

Enraizamiento a partir de callos de *Jatropha cuneata* (wiggins & rollins) in vitro

Rooting from calluses of jatropha cuneata (wiggins & rollins) in-vitro

Paula Miriam Preciado Paredes

Universidad de Sonora, México

miriampreciado@hotmail.com

Gloria Irma Ayala Astorga

Universidad de Sonora, México

gayala@guayacan.uson.mx

Damián Martínez Heredia

Universidad de Sonora, México

dmartinez@guayacan.uson.mx

Resumen

El género *Jatropha* es importante por sus propiedades medicinales y se piensa que podría llegar a constituir una fuente de aceite con posibilidades de desplazar en un futuro a las fuentes de combustibles convencionales.

En el estado de Sonora existen varias especies de *Jatropha*, una de ellas es *Jatropha cuneata*, la cual necesita ser estudiada debido a que es una especie con gran potencial económico, ya que representa una posible alternativa para el desarrollo energético sostenible de biodiesel.

A través del cultivo *in vitro*, se realizan estudios con la planta *Jatropha cuneata*. Para ello se utilizan hojas de la planta, se desinfectan y siembran asépticamente en medio MS con el regulador de crecimiento ANA (0, 1, 1.5 y 2 mgL⁻¹) combinándolo con 0, 0.5 y 1 mgL⁻¹ de cinetina, lo cual produjo mayor formación de callos con 1 mgL⁻¹ de ambos reguladores de crecimiento. Los callos obtenidos se subcultivaron en medio de cultivo conteniendo las

combinaciones de ANA con cinetina: ANA en concentraciones de 0, 1, 1.5 y 2 mGL⁻¹ y cinetina en las concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 mGL⁻¹; se obtuvo enraizamiento en los callos que estuvieron sometidos en medios de cultivo con las concentraciones de 1 y 1.5 mGL⁻¹ de ANA. También se subcultivaron callos en 0, 1, 1.5, 2 y 2.5 mGL⁻¹ de 2, 4-D y en 0, 1, 1.5, 2, y 2.5 mGL⁻¹ del regulador de crecimiento de cinetina, no mostrando diferencias significativas con los callos sometidos en 1, 1.5 y 2 mGL⁻¹ de 2, 4-D y cinetina.

Palabras clave: *Jatropha cuneata*, callos, ANA, cinetina, 2, 4-D.

Abstract

The *Jatropha* genus is important for its medicinal properties and it is thought that it could constitute a source of oil likely to displace conventional fuel sources in the future.

There are several species of *Jatropha* in Sonora State, one of them is *Jatropha cuneata*, which needs to be studied since it is a species with great economic potential, since it represents a possible alternative for sustainable energy development of biodiesel.

Through in vitro culture, are carried out studies with the plant *Jatropha cuneata*. Leaves of the plant are used for this, are disinfected and sown aseptically in MS medium with ANA growth regulator (0, 1, 1.5 and 2 mGL⁻¹) combined with 0, 0.5 and 1 mGL⁻¹ of kinetin, which produced more callus (mass of unorganized parenchyma cells derived from plant tissue (explants)) formation with 1 mgL⁻¹ both of growth regulators. Obtained callus was subcultured in a culture containing combinations of ANA with kinetin: ANA at concentrations of 0, 1, 1.5 and 2 mGL⁻¹ and kinetin at concentrations of 0, 0.5, 1, 1.5 and 2 mGL⁻¹; He was rooting in the calluses that were subjected in culture media with concentrations of 1 and 1.5 mGL⁻¹ of ANA. She is also subcultured callus in 0, 1, 1.5, 2 and 2.5 mGL⁻¹ of 2, 4-D and in 0, 1, 1.5, 2 and 2.5 mGL⁻¹ of kinetin growth regulator, showing no significant differences with the tripe in 1, 1.5 and 2 mGL⁻¹ of 2, 4-D and kinetin.

Keywords: *Jatropha cuneata*, callus, ANA, kinetin, 2, 4-D.

Fecha recepción: Noviembre 2014

Fecha aceptación: Mayo 2015

Introducción

Entre los principales tipos de vegetación reconocidos de México se encuentran las Euphorbiaceae (Martínez-Gordillo et al., 2002). *Jatropha* L. es un género perteneciente a esta familia con 175 especies distribuidas en América, África e India (Rodríguez-Acosta et al., 2009). En México, se encuentran 45 especies de *Jatropha*. Crece en una serie de zonas climáticas en las regiones tropical y subtropical y se puede cultivar en regiones con escasez de lluvia y suelos pobres (Renuga y Rajamanickam, 2014). En el estado de Sonora se han encontrado siete especies, algunas en zonas áridas y semiáridas (Gil-Montaña et al., 2010).

Los cultivos que se aprovechan como productores de aceite para su transformación en biodiesel son: colza (*Brassica napus*) en Estados Unidos, girasol (*Helianthus annuus*) en Italia y el sur de Francia, soya (*Glycine max*) en Estados Unidos y Brasil, y palma aceitera (*Elaeis guineensis*) en Malasia (Sujatha et al., 2005), pero tienen el inconveniente de que al ser de regiones de climas áridos, no podrían crecer ni lograr sobrevivir en lugares con aridez y sequía, por lo cual no constituyen una alternativa adecuada para terrenos marginales, mientras que las especies de *Jatropha* son cultivos que no compiten con otros cultivos ya que sobreviven y crecen en zonas pobres para la agricultura, como son las zonas áridas y semiáridas soportando climas secos; además, presentan la ventaja de no consumirse como alimento. Lo antes mencionado hace necesario llevar a cabo estudios con plantas que se desarrollan y logran sobrevivir en esas condiciones.

La demanda de biodiesel ha creado un interés creciente en encontrar especies nuevas y potencialmente generadoras de energía (Ricci et al., 2012). Las semillas de *Jatropha* son productoras de energía. La atención en los aceites vegetales se incrementa día a día por sus aplicaciones en diferentes industrias como son la cosmética, alimentaria y energética. *Jatropha* ha demostrado ser de gran importancia debido a su potencial como productora de

agroenergéticos y a que el aceite de sus semillas puede aprovecharse en la producción de biodiesel (Adriano-Anaya et al., 2014). Algunas partes de esta planta han demostrado ser medicinales, como sus cortezas, las cuales contienen taninos (Kumar y Sharma, 2008), el látex, que contiene un alcaloide anticancerígeno llamado jatrophina (Das-Gupta et al., 2011), y en general todas las partes de la planta se han usado en la medicina tradicional y veterinaria, como las semillas que han sido utilizadas para la artritis y la gota, la savia en enfermedades dermatomucosas y los extractos de algunas partes de la planta para alergias, heridas e inflamaciones. Partes de la *Jatropha gossypifolia* se ha utilizado tanto en humanos como en usos veterinarios (Félix-Silva et al., 2014a), y puede ser empleada en tratamientos contra enfermedades cardiovasculares debido a que posee actividades anticoagulantes y antioxidantes sin mostrar efectos tóxicos (Félix-Silva et al., 2014b).

Se han efectuado estudios con diferentes especies de *Jatropha*, siendo *J.curcas* la más estudiada por contener aceite que cumple con los requisitos necesarios para funcionar como biocombustible, y presentando la ventaja de no ser comestible por contener sustancias tóxicas (Falasca y Ulberich, 2008). Además, se han realizados estudios con *J. gossypifolia*, debido a que algunas de sus partes son utilizadas en algunos países de diferentes maneras: con las hojas hacen curaciones cuando las personas tienen dermatitis, fiebre, erupciones e inflamaciones de la piel, ulceraciones en lenguas de los bebés, dolores de estómago y enfermedades venéreas (Balee, 1994). El agua del cocimiento de las hojas de esta planta la utilizan para bañar a personas con infecciones en la piel, las semillas son purgantes y se usan en malestares como dolores de cabeza, corporales y como purificador de sangre (Oduola et al., 2005).

La micropropagación vegetal es un método alternativo para obtener plantas a partir de diferentes tejidos, muchos laboratorios comerciales utilizan el cultivo de tejidos para una rápida multiplicación de plantas, conservación de germoplasma, eliminación de patógenos, multiplicación genética, así como para la producción de metabolitos secundarios (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011). El cultivo de tejidos constituye una buena alternativa para la propagación de plantas de interés económico y medicinal, mediante estas técnicas biotecnológicas es posible obtener plantas de buena calidad aprovechando las características adecuadas proporcionadas por una sola planta madre. El cultivo de tejidos en

los vegetales, aunado a la ingeniería genética, son herramientas muy utilizadas en la biotecnología vegetal para llevar a cabo diversos estudios con resultados muy prometedores tanto en plantas leñosas como en plantas de interiores y ornamentales para su rápida propagación, sin embargo, generalmente, las investigaciones relacionadas con la producción de metabolitos secundarios de plantas a través del cultivo *in vitro* se han enfocado en el uso de tejidos indiferenciados (callos, suspensiones celulares) (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011). Callos, suspensiones celulares, pelos radiculares y multiplicaciones de tallos son utilizados para estudios de micropropagación, así como para estudios de interacción planta-contaminantes bajo condiciones asépticas (Couselo et al., 2012).

En el estado de Sonora existen algunas especies de *Jatropha*, entre ellas *Jatropha cuneata* Wigg. et Rollin, cuyo nombre común es matacora (Velderrain-Algara, 2010) (figura 1). Las semillas de *Jatropha cuneata* presentan bajo porcentaje de germinación, por lo cual se pretende el uso de las técnicas de cultivo de tejidos para realizar estudios con dicha planta, poder asentar bases y lograr su obtención *in vitro*.

Materiales y métodos

Medio de cultivo

Se preparó medio de cultivo utilizando las sales de Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962), con agua desionizada, se ajustó el pH a 5.7, se agregó 3 % de sacarosa y 8.5 G de agar, reguladores de crecimiento (ANA, cinetina y 2, 4-D) en diferentes concentraciones, se calentó con agitación y se agregaron 10 o 20 mL en tubos de ensayo de 25 x 150 mm, después se esterilizó en una autoclave modelo Sterilmatic durante 15 minutos, con temperatura de 121 °C y 15 libras de presión. Estando ya frío el medio de cultivo se procedió a la desinfección de las muestras de la planta y a la siembra aséptica de las hojas en la cámara de flujo laminar Edge Gard Hood.

Obtención de los explantes

Primero se intentó hacer germinar semillas de la planta colectadas en Bahía de Kino, Sonora, obteniendo 3 % de porcentaje de germinación, debido a que es un porcentaje de germinación muy bajo, se decidió utilizar hojas de *Jatropha cuneata*, las cuales se

colectaron de plantas silvestres que crecen en el km 93 de la carretera a Bahía de Kino, Sonora (figura 1). Las hojas tenían un tamaño aproximado de 1.0 cm de largo y 1.0 cm de ancho; debido a la contaminación se procedió de otra manera para tener material vegetativo para las siembras *in vitro*, por lo cual se cortaron tallos de las plantas silvestres y en el laboratorio se colocaron en un recipiente con agua de la llave; a la semana ya había nuevas hojas (figura 2), que se tomaban de muestra para ser inoculadas en el medio de cultivo.



Figura 1. *Jatropha cuneata* en Bahía de Kino, Sonora.



Figura 2. Tallos de *Jatropha cuneata* con crecimiento de hojas en el laboratorio.

Desinfección de las muestras:

Las hojas de la planta se desinfectaron con 70-75 % de alcohol etílico durante 1-3 minutos, conteniendo 0.5 % de tween 20, se sumergieron en una solución de 10-15 % de cloro comercial durante 8-12 minutos, se enjuagaron en varias ocasiones con agua desionizada estéril y luego se procedió a la siembra en condiciones asépticas, sembrándose hojas

completas y cortes de hojas en medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) estéril. El material vegetativo, ya desinfectado, se sembró asépticamente en los medios de cultivo, el ambiente aséptico lo proporcionó la cámara de flujo laminar modelo Edge Gard Hood, la cual se limpió previamente. Ya realizada la siembra de las muestras en el medio de cultivo MS con los reguladores de crecimiento Ácido α -naftalenacético (ANA) y cinetina en diferentes concentraciones, se procedió a la incubación. Los explantes en los medios nutritivos se colocaron en condiciones de incubación: $25\pm 1^\circ$ C de temperatura, 75 % de humedad relativa con 16 horas luz.

Para estimular la inducción de crecimiento celular desorganizado (callos), se utilizaron hojas de la planta, se desinfectaron y sembraron en medio MS conteniendo el regulador de crecimiento ANA en las concentraciones de 0, 1, 1.5 y 2 mGL^{-1} combinando con cinetina en las concentraciones de 0, 0.5 y 1 mGL^{-1} .

Para estimular la organogénesis en los callos obtenidos, se preparó medio de cultivo MS adicionando 0, 1 y 1.5 y 2 mGL^{-1} de ANA con 0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2 mGL^{-1} de cinetina; se subcultivaron los callos obtenidos y se colocaron bajo condiciones de incubación descritas anteriormente. También se transfirieron callos en medio MS con el regulador de crecimiento ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D) en: 0,1, 1.5, 2 y 2.5 mGL^{-1} y en cinetina (0, 1, 1.5, 2 y 2.5 mGL^{-1}).

Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Para determinar diferencias significativas se utilizó el análisis de varianza de una vía. Al existir diferencias significativas se efectuó la prueba de LSD de comparación de medias, con un nivel de significancia del 95 %. Los resultados se analizaron estadísticamente por medio del programa StatGraphic, versión Plus para windows 1.5.

Resultados y discusión

Las hojas de la planta inoculadas en medio de cultivo MS con los reguladores de crecimiento: ANA combinando con cinetina presentaron inicios de crecimiento de callos en el medio conteniendo 1 mGL^{-1} de ANA con 1 mGL^{-1} de cinetina, a los 8 días de incubación,

continuaron creciendo (figura 3), y a los 30 días de incubación presentaron mayor crecimiento de callos (crecimiento celular indiferenciado) de buenas características, con proliferación y crecimiento, lo cual no se observó en las hojas sembradas en las otras combinaciones de los reguladores de crecimiento. Los callos obtenidos se subcultivaron en medio MS con ANA: 0, 1, 1.5 y 2 mGL^{-1} con 0, 0.5, 1.0, 1.5 y 2 mGL^{-1} de cinetina, lográndose la presencia de raíces en medio MS con ANA 1 mGL^{-1} (figura 4) en 15 días de incubación y 1.5 mGL^{-1} (figura 5) en 20 días de incubación, a partir de callos provenientes de hojas de la planta, no presentándose enraizamiento cuando estaba presente la cinetina en el medio de cultivo.

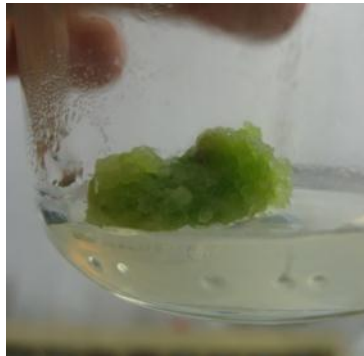


Figura 3. Callos obtenidos en MS con 1 mGL^{-1} de ANA con 1 mGL^{-1} de cinetina



Figura 4. Enraizamiento en callos de hojas de *J. cuneata* en el medio MS con 1 mGL^{-1} de ANA.



Figura 5. Raíces en callos con 1.5 mgL^{-1} de ANA.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la presencia de auxina es necesaria para la inducción y crecimiento de masa celular, ya que las hojas de *Jatropha cuneata* sembradas en los medios de cultivo MS con ANA mostraron crecimiento de callo en 30 días de incubación. Al transferir los callos obtenidos a medios nutritivos MS con ANA y cinetina, se observó el crecimiento de raíces en ANA: 1 y 1.5 mgL^{-1} , Suárez y Salgado, (2008) mencionan que la falta de organogénesis a partir de callos con frecuencia se reporta en determinadas especies, especialmente en las que son recalcitrantes para la propagación *in vitro*, sin embargo, en este trabajo fue posible observar el desarrollo de raíces. Para la propagación por cultivo de tejidos de *Jatropha* existen limitantes, como el látex que contiene, que lo hace recalcitrante para este tipo de propagación, sin embargo, en estudios *in vitro* con *Jatropha curcas* han obtenidos buenos resultados (Datta et al., 2007). Renuga y Rajamanickam, (2014) desarrollaron un sistema eficiente para propagar *Jatropha curcas in vitro* a partir de segmentos nodales. También con *Jatropha curcas* utilizaron el medio nutritivo MS con diferentes concentraciones de sacarosa, para la estimulación de embriones cigóticos provenientes de frutos inmaduros, encontrándose que la concentración de 60 GL^{-1} de sacarosa fue la mejor (Ferreira et al., 2008), mientras que en otro trabajo con la misma planta y con $22.2 \text{ } \mu\text{M}$ de bencilaminopurina lograron los mejores resultados para el crecimiento de tallos *in vitro* (Sujatha et al., 2006).

En este estudio, al transferir callos de la planta en el medio de cultivo MS conteniendo las concentraciones de 0 , 1 , 1.5 , 2 y 2.5 mgL^{-1} del regulador de crecimiento 2, 4-D, se observó que las mejores respuestas de crecimiento de esos callos se obtuvieron en las concentraciones de 1 , 1.5 y 2 mgL^{-1} (fig. 6), mostrando diferencias estadísticamente

significativas al incrementar la concentración del regulador de crecimiento (tabla 1). Dichos resultados concuerdan con los obtenidos en *J. curcas*, en los cuales se indujo el mayor índice de calogénesis con 1.5 y 2 mgL⁻¹ de 2,4-D (Solís et al., 2013). En estudios efectuados con *J. curcas* obtuvieron mayor crecimiento de callos con 2, 4-D (Coutiño-Cortés et al., 2013). En el presente trabajo se observó que al incrementar la concentración del regulador de crecimiento, es decir, con 2.5 mgL⁻¹ de 2, 4-D, se disminuyó la proliferación celular. También se observó mayor producción de callo a los 30 días de incubación (figura 7). transcurrido este tiempo, se disminuyó el crecimiento y la producción de callos, lo cual no concuerda con los resultados obtenidos con *J. curcas*, en los cuales las combinaciones de BA 0.25 mGL⁻¹ con AIB 0.5 mGL⁻¹ presentaron formación de callo a los 21 días de incubación (Bermejo-Cruz, 2010).

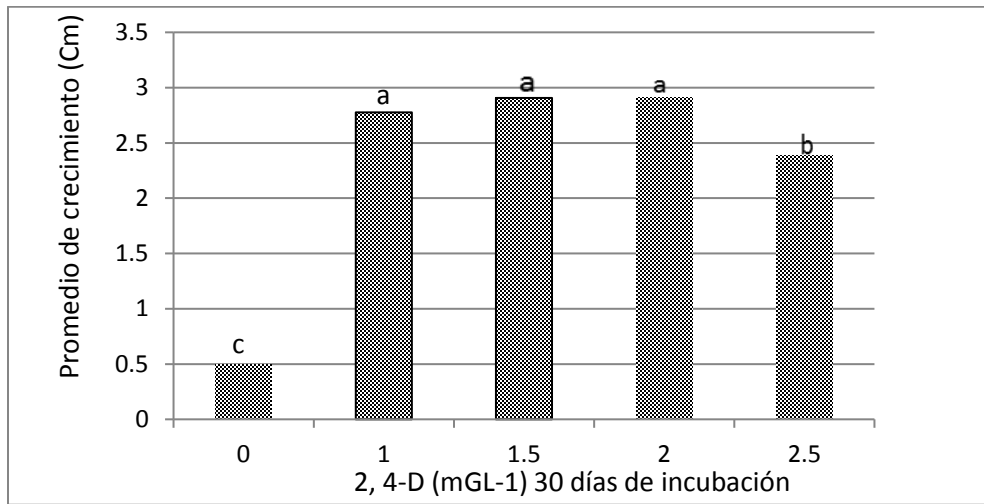


Figura 6. Promedio de crecimiento de callos en 0, 1, 1.5, 2.0 y 2.5 mgL⁻¹ de 2,4-D.

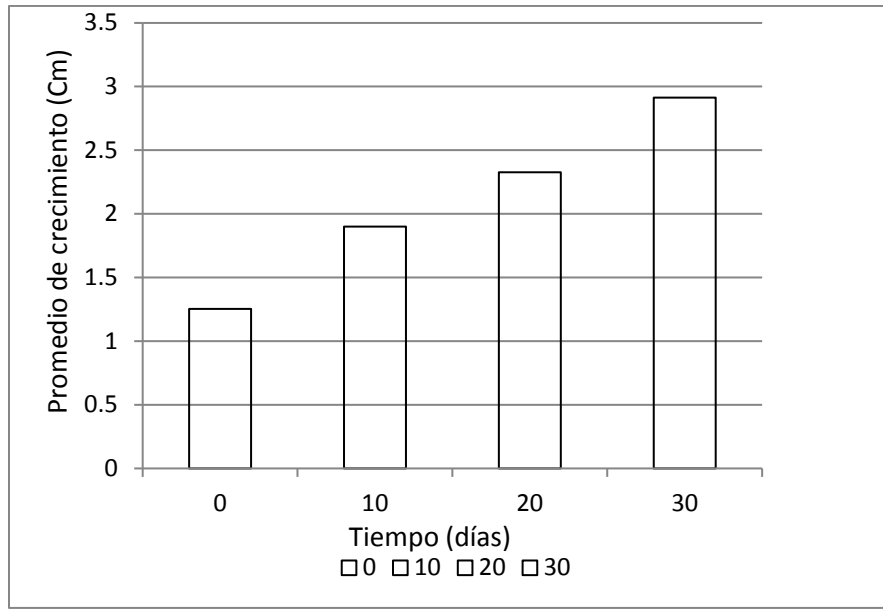


Figura 7. Promedio de crecimiento de callos de *J. cuneata* en 10, 20 y 30 días de incubación con el regulador de crecimiento 2,4-D (2 mgL⁻¹).

Tabla 1. Efectos del regulador de crecimiento 2, 4-D sobre callos en cuatro semanas de incubación.

| 2, 4-D (mgL ⁻¹) | Crecimiento (cm) | Diferencia estadística |
|-----------------------------|------------------|------------------------|
| 0 | 0.5 | c |
| 1 | 2.77 | a |
| 1.5 | 2.90 | a |
| 2 | 2.91 | a |
| 2.5 | 2.38 | eb |

Valores no asociados con la misma letra son significativamente diferentes (P<0.05).

También se subcultivaron callos obtenidos en medio de cultivo MS con cinetina en las concentraciones de 0, 1, 1.5, 2 y 2.5 mgL⁻¹, encontrando las mejores respuestas en las concentraciones de 1.5 mgL⁻¹, al analizar los datos estadísticamente no mostraron

diferencias significativas con los callos que se sometieron en las concentraciones de 1 y 2 mgL⁻¹ (tabla 2).

Tabla 2. Efectos del regulador de crecimiento cinetina sobre callos de *J. cuneata* en 30 días de incubación.

| Cinetina (mGL ⁻¹) | Crecimiento (cm) | Diferencia estadística |
|-------------------------------|------------------|------------------------|
| 0 | 0.5 | c |
| 1 | 2.54 | ab |
| 1.5 | 2.63 | a |
| 2 | 2.55 | ab |
| 2.5 | 2.26 | b |

Valores no asociados con la misma letra son significativamente diferentes (P<0.05).

Conclusiones

Los cultivos que se han utilizado como fuentes de biodiesel, han sido cultivos tradicionales que se usan en alimentación en humanos. Es necesario incrementar la investigación en vegetales que potencialmente podrían ser utilizados como cultivos para la producción de biodiesel y que no compitan con los cultivos que se utilizan como fuente de alimentos para el humano.

Los resultados del presente trabajo demuestran que *Jatropha cuneata* es capaz de producir resultados favorables en condiciones *in vitro*, por lo que es necesario continuar con estudios con este género, ya que son plantas que logran sobrevivir en condiciones climáticas adversas para otros tipos de cultivos, pudiendo utilizarse en terrenos marginales y con la ventaja de que no compiten con plantas que son aprovechadas para la producción de alimentos. *Jatropha cuneata* puede ser utilizada por su potencial para producir biodiesel.

Bibliografía

- Adriano-Anaya, M. L., Gómez-Pérez, J. A., Ruiz-González, S., Vásquez-Ovando, J. A., Salvador-Figueroa, M. y Ovando-Medina, I. (2014). Oleosomas de semillas de *Jatropha curcas* L. como estimadores de diversidad en poblaciones del Sur de México. *Grasas Aceites* 65 (3).
- Balee, W. (1994). *Footprints of the forest, ka'apor ethnobotany-the historical ecology of plant utilization by an Amazonian people*. Columbia University Press, New York.
- Bermejo-Cruz, M. E. G. (2010). *Cultivo in vitro de Jatropha curcas para la obtención de curcina*. Tesis Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Departamento de Biotecnología. Yautepec de Zaragoza, Morelos, México.
- Carneros, E., Zavattieri, A., Hernández, I., Toribio, M. y Celestino, C. (2005). Inducción de masas preembriogénicas en embriones cigóticos de pino piñonero. Congreso Forestal Nacional. Sociedad Española de Ciencias Forestales (SECF), pp. 202. Zaragoza, España.
- Celestino, C., I. Hernández, E. Carneros, D. López-Vela, J. Jiménez, J. Alegre, A. Vieira-Peixe, A. Zavattieri y M. Toribio (2007). La embriogénesis somática como vía de regeneración clonal de especies forestales mediterráneas. *Rev. de Ciências Agrárias*, Vol. 30, No.1, Lisboa, Portugal.
- Collado, R., Barbón, R, Agramonte, D., Jiménez-Terry, F., Pérez, M. y Gutiérrez, O. (2006). Embriogénesis somática directa en *Swietenia macrophylla* King. *Biotecnología Vegetal*, Vol. 6, No. 2, pp. 67-71.
- Couselo, J. L., Corredoira, E., Vieitez. A. M. y Ballester, A. (2012). Plant tissue culture of fast-growing trees for phytoremediation research. *Methods Mol Biol.* 877: 247-63.
- Coutiño-Cortés, A. G.;Ovando-Medina, I.; Adriano-Anaya, M. L. Salvador-Figueroa, M. y Ruiz-González, S. (2013). Organogénesis de *Jatropha curcas* a partir de plantas adultas: Estudio de fitohormonas y factores físico-químicos. *Quehacer Científico en Chiapas* 8 (2) 2013, pp. 3-11.

- Das, Gupta D., Haque, E., Islam, N., Rahman, N., Hasan, M. y Shibib, B. A. (2011). Alkaloid and steroid from the stem bark of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). *J. Pharm. Sci.* 10(1), pp. 9-11.
- Horsten S, Van den Berg A., Kettens-van den Bosch J, Leeflang B, Labadie R. (1996). Cyclogossine A: a novel cyclic heptapeptide isolated from the latex of *Jatropha gossypifolia*. *Planta Médica*; 62, pp.46-50.
- Félix-Silva J., Giordiani, R. B., Da Silva, A. A., Zuccoloto S. M. y Fernandes-Pedrosa, M. de F. (2014). *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): A Review of Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of This Medicinal Plant. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Hindawi Publishing Corporation. Vol 2014, pp. 1-32.
- Félix-Silva, J., Souza, T., Gomes-Camara, R. B. Cabral, B. Silva-Junior, A. A., Rebecchi, I. M., Zuccolotto, S. M. Oliviera-Rocha, H. A. y Fernandez-Pedrosa, M. de F. (2014). In vitro anticoagulant and antioxidant activities of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) leaves aiming therapeutical applications. *BMC Complement Altern Med.* 20; 14, p. 405.
- Ferreira, N. C. Pasqual, M. Dos Santos, D. N. Custódio, T. N. y Gomes de Araujo, A. (2008). Diferentes suplementos no cultivo in vitro de embriões de pinhão-manso. *Pesq. Agropec. Bras. Brasília*, Vol. 43, No.1, pp. 9-14.
- Martínez-Gordillo, M., Jiménez-Ramírez, J. Cruz-Durán, R., Juárez-Arriaga, E., García, R., Cervantes, A. y Mejía-Hernández, R. (2002). Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 73(2), pp. 155-281.
- Murashige T. y Skoog F.A. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15, pp. 473-497.
- Oduoal, T.; Adeosun G. O.; Oduola T. A., Avwioro G. O. y Oyeniya M. A. (2005).

- Mechanism of action of *Jatropha gossypifolia* stem latex as a haemostatic agent. *Eur J Gen Med* 2005; 2(4), pp.140-143.
- Pérez-Alonso, N y Jiménez E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*. Vol. 11, No. 4: pp. 195-211.
- Renuga C. y Rajamanickam C. (2014). Efficient in vitro regeneration of biodiesel plant *Jatropha curcas* .L. *Journal of Plant & Agriculture Res*. Vol. 1. Issue 1, pp. 1-6.
- Robineau, L. (1991). Towards a Caribbean pharmacopoeia, TRAMIL 4 Workshop: Scientific Research and Popular Use of Medical plants in the Caribbean. Santo Domingo, DO: Enda-caribe UNAH.
- Rodríguez-Acosta, M.; Vega-Flores, K. De Gante Cabrera V. H. (2009). Distribución del género *Jatropha* l. (euphorbiaceae) en el estado de Puebla, México. *Polibotánica*. ISSN 1405-2768. Núm. 28, pp. 37-48.
- Rout, G. R.; A. Mohapatra, S. Mohan Jain. (2006). Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*. 24, pp. 531–560.
- Solís-Ramos, L. y Miranda-Carballo, L. y Valdez-Melara, M. (2013). Establishment of cell suspension cultures of two Costa Rican *Jatropha* species (Euphorbiaceae). *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN-0034-7744)* Vol. 61 (3), pp. 1095-1107.
- Suárez, I. E. y Salgado, J. A. (2008). In vitro Propagation of *Stevia rebaudiana* BERT. (Asteraceae-Eupatorieae). *Temas Agrarios*. Vol. 13:(1), pp. 40-48.
- Velderrain-Algara, L. A., León de la Luz, J. L. y Maya-Delgado, Y. (2010). *Polibotánica*. Estructura de la vegetación en montículos de la Bahía de la Paz, Baja California Sur, México. pp. 67-90, ISSN 1405-2768.
- Zhang, B.H. (2000). Regulation of plant growth regulators on cotton somatic embryogenesis and plant regeneration. *Biochemistry* 39: 1567.