

## 17. Ciencia, Tecnología e Innovación

### **Introducción al cultivo *in vitro* de la planta silvestre *Jatropha peiranoi* para la producción de biodiesel.**

Paterlini, Paula: [paula\\_paterlini@hotmail.com](mailto:paula_paterlini@hotmail.com)

Directoras: Romero, Cintia Mariana; Tonello, Ursula

Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia

Universidad Nacional de Tucumán

---

#### **Resumen**

El objetivo fue establecer estrategias de cultivo *in vitro* para la especie silvestre *Jatropha peiranoi* (candidata para la producción de biodiesel en la región del NOA) en la iniciación, micropropagación, y aclimatación *ex vitro*. En la iniciación del cultivo, la regeneración de las vitroplantas se realizó de manera directa partiendo de estructuras internas de las semillas, cotiledones y cotiledones más endosperma; de modo indirecto a partir de hojas cotiledonares competentes; y a partir de yemas apicales y axilares de tallos de plantas crecidas a campo. La regeneración directa fue posible entre un 40 a 45 % del material con Ácido Giberélico ( $GA_3$ ) 0,1 mg/L y un rango de Ácido Indol Butírico (IBA) entre 0,1 y 0,2 mg/L agregados en medio MS sólido; la regeneración adventicia de brotes a partir de hojas cotiledonares competentes requirió de la presencia de Bencilaminopurina (BAP) e IBA en la proporción de 3/0,1. El medio MS suplementado con 1 mg/L de Tiazurón (TDZ) fue efectivo para regenerar brotes a partir de hipocótilos, epicótilos y pecíolos de las plántulas obtenidas por regeneración directa. Las yemas apicales y axilares de los tallos colocadas en medio con 0,1 mg/L de IBA y 1 mg/L de BAP se desarrollaron hasta brotes de 1 cm de altura. Durante la micropropagación, el medio suplementado con IBA 0,1, BAP 1 y  $GA_3$  0,1 mg/L determinó la elongación de los brotes y aparición de nuevas yemas en los tallos formados. Éstas se separaron, y colocaron en medio fresco para repetir el ciclo de subcultivos. El enraizamiento de las plántulas requirió del agregado de 0,1 mg/L de IBA al medio de cultivo para la formación de raíces primarias y secundarias. Las plántulas obtenidas *in vitro* fueron aclimatadas en vivero antes de ser trasladadas a campo.

**Palabras clave:** Biodiesel, *Jatropha*, cultivo *in vitro*.

## 1. Introducción

El bioetanol y el biodiesel son las formas de utilización de los denominados biocombustibles líquidos, compuestos químicos elaborados a partir de material vegetal proveniente de plantas herbáceas, oleaginosas y leñosas, residuos de la agricultura, desechos residenciales, etc (Granda, *et al.*, 2007). El biodiesel es un sustitutivo del gasoil obtenido a través de la transesterificación de aceites y grasas de origen vegetal como aceites de soja, girasol, y jatropha, entre otros. La utilización de estos como materia prima para la fabricación de los llamados biocombustibles de primera generación, ha generado algunas consecuencias adversas: utilización de suelos destinados a la producción de alimentos para su cultivo, deforestación de bosques y aplicación de fertilizantes y maquinarias que comprometen al equilibrio del medioambiente (Singh Nigam y Singh, 2011).

A partir del reconocimiento de estas dificultades, se incrementaron los estudios destinados a identificar y domesticar cultivos energéticos que no compitan con la producción de alimentos y que se desarrollen en tierras marginales de poca calidad en términos de uso agrícola. Estos son los llamados biocombustibles de segunda generación y con respecto al biodiesel de segunda generación, los

estudios están orientados al mejoramiento de especies oleaginosas de cuyas semillas puedan extraerse aceites de mejor calidad que puedan ser sustitutos de los tradicionalmente empleados como materia prima, que son usados en la alimentación humana. Entre estos cultivos, *Jatropha curcas* ha sido seleccionada por el alto contenido en aceite de sus semillas (Contran, *et al.*, 2013).

*J. curcas* pertenece a la familia de las Euphorbiaceae, es nativa de las regiones tropicales de América Central. Sus frutos poseen de 2 a 3 semillas con un 30-35% de aceite, las cuales contienen compuestos tóxicos (ésteres de forbol, curcina, etc), por lo que no son comestibles). *J. curcas* puede crecer en zonas con un amplio rango de condiciones climáticas. Carece de tolerancia a las heladas (Trabuco, *et al.*, 2010). Posee habilidad para adaptarse a suelos pobres. Es considerada actualmente una planta semi-silvestre, aún no domesticada, ya que no se ha desarrollado una variedad comercial de alto rendimiento y tolerante a estrés biótico y abiótico (Achten, *et al.*, 2010).

Para aprovechar todo el potencial de este cultivo energético es necesario aplicar metodologías que permitan su mejoramiento y domesticación. La variabilidad genética de una especie es

esencial para el éxito de un programa de mejoramiento. Diferentes estudios moleculares revelaron que en el género *Jatropha* es muy baja. Este panorama reduce el potencial de los cruzamientos intraespecíficos para la obtención de nuevas variedades, y hace necesaria la implementación de herramientas biotecnológicas como la obtención de híbridos interespecíficos, la producción de haploides, la embriogénesis somática, la variación somaclonal, entre otras (Moniruzzaman, *et al.*, 2016).

*J. peiranoi* es una especie endémica del NOA, es decir que solo crece naturalmente en esta región y no es posible encontrarla en otras partes del mundo. Se encuentra adaptada a condiciones climáticas áridas y a suelos arenosos, pobres en nutrientes y materia orgánica (Fracchia, *et al.*, 2016). Las diferencias encontradas en el color y aspecto del tegumento de las semillas permitieron a Adén (2016) la clasificación en cinco grupos diferentes: Grupo 1: Marrón claro no marmoreadas; Grupo 2: Marrón claro marmoreadas; Grupo 3: Marrón oscuro; Grupo 4: Pardo grisáceas no marmoreadas; Grupo 5: Pardo grisáceas marmoreadas (Fig. 1).

Al realizar la extracción de aceite de las mismas con solventes de distintas polaridades se obtuvieron rendimientos superiores a los de *J. curcas*. Se determinó su composición de ácidos grasos y estabilidad térmica, de fundamental importancia para conocer las

propiedades físicas que presentaría el biodiesel producido a partir de él (Adén, 2016). La determinación de la presencia de actividad enzimática lipolítica (lipasa y esterasa) en la biomasa residual le da un valor agregado a este subproducto. La caracterización de los oleosomas (compartimentos presentes en las semillas en donde se almacena el aceite), y su relación con el contenido de aceite hace que esta especie sea promisoría para la obtención de biocombustible.



Figura 1. Semillas de *Jatropha peiranoi* clasificadas en 5 grupos según Adén 2016.

El cultivo *in vitro* de tejidos es una herramienta de la Biotecnología Agrícola que estudia el crecimiento de células, tejidos u órganos vegetales aislados de una planta madre, en un medio nutritivo y en condiciones ambientales controladas.

Se basa en la totipotencialidad celular, característica los tejidos meristemáticos que retienen su capacidad de desarrollo, y bajo condiciones controladas pueden multiplicarse, dando origen a todos los tipos celulares presentes en una nueva planta (Pierik, 1998).

Los cultivos se inician a partir de pequeñas piezas de tejidos aislados de una planta entera (explantes). Sus aplicaciones son numerosas: conservación de la biodiversidad en Bancos de Germoplasma (García-Águila, *et al.*, 2007); propagación clonal de genotipos determinados, obtención de plantas libres de virus a través del cultivo de meristemas, producción de metabolitos secundarios y otros productos de interés, la producción de híbridos en programas de mejoramiento, etc. (Villalobos y Torphe, 1991).

Las ventajas del cultivo *in vitro* son, entre otras, que la micropropagación puede realizarse en espacios físicos reducidos donde las condiciones ambientales son controladas, es decir, no hay dependencia del clima, suelo, distribución geográfica, estación del año, se evita el riesgo de contaminación con patógenos, permite asegurar las características genéticas del material, y facilita el transporte del material en grandes distancias. (George, 1993). El medio que se utilice para el cultivo *in vitro* debe proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento de la planta. El más difundido es el que

contiene la formulación de las sales de Murashige y Skoog (1962). El pH es ajustado entre 5,6 - 5,8.

Los reguladores del crecimiento vegetal son compuestos de síntesis química agregados al medio con efectos fisiológicos similares a los de las hormonas vegetales, moléculas presentes en las plantas que tienen acción regulatoria sobre el crecimiento y desarrollo. Entre los más usados se encuentran las auxinas, las citoquininas y giberelinas (Passey, *et al.*, 2003)

El proceso consta de cuatro etapas: En la primera, Establecimiento o Iniciación, se inicia el cultivo *in vitro* del material vegetal seleccionado en condiciones asépticas. La regeneración de una plántula a partir del meristema del donante se completa entre las 4-6 semanas. En la siguiente etapa de Multiplicación, esta plántula es transferida a medio fresco de diferente composición al anterior, en donde se induce la aparición de yemas axilares en los tallos, capaces de originar nuevas plántulas. Este paso puede repetirse realizando nuevos ciclos de cultivo con las plántulas recientemente formadas. En la tercera etapa, el Enraizamiento, se adecua la composición del medio para favorecer el desarrollo de raíces, y cuando el sistema radicular de la vitroplanta está maduro, al cabo de 40 días, puede ser transferida a suelo en la etapa de Aclimatación (Kumar y Reddy, 2011).

## 2. Objetivos

Emplear diferentes estrategias de cultivo de tejidos *in vitro* adaptándolas a la especie silvestre *Jatropha peiranoi*, ajustando los factores que influyen en cada una de las etapas involucradas en la regeneración y multiplicación clonal de las vitroplántulas, de modo de favorecer su posterior crecimiento *ex vitro*.

### **3. Materiales y Métodos**

#### **3.1 Material vegetal**

Las semillas y segmentos de tallos de *J. peiranoi* fueron recolectados en un predio en el Valle de Santa María, Catamarca (Argentina) a 1,5 Km del centro de esta ciudad, a 1885 metros sobre el nivel del mar, coordenadas (66° 2 33" W – 26° 41 16" S), en el periodo comprendido entre los meses de octubre de 2016 y febrero de 2017.

#### **3.2 Micropropagación de *J. peiranoi***

##### **3.2.1 Etapa de Iniciación o establecimiento del cultivo**

Se partió de material proveniente de las semillas de los grupos tres, cuatro y cinco; y de las yemas axilares y apicales del tallo de *J. peiranoi* con el objetivo de regenerar vitroplantas. La regeneración se realizó en forma directa e indirecta. En el caso de la regeneración directa, se separaron lotes de 320 semillas sin cubiertas de cada grupo. Cada uno de ellos se subdividió en dos lotes de 160, de los cuales la mitad de las semillas se establecieron como cotiledones (C), y la otra mitad como cotiledones más endosperma (C+E). A su vez, estos lotes se subdividieron

equitativamente para ensayar el efecto de diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento GA<sub>3</sub> e IBA (0,01; 0,02; 0,03; 0,04 y 0,1 mg/L para GA<sub>3</sub>, y 0,1 y 0,2 mg/L para IBA), solos o combinados, agregados en medios de cultivo de diferente estado, sólido o líquido. La evolución del desarrollo de las estructuras de la semilla hasta obtener la regeneración de la plántula se registró diariamente hasta los 40 días desde la iniciación del ensayo. Posteriormente, los órganos (hipocótilos, epicótilos y pecíolos) de estas plántulas se usaron para ensayar el efecto de TDZ e IBA en concentraciones de entre 0,002 y 1 mg/L de TDZ y 0,002 mg/L de IBA en la regeneración de brotes adventicios.

En el caso de la regeneración indirecta, se utilizaron 200 semillas sin cubiertas de los grupos cuatro y cinco. El ensayo consistió en dos etapas. En la primera de ellas, la etapa de competencia, en 10 cajas de Petri conteniendo un papel de filtro embebido en medio MS 0,5X (medio de competencia) se colocaron 200 semillas (20 semillas por caja) y se incubaron 1 semana. Al cabo de este tiempo las semillas adquirieron un estado denominado de competencia, en el que los procesos metabólicos relacionados a la germinación comienzan a activarse en el embrión y el endosperma. En la segunda etapa, de regeneración adventicia, se extrajeron los cotiledones del interior las semillas competentes, se cortaron en fragmentos de 0,5 x 0,5 cm y

se cultivaron en medios de regeneración. En este punto se evaluó el efecto de la concentración de IBA, BAP y TDZ (1, 2 y 3 mg/L de BAP, 0,1 mg/L de IBA y 0,5 mg/L de TDZ) sobre el desarrollo de brotes al cabo de 6 semanas de incubación.

Por último, las yemas axilares y apicales de los tallos se disecaron cuidadosamente bajo lupa hasta aislar el tejido meristemático. La capacidad de este tejido para regenerar nuevos brotes fue evaluada en medios con IBA y BAP en concentraciones de entre 0 y 1,5 mg/L de IBA y 1 mg/L de BAP hasta las 4 semanas de cultivo.

### **3.2.2 Multiplicación**

Con los brotes obtenidos en el paso anterior se ensayaron las condiciones de multiplicación y elongación de los mismos. Para esto se seleccionaron 3 lotes de 25 brotes que se cultivaron en medios con agregado de IBA (0,1 mg/L), GA<sub>3</sub> (0,1 mg/L) y BAP (0; 0,1; 0,5 y 1 mg/L) con el objetivo de determinar el efecto de estos reguladores del crecimiento sobre la multiplicación y elongación de los brotes, y aparición de nuevas yemas en los tallos formados hasta los 40 días de inicio del cultivo en cada tratamiento. Éstas se separaron, y colocaron en medio fresco para repetir el ciclo de subcultivos hasta tener el número deseado de vitroplantas.

### **3.2.3 Enraizamiento y Aclimatación**

Para el enraizamiento, se seleccionaron 4 lotes de 36 plántulas de 2-3 cm de longitud, y se transfirieron a medio MS

0,5X, con sacarosa 30 g/L y agar 7%, suplementados con IBA en concentraciones de 0, 0,1, 0,2 y 0,3 mg/L. Se evaluó el porcentaje de brotes enraizados en cada tratamiento, y se describieron los cambios morfológicos asociados a la madurez del sistema radicular hasta los 40 días.

Al cabo de ese tiempo, las vitroplantas con raíces desarrolladas se retiraron de los frascos de cultivo, se lavaron para eliminar los restos de medio, y fueron trasplantadas a macetas conteniendo tierra estéril. Se cubrieron con plástico transparente durante 15 días para facilitar la adaptación a las condiciones *ex vitro*, y luego se transfirieron a un invernadero (25 °C y humedad relativa del 70%) para que completen su crecimiento. Se evaluó el porcentaje de plantas que desarrollaron en vivero al cabo de un mes.

### **3.3. Condiciones de crecimiento *in vitro***

Durante todos los tratamientos los frascos de cultivo fueron mantenidos en cámaras de crecimiento a 24 ± 2°C, humedad relativa del 70% y fotoperiodo de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad.

## **4. Resultados y Discusión**

### **4.1 Clasificación de las semillas**

Se clasificaron las semillas recolectadas en cinco grupos diferentes en base al color y aspecto de su tegumento, según lo descrito por Adén (2016).

### **4.2 Micropropagación de *J. peiranoi***

#### **4.2.1 Iniciación**

#### 4.2.1.1 Regeneración directa

La regeneración directa dependió del grupo de semillas con el que se realizó el ensayo. Tanto los cotiledones (C) como los cotiledones más endosperma (C+E) de las semillas del grupo tres no fueron capaces de regenerar plantas *in vitro* con ninguno de los tratamientos empleados. Las de los grupos cuatro y cinco, presentaron porcentajes de regeneración variables, no superiores al 45% con los diferentes tratamientos, tanto si la estructura usada para el establecimiento se trató de cotiledones solos o cotiledones unidos al endosperma de las semillas desprovistas de cubiertas (Fig. 2A y 2B). Se observó también que el 80% de las plántulas regeneradas a partir de cotiledones en los dos grupos, frenaron su desarrollo entre los 18 a 20 días del inicio del experimento, lo que podría atribuirse a la ausencia de algún factor presente en el endosperma necesario para completar el programa genético del proceso iniciado en los cotiledones. En los dos casos, el aumento de la concentración de GA<sub>3</sub> resultó en un aumento del porcentaje de plántulas regeneradas con respecto al control; y se observó un efecto sinérgico al agregar juntos al medio de cultivo, los 2 reguladores de crecimiento en las concentraciones de 0,1 mg/L -0,1 mg/L (T6) y 0,1 mg/L -0,2 mg/L (T7) de GA<sub>3</sub> e IBA, respectivamente sobre la regeneración de las plántulas de *J. peiranoi* (Fig. 2A y 2B).

El medio solidificado con agar fue más eficiente en la regeneración que el líquido hasta los 40 días de cultivo (Fig. 2C). Esto podría deberse a la dificultad para que la semilla se mantenga siempre en la posición vertical en el medio líquido dificultando su desarrollo normal.

Estos resultados indicarían que el color y aspecto del tegumento de los distintos grupos de semillas se corresponden con distintos estadios del desarrollo, y que en los grupos cuatro y cinco las semillas han completado su maduración y pueden iniciar la regeneración de una planta completa.

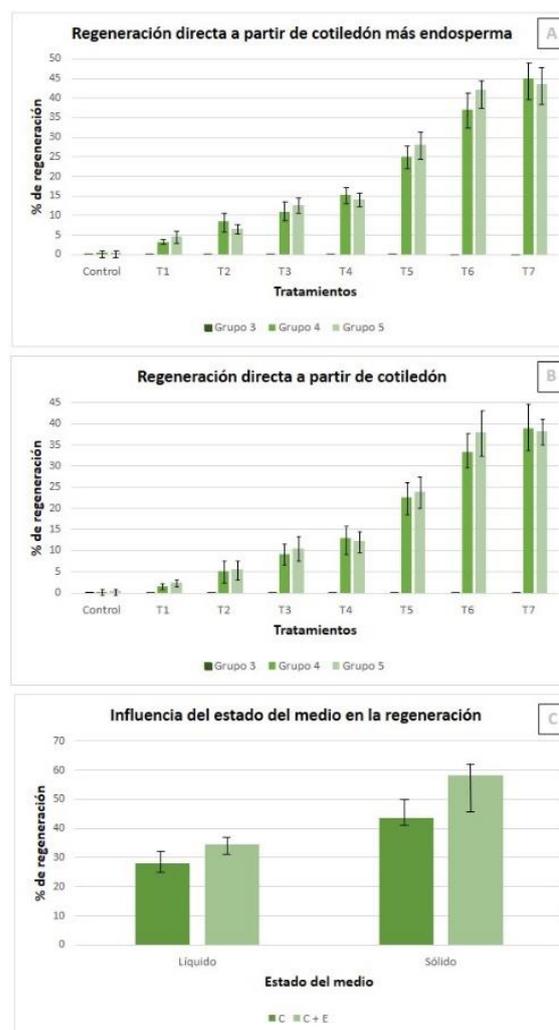


Figura 2. Regeneración de plántulas de *J. peiranoi* a partir de estructuras internas (C o C+E) de las semillas de los grupos tres, cuatro y cinco. A). Efecto de los tratamientos en la regeneración de plántulas partiendo de C+E; n=160 B) Efecto de los tratamientos en la regeneración de plántulas partiendo de C; n=160. C) Efecto de la consistencia del medio de cultivo en la regeneración de plántulas *in vitro* a partir de semillas de los grupos cuatro y cinco de *J. peiranoi*; n=160. Los valores corresponden a la evaluación realizada a los 40 días desde el inicio del cultivo. Se realizó el Análisis de la varianza ANOVA  $p \leq 0,05$ .

Distintos autores reportan la obtención de un porcentaje del 75% de regeneración de plántulas en medios MS con diferentes combinaciones de auxinas y giberelinas a partir de embriones inmaduros de *J. curcas* usando medios sólidos y líquidos (Islam y Bari, 2012). En nuestros experimentos los porcentajes de regeneración obtenidos, en general, no superaron el 50%. Esto puede ser atribuido a diferencias entre especies, en donde los eventos relacionados a la maduración de la semilla respondan a variantes de las vías metabólicas involucradas en el proceso.

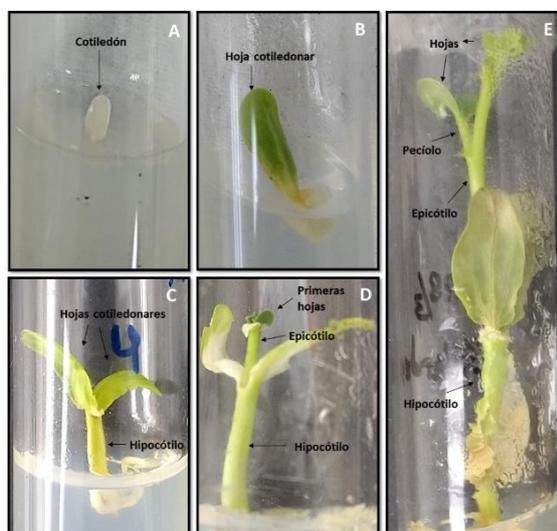


Figura 3. Desarrollo de una plántula de *J. peiranoi* a partir de cotiledón en medio sólido. A) Establecimiento de cotiledón en medio sólido. B) Hoja cotiledonar formada a los 10 días del establecimiento. C) Hipocótilo en desarrollo luego de 20 días de incubación. D) Epicótilo y primeras hojas en desarrollo a los 30 días de establecido el cultivo. E) Plántula desarrollada con hojas, pecíolos, epicótilo e hipocótilo luego de 40 días de incubación.

Ha sido reportado que, al ser aplicado exógenamente, el ácido giberélico es capaz de inducir la ruptura de la dormancia de las semillas (Cavusoglu y Sulusoglu, 2015). Las auxinas son responsables del alargamiento de los tejidos y las giberelinas son, en parte, de la división celular y la elongación del tallo y de otros tejidos (Gaspar, *et al.*, 1996). La combinación de ambos reguladores parece tener un efecto positivo en la organogénesis de *J. peiranoi*.

#### 4.2.1.2 Regeneración de brotes utilizando diferentes tejidos donantes

En la Tabla 1 se muestran los tratamientos (T) y los porcentajes de regeneración obtenidos a las 6 semanas de incubación.

Tabla 1. Regeneración de brotes utilizando diferentes tejidos donantes.

| Material Vegetal        | Tratamiento | TDZ (mg/L) | IBA (mg/L) | % de regeneración |
|-------------------------|-------------|------------|------------|-------------------|
| Hipocótilo y epicótilos | Control     | -          | -          | 0                 |
|                         | T1          | 0,025      | -          | 22                |
|                         | T2          | 0,5        | -          | 43                |
|                         | T3          | 0,75       | -          | 65                |
|                         | T4          | 1,0        | -          | 75                |
|                         | Control     | -          | -          | 0                 |

|          |    |      |   |    |
|----------|----|------|---|----|
| Peciolos | T1 | 0,01 | - | 34 |
|          | T2 | 0,02 | - | 72 |
|          |    | 5    | - |    |
|          | T3 | 0,05 | - | 86 |

En el caso de los hipocótilos y epicótilos, el porcentaje de regeneración adventicia se incrementa al aumentar la concentración de TDZ presente en el medio, es decir que, la regeneración se encuentra fuertemente influenciada por la concentración de esta hormona, tal como es reportado en *J. curcas* por Sharma, *et al* (2011). También se observó la formación de pequeños callos en el material de algunos de los tubos o independientemente de la concentración de TDZ, a partir de los cuales se produjo la regeneración indirecta (Fig. 4 C).

En la Fig. 4 se puede observar la regeneración adventicia a partir de explantos de hipocótilos y epicótilos.

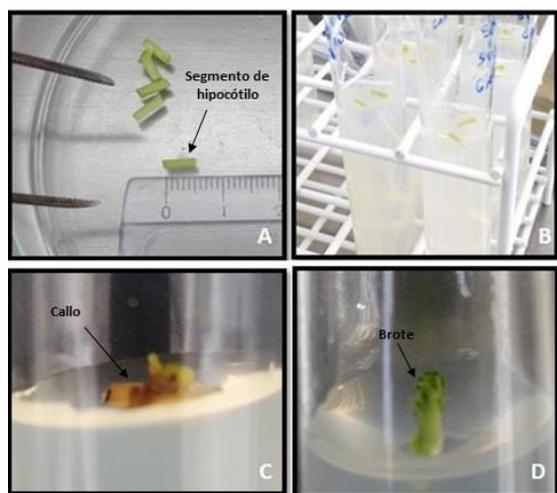


Figura 4. Regeneración adventicia a partir de explantos de hipocótilos y epicótilos. A) Material de partida: Segmentos de 0,5 cm de longitud de explantos obtenidos a partir de plántulas regeneradas *in vitro*. B)

Explantos colocados en medio control. C) Formación de callo a los 10 días de incubación. D) Brote regenerado luego de 25 días de incubación en medio MS con 1 mg/L de TDZ.

Según los resultados obtenidos para la regeneración a partir de explantos de peciolos, a mayor concentración de TDZ agregado al medio, mayor es el porcentaje de regeneración. Nuestros resultados coinciden con lo expuesto por Kumar, *et al.* (2011), quienes sostienen que el porcentaje de regeneración a partir vía organogénesis directa para *J. curcas* se encuentra fuertemente influenciado por la concentración de TDZ presente en el medio (Fig. 5).

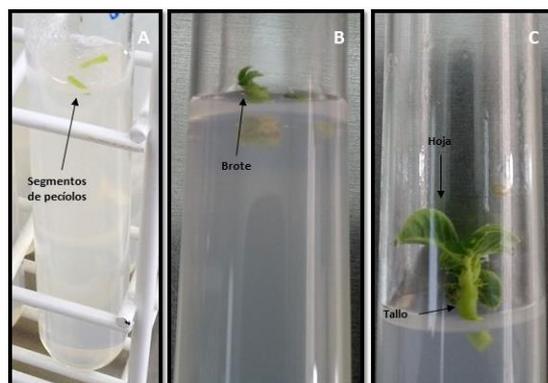


Figura 5. Plántulas regeneradas a partir de explantos de peciolos. A) Material de partida: segmentos de peciolos de 0,5 cm de longitud en medio control. B) Brote regenerado en medio con 0,05 mg /L de TDZ a las 3 semanas de incubación. C) Plántula regenerada en medio con 0,05 mg/L de TDZ a las 6 semanas de incubación.

Se ha comprobado que, comparado con la mayoría de otros compuestos activos, el agregado a los medios de concentraciones extremadamente bajas de TDZ estimulan la proliferación de

brotos axilares de muchas especies leñosas (Huetteman y Preece, 1993).

#### 4.2.1.3 Regeneración indirecta

Se obtuvo un promedio del 65% de regeneración al cabo de 6 semanas en los medios sin TDZ, siendo 3 mg/L de BAP y 0,1 mg/L de IBA la combinación de reguladores del crecimiento que dio lugar al mayor porcentaje (70%). El agregado de TDZ al medio produce una disminución del porcentaje de regeneración adventicia de brotes en relación a los otros tratamientos.

Entre la segunda y tercera semana de realizada la transferencia de los cotiledones competentes a los medios se observó la formación de callos (tejido no organizado). Luego, en la cuarta semana comenzaron a crecer los brotes adventicios a partir de estos callos en todos los medios excepto el control (Fig. 6).

Los resultados obtenidos en esta experiencia coinciden con lo expuesto por Khemkladngoen, *et al.* (2011) para *J. curcas*, quienes observaron la formación de callos en el 100% de las combinaciones de reguladores de crecimiento (IBA, BAP y TDZ) utilizadas. Según lo informado por estos autores, en medios sin TDZ, el porcentaje de regeneración es superior cuando se utiliza una mayor concentración de citoquinina (BAP), lo cual coincide con nuestros resultados.

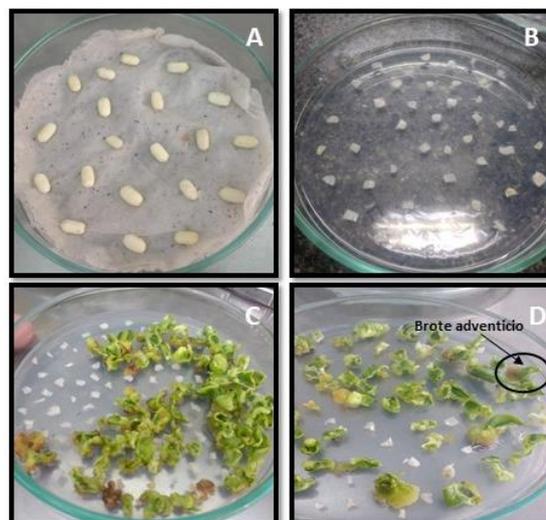


Figura 6. Regeneración indirecta a partir de cotiledones de *J. peiranoi*. A) Semillas de *J. peiranoi* sin cubiertas colocadas horizontalmente sobre papel de filtro embebido en medio de competencia (MS 0,5X). B) Fragmentos de cotiledones competentes colocados en medio de regeneración control. C) Cotiledones sembrados en MS con 3 mg/L BAP y 0,1 mg/L IBA luego de 3 semanas de incubación. D) Regeneración adventicia a partir de cotiledones sembrados en MS con 3 mg/l BAP y 0,1 mg/L IBA luego de 6 semanas de incubación.

#### 4.2.1.4 Regeneración de brotes a partir de yemas axilares y apicales de *J. peiranoi*

Las concentraciones utilizadas y el número de brotes obtenidos en cada tratamiento se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Regeneración de brotes a partir de yemas axilares y apicales de *J. peiranoi*.

| TRATAMIENTO | BAP (mg/L) | IBA (mg/L) | Nº de brotes |
|-------------|------------|------------|--------------|
| Control     | -          | -          | 0            |
| T1          | 1          | 1,5        | 5            |
| T2          | 1          | 0,1        | 10           |
| T3          | 1          | 0          | 2            |
| T4          | 0          | 0,5        | 1            |

El mayor número de brotes con respecto al control se obtuvo con el tratamiento 2. Esta relación auxina/citoquinina baja favorece la regeneración de brotes, y al aumentarla en T1, se redujo a la mitad el número de brotes formados. Por otro lado, se puede ver que el agregado de IBA o BAP individualmente al medio produce la formación de un bajo número de brotes (1 o 2) (Fig. 7).

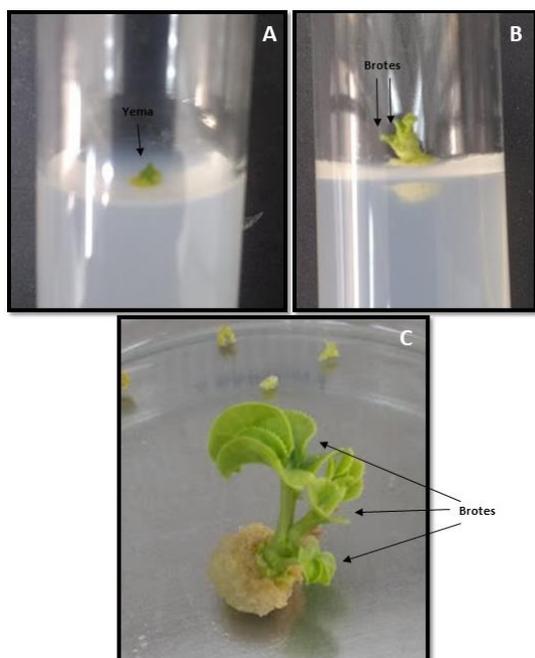


Figura 7. Efecto de los reguladores de crecimiento BAP e IBA en la regeneración de brotes a partir de yemas apicales y axilares del tallo de *J. peiranoi*. A) Yema aislada de tallo en medio control sin reguladores de crecimiento. B) Brote regenerado en medio con 0,1 mg/L de IBA y 1 mg/L de BAP luego de una semana de incubación. C) Brote regenerado luego de 3 semanas de incubación en medio con 0,1 mg/L de IBA y 1 mg/L de BAP.

El efecto sinérgico presentado por IBA y BAP ha sido reportado, tanto para *J. curcas*, como para otras plantas (Singh, *et al.*, 2010).

#### 4.2.2 Micropropagación o Multiplicación de *J. peiranoi*

Luego de 2 semanas de transferencia de los brotes a los medios de cultivo comenzaron a aparecer las primeras yemas axilares en los tallos elongados de las vitroplantas. El número de brotes fue cuatro veces mayor en el medio con IBA 0,1, BAP 1 y GA 0,1 mg/L con respecto al control, a los 25 días de incubación (4 o 5 brotes por explanto), tiempo después del cual los nuevos brotes se subcultivaron en medios frescos de la misma composición de los originales. La longitud máxima alcanzada por los brotes fue de 6,2 cm en este mismo medio. Esto permitió concluir que esta combinación de reguladores de crecimiento fue la más eficiente para la multiplicación y elongación de los brotes (Fig. 8).

Los reguladores del crecimiento fueron agregados en forma combinada para evaluar acciones sinérgicas entre estos compuestos, reportadas por diferentes autores. Diferentes trabajos realizados en *J. curcas* (Shukla, *et al.*, 2013; Coutiño-Cortés, *et al.*, 2013), indican que el uso de citoquininas como BAP en combinación con bajas concentraciones de auxinas, producen un elevado número de brotes, que es lo que observamos en nuestra experiencia. Se utilizó además GA<sub>3</sub>, cuya presencia en el medio de cultivo puede tener un efecto positivo en facilitar el alargamiento de los brotes regenerados, según lo reportado por Ying Liu, *et al.*, (2016).

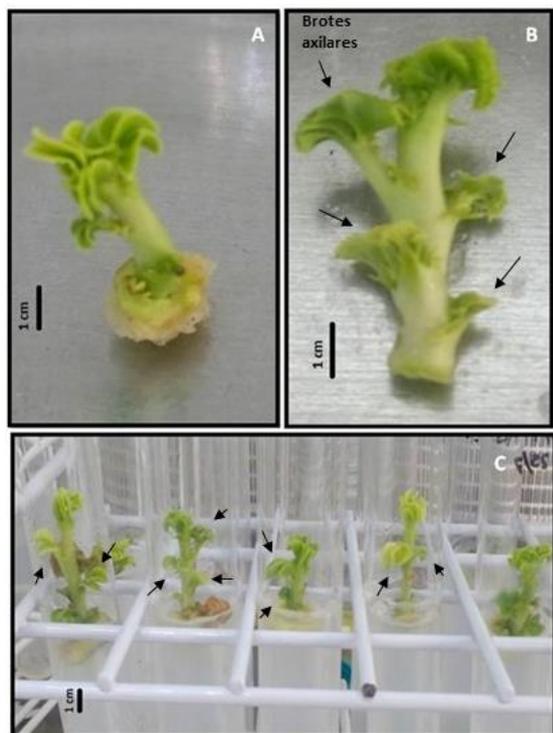


Figura 8. Multiplicación de brotes. A) Brote aislado obtenido en experimento anterior. B) Multiplicación y elongación observada luego de cultivar el brote durante 15 días en medio con: IBA 0,1, BAP 1 y GA 0,1 mg/L. C) Plántulas de *Jatropha peiranoi* multiplicadas y elongadas al final de la experiencia.

#### 4.2.3 Enraizamiento y Aclimatación de las vitroplántulas

Se observa que el agregado de IBA al medio estimula la iniciación y el crecimiento de raíces, siendo la concentración de 0,1 mg/L la que presentó el mayor porcentaje de plántulas enraizadas ( $68,7 \pm 2,5$ ) en relación a los otros tratamientos (Tabla 3).

Tabla 3: Efecto de diferentes concentraciones de IBA en el enraizamiento de plántulas regeneradas a partir de diferentes explantos de *J. peiranoi*.

| IBA (mg/l) | % enraizamiento  | R. primarias | R. secundarias |
|------------|------------------|--------------|----------------|
| 0          | 0                | No           | No             |
| 0,1        | $68,7 \pm 2,5^a$ | Si           | Si             |
| 0,2        | $34,2 \pm 2,9^b$ | Si           | Si             |
| 0,3        | $5,3 \pm 1,4^c$  | Si           | No             |

Los valores representan la media  $\pm$  la desviación estándar de 36 brotes por tratamiento en tres experimentos independientes. Los promedios que no comparten la misma letra son significativamente diferentes.

Entre los 9-12 días de realizada la transferencia de las plántulas a los medios con IBA se observó la aparición del primer esbozo de la raíz, que alcanzó una longitud de entre 4 a 6 cm al cabo de 15 días. En este punto apareció una segunda raíz que igualó en longitud y diámetro a la primera. A los 20 días comenzaron a desarrollarse las raíces secundarias y al mismo tiempo se registró una importante elongación de las raíces primarias llegando a medir entre 15-20 cm al cabo de 40 días (Fig.9). Se considera que la aparición de raíces secundarias es indicativa de la maduración del sistema radicular, ya que un 87% de las plántulas sobrevivieron en la siguiente etapa de aclimatación a suelo.

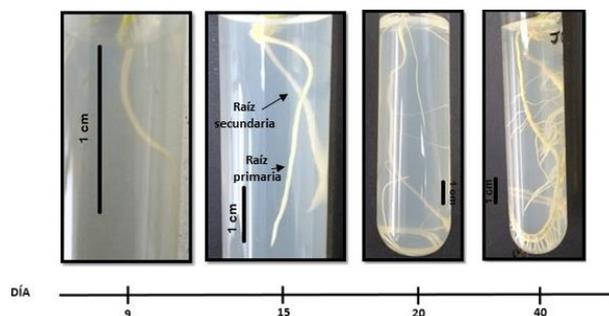


Figura 9. Cambios producidos durante el desarrollo del sistema radicular de *J. peiranoi*.

*peiranoi* hasta los 40 días de crecimiento *in vitro*.

Los datos obtenidos en estas experiencias coinciden con las observadas en los ensayos de enraizamiento *in vitro* de *J. curcas*, ya que con el agregado de IBA 0,1 mg/L se obtienen los índices más e Elevados de enraizamiento de los brotes (Ying Liu, *et al.*, 2016; Khemkladngoen, *et al.*, 2011; Singh, *et al.*, 2010). Asimismo, mayores concentraciones de esta fitohormona provocaron una inhibición de la inducción de las raíces, coincidiendo con lo mostrado para *J. peiranoi* en este ensayo.

Las vitroplantas con raíces primarias y secundarias se retiraron de los frascos de cultivo a los 40 días, se lavaron para eliminar los restos de medio y se trasplantaron a macetas conteniendo tierra estéril. Se cubrieron con plástico transparente durante 15 días para evitar la pérdida de humedad, y se transfirieron a un invernadero (25 °C y humedad relativa del 70%). Se mantuvieron bajo estas condiciones hasta que desarrollaron un buen sistema radicular. Por último, se trasladaron a vivero y se evaluó el porcentaje de plantas que se desarrollaron al cabo de un mes. Aún se encuentran en etapa de prueba y evaluación de resultados.

## 5. Conclusiones

Por primera vez, se establecieron protocolos para la micropropagación *in vitro* de la especie silvestre *J. peiranoi*. Con diferentes explantos y ajustando las concentraciones

de los reguladores de crecimiento en cada etapa del cultivo, se obtuvieron vitroplantas que se aclimataron para su posterior crecimiento *ex vitro*. Este trabajo representa la primera etapa para el desarrollo de este cultivo energético adaptado a la región del NOA, con potencial en la producción de biodiesel.

## 6. Bibliografía

Achten, W.M.J., Nielsen, L.R., Aert, R., Lengkeek, A.G., Kjaer, E.D., Trabucco A., Muys B. (2010). Towards domestication of *Jatropha curcas*. *Biofuels*, 1, 91-107.

Adén, C. (2016). Obtención de aceite como materia prima para biocombustibles a partir de plantas nativas de la región del NOA: experiencia con *Jatropha* sp. (Tesina de grado). Facultad de Bioquímica, química y Farmacia, UNT. San Miguel de Tucumán, Argentina.

Cavusoglu, A., y Sulusoglu, M. (2015). The Effects of Exogenous Gibberellin on Seed Germination of the Fruit Species. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8 (1), 06-09.

Contran, N., Chessa, L., Lubino, M., Bellavite, D., Roggero, P.P., y Enne G. (2013). State of the art of the *Jatropha curcas* productive chain: From sowing to biodiesel and by-products. *Industrial Crops & Products*, 42, 202-215.

Coutiño-Cortés, A.G., Ovando-Medina, I., Adriano-Anaya, M.D.L., Salvador-Figueroa M., y Ruiz-González S. (2013). *Jatropha curcas* organogenesis from adult plants: study of phytohormones and physicochemical factor. *Quehacer Científico en Chiapas*. 8 (2).

- Fracchia, S., Miranda, V., y Rickert, A.A. (2016). Seed Oil evaluation of the Desert Plant *Jatropha peiranoi* and its Potential as Feedstock for Biofuel. *Journal of the Mexical Chemical Society*, 60(3), 163-167.
- García-Águila, L., y Karen Acosta, M.F. (2007). Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. *Bioteología Vegetal*, 7(2), 67 – 79.
- Gaspar, T.H., Kevers, C., Penel, C., Greppin H., Reid, D.M., y Thorpe, T.A. (1996). Plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 32 (4), 272–289.
- George, E. (1993). Plant Propagation by Tissue Culture: Part 1. The Technology. (Ed 2) Exegenetics, Edington, UK.
- Granda, C. B., Zhu, L., y Holtzapple M T. (2007). Sustainable liquid biofuels and their environmental impact. *Environmental Progress*, 26, 233–250.
- Huetteman, C.A., Preece, J.E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33, 105-119.
- Islam M.R., y Bari, A. (2012). Immature embryo is the potential source for *in vitro* plant regeneration in *Jatropha curcas*. *Journal of bio-science*, 20, 125-134.
- Khemkladngoen, N., Cartagena, J., Shibagaki, N., y Fukui, K. (2011). Adventitious shoot regeneration from juvenile cotyledons of a biodiesel producing Plant, *Jatropha curcas* L. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(1), 67-70.
- Kumar, N., Vijay Anand, K.G., y Reddy, M.P. (2011). *In vitro* regeneration from petiole explants of non-toxic *Jatropha curcas*. *Industrial Crops and Products*, 33, 146–151.
- Kumar, N., y Reddy, M.P. (2011). *In vitro* Plant Propagation: A Review. *Journal of Forest Science*, 27 (2), 61-72.
- Moniruzzaman, M., Yaakob, Z., y Khatun, R. (2016) Biotechnology for *Jatropha* improvement: a worthy exploration. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, 1262 1267.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacc Tissue Culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Passey, A.J., Barret, K.J., y James, D.J. (2003). Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) using a range of explant types. *Plant Cell Reports*, 21(5), 397-401.
- Pierik, R.L.M. (1998). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores, 3rd edn. Ediciones multi- Prensa, Madrid, 326 pp.
- Sharma, S., Kumar, N., y Reddy, M.P. (2011). Regeneration in *Jatropha curcas*: Factors affecting the efficiency of *in vitro* regeneration. *Industrial Crops and Products*, 34, 943 – 951.
- Shukla, P., Makwana, V., Bhatt, D., y Robin, P. (2013). Efficient method for direct and indirect organogenesis in biofuel crop *Jatropha curcas*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(1), 673 – 682.
- Singh Nigam, P., y Singh A. (2011). Production of liquid biofuels from

renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37, 52-68.

Singh, A., Reddy, M.P., Chikara, J., and Singh, S. (2010). A simple regeneration protocol from stem explants of *Jatropha curcas*—A biodiesel plant. *Industrial Crops and Products*, 31, 209–213.

Trabucco, A., Achten, W.M.J., Bowe, C., Aerts, R., Van Orshoven, J., Norgrove, L., y Muys, B. (2010). Global mapping of *Jatropha curcas* yield based on response of fitness to present and future climate. *Global Change Biology Bioenergy*, 2, 139-151.

Villalobos, M., y Thorpe, A. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *Cultivo de tejidos en la agricultura*, 127-141.

Ying, L., Jiannong, L., Hongbo, Z., Linfeng, L., Yuzhen, S., y Xuegui, Y. (2016) Efficient culture protocol for plant regeneration from cotyledonary petiole explants of *Jatropha curcas* L. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30 (5), 907-914.

## 7. Financiamiento

-Voluntariado Universitario 2016,  
Compromiso Social Universitario:  
Patrimonio vegetal e industria.

-Voluntariado Universitario 2017,  
Compromiso Social Universitario:  
Energías e Innovación Social.