

# ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *in vitro* DEL PIÑÓN (*Jatropha curcas L*)

*Xavier Álvarez Montero*  
*Genoveva Torres Muñoz*  
*Griselda Mite Orrala*  
*Nancy Saltos Rosero*



**Investigación  
Tecnología e Innovación**

Revista de divulgación de la Dirección de Investigaciones y Proyectos Académicos



## ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *in vitro* DEL PIÑÓN (*Jatropha curcas* L)

### ESTABLISHMENT OF *in vitro* CULTURE OF PIÑÓN (*Jatropha curcas* L)

Xavier Álvarez<sup>1</sup>, Genoveva Torres<sup>1</sup>, Griselda Mite<sup>1</sup>, Nancy Saltos<sup>1</sup>

#### RESUMEN

Las condiciones energéticas mundiales no son muy optimistas, debido al continuo aumento de la demanda energética, la cual es en su mayoría cubierta por combustibles fósiles, generando problemas medioambientales, como el cambio climático global causado en gran parte por el efecto invernadero producido por los gases resultantes de la quema de combustibles fósiles (Petróleo-43,3 %, Carbón-36,4% y Gas natural-20,3%). Se busca de forma global incorporar en mayor porcentaje el uso de las energías renovables. Una opción factible es la obtención de energía a través de la biomasa, el piñón (*Jatropha curcas*, L) surge como una alternativa para la producción de biomasa con fines energéticos, ya que no es un cultivo alimenticio y se puede desarrollar en suelos marginales. La presente investigación desarrolló el establecimiento del cultivo *in vitro* de explantes de *J. curcas* (embriones y yemas meristemáticas). El explante con el menor índice de contaminación (10 %) y con mejor respuesta al cultivo *in vitro* fue el embrión, el tratamiento de desinfección se efectuó con hipoclorito de sodio al 5 % por 5 minutos, para la fase de adaptación se utilizó el medio propuesto por Murashige y Skoog (MS) (1962), para la fase de multiplicación se optimizó el medio MS suplementado con 1 mg/L ácido indol butírico y 3 mg/L bencilaminopurina, obteniéndose un número promedio de  $6 \pm 0,99$  brotes por explante. En la fase de enraizamiento se optimizó el medio MS suplementado con 1,2 mg/L ácido indol acético y 0,8 mg/L Kinetina, obteniéndose un número promedio de  $3 \pm 0,42$  raíces, con una longitud promedio de  $2,3 \text{ cm} \pm 1,12 \text{ cm}$ . Para la adaptación *ex vitro* se expuso a las vitroplantas a períodos controlados de iluminación natural y sustrato esterilizado, observándose una mortalidad del 100% por no adaptarse a las condiciones *ex vitro*.

**Palabras claves:** *totipotencia celular, micropropagación, reguladores del crecimiento, biocombustibles.*

1 Universidad de Guayaquil – Facultad de Ciencias Naturales – Instituto de Investigaciones de Recursos Naturales - Laboratorio de Biotecnología, xalvarezec@gmail.com

## SUMMARY

The global energy conditions are not very optimistic, because energy demand continues to increase, which is mostly covered by fossil fuels, creating environmental problems such as global climate change, caused largely by greenhouse effect produced by gases from burning fossil fuels (Oil-43, 3%, Coal-36, 4% and Natural gas-20,3%). World are looking to incorporating a higher percentage use of renewable energy. One feasible option is to obtain energy through biomass; the piñón (*Jatropha curcas* L) emerges as an alternative for the production of biomass for energy purposes, because it is not a food crop and can be developed on marginal soils. This research developed the establishment of *in vitro* culture of explants of *J. curcas* (embryos and meristematic buds), the explant with the lowest rate of contamination (10%) and more adaptation to *in vitro* culture was the embryo, the disinfection treatment was performed with sodium hypochlorite at 5% for 5 minutes, the adaptation phase medium was used as proposed by Murashige and Skoog (MS) (1962), for the multiplication phase was optimized MS medium supplemented with 1mg/L indole butyric acid and 3 mg/mL benzylaminopurine, thus obtaining an average number of  $6 \pm 0,99$  shoots per explant. In the rooting phase was optimized MS medium supplemented with 1,2 mg/L indole acetic acid and 0,8 mg/L kinetin, obtaining an average number of  $\pm 0,42$  roots, with an average length of  $2,3 \text{ cm} \pm 1,12 \text{ cm}$ . To adaptation at *ex vitro* conditions, vitroplantlets were exposed to periods of controlled natural lighting and sterilized substrate, having failed to adapt to *ex vitro* conditions, there was a mortality of 100%.

**Key words:** *cellular totipotency, micropropagation, growth regulators, biofuels.*

## 1. INTRODUCCIÓN

La energía es uno de los fundamentos de la vida para todos los organismos, es necesaria para realizar todas las actividades, respiración, alimentación, movimiento, etc. Los organismos autótrofos aprovechan directamente la energía del sol, mientras que los organismos heterótrofos toman la energía de sus alimentos. El hombre además utiliza otras fuentes de energía para satisfacer otras necesidades y mejorar su calidad de vida.

La demanda mundial de energía sigue creciendo, a pesar de que la eficiencia de muchos vehículos, aparatos eléctricos y procesos industriales ha mejorado. La responsabilidad por este crecimiento recae tanto en los países industrializados como en los países en desarrollo (IEA, 2005).

De esta manera, a pesar de que el aporte energético básico que requiere una



persona es de 2 600 kilocalorías por día o cerca de 4 GJ por año (para el caso de un hombre joven de 25 años y 70 kilos de peso con una actividad moderada), el consumo mundial de energía primaria por habitante es de aproximadamente 73 GJ por año, es decir, 18 veces mayor a lo requerido estrictamente para sobrevivir (Castro *et al.*, 2007; IEA, 2006a).

Bioenergía es un término general derivado de la obtención de energía de materiales tales como la madera, paja o residuos de animales. Los materiales citados pueden ser quemados directamente para producir calor o energía, pero también pueden ser convertidos en biocombustibles. El carbón vegetal y el biodiesel, por ejemplo, son biocombustibles obtenidos a partir de la madera y de las semillas de las plantas respectivamente (García, 2008).

El uso de energía fósil (petróleo y sus derivados) ha contribuido enormemente al cambio climático global, debido a la gran producción de CO<sub>2</sub>, que es un gas de efecto invernadero.

Cuando la biomasa es quemada, libera agua y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), el principal gas de efecto invernadero. Pero cuando esta biomasa es producida por organismos autótrofos, una cantidad equivalente de CO<sub>2</sub> es tomada de la atmósfera mediante la fotosíntesis. La emisión neta de CO<sub>2</sub> será nula mientras que se continúe replantando vegetales para la producción de nueva biomasa (Institute for Plasma Physics Rijnhuizen, 2005).

El piñón (*Jatropha curcas*) se proyecta como un cultivo energético promisorio, los cultivos energéticos son cultivos agrícolas o forestales producidos expresamente con fines energéticos en lugar de alimenticios, como ha sido la actividad tradicional en la agricultura. La biomasa obtenida puede transformarse tanto en biocombustibles líquidos para ser utilizada en motores de combustión interna ó en biocombustibles sólidos para su aprovechamiento en aplicaciones térmicas para la generación de calor y electricidad (García, 2008).

Sin embargo para la normal industrialización de todo cultivo agroenergético es necesario el desarrollo de tecnologías que permitan el suministro permanente de plantas de alta calidad y probada estabilidad genética. Esto último se logra con el desarrollo de las técnicas del cultivo de tejido o *in vitro*.

En base a esta premisa, este proyecto estableció el cultivo *in vitro* de *J. atrophica curcas*, como base para el desarrollo de nuevas tecnologías en la propagación masiva de esta especie, tales como: **cultivo sumergido, suspensiones celulares, biorreactores y semilla artificial.**

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El área de muestreo se estableció en la Hacienda Olmedo del cantón Pedro Carbo de la Provincia del Guayas, Ecuador ( $80^{\circ} 13' 48''$  W -  $01^{\circ} 48' 36''$  S).

La metodología constó de dos partes, una parte de campo y otra de laboratorio. En campo los muestreos se realizaron en la Hacienda Olmedo con plantación de *J. curcas*, se seleccionaron plantas jóvenes (9 meses) (Fig. 1), se colectaron ramas apicales con múltiples yemas de crecimiento (tejido meristemático). Las muestras colectadas se colocaron en fundas plásticas y se las trasladó al laboratorio de biotecnología del Instituto de Investigaciones de Recursos Naturales (IIRN).



**Figura 1. *Jatropha curcas* de 9 meses, recuadro yema meristemática.**

Se seleccionó además, otro tipo de explante, semillas de los viveros de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), este material fue donado por el Dr. Alfredo Barriga (Fig. 2).



**Figura 2. Semillas de *Jatropha curcas***

En el laboratorio, ambos tipos de explantes fueron lavados con jabón neutro, enjuagados con abundante agua de la llave y finalmente se lavaron con agua destilada estéril cinco veces.

Se evaluaron tres tipos de químicos para la desinfección de 210 yemas meristemáticas y 210 semillas:

1. Etanol al 70 %.
2. Hipoclorito de sodio al 5 y 10%.
3. Bicloruro de mercurio al 0,1 %.

Los tiempos de tratamiento evaluados fueron: cinco y diez minutos para el etanol al 70 % e hipoclorito 5 y 10 %, y tres minutos para el bicloruro de mercurio 0,1 % (Cuadro 1).

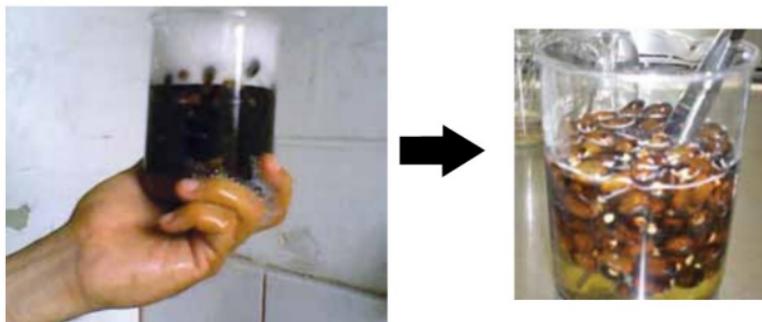
**Cuadro 1. Número y tipo de explantes por tratamiento de desinfección.**

<b>Tratamientos</b>	<b># Yemas meristemáticas</b>	<b># Embriones de semillas</b>
Etanol 70% x 5'	30	30
Etanol 70% x 10'	30	30
Hipoclorito 5 % x 5'	30	30
Hipoclorito 5% x 10'	30	30
Hipoclorito 10% x 5'	30	30
Hipoclorito 10% x 10'	30	30
Bicloruro de mercurio 0,1% x 3'	30	30
<b>Total</b>	<b>210</b>	<b>210</b>

Antes de los tratamientos, los explantes se lavaron con abundante agua de la llave, posteriormente se aplicó jabón neutro y se procedieron a enjuagar con agua de la llave y agua destilada (Fig. 3) (Cuadro 1). Como control positivo se utilizaron explantes sin tratamiento y como control negativo el medio MS sin explantes. Después de cada tratamiento se enjuagaron los explantes con agua destilada estéril cinco veces.

Para la introducción al cultivo *in vitro*, se utilizó el medio MS modificado (Shrivastava & Barnejee, 2008). Subsiguientemente se procedió a optimizar el protocolo de multiplicación *in vitro* (micropropagación) de *J. curcas*, se utilizó el medio MS modificado con los siguientes reguladores del crecimiento: bencilaminopurina (BAP), ácido indol butírico (IBA) y sulfato de adenina (ADS) (Cuadro 2).





**Figura 3.** Tratamiento de desinfección de *Jatropha curcas*, recuadro hipoclorito de sodio al 10%.

**Cuadro 2.** Número y tipo de explante por tratamiento de multiplicación.

Tratamiento	Yema meristemática	Embrión de semilla
MS+BAP(3 mg/L)+IBA(2 mg/L)+ADS(25 mg/L)	58	78
MS+BAP(3 mg/L)+IBA(1 mg/L)	58	78
<b>Total</b>	<b>116</b>	<b>156</b>

Para la fase de enraizamiento de *J. curcas* se utilizó el medio MS modificado con los siguientes promotores del crecimiento: ácido indol acético (AIA) y Kinetina (KN) (Cuadro 3).

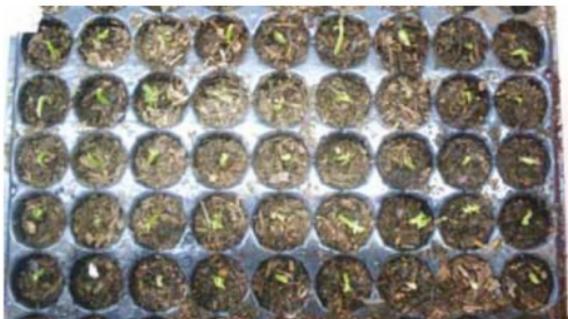
**Cuadro 3.** Número y tipo de explante por tratamiento de enraizamiento

Tratamiento	Brotos meristemáticos de yemas	Brotos meristemáticos de embriones
MS+AIA(1.2 mg/L)+KN(0.8 mg/L)	100	100
MS+AIA(1.5 mg/L)+KN(1.0 mg/L)	100	100
<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>200</b>

Se evaluaron dos protocolos para aclimatar las vitroplantas, primero se colocaron los frascos sin abrir con las plántulas en fase de enraizamiento bajo la luz indirecta del sol durante siete días, el segundo tratamiento consistió en abrir los frascos con las plántulas en la misma fase bajo la luz indirecta del sol, durante siete días (Kozai y col., 1988; Laforge y col., 1991).

Una vez concluido el período de adaptación se lavó las vitroplántulas con abundante agua de la llave, hasta eliminar completamente el medio de cultivo, procedimiento que se llevó a cabo evitando dañar las raíces.

La tierra orgánica se esterilizó a 100 °C en una estufa por 90 minutos dejándola reposar durante diez días. Las plántulas de ambos tratamientos fueron trasplantadas a bandejas con la tierra orgánica esterilizada (Figura 4).



**Figura 4.** Vitroplántulas de *Jatropha curcass* aclimatándose a condiciones ex vitro.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Selección del explante y protocolo de desinfección

De los dos tipos de explantes evaluados, yemas apicales y meristemas embrionarios, fueron estos últimos los que presentaron una mejor respuesta a las condiciones *in vitro*, observándose menor contaminación y fenolización (*Cuadro 4*).

#### 3.2. Micropropagación

Se alcanzó un coeficiente promedio de micropropagación de  $6 \pm 0,99$  para los dos tipos de explantes (embriones y yemas meristemáticas) y una longitud promedio de los brotes de  $0,85 \text{ cm} \pm 0,065$ , con el medio MS + BAP (3 mg/L) + IBA (1mg/L) (*Cuadro 5*).

#### 3.3. Enraizamiento

En la fase de enraizamiento se obtuvieron un número promedio de raíces por vitroplántula para los dos tipos de explantes de  $3 \pm 0,42$  y la longitud de las



mismas fue de  $2,3 \text{ cm} \pm 1,12$ , con el medio MS + AIA (1,2 mg/L) + KN (0,8 mg/L) (Cuadro 6 - Figura 5).

**Cuadro 4. Resultados de los diferentes tratamientos de esinfección del explante.**

# Explantes	Tipo de tratamiento/minutos	# Contaminados	# Fenolizados
<b>210 embriones (E)</b>	Hipoclorito de sodio 5 %x 5'	3	0
	Hipoclorito de sodio 5 %x 10'	2	5
	Hipoclorito de sodio 10 %x 5'	1	7
	Hipoclorito de sodio 10 %x 10'	0	10
	Etanol 70 %x 5'	7	0
	Etanol 70 %x 10'	5	0
	Bicloruro de mercurio 0.1 %x 3'	3	3
	<b>TOTAL</b>	<b>21 (10%)</b>	<b>25 (11.90%)</b>
<b>210 yemas meristemáticas (BM)</b>	Hipoclorito de sodio 5 %x 5'	10	0
	Hipoclorito de sodio 5 %x 10'	8	4
	Hipoclorito de sodio 10 %x 5'	6	8
	Hipoclorito de sodio 10 %x 10'	2	10
	Etanol 70 %x 5'	15	0
	Etanol 70 %x 10'	10	0
	Bicloruro de mercurio 0.1 %x 3'	5	4
	<b>TOTAL</b>	<b>56 (26.67%)</b>	<b>26 (12.38%)</b>

**Cuadro 5. Resultados de los tratamientos de micropropagación.**

Tipo de medio	# plántulas	# promedio de brotes	Longitud promedio de los brotes (cm)
MS+BAP (3 mg/L)+ IBA (1 mg/L)	78 E	$6.4 \pm 1.10$	$0.9 \pm 0.07$
	58 BM	$5.6 \pm 0.88$	$0.8 \pm 0.06$
MS+ BAP (3 mg /L)+IBA (2 mg/L)+ ADS (25 mg/L)	78 E	$4.3 \pm 0.40$	$0.7 \pm 0.05$
	58 BM	$2.2 \pm 0.17$	$0.6 \pm 0.02$

**Cuadro 6. Resultados de los tratamientos de enraizamiento.**

Tipo de medio	Plántula	# promedio de raíces	Longitud promedio de las raíces (cm)
MS+ AIA (1.2 mg/L)+KN (0.8 mg/L)	100 E	$3.5 \pm 0.56$	$2.5 \pm 1.30$
	100 BM	$2.5 \pm 0.28$	$2.1 \pm 0.94$
MS+ AIA (1.5 mg/L)+ KN (1.0 mg/L)	100 E	$1.5 \pm 0.06$	$2.0 \pm 0.08$
	100 BM	$1.0 \pm 0.42$	$1.5 \pm 0.04$



**Figura 5. Vitroplántulas de *Jatropha curcas* enraizadas.**

#### **3.4. Condiciones *ex vitro***

Las vitroplantas obtenidas en fase de enraizamiento no se adaptaron a las condiciones *ex vitro*, observándose una mortalidad del 100 %.

#### **4. CONCLUSIONES**

El índice de contaminación más elevado de las yemas (26,67%), se debe a la introducción del material de campo sin una previa cuarentena fitosanitaria, la misma que no se efectuó por falta de espacio y tiempo, por el contrario los embriones presentaron un menor valor (10%), debido a las capas de tejido que los recubren.

El protocolo de desinfección ( $\text{HgCl}_2$  0,1 % x 3 min), debe dar mejor resultado si se combina con la cuarentena fitosanitaria, este desinfectante es uno de los más efectivos por su toxicidad, y *J. curcas* requiere de una combinación de ambas estrategias.

El número y la longitud de las raíces obtenidas durante la fase de enraizamiento, no fue el adecuado, el sistema radical de *J. curcas* es más profuso y de mayor longitud, en ninguna de las dos formulaciones empleadas, ni en los dos tipos de explantes (embriones y yemas meristemáticas), se obtuvieron los resultados esperados.

La aclimatación a condiciones *ex vitro* no resultó, una de las causas puede ser el pobre desarrollo radical obtenido en las vitroplantas de *J. curcas*; así como al sustrato utilizado en la fase de adaptación.



## 5. BIBLIOGRAFÍA.

- Castro, P., Coello, J., y Castillo-Lima, L., 2007. Opciones para la producción y uso del Biodiésel en el Perú. Intermediate Technology Development Group (ITDG-Perú).
- García, Gil. 2008. Energías del siglo XXI. De las energías fósiles a las alternativas. Ediciones Mundi-Prensa.
- IEA, 2005. World Energy Outlook. International Energy Agency.
- IEA, 2006. Key World Energy Statistics. International Energy Agency.
- Institute for Plasma Physics Rijnhuizen. Disponible en <http://www.rijhuizen.nl>
- Kozai, T., H. Oki and K. Fujiwara, 1988. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and sucrose concentration under high photosynthetic photon fluxes on growth of tissue cultured cymbidium plantlets during the preparation stages. Symposium on Plant Micropropagation. pp 135-143. Arlon, Belgium.
- Laforge, F., Lussier, C., Desjardins, Y., and Gosselin, A., 1991, Effect of light intensity and CO<sub>2</sub> enrichment *in vitro* rooting on subsequent growth of plantlets of strawberry, raspberry and asparagus in acclimatization. Scientia Horticulturae 47 pp.
- Shrivastava, S., and Banerjee, M., 2008. *In vitro* clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Influence of additives. Laboratory of Algal Biotechnology, Department of Bioscience, Barkatullah University, Bhopal, India.