

Establecimiento *in vitro* de *Jatropha curcas* L. a partir de diferentes tipos de explantes

Maité Chávez¹, Manuel de Feria, Mariana La O, Leonardo Rivero. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5, Santa Clara, Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: maite@ibp.co.cu

RESUMEN

El uso de *Jatropha curcas* L. para la producción de biocombustibles está creciendo rápidamente a nivel mundial. Los métodos tradicionales de propagación no han logrado dar respuesta a dicha demanda. El cultivo *in vitro* podría convertirse en una alternativa para propagar esta especie a escala comercial. El presente trabajo tuvo como objetivo lograr el establecimiento *in vitro* de diferentes progenies de *J. curcas* a partir de varios tipos de explante. Para ello fueron utilizados yemas apicales, yemas axilares y discos de hojas que se trataron con diferentes concentraciones de NaOCl durante 15 minutos. En el caso de las yemas apicales y axilares no se observó contaminación por hongos, pero sí por bacterias y esta osciló entre 16 y 33%. Con la aplicación de NaOCl al 3.0% aumentó la necrosis del tejido y provocó la mortalidad del 21% de los explantes, mientras que con un 2.0%, aumentó la brotación a un 83.3% y 54% de las yemas apicales y axilares respectivamente. Para los discos de hojas se obtuvieron los mejores resultados en cuanto al índice de contaminación microbiana (30%) y formación de callos (65%) con una concentración de 1.5% de NaOCl. Estos resultados permiten disponer de un procedimiento que garantiza establecer *in vitro* diferentes tipos de explantes, lo cual constituye un punto de partida la propagación *in vitro* de esta especie.

Palabras clave: biocombustibles, desinfección, hipoclorito de sodio.

In vitro establishment of *Jatropha curcas* L. from different types of explants

ABSTRACT

The use of *Jatropha curcas* L. for biofuels production is growing rapidly worldwide. Traditional methods of propagation have failed to respond to that demand. *In vitro* culture could become an alternative to propagate this species on a commercial scale. This study aimed to achieve the *in vitro* establishment of different progenies of *J. curcas* from various explant types. For this study, apical bud, axillary buds and leaf discs were used and treated with different concentrations of sodium hypochlorite for 15 minutes. In the case of the apical and axillary buds not observed fungal contamination but bacterial contamination ranged between 16 and 33%. A concentration of 3.0% NaOCl increased tissue necrosis and caused mortality to the 21% of the explants, while a 2.0% increased sprouting of the apical (83.3%) and axillary (54%) buds. For leaf discs the best results in terms of microbial contamination rate (30%) and callus formation (65%) were obtained with 1.5% NaOCl. The results give a procedure that guarantees the *in vitro* establishment of different types of explants, which is a starting point in developing a protocol for the *in vitro* propagation of this species.

Key words: biofuels, disinfection, sodium hypochlorite.

INTRODUCCIÓN

El género *Jatropha* perteneciente a la familia *Euphorbiaceae*, se encuentra distribuido en los climas tropicales y subtropicales desde 5.0 hasta 1 500 msnm (Bártoli, 2008). La especie *Jatropha curcas* L. es originaria de México y Mesoamérica, es una planta oleaginosa arbustiva con crecimiento rápido que puede superar los 6.0 m de altura (Martínez, 2007).

El látex que produce es muy utilizado en medicina tradicional por sus propiedades

anticancerígenas (Shrivastava y Banerjee, 2008).

Es un cultivo adaptado a zonas marginales semiáridas, con tolerancia a la sequía, alta producción de proteínas y aceite (2.0 ton/ha/año) con alto porcentaje de cetonas. Según López *et al.* (2011), este aceite puede ser convertido en biodiesel por medio de una reacción química de transesterificación y es una fuente de energía renovable.

Lo anterior hace que su utilización para la obtención de biocombustibles esté creciendo rápidamente a nivel mundial pues puede servir como sustituto de los combustibles fósiles (Toral *et al.*, 2008; King *et al.*, 2009; Songstad *et al.*, 2009).

La propagación por semilla botánica se ve limitada por su alta variabilidad genética (López *et al.*, 2011) y por la pérdida de la capacidad germinativa, además de que se reduce la longevidad de la planta, su productividad, y se limita el desarrollo de la raíz pivotante (Shrivastava y Banerjee, 2008). Por lo anterior, los métodos de propagación tradicionales no han logrado dar respuesta a la demanda de *J. curcas* en el mercado mundial.

La propagación empleando el cultivo *in vitro* a escala comercial, podría convertirse en una alternativa para satisfacer dicha demanda. Según Kochhar *et al.* (2008), las plantas propagadas por cultivo *in vitro* se comportaron mejor en el campo que las producidas a partir de semilla, este resultado puede estar condicionado por el hecho de que las técnicas biotecnológicas basadas en un proceso de clonación permiten obtener plantas genéticamente similares a partir de genotipos caracterizados por una mejor respuesta a las condiciones del lugar donde se vayan a plantar, con vista a lograr mejores resultados en cuanto a la producción y calidad de aceite, mientras que la siembra a partir de semillas siempre generará variabilidad.

A partir de estos antecedentes, este trabajo tuvo como objetivo establecer *in vitro* *J. curcas* a partir de varios tipos de explante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se estableció un banco de plantas donantes en casa de cultivo (Figura 1) a partir de estacas de plantas adultas cultivadas en campo. Como explante inicial fueron utilizados yemas apicales, yemas axilares (aproximadamente 2.0 cm de longitud) y discos de hojas (1.0 cm de diámetro).

Establecimiento *in vitro*

La desinfección se realizó por inmersión de los explantes en una solución de NaOCl. En el caso de las yemas (apicales y axilares) al 1.0, 2.0 y 3.0% y para los discos de hojas se emplearon concentraciones de 1.0, 1.5 y 2.0% (v/v). En todos los tratamientos el tiempo de desinfección fue de 15 minutos.

Para establecer *in vitro* las yemas apicales y axilares se empleó como medio de cultivo el compuesto por el 100% de las sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962), 1.0 mg l⁻¹ de tiamina, 2.0 mg l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP), 30 g l⁻¹ de sacarosa, 2.5 g l⁻¹ de Gelrite y pH ajustado a 5.8 antes de la esterilización en autoclave. El medio de cultivo se distribuyó en tubos de ensayo a razón de 15 ml por cada uno en los cuales se colocó un explante.

Durante el establecimiento *in vitro* de estos explantes se evaluó diariamente la presencia de microorganismos contaminantes y la brotación de las yemas. A los nueve días de cultivo se cuantificó el número explantes contaminados y brotados, luego a los 21 días de cultivo, se cuantificó finalmente el número de yemas brotadas y afectadas para cada tratamiento de desinfección aplicado.



Figura 1. Plantas donantes de *Jatropha curcas* L. establecidas en casa de cultivo como fuente de explantes para establecer *in vitro* la especie.

Los discos de hojas se emplearon para la formación de callos y para ello se utilizó el medio de cultivo compuesto por el 100% de las sales MS, 0.45 mg l⁻¹ de 6-BAP, 0.2 mg l⁻¹ de ácido indol butírico (AIB), 0.66 mg l⁻¹ de tiazaurón (TDZ), 30 g l⁻¹ de sacarosa, 3.5 g l⁻¹ de Gelrite y el pH ajustado a 5.7 antes de la esterilización en autoclave. Las evaluaciones relacionadas con la contaminación microbiana se realizaron diariamente y hasta los 9 días de cultivo, mientras que, la cuantificación del número de explantes que formaron callos se llevó a cabo a los 30 días de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento *in vitro*

El banco de plantas donantes en casa de cultivo permitió seleccionar y utilizar explantes para el establecimiento *in vitro* de *Jatropha curcas*.

En el caso de las yemas apicales y las yemas axilares, independientemente de la concentración de NaOCl usada para su desinfección, no se observó contaminación por hongos filamentosos.

Sin embargo, la presencia de contaminantes bacterianos osciló entre 16 y 33%. El primer valor se correspondió con la desinfección con hipoclorito de sodio al 3.0% y el segundo con 1.0%. Sin embargo, con 3.0% se incrementó el número de explantes con necrosis en diferentes zonas del tejido, e incluso se observaron explantes muertos (21%).

A los nueve días de cultivo ya se podía observar la respuesta de los diferentes tipos de explantes y la brotación de las yemas (Figura 2). El mayor porcentaje de brotación (83.3%) se logró en el tratamiento con una concentración del desinfectante de 2.0% en el caso de las yemas apicales y un 54% para las yemas axilares. A los 21 días de cultivo se observó la presencia de hojas expandidas de color verde (Figura 3).

Con este mismo desinfectante al 1.5%, combinado con inmersión de los explantes durante 15 minutos, Peña (2009) logró un 83.3% de explantes libres de contaminación microbiana visible y un 66.6% de explantes viables durante la fase de establecimiento *in vitro* de *J. curcas*.



Figura 2. Yemas brotadas en explantes de *Jatropha curcas* L. después de nueve días de cultivo en la fase de establecimiento *in vitro*. A) Yemas apicales. B) Yemas axilares.

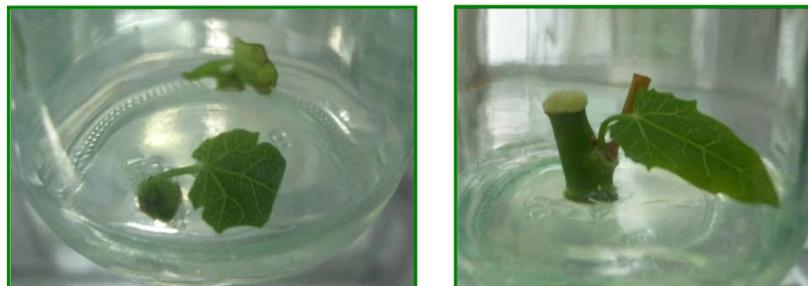


Figura 3. Explantes de *Jatropha curcas* L. a los 21 días de cultivo en la fase de establecimiento *in vitro*.

En el caso de los discos de hojas, con NaOCl al 1.0% se observó el 75% de los explantes contaminados con microorganismos, mientras que con 2.0% aunque disminuyó la contaminación (12.0%) se presentaron daños por necrosis en el 58.3% de los explantes.

Con NaOCl al 1.5% sólo se contaminó el 30.0% de los discos de hojas y se formaron callos en el 65.0% de los explantes (Figura 4), esta fue la concentración seleccionada para continuar los estudios.

Según Misra *et al.* (2010), la presencia de TDZ en el medio de cultivo es necesaria para estimular la formación de callos y la regeneración de brotes a partir de secciones de hojas de *J. curcas*. De igual forma, autores como López *et al.* (2011), han descrito la formación de callos de *J. curcas* a partir de secciones de hoja con el empleo de bajas concentraciones de 6-BAP y AIB en el medio de cultivo.

Con el empleo de diferentes concentraciones de NaOCl como agente desinfectante se pudo establecer en condiciones *in vitro* la especie *Jatropha curcas* con bajos índices de contaminación y altos porcentajes de supervivencia, a partir de diferentes tipos de explante. Los explantes respondieron positivamente a diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento tanto para la emisión de nuevos brotes en el caso de las yemas apicales y axilares, como en la formación de callos a partir de discos de hojas, resultados que permitirán continuar estudios en función de lograr la multiplicación *in vitro* de esta especie.

REFERENCIAS

Bártoli, J (2008) Manual para el cultivo de piñón (*Jatropha curcas*) en Honduras. La Lima, Cortés, Honduras. 30 p.

King, A, Cuevas JA, Freudenberg M, Ramiarmanana D, Graham IA (2009) Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. *Journal of Experimental Botany* 60(10): 2897-2905

Kochhar, S, Singh SP, Kochhar VK (2008) Effect of auxins and associated biochemical changes during clonal propagation of the biofuel plant *Jatropha curcas*. *Biomass Bioenerg.* 32: 1136-1142

López, D, Peñate L, Daquinta M, Pina D, Escalona M (2011) Cultivo de *Jatropha curcas* L. (*Euphorbiaceae*). Resultados preliminares y estrategias futura. [En línea]. Disponible en: <http://www.cubasolar.cu/biblioteca/Ecosolar/Ecosolar21/HTML/articulo03.htm>. Consultado el 25 de agosto de 2012

Martínez, J (2007) El piñón mexicano: una alternativa bioenergética para México. *Revista digital universitaria* 8(12): 1067-6079

Misra, P, Gupta N, Toppo DD, Pandey V, Mishra MK Tuli R (2010) Establishment of long-term proliferating shoot cultures of elite *Jatropha curcas* L. by controlling endophytic bacterial contamination. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 100: 189–197

Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497

Peña, CJ (2009) Establecimiento y evaluación de protocolos de desinfección, introducción y multiplicación *in vitro* de piñón (*Jatropha curcas*) a partir de semillas y yemas apicales obtenidas de plantas adultas con miras a una propagación masiva de plantas élite. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE. Sede Sangolquí. [En línea]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/779> Consultado el 12 de julio de 2012

Shrivastava, S, Banerjee M (2008) *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Influence of additives. *International Journal of Integrative Biology* 3(1): 73-79

Songstad, D, Lakshmanan P, Chen J, Gibbons W, Hughes S, Nelson R (2009) Historical perspective of biofuels: learning from the past to rediscover the future. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 45: 189-192

Toral, O, Iglesias JM, Montes de Oca S, Sotolongo JA, García S, Torsti M (2008) *Jatropha curcas* L. una especie arbórea con potencial energético en Cuba. *Pastos y Forrajes* 31(3): 191-207

Recibido: 28-6-2013
Aceptado: 12-9-2013