

DESARROLLO DE METODOS DE PROPAGACION CLONAL PARA LA DOMESTICACION DE *Jatropha curcas* L. EN MISIONES (ARGENTINA)

DEVELOPMENT OF CLONAL PROPAGATION TECHNIQUES FOR DOMESTICATION OF *Jatropha curcas* L. IN MISIONES ARGENTINA

Fernando Niella¹
Patricia Rocha¹
Beatriz Eibl¹
Marcos Radins²
Daniel Flor³
Soledad Facio²
Santiago Velazco²
Darío Brites⁵

Fecha de recepción: 02/11/2012
Fecha de aceptación: 20/12/2012

1. Docentes-Investigadores FCF-UNaM. Email: fniella@arnet.com.ar; lpv@facfor.unam.edu.ar; beibl@facfor.unam.edu.ar
2. Ing. Ftal. FCF-UNaM
3. Ing. Ftal. Alto Parana APSA
4. Estudiante Licenciatura en Genética UNaM
5. Ing. Ftal. Empresa Forestal Bosques del Plata SA

SUMMARY

In this paper we studied in vitro and ex vitro culture techniques for *Jatropha curcas* L vegetative propagation. Cloning of local varieties of this species will establish the basis for a domestication program of *Jatropha curcas* L in the province of Misiones. Using in vitro tissue culture techniques, it was obtained organogenic tissue induction in different explants grown on MS basal medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with BAP, TDZ KIN or in combination with AIB. Significant differences between nutrient media studied in the differentiation process were not observed, being able to be used MS, MS ½ or MS + CA with a high rate of differentiation. The rooting of apical sections obtained, from juvenile and adult stock plants, whose bases were treated with a solution of 70% ethanol for 10 seconds without IBA (TC1) showed, respectively, 75 and 45% rooting, significantly higher than the cuttings treated with IBA. Nevertheless, when the apical section cuttings received the treatment control with water (TC2), they showed significant differences between young and adult cuttings. A significantly higher rooting percentage was obtained when juvenile apical cuttings were used with no hormone application (TC2) (75±15%).

Key words: tissue culture, rooting cuttings, biofuels, plant growth regulators, ethanol.

RESUMEN

EL presente trabajo busca optimizar las técnicas de cultivo in vitro y enraizamiento de estacas para la propagación vegetativa de *Jatropha curcas* L. La clonación de variedades locales de esta especie permitirá establecer las bases para un programa de domesticación de *Jatropha curcas* L en la provincia de Misiones. Utilizando las técnicas generales de cultivo in vitro de tejidos vegetales, se observó que los medios inductivos estudiados afectaron en forma significativa la formación de tejido organogénico; obteniéndose la mayor frecuencia de inducción en explantos cultivados en el medio nutritivo básico de MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962) suplementado con BAP (6-Benzilaminopurina), KIN (Kinetina) o TDZ (Thidiazuron) en combinación con AIB (Acido Índole Butírico). No existieron diferencias

significativas entre los diferentes medios nutritivos utilizados en el proceso de diferenciación, pudiendo utilizarse tanto MS, MS ½ o MS + CA con una alta tasa de diferenciación. El enraizamiento de estacas apicales obtenidas de plantas madres juveniles y adultas, cuyas bases fueron tratadas con solución de etanol al 70%, por 10 segundos sin AIB (TC1), presentaron, respectivamente, un 75 y 45 % de enraizamiento, significativamente mayor a las estacas tratadas con AIB. Sin embargo, cuando las estacas de posición apical recibieron el tratamiento control con agua (TC2), demostraron diferencias significativas entre las estacas juveniles y adultas. El mayor porcentaje de enraizamiento se obtuvo en estacas de posición apical, juveniles, que recibieron tratamiento control con agua (TC2) (75±15%).

Palabras clave: cultivo de tejidos, enraizamiento de estacas, biocombustibles, reguladores de crecimiento, etanol.

INTRODUCCIÓN

Los biocombustibles de origen vegetal aparecen como una solución alternativa al problema energético a escala global y local. *Jatropha curcas* L se encuentra entre los vegetales identificados como potenciales para la generación de biodiesel. *Jatropha curcas* L es un arbusto perenne originario de Centroamérica de la familia Euforbiácea, introducido y naturalizado en distintos lugares del mundo como especie ampliamente valorizada por el aceite presente en sus semillas (llega hasta el 40 % de contenido de aceite) (JHA *et al.*, 2007), para la producción de biodiesel. El área de dispersión de *Jatropha* llega hasta Argentina, siendo Misiones, una de las provincias consideradas como óptimas para el cultivo de *Jatropha curcas* (FALASCA y ULBERICH, 2008). Las semillas de *Jatropha curcas*, son la fuente primaria de producción de aceite no comestible para la producción de biodiesel, son genéticamente heterocigotos y presenta un alto grado de variabilidad en el porcentaje de aceite extraíble, que va del 4 al 40% dentro de la especie (JHA *et al.*, 2007). La potencialidad de *Jatropha curcas* como fuente de biodiesel se verá enormemente favorecida si existe una técnica de propagación vegetativa que permita clonar aquellas variedades que posean un alto tenor de aceite extraíble en sus semillas. El presente trabajo describe los resultados de ensayos conducentes a la elaboración de una metodología para propagar clonalmente material genético selecto, y permitirá establecer las bases para iniciar un programa de domesticación de *Jatropha curcas*, en la provincia de Misiones.

Con el objetivo de generar en el mediano plazo, una metodología de propagación *in vitro* / *ex vitro* para *J. curcas*, factible de ser aplicado a escala comercial, se plantean los siguientes objetivos específicos: a) evaluar la respuesta al cultivo *in vitro* de germoplasma local de *Jatropha curcas* a partir de diferentes tipos de explantos (hojas, segmentos nodales, segmentos de hipocótilos y brotes apicales), y diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento; y b) evaluar la respuestas al cultivo *ex vitro* de germoplasma local de *Jatropha curcas* considerándose los siguientes factores: edad de la planta madre, modo de aplicación, concentración y tipo de regulador de crecimiento, y tipo de estaca (posición de la estaca en el brote).

MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se describen los materiales y métodos en forma separada para las técnicas de cultivo *in vitro* y *ex vitro*.

Ensayos in vitro

Ensayo 1: Inducción a la formación de tejido organogénico

Material Vegetal

Fuente de explantos

Para la obtención de los explantos se utilizaron plántulas de 30-60 días de *Jatropha curcas* germinadas *in vitro*.

Germinación in vitro de las semillas

Se utilizaron semillas maduras, cosechadas de plantas que crecen en áreas urbanas de la ciudad de Eldorado, Misiones, Argentina (Región subtropical del NE de Argentina con un régimen pluviométrico promedio de 2000 mm anuales, sin estación seca y temperatura media anual de 19 a 20°C. Riesgo de heladas de 0 a 10 días por año, esto es, días con temperaturas menores a 0°C). Para su desinfección, las semillas fueron previamente lavadas con agua corriente y detergente comercial. En cámara de flujo laminar, las semillas se sumergieron en etanol al 70 % durante 60 segundos y luego en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 20 minutos, con dos gotas de Tween 20, en agitación constante. Posteriormente, se realizó un triple enjuague con agua destilada estéril. Luego se procedió a la extracción manual de la cubierta seminal y una nueva desinfección con etanol al 70 % durante 10 segundos y con hipoclorito de sodio al 1 % por 15 minutos, en agitación constante. Finalmente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

Explantos

Los explantos utilizados consistieron en: segmentos de hojas de 0.2-0.5 cm², segmentos uninodales, segmentos de ápices de brotes y de raíces.

Medio nutritivo

Todos los tratamientos estudiados utilizaron el medio básico de MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962) suplementados con 30 g/l de sacarosa y 7 g/l de agar, pH=5.8, con diferentes combinaciones de tipo y concentraciones de reguladores de crecimiento.

Descripción de los tratamientos inductivos

Con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento, los explantes fueron cultivados en diferentes medios inductivos publicados para la especie mencionada (DEORE y JOHNSON, 2008; SUJATHA *et al.*, 2005; JHA *et al.*, 2007; MURALI *et al.*, 2008; y SHRIVATAVA y BANERJEE, 2008), que a continuación se describen:

M1: MS suplementado con 2.27 µM de TDZ (Thidiazuron), 2.22 µM de BA (6-Benzilaminopurina) y 0.49 µM de AIB (Acido Índole Butírico)

M2: MS suplementado con 23.2 µM de KIN

(Kinetina), 4.49 μ M de AIB

M3: MS suplementado con 9.3 μ M KIN

M4: MS suplementado con 4.5 μ M de TDZ

M5: MS suplementado con 0.44 μ M de BA

M6: MS suplementado con 13.2 μ M de BA, 4.4 μ M de AIB y suplementos orgánicos (Adenina, Glutamina, L-Arginina y ácido cítrico).

Condiciones de cultivo

Los explantos cultivados fueron mantenidos, por un periodo de 30 días, en cámara de cría con fotoperiodo (16 horas de luz) y temperatura controlada (24-28° C).

Ensayo 2: Diferenciación de brotes

Explantos: consistieron en porciones de aproximadamente 5 mm² de masas organogénicas obtenidas en el ensayo 1.

Descripción de los tratamientos de diferenciación:

MS: MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962), suplementados con 30 g/l de sacarosa y 7 g/l de agar, pH=5.8

MS1/2: consistió en la reducción a la mitad de la concentración de macro nutrientes descriptos en el medio nutritivo MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962), suplementados con 30 g/l de sacarosa y 7 g/l de agar, pH=5.8

MS+CA: MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962), suplementados con 30 g/l de sacarosa, 5g/l de carbón activado y 7 g/l de agar, pH=5.8

Condiciones de cultivo

Los explantos cultivados fueron mantenidos, por un periodo de 30 días, en cámara de cría con fotoperiodo (16 horas de luz) y temperatura controlada (24-28° C).

Diseño experimental y análisis estadístico

En todos los casos se utilizó un diseño completamente aleatorizado con un arreglo factorial de los tratamientos con 10 repeticiones por tratamiento, donde cada repetición consistió de 5 explantos. Los datos fueron analizados utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) y test de separación de medias (LSD). Las variables estudiadas incluyeron: frecuencia de explantos con presencia de tejido organogénico² y frecuencia de explantos con presencia de brotes. Los ensayos fueron evaluados a las 8-12 semanas del establecimiento.

Ensayos ex vitro

Material Vegetal

Plantas madres juveniles

Se utilizaron estacas obtenidas de plantas madres de 2 años de edad (originadas de semillas

cosechadas de plantas que crecen en áreas urbanas de la ciudad de Eldorado, Misiones, Argentina) criadas a pleno sol, con fertilización de base (liberación lenta Osmocote Plus® 15-8-12), con sustrato de corteza de pino compostada, criadas en contenedores de 10 litros a pleno sol, y riego por aspersión.

Plantas madres adultas

Se utilizaron estacas cosechadas en el mes de noviembre de plantas madres adultas, que crecen en áreas urbanas de la ciudad de Eldorado, Misiones, Argentina.

Cosecha y manejo de estacas

Los brotes obtenidos del rebrote de plantas madres juveniles en el mes de noviembre, tenían una longitud de 8 a 12cm, mientras que los brotes seleccionados de plantas adultas presentaron una longitud de 0.20 – 1 m. Las estacas fueron acondicionadas mediante un corte fresco de la base (horizontal) al tamaño final de 8-10 cm y posterior aplicación de un tratamiento de las bases con fungicidas CAPTAN® en polvo 20 gr/litro por 20 minutos y sellado de los ápices con cera estampada (a las estacas basales). Las estacas así acondicionadas fueron asignadas a los diferentes tratamientos inductivos.

Tratamientos

Edad de la planta madre:

J: estacas obtenidas de plantas madres juveniles

A: estacas obtenidas de plantas madres adulta

Posición de la estaca en el brote:

Ap: correspondiente a la porción apical del brote

Bs: correspondiente a la porción basal de la estaca, situada por debajo de la posición apical

Tratamientos inductivos:

T1: inmersión, por 10 segundos, de la base de la estaca en una solución de Ácido Índole Butírico (AIB) 15.000 ppm, disuelto en 70% de etanol.

T2: inmersión, por 24 horas, de la base de la estaca en una solución acuosa de 150 ppm de AIB

TC1: inmersión, por 10 segundos, de la base de la estaca en una solución 70% Etanol sin AIB.

TC2: Agua sin AIB.

Cultivo: Las estacas acondicionadas y tratadas, fueron insertadas en bandejas con arena como sustrato.

Diseño experimental y análisis estadístico

En todos los casos se utilizó un diseño completamente aleatorizado con un arreglo factorial de los tratamientos con 40 repeticiones (estacas) por tratamiento, la unidad experimental fue el conjunto de 40 estacas. Los datos fueron analizados utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) y test de separación de medias (LSD). Las variables consideradas para evaluar el efecto de los tratamientos fueron: porcentaje de estacas inducidas (con inicio emergencia de raíces primarias); porcentaje de estacas enraizadas; número de raíces primarias; número de raíces secundarias y presencia de raicillas.

² Tejido organogénico: masa indiferenciada de células presente en el explanto inducido

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos *in vitro*

Ensayo 1: Inducción a la formación de tejido organogénico

El cultivo de segmentos de hojas, nodales, apicales y de raíces, obtenidos de plántulas germinadas *in vitro* de *Jatropha curcas* de origen local, en diferentes medios de inductivos publicados para la especie mencionada (DEORE y JOHNSON, 2008; SUJATHA *et al.*, 2005; JHA *et al.* 2007; MURALI *et al.*, 2008; y SHRIVATAVA y BANERJEE, 2008), resulto en una respuesta diferencial para la inducción de tejido organogénico.

Los resultados obtenidos indican que los explantos de segmento de hojas cultivados en los medios nutritivos M1 (suplementado con TDZ, BA y AIB según DEORE y JOHNSON, 2008) y M2 (suplementado con KIN y AIB según SUJATHA *et al.*, 2005) generaron tejidos organogénicos presentando diferencias significativas (p-value: 0.0007) entre ellos, con una frecuencia de inducción de tejido organogénico de 60±5.5% y 100±0.0 % respectivamente. Mientras que en los explantos cultivados en los medios nutritivos M3 (suplementado con KIN según JHA *et al.* 2007), M4 (suplementado con TDZ según SUJATHA *et al.*, 2005), M5 (suplementado con BA según MURALI *et al.*, 2008) y M6 (suplementado con BA y AIB según SHRIVATAVA y BANERJEE, 2008), la frecuencia de inducción fue del 0%. En el caso del cultivo de segmentos nodales, los medios nutritivos M4 y M6 demostraron ser los indicados para la formación de tejidos organogénicos, no existiendo diferencias significativas (p-value: 0.0562) entre ellos, con una frecuencia de formación de tejido organogénico de

100±0.0 % y 90±8.4% respectivamente; observándose un 0% de frecuencia de inducción en los explantos cultivados en medio M1, M2, M3, y M5. En el caso de los brotes apicales, los medios nutritivos M1 y M2 demostraron formación de tejido organogénico existiendo diferencias significativas (p-value: 0.0004) entre ellos, obteniéndose una frecuencia de 100±0.0 % y 50±2.3 % respectivamente; los medios M3, M4, M5, y M6 no indujeron a la formación de tejido organogénico. Los segmentos de ápices de raíces no formaron tejido organogénico en ninguno de los medios inductivos (Tabla 1). Los segmentos de hojas, nodales y apicales cultivados en medios inductivos, que contenían IBA, sin considerar la citokinina utilizada, ya sea BAP o Kinetina, indujeron a la formación de tejido organogénico. Mientras que los mismos explantos cultivados en medios inductivos que contenían BAP o Kinetina, en ausencia de IBA no mostraron signos de formación de tejido organogénico. La presencia de TDZ en el medio inductivo, aun en ausencia de IBA, demostró ser adecuado para la inducción de tejido organogénico, mostrando mayor efecto inductivo en segmentos nodales y apicales que en segmentos de hojas Figura 1, resultados comparables a los obtenidos por SUJATHA *et al.* (2005) y DEORE y Johnson (2008). La capacidad inductiva del TDZ, en diferentes tipos de explantos en especies leñosas, ha sido previamente demostrada por varios autores (DEORE y JOHNSON (2008); HUETTEMAN y PREECE, 1993; y MENG *et al.*, 2004). El TDZ ha demostrado tener un efecto similar a las citokininas, además de actuar como regulador de los niveles endógenos de las auxinas (MURTHY *et al.* 1995), reafirmando el hecho de que en el presente ensayo, indujera a la formación de tejido organogénico aun en ausencia de IBA.

Tabla 1: Efecto del medio nutritivo, y tipo de explanto en la formación de tejido organogénico: Promedio ±Error estándar (Prom±ES), y Número de Repeticiones (N) para la variable porcentaje de explantos con tejido organogénico.

Table 1: Nutrient media and explant type effect on percentage of explant with organogenic tissue. Mean±Standard error, and replication number (N).

Medio inductivo	N	Segmento de hojas (Prom±ES)	Segmentos nodales (Prom±ES)	Brotes apicales (Prom±ES)	Segmento de ápices de raíces (Prom±ES)
M1	10	60±5.5b	0b	100±0.0a	0
M2	10	100±0.0a	0b	50±2.3b	0
M3	10	0c	0b	0c	0
M4	10	0c	100±0.0a	0c	0
M5	10	0c	0b	0c	0
M6	10	0c	90±8.4a	0c	0

M1: MS + TDZ + BAP + IBA (Deore, 2008); **M2:** MS + Kinetina + IBA (Sujatha, 2005); **M3:** MS + Kinetina (Bahran Jha, 2007); **M4:** MS + TDZ (Sujatha, 2005); **M5:** MS + BAP (Patente, Murali et al, 2008); y **M6:** MS + BAP + IBA + suplementos orgánicos (Shrivatava, 2007)

Ensayo 2: Diferenciación de brotes

En la diferenciación de los tejidos organogénicos generados en la fase inductiva (en segmentos apicales, nodales y de hojas), los medios de diferenciación utilizados resultaron adecuados para la diferenciación de brotes, no presentando diferencias significativas entre ellos, en las condiciones estudiadas (Tabla 2). Se observa en este ensayo, que no fue necesaria la aplicación de reguladores de crecimiento en el medio de diferenciación, y que el medio nutritivo MS es apropiado para la diferenciación de brotes (Figura 2).

Ensayos *ex vitro*

Los resultados presentados en este trabajo evidencian que, los tratamientos de inducción afectan significativamente el porcentaje de estacas enraizadas de *Jatropha curcas* L. Los resultados indicaron diferencia significativa entre los tratamientos inductivos, la edad de la planta madre y la posición de la estaca en el brote (p-value: 0.00562). En general las estacas obtenidas de plantas madres juveniles demostraron un mayor porcentaje de enraizamiento que las estacas adultas. El efecto de la edad de las estacas, en el porcentaje de estacas enraizadas, que se obtuvo en el presente ensayo, corrobora lo publicado por HARTMANN *et al.*, (2002); WELDT CARMONA, (2008); que las estacas herbáceas o semileñosas, por lo general, enraizan con mayor facilidad y rapidez que las estacas leñosas. Observándose, en estacas juveniles, un porcentaje de enraizamiento significativamente mayor (p-value: 0.00631) para estacas provenientes de la posición apical del brote, respecto a las de posición basal. En estacas adultas estas diferencias fueron no significativas, aun cuando la frecuencia de enraizamiento fue mayor en estacas de posición apical. Los tratamientos inductivos sin aplicación de IBA, tanto con agua, como con etanol indujeron un mayor porcentaje de enraizamiento que los tratamientos inductivos con IBA. Las estacas que fueron sometidas al tratamiento con IBA no superaron a las tratadas con el tratamiento control, por lo que se observa que difiere con los resultados

obtenidos por NOOR CAMELLIA *et al.* (2009), que expresa que al aumentar las concentraciones de IBA aumenta el porcentaje de enraizamiento. Por otra parte, el mayor porcentaje de inducción a la formación de raíces adventicias sin la aplicación de auxina, se contrapone a lo publicado por BLAZICH (1988) y MESÉN *et al.* (1995), que expresaban que la aplicación de auxinas generalmente aumenta el porcentaje de enraizamiento, y reduce el tiempo de iniciación de raíces. Si se puede corroborar que los niveles endógenos de auxinas son suficientes para sostener la formación de raíces en la estaca, y que la aplicación exógena de IBA pudo haber afectado negativamente la formación de raíces, en las condiciones ensayadas, coincidiendo con resultados publicados por (THETFORD Y BLAZICH, 1995; FRAMPTON *et al.* 1999; y ROCHA Y NIELLA, 2000- 2002, 2007 y 2011). Se observaron diferencias no significativas (p-value: 0.05663) para el tratamiento control con etanol (TC1) (Figura 3) en estacas de posición apical, obtenidas tanto de plantas madres juveniles como adultas ($64\pm 15\%$ y $45\pm 16\%$, respectivamente). Sin embargo, cuando las estacas de posición apical recibieron el tratamiento control con agua (TC2), demostraron diferencias significativas (p-value: 0.00058) entre las estacas juveniles y adultas ($75\pm 15\%$ y $25\pm 12\%$), respectivamente). El mayor porcentaje de enraizamiento se obtuvo en estacas de posición apical, juveniles, que recibieron tratamiento control con agua (TC2) ($75\pm 15\%$) (Figura 4). Respecto a la variable número de raíces primarias, si bien se observaron diferencias significativas entre los tratamientos inductivos, la edad de la planta madre y la posición de la estaca en el brote (p-value: 0.00667), el tratamiento con mayor número de raíces, correspondió a estacas juveniles, de posición apical y tratamiento inductivo con IBA 15000 ppm (11.09 ± 5.1 número de raíces promedio/estaca) (Figura 5). Para el resto de los tratamientos en los cuales se observó enraizamiento las diferencias fueron no significativas (p-value: 0.05219) entre ellos.

Tabla 2: Efecto del medio nutritivo en el porcentaje de diferenciación de brotes organogénicos. Promedio \pm Error estándar (Prom \pm ES), y número de repeticiones (N).

Tabla 2: Nutrient media effect on percentage of organogenic tissue differentiation. Mean \pm Standard Error, and replication number (N).

Medio de diferenciación	N	Porcentaje de diferenciación de brotes (Prom \pm ES)
MS	10	80 \pm 4.47
MS1/2	10	75 \pm 5.38
MS+CA	10	74 \pm 5.19

Tabla 3: Efecto de la edad de la planta madre, posición de la estaca y tratamiento inductivo en el porcentaje de enraizamiento (%ENRAIZ) y número de raíces primaria (N°RAICES PRIM.). Promedio \pm Error estándar (Prom \pm ES), y número de repeticiones (N).

Table 3: Stock plant age effect, cutting position and inductive treatment on rooted cuttings percentage (%ENRAIZ), and number of primary roots. Mean \pm Standard error and replication number (N).

Edad	Posición estaca	Tratamiento inductivo	N	%ENRAIZAMIENTO (Prom \pm ES)	No. RAICES PRIM (Prom \pm ES)
J	Ap	T1	40	36 \pm 15bc	11.09 \pm 5.1a
J	Bs	T1	40	0c	0c
J	Ap	T2	40	7 \pm 2.3b	8.7 \pm 2.3ab
J	Bs	T2	40	0c	0c
J	Ap	TC1	40	64 \pm 15ab	4.09 \pm 1.28b
J	Bs	TC1	40	20 \pm 14ab	3.70 \pm 3.21ab
J	Ap	TC2	40	75 \pm 15a	2.64 \pm 0.97b
J	Bs	TC2	40	30 \pm 8.9b	3.09 \pm 1.2b
A	Ap	T1	40	0c	0c
A	Bs	T1	40	0c	0c
A	Ap	T2	40	10 \pm 8.2b	2.7 \pm 1.8ab
A	Bs	T2	40	4 \pm 2.4b	0.91 \pm 0.91b
A	Ap	TC1	40	45 \pm 16ab	1.64 \pm 0.61b
A	Bs	TC1	40	18 \pm 14b	2.31 \pm 0.16b
A	Ap	TC2	40	25 \pm 12b	0.91 \pm 0.61b
A	Bs	TC2	40	9 \pm 9b	0.77 \pm 0.63b

J: estacas obtenidas de plantas madres juveniles juvenil.; **A:** estacas obtenidas de plantas madres adulta. **Ap:** correspondiente a la porción apical del brote.; **Bs:** correspondiente a la porción basal de la estaca, situada por debajo de la posición apical. **T1:** inmersión, por 10 segundos, de la base de la estaca en una solución de Ácido Indol Butirico (AIB) 15.000 ppm, disuelto en 70% de etanol; **T2:** inmersión, por 24 horas, de la base de la estaca en una solución acuosa de 150 ppm de IBA; **TC1:** inmersión, por 10 segundos, de la base de la estaca en una solución 70% Etanol sin IBA; **TC2:** Agua sin IBA.

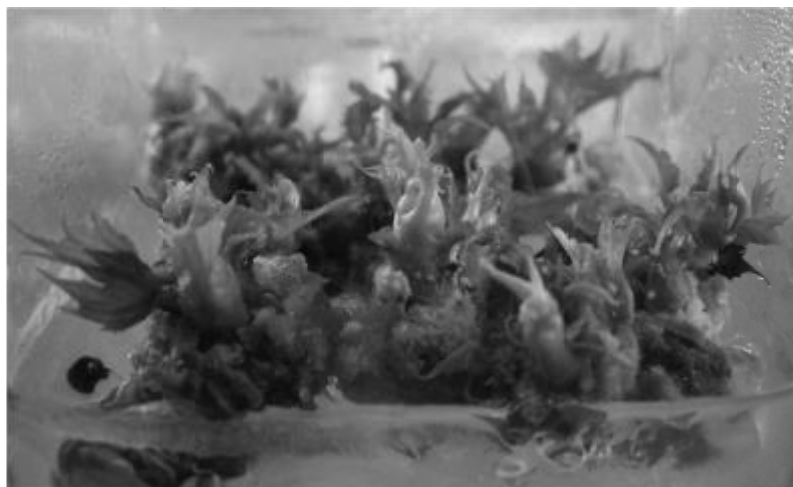


Figura 1: Inducción de tejido organogénico en segmentos nodales y apicales de *Jatropha curcas* en presencia de TDZ.

Figure 1: Induction of organogenic tissue in nodal and apical segments of *Jatropha curcas* in presence of TDZ.



Figura 2: Tejido organogénico proveniente de segmentos nodales y apicales en proceso de diferenciación de brotes en medio nutritivo MS (MURASHIGE y SKOOG, 1962) sin reguladores de crecimiento.

Figure 2: Organogenic tissue from nodal segments and apical shoot differentiation process in MS nutrient medium (Murashige and Skoog, 1962) without growth regulators.

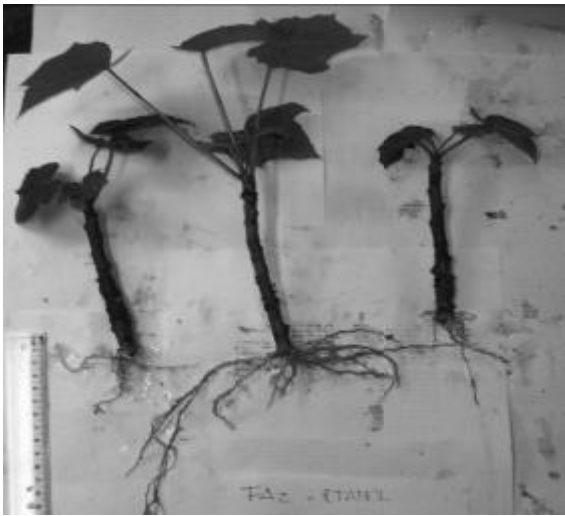


Figura 3: Estacas de posición apical enraizadas de *Jatropha curcas* en el tratamiento con etanol.
Figure 3: Apical position rooted cuttings of *Jatropha curcas* in ethanol treatment.



Figura 4: El mayor porcentaje de enraizamiento se obtuvo en estacas de posición apical, juveniles que se ven en la imagen y que recibieron el tratamiento control con agua (TC2) (75±15%).

Figure 4: The highest percentage of rooting was obtained in apical position and juveniles cuttings, juveniles under the control treatment with water (TC2) (75 ± 15%).



Figura 5: El tratamiento con mayor número de raíces, correspondió a estacas juveniles, de posición apical que se ven en la imagen, con tratamiento inductivo de IBA en una concentración de 15000 ppm (11.09±5.1 número de raíces promedio/estaca).

Figure 5: Highest number of roots in apical position and juvenile cuttings you see was obtained with an induction treatment of IBA at a concentration of 15,000 ppm (11.09 ± 5.1 average number of roots / cutting).

CONCLUSIONES

La combinación de reguladores de crecimiento en los medios inductivos utilizados para el cultivo in vitro de explantos juveniles de *Jatropha curcas* L. demostró tener un efecto significativo en la inducción de tejido organogénico, en función al tipo de explanto utilizado. Todos los medios de diferenciación estudiados en el sub-cultivo generaron la diferenciación de brotes y no mostraron diferencias significativas entre ellos.

El enraizamiento ex vitro fue factible tanto en estacas obtenidas de plantas madres juveniles como adultas, tratadas con solución de etanol (TC1) sin auxinas. El mayor porcentaje de enraizamiento se obtuvo en estacas juveniles de posición apical sin la necesidad de aplicación de reguladores de crecimiento.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado por la Secretaria General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Misiones Argentina (SGCyT UNaM - Convocatoria Especial 2007: Desarrollo Sostenible y Energía).

BIBLIOGRAFIA

- BLAZICH, F. A. 1988. Chemicals and formulations used to promote adventitious rooting. In: Davis, TD, Haissig, B E y Sankhla N (eds) *Adventitious Root Formation in Cuttings*, Portland, Oregon. BE Dioscorides Press, pp 132-149.
- DEORE, A. y Johnson S. 2008. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnol Rep.*
- FALASCA, S., Ulberich, A. (2008). Potencialidad bioenergética sudamericana a partir de forestaciones con *Jatropha* sp. (*J. curcas*, *hieronymi* y *macrocarpa*). *Revista Virtual REDESMA*. Julio 2008.
- FRAMPTON, J. Goldfarb, B. and Surles, S. 1999. Nursery rooting and growth of loblolly pine cuttings: effects of rooting solutions and full sib family. *South J. Appl. For.* 23 (2): 108-115.
- HARTMANN, H., Kester, D., Davies, F. y Geneve, R. 2002. *Plant Propagation. Principles and Practices*. New Jersey, Estados Unidos. Prentice Hall. 880p.
- HUETTEMAN, C., J Preece. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 33:105-119.
- JHA T.B. ; Mukherjee P. y Manjari Datta M. 2007. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn. , and important biofuel plant. *Plant Biotechnology Report* 1:135-140.
- MENG, R.; T.Chen; F. Ce.; y Y Li. 2004. Improving in vitro plant regeneration from leaf and petiole explant of 'Marion' blackberry. *Hort. Sci.* 39:316-320.
- MESÉN, F.; Leakey, R; y Newton A. C. 1995. Propagadores de subirrigación: un sistema simple y económico para la propagación vegetativa de especies forestales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). *Memorias Del Simposio, Avances en la producción de Semillas Forestales en América Latina*. Editor Técnico Rodolfo Salazar. Managua, Nicaragua.
- MURASHIGE, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum.* 15:473-497.
- MURALI, K.; P. Patil, y G. Maurya. 2008. Commercially viable process for in vitro mass cultura of *Jatropha curcas*. United State Patent Application#20080196121.
- MURTHY, B.; S. Murch; y P.Saxena. 1995. TDZ-induced somatic embryogenesis in geranium cotyledonary cultures. *Plant Cell Rep.* 15:423-426.
- NIELLA, F.; Rocha, P.; Eibl, B.; Radins, M.; Flor, D., Facio, S. y Velazco, S. 2011. Opción para un desarrollo sustentable y eficiente de biocombustibles en la provincia de Misiones: Propagación clonal de variedades locales de *Jatropha curcas*. 1º Encuentro de exposición de proyectos de investigación-UNaMTEC-SGCyT. 13 de abril 2011. UNaM- SGCyT, Posadas, Misiones, p 27-28
- NOOR CAMELLIA, N.A., Thohirah, L.A., N.A.P Abdullah, and Mohd Khidir, O. 2009. Improvement on Rooting Quality of *Jatropha curcas* Using Indole Butyric Acid (IBA), entrada 2009, consultado el 23 de marzo de 2011. URL: <http://www.aensionline.com/rjabs/rjabs/2009/338-343.pdf>.
- ROCHA, P y Niella, F. 2000. Informe técnico: Presentación de avance en técnicas de propagación vegetativa para *Pinus taeda* y *Pinus elliottii x caribaea*. Presentado en: Seminario interno Abril
- FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES. Universidad Nacional de Misiones. Eldorado, Misiones. 2000. Circulación interna 63 p.
- ROCHA, P y Niella, F. 2002. Efectos de tratamientos inductivos en el enraizamiento de estacas de *Pinus elliottii x caribaea* y *Pinus taeda*. 9na Jornadas Técnicas Forestales. Mayo 15-17, 2002. FCF UNaM-INTA-ME yRNR y T- Eldorado, Misiones- Argentina.
- ROCHA, P y Niella, F. 2007. Efectos del tratamiento inductivo en el enraizamiento de estacas de *Araucaria angustifolia* (Bert.)O. Ktze, *Myrocarpus frondosus* fr. All, y *Balfourodendron riedelianum* (Engl). *Revista Forestal Yvyraretá* 14: (2007) 41-46
- SUJATHA M., H.P.S. Makkar, and Becker K

- (2005). Shoot bud proliferation from axillaries nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. *Plant growth regulation* . 47:83-90.
- SHRIVATAVA, S. y Banerjee,M. 2008. In vitro clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L). IJIB, Vol. 3, No. 1, 73-79.
- THETFORD, M. y Blazich, F. 1995. Comparison of IBA and P-IPB for propagation of Loblolly pine stems cuttings. SNA Research Conference- Vol. 40: 269-271
- WELDT CARMONA E. S. 2008. Establecimiento, multiplicación y enraizamiento in vitro de Rosa canina L. Tesis Lic. Agronomía. Universidad Austral de Chile, Escuela de Agronomía. 62p