

## MICROPROGACION DE PIÑON BLANCO (*Jatropha curcas* L.) A PARTIR DE DISCOS FOLIARES.

Delgado Haya, Henri.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología, Estación Experimental Agraria El Porvenir-San Martín. Ctra. Fernando Belaunde Terry km 14.5, Juan Guerra, San Martín, Perú

[henri.delgado.12@gmail.com](mailto:henri.delgado.12@gmail.com)

**Resumen:** Se desarrolló un simple protocolo para la inducción de brotes laterales adventicios a partir de discos foliares de hoja de *Jatropha curcas* L.. Brotes laterales adventicios se obtuvieron a partir de explantes de hoja cultivadas in vitro cultivadas en medio Murashige y Skoog's (MS) suplementado con thidiazuron (TDZ) (2.27  $\mu$ M), 6-benzylaminopurina (BA) (2.22  $\mu$ M) y ácido indol-3-butirico (IBA) (0.49  $\mu$ M). La presencia de TDZ en el medio de inducción ejerció gran influencia en la inducción de brotes laterales adventicios. Los brotes laterales fueron multiplicados y elongados en un medio de refrescamiento MS suplementado con BA (4.44  $\mu$ M), kinetina (Kn) (2.33  $\mu$ M), ácido indole-3-acetico (IAA) (1.43  $\mu$ M), y ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) (0.72  $\mu$ M). Este protocolo puede ser usado para la producción masiva de plantas.

**Palabras clave:** *Jatropha curcas*, regeneración directa de brotes, brotes adventicios, Thidiazuron, Biodisel.

### Abreviaturas

BA	6-Benzylaminopurina
GA <sub>3</sub>	Acido giberélico
IAA	Ácido Indole-3-acetico
IBA	Ácido Indole-3-butirico
Kn	Kinetina
MS	Medio basal Murashige y Skoog
TDZ	Thidiazuron

**Abstract.** A simple, high-frequency and reproducible protocol for induction of adventitious shoot buds and plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L. has been developed. Adventitious shoot buds were induced from very young leaf explants of in vitro germinated seedlings as well as mature field-grown plants cultured on Murashige and Skoog's (MS) medium supplemented with thidiazuron (TDZ) (2.27  $\mu$ M), 6-benzylaminopurine (BA) (2.22  $\mu$ M) and indole-3-butyric acid (IBA) (0.49  $\mu$ M). The presence of TDZ in the induction medium has greater influence on the induction of adventitious shoot buds, whereas BA in the absence of TDZ promoted callus induction rather than shoot buds. Induced shoot buds were multiplied and elongated into shoots following transfer to the MS medium supplemented with BA (4.44  $\mu$ M), kinetin (Kn) (2.33  $\mu$ M), indole-3-acetic acid (IAA) (1.43  $\mu$ M), and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) (0.72  $\mu$ M). This protocol might find use in mass production of true-to-type plants.

## INTRODUCCION

*Jatropha curcas* L. es un arbusto perenne originario de América latina y extendida en todas las regiones tropicales del mundo. *Jatropha* es un género que comprende más de 170 especies. Las especies más comunes en la India son *J. curcas*, *J. glandulifera*, *J. gossypifolia*, *J. multifida*, *J. nana*, *J. panduraefolia*, *J. villosa*, y *J. podagrica*. La mayor parte de estas especies son ornamentales excepto *J. curcas* y *J. glandulifera*, estas son especies de alto rendimiento de aceite (Swarup 2004). Las semillas de *Jatropha* contienen 30–40% de aceite con un perfil de ácidos grasos similar al de los alimentos (Gubitz et al. 1999). *Jatropha* contiene aceite con ácido linolénico y ácido oleico, que en conjunto representan más del 80% de su composición. El ácido palmítico y el ácido esteárico y otros ácidos grasos están presentes en este aceite. Por otro lado, *J. curcas* es una atractiva planta tropical fuente de energía. El aceite de las semillas es usada para los motores diesel, porque tiene características de los combustibles fósiles. El cultivo de *J. curcas* asume un rol importante para la producción a gran escala y la satisfacción de la demanda de material elite. En forma tradicional es posible la propagación a través de puntas de tallo, pero los bajos rendimientos y el establecimiento de plantas en suelos marginales hacen imposible este método de propagación.

Siendo necesaria la generación de protocolos de clonación de plantas elite en cuanto a rendimientos de semilla y contenido de aceites y existiendo protocolos desarrollados en otros países; es que se planteó la validación del protocolo generado por **Ajay C. Deore & T. Sudhakar Johnson: High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.**, publicado en **Plant Biotechnol Rep (2008) 2:7–11.**, en el cual se logró inducir brotes laterales utilizando como material inicial discos foliares.

## Materiales y método

### Material vegetal

Semillas fueron colectadas de la plantación ubicada en la Estación Experimental Agraria “El Porvenir”. Las semillas colectadas fueron sumergidas en agua destilada por 24–48 h a temperatura ambiente. Después de 48 horas, las semillas colectadas fueron esterilizadas superficialmente con una solución al 1% de NaOCl por 20 minutos después fueron enjuagados con agua destilada estéril. El material fue colocado en placas con papel filtro estéril para la disección, cotiledones fueron extraídos y cultivados en sales basales de MS (Murashige y Skoog

1962) distribuidos en tubos de cultivo de 25x150-mm. Sales basales de MS suplementado con 3% de sucrosa y solidificado con 0.8% agar (Hi-Media, India). Los cultivos fueron mantenidos en  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y a 16-h fotoperiodo iluminados con lámparas fluorescentes de 40 watts.

### Inducción de brotes adventicios en cultivos de hojas

De semillas germinadas in vitro de 2 meses de edad, fueron extraídos discos de hoja usando un sacabocado de aproximadamente 3–5 mm de diámetro y puestos en contacto con el medio. El medio para la inducción de brotes laterales adventicios consistió en sales de MS con 3% sucrosa (w/v), y fueron cultivados en combinaciones de tres hormonas, estas fueron: tidiazuron (TDZ) ( $2.27 \mu\text{M}$ ) y 6-benzylaminopurina (BA) ( $2.22 \mu\text{M}$ ) en combinación con IBA ( $0.49 \mu\text{M}$ ). Los cultivos fueron incubados a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  y en un fotoperiodo de 16-h e iluminados con lámparas fluorescentes de luz blanca de 40 watts. Los discos de hoja fueron incubados en medio de inducción por 4–6 semanas.

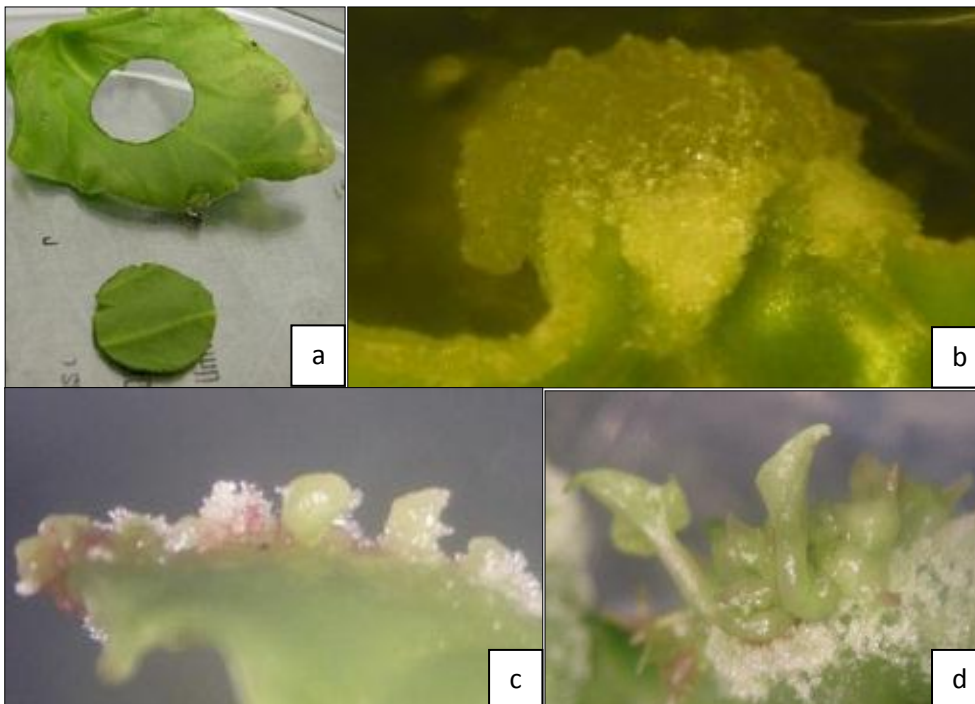
## Análisis estadístico

El experimento fue instalado en un diseño completamente randomizado (DCA) Para los experimentos de inducción de brotes laterales adventicios los tratamiento consistieron en 5 repeticiones y cada repetición contenía dos discos foliares. La frecuencia de formación de callos y formación e inducción de yemas, expresada en porcentaje fue calculado en proporción al número de explantes formados, explante formando callo y yemas laterales. El porcentaje fueron transformados arc sen angular y sujeto al análisis de varianza (F test). Diferencias significativas fueron calculadas y evaluadas donde el efecto de las interacciones fue estadísticamente significativo y acorde a los promedios.

## Resultados y discusiones

Los discos de hoja puestos en medio de inducción alargaron y mostraron respuesta variada. Los discos de hoja incrementaron de tamaño y originaron brotes laterales adventicios en los extremos de los cortes expuestos al medio. La regeneración de yemas laterales fue observada en discos de hoja cultivadas en tres grupos de medio de cultivo (Fig. 1a, b). Sin embargo, la frecuencia de hojas que presentaron inducción de brotes laterales adventicios, variaron en presencia o ausencia de citoquininas. TDZ y BA en combinación con IBA, pero el más adecuado para la máxima inducción de brotes laterales fue. TDZ at 2.27- $\mu\text{M}$  esta concentración indujo brotes laterales en un 53.5% de los explantes de discos de hoja, mientras que a 4.55  $\mu\text{M}$ , los brotes laterales inducidos fue solamente 37%. La capacidad de inducción de brotes laterales fue reducida en ausencia de BA. TDZ e IBA y en ausencia de BA tenía menos efecto la inducción de brotes laterales. TDZ (2.27  $\mu\text{M}$ ) in combinación con IBA (0.49  $\mu\text{M}$ ) había inducido brotes laterales en 24.5%, mientras que TDZ (4.55  $\mu\text{M}$ ) en combinación con IBA (2.46  $\mu\text{M}$ ) indujeron brotes laterales en 32% en cultivos de discos de hoja, respectivamente. En forma similar, BA en ausencia de TDZ promovió la inducción de callos en lugar de inducir brotes laterales. BA (2.22  $\mu\text{M}$ ) en combinación con IBA (0.49  $\mu\text{M}$ ) indujeron callos en 58% y brotes laterales en 12% en cultivos de discos de hoja, mientras que BA (4.44  $\mu\text{M}$ ) en combinación con IBA (2.46  $\mu\text{M}$ ) indujeron callos en 62% y brotes laterales en 20% en cultivos de discos de hoja, respectivamente.

La capacidad de inducción de brotes laterales fue drásticamente reducida en ausencia de TDZ. Estos resultados sugieren que tanto TDZ y BA ejercen siempre efectos sinérgicos en la inducción de brotes laterales en *J. curcas*.



**Fig. 1:** Regeneración de brotes laterales a partir de discos de hoja en *Jatropha curcas* L. **a** Explante (disco de hoja utilizado). **b** Formación de callo en borde de explante a los 21 días de la inducción. **c** Aparición de brotes a los 31 días. **d** Desarrollo de brotes.

Concentración de regulador de crecimiento ( $\mu\text{M}$ )			Respuesta de los discos de hoja (%)	
TDZ	BA	IBA	Formación de callo	Inducción de brotes
2.27	2.22	0.49	40 e	53.5 a (47.040)
4.55	4.44	0.98	50 d,e	37 b,c (37.320)
2.27	–	0.49	52.5 c,d	24.5 d ( 29.328)
4.55	–	2.46	50 d,e	32 b,c (34.368)
–	2.22	0.49	58 a,b,c	12 f (21.072)
–	4.44	2.46	62 a	20 e (26.220)

TDZ= thidiazuron  
 BA= 6-benzylaminopurine  
 IBA= acido 3- indol butirico

En otras investigaciones, TDZ y BA en combinación con IBA mostraron más capacidad para la inducción de brotes laterales. Weida et al. (2003) reporta la regeneración de callos en plántulas a partir de hipocotilos, peciolos y explantes de hoja en *J. curcas* en medio suplementado con BA and IBA.

Los resultado obtenidos validan el protocolo desarrollado por Ajay C. Deore & T. Sudhakar Johnson: High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L., publicado en *Plant Biotechnol Rep* (2008) 2:7–11., en el cual se logró inducir brotes laterales utilizando como material inicial discos foliares.

## AGRADECIMIENTOS

El autor agradece la colaboración del Gobierno Regional de San Martín en el financiamiento del proyecto Piñón, en el marco del cual se ejecutó en presente trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Gubitz GM, Mittelbach M, Trabi M (1999) Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresour Technol* 67:73–82 Huetteman CA, Preece JE (1993) Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 33:105–119
- Krikorian AD (1982) Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cells. *Biol Rev* 57:151–218
- Landi L, Mezzetti B (2006) TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. *Plant Cell Rep* 25:281–288
- Malik KA, Saxena PK (1992) Thidiazuron induces high frequency shoot regeneration in intact seedlings of pea, chickpea and lentil. *Aust J Plant Physiol* 19:731–740 Meng RG, Chen THN, Finn CE, Li YH (2004) Improving in vitro plant regeneration from leaf and petiole explants of ‘Marion’ blackberry. *HortSci* 39:316–320
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497 Murthy BNS, Murch SJ, Saxena PK (1995) TDZ-induced somatic embryogenesis in geranium cotyledonary cultures. *Plant Cell Rep* 15:423–426 Srivastava PS (1974) In

vitro induction of triploid roots and shoots from mature endosperm of *Jatropha panduraefolia*. Z Pflanzenphysiol 66:93–96

Srivastava PS, Johri BM (1974) Morphogenesis in mature endosperm cultures of *Jatropha panduraefolia*, Beitr. Biol Pflanz 50:255– 268  
Sujatha M, Mukta N (1996) Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. Plant Cell Tissue Organ Cult 44:135–141

Sujatha M, Reddy TP (2000) Morphogenic responses of *Jatropha integerrima* explants to cytokinins. Biologia 55:99–104

Sujatha M, Dhingra M (1993) Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerrima*. Plant Cell Tissue Organ Cult 35:293–296

Sujatha M, Makkar HPS, Becker K (2005) Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. Plant Growth Reg 47:83–90

Swarup R (2004) Biotechnological interventions to improve *Jatropha* seeds and oil quality. SAARC Oils & Fats Today, August, pp 39–41

Tsugawa H, Kagami T, Suzuki M (2004) High-frequency transformation of *Lobelia erinus* L. by *Agrobacterium* mediated gene transfer. Plant Cell Rep 22:759–764

Weida L, Qim W, Lin Tang, Fang Y, Fang C (2003) Induction of callus from *Jatropha curcas* and its rapid propagation. Ying