

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Formulación del problema

Acompañando al desarrollo de la sociedad se encuentran el incremento de la demanda de energía y el declive de las fuentes de combustibles fósiles; es por esto que las fuentes de energía alternativa se han convertido en el centro de atención. Una de éstas son los biocombustibles, cuyo campo ha crecido y se ha incrementado rápidamente en estos últimos años (Feike, Weis, Claupein & Mueller, 2007).

Hay que agregar la creciente conciencia sobre los efectos negativos que el uso de combustibles fósiles provoca en el ambiente, en especial por la producción de gases de efecto invernadero y sus consecuencias en el cambio climático. Estos factores han creado las condiciones para el surgimiento y configuración de un mercado mundial de biocombustibles (Salvador *et al.*, 2007)

La obtención de biocombustibles está limitada al cultivo vegetal de especies oleaginosas y su posterior procesamiento, y en una menor proporción a la reutilización de aceites quemados. Alrededor del mundo las mayores fuentes de biodiesel incluyen: canola (USA), girasol (Italia y sur de Francia), soya (USA y Brasil) aceite de palma (Malasia), linaza (España), semilla de algodón (Grecia), sebo de res (Irlanda) y *Jatropha* (Nicaragua y Sudamérica) (Sujatha, Makkar y Becker, 2005).

*Jatropha curcas* o mejor conocido como piñón en Ecuador, es una especie oleaginosa de origen centroamericano que crece en una amplia variedad de climas y suelos. Se ha reportado que algunas especies de piñón pueden alcanzar producciones de entre seis a ocho toneladas de semilla por hectárea, lo que potencialmente puede rendir hasta 2800 litros de aceite susceptible de transformarse en biodiesel (Salvador *et al.*, 2007); además esta

especie ha atraído el interés de varias agencias de desarrollo en los trópicos y subtropicos debido a su fácil adaptabilidad en lugares marginales áridos, uso de su aceite como combustible y su utilización en el control de la erosión (Sujatha *et al.*, 2005).

El principal problema con los llamados cultivos energéticos es que amenazan terrenos potencialmente productivos de consumo humano; este no es el caso del piñón, ya que puede desarrollarse en tierras poco fértiles, con baja disponibilidad de agua, y sin afectar su producción, convirtiéndose esta especie en la más apta en utilizarse para la obtención de biodiesel.

## **1.2 Justificación del problema**

Con la creciente necesidad de cultivos energéticos encaminados a la producción de biodiesel, y conociendo las ventajas que tiene *Jatropha curcas* sobre otros cultivos, se han desarrollado algunas investigaciones en el área de la micropropagación mediante el cultivo *in vitro* de esta especie. La mayoría de estos trabajos, y además los pioneros en estas investigaciones, se han realizado en países del sur de Asia; específicamente en India y Tailandia, donde se trabaja con variedades de Asia y África, y donde las condiciones del suelo son las ideales para este tipo de cultivo, ya que existen grandes áreas de terreno árido y semiárido que son improductivas. Cabe resaltar que las variedades cultivadas son diferentes a las que se puede encontrar en centro y Sudamérica debido a la deriva genética y calidad de suelo principalmente.

En los últimos años este cultivo se ha convertido en una de las principales apuestas que han realizado países en vías de desarrollo con fines energéticos, específicamente para la producción de biodiesel. No solo por el alto porcentaje de aceite que se puede extraer de sus semillas, sino por la capacidad de recuperación de suelos erosionados e improductivos que se encuentran olvidados.

En nuestro país este cultivo se encuentra todavía en fases preliminares, pero con un potencial muy alto, ya que regiones de nuestro país

como las zonas áridas y semiáridas que se encuentran principalmente en el área costanera de provincias como Manabí, Santa Elena y Loja, se podrían perfilar como las principales productoras de cultivos bioenergéticos, y así contrarrestar la demanda de combustibles que se encuentra en crecimiento.

Como se ha mencionado, el piñón es una planta multifuncional ya que se puede utilizar íntegramente toda su estructura. El látex que produce es muy utilizado en medicina tradicional, y se han reportado propiedades anticancerígenas (Shrivastava & Banerjee, 2008).

Sus semillas contienen un 35-55% de aceite, lo que da un rendimiento de 2000 - 2750 kilogramos de aceite, o 1200 - 2000 litros por hectárea, lo que es equivalente a 13.3 - 18.9 Kw/h (Falasca y Ulberich, 2006). Este aceite contiene alto porcentaje de cetano y hasta puede ser utilizado directamente en maquinaria a diesel añadiéndose al diesel fósil (Datta, Mukherjee, Ghosh & Jha, 2007).

También su cultivo se realiza a manera de cercas vivas en el caso de pequeños y medianos productores, los cuales se benefician directamente de las semillas de piñón producidas, y tienen acceso a un combustible sustentable que utilizan en sus propias maquinarias, introduciendo el concepto de granjas integrales.

Para el abastecimiento de plantas de piñón en los cultivos de campo, es necesaria una producción a gran escala, y el cultivo *in vitro* es una de las estrategias más aptas; las ventajas que posee en relación con la propagación convencional se encuentra en el reducido espacio que se necesita para producir un importante número de plantas a partir de un explante, se reduce el tiempo de crecimiento de las plantas en comparación a su crecimiento natural, y no importa la época del año en que se siembre, pudiendo efectuar así la introducción rápida de esta especie. Además, se producen plantas con sanidad controlada y la posibilidad de propagar la variedad de *Jatropha curcas* que presente las mejores características de producción y calidad de aceite.

Con este propósito en el cultivo *in vitro* se escogen plantas adultas, que florecen y fructifican, donde se puede determinar si un espécimen es élite y tiene buenas características en cuanto a producción. Otra alternativa es tomar sus semillas para propagarlas *in vitro*, y aunque sus características genéticas se mantienen parcialmente, se puede aumentar el porcentaje de germinación que las semillas tienen en campo y superar el hecho de que los frutos colectados en estado de pre – dehiscencia son atacados por hongos saprófitos, lo que resulta en pérdida de viabilidad de las semillas.

Lo mencionado, y los estudios preliminares que se han realizado, muestran que la implementación de cultivos de piñón, es una de las mejores alternativas actuales para la producción de biodiesel, y dicha actividad mejorará los indicadores de bienestar humano de la población en nuestro estado.

### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Establecer y evaluar 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.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Determinar el método de desinfección de semillas de *Jatropha curcas* y evaluar el mejor medio nutritivo para la germinación y desarrollo primario de la plántula.
- Estandarizar el método de desinfección en yemas apicales de plantas de piñón adultas para controlar los agentes contaminantes externos.
- Determinar los mejores medios nutritivos para el establecimiento e inducción de brotes en *Jatropha curcas*.
- Establecer los medios de cultivo más apropiados para la multiplicación de brotes en *Jatropha curcas*.

## 1.4 Marco teórico

### 1.4.1 Características generales de la especie en estudio

#### 1.4.1.1 Taxonomía

La familia Euforbiácea comprende aproximadamente 8000 especies incluidas en 321 géneros, uno de ellos es el género *Jatropha*, que pertenece a la tribu Joannesieae de Crotonoideae y que contiene aproximadamente 170 especies conocidas (Heller, 1996).

A continuación se detalla la clasificación taxonómica completa del piñón:

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Euphorbiales
Familia:	Euphorbiaceae
Género:	<i>Jatropha</i>
Especie:	<i>curcas</i>

El nombre de su género, *Jatropha*, se deriva del vocablo griego *iatrós*, que significa **doctor**, y *trophé*, que significa **comida**, lo cual vuelve implícito su uso medicinal (Vendiola & Idlao, 2006). Linneo fue el primero que nombró al piñón como *Jatropha curcas* L. de acuerdo a la nomenclatura binomial de su libro "Species Plantarum", que es utilizado hasta la actualidad (Heller, 1996).

Esta planta es conocida comúnmente como: piñón (Ecuador, Guatemala), piñón manso (Brasil), tubang-bakod, tuba-tuba (Filipinas), purging nut, physic nut, barbados nut (USA). También la podemos encontrar con los nombres científicos: *Ricinus jarak*, *Ricinus americanus*, *Jatropha acerifolia* y *Jatropha edulis* (Falasca y Ulberich, 2006).

Heller (1996) menciona numerosos nombres vernáculos para el piñón como: pourghère, pignon d'Inde (Francés); purgeernoot (Holandés); Purgiernuß, Brechnuß (Alemán); purgueira (Portugués); fagiola d'India (Italiano); dand barrî, habel meluk (Arábigo); kanananaeranda, parvataranda (Sanskrito); bagbherenda, jangliarandi, safed arand (Hindi); kadam (Nepal); yu-lu-tzu (Chinesa); sabudam (Tailandés); jarak budeg (Indonesia); bagani (Costa de Marfil); kpoti (Togo); tabanani (Senegal); mupuluka (Angola); butuje (Nigeria); makaen (Tanzania); piñoncillo (México); coquillo, tempate (Costa Rica); tártago (Puerto Rico); mundubi-assu (Brasil); piñol (Perú) y piñón (Guatemala).

#### **1.4.1.2 Distribución geográfica y origen de la especie**

El piñón es una planta perenne nativa de los trópicos americanos. Su distribución se extiende a través de toda América tropical y otras regiones tropicales y subtropicales en el mundo. Se lo puede encontrar principalmente en países como Filipinas, Tailandia, Burma, Indonesia, Malasia, India, China, Japón, Jamaica, Puerto Rico, Madagascar, Argentina, Venezuela entre otros (Aguhob, 2006).

Los suelos de su hábitat natural formados bajo un clima tropical, se originaron a través del proceso de laterización, produciéndose liberación de hierro y óxido de aluminio, dando como resultado suelos rojos, denominados lateríticos pertenecientes al orden de los oxisoles. Si bien son suelos de muy baja reserva de nutrientes y fertilidad natural, al fertilizarlos pueden ser altamente productivos. El piñón crece en suelos salinos, arenosos y rocosos; y sus hojas se caen en invierno, formando un mulch que luego fertiliza la zona de la raíz (Falasca y Ulberich, 2006).

Las primeras investigaciones y recolecciones documentadas hace 60 años sostienen que las colecciones se hicieron en la flora "natural" de las Américas, en diferentes formas de vegetación como: bosque húmedo, bosque seco tropical, bosque seco y espinoso. Heller (1996) afirma que es altamente probable que el centro del origen del piñón esté en México (y América Central)

(Figura 1.1), ya que no se lo ha encontrado, en las formas de vegetación mencionadas, en África y Asia, y solo se lo encuentra en forma de cultivos. Sin embargo, el “verdadero” centro de origen no ha sido encontrado. Además sostiene que para dilucidar el origen, los sitios originales de colecta en México y América Central deberían ser revisados y la diversidad existente analizada preferiblemente con técnicas moleculares.

Probablemente desde el Caribe, esta especie fue distribuida por embarcaciones portuguesas hacia las islas de Cabo Verde y desde Guinea Bissau hacia otros países de África y Asia.

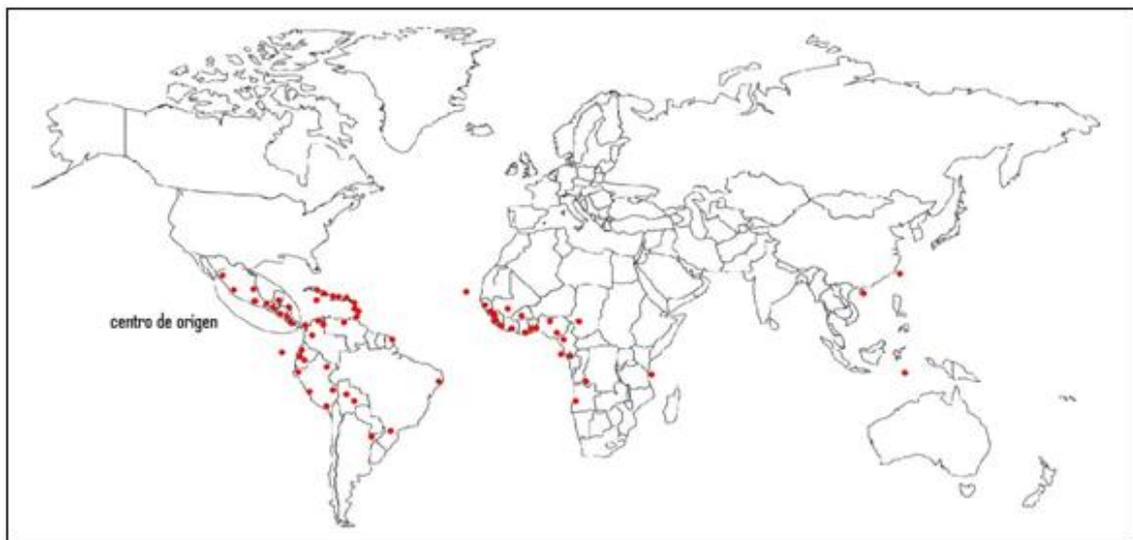


Figura 1.1 Distribución mundial de *Jatropha curcas* y centros de diversidad propuestos por Munch en 1986 (Tomado de Heller, 1996).

La distribución actual de la especie refleja que su introducción ha sido más exitosa en regiones secas de los trópicos con precipitaciones anuales de 300 a 1000 milímetros; esto ocurre principalmente en altitudes bajas (0 – 500 metros), en áreas con una temperatura anual promedio sobre los 20 °C, aunque puede crecer en altitudes mayores tolerando ligeramente el clima frío (Joker & Jepsen, 2003).

### **1.4.1.3 Descripción botánica y morfología**

El piñón o *Jatropha curcas* es un árbol pequeño de tipo arbustivo, de corteza suave y color verde gris, que al corte exuda un látex blanquecino (Vendiola, & Idlao, 2006). Normalmente crece de tres a cinco metros, pero puede alcanzar los 10 metros bajo condiciones favorables (Aguhob, 2006).

Es una especie resistente a sequías y muchas de sus partes son utilizadas en la medicina tradicional, sin embargo sus semillas son tóxicas para los humanos y muchos animales. Esta planta presenta un crecimiento articulado, con discontinuidad morfológica desde la base. Su dormancia es inducida por fluctuaciones en las precipitaciones, temperatura y luz (Heller, 1996).

El tronco de una planta adulta mide aproximadamente 20 centímetros de diámetro, su xilema es poco resistente y su médula desarrollada; su floema encierra canales comprimidos, que se prolongan hasta las raíces, por donde circula el látex, el cual al secarse toma una coloración café con aspecto de resina (Figura 1.2B). Las ramas son distribuidas y largas, y presentan cicatrices que se forman por la caída de las hojas. El tronco y las ramas son recubiertas por una corteza serosa, que al secarse se desprende en láminas finas (Nunes, dos Santos, Pasqual y Teixeira, 2009). Normalmente su sistema radicular consta de una raíz central y cuatro periféricas en plantas obtenidas de la germinación de semillas. La raíz central no se forma usualmente en la propagación vegetativa a partir de estacas (Heller, 1996).

#### **1.4.1.3.1 Las hojas**

Sus hojas, de color verde claro brillante, son alternadas a sub opuestas, tienen de tres a cinco lóbulos con un filotaxis espiral, y su peciolo mide entre 6 y 23 milímetros (Figura 1.2A) (Vendiola & Idlao, 2006). Cuando son jóvenes presentan una coloración rojo-vino, y a medida que crecen se tornan verdes, pálidas y brillantes, con nervaduras blanquecinas y salientes en

su cara inferior, su peciolo es largo y verdoso, del cual parten las nervaduras divergentes (Nunes, 2007) (Figura 1.2C).

#### 1.4.1.3.2 Las flores

Las inflorescencias son formadas en la parte terminal de las ramas y son complejas (Figura 1.2A), poseen inflorescencias principales y co-florescencias con paracladio; botánicamente se conoce con el nombre de cima. La planta es monoica y sus flores son unisexuales, ocasionalmente puede ocurrir el hermafroditismo en las flores. Las flores masculinas poseen diez estambres arreglados en dos distintas estructuras espirales de cinco estambres en una sola columna en el androceo, ubicados muy cerca la una de la otra. En el gineceo, los tres estilos finos están conectados sobre los dos tercios de su longitud, dilatándose hacia la bifurcación del estigma (Heller, 1996). En condiciones de crecimiento continuo, la producción de flores resulta en un alto número de flores femeninas con semillas durmientes (Vendiola & Idlao, 2006).

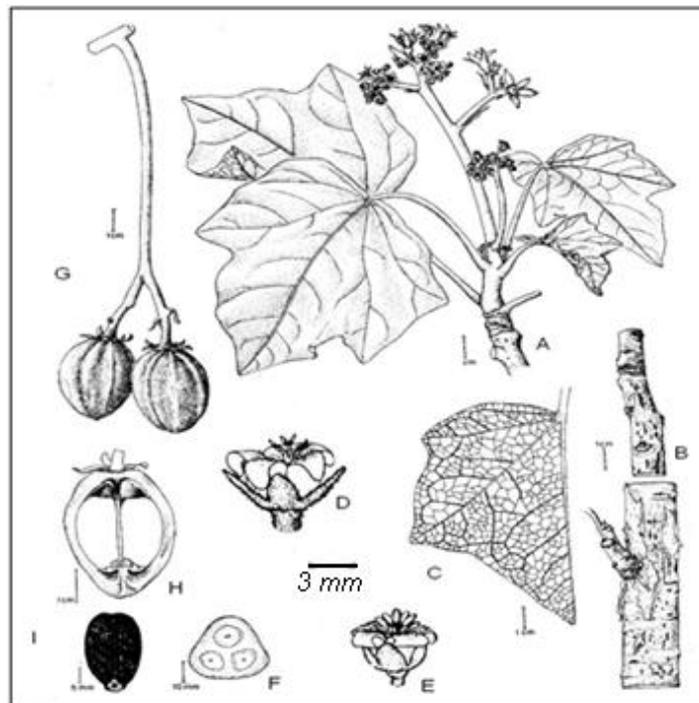


Figura 1.2 Partes importantes del piñón: A. Rama con inflorescencia, B. Corteza, C. Nervaduras de la hoja, D. Flor con pistilo, E. Flor estaminada, F. Corte transversal de fruto inmaduro, G. Frutos, H. Corte longitudinal del fruto I. Semilla; A - C y F - H tomados de Aponte 1978; D y E tomados de Dehgan 1984 (Tomado de Heller, 1996).

Este tipo de inflorescencia (cima) se desarrolla conjuntamente con las hojas nuevas, y las flores masculinas y femeninas se encuentran dispuestas en la misma inflorescencia (Figura 1.3) (Nunes, 2007), aunque las flores masculinas se encuentran en mayor número en las extremidades de las ramificaciones y las femeninas en mayor número en el resto de la ramificación (Lopes *et al.*, 2007).



Figura 1.3 Inflorescencia de piñón (*Jatropha curcas*) (Tomado de Nunes, 2007, p. 11).

La polinización de las flores del piñón se da gracias a la intervención de los insectos; posiblemente en su mayoría por mariposas. En condiciones de invernadero, la polinización debe hacerse de forma manual. (Heller, 1996).

La floración en la planta de piñón puede presentarse entre el primer y segundo año en condiciones muy favorables, pero normalmente toma más tiempo (tres años). La producción de semilla se estabiliza a partir del cuarto o quinto año. Al parecer la formación de flores está relacionada con el periodo de lluvias. Puede florear nuevamente después de producir frutos cuando las condiciones permanecen favorables por otros 90 días, pero después de esta segunda floración, la planta no florea nuevamente, sino que se desarrolla vegetativamente (De la Vega, 2008).

### **1.4.1.3.3 Los frutos**

El fruto del piñón es seco, con tres lóculos, liso, coriáceo, capsular, ligeramente corpulento, con el ápice y la base de forma aguda. Entre los carpelos se puede distinguir la presencia de surcos suaves. El endocarpio es leñoso (rígido y duro), con pequeños orificios en los puntos de unión de los carpelos, a través de los cuales pasan cordones fibrosos que se distribuyen por las partes dorsal y ventral de los lóculos. El fruto seco presenta dehiscencia, provocando que los lóculos se abran longitudinalmente exponiendo las semillas (Figura 1.2F, G, H y 1.4A, B, C) (Nunes *et al.*, 2009). Además, el fruto está constituido por un pericarpio de cáscara dura y leñosa; en un inicio, es de color verde, luego se vuelve amarillo, castaño y negro, de acuerdo al estado de maduración. El fruto tiene una medida de 2,5 a 4 centímetros de longitud y 1,5 a 3 centímetros de diámetro (Nunes, 2007).

Los frutos son producidos una vez al año, si la mezcla de suelo es buena y la temperatura es suficientemente alta. Cada inflorescencia rinde un racimo de aproximadamente diez o más frutos (Vendiola & Idlao, 2006).

### **1.4.1.3.4 Las semillas**

La semilla de piñón es relativamente grande, de tegumento quebradizo, y estructura resinosa (Figura 1.4A). Arruda y colaboradores (2004) describen que debajo de de la envoltura de la semilla existe una película blanca que recubre la almendra. El albumen es blanco, oleaginoso y contiene un embrión provisto de dos cotiledones achatados (Citado por Lopes *et al.*, 2007, p. 228) (Figura 1.4B).

De acuerdo a Barroso y colaboradores (1999), todas las euforbiáceas tienen endospermos carnosos y ricos en reservas oleaginosas (Citado por Nunes *et al.*, 2009, p. 208). De aquí la importancia de esta especie, considerada promisoría, según Arruda y colaboradores (2004), por su elevado contenido de aceite (25 a 40%), superior a las oleaginosas utilizadas en el mercado de biocombustibles (Citado por Nunes, Pasqual, Dos Santos,

Custódio y Gomes., 2008, p. 9). Según Silveira (1934), cada semilla contiene de 27,9 a 37,33% de aceite, aunque la almendra contiene de 5,5 a 7% de humedad y de 52,54 a 61,72% de aceite (Citado por Lopes *et al.*, 2007, p. 228).

La semillas maduran luego de que la cápsula cambia de color verde a amarillo aproximadamente de dos a cuatro meses luego de la fertilización (Vendiola & Idlao, 2006). En la parte superior posee una prominencia carnuda, la carúncula, que se encuentra próxima a la micrópila (Figura 1.4A). Cuando la semilla está seca, la carúncula tiene una extremidad cónica con dos lóculos escasamente visibles. Las dimensiones de las semillas cuando están secas son aproximadamente: 1,3 a 1,7 centímetros de largo y 0,5 a 1,5 centímetros de ancho (Nunes *et al.*, 2009).

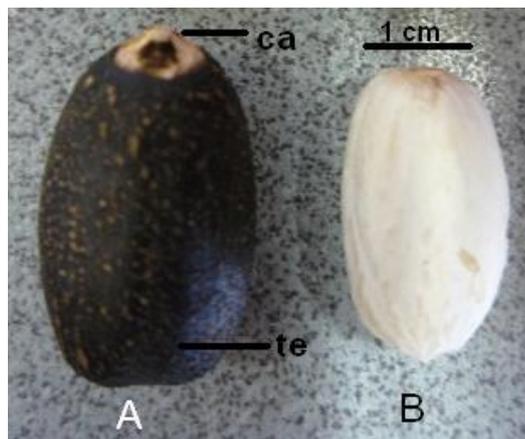


Figura 1.4 Semilla de piñón. A. Semilla con tegumento, B. Semilla sin tegumento. (te: tegumento, ca: carúncula) (Laboratorio de Cultivo de tejidos – ESPE, Sangolquí – Ecuador, 2009).

Como se mencionó anteriormente, los cotiledones del embrión son muy largos pero con un espesor mínimo, foliáceos y funcionan como órganos de reserva, siendo una particularidad encontrada en el albumen o endospermo alrededor del embrión. El contorno de los cotiledones es ovalado, con nervaduras marcadas y un eje hipocótilo – radícula de forma cilíndrica y recta (Figura 1.5D y E) (Nunes *et al.*, 2009). Genéticamente el piñón es una especie diploide, con  $2n = 22$  cromosomas (Heller, 1996).

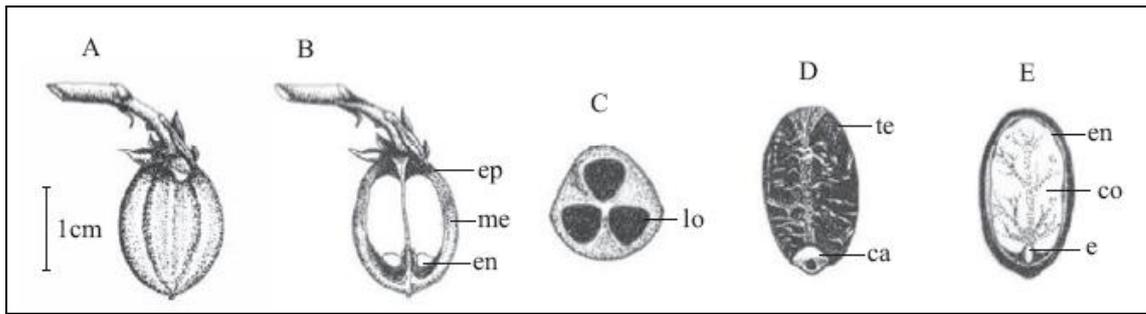


Figura 1.5 Aspecto morfológico del fruto y semilla de *Jatropha curcas*. A. Detalle del fruto, B. Corte longitudinal del fruto (en: endocarpo; ep: epicarpo; me, mesocarpo), C. Corte transversal del fruto (lo: lóculos), D. Detalle de la semilla (ca: carúncula, te, tegumento), E. Detalle de la semilla mostrando el embrión (en: endosperma, co: cotiledón, e: eje embrionario). Ilustración botánica: Dalilhia Nazaré dos Santos (Tomado de Nunes *et al.*, 2009, p. 209).

#### 1.4.1.4 Usos y propiedades

##### 1.4.1.4.1 Uso medicinal

El piñón ha sido utilizado principalmente como cultivo en cercas vivas para evitar el paso del ganado; aunque en comunidades locales, también es utilizado con fines medicinales. La savia, aceite, ramas, madera y hojas han sido reportadas en usos externos para curar heridas, hemorragias, reumatismo y otras enfermedades de la piel (Aguhob, 2006). Nath y Dutta (1992) demostraron que la propiedad de sanar heridas se debe a la curcina, una enzima proteolítica aislada del látex (Citado por Heller, 1996, p. 19). Otros usos medicinales que se le atribuyen son: como laxante, remedio para la tos, antídoto para el envenenamiento, alivia el dolor de muelas, se usa para tratar la gonorrea y sífilis, y alivia los dolores causados por esguinces (Aguhob, 2006). Se ha reportado que también es eficaz en el tratamiento de hidropesía, ciática y parálisis. La droga obtenida de *Jatropha curcas* denominada “Dravanti”, que tiene un sabor picante y astringente, ha presentado propiedades antihelmínticas; esta droga trabaja como un limpiador de todas las impurezas en el sistema digestivo. El jugo de las hojas es usado para inflamaciones de la lengua en bebés y también se usa para curar la sarna, eczema y la tiña de la piel (Shrivastava & Banerjee, 2008).

Además, preparaciones con todas las partes de la planta, incluyendo semillas, hojas y corteza, frescas o cocidas, son usadas en la medicina

tradicional con propósitos veterinarios. Muanza y colaboradores (1995) encontraron que un extracto con metanol de las hojas de piñón proporciona una protección moderada en cultivos de células linfoblastoides humanas contra los efectos citopáticos del VIH (Citado por Heller, 1996, p. 19).

#### **1.4.1.4.2 Materia prima para productos industriales**

El aceite de las semillas es utilizado como materia prima en muchos países para la manufactura de velas, jabón y barniz. También se utiliza en lámparas de aceite, en estufas como combustible en lugar de queroseno, y sustituto del diesel. Las hojas, raíces y corteza pueden ser utilizadas en la industria de la tinta. El color negro azulado puede ser producido de la corteza y de las raíces se obtiene el amarillo (Aguhob, 2006).

#### **1.4.1.4.3 Pesticida y fungicida**

El extracto de las semillas del piñón, que contiene ésteres de forbol, se ha utilizado en el control de varias plagas, en muchos casos con éxito. Debido a que se encuentra en una fase experimental, no puede ser utilizado en el campo por los agricultores todavía. Otros ensayos experimentales presentan una actividad moluscocida muy pronunciada (Heller, 1996). Debido a que esta especie contiene sustancias cianofóricas en las hojas, corteza, raíces y frutos, se las utiliza para fabricar fungicidas contra chinches (Aguhob, 2006).

#### **1.4.1.4.4 Recuperación de suelos**

Las planta de piñón, por sus características de resistencia a las sequías y bajos requerimientos en la cantidad de agua, tiene un uso potencial en la recuperación de suelos erosionados (Heller, 1996); además sus cultivos pueden darse en suelos improductivos y desgastados, para aprovechar los pocos recursos con los que cuenta ese tipo de suelo y propiciar un rendimiento integral.

En Madagascar se usa el piñón como una planta de soporte en plantaciones de vainilla (Heller, 1996), también se la usa para dar sombra a plantaciones de café, aunque su mayor utilización está en la conformación de cercas vivas. Con un enfoque integral, la torta, que se obtiene de las semillas luego de la extracción de aceite, es rica en nitrógeno, fósforo y potasio, y se la puede usar para la fertilización y acondicionamiento del suelo (Aguhob, 2006).

#### **1.4.1.4.5 Protección ambiental**

La captura de carbono en plantaciones de piñón, así como en otros tipos de plantaciones, ocurre únicamente durante el desarrollo de las plantas hasta llegar su estado de madurez. Es en troncos y ramas donde el carbono queda almacenado. La cantidad de carbono (CO<sub>2</sub>) que el árbol captura, consiste sólo en el pequeño incremento anual que se presenta en la madera del árbol multiplicado por la biomasa del árbol que contiene carbono. De 40 a 50% de la biomasa de un árbol (madera: materia seca) es carbono. Es necesario conservar los árboles para evitar que el carbono (CO<sub>2</sub>) contenido en ellos se emita a la atmósfera (De la Vega, 2008).

#### **1.4.1.4.6 Biodiesel**

El aceite extraído de las semillas de piñón se ha convertido en una de las mejores opciones para la producción de biodiesel, además no es necesario realizar modificaciones ni ajustes en las maquinarias (Aguhob, 2006).

En el cultivo, el rendimiento de las semillas es aproximadamente de seis a ocho toneladas métricas por hectárea; al contener un 37% de aceite en la semillas, se calcula un rendimiento de 2100 a 2800 litros de aceite por hectárea (Vendiola & Idlao, 2006).

Mediante cromatografía de gases se ha determinado la composición de los ácidos grasos encontrados en el aceite de piñón, luego de una metilesterificación: ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1) y linoleico (C18:2). El promedio del contenido de los ácidos grasos saturados es

bajo: 15,38% de ácido palmítico y 6,24% de ácido esteárico; en cambio el contenido de los ácidos grasos insaturados es alto: 40,23% de ácido oleico y 36,32% de linoleico. Dependiendo del origen, las cantidades de ácido oleico y linoleico pueden ser mayores (Heller, 1996). En el cuadro 1.1 y 1.2 se presenta una comparación entre las propiedades y especificaciones estándar del aceite de piñón y del diesel fósil.

Cuadro 1.1 Comparación de las propiedades/especificaciones estándar de aceite de *Jatropha curcas* y diesel fósil (Tomado de Aguhob, 2006).

<b>Especificación</b>	<b>Especificación estandar del aceite de piñón</b>	<b>Especificación del diesel</b>
Gravedad específica	0,9186	0,82 / 0,84
Punto de inflamación	240/110 °C	50 °C
Carbono residual	0,64	0,15 o menos
Valor de octano	51,0	>50,0
Punto de destilación	295 °C	350 °C
Viscosidad cinemática	50,73 cs	>2,7 cs
Porcentaje de azufre	0,13	1,2% o menos
Valor calorífico	9,470 kcal/kg	10,170 kcal/kg
Punto de escurrimiento	8 °C	10 °C
Color	4,0	4 o menos

Cuadro 1.2 Propiedades físicas y químicas de *Jatropha curcas* y diesel (Tomado de Aguhob, 2006).

<b>Propiedad</b>	<b><i>Jatropha curcas</i></b>	<b>Diesel</b>
Viscosidad (cp) (30 °C)	5,51	3,6
Gravedad específica	0,917/0,923 (0,881)	0,841/0,85
Punto de solidificación	2,0	0,14
Valor de cetano	51,0	47,8 a 59
Punto de inflamación (°C)	110/340	80
Carbono residual (%)	0,64	<0,05 a <0,15
Destilación (°C)	284 a 295	<350 a <370
Azufre (%)	0,13 a 0,16	<1,0 a 1,2
Valor de ácido	1,0 a 38,2	-
Valor de saponificación	188 a 198	-
Valor de iodo	90,8 a 112,5	-
Índice de refracción (30 °C)	1,47	-

El especial interés que se muestra en el cultivo de piñón se debe especialmente a que puede ser usado potencialmente en la producción de

aceite en zonas marginales semiáridas, sin competir con la producción de alimentos para consumo humano; además este combustible puede ser usado parcialmente para sustituir el costo en las importaciones de aceite para países sin salida al mar. Para la producción de biodiesel se debe someter el aceite a un proceso de transesterificación, que involucra el uso de metanol, que es un químico tóxico e inflamable. Para esto se requiere de equipos mixtos que sean a prueba de explosiones, lo cual no siempre está al alcance de países subdesarrollados. En Nicaragua se está construyendo una planta, con la colaboración de una fundación austriaca, que pretende producir 1600 toneladas de ésteres de metilo anualmente a un costo de US\$ 0,74 por galón (Heller, 1996).

En general, parecería que las bases tecnológicas no presentan problemas que no puedan ser resueltos. Los análisis económicos han demostrado que el combustible de piñón puede competir con el combustible de diesel fósil. Existen diferentes proyectos que involucran al piñón como un cultivo para resolver problemas energéticos en varios países, y se ha estudiado a fondo la sustentabilidad y los muchos beneficios que acarrea poner en marcha este tipo de cultivo. Entre estos proyectos se puede mencionar: “Propagación generativa de *Jatropha curcas* L. en Kalahari Sand (Jepsen, Henning & Nyathi, 2003), “*Jatropha curcas* L. su expansión agrícola para la producción de aceites vegetales con fines de comercialización energética” en Guatemala (Octagon, 2006); “Posibilidades de éxito de *Jatropha curcas* L. en Argentina” (Falasca y Ulberich, 2006); “Propagación de piñón (*Jatropha curcas*) en la isla Leyte, Philipinas (Feike *et al.*, 2007), “Desarrollo de tecnología para la producción sustentable de piñón (*Jatropha spp*) como alternativa para obtener bioenergéticos e incrementar los índices de desarrollo de los agricultores” en México (Salvador *et al.*, 2007), entre otros.

#### **1.4.1.4.7 Otros usos**

Luego de la extracción del aceite de piñón, se obtiene una pasta o torta que puede ser utilizada en la alimentación de animales; de acuerdo a la variedad que se utilice, esta torta puede ser tóxica, y debe someterse primero a

un proceso de detoxificación con etanol o éter etílico para ser apto para el consumo. Con la cascarilla de los frutos se puede producir biogás (70% metano) en reactores anaeróbicos; lo mismo se puede realizar con la torta resultante de la extracción de aceite, además esta torta se puede fermentar ya que contiene un hongo identificado como *Rhizopus oryzae* que puede incrementar la producción de aceite ya que produce un amplio espectro de enzimas hidrolíticas. Además la harina de las semillas también puede servir como suplemento proteico para el ganado (De la Vega, 2008).

#### **1.4.1.5 Importancia de la especie**

La principal importancia del piñón radica en la utilización del aceite extraído de su semilla, según ERGAL (2008), este aceite puede ser utilizado directamente como combustible, no así otros aceites vegetales derivados de cultivos como soya, higuera y algodón, que necesariamente tienen que ser transformados a biocombustibles para poder ser utilizados, esto es debido a que estos tipos de aceites tienen un contenido elevado de ácidos grasos poli-insaturados y otros compuestos químicos que representan problemas de combustión en los motores (Citado por Muñoz y Jiménez, 2008, p. 3).

Otro punto a favor, es que el biodiesel de piñón contiene más oxígeno, con altos valores de cetano, incrementando la calidad de la combustión, es limpio, no tóxico, amigable con el ambiente y económico; conjuntamente con esto, su costo de producción es bajo. Esta puede ser una buena plantación para una eco restauración en todos los tipos de suelos poco fértiles (Jha, Mukherjee & Datta, 2007).

Se pueden citar muchos impactos positivos que se obtienen al cultivar el piñón, y están enmarcados dentro del desarrollo económico, social y medioambiental, entre los que se destacan:

- Generación de empleos en comunidades rurales.
- Beneficios para inversionistas y productores.
- Productores en comunidades rurales aseguran ingreso adicional duradero.

- Uso de terrenos improductivos.
- Obtención de bonos de carbono y certificados de reducción de emisiones de CO<sub>2</sub>.
- Se evita la utilización de alimentos para elaboración de biocombustibles.
- Se participa en programas y mecanismos relacionados con energía limpia.
- Promoción de la sustentabilidad en el medio rural.
- Captura de CO<sub>2</sub> atmosférico.
- No se interviene en el ciclo del carbono.
- Se evita la desertificación, la deforestación y degradación en los suelos.
- Se favorece la bio-diversidad y conservación ecológica en zonas marginales.
- Reducción en el uso de energía fósil primaria.
- Disminución de las emisiones de CO<sub>2</sub> (gas de efecto invernadero) (De la Vega, 2008).

Para que se pueda poner en marcha proyectos relacionados a cultivos energéticos de piñón se debe tener en cuenta la necesidad de identificar plantas élite con excelentes características en cuanto al tiempo de fructificación, vida útil, calidad y cantidad de aceite en las semillas, resistencia a enfermedades y sequías, entre otras; para poder obtener los mejores resultados. Esta identificación se la puede llevar a cabo mediante largos procesos de selección fenotípica de plantas madres; o acudir a herramientas de última generación como la biología y genética molecular, que permitirían identificar los genes que proveen las características deseadas para que en el futuro se pueda ensamblar una planta élite en producción.

Mediante las técnicas de cultivo *in vitro* se puede establecer una multiplicación en masa de clones de la planta élite escogida, con lo cual se conseguiría un cultivo en campo muy uniforme, de características y rendimientos excelentes, en lo que se refiere a la producción y productividad deseada.

### **1.4.2 Cultivo *in vitro***

El cultivo *in vitro* de plantas o tejidos vegetales se define como el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles, de partes de una planta: semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos. Se caracteriza porque ocurre a micro escala sobre una superficie pequeña; se optimizan las condiciones ambientales refiriéndose a los factores físicos, nutricionales y hormonales, y además se elimina por completo la presencia de microorganismos y organismos patógenos o plagas (Pierik, 1990).

El desarrollo de la tecnología del cultivo de tejidos (comúnmente llamado cultivo *in vitro*) como fundamento científico, estuvo estrechamente ligado con el descubrimiento y caracterización de las hormonas vegetales, lo cual ha facilitado el entendimiento del crecimiento y desarrollo de las plantas. Además, esta habilidad de controlar el crecimiento y desarrollo de células y tejidos vegetales, es la base para muchas aplicaciones en la agricultura, horticultura e industria química, y constituye además un prerrequisito para la ingeniería genética en plantas (Evans, Coleman & Kearns, 2003).

Los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son numerosos y diferentes. Brevemente, las posibilidades de aplicación de tales cultivos se pueden resumir así:

- a) Estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines;
- b) Bioconversión y producción de compuestos útiles;
- c) Incremento de la variabilidad genética;
- d) Obtención de plantas libres de patógenos;
- e) Propagación de plantas; y
- f) Conservación e intercambio de germoplasma (Roca & Mroginski, 1993).

### **1.4.3 Tipos de propagación *in vitro***

El establecimiento de un cultivo *in vitro* dependerá en gran manera de las necesidades y objetivos propuestos. De acuerdo al fin perseguido se

deberá determinar las condiciones de trabajo, y establecer el tipo de explante, sistema de cultivo, medio nutritivo, hormonas de crecimiento y condiciones ambientales.

De acuerdo al tipo de multiplicación con que se trabaje, el método de propagación puede ser: generativa o vegetativa (clonal), los mismos que serán tratados en los siguientes apartados.

#### **1.4.3.1 Propagación clonal**

La multiplicación vegetativa (de forma asexual, también llamada clonado) *in vivo* se la ha realizado tradicionalmente por esquejes, acodos y distintos tipos de injerto; y ha jugado un papel muy importante en la agricultura. Por ejemplo en el caso de papas, manzanas, peras, muchos bulbos ornamentales, plantas tuberosas, cultivos leñosos, claveles, crisantemos, entre otros; se la ha utilizado para mantener líneas parentales de buenas características en lo que se refiere a producción. Pero estos métodos clásicos de reproducción son insuficientes para las necesidades actuales, ya que son demasiado lentos, difíciles, caros y a veces completamente inviables (Pierik, 1990).

La micropropagación clonal es prácticamente una multiplicación masiva *in vitro* permitiendo reproducir cientos de clones de una misma especie, o de plantas con genotipos selectos, además esta técnica permite obtener otras ventajas versus los métodos convencionales como son: reducir los tiempos de multiplicación; tener mayor control de sanidad, facilidad de transporte de material *in vitro* de un país a otro y permitir multiplicar grandes cantidades de plantas en espacios reducidos (Roca & Mroginski, 1993).

En el ámbito comercial, la micropropagación *in vitro* es utilizada para la producción de una gran cantidad de copias (clones) de un genotipo seleccionado. Solo se necesita remover una pequeña cantidad de partes de la planta madre seleccionada para utilizarlas como explantes iniciales, sin causarle un mayor daño, ni comprometer su vida útil.

Los pasos operacionales en la micropropagación son laboriosos y repetitivos, y en algunos sistemas de producción se puede reducir en costos de esterilización, trabajo y velocidad con la introducción de la automatización. Los costos relativamente altos de producción de la micropropagación *in vitro* comparados con los métodos clásicos de propagación son compensados con los siguientes beneficios:

- Rápida propagación debido a los ciclos cortos de propagación;
- Gran volumen de propagación de plantas ornamentales de alto valor como orquídeas, especies forestales y arbustivas;
- Almacenamiento y transporte de una gran cantidad de plantas;
- La producción de plantas es independiente de la estación;
- La producción puede reaccionar rápidamente frente a los cambios en la demanda (Evans *et al.*, 2003);
- Los clones o las poblaciones agregadas que se producen por métodos convencionales no se forman, por lo regular, “horizontalmente”, es decir, durante una generación, sino lo hacen “verticalmente” a través del tiempo, generación tras generación; en cambio, las técnicas del cultivo aséptico que incluyen grandes cantidades de propágulos muy pequeños o de células, han cambiado dramáticamente el potencial hacia lo “horizontal”; lo cual magnifica cualquier falta de fidelidad absoluta en el genotipo o fenotipo (Roca & Mroginski, 1993).

Dentro de las principales estrategias que se pueden seguir para realizar la multiplicación clonal están: el microinjerto, órganos de perennidad, embriogénesis somática, organogénesis directa, organogénesis indirecta y el cultivo de meristemas y yemas axilares; éste último se tratará a detalle a

continuación, ya que es el método que se utilizará en la realización de la presente tesis.

#### **1.4.3.1.1 Cultivo de meristemas y yemas axilares**

Las plantas juveniles tienen una mayor capacidad de regeneración que las adultas; pero debido a que las plantas que se usan generalmente para la multiplicación vegetativa son adultas, se debe intentar antes de su uso, sobre todo en las especies leñosas, una juvenalización. Esa puede ser conseguida a veces por: cultivo de meristemas, obtención de esquejes a partir de otros esquejes, injerto de un meristemo o ápice del vástago sobre un patrón (plántula), aislamiento a partir de zonas que son aún juveniles o una poda severa; lo cual estimulará la producción de vástagos juveniles laterales. El rejuvenecimiento por medio de cultivo *in vitro* de meristemas, a pesar de las dificultades que entraña, es todavía la técnica más utilizada, ya que: mantiene la estabilidad genética, elimina los hongos y bacterias y puede suponer a veces la ventaja adicional para producir un material libre de virus (Pierik, 1990).

Los meristemas son regiones con células en constante división, que producen células que se diferencian en los nuevos tejidos de la planta, los meristemas apicales son responsables de la elongación de la planta, es decir del crecimiento primario (se pueden comparar con las células madre en los animales) (Evans *et al.*, 2003). Por esta razón se utilizan los meristemas en la micropropagación, y si su extracción y manejo son muy difíciles. Se utilizan las yemas apicales, que son el explante donde se los puede encontrar.

La micropropagación a partir de yemas, ápices y meristemas tomó un gran impulso en los años 60, con el descubrimiento de su capacidad de regeneración en orquídeas, ya que cortados apropiadamente y sembrados en cultivo aséptico producen protuberancias que se asemejan a protocormos normales capaces de crecer y desarrollarse en plántulas. Desde entonces se han usado cultivos de puntas de brotes y de meristemas en muchas otras plantas para obtener, mantener y multiplicar material genético. En algunos

casos se regenera una planta completa y en otros se puede estimular la formación de brotes múltiples (Roca & Mroginski, 1993).

Muchas especies de interés comercial son producidas con este tipo de micropropagación, donde se incluyen: orquídeas, flores y plantas ornamentales, girasoles, coco, cardamomo, eucalipto, cuningamia, palmera del rattan y sandía. Este tipo de micropropagación tiene la inmensa ventaja de generar rápidamente un gran número de plantas idénticas genéticamente en un tiempo muy corto comparado con los cultivos convencionales. Particularmente tiene una importante aplicación en la modificación genética, ya que plantas transgénicas pueden ser multiplicadas muy rápidamente (Evans *et al.*, 2003).

Luego de obtener ramas axilares, éstas pueden separarse y enraizarse; teóricamente, los brotes axilares o laterales pueden a su vez producir ramas axilares adicionales a perpetuidad, a medida que se subcultiva cada brote recién formado o cada explante de nudo. Este método ha sido utilizado en una gran variedad de especies, desde las herbáceas hasta las leñosas. En la figura 1.6 se muestra un esquema de este tipo de propagación vegetativa (Roca & Mroginski, 1993).

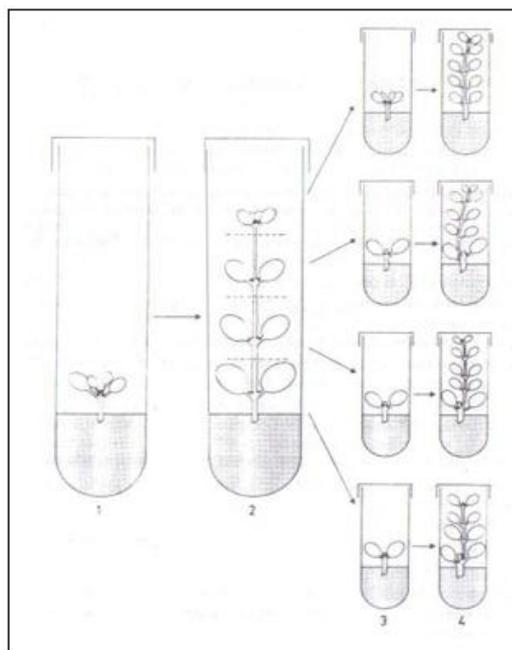


Figura 1.6 Representación esquemática del método de explantes nodales, para la propagación vegetativa de plantas (Pierik, 1990).

Al aplicarse este método se debe tener en cuenta los siguientes puntos:

- El aislamiento por este método es prácticamente imposible cuando se trata de plantas en roseta, como las bromeliáceas, y cuando las posibilidades de infección son altas.
- Para reducir las posibilidades de infección es mejor aislar yemas cerradas.
- La velocidad de propagación depende del número de yemas disponibles.
- La dormición, especialmente en plantas leñosas de los climas templados, frecuentemente presenta problemas. Para romper la dormición se debe entender muy bien los problemas asociados con la misma o su ruptura. El material inicial juega un papel muy importante en este sentido (posición, edad, época del año en que se produce el aislamiento, etc.), los factores físicos también son muy importantes como por ejemplo la composición del medio nutritivo.
- Las formas de romper la dormición después del aislamiento *in vitro*, especialmente en plantas leñosas son: tratamientos con temperatura baja (0 – 5 °C), día largo (16 horas luz por día), y la mezcla de ambas. En algunos casos las giberelinas y/o citoquininas pueden estimular la ruptura de dormición en yemas, además de una etiolación (causada por la oscuridad o la baja irradiancia) (Pierik, 1990).

#### **1.4.3.2 Propagación generativa**

La propagación generativa en cultivo de tejidos, es la que involucra células sexuales, por lo tanto, se trata de reproducir plantas a partir de óvulos fecundados, que al desarrollarse y madurarse formaran una semilla sexual, con la información genética de los gametos sexuales masculino y femenino. Este tipo de propagación no será clonal, referido a la planta de la que se extraen las semillas; aunque las múltiples plántulas que se puedan extraer de la semillas,

ya sea por inducción de callo y posterior organogénesis, multiplicación o embriogénesis, sí serán idénticas entre ellas. Para entender mejor los procesos que implica esta técnica se revisará al detalle el cultivo de los embriones extraídos de semillas.

#### **1.4.3.2.1 Cultivo de embriones**

El cultivo de embriones es un importante método para estudiar el desarrollo embrionario y de la semilla; esto involucra la obtención de semillas viables cuando la germinación *in vivo* es un problema. El método más fácil para cultivar embriones es removerlos de la semilla cuando están cerca de madurarse y listos para germinar. Sin embargo, en otros casos (para obtener semillas estériles o rescatar embriones mutantes), es necesario extraer un embrión inmaduro y hacerlo crecer directamente en un medio sólido (Evans *et al.*, 2003).

El tipo de embriones con que se trabaja, y sus características se detallan a continuación:

- Cultivo de embriones inmaduros, que se originan en semillas no acabadas de madurar. Este tipo de cultivo se utiliza sobre todo para impedir el aborto embrionario, y con el fin de obtener una planta viable. Este cultivo es (extremadamente) difícil; en parte porque se necesita una ardua disección, y también un medio nutritivo complejo. Las posibilidades de éxito de este tipo de cultivo, dependen mucho del estado de desarrollo del embrión en el momento de ser aislado.
- Cultivo de embriones maduros, que se encuentra a su vez en semillas maduras. Este tipo de cultivo es relativamente fácil, y se utiliza para eliminar la inhibición (absoluta) de la germinación de las semillas y para mejorar los porcentajes de germinación comparados con los obtenidos *in vivo*. Adicionalmente, el hecho de que son tejidos embrionarios, son excelente explantes para ser usados en estudios de propagación clonal

*in vitro* en virtud de su naturaleza y alto potencial regenerativo (Pierik, 1990).

El cultivo aséptico se ha convertido en un procedimiento ampliamente utilizado y de rutina para el “rescate” de los embriones que normalmente no crecen ni se convierten en plántulas. En un sentido estricto, el material no se está multiplicando clonalmente, pero si se está multiplicando el germoplasma que de otra manera se perdería; por lo tanto, tal vez se justifique incluir este sistema en la lista de estrategias para la multiplicación (Roca & Mroginski, 1993). Además el cultivo de embriones posibilita la recuperación de híbridos de cruzamientos incompatibles, rompimiento de la dormancia, esterilidad de las semillas y se pueden obtener explantes jóvenes libres de contaminación (Santos, Pasqual, Ferreira y Alves, 2003).

Los suplementos en el medio de cultivo como el agua de coco (un endospermo líquido vegetal) han tenido mucho éxito en proveer de los nutrientes necesarios y los factores de crecimiento requeridos. Aunque en embriones maduros, al incrementar su actividad autotrófica, no se requiere un medio muy complejo. Azúcar o glucosa es la fuente de carbohidratos más usual, el aminoácido glutamina es preferido como fuente de nitrógeno en comparación con la asparagina. Otros aditivos incluyen, hormonas (particularmente auxinas y citoquininas) y otros como la leche de coco y caseína hidrolizada. La concentración de agar tiene una importancia particular, ya que una alta concentración genera la deshidratación del embrión (Evans *et al.*, 2003).

El medio de cultivo adecuado tanto para la propagación como para el cultivo de embriones debe ser adaptado para cada especie. Aunque diferentes medios son capaces de mantener los microcultivos, el frecuentemente utilizado es el medio Murashigue & Skoog (Nunes, 2007) y para embriones inmaduros el medio basal Gamborg (Evans *et al.*, 2003).

Uno de los problemas en el cultivo de embriones es la germinación precoz de los embriones cigóticos, ya que las plantas resultantes serán

anormales o débiles, faltándoles estructuras o presentar solamente aquellas que tenían en el momento de la extracción. Varias son las formas para evitar la germinación precoz, tales como: alta presión osmótica, baja tensión de nitrógeno, elevado nivel de potasio y nitrógeno, incluso de ácido abscísico (ABA) en el medio, y también de polietilenglicol (PEG). En general, cuanto más joven es el embrión utilizado, más alta será la osmolaridad requerida en el medio (Nunes *et al.*, 2008).

Es muy importante que las semillas o embriones que se van a cultivar *in vitro*, aseguren tener buenas características, es decir, un material que no se haya almacenado por mucho tiempo, no presentar patógenos ni pudrición, y otros factores que pueden interferir con una normal germinación *in vivo*. También se debe tener en cuenta los tratamientos pre-germinativos (escarificación, remojo, imbibición, etc.) a utilizar antes de la siembra aséptica en el medio de cultivo. Por otro lado se pueden realizar pruebas de viabilidad para asegurarnos el porcentaje de semillas viables. Este porcentaje deberá aproximarse en gran manera al porcentaje de germinación *in vitro*, ya que se tiene las condiciones ideales para ello, no así *in vivo*. Una de las pruebas más utilizadas es la prueba de tinción con tetrazolio, debido su precisión y facilidad de observación en los resultados, la cual se detalla en el siguiente apartado.

#### **1.4.3.2 Prueba de viabilidad de semillas basada en la tinción con tetrazolio**

Una prueba de germinación es el mejor indicador del potencial de un lote de semillas para emerger en condiciones de campo. Sin embargo, ésta dura desde días, semanas y en algunos casos hasta meses para completarse. La prueba de tetrazolio, comúnmente llamada como prueba TZ, es una prueba de viabilidad de semillas que ha sido desarrollada para proporcionar una rápida estimación de la germinabilidad de semillas (Patil & Dadlani, 1993).

La prueba de tetrazolio (TZ) fue desarrollada en Alemania en los años 40 por Georg Lakon e introducida a los Estados Unidos después de la Segunda Guerra Mundial. El uso de esta prueba se ha incrementado y expandido desde

entonces debido a que es completamente rápida y tarda unas pocas horas. Este es un método rápido para determinar la viabilidad de la semilla comparada con una prueba estándar de germinación. Comúnmente los resultados con TZ son usados en lugar de los resultados con pruebas de germinación estándar. Además, este procedimiento es usado también para determinar la viabilidad de semillas no germinadas al final de una prueba de germinación (Vankus, 1997).

- **Mecanismo de reacción**

El creador de este método, Georg Lakon, reconoció que todos los tejidos vivos, los cuales respiran, son capaces de reducir un químico incoloro, el cloruro o bromuro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio, a un compuesto de color rojo, el formazan, por transferencia de hidrógenos, reacción que es catalizada por la enzima deshidrogenasa como se muestra en la figura 1.7 (Patil & Dadlani, 1993).

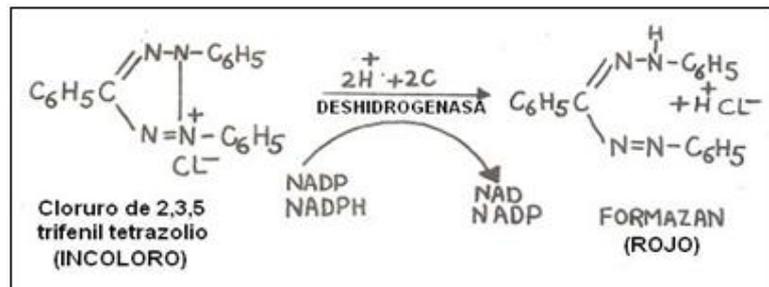


Figura 1.7 Mecanismo de reacción del cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolio (incoloro), reducido por la deshidrogenasa, en formazan (color rojo) (Tomado de Patil & Dadlani, 1993).

Es decir que, la prueba del tetrazolio mide la actividad de las enzimas deshidrogenasas usadas en el proceso de respiración. La respiración es un proceso celular que degrada azúcares para producir energía, dióxido de carbono y agua, utilizando oxígeno. Las enzimas reaccionan con los sustratos liberando iones hidrógeno a la solución soluble de cloruro de tetrazolio. La solución salina es reducida por estos iones hidrógeno. Entonces la solución incolora de tetrazolio es convertida en un compuesto rojizo insoluble llamado formazan. Si el embrión y posiblemente el endospermo o tejidos de almacenamiento se encuentran respirando activamente, el formazan estará

presente y los tejidos se teñirán de rojo. La viabilidad de las semillas es determinada evaluando: la cantidad del área teñida, la intensidad de la tinción, el patrón de teñido y otras características críticas que incluyen la turgencia, presencia y daño de estructuras esenciales, anormalidades y presencia de patógenos (Vankus, 1997).

Este procedimiento mencionado también sirve para estimar la viabilidad de semillas en dormancia, especialmente aquellas que tienen una dormancia muy pronunciada. Esta prueba requiere un remojo previo de las semillas en agua, para que se vuelvan más blandas para el corte. Una semilla humedecida se teñirá mucho más rápido. Es extremadamente importante que no se dañe en el corte el eje embrionario, esto se refiere a la radícula y plúmula. Las regiones meristemáticas están allí, y sus condiciones deben permanecer inalteradas hasta que sean examinadas cuidadosamente. Estas áreas permitirán al embrión desarrollarse para producir una germinación normal. Para semillas con cubiertas muy duras, se tiene una variedad de métodos que permiten extraer el embrión sin daño. El tiempo de teñido va de dos a cuatro horas, a temperaturas de 20 a 40°C dependiendo del tipo de semilla tratada (Karrfalt, 2004).

La concentración de cloruro de tetrazolio está en el rango de 0,1 a 1,0%. Generalmente una solución al 1% es utilizada para semillas que no necesitan abrirse para extraer el embrión. Bajas concentraciones (0.2 a 0.5%) son utilizadas para embriones poco voluminosos y relativamente frágiles. La solución de cloruro de tetrazolio puede hacerse con disolución en agua, pero se debe tener en cuenta que el pH debe estar alrededor de 7. Un pH de 4 o menos no dará una tinción clara de embriones viables, y una solución de pH 8 o más resultará en un teñido muy intenso, lo cual puede interferir en la lectura de resultados. Si el pH del agua no está en el rango neutral, la sal de tetrazolio deberá ser disuelta en una buffer de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). El almacenamiento de la solución de tetrazolio se lo realiza en condiciones de oscuridad, para prevenir la reacción en presencia de luz, y a bajas temperaturas (Patil & Dadlani, 1993).

#### **1.4.4 Etapas de la micropropagación clonal *in vitro***

Dentro del proceso de micropropagación se pueden diferenciar claramente varias fases o etapas, cuya secuencia abarca un ciclo completo en la multiplicación de plantas *in vitro*. De acuerdo a las características de cada especie vegetal pueden existir simplificaciones o cambios, pero en términos generales, estas etapas son comunes al proceso de propagación *in vitro*.

##### **1.4.4.1 Etapa 0: Preparación y selección de plantas donadoras**

Se pueden utilizar dos tipos de material vegetal *in vitro*: plantas cultivadas bajo condiciones controladas, en invernadero o cámara de ambiente controlado; o plantas cultivadas en campo. En la práctica, si un explante es aislado de una planta cultivada en el exterior, existen muchas más posibilidades de que se produzca una infección. Si se tiene que utilizar material exterior, es aconsejable, siempre que sea posible, pasar la planta al interior; donde se continúa su cultivo en algún recipiente, y por tanto, su crecimiento. A partir de las partes de la planta que sean recientemente formadas se escogen los explantes para el cultivo *in vitro* (Pierik, 1990).

En relación con la especie vegetal utilizada, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada al genotipo de las plantas. Es muy frecuente que, en idénticas condiciones de medio y ambiente, las respuestas *in vitro* de cultivo de un determinado explante de una especie, difieran con el cultivar empleado. Ligeros cambios en la composición de los medios de cultivo, especialmente en lo que se refiere a los reguladores de crecimiento, pueden ser de utilidad para obviar este efecto del genotipo del material vegetal (Roca & Mroginski, 1993).

Por otro lado, y con fines de obtener resultados estadísticos relevantes, se debe tener en cuenta que el material con el que se va a trabajar sea lo más homogéneo posible, esto en lo que se refiere a las plantas donadoras, época de recolección, tipo de explante y condiciones de cultivo.

#### **1.4.4.2 Etapa 1: Establecimiento del cultivo aséptico**

La asociación explante – medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacteria, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar la contaminación es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos, sino en su ulterior incubación y manipulación (Roca & Mroginski, 1993).

La obtención de explantes estériles es dificultosa debido a que el tejido vegetal debe ser tratado con desinfectantes que sean efectivos en destruir cualquier contaminación microbiana sin dañar el tejido del explante. Los siguientes procedimientos pueden ser utilizados en la esterilización superficial de los explantes:

- Realizar un lavado de los explantes con un detergente suave; hojas y tejidos herbáceos pueden no requerir este paso, pero tejidos leñosos y tuberoso deben ser lavados cuidadosamente.
- Se debe realizar un lavado del tejido con una corriente constante de agua por 10 a 30 minutos.
- Luego se sumerge el tejido por unos segundos (no más de un minuto) en una solución de etanol al 70%.
- Bajo condiciones estériles, el explante es sumergido en una solución desinfectante en un recipiente sellado con una agitación leve por 5 a 10 minutos. Se puede añadir un agente humectante como Tween 20 u 80 al desinfectante para mejorar el contacto entre el explante y el desinfectante. Para tejidos que son difíciles de desinfectar se pueden utilizar bombas de vacío para una mejor descontaminación al eliminar las burbujas de aire.

- Al final del periodo de esterilización, los desinfectantes son decantados y los explantes lavados tres o más veces en agua destilada estéril y secados con toallas de papel estériles, para así iniciar el cultivo del tejido (Evans *et al.*, 2003).

No es aconsejable utilizar en la desinfección etanol al 96% ya que produce una excesiva deshidratación en el tejido; este desinfectante se aconseja utilizarlo para descontaminar las áreas donde se va a trabajar en la siembra del explante, los instrumentos a utilizar como pinzas y bisturís, y para el flameado ocasional de las superficies (Pierik, 1990).

Hay una vasta gama de compuestos químicos que se pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad es casi generalizado el empleo de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1 al 3 % contenido en productos de uso doméstico. Con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio (Ca(OCl)<sub>2</sub>) del 6 al 12% y el cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) del 0,1 al 1,5%, aunque hay que recalcar que este compuesto es altamente tóxico y que no es fácilmente removible del explante (Roca & Mroginski, 1993).

La elección del tiempo de esterilización y la concentración del hipoclorito de sodio se pueden hacer en función de las circunstancias particulares de cada caso. Depende en gran parte de si la superficie del explante que se utiliza se va a conservar (esterilización suave) o se va a cortar antes de la inoculación (esterilización vigorosa). Una esterilización prolongada puede producir efectos negativos sobre el explante; el tiempo y la concentración adecuada de hipoclorito de sodio deben elegirse cada vez, en función del material experimental (Pierik, 1990).

#### **1.4.4.3 Etapa 2: Inducción de brotes**

Una vez que se establezca el protocolo de desinfección más adecuado, donde los explantes tengan el menor porcentaje de contaminación y el mayor porcentaje de recuperación de explantes viables, se procede a determinar el

medio nutritivo que permitirá al tejido adaptarse y desarrollarse al nuevo ambiente *in vitro*.

Los nutrientes son esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta: sin agua y nutrientes minerales una planta no puede vivir ni *in vitro* ni *in vivo*. También se debe añadir azúcares al medio de cultivo, ya que las plantas no son completamente autotróficas cuando se desarrollan en estas condiciones. El medio de cultivo brinda los requerimientos nutritivos al explante para su crecimiento óptimo en condiciones *in vitro*, pero estos requerimientos varía según la especie. Debido a esto existen muchas formulaciones de medios de cultivo según el tipo de planta y el explante con el cual se trabaje. Por ejemplo el medio MS, o de Murashige y Skoog (1962) (Anexo A), es muy usado, particularmente si el objetivo es regenerar plantas (Pierik, 1990).

Todos los medios parecen beneficiarse en cierto grado con los suplementos vitamínicos, a menos que las células se vuelvan verdes o hasta que ello ocurra; los aditivos mínimos usuales son la tiamina, ácido nicotínico y la Piridoxina (Roca y Mroginski, 1993).

Muchos cultivos vegetales requieren de reguladores de crecimiento (hormonas). Es muy útil la preparación de una solución que se 1000X de la concentración final, para facilitar la adición de pequeños volúmenes. Las hormonas son añadidas antes del autoclavado o filtradas de forma estéril y añadidas luego del mismo. Es posible que el medio requiera un suplementos indefinidos como agua de coco, caseína hidrolizada o harina de plátano, los cuales pueden ser también autoclavados (Evans *et al.*, 2003).

Las principales diferencias entre los medios de cultivo se relacionan con los diferentes compuestos utilizados para estimular la división celular. Como se mencionó, se emplean generalmente sustancias reguladoras de crecimiento, generalmente del tipo de las auxinas o las citoquininas. Las auxinas que más se utilizan en el establecimiento de los cultivos son: 2,4-D, ANA, AIA y AIB; las citoquininas que más se emplean son: KIN, BAP y ZEA. Además se ha demostrado que el uso de giberelinas, especialmente el GA<sub>3</sub>, es

necesario para el cultivo de ápices o meristemas caulinares de varias especies vegetales (Roca y Mroginski, 1993).

#### **1.4.4.4 Etapa 3: Multiplicación de brotes**

El explante establecido es inducido a producir brotes vegetativos luego de ser transferido a un medio que contiene citoquininas (Evans *et al.*, 2003); se espera que estos explantes originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Castillo, 2004).

Un parámetro que se debe tener muy en cuenta es que, la multiplicación o propagación no ocasione una pérdida de la estabilidad genética (variación somaclonal), que puede ser causada por un excesivo subcultivo de los brotes adventicios formados (este tema se trata en el apartado 1.4.5.4); aunque sí es necesario un número de repicados para que se produzca un rejuvenecimiento de la planta, especialmente en especies leñosas.

Las necesidades de citoquinina son muy variables (tipo y concentración); para muchas plantas ocurre, que cuantos más repicados se realizan, más disminuyen las necesidades de citoquinina, como resultado del rejuvenecimiento y habituación. La mayor parte de plantas reaccionan bien al BAP (bencilaminopurina), e incluso a concentraciones menores de kinetina o 2ip. Se aconseja elegir una concentración de auxinas baja, junto con una

concentración de citoquininas alta; generalmente la proporción citoquinina/auxina es de 10/1. En algunas ocasiones se recomienda el permitir al ápice del vástago un cierto desarrollo, antes de aumentar la concentración de citoquininas para inducir la formación de vástagos axilares (Pierik, 1990).

#### **1.4.4.5 Etapa 3: Enraizamiento y elongación**

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro* requiere generalmente del transplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. Por ejemplo, el medio MS diluido al 50% ha dado resultados positivos en diferentes especies. Así mismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir las citoquininas y aumentar las auxinas exógenas. En algunas especies, es suficiente la eliminación de las citoquininas exógenas para estimular la diferenciación del sistema radical (Roca & Mroginski, 1993).

En la mayor parte de los casos, la formación de raíces se induce más fácilmente en plantas juveniles que en plantas adultas, aunque las razones por las que esto es así, no están generalmente claras. Un factor muy importante es el suministro de oxígeno, ésta es la razón por la que los vástagos enraízan mejor *in vivo* que *in vitro*; en el agar se encuentra un suministro limitado de oxígeno (el oxígeno no es muy soluble en el agua). Las raíces formadas en agar, por lo general tienen pelos radicales escasamente desarrollados, debido a la falta de oxígeno. Por este motivo el enraizamiento se da de mejor manera en medio líquido (Pierik, 1990).

Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea (Castillo, 2004).

Otros factores importantes en la formación y elongación de raíces es la luz, la cual en la mayoría de especies inhibe el enraizamiento. Por otro lado, una concentración alta de azúcar estimula la formación de raíces adventicias. También se ha demostrado que el carbón activado juega un importante papel

en la formación radical, ya que se le atribuyen dos efectos: la adsorción de todos los compuestos orgánicos, con excepción de los azúcares, y la falta de suministro de luz a los medios nutritivos (Pierik, 1990).

#### **1.4.4.6 Aclimatación**

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. Tanto si los explantes son enraizados *in vitro* como *ex vitro*, en el momento en que se extraen los explantes de los recipientes de enraizamiento están poco adaptados a crecer en un invernadero, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas que no están muy bien adaptados para responder al descenso de la humedad relativa, y son demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula cerosa bien desarrollada, la barrera para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta. Los explantes deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz (SABIT, 2006).

#### **1.4.5 Factores que influyen en el cultivo *in vitro***

Diversos agentes influyen para que un determinado cultivo de explantes tenga éxito en el establecimiento y posterior desarrollo normal *in vitro*. Dentro de estos factores se tiene principalmente: el material vegetal, factores físicos y químicos, y la variación somaclonal.

##### **1.4.5.1 Material vegetal**

###### **1.4.5.1.1 Plantas donadoras de material vegetal**

Es muy importante obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para esto, se recomienda mantener las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo

que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. Así, se cultiva una planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo, 2004).

Si se tiene que utilizar material obligatoriamente cultivado en el campo, se debe tener en cuenta lo siguiente:

- Las yemas deben usarse con sus catáfilos o brácteas, una vez que no estén durmientes, aunque no hayan empezado a abrirse.
- Se pueden utilizar ramas que hayan permanecido almacenadas, y luego brotadas en agua en el interior.
- Las ramas que se hayan desarrollado en el exterior, se pueden envolver en plástico, y solo deben usarse para su aislamiento las partes que se desarrollen a partir de ese momento.

En cambio, para limitar las infecciones cuando se utiliza material de invernadero o cámara de crecimiento, se deben seguir las siguientes directrices:

- Impedir infecciones de insectos (áfidos, araña roja, ácaros, mosca blanca), ya que son vectores de enfermedades.
- Evitar hongos y bacterias, utilizando cuando, sea posible, fungicidas o bactericidas sistémicos.
- No mojar nunca las plantas al regar, añadiendo directamente el agua al tiesto.

- Mantener la humedad en el invernadero tan baja como sea posible. Las infecciones fúngicas y bacterianas son más probables con una humedad alta.
- Permitir a las plantas secarse parcialmente antes de iniciar la esterilización y aislamiento (Pierik, 1990).

#### **1.4.5.1.2 Tipo y edad de los explantes**

La parte de la planta que se va a introducir *in vitro* influirá mucho a la hora de la desinfección y establecimiento, y en el tipo de propagación que se vaya a realizar. Por ejemplo, la desinfección es mucho más sencilla si se trata de hojas, peciolo o entrenudos, por tratarse de tejidos relativamente lisos; en contraste, la contaminación se vuelve mucho más persistente en yemas axilares y apicales, y en tejidos con tricomas, debido a la dificultad que tiene el desinfectante para ingresar en estos lugares.

El tamaño del explante es otro aspecto que se debe tener en cuenta para el establecimiento de los cultivos; cuanto más grande sea, mayores son las posibilidades de obtener proliferación callosa, aunque ello trae aparejadas mayores probabilidades de heterogeneidad y de contaminación con microorganismos. Existe un tamaño mínimo del explante, variable según el material vegetal, por debajo del cual no se obtienen proliferación callosa u otras respuestas deseables (Roca & Mroginski, 1993).

Para una obtención rápida de una estructura callosa será muy importante escoger hojas o peciolo como explantes, ya que son tejidos jóvenes y muy propensos a un incremento en la división celular.

La micropropagación clonal implica que cada una de las plántulas que se produce, pueda crecer y ser fenotípicamente y genotípicamente idéntica a la planta original de la que se deriva. Hasta el momento, las puntas de tallos y las yemas laterales han sido los explantes que utilizan mayormente en esta etapa. Por esta razón, cuando se usa la palabra “micropropagación” muy raras veces

se piensa en el uso de callos, células libres o de otros sistemas de tejidos más exigentes (Roca & Mroginski, 1993).

Cuando se aíslan meristemos y ápices del vástago (iniciales del vástago), se debe tener en cuenta que los ápices del vástago juveniles permanecen como juveniles *in vitro*, mientras que los adultos se comportan como tales. A veces a través de repicados repetidos de ápices del vástago o especialmente meristemos, un meristemo adulto, de forma gradual, adquiere caracteres juveniles. Este rejuvenecimiento se traduce en un incremento de la división celular y la regeneración. Por tanto, los tejidos jóvenes, no lignificados, por lo general son más apropiados para el cultivo que los tejidos viejos y leñosos, aunque existen algunas excepciones (Pierik, 1990).

En lo que tiene que ver al estado fisiológico, este tiene un fuerte efecto sobre la división celular y la regeneración *in vitro*. Aunque con muy pocas excepciones, en general los fragmentos de plantas en estado vegetativo, regeneran *in vitro* con más facilidad que los fragmentos de plantas en estado generativo; dentro de este caso, las yemas (especialmente de árboles y arbustos), que se encuentran todavía en estado de reposo (final de otoño o principio del invierno), son más difíciles de cultivar *in vitro* que las que proceden de plantas que ya no están durmientes (Tomado de Pierik, 1990).

#### **1.4.5.2 Factores Químicos**

##### **1.4.5.2.1 Carbohidratos**

El azúcar es un componente muy importante en cualquier medio nutritivo ya que los tejidos verdes no son suficientemente autótrofos *in vitro*. También la concentración del CO<sub>2</sub> en el tubo de ensayo puede ser un factor limitante para la fotosíntesis, y en la práctica es muy difícil y caro suministrar el anhídrido carbónico. Generalmente el azúcar se usa en una concentración de 1 a 5% de sacarosa, ya que este azúcar se sintetiza y se transporta de forma natural por las plantas. También se puede utilizar glucosa y fructosa. La concentración utilizada depende mucho del tipo y edad del material vegetal; por

ejemplo embriones muy jóvenes requieren concentraciones de azúcar relativamente altas (Pierik, 1990).

#### 1.4.5.2.2 Sales inorgánicas

Los nutrientes inorgánicos son elementos minerales, que basados en sus concentraciones de uso se clasifican en dos grupos: macroelementos, que se utilizan en concentraciones milimolares (mM), y microelementos, que se utilizan en concentraciones micromolares (uM).

En el cuadro 1.3 se resumen los macro y microelementos utilizados en cultivo *in vitro*, la forma en que se encuentran en el medio y sus concentraciones utilizadas.

Cuadro 1.3 Elementos contenidos en los medios nutritivos y concentraciones necesarias (Tomado de Evans *et al.*, 2003).

	ELEMENTOS	CONCENTRACIÓN
Macroelementos	Nitrógeno (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	20 - 40 mM
	Azufre (SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )	1 - 3 mM
	Fósforo (PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )	1 - 3 mM
	Calcio	1 - 3 mM
	Magnesio	1 - 3 mM
	Potasio	20 - 30 mM
	Microelementos	Hierro
Boro		-
Cobalto		0,1 uM
Cobre		0,1 uM
Iodo		-
Manganeso		5 - 30 uM
Molibdeno		0,1 uM
Zinc		5 - 30 uM

#### 1.4.5.2.3 Vitaminas, aditivos y aminoácidos

La adición de vitaminas no es esencial para la célula vegetal y el cultivo de tejidos, aunque la vitamina B<sub>1</sub> (tiamina) es considerada benéfica para cultivos de algunas especies. Sin embargo, biotina, ácido pantoténico, ácido

nicotínico (niacina), piridoxina (piridoxol, vitamina B<sub>6</sub>), ácido fólico, ácido ascórbico (vitamina C) y tocoferol (vitamina E) son añadidos a algunos medios. La adición de extracto de levadura también es usada como fuente de vitaminas. El mioinositol es frecuentemente utilizado en medios para monocotiledóneas, gimnospermas y algunas dicotiledóneas, ya que juega un papel importante en el desarrollo de la pared celular y la membrana (Evans *et al.*, 2003).

Los aminoácidos son usados como fuente de nitrógeno orgánico; la L-glutamina es el más usado; aunque también se pueden utilizar la asparagina y la adenina; esta última es más soluble como sulfato y suele usarse en la propagación vegetativa (2 – 120 mg L<sup>-1</sup>) para estimular la formación de vástagos adventicios (Pierik, 1990).

#### **1.4.5.2.4 Reguladores de crecimiento**

Son compuestos orgánicos sintetizados por plantas superiores que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en lugar diferente a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades. También se han desarrollado otros reguladores de origen sintético con similares propiedades a los naturales. En el cultivo *in vitro* se usan especialmente auxinas y citoquininas, cuyas concentraciones dependen del tipo de cultivo y especie vegetal (Pierik, 1990).

- **Auxinas**

La auxina que se encuentra en mayor cantidad de forma natural es el ácido 3 - indol acético (AIA), este es sintetizado en los ápices radicales y transportado a lo largo del eje de la planta. En general, en las raíces estimulan la división celular y su diferenciación, y junto con las citoquininas regulan algunos procesos del desarrollo vegetal. Por ejemplo induce a la formación de raíces laterales. La senescencia y abscisión de hojas, frutos y flores maduras son inhibidas por las auxinas. También se utilizan las auxinas sintéticas: ácido 2,4 – diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 1 – naftalenacético (ANA), ácido 3 – indol butírico (AIB) y ácido p – clorofenoxiacético (Evans *et al.*, 2003).

- **Citoquininas**

Las citoquininas se utilizan frecuentemente para estimular el crecimiento y el desarrollo; siendo las más comunes: kinetina, BAP, 2ip y PBA. Generalmente estimulan la división celular, sobre todo si van en compañía de una auxina. En concentraciones elevadas ( $1 - 10 \text{ mg L}^{-1}$ ) pueden inducir la formación de vástagos adventicios, sin embargo, generalmente se inhibe la formación de raíces. Se puede decir que promueven la formación de vástagos axilares porque disminuyen la dominancia apical, además de retardar el envejecimiento (Pierik, 1990).

- **Giberelinas**

El uso del ácido giberélico (GA) comenzó a partir de su aislamiento del hongo *Gibberella fujikuroi*, y su adición en el medio de cultivo produce efectos fisiológicos muy amplios. Existen también varias giberelinas, relacionadas con el GA que son productos complejos del metabolismo del hongo o de plantas superiores, y son capaces de intervenir en el alargamiento celular. Se conoce que niveles de GA superiores a  $1 \text{ mg L}^{-1}$  son tóxicos, por lo que se deben utilizar en bajos niveles y con cautela; además las giberelinas son termolábiles y deberían esterilizarse con filtros (Roca & Mroginski, 1993).

- **Brasinoesteroides**

Los brasinoesteroides son potentes reguladores del crecimiento vegetal de naturaleza esteroide, siendo, la brasinolida, el primer compuesto aislado a partir de una fuente natural en 1979 de *Brasica napus* (Adam, 1998). Se le atribuyen las siguientes respuestas en las especies vegetales como: promover la elongación de tejidos, acelera la desdiferenciación de protoplastos y regeneración de la pared celular, hiperpolariza el potencial eléctrico de la membrana, influye en el gravitropismo, retrasa la abscisión de hojas en cítricos, en presencia de auxinas y citoquininas, estimula el crecimiento de callos, induciendo el alargamiento y la división celular; acelera la actividad fotosintética, incrementa la biosíntesis de proteínas y azúcares. Se los utiliza en

muy bajas concentraciones (0,1 – 0,001 mg L<sup>-1</sup>); y además de su influencia en el crecimiento, usualmente influyen sobre otros aspectos del desarrollo, como la reproducción, maduración, senescencia y abscisión (Rossi, 2005).

#### **1.4.5.2.5 Antioxidantes**

Muchas especies, sobre todo las leñosas, contienen compuestos fenólicos que en el medio de cultivo producen una oxidación excesiva del material vegetal, para esto se han diseñado varias estrategias que reducen este efecto, como es la adición de sustancias antioxidantes como ácido cítrico, ácido ascórbico, cisteína, entre otros, que controlan en gran manera la oxidación.

#### **1.4.5.2.6 Agente gelificante**

En el cultivo de tejidos se necesita de una matriz sólida o semi – sólida que sirva de sostén al explante mientras permita el contacto con el medio, aunque un medio líquido es muy útil en algunos sistemas de cultivo, frecuentemente se presenta el problema de la hiperhidratación, donde los explantes no pueden crecer apropiadamente. Las siguientes sustancias han sido utilizadas con éxito como agentes gelificantes: agar, agarosa, gelatina o gomas géllicas (Phytigel – Sigma, Gelrite – Merck), los cuales no reaccionan con los constituyentes del medio y no son digeridos normalmente por enzimas vegetales (Evans *et al.*, 2003).

#### **1.4.5.3 Factores Físicos**

Es indispensable en la investigación disponer de cámaras de cultivo, en las que se pueda controlar la luz, temperatura y humedad, principalmente. Estas condiciones deben estar reguladas dependiendo de la especie vegetal con la que se trabaje, para que se adapte y desarrolle de la mejor manera. Algunas veces cuando se cultiva un embrión, tejido, órgano, etc., se hacen necesarias condiciones especiales, primero de luz y después de oscuridad o viceversa, por lo cual se recomienda tener cámaras separadas para cada

cultivo, con la intención de que no interfiera la una con la otra en su crecimiento (Pierik, 1990).

#### **1.4.5.4 Variación somaclonal**

Está plenamente comprobado que ocurren modificaciones genéticas en las células y tejidos cultivados con técnicas *in vitro*. Según Larkin y Scowcroft (1981), muchas de estas modificaciones se manifiestan como mutaciones heredables a las progenies de las plantas regeneradas. Este fenómeno se conoce como variación somaclonal (Tomado de Roca & Mroginski, 1993).

El origen y expresión de estas variaciones observadas difiere de especie a especie y depende también del tipo de tejido del explante. La variación somaclonal se puede dar de dos clases:

- Variabilidad genética (heredable), causada de mutaciones u otros cambios en el DNA.
- Variabilidad epigenética (no heredable), causada por cambios fenotípicos temporales (Evans *et al.*, 2003).

La aparición de mutaciones no resulta siempre fácil de determinar, debido a algunos motivos como:

- La expresión de las mutaciones depende a menudo, en gran medida, de las condiciones ambientales.
- Frecuentemente ocurren micro – mutaciones que son difíciles de identificar.
- Se necesitan métodos citológicos para identificar los mutantes, y esto implica complicaciones en la investigación; sería necesario utilizar

técnicas como la electroforesis para identificar iso – enzimas (Pierik, 1990).

Los procedimientos *in vitro* para la transformación, regeneración y propagación clonal de plantas pueden abarcar procedimientos de cultivo de tejidos que toman de cuatro semanas a varios meses en completarse. El grado de variación somaclonal generado y acumulado durante este periodo de cultivo puede significar una interferencia difícil de controlar. Una variación somaclonal extensiva puede resultar en cambios indeseados en la genética de las plantas regeneradas, lo que podría limitar su uso como cultivares de padres élite (Evans *et al.*, 2003); asimismo, pueden darse cambios genéticos que mejoren una especie investigada, donde se tendría que hacer un riguroso proceso de selección de las nuevas variedades obtenidas.

### **1.5 Sistema de hipótesis**

La estandarización del protocolo de desinfección y germinación de semillas de piñón, y de los métodos de desinfección, inducción y multiplicación de brotes a partir de yemas apicales adultas, tienen éxito en las etapas iniciales de la micropropagación de plantas de *Jatropha curcas* mediante cultivo *in vitro*.