de dos genes más que tienen una participación relevante en la regeneración de tejidos en plantas y fue posible hallar secuencias de proteínas de *J. curcas* con porcentajes altos de cobertura; *ESR1* (Enhancer of Shoot Regeneration 1) y *RKD4* (RWP-RK Domain Containing 4). Se sabe

que la sobreexpresión de *ESR1* potencia la regeneración de brotes *in vitro* y se observa el mismo efecto cuando se induce la sobreexpresión de *ESR2*, lo cual implica que *ESR1* y *ESR2* funcionan de forma redundante en la regulación del proceso de organogénesis. En este caso, el alineamiento de las secuencias de aminoácidos permitió identificar el dominio AP2 que al igual que en *JcPLT3*, es responsable de la unión a DNA (Nomura et al. 2009).

La sobreexpresión transitoria de RKD4 es suficiente para inducir genes específicos de la embriogénesis cigótica temprana y también en la embriogénesis somática (Waki et al. 2011). En comparación con otros genes conocidos por inducir la embriogénesis somática, RKD4 parece actuar diferente ya que la progresión de la embriogénesis parece ocurrir una vez que la sobreexpresión transitoria cesa, mientras que la continua sobreexpresión mantiene a las células en un estado embriogénico temprano (Zulwanis et al. 2020) Su dominio RWP-RK está presente en el extremo C terminal y está constituido por una secuencia consenso RWPXRK que ha sido descrita como característica de esta familia de factores de transcripción en *Arabidopsis* y en *Triticum aestivium* y es este dominio el que le permite interactuar con el DNA dada su estructura HLH (Chardin et al. 2014). El ortólogo en *Jatropha* (*JcRKD4*) obtuvo en el alineamiento local un porcentaje de identidad de 43% y se identificó el dominio RWP-RK conservado. Una vez que se corroboró la presencia de dominios relevantes en la función de cada uno de los factores de transcripción de interés, procedimos a diseñar los oligonucleótidos que se reportan en la tabla 7.

**Tabla 7** Secuencias de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de RT-qPCR. En el anexo se reportan las secuencias completas de los genes analizados, así como las zonas elegidas para el diseño de los oligonucleótidos.

Gen	Sentido	Secuencia	Producto (pb)
<i>PLT3</i>	Directo	5' CTCACTGAGGAGGAAGAGTAGTGGG 3'	149
	Reverso	5' CCGCTTCTCCTCAGTGGCAAATG 3'	
<i>WUS</i>	Directo	5' CCCTAGTTTTACTTCTCCTGGGTTTTCTT 3'	144
	Reverso	5' CCACCAGCTGATATTGAACACTCCC 3'	
<i>AGL15</i>	Directo	5' TTCTCTAGTGCTGGCATGAAGAGAACA 3'	167
	Reverso	5' CCCAAAAGCCGCAATTGTTTCACTT 3'	
<i>EF1a</i>	Directo	5' CACACCTCCCACATTGCTGTTAAG 3'	199
	Reverso	5' GCATGTCCCTCACAGCAAAACG 3'	
<i>ESR1</i>	Directo	5' TCTACTGACAAGGTTGACAGTGCAG 3'	168
	Reverso	5' CTCAAAATGTGCTTGCCCTCCATG. 3'	
<i>RKD4</i>	Directo	5' CCATTGGAGAGCTTCTTCGAGTTGG 3'	185
	Reverso	5' TTTCTTAACCTCCTCTCTTCCCTCCAC 3'	

### 6.3.1 Especificidad de oligonucleótidos

Las curvas melting de los productos amplificados a partir de muestras de RNA obtenidas de eje embrionario con los oligonucleótidos reportados en la tabla 7. *JcPLT3*, *JcAGL15*, *JcWUS*, así como *JcEF1 $\alpha$*  mostraron un solo pico, correspondiente a una Tm específica que coincidió con la predicha con ayuda del software uMelt (Fig. 9) y mediante una electroforesis en gel de agarosa se pudo observar una sola banda de peso molecular

correspondiente a cada uno de los genes mencionados (Fig. 10A y B), indicando la especificidad de estos cuatro pares de oligonucleótidos.

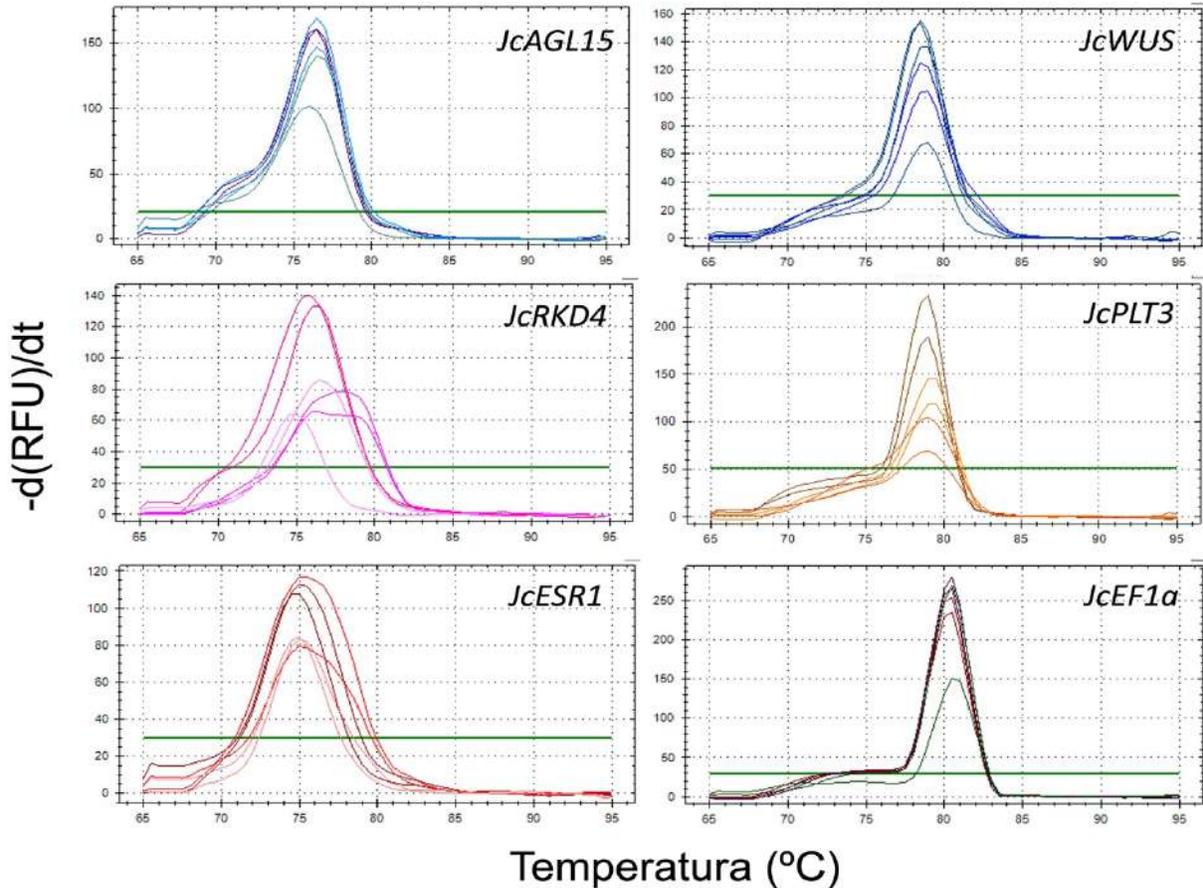
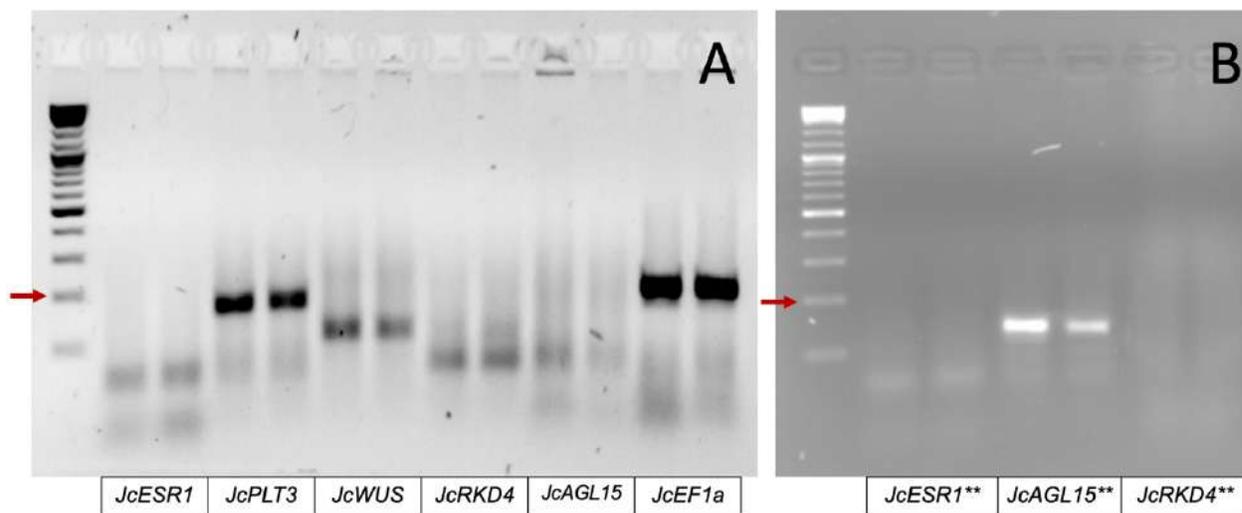


Figura 9. Curva melting de productos de qPCR de los genes evaluados en eje embrionario maduro de *Jatropha curcas*. En cada curva se muestran 6 líneas que corresponden a las diferentes temperaturas de añeamiento evaluadas para la optimización de las condiciones de reacción para cada gen. *JcWUS*, *JcPLT3*, *JcEF1a* y *JcAGL15* muestran picos delgados a temperaturas superiores a 75° C en todas las temperaturas probadas lo cual es deseable ya que es indicativo de la especificidad de los oligonucleótidos y aunque la altura de los picos varía dentro de las mismas muestras solo es indicativo de la cantidad de copias del amplicón. En *JcRKD4* y *JcESR1* se observan curvas melting con picos anchos a temperaturas menores a 75 °C y con algunos hombros, lo cual indica que posiblemente la presencia de más de un amplicón y por lo tanto que los oligonucleótidos son inespecíficos.



**Figura 10.** Electroforesis en gel de agarosa de productos de qPCR. La flecha roja señala la banda del marcador de peso molecular correspondiente a 200 pb. En A se muestran los productos de la amplificación en muestras del tejido control (eje embrionario). En la parte inferior del gel se indican los genes que se amplificaron. El tamaño de los aplicones esperado para JcESR1 es de 168 pb, para JcPLT3 149 pb, JcWUS 144 pb, JcRKD4 185 pb, JcAGL15 167 pb y para JcEF1a 199 pb. Las bandas de los amplicones de JcESR1, JcAGL15 y JcRKD4 no corresponden al peso esperado ya que en los tres casos la banda se observa por debajo de las 100 pb. En B se muestran los resultados de la amplificación de JcESR1, JcAGL15 y JcRKD4 con nuevos oligonucleótidos diseñados bajo los mismos parámetros que los empleados para el resto de los genes de interés, pero en una zona diferente de la secuencia codificante. Solo se encontraron resultados favorables en el caso de JcAGL15 con los nuevos oligonucleótidos (reportados en la tabla 7) cuyo producto se esperaba del mismo tamaño que el predicho con los primeros oligonucleótidos diseñados (no reportados), 167 pb.

En las curvas melting de los genes JcESR1, y JcRKD4 se observaron picos a temperaturas relativamente bajas (aproximadamente 75°C), anchos y en algunos casos con hombros que denotaron la presencia de dos posibles amplicones en el producto de

la reacción, aunado a lo anterior, en la electroforesis en gel de agarosa únicamente se observaron bandas menores a 100 pb, por lo que concluimos que probablemente los oligonucleótidos de estos dos genes dimerizaron durante la reacción (Fig. 10A). Posteriormente realizamos una reacción de RT-qPCR con gradiente de temperatura de alineamiento (55, 55.7, 57, 59, 61.4, 63.3, 64.5, 65°C) para observar el comportamiento de estos, sin embargo, no se obtuvo bajo ninguna temperatura probada un amplicón del peso molecular esperado ni con  $T_m > 75^\circ\text{C}$  (datos no mostrados).

Se planificó abarcar el análisis de la expresión de estos genes con papeles muy relevantes en la regeneración, sin embargo, debido a limitaciones prácticas y de tiempo se decidió dejarlos fuera de este estudio.

### 6.3.3 Niveles de expresión relativa de *JcPLT3*, *JcWUS*, y *JcAGL15* durante los procesos de regeneración.

Para determinar los niveles de expresión de los genes blanco que probablemente están involucrados en los procesos de regeneración en *Jatropha curcas*, empleamos el método de normalización doble delta Cq ( $\Delta\Delta\text{Cq}$ ) que permite calcular la expresión relativa de un gen problema, respecto a un gen de referencia, siendo este último generalmente un gen constitutivo. Este método es uno de los más utilizados para obtener cuantificaciones rápidas de muchos genes ya que no tiene en cuenta la eficiencia de la reacción.

Los valores obtenidos para cada gen blanco son normalizados con los niveles de Cq obtenidos para el gen de referencia (Livak et al., 2001). Para ello se emplea la fórmula

$2^{-\Delta\Delta Cq}$ . Dónde:

$$\Delta Cq = Cq \text{ (gen blanco)} - Cq \text{ (control endógeno)}$$

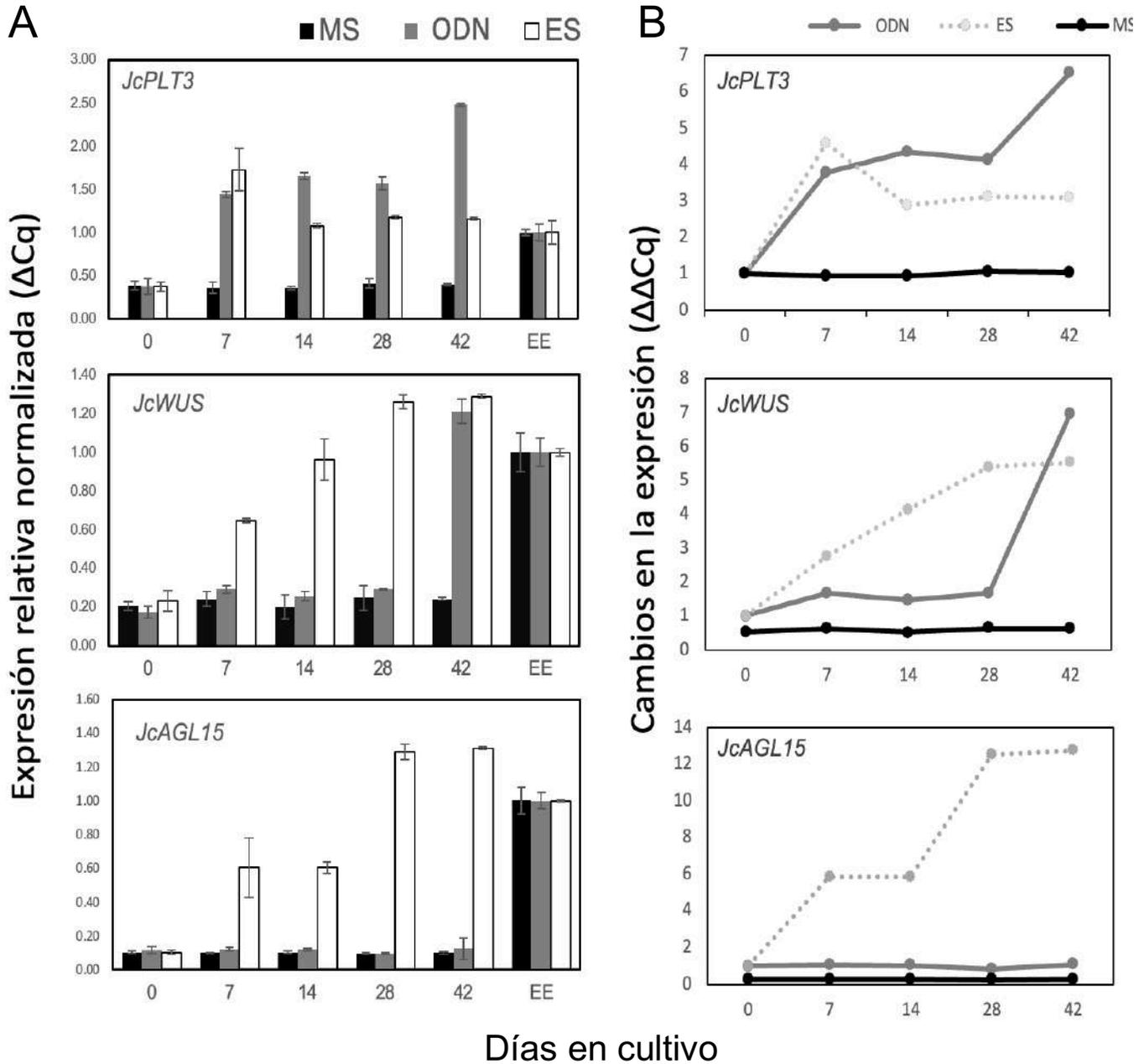
$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq - \Delta Cq \text{ (tejido de referencia)}$$

$2^{-\Delta\Delta Cq}$  = Incremento de la expresión del gen blanco sobre el tejido de referencia

En el presente trabajo, el gen *JcEF1a* fungió como control endógeno y el eje embrionario como tejido de referencia. Los valores Cq del gen blanco y del de referencia se corrigieron con los obtenidos en el control endógeno para eliminar variaciones debidas a errores de pipeteo, degradación parcial de RNA o diferencias en la eficiencia de la retrotranscripción (Zhang et al. 2010).

Los resultados del análisis de RT-qPCR (Fig.11) mostraron que los RCV indujeron cambios diferentes en la expresión de los tres genes involucrados en la regeneración de tejidos. Para *JcPLT3* se observa que, durante la ODN, 7 días después del inicio del cultivo su expresión aumenta 3.78 veces y se mantiene relativamente estable hasta los 42 días de cultivo donde su expresión alcanza el nivel máximo observado representando un aumento de 6.52 veces respecto al inicio del cultivo, hecho que indica la sensibilidad de *JcPLT3* durante la ODN ante el cambio en la concentración de RCV en el medio de cultivo que fue cambiada a los 28 días. En el caso de la embriogénesis somática *JcPLT3* alcanza su máxima expresión a los 7 días con un aumento de 4.59 veces y posteriormente el nivel de expresión baja, aunque se mantiene regulado al alza, pero en menor proporción registrando en promedio un aumento de 3.03 veces respecto

al inicio del cultivo, siendo insensible a la eliminación de las auxinas del medio de cultivo a los 28 días después del inicio del tratamiento.



**Figura 11.** Expresión de *JcPLT3*, *JcWUS*, y *JcAGL15*. A. Niveles de expresión relativa en tejidos regenerados de *Jatropha curcas* vía organogénesis de novo y embriogénesis somática. En negro se muestran los niveles de expresión de los genes evaluados en tejidos cultivados en medio Murashige y Skoog (MS), en gris los evaluados en el

*tratamiento que presentó los mejores resultados en la inducción de la organogénesis de novo TIB1 y en blanco los de TIE2 que indujo embriogénesis somática. La expresión de todos los genes de interés se evaluó en eje embrionario (EE) siendo empleado como tejido de referencia. B. Cambios en el nivel de expresión de los genes involucrados en la regeneración de J. curcas respecto del inicio del tratamiento de inducción. La línea negra representa las determinaciones hechas a partir de tejido cultivado en medio MS, la línea gris en medio inductor de organogénesis de novo TIB1 y la línea punteada en medio inductor de embriogénesis somática TIE2.*

Existe gran evidencia que sugiere que la activación del programa de desarrollo de una raíz lateral es el mecanismo que guía la formación de callo a partir de diferentes tejidos y que dicho proceso es relevante para la adquisición de competencia durante la formación de nuevos meristemas de partes aéreas, pues durante la formación de callo, algunas poblaciones celulares adquieren pluripotencia mediante la inducción de la expresión de genes reguladores del nicho de células troncales de la raíz (Atta et al. 2009, Sugimoto y Meyerowitz 2010, Shin et al. 2020). Se ha observado que la expresión de *PLT3* junto con *PLT5* y *PLT7* está regulada al alza tras 3 días de incubación en explantes provenientes de cotiledones, hipocótilos y raíces de *Arabidopsis* en un medio de inducción de callo (MIC) rico en auxinas. *PLT3*, *5* y *7* funcionan como reguladores transcripcionales de los genes *PLT1* y *PLT2*, que junto con *WOX5*, *SCR*, *SHR*, *RCH1*, regulan la formación del nicho de células troncales de la raíz, y mutantes triples *plt3 plt5 plt7* muestran una capacidad reducida para la regeneración de brotes (Atta et al. 2009, Kareem et al. 2015). Se sabe que los genes determinantes para el establecimiento de la pluripotencia se encuentran regulados a la baja en callos generados en medios de inducción ricos en citoquininas, que posteriormente fracasan en la regeneración de

brotos. En cambio, cuando los callos se inducen en medios ricos en auxinas si son competentes para la regeneración de brotes, lo cual es evidencia de que las auxinas juegan un papel importante en los cambios moleculares requeridos tanto para el establecimiento de la potencialidad celular, como para la capacidad de regeneración de brotes (Radhakrishnan et al. 2018). Lo anterior está asociado con la expresión de *PIN1* y el establecimiento de dominios de respuesta auxinas donde se ha visto que *PLT3* tiene cierta relevancia, pues en callos generados a partir de explantes obtenidos de mutantes triples de *Arabidopsis* *plt3; plt5-2; plt7*, la expresión de *PIN1* se encontró regulada a la baja después de 6 días y fue indetectable tras 8 días. Así mismo durante la incubación en medios de inducción de brotes la actividad de las auxinas se observó dispersa, sin señales de acumulación localizada, en contraste con los callos inducidos a partir de plantas silvestres, demostrando así la relevancia de *PLT3*, 5, y 7 tanto en las fases tempranas de la regeneración, como en la formación de brotes influenciando la expresión de *PIN1* y por lo tanto el transporte polar de auxinas (Kareem et al. 2015). En el caso de la embriogénesis somática, en los callos competentes para la formación de embriones se observa la formación de dominios de respuesta auxinas que son establecidos por *PIN1* una vez que estos se incuban en medios libres de RCV. Aunado a esto hay un incremento de concentración de auxinas endógenas, comienza la expresión de *WUS* y *WOX5* en poblaciones celulares cercanas a los dominios de respuesta a auxinas previamente establecidos (Su et al. 2015). En *Jatropha*, la aparición de callo en explantes de cotiledones cultivados en los medios de inducción tanto de ODN como de ES, se hizo evidente tras 7 días de incubación, hecho que coincide con la sobreexpresión de *JcPLT3* en ambos tratamientos (Fig.11). Sin embargo, el tratamiento de inducción de callos para

la ODN contenía mayor concentración de citoquininas que de auxinas, y en contraste con lo reportado para *Arabidopsis*, estos callos mostraron ser competentes para formar brotes tras la incubación en el respectivo medio inductor. En el caso de la ES, donde el tratamiento de inducción de callos no contiene citoquininas, la expresión de *JcPLT3* se observa estimulada en mayor medida que en la ODN tras 7 días, pero posteriormente baja significativamente y se mantiene de forma constante en un nivel de expresión basal.

Los callos regenerados bajo este tratamiento conformado únicamente por auxina mostraron competencia parcial de regeneración de embriones pues únicamente se desarrollaron hasta la fase globular, una vez incubados en medio libre de RCV, no se observó progresión de las estructuras globulares.

Las citoquininas también tienen una participación importante durante la regeneración vía ODN y ES. Durante la ODN, las citoquininas participan de manera importante en la fase de incubación en medio inductor de brotes mediando un evento molecular clave que consiste en la activación transcripcional de *WUSCHEL (WUS)*. Se ha reportado que la sobreexpresión de este gen es suficiente para desencadenar la formación de brotes ectópicamente y mutantes de pérdida de función de *WUS* son incapaces de regenerar aún en medios de inducción ricos en citoquininas (Gordon et al. 2007). En el caso de la ES, se ha observado que tras el establecimiento de los dominios de respuesta a auxinas vía transporte polar dependiente de *PIN1*, el nivel de auxinas endógenas incrementa dentro de las primeras 12h de incubación en medio libre de RCV, debido a la síntesis de

novo dependiente de *YUC*. En las posteriores 24h a la transferencia, *WUS* y *WOX5* comienzan a expresarse en poblaciones celulares cercanas a los dominios de respuesta a auxinas (Su et al. 2009).

La expresión de *JcWUS* durante la ODN en *Jatropha* no muestra cambios significativos hasta 42 días de cultivo donde se observa regulado al alza con un aumento de 4.47 veces (Fig. 11A). En cambio, durante la embriogénesis somática, *JcWUS* muestra un incremento gradual en su expresión desde los 7 días de cultivo hasta alcanzar su máximo registro a los 42 días que representó 5.52 veces más expresión respecto del inicio del cultivo, sin embargo, desde los 28 días ya se observaba un aumento similar en la expresión de este regulador clave de la formación del meristemo apical de partes aéreas (Fig. 11B).

En la ODN, la presencia de citoquininas en el medio inductor de callo aparentemente no es suficiente para inducir la expresión de *JcWUS* en contraste con lo observado en *Arabidopsis*, sin embargo, esto no se vio reflejado en el éxito de la regeneración puesto que aun con baja expresión, la aparición de brotes se registró desde los 21 días de cultivo en medio inductor de callo. En este sentido, se sabe que únicamente un grupo selecto de células comienza a expresar *WUS* a pesar de que la activación en respuesta a citoquininas se da en todo el tejido, hecho que indica que la activación por citoquininas no es suficiente para inducir a *WUS*, se requiere además de los factores de transcripción *PHABULOSA (PHB)*, *PHAVOLUTA (PHV)*, y *REVOLUTA (REV)* para la inducción de *WUS* dependiente de citoquininas y para la subsecuente regeneración (Zhang et al. 2017). Aunque la expresión de *JcWUS* es baja en los tratamientos de ODN en

comparación con el control (EE), el registro es ligeramente mayor que el de los explantes cultivados en medio MS sin RCV desde el día 7, lo que probablemente sea reflejo de la activación de *JcWUS* en un número muy limitado de células. La sobreexpresión de *JcWUS* a los 42 días coincide con mayor aparición de brotes regenerados (Fig. 12).

Por otro lado, la relación entre el incremento en la expresión de *JcWUS* y la aparición de estructuras globulares durante la ES de *Jatropha* es clara puesto que dicha aparición de regenerantes se registró tras 21d de cultivo, momento en el cual *JcWUS* probablemente ya había alcanzado la sobreexpresión de acuerdo con la tendencia que se aprecia en la Fig. 11. La expresión de *JcWUS* parece estar estimulada por la presencia de auxinas desde la fase de inducción de callo, pues desde entonces la expresión va al alza posiblemente en respuesta a la concentración de auxinas en el medio de cultivo, aunque se sabe que en *Arabidopsis*, la respuesta celular a citoquininas también es requerida para el proceso de embriogénesis somática y esta es establecida tras la transferencia de los callos a medio libre de RCV (Su et al. 2009).

La forma en la que las células somáticas adquieren identidad embrionaria bajo condiciones de cultivo inductoras de la ES se desconoce, pero se ha observado que el factor de transcripción tipo MADS-box *AGAMOUS-LIKE 15 (AGL15)* induce la embriogénesis somática cuando se encuentra sobreexpresado en *Arabidopsis*, y lo mismo se observa con otros factores de transcripción como *LEAFY COTYLEDON 1 y 2 (LEC1 y LEC2)*; y *BABY BOOM (BBM)* (Horstman et al. 2017). Varios estudios transcriptómicos han logrado descubrir una red transcripcional que establece interacciones entre varios reguladores transcripcionales de la embriogénesis, incluyendo a *AGL15*, que se ha visto que forma bucles de retroalimentación positiva con *LEAFY*

*COTYLEDON 2 (LEC2)*, ambos son requeridos junto con *LEC1* para la activación de *BABY BOOM (BBM)* y viceversa (Zheng et al. 2009). Muchos de estos reguladores embriogénicos promueven la embriogénesis a través de la modulación de la señalización que conduce a la biosíntesis de auxinas (Zhao et al. 2010).

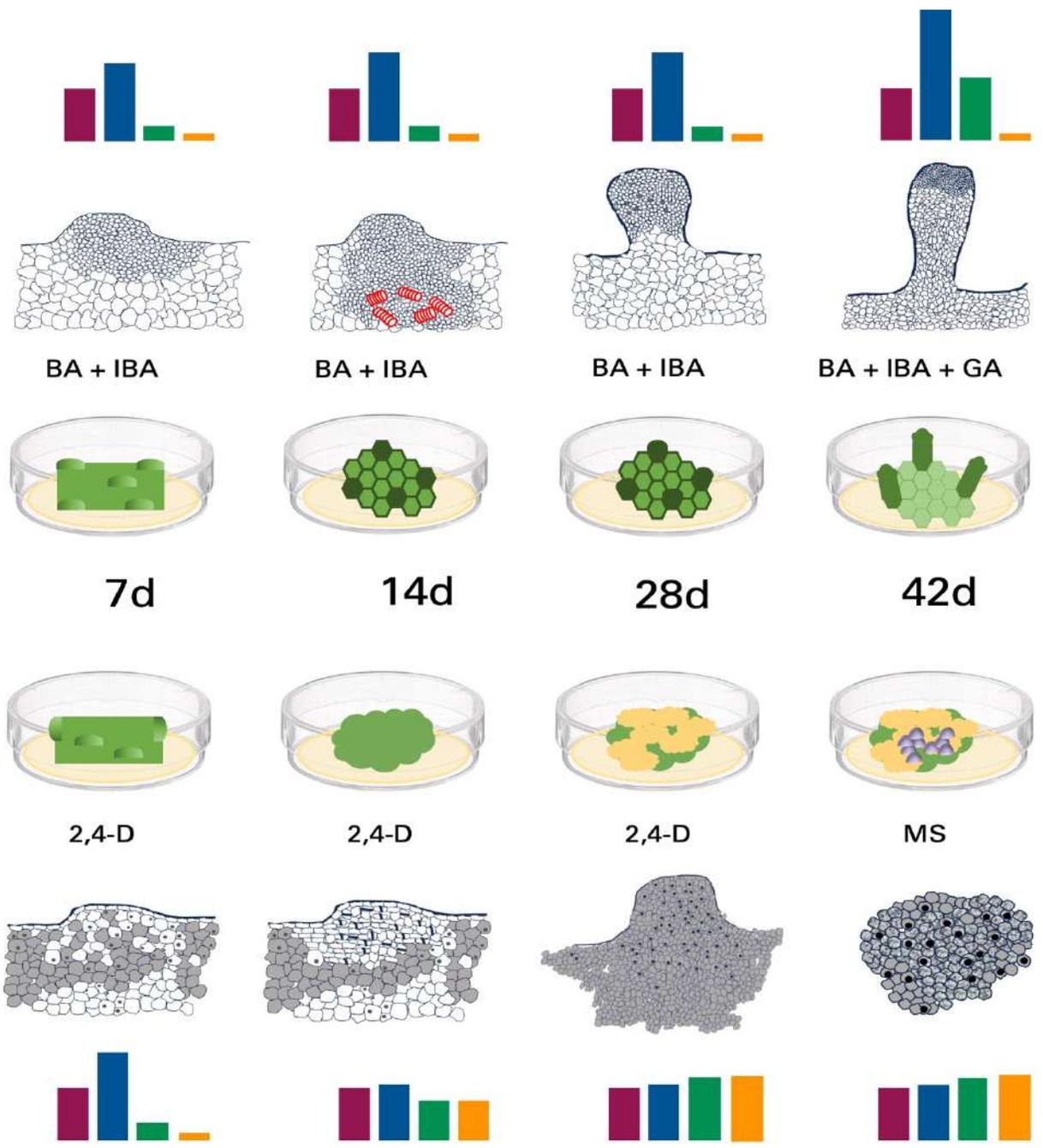
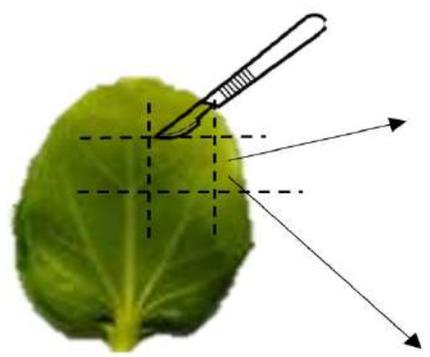
La expresión de *JcAGL15* en *Jatropha* registra un incremento en su expresión a los 7 y 14 días respecto del inicio del cultivo sin embargo se observa apenas un 60% de expresión con respecto al control endógeno (Fig. 11A). Tras 28 días de cultivo, *JcAGL15* muestra un nuevo incremento alcanzando 12.7 veces más expresión comparado con el inicio del cultivo, lo cual indicó que estaba siendo sobreexpresado, manteniendo el mismo nivel tras la evaluación a los 42 días de cultivo (Fig. 11B). La sobreexpresión de *JcAGL15* tras 28d de cultivo coincide con la de *JcWUS*, hecho que podría relacionarse con la activación de síntesis de auxinas por parte de *JcAGL15*, para posteriormente formar dominios de respuesta cerca de los cuales se estaría expresando *JcWUS*, como ya se ha reportado que sucede en *Arabidopsis* (Zhang et al. 2017), aunque en su caso, la activación de los genes reguladores de la embriogénesis se da en medios libres de auxinas, y en contraste, *JcAGL15* en *Jatropha* comienza a activarse desde la incubación en medio inductor de embriones rico en auxinas.

Durante la ODN, la expresión de *JcAGL15* no mostró cambios significativos, registrando regulación a la baja donde se observaba al gen expresado en un 11% respecto del control endógeno (Fig. 11A). A la fecha no hemos hallado datos sobre la participación de este factor de transcripción en la regeneración de brotes vía ODN.

Sin duda, tanto la embriogénesis somática como la organogénesis de novo son procesos estrictamente inducidos y controlados por dos hormonas clave para el desarrollo de las plantas, las auxinas y las citoquininas y es casi imposible que se lleven a término estos procesos sin estas señales químicas externas (Huang y Yeoman 1995, Che et al. 2006). Esto ha quedado evidenciado no solo en modelos de estudio como *Arabidopsis*, en el presente estudio también se halló evidencia de que este fenómeno se da en plantas tropicales no modelo como lo es *Jatropha* puesto que los explantes incubados en medio sin suplemento hormonal (MS) no se observa formación de estructuras regenerantes y tampoco cambios en la expresión de los genes evaluados (Fig. 11B).

■ *JcEF1a*    ■ *JcPLT3*  
■ *JcWUS*    ■ *JcAGL15*

Organogénesis de novo



Embriogénesis somática

**Figura 12.** Representación esquemática que resume las respuestas morfológicas, histológicas y moleculares obtenidas en *Jatropha curcas* bajo las condiciones de cultivo *in vitro* evaluadas durante el desarrollo del presente trabajo. Demostramos que los explantes obtenidos de cotiledones muestran la mejor respuesta regenerativa en *Jatropha curcas* variedad mexicana no tóxica vía organogénesis de novo y también vía embriogénesis somática. El hipocótilo presentan una buena capacidad de generación de callo sin embargo este no muestra las características descritas por diferentes autores para considerarse como competente para la regeneración de tejido. El uso de BA en combinación con IBA en baja concentración resultó efectivo en la inducción de organogénesis de novo logrando regenerar hasta 12 brotes por explante de *Jatropha* empleado. Por otro lado, el 2,4-D fue suficiente para inducir embriogénesis somática en cotiledones de *Jatropha*, pero la remoción del regulador de crecimiento vegetal es necesaria después de 28 días de incubación para que se dé la formación de masas proembriogénicas. Dado que el genotipo de *Jatropha* es un factor muy relevante en el establecimiento de un protocolo de regeneración, las condiciones de cultivo establecidas en este estudio representan un avance significativo en la superación de las limitaciones que presenta esta planta de interés biotecnológico ante la explotación de su potencial.

El análisis histológico de los regenerantes vía ODN mostró que después de 7 días de cultivo, las células epidérmicas y subepidérmicas dan origen a callos primarios y posteriormente a meristemoides que llegarán a formar primordios de brotes. En la vía de regeneración por ES, las primeras señales de respuesta también se encontraron tras 7 días de incubación de los explantes con la formación de protuberancias compuestas por células competentes para la regeneración provenientes de la región subepidérmica del

explante. A partir de estas células se formaron masas proembriogénicas compuestas por células meristemáticas. Considerando la vía embriogénica como una asociación de dos programas "organogénicos" separados (el establecimiento simultáneo de las vías de formación de meristemas de brotes y raíces), es posible sugerir que ES y ODN comparten, al menos en parte, programas de desarrollo similares. De hecho, se ha informado que la señalización de auxinas a través del transporte polar es necesaria en los primeros pasos tanto de SE como de ODN para especificar las identidades celulares (Gordon et al. 2007; Petrašek y Friml 2009), reclutando posiblemente los mismos patrones de expresión génica diferencial y, en consecuencia, modificaciones celulares similares en las etapas tempranas de ambas vías. El sistema que describimos aquí para inducir alternativamente ES o ODN a partir de un mismo tipo de explante podría ser una herramienta muy útil para estudiar los patrones de expresión de genes conocidos por ser inducidos durante las etapas tempranas de los procesos de ES y ODN.

Este estudio también ha permitido tener un primer vistazo del comportamiento de algunos genes clave en la regulación de la regeneración indirecta vía ODN y ES en *Jatropha curcas*. *JcPLT3* muestra mayor actividad en presencia de citoquininas en contraste con hallado en *Arabidopsis* donde se encuentra mayormente expresado en medios ricos en auxinas, y aunque se ha reportado que los callos inducidos en citoquininas encuentran dificultades para llevar a cabo la regeneración de brotes, en *Jatropha* no se detectó dicho fenómeno puesto que los callos inducidos en el tratamiento elegido (conformado mayormente por citoquininas), se formaron brotes completos hasta la etapa de dos hojas. Por otro lado, la activación de *JcWUS* en *Jatropha* durante la ODN se observa en etapas tardías de proceso a pesar de la constante presencia de citoquininas y durante la ES su

expresión se ve estimulada desde etapas tempranas de la inducción a pesar de la presencia de auxinas en el medio. *JcAGL15* por su parte alcanza su máxima expresión tras 28d en tratamiento inductor de ES que coincide con la máxima expresión de *JcWUS* lo que sugiere que la expresión de estos dos genes podría estar relacionada como se ha reportado en *Arabidopsis*.

## 7. CONCLUSIONES

La regeneración vía organogénesis de novo en la variedad mexicana de *Jatropha curcas* con genotipo no tóxico empleada es exitosa empleando explantes obtenidos de cotiledones, cultivados en medio MS con suplemento de BA, IBA y GA. La embriogénesis somática es exitosa inoculando cotiledones en medio MS con suplemento de 2,4-D para su posterior remoción del medio tras 28d.

La evidencia histológica soporta tanto la inducción de organogénesis de novo como la embriogénesis somática en la variedad de *Jatropha* empleada. Ambas vías desarrollan fenómenos celulares particulares de cada proceso.

*JcPLT3* y *JcWUS* se sobreexpresan en los tejidos regenerados vía organogénesis de novo. *JcAGL15* permanece en niveles bajos durante todo este proceso de generación de brotes. En cambio, durante la embriogénesis somática los tres genes evaluados se sobreexpresan mostrando su influencia en la regeneración puesto que en tejido sin estructuras regeneradas los tres permanecen regulados a la baja.

## 8. PERSPECTIVAS

Aunque actualmente existe mucha evidencia que demuestra el papel clave que juega la activación de los reguladores del nicho de células troncales en la formación de callos competentes para la regeneración en *Arabidopsis*, no está claro del todo si esta red de regulación que confiere pluripotencia a cierta población celular se encuentra conservada y es necesaria en especies tropicales. Resultaría interesante profundizar en el estudio de la regulación de estos genes puesto que los hallazgos del presente proyecto hacen posible ver que, aunque al igual que en *Arabidopsis* tienen papeles relevantes en la regeneración, en *Jatropha* no siguen el comportamiento reportado en la planta modelo. Una cuestión importante sería indagar en la activación de *JcPLT3* en *Jatropha*, si la concentración endógena de auxinas está compensando la baja concentración de las exógenas, o si es que *JcPLT3* en *Jatropha* se activa mayormente por el estímulo de las citoquininas. Así mismo indagar sobre la actividad de otros factores de transcripción que activan a los reguladores de nicho de células troncales como *PLT5* y *PLT7*. También la distribución de auxinas y citoquininas en los callos de *Jatropha* revelaría si estos tienen efecto en la expresión de *JcWUS*.

Otro aspecto interesante sería el estudio de la interacción de compuestos específicos de *Jatropha*, como la curcina, curcasina, ésteres de forbol, etc., con los RCV y su posible relación con la vía de señalización de genes como *JcWUS*, *JcPLT3* y *JcAGL15*, dado que autores proponen que la presencia de estos compuestos explica la disparidad en la eficiencia de regeneración entre genotipos de *Jatropha*.

## REFERENCIAS

- Abd-Elsalam, K. A. (2003). Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *African Journal of Biotechnology*, 2(5), 91-95.
- 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.
- Appezzato-da-Glória, B., Cury, G., Soares, M. K. M., Rocha, R., & Hayashi, A. H. (2008). Underground systems of Asteraceae species from the Brazilian Cerrado1. *the Journal of the torrey botanical society*, 135(1), 103-113.
- Apte, A., & Daniel, S. (2009). PCR primer design. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(3), pdb-ip65.
- Atta, R., Laurens, L., Boucheron-Dubuisson, E., Guivarc'h, A., Carnero, E., Giraudat-Pautot, V., ... & Chriqui, D. (2009). Pluripotency of *Arabidopsis* xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. *The Plant Journal*, 57(4), 626-644.
- Bahadur, B., Sujatha, M., & Carels, N. (Eds.). (2012). *Jatropha, challenges for a new energy crop: Volume 1: Farming, economics and biofuel*. New York, NY: Springer New York.
- Baran Jha, T., Mukherjee, P., & Datta, M. M. (2007). Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. *Plant Biotechnology Reports*, 1(3), 135-140.
- Bäurle, I., & Laux, T. (2005). Regulation of WUSCHEL transcription in the stem cell niche of the *Arabidopsis* shoot meristem. *The Plant Cell*, 17(8), 2271-2280.
- Birnbaum, K. D., & Alvarado, A. S. (2008). Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. *Cell*, 132(4), 697-710.
- Braybrook, S. A., & Harada, J. J. (2008). LECs go crazy in embryo development. *Trends in Plant Science*, 13(12), 624-630.
- Braybrook, S. A., Stone, S. L., Park, S., Bui, A. Q., Le, B. H., Fischer, R. L., ... & Harada, J. J. (2006). Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(9), 3468-3473.
- Cabrera-Ponce, J. L., López, L., León-Ramírez, C. G., Jofre-Garfias, A. E., & Verver-y-Vargas, A. (2015). Stress induced acquisition of somatic embryogenesis in common bean *Phaseolus vulgaris* L. *Protoplasma*, 252(2), 559-570.
- Cai, L., Fu, L., & Ji, L. (2011). Regeneration of *Jatropha curcas* through efficient somatic embryogenesis and suspension culture. *GM Crops*, 2(2), 110-117.
- Chang, F. C., Ko, C. H., Tsai, M. J., Wang, Y. N., & Chung, C. Y. (2014). Phytoremediation of heavy metal contaminated soil by *Jatropha curcas*. *Ecotoxicology*, 23(10), 1969-1978.
- Chardin, C., Girin, T., Roudier, F., Meyer, C., & Krapp, A. (2014). The plant RWP-RK transcription factors: key regulators of nitrogen responses and of gametophyte development. *Journal of Experimental Botany*, 65(19), 5577-5587.

- Chatfield, S. P., Capron, R., Severino, A., Penttila, P. A., Alfred, S., Nahal, H., & Provart, N. J. (2013). Incipient stem cell niche conversion in tissue culture: using a systems approach to probe early events in WUSCHEL-dependent conversion of lateral root primordia into shoot meristems. *The Plant Journal*, 73(5), 798-813.
- Che, P., Lall, S., Nettleton, D., & Howell, S. H. (2006). Gene expression programs during shoot, root, and callus development in *Arabidopsis* tissue culture. *Plant Physiology*, 141(2), 620-637.
- Cheng, Z. J., Wang, L., Sun, W., Zhang, Y., Zhou, C., Su, Y. H., ... & Cheng, Y. (2013). Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. *Plant Physiology*, 161(1), 240-251P.
- Curaba, J., Moritz, T., Blervaque, R., Parcy, F., Raz, V., Herzog, M., & Vachon, G. (2004). AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136(3), 3660-3669.
- DiCosmo, F., & Towers, G. H. N. (1984). Stress and secondary metabolism in cultured plant cells. In *Phytochemical Adaptations to Stress* (pp. 97-175). Springer, Boston, MA.
- Divakara, B. N., Upadhyaya, H. D., Wani, S. P., & Gowda, C. L. (2010). Biology and genetic improvement of *Jatropha curcas* L.: a review. *Applied Energy*, 87(3), 732-742.
- Efroni, I., Mello, A., Nawy, T., Ip, P. L., Rahni, R., DelRose, N., ... & Birnbaum, K. D. (2016). Root regeneration triggers an embryo-like sequence guided by hormonal interactions. *Cell*, 165(7), 1721-1733.
- El-Sayed, M., Aly, U. I., Mohamed, M. S., & Rady, M. R. (2020). In vitro regeneration and molecular characterization of *Jatropha curcas* plant. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 1-12.
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(4), 385-402.
- Fehér, A., & Magyar, Z. (2015). Coordination of cell division and differentiation in plants in comparison to animals. *Acta Biologica Szegediensis*, 59(suppl. 2.), 275-289.
- Francis, G., Edinger, R., & Becker, K. (2005, February). A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. In *Natural resources forum* (Vol. 29, No. 1, pp. 12-24). Oxford, UK: Blackwell Publishing, Ltd.
- Galáz-Ávalos, R. M., Aguilar-Díaz, S., Xool-González, P. A., Huchín-May, S. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2012). Callus, suspension culture, and hairy roots. Induction, maintenance and characterization. *Plant Cell Culture Protocols*, 29-40.
- Gallois, J. L., Nora, F. R., Mizukami, Y., & Sablowski, R. (2004). WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes & development*, 18(4), 375-380.
- Gangwar, M., Sood, H., & Chauhan, R. S. (2016). Genomics and relative expression analysis identifies key genes associated with high female to male flower ratio in *Jatropha curcas* L. *Molecular Biology Reports*, 43(4), 305-322.
- García-Rojas, M., Fernández-Rodríguez, C., Rivero, R., et al. (2014). Effects of *Jatropha curcas* L. extracts on seed germination, early seedling growth and hormonal profile of

- Raphanus sativus L. *Industrial Crops and Products*, 54, 212-220. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.01.005.
- Garcia, C., Marelli, J. P., Motamayor, J. C., & Vilella, C. (2018). Somatic Embryogenesis in *Theobroma cacao* L. *Plant cell culture protocols*, 227-245.
  - Gazzarrini, S., Tsuchiya, Y., Lumba, S., Okamoto, M., & McCourt, P. (2004). The transcription factor FUSCA3 controls developmental timing in *Arabidopsis* through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Developmental Cell*, 7(3), 373-385.
  - Gliwicka, M., Nowak, K., Balazadeh, S., Mueller-Roeber, B., & Gaj, M. D. (2013). Extensive modulation of the transcription factor transcriptome during somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plos One*, 8(7), e69261.
  - Goel, G., Makkar, H. P., Francis, G., & Becker, K. (2007). Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *International Journal of Toxicology*, 26(4), 279-288.
  - Gordon, S. P., Chickarmane, V. S., Ohno, C., & Meyerowitz, E. M. (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), 16529-16534.
  - Gordon, S. P., Heisler, M. G., Reddy, G. V., Ohno, C., Das, P., & Meyerowitz, E. M. (2007). Pattern formation during de novo assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development*, 134(19), 3539-3548.
  - Hake, S., & Char, B. R. (1997). Cell-cell interactions during plant development. *Genes & Development*, 11(9), 1087-1097.
  - He, W., King, A. J., Khan, M. A., Cuevas, J. A., Ramiamanana, D., & Graham, I. A. (2011). Analysis of seed phorbol-ester and curcumin content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* L. from Madagascar and Mexico. *Plant physiology and biochemistry*, 49(10), 1183-1190.
  - Heller, J. (1996). *Physic nut, Jatropha curcas* L. (Vol. 1). Bioversity International.
  - Heller, J. (1996). *Physic nut Jatropha curcas* L. promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome: International Plant Genetic Resources Institute.
  - Hill, K., Wang, H., & Perry, S. E. (2008). A transcriptional repression motif in the MADS factor AGL15 is involved in recruitment of histone deacetylase complex components. *The Plant Journal*, 53(1), 172-185.
  - Hofhuis, H., Laskowski, M., Du, Y., Prasad, K., Grigg, S., Pinon, V., & Scheres, B. (2013). Phyllotaxis and rhizotaxis in *Arabidopsis* are modified by three PLETHORA transcription factors. *Current Biology*, 23(11), 956-962.
  - Horstman, A., Bemer, M., & Boutilier, K. (2017). A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration*, 4(4), 201-216.
  - Horstman, A., Willemsen, V., Boutilier, K., & Heidstra, R. (2014). AINTEGUMENTA-LIKE proteins: hubs in a plethora of networks. *Trends in Plant Science*, 19(3), 146-157.
  - Huang, B., & Yeoman, M. M. (1995). Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* L. In *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed II* (pp. 371-384). Springer, Berlin, Heidelberg.
  - Huded, A. K. C., Jingade, P., & Mishra, M. K. (2018). A rapid and efficient SDS-based RNA isolation protocol from different tissues of coffee. *3 Biotech*, 8(3), 183.
  - Huy, Duong Huu, Kiyoshi Imamura, Le Tu Thanh, Phuong Duc Luu, Hoa Thi Truong, Hanh Thi Ngoc Le, Boi Van Luu, Norimichi Takenaka, and Yasuaki Maeda. (2016). Fate of toxic phorbol

- esters in *Jatropha curcas* oil by a biodiesel fuel production process. *Clean Technologies and Environmental Policy* 18, no. 7: 2305-2314.
- Ikeda-Iwai, M., Satoh, S., & Kamada, H. (2002). Establishment of a reproducible tissue culture system for the induction of Arabidopsis somatic embryos. *Journal of Experimental Botany*, 53(374), 1575-1580.
  - Ikeuchi, M., Favero, D. S., Sakamoto, Y., Iwase, A., Coleman, D., Rymen, B., & Sugimoto, K. (2019). Molecular Mechanisms of Plant Regeneration. *Annual Review of Plant Biology*, 70, 377-406.
  - Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development*, 143(9), 1442-1451.
  - Ikeuchi, M., Shibata, M., Rymen, B., Iwase, A., Bågman, A. M., Watt, L., & Brady, S. M. (2018). A gene regulatory network for cellular reprogramming in plant regeneration. *Plant and Cell Physiology*, 59(4), 770-782.
  - Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, 25(9), 3159-3173.
  - Iwase, A., Mita, K., Favero, D. S., Mitsuda, N., Sasaki, R., Kobayshi, M., & Sakakibara, H. (2018). WIND1 induces dynamic metabolomic reprogramming during regeneration in *Brassica napus*. *Developmental Biology*, 442(1), 40-52.
  - Iwase, A., Mitsuda, N., Koyama, T., Hiratsu, K., Kojima, M., Arai, T., & Ohme-Takagi, M. (2011). The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in Arabidopsis. *Current Biology*, 21(6), 508-514.
  - *Jatropha curcas* Data Base (JCDB). <http://jcdb.xtbq.ac.cn/index.php?m=Index&a=index>
  - Karami, O., Deljou, A., Esna-Ashari, M., & Ostad-Ahmadi, P. (2006). Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Scientia Horticulturae*, 110(4), 340-344.
  - Kareem, A., Durgaprasad, K., Sugimoto, K., Du, Y., Pulianmackal, A. J., Trivedi, Z. B., ... & Prasad, K. (2015). PLETHORA genes control regeneration by a two-step mechanism. *Current Biology*, 25(8), 1017-1030.
  - Kieffer, M., Stern, Y., Cook, H., Clerici, E., Maulbetsch, C., Laux, T., & Davies, B. (2006). Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in Antirrhinum reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *The Plant Cell*, 18(3), 560-573.
  - Kim, J. Y., Yang, W., Forner, J., Lohmann, J. U., Noh, B., & Noh, Y. S. (2018). Epigenetic reprogramming by histone acetyltransferase HAG1/AtGCN5 is required for pluripotency acquisition in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 37(20), e98726.
  - Kim, S., Soltis, P. S., Wall, K., & Soltis, D. E. (2005). Phylogeny and domain evolution in the APETALA2-like gene family. *Molecular Biology and Evolution*, 23(1), 107-120.
  - Kulchetscki, L., Harry, I. S., Yeung, E. C., & Thorpe, T. A. (1995). In vitro regeneration of Pacific silver fir (*Abies amabilis*) plantlets and histological analysis of shoot formation. *Tree physiology*, 15(11), 727-738.
  - Kumar, A., Batra, R., Gahlaut, V., Gautam, T., Kumar, S., Sharma, M., ... & Gupta, P. K. (2018). Genome-wide identification and characterization of gene family for RWP-RK transcription factors in wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS one*, 13(12), e0208409.

- Kumar, N., Anand, K. V., & Reddy, M. P. (2010). Shoot regeneration from cotyledonary leaf explants of *Jatropha curcas*: a biodiesel plant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(5), 917-924.
- Kumar, N., Anand, K. V., & Reddy, M. P. (2011). In vitro regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas*. *Industrial crops and products*, 33(1), 146-151.
- Kumar, N., Bhatt, V. D., Mastan, S. G., & Reddy, M. P. (2018). TDZ-induced plant regeneration in *Jatropha curcas*: a promising biofuel plant. *Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator*, 419-428.
- Kurczyńska, E. U., Gaj, M. D., Ujczak, A., & Mazur, E. (2007). Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, 226, 619-628.
- Laguna, G., Molina, M. V., Padilla, A., Aviles, Z., Bonomo, C., Carrizo, A., & Martinez, R. (2018). Induction of Somatic Embryogenesis in *Jatropha Curcas* L. *Int J Res Agric Sci*, 6(5), 2348-3997.
- Laux, T., Mayer, K. F., Berger, J., & Jurgens, G. (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, 122(1), 87-96.
- Li, M., Li, H., Jiang, H., Pan, X., & Wu, G. (2008). Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92, 173-181. Li et al ¿?
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Long, Y., Yang, Y., Pan, G., & Shen, Y. (2022). New insights into tissue culture plant-regeneration mechanisms. *Frontiers in plant science*, 13, 926752.
- Makwana, V., Shukla, P., & Robin, P. (2010). GA application induces alteration in sex ratio and cell death in *Jatropha curcas*. *Plant Growth Regulation*, 61(2), 121-125.
- Marínez, A. M., Brito, R. F., Ayala, A. M., Herrera, J. M., Vargas, G. P., & Dávila, J. G. (2018). Chemical and Physical Characterization of *Jatropha curcas* L. Seed from the Northern Sierra of Puebla, México. *Journal of Plant Sciences*, 6(1), 25-30.
- Martínez-Herrera J, Martínez-Ayala AL, Makkar H, Francis G, Becker K. (2010) Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. from México. *Eur J Sci Res* 39:396–407
- Matsuo, N., & Banno, H. (2008). The *Arabidopsis* transcription factor ESR1 induces in vitro shoot regeneration through transcriptional activation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(12), 1045-1050.
- Mayer, K. F., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G., & Laux, T. (1998). Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*, 95(6), 805-815.
- Mazumdar, P., Singh, P., Babu, S., Siva, R., & Harikrishna, J. A. (2018). An update on biological advancement of *Jatropha curcas* L.: New insight and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, 903-917.
- Medina Hernández Anamarel Edzná. (2016). Caracterización bioquímica diferencial y análisis de terpenoides en dos fases del desarrollo de embriones somáticos de *Jatropha curcas* L. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del instituto Politécnico Nacional.

- Medipally, S. R., Naresh, B., Manoj Kumar, S., Yusoff, F. M., & Devi, P. (2014). Somatic Embryogenesis from leaf and shoot tip explants of *Jatropha curcas* L. *Indian J Sci Technol*, 7, 1842-1846.
- Melnyk, C. W., Schuster, C., Leyser, O., & Meyerowitz, E. M. (2015). A developmental framework for graft formation and vascular reconnection in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*, 25(10), 1306-1318.
- Mitrofanova, O. V., Mitrofanova, I. V., Kuzmina, T. N., Lesnikova-Sedoshenko, N. P., & Dolgov, S. V. (2019). In vitro adventitious shoot regeneration from leaf explants of some apricot cultivars. *Ciência e Agrotecnologia*, 43, e001319.
- Moniruzzaman, M., Yaakob, Z., & Khatun, R. (2016). Biotechnology for *Jatropha* improvement: a worthy exploration. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, 1262-1277.
- Motte, H., Vereecke, D., Geelen, D., & Werbrout, S. (2014). The molecular path to in vitro shoot regeneration. *Biotechnology Advances*, 32(1), 107-121.
- Mundhara, R., & Rashid, A. (2006). TDZ-induced triple-response and shoot formation on intact seedlings of *Linum*, putative role of ethylene in regeneration. *Plant science*, 170(2), 185-190.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nahar, K., & Ozores-Hampton, M. (2011). *Jatropha* an Alternative Substitute to Fossil Fuel (IFAS Publication Number HS1193). Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences.
- National Center for Biotechnology Information. (2019). AGL15 AGAMOUS-LIKE 15 [*Arabidopsis thaliana* (thale cress)]. 15 de agosto de 2019, de NCBI Sitio web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/831224>
- National Center for Biotechnology Information. (2019). WUS Homeodomain-like superfamily protein [*Arabidopsis thaliana* (thale cress) ]. 15 de agosto de 2019, de NCBI Sitio web: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=\(wuschel\[gene\]\)%20AND%20\(Arabidopsis%20thaliana\[orgn\]\)%20AND%20alive\[prop\]%20NOT%20newentry\[gene\]&sort=weight](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=(wuschel[gene])%20AND%20(Arabidopsis%20thaliana[orgn])%20AND%20alive[prop]%20NOT%20newentry[gene]&sort=weight)
- Negin, B., Shemer, O., Sorek, Y., & Williams, L. E. (2017). Shoot stem cell specification in roots by the WUSCHEL transcription factor. *PLoS One*, 12(4).
- Nindita, A., Purwoko, B. S., Efendi, D., & Dewi, I. S. (2014). Somatic embryogenesis media optimization study of physic nut (*Jatropha curcas*) as biodiesel feedstock. *Energy Procedia*, 47, 21-28.
- Nogueira, A. R., Soares, A. A., Ibrahim, A. B., & Campos, F. A. (2011). Analysis of organogenic competence of cotyledons of *Jatropha curcas* and their in vitro histological behavior. *African Journal of Biotechnology*, 10(54), 11249-11258.
- Nolan, K. E., Song, Y., Liao, S., Saeed, N. A., Zhang, X., & Rose, R. J. (2014). An unusual abscisic acid and gibberellic acid synergism increases somatic embryogenesis, facilitates its genetic analysis, and improves transformation in *Medicago truncatula*. *PloS One*, 9(6), e99908.
- Nole-Wilson, S., & Krizek, B. A. (2000). DNA binding properties of the *Arabidopsis* floral development protein AINTEGUMENTA. *Nucleic Acids Research*, 28(21), 4076-4082.

- Nomura, Y., Matsuo, N., & Banno, H. (2009). A domain containing the ESR motif in ENHANCER OF SHOOT REGENERATION 1 functions as a transactivation domain. *Plant biotechnology*, 26(4), 395-401.
- Okamoto, J. K., Caster, B., Villarreal, R., Van Montagu, M., & Jofuku, K. D. (1997). The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(13), 7076-7081.
- Ong, H. C., Silitonga, A. S., Masjuki, H. H., Mahlia, T. M. I., Chong, W. T., & Boosroh, M. H. (2013). Production and comparative fuel properties of biodiesel from non-edible oils: *Jatropha curcas*, *Sterculia foetida* and *Ceiba pentandra*. *Energy conversion and management*, 73, 245-255.
- Ozaslan, M., Can, C., & Aytakin, T. (2005). Effect of explant source on in vitro propagation of *Paulownia tomentosa* Steud. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19(3), 20-26.
- Perez-Garcia, P., & Moreno-Risueno, M. A. (2018). Stem cells and plant regeneration. *Developmental biology*, 442(1), 3-12.
- Prasad, D. R., Izam, A., & Khan, M. M. R. (2012). *Jatropha curcas*: plant of medical benefits. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(14), 2691-2699.
- Puigderrajols, P., Mir, G., & Molinas, M. (2001). Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.). *Annals of Botany*, 87(2), 179-189.
- Radhakrishnan, D., Kareem, A., Durgaprasad, K., Sreeraj, E., Sugimoto, K., & Prasad, K. (2018). Shoot regeneration: a journey from acquisition of competence to completion. *Current Opinion in Plant Biology*, 41, 23-31.
- Rajore, S., & Batra, A. (2005). Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 14(1), 73-75.
- Rajore, S., & Batra, A. (2007). An alternative source for regenerable organogenic callus induction in *Jatropha curcas* L.
- Reinhardt, D., Frenz, M., Mandel, T., & Kuhlemeier, C. (2003). Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem. *Development*, 130(17), 4073-4083.
- Rocha, D. I., Vieira, L. M., Koehler, A. D., & Otoni, W. C. (2018). Cellular and morphological foundations of in vitro plant regeneration. In *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 47-68). Humana Press, New York, NY.
- Rocha, D.I., Monte-Bello, C.C., Aizza, L.C.B. *et al.* (2016). A passion fruit putative ortholog of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE1* gene is expressed throughout the in vitro de novo shoot organogenesis developmental program. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 125, 107–117.
- Rosa, Y. B. C. J., & Dornelas, M. C. (2012). In vitro plant regeneration and de novo differentiation of secretory trichomes in *Passiflora foetida* L.(Passifloraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 108, 91-99.
- Rounsley, S. D., Ditta, G. S., & Yanofsky, M. F. (1995). Diverse roles for MADS box genes in Arabidopsis development. *The Plant Cell*, 7(8), 1259-1269.

- Rubio-Piña, J. A., & Zapata-Pérez, O. (2011). Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(5), 11-11.
- Savona, M., Mattioli, R., Nigro, S., Falasca, G., Della Rovere, F., Costantino, P., ... & Altamura, M. M. (2012). Two SERK genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. *Journal of experimental botany*, 63(1), 471-488.
- Scheres, B. (2007). Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(5), 345-354.
- Schneiderbauer, A., Sandermann Jr, H., & Ernst, D. (1991). Isolation of functional RNA from plant tissues rich in phenolic compounds. *Analytical Biochemistry*, 197(1), 91-95.
- Sharma, S., Kumar, N., & Reddy, M. P. (2011). Regeneration in *Jatropha curcas*: Factors affecting the efficiency of in vitro regeneration. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 943-951.
- Shin, J., Bae, S., & Seo, P. J. (2020). De novo shoot organogenesis during plant regeneration. *Journal of Experimental Botany*, 71(1), 63-72.
- Siang, T. C., Soong, S. T., & Yien, A. T. S. (2012). Plant regeneration studies of *Jatropha curcas* using induced embryogenic callus from cotyledon explants. *African Journal of Biotechnology*, 11(31), 8022-8031.
- Silitonga, A. S., Atabani, A. E., Mahlia, T. M. I., Masjuki, H. H., Badruddin, I. A., & Mekhilef, S. (2011). A review on prospect of *Jatropha curcas* for biodiesel in Indonesia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(8), 3733-3756.
- Su, Y. H., Liu, Y. B., Bai, B., & Zhang, X. S. (2015). Establishment of embryonic shoot–root axis is involved in auxin and cytokinin response during *Arabidopsis* somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 5, 792.
- Su, Y. H., Zhao, X. Y., Liu, Y. B., Zhang, C. L., O'Neill, S. D., & Zhang, X. S. (2009). Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 59(3), 448-460.
- Sugimoto, K., Jiao, Y., & Meyerowitz, E. M. (2010). *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Developmental Cell*, 18(3), 463-471.
- Sugimoto, K., Temman, H., Kadokura, S., & Matsunaga, S. (2019). To regenerate or not to regenerate: factors that drive plant regeneration. *Current Opinion in Plant Biology*, 47, 138-150.
- Sujatha, M., & Mukta, N. (1996). Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44(2), 135-141.
- 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, 83-90.
- Technical Bulletin Nanodrop spectrophotometers. (s. f.). 260/280 and 260/230 ratios. 15 de agosto de 2019, de Thermo Scientific Sitio web: <https://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf>
- The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR) <https://www.arabidopsis.org/>
- Thermo Scientific. (s. f.). RNA isolation and purification. 15 de agosto de 2016, de Thermo Fisher Scientific Sitio web: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/brochures/rna-isolation-purification-brochure.pdf>

- Toral, O. C., Iglesias, J. M., de Oca, S. M., Sotolongo, J. A., García, S., & Torsti, M. (2008). *Jatropha curcas* L., a tree species with energetic potential in Cuba. *Pastos y Forrajes*, 31(3), 191-207.
- Varshney, A., & Johnson, T. S. (2010). Efficient plant regeneration from immature embryo cultures of *Jatropha curcas*, a biodiesel plant. *Plant Biotechnology Reports*, 4, 139-148.
- Varshney, A., Sangapillai, R., Patil, M. S., & Johnson, T. S. (2011). Histological evidence of morphogenesis from various explants of *Jatropha curcas* L. *Trees*, 25, 689-694.
- Verdeil, J. L., Alemanno, L., Niemenak, N., & Tranbarger, T. J. (2007). Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends in plant science*, 12(6), 245-252.
- Waki, T., Hiki, T., Watanabe, R., Hashimoto, T., & Nakajima, K. (2011). The Arabidopsis RWP-RK protein RKD4 triggers gene expression and pattern formation in early embryogenesis. *Current Biology*, 21(15), 1277-1281.
- Warra, A. A. (2012). Cosmetic potentials of physic nut (*Jatropha curcas* Linn.) seed oil: A review. *Am. J. Sci. Ind. Res*, 3(6), 358-366.
- Weigel, D., & Jürgens, G. (2002). Stem cells that make stems. *Nature*, 415(6873), 751-754.
- Zhang, J. D., Ruschhaupt, M., & Biczok, R. (2010). ddCt method for qRT-PCR data analysis.
- Zhang, T. Q., Lian, H., Zhou, C. M., Xu, L., Jiao, Y., & Wang, J. W. (2017). A two-step model for de novo activation of WUSCHEL during plant shoot regeneration. *The Plant Cell*, 29(5), 1073-1087.
- Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 49-64.
- Zheng, Y., Ren, N., Wang, H., Stromberg, A. J., & Perry, S. E. (2009). Global identification of targets of the Arabidopsis MADS domain protein AGAMOUS-Like15. *The Plant Cell*, 21(9), 2563-2577.
- Zhou, Y. H., Chen, J. Y., Yang, S. X., Xue, Y. B., & Liu, Y. (2022). Effect of Different Factors on Callus Induction from Leaf Explants of *Jatropha Curcas* L. In *Key Engineering Materials* (Vol. 905, pp. 359-364). Trans Tech Publications Ltd.
- Zulwanis, Z., Setiari, N., Gutierrez-Marcos, J., & Semiarti, E. (2020). The expression of AtRKD4 transgene during induction of somatic embryogenesis in transgenic *Dendrobium phalaenopsis* orchid carrying 35S::GR::AtRKD4. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 2260, No. 1). AIP Publishing.



ANEXOS

**Anexo A.** Secuencias codificantes de los genes de interés. Se indican las accesiones de cada secuencia, se destaca en verde la secuencia del oligonucleótido directo y en rojo el oligonucleótido reverso.

Gen	Accesión NCBI	Secuencia
<i>JcPLT3</i>	XM_037641768.1	<p>ATGGCACCAGCTACTAACTGGCTTTTCCTTTTCACTATCTCCAATGGAATGTTGAGGTCATCTGAATCTCAGTTCATGTCTTAT            GAAGGCTCTTCTACTGCTTCTCCTCACTATTTGATCGATAACTTCTATGCTAACGGCTGGGGAACTCGAAGGAAGCACAAG            TAGCAACAACAATGGCGGAGACTTCCATTCTCACAAGCTTTATAGACCCAGAAACCAACACCATCATGCGCCTAACTTGA            GGACTTTCTTGGCGATTTCATCATCCATAGTTCGCTACTCAGATAATAGCCAAACAGAGACTCAGGACTCAACTTTGACTCACA            TCTATGATCAGGGCCCTGCTGCTTACTTCAATGAGCAACAAGATCTTAAAGTGATTGCTGGGATTCAAGCTTTTTCAACCAAC            TCGGTTTCGGAGGTTGATGACTCGGCCTCAATGGCCCGGACTCAGCTTGGTGGCGGTGAGTTTGTGGGCCACTCAATTGAA            TCGTCTGGAACGAGTTGGGTTTCTAGTTGCACTGGTCAAATAATGCTTTGCTACTCGCGTTAATAATAATAATAATCA            GAGCTCTGCAGAGAAATCTATTGTTCTGTTGAATCTGATTGCCCTAAAAGATTGCTGATACTTTTGGCCAAAGAACTTCAA            TTTACAGAGGAGTTACTAGACACAGATGGACAGGTAGATATGAAGCGCATCTATGGGATAACAGCTGTAGAAGAGAGGGTC            AGGCCAGAAAAGGGCGTCAAGTATACCTAGGTGGATATGATAAGGAAGAAAAGGCAGCCAGAGCTTATGATTTAGCAGCTA            TGAAATATTGGGGCCCCACTGCAACTACCAACTCCCTGTTAGTAATTATACCAAAGAATTGGAAGAGATGAAATATGTGTCC            AAACAAGAATTCATAGCTTCACTGAGGAGGAAGAGTAGTGGCTTTTCAAGGGGAGCCTCTATATACAGAGGTGTTACAAGAC            ATCATCAACAAGGACGTTGGCAAGCTAGAATCGGTGCTGTTGCTGGAAACAAAGACCTTTACCTTGGCACTTTGCCACTGA            GGAAGAAGCGCTGAGGCATATGACATAGCAGCCATAAAGTTTCGGGGTGAATGCAGTGACCAATTTTGTAGATGAGCCG            GTATGATGTTGAAGCTATCATGAAAAGTGCTCTCCCCATAGTTGGGGCCGCAAGCGCTTAAAGCTCTCACTAGAAGCAGA            CCAGAAACCAACTGAACCACCATGAACAACCTCAAGGCAGCAGCAATAGCAGCAACAATATCAGTTTTGCTTCTATTCCA            CCAGTCTCAGCTATTCCTTGTGGTATCCCTTTTGAACAACAACAGCACTCTATCATCACAACCTCTTCCACTACCTTCCATCC            GGTAAATACTTGGGTGGAACCGATTCTTCTGGCTCCACCTCATCGATGGGGATTCCAATGACTACATTGCCTCAAACAGCTG            AGTTTTTATATGGCCTCACCAATCTTATTGA</p>
<i>JcWUS</i>	XM_012210371.3	<p>ATGTGTTGGTTTCTCTTTGTTTTCTTAAATTTCTTGATCATGGACTCTAACCAACAGCAAGTGCAGCAACAACAACACCACC            AACTAGCAAATGAGGAGAATAGCGGCGTTGGATCAGCTAAAGGAAGCTTTCTTTCAGGCAAAGTAGTACAAGATGGATCC            AACAACTGACCAGATAAGAATACTGAAGGATCTTTATTATAACAGTGGAGTTAGGTCTCCAAATGCAGATCAGATTCAAAGAA            TCTCTGCTAGGCTTAGACAGTACGGTAAAATTGAAGGAAAAGTGTCTTTTATTGGTTTCAGAACCATAAAGCTCGTGAGAGG            CAAAAGAAACGTTTCACAACTGATGTTCCCATGCAACAACAACAACAGCAACAGCAACAGCAACAGCAAAAGAACTGCTTCTG            CTACTGTTAAACCTGATCAAGATCTTTCTTTCTACAACAATACTCCTAGTTTACTTCTCCTGGGTTTTCTTGTTCGATCTCC            ATCTTCAAATTTCTGGGTTTACTGTTGGACAGATGGGAAATTATGGGCATGGATCTGTAAACAATGGAAGAGATTTTAAAGGAGT            GTTCAATATCAGCTGGTGGATCCATGAGCTCTAACTATGGATGGGTTGGGATTAATGAAAATCCTTATAGCAGTGGATCATCT            AGTTACTCATATTTTGACAAGCAAAAATCAAGTTATATGGAAACCTATTTGAACAACATGATGAAGAACAAGAAGAAGAACAA            GAAGCAGAAATTGAACTCTCCCTCTCTCCCTACACAAGAGAAAACATTAATGGCTTCTGCAGCAACATAAAGCACAACCC            TCTTCTTACTCTCAGTATCACAATTGGTATGGTTCTGTCAAGAAAAGCAACAACACTTTCCGTACTACTCTATTAGAGCT            TAGCCTCAACTCGTACACTGCTAATGGGCAGGGACCAGATTCTATCTAGTTAATAATAATCTAATATATTTATATTATGTATGT            AATTCTTCACTTAAATCATATTTAGGTCCTACTAATTAATTAATTAATTAATATATGGGTCTATTTTCTTTTATGTGCTTAATTAAG            CAATCTAGTATGTGATTTTCTTTGCTTTGACATGTGTGAGGCAAGAAGCTTAAATTAATTAGTAGTAATT</p>
<i>JcAGL15</i>	XM_012210244.3	<p>ATGTTATTTTCTCTGCTATCTATCTGAAAGAAAGAAAGCTCCTTGTCTTTGTTTTAAAGATAGAAAATTGAATTTTGAAGAA            TAAAAATTTCCCTTTCTGTTGGTTTTGTGGGTTTTGATCAGTTGGGTCTCTGTTGTTGTTTGAAGAGGAAAAATGGGTAG            AGGGAAGATTGAGATCAAGAGGATTGAGAATGCAAACAGCAGGCAAGTTACATTCTCTAAAAGGAGAGCCGGGCTGCTGAA            AAAGGCTCAGGAACCTGCCATTCTGTGATGCTGAGTTGCTGTTATTATCTTCCAACACTGGCAAGCTCTTTGAGTCTCT            CTAGTGCTGGCATGAAGAGAACA</p>



*JcEF1a*

EZ114412.1

---

ATGGGTAAGGAGAAGGTTACATTAATATTGTGGTCATTGGCCATGTCGACTCTGGCAAGTCAACAACCACTGGTCATTTAAT  
CTACAAGCTTGGAGGTATTGACAAGCGTGTGATTGAGAGATTGAGAAGGAAGCTGCTGAAATGAACAAAAGGTCATTCAAG  
TATGCTTGGGTCTTGGACAAGCTTAAGGCTGAACGTGAGCGTGGTATCACCATTGATATTGCTCTTTGGAAGTTTGGACCA  
CTAAATATTACTGCACTGTCATTGATGCTCCTGGACATCGCGACTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCACAGGCTGAC  
TGTGCTGTGCTCATTATTGACTCTACCACTGGTGGTTTTGAAGCTGGTATTTCCAAGGATGGTCAGACCCCGTGAGCATGCTC  
TGCTTGCTTTCACTCTTGGTGTGAAGCAGATGATCTGTTGCTGCAACAAGATGGATGCCACCACCCCAAGTACTCTAAGGC  
TAGATACGATGAAATTGTGAAGGAAGTTTGTTCCTACTTGAAGAAGGTGGGTTACAACCCTGACAAGATCCCATTTGTGCC  
ATCTCTGGTTTTGAGGGTGATAACATGATTGAGAGATCAACCAACCTCGATTGGTACAAGGGGCCCTACCCTCCTTGAGGCC  
TCGACTTGAGCAATGAGCCAAAGAGGCCAACAGAAAAGCCACTCCGTCTCCCACTTCAGGATGTCTACAAGATTGGTGGTAT  
TGGAAGTGTCCCTGTCGGTCTGTTGAGACTGGTGTCTTAAACCTGGTATGGTTGTCACCTTCGGACCATCTGGACTGACC  
ACTGAAGTTAAGTCTGTTGAGATGCACCACGAAGCTCTCCAGGAGGCCCTTCAGGTGACAATGTTGGCTTCAATGTGAAGA  
ATGTTGCTGTCAAGGATTTGAAACGTGGTTTTGTTGCCTCTAACTCCAAGGATGATCCTGCGAAGGAAGCTGCCAACTTAC  
CTCTCAGGTCATCATCATGAACCACCCTGGTCAGATTGAAAATGGATATGCTCCAGTCCTTGACTGC **CACACCTCCACATT**  
**GCTGTTAAG**TTTGCTGAGATCCTAACCAAGATTGATAGGCGATCTGGTAAAGAGCTTGAGAAGGAGCCAAAATTCTGAAGA  
ATGGTGATGCTGGATTTGTTAAGATGATTCCACCAAGCCCATGGTTGTGGAGACCTTTTCTGAGTACCCTCCTCTGGGT **CG**  
**TTTGCTGTGAGGGACATGC**GCCAGACAGTTGCTGTTGGTGTCAAGAGTGTGAGAAGAAGGACCCAAGTGGTGCTAA  
GGTCACCAAATCCGCAGCAAAGAAAAAGTAA

---