

## CULTIVO DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE PIÑÓN (*Jatropha curcas* L.)

Delgado, H.<sup>1</sup> - Vásquez, J.<sup>2</sup> – Díaz, E.<sup>3</sup>

*Laboratorio de Biotecnología Vegetal – Estación Experimental Agraria “El Porvenir” – Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA*

<sup>1</sup> Ingeniero Agrónomo – Responsable del Laboratorio de Biotecnología Vegetal. E.E.A. “El Porvenir” - INIA.

<sup>2</sup> Ingeniero Agrónomo – Técnico del Laboratorio de Biotecnología Vegetal. E.E.A “El Porvenir” - INIA .

<sup>3</sup> Ingeniero Agrónomo – Responsable de Aclimatación de Biotecnología Vegetal. E.E.A “El Porvenir” - INIA.

### RESÚMEN

Con el propósito de desarrollar una metodología adecuada para la introducción y cultivo in Vitro de embriones cigóticos de piñón (*Jatropha curcas* L.), se emplearon semillas, escarificadas y las almendras fueron desinfectadas por inmersión con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1 % por un intermedio de diez minutos, en constante agitación. Se estudiaron tres ensayos, el primero consistió en la evaluación de la sincronización tiempo-germinación, utilizando 03 tratamientos con diferentes tipos de explantes (embrión cigótico completo, embrión cigótico con media plúmula y embrión cigótico sin plúmula). Para el segundo ensayo se utilizó tres tratamientos, se evaluó la respuesta de los embriones cigóticos a tres tipos de medio de cultivo (M&S a mitad de concentración total, M&S a concentración total y el medio WPM) suplementado con vitaminas, 20 g/l de sucrosa y 7 g/l de agar - agar. Para el tercer ensayo se hidrató las almendras de piñón en 4 tiempos (a 0, 6, 12 y 18 horas respectivamente). El porcentaje de germinación para el primer ensayo corresponde a T1 con 100 % en 4 días, T2 con 96 % en 4 días y T3 con 93% en 4 días, en todos los tratamientos del primer ensayo demuestra que los embriones cigóticos introducidos a condiciones in Vitro germinan en un promedio de 4 días, para el segundo ensayo en el tratamiento T2, no hubo variaciones en cuanto a la germinación, teniendo resultados similares al ensayo anterior, mientras que en el tratamiento T1, no se observó que el proceso de germinación fue normal, puesto que se observó la formación de callos, los mismos que impidieron el desarrollo del embrión. En un promedio de 30 días las plántulas estuvieron con dos hojas verdaderas, de esta manera pasando ya a la fase de endurecimiento, para su futura aclimatación.

## INTRODUCCIÓN

*Jatropha curcas* L., es un miembro de la familia Euphorbiaceae, es considerada como una fuente potencial productora de biocombustibles y recursos energéticos en todo el mundo. Este combustible producido por *Jatropha* contiene más oxígeno, con un mayor valor de cetano el mismo que aumenta la calidad de combustión, está limpia, no es tóxico, es ecológico y económico debido a su bajo costo de producción. Puede ser un buen material de plantación para la restauración ecológica en todos los tipos de páramos y también sirve como una importante planta usado en el campo medicinal. Las semillas, lo que constituye la fuente principal de la producción de aceite no comestible, son genéticamente heterocigotos como *Jatropha* sp. De este modo, el porcentaje de aceite varía entre el 4 y el 40% dentro de la especie. Los métodos convencionales de propagación de *J. curcas* tienen problemas de viabilidad de semillas, la baja germinación, escasos y el retraso de enraizamiento de las plantas de semillero y esquejes vegetativos. Las plantas propagadas por esquejes muestran una menor longevidad y poseen resistencia a la sequía y enfermedades que las propagadas por semillas. Teniendo en cuenta su enorme potencial, se necesita una gran cantidad de material de plantación de calidad se para su uso en el futuro. De este modo, la mejora del cultivo a través de la aplicación de métodos biotecnológicos de plantas se hace sentir. Con el cultivo de embriones cigóticos se pretende obtener plantas de *Jatropha curcas* L., sanas y vigorosas en corto tiempo, al mismo tiempo es comprender el inicio de los trabajos biotecnológicos en el cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Preparación del material vegetal para explantes.** El material vegetal que se usó como fuente de explante fueron embriones cigóticos, las semillas fueron provenientes de las parcelas de piñón de la Estación Experimental Agraria “El Porvenir”. Las mismas que fueron trasladadas, debidamente etiquetadas al área de lavado y preparación de material vegetal del laboratorio de biotecnología para su tratamiento con solución desinfectante.

### Protocolo de desinfección del material vegetal.

**Primera etapa de desinfección:** el material vegetal (semillas maduras) fueron lavadas con agua de caño más detergente, eliminando todo resto orgánico que se encuentren adheridos a las semillas, luego se realizó enjuagues con agua destilada por tres veces.

**Segundo proceso de desinfección:** Para este proceso se desinfectó las semillas en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2%; por un tiempo de 10 minutos, agitando constantemente; después de este proceso se extrajo las semillas de la solución desinfectante y se enjuagó con agua destilada tres veces.

**Eliminación de la testa:** inmediatamente después de los enjuagues se colocó las semillas en una placa petri y con la ayuda de una pinza se eliminó la testa, dejando libre las almendras, las mismas que se colocó en placa petri.

**Tercer momento de desinfección:** se preparó una solución desinfectante de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,5%, se colocó las semillas en la solución por 10 minutos, agitando constantemente; después de este proceso, en la cámara de flujo laminar se eliminó toda la solución desinfectante y se enjuagó tres veces con agua destilada estéril, luego se colocó las almendras en agua destilada estéril por un espacio de 30 minutos.

**Medios de cultivo.** Se utilizó dos medios de cultivo, preparadas con las sales de Murashige y Skoog (1962) modificado. El primer medio comprende el M&S a mitad de concentración, el segundo medio corresponde al M&S a concentración total y el tercer medio es el WPM.

#### **Preparación de medio de cultivo.**

- Se disolvió las sales minerales en 500 ml., de agua destilada, luego se añadió 20 g/l de sucrosa, se agregó las hormonas respectivas y finalmente se enrazó con agua destilada al volumen deseado.
- Se realizó el dispensado en frascos de vidrio de 15 Oz, colocando 50 ml aproximadamente de medio de cultivo en cada frasco. Se tapó los frascos con papel aluminio y papel de oficina, a los mismos que sujetaron con hilo pabilo en la boca para evitar que este se derrame en el momento de la esterilización y mejorar las prevenciones de contaminación.
- Estos frascos fueron esterilizados en un autoclave a razón de 15 Lbs. de presión durante 15 minutos, a una temperatura de 121 °C; al cabo del mismo se retiraron, se agitó levemente y se dejó enfriar a temperatura ambiente, luego se etiquetó y se almacenó en un lugar fresco hasta el momento de su uso.

**Obtención y siembra de embriones cigóticos en un medio de cultivo.** Con la ayuda de una pinza se extrajeron las almendras y se colocaron en una placa petri estéril, con una hoja de bisturí Nº 10 y una pinza grande, se realizaron tres cortes a las almendras tratando de no afectar al embrión, se separaron los cotiledones y se extrajo el embrión colocando en una placa petri estéril, para su siembra respectiva. Se sembraron los embriones en un medio de cultivo basal a ½ concentración y a concentración total, se colocó cinco embriones cigóticos por frasco de 15 Oz, luego de sellado, se etiquetaron e inmediatamente se trasladó a la cámara de incubación a una temperatura de 24 – 25° C, con una humedad relativa de 60%. Cabe indicar que todo el proceso de extracción e introducción o siembra de embriones cigóticos a condiciones in Vitro se realizaron con mucha asepsia y dentro de una cámara de flujo laminar, para evitar pérdida de material vegetal por contaminación. En estos medios iniciales las plántulas permanecerán hasta que lleguen a la etapa de aclimatación.

Foto 1: Embrión zigótico de *Jatropha curcas* L.



Foto2: Plántulas in vitro de *Jatropha curcas* L.



Foto3: Plántulas generadas, listas para la etapa de aclimatación.

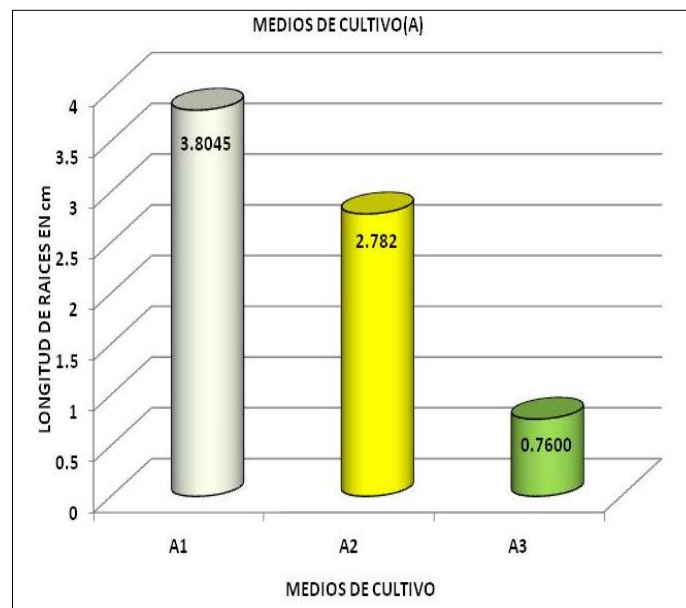


## RESULTADOS

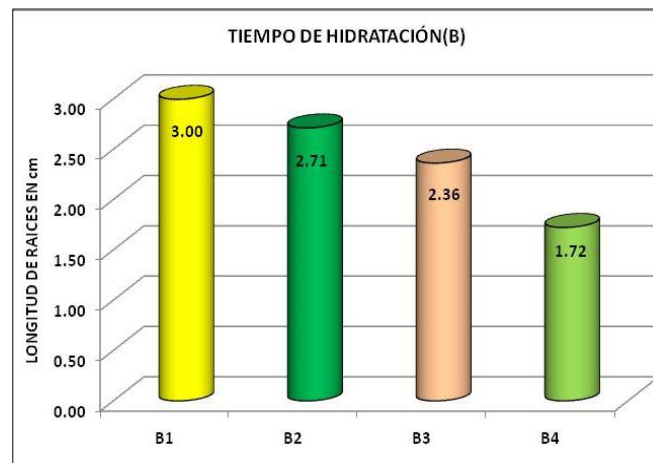
**Porcentaje de germinación.** Este parámetro se evaluó al cuarto día después de la siembra, teniendo los siguientes resultados: para el primer ensayo corresponde a T1 con 100 %, T2 con 96 % y T3 con 93%, en todos los tratamientos del primer ensayo demuestran que los embriones cigóticos introducidos a condiciones in Vitro germinan en un promedio de 4 días; para el segundo ensayo en el tratamiento T2, no hubo variaciones en cuanto a la germinación, teniendo resultados similares al ensayo anterior, mientras que en el tratamiento T1, no se observó que el proceso de germinación fue normal, puesto que se observó la formación de callos, los mismos que impidieron el desarrollo del embrión.

**Contaminación.** Se obtuvo un porcentaje de contaminación muy baja (2 %), esto se debe a que el protocolo utilizado en todo el proceso es el apropiado y con esto se demuestra que ya se estandarizó un protocolo de cultivo in Vitro de embriones cigóticos.

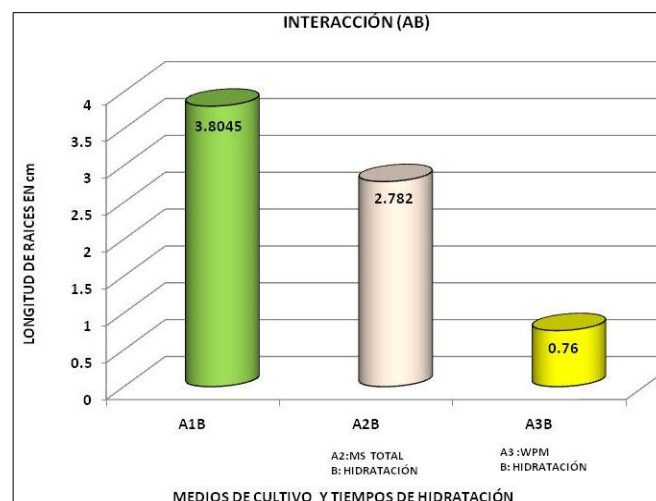
**Desarrollo de plántulas - sistema radicular.** En la figura se observa el desarrollo del sistema radicular, donde se muestra un mejor crecimiento del tratamiento 1 con el medio M&S a mitad de concentración como mejor resultado en el sistema radicular.



**Tiempo de Hidratación de las semillas.** En la figura se observa que el tratamiento 1 con cero horas de hidratación responde a un crecimiento superior del sistema radicular con respecto a los demás tratamientos en estudio.



**Interacción entre el Medio de cultivo y el Tiempo de Hidratación de las semillas.** En la figura se observa que la interacción del medio de cultivo M&S a mitad de concentración con respecto a tiempo de hidratación es significativo en cuanto al crecimiento del sistema radicular con respecto a los demás tratamientos en estudio



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARRILLO E. 2006**, Biotecnología vegetal, Aplicaciones del cultivo de meristemas apicales de tallo.
- LIBERATO, M. 2007**, Embriogénesis Somática En El Cultivo De Tejidos Vegetales Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Botánica y Zoología, Universidad de Guadalajara México.
- ROCA, W y L. MROGINSKI 1991**. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT.
- SUNITA KOCHHAR, et all 2005**. Differential rooting and sprouting behaviour of two *Jatropha* species and associated physiological and biochemical changes. National Botanical Research Institute, Rana Pratap Marg, Lucknow 226 001, India
- TIMIR BARAN JHA, PRIYANKA MUKHERJEE & MUKUL MANJARI DATTA. 2007** Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. Korean Society for Plant Biotechnology and Springer 2007.