

# Cultivo in vitro de tempate (*Jatropha curcas*)

Jenny Muñoz Valverde <sup>1</sup>  
Karla Valerín Berrocal <sup>2</sup>  
Silvana Alvarenga Venutolo <sup>3</sup>  
Elizabeth Alán Fonseca <sup>4</sup>

*Jatropha curcas* es una especie de la familia Euphorbiaceae, nativa de América tropical. Se conoce comúnmente como tempate o tampate, coquillo o coquito. (Burger y Huft, 1995).

## Palabras clave

Tempate, cultivo de tejidos, callogénesis.

## Resumen

*J. curcas* es una especie de importancia medicinal. Las hojas, la corteza y la semilla han sido utilizadas popularmente para aliviar inflamaciones, para el combate de hongos y como agentes antimicrobianos. Se emplea en la industria de fabricación de tintas y colorantes por sus propiedades como astringente y como fuente de aceite. Esta variedad de usos se debe a la presencia de diversos compuestos como enzimas proteolíticas, presurores de hormonas esteroidales, alcaloides, taninos y flavonoides.

El trabajo de investigación consistió en establecer el protocolo de cultivo *in vitro* de embriones de *Jatropha curcas* y la propagación masiva *in vitro* de las

microestacas producidas de la germinación *in vitro*. El medio de cultivo empleado fue el de las sales y vitaminas M&S (1962), con 3% de sacarosa. La adición de reguladores en el medio indujo la formación de callo y variación somaclonal. Se inocularon segmentos de hoja en un medio de cultivo que contenía el 50% de las sales de M & S (1962), complementado con las vitaminas de Morel (1958), 2mg/L de AIB, y 1% de sacarosa, se colocaron en la oscuridad y se obtuvieron callos friables efectivos para el establecimiento de suspensiones.

## Introducción

*Jatropha curcas* es una especie de la familia Euphorbiaceae, nativa de América tropical. Se conoce comúnmente como tempate o tampate, coquillo o coquito. (Burger y Huft, 1995).

1 Escuela de Biología. Universidad de Costa Rica. [jmunoz@biologia.ucr.ac.cr](mailto:jmunoz@biologia.ucr.ac.cr).

2 DP y L Semilla Delta Land. [kvalerin@costarricense.cr](mailto:kvalerin@costarricense.cr).

3 Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. [salvarenga@itcr.ac.cr](mailto:salvarenga@itcr.ac.cr).

4 Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. [ealan@itcr.ac.cr](mailto:ealan@itcr.ac.cr).

Es un arbusto que crece entre 1,5 y 5 metros de altura. Presenta una savia viscosa, lechosa o rojiza. Con tallos frondosos, glabros o levemente pubescentes, con estípulas, hojas deciduas, alternas o en grupos terminales. Produce inflorescencias de color amarillento o blanco. Las flores son acampanadas y unisexuales, pero las flores femeninas y masculinas están juntas, los frutos son cápsulas elipsoides, algo carnosos. Presentan semillas oblongas de color negruzco con ranuras longitudinales diminutas, ricas en aceite. El sistema radical es pivotante (Jones y Miller, 1996).

Crece en el bosque caduco en regiones muy secas y se cultiva desde los 5 a los 1.000 m de elevación, para la producción óptima requiere entre 900 y 1.200 milímetros de precipitación anual. Tolerancia temperaturas de entre 18 y 28,5 °C. Florece y fructifica de mayo hasta

setiembre. Es muy resistente a la sequía. (Jones y Miller, 1996). Se puede propagar en forma natural por semillas o por estacas. (House *et al.*, 1995). Se distribuye en Centroamérica a lo largo del Pacífico seco (Burger y Huft, 1995). En Costa Rica se encuentra en Guanacaste y en el Pacífico Central, en las provincias de Alajuela y Puntarenas (INBIO, 2001).

En el Cuadro 1 se detallan los compuestos producidos en diferentes partes de la planta, sus usos medicinales y mecanismos de acción. *J. curcas* ha despertado interés debido a la alta producción de aceite a partir de la semilla que se considera como sustituto potencial del petróleo, que puede usarse como combustible para motores diesel (Jones y Miller, 1996). También puede utilizarse como aceite comestible después de su detoxificación y en la elaboración de velas, jabones y cosméticos (Mittelbach

**Cuadro 1**  
**Compuestos activos de interés, localización en la planta de *J. curcas* y uso.**

Compuesto	Localización en la planta	Uso
Alcaloides	Corteza	Medicinales. Actúan sobre el sistema nervioso y constituyen materias primas para medicamentos.
Beta-sitosterol, Estigmaesterol y campesterol	Hojas	Poliesteroles antiinflamatorios, regulan los ciclos menstruales, tienen efectos anticonceptivos e inhiben cánceres femeninos.
Curcaina	Látex	Enzima proteolítica que destruye proteínas, tiene propiedades antimicrobianas contra <i>Candida albicans</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .
Fenoles simples	Hojas	Medicinales e industriales. Poseen actividad antifúngica y desinfectante.
Flavonoides	Hojas	Compuestos fenólicos antioxidantes, con propiedades antialérgicas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antivirales y anticancerígenas, su consumo elevado reduce el riesgo de cáncer pulmonar.
Jatropina	Hojas	Alcaloide que tiene actividad antiinflamatoria y diurética
Saponinas	Hojas	Medicinales e industriales. Precursores de hormonas esteroidales y corticosteroides. Por su actividad tensoactiva son útiles como emulgentes y hemolizantes.
Taninos	Hojas y corteza	Propiedades astringentes, antisépticas y cicatrizantes. Útiles en la fabricación de tintas y otros colorantes para curtir pieles.
Vitexina	Hojas	Flavonoide, se considera como anti ulceroso

El proyecto se llevó a cabo en los laboratorios del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) de la Escuela de Biología en el Instituto Tecnológico de Costa Rica.

et al., 1997). Por el efecto tóxico de la semilla puede usarse como insecticida, raticida y contra babosas.

La industria farmacéutica emplea las hojas como fuente de Beta-sitosterol, estigamesterol y campesterol, para la fabricación de medicamentos anticonceptivos, antiinflamatorios e inhibidores de cáncer femenino.

Esta planta puede ser tóxica. La corteza, fruta, hoja, raíz y madera contienen HCN (Duque, 1983). La ingestión de cinco semillas altera la respiración y la circulación sanguínea; más de 20 semillas pueden provocar un estado de coma, inclusive la muerte; se conoce por su capacidad abortiva (House et al., 1995).

La micropropagación de esta especie es importante para la obtención de un mayor número de individuos sanos en menor tiempo, el establecimiento de suspensiones celulares y el análisis de sustancias activas. Con este trabajo se pretende establecer el protocolo del cultivo *in vitro* para la propagación masiva a partir del cultivo de embriones sexuales.

## Metodología

El proyecto se llevó a cabo en los laboratorios del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) de la Escuela de Biología en el Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Las semillas de *J. curcas* se colectaron en Tempate de Santa Cruz, Guanacaste. Estas se conservaron en refrigeración (5° C) para posteriormente ser utilizadas en el cultivo *in vitro*.

La desinfección se efectuó lavando las semillas con agua y jabón líquido utilizando un cepillo. Posteriormente se sumergieron en alcohol de 70° durante 10 minutos. Se llevaron a la cámara de flujo laminar y se flamearon cada una por separado con ayuda de pinzas largas,

utilizando alcohol de 95°. Las semillas se colocaron en un plato Petri estéril hasta que la llama se consumió. Se eliminó la testa con pinzas y un bisturí que se introdujo lejos del embrión, para evitar dañarlo (Figs. 1 y 2). Una vez eliminada la cubierta seminal, se procedió a la extracción del embrión partiendo el endospermo a la mitad con un corte longitudinal y sin tocar el embrión. Se extrajo el embrión con cuidado de no eliminar las hojas



Figura 1  
Semillas de *Jatropha curcas*

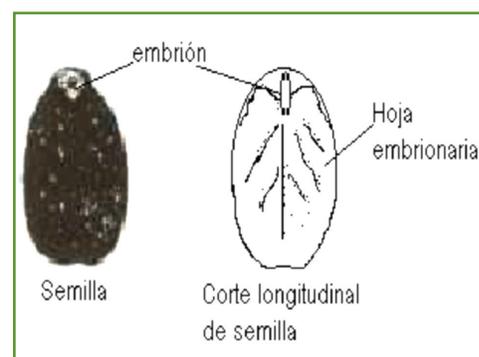


Figura 2  
Semillas de *J. curcas* (izquierda) y corte longitudinal de semillas (derecha)

embrionarias, las que seguidamente se cortaron a la mitad.

Los embriones se inocularon en un medio suplementado con las sales y vitaminas de Murashige & Skoog (1962), 2g/L de Phyta-Gel y un 3% de sacarosa. A este medio de cultivo se agregaron diferentes concentraciones de giberelinas y citocininas, como se señala en el Cuadro 2. Se introdujeron 30 embriones por tratamiento

Las vitroplantas obtenidas mediante el cultivo de embriones se utilizaron en los ensayos de multiplicación. De cada individuo se obtuvieron de 1 a 3 microestacas. Se seccionaron en microestacas de aproximadamente 1,5 cm de largo con dos yemas y una hojas cada una.

Después de dos semanas de cultivo, el 10% del material se contaminó con bacteria endógena. Los embriones que no sufrieron contaminación, germinaron y se desarrollaron.

Las microestacas se sembraron en un medio de cultivo con las sales y vitaminas de Murashige & Skoog (1962), 2g/L de Phyta-Gel y un 3% de sacarosa. A este medio de cultivo se agregaron giberelinas y citocininas, en las concentraciones señaladas en el Cuadro 3. Se inocularon 30 microestacas por tratamiento.

### Inducción a la callogénesis

Se siguió el protocolo establecido por Alvarenga, Alan y Peraza, 2002, en la inducción de callo de *Uncaria tomentosa* (uña de gato). Se inocularon segmentos de hoja en el medio que contenía los macroelementos M&S (1962) al 50%, vitaminas de Morel, 2mg/L de Ácido Indol Butírico (AIB), 10g/L de sacarosa y 2g de Phytigel. Los explantes se sometieron a luz directa, luz difusa y oscuridad. Después de la obtención de los callos a partir de los diferentes tratamientos, se realizó un análisis citológico para describir el tipo de células presentes.

## Resultados y discusión

### Cultivo de embriones

Después de dos semanas de cultivo, el 10% del material se contaminó con bacteria endógena. Los embriones que no sufrieron contaminación, germinaron y se desarrollaron. El mayor porcentaje de embriones en desarrollo se obtuvo en el medio de cultivo con las sales de M & S (1962) complementado con 1mg/L de BA (tratamiento 2).

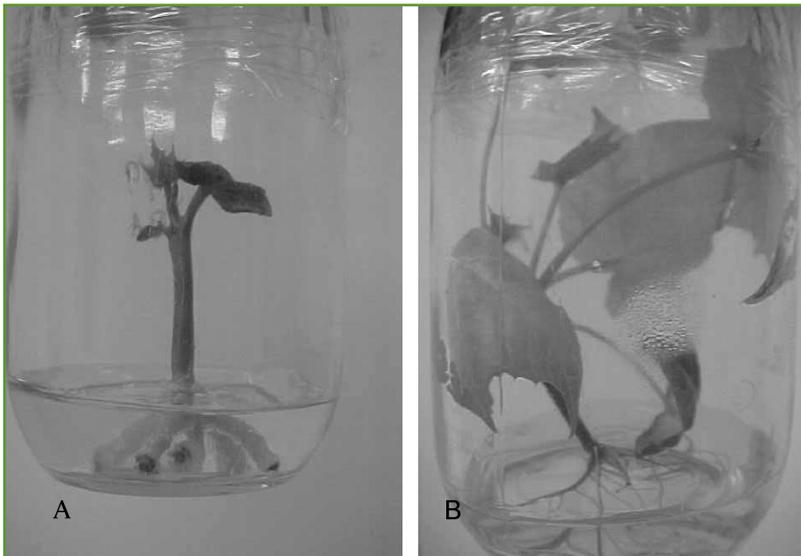
En los individuos inoculados en el tratamiento 2, se pudo observar un crecimiento de aproximadamente 2 cm de largo en el tallo, al cabo de una semana. Además presentaban raíces bastante gruesas con una longitud similar a la del tallo. A las dos semanas de la germinación las raíces formaron un callo en el extremo distal y en la base del explante. Una vez que se formó el callo,

**Cuadro 2**  
Tratamientos utilizados en el cultivo de embriones de *Jatropha curcas*

Reguladores del crecimiento	Tratamiento			Testigo
	1	2	3	
AG <sub>3</sub>	1 mg/L	—	0,5mg/L	—
BA	—	1mg/L	0,1mg/L	—

**Cuadro 3**  
Tratamientos utilizados en la micropropagación de *Jatropha curcas*.

Reguladores del crecimiento	Tratamiento		Testigo
	I	II	
AG <sub>3</sub>	0,5 mg/L	0,5mg/L	—
BA	2 mg/L	1,5 mg/L	—



**Figura 3**

**A) Embrión inoculado en el medio de cultivo complementado con 1mg/L de BA. Se observa la formación de un callo en la base de la raíz. B) Embrión con desarrollo normal en medio M & S (1962)**

su crecimiento fue muy pobre (Fig. 3.A). Por el contrario, los individuos inoculados en el medio M & S (1962), sin reguladores, no formaron callo y presentaron un crecimiento normal, con raíces más delgadas y largas (Fig. 3 B).

Cuanto más tiempo se mantuvieron las semillas en almacenamiento, aumentó el porcentaje de contaminación de los embriones y se redujo el número de individuos con crecimiento normal.

Al comparar las plantas que crecieron en el medio de cultivo al que se adicionó 1mg/L de  $AG_3$ , se pudo apreciar mayor elongación del tallo, sin embargo, las vitroplantas presentaban un bajo número de nudos (2 yemas por individuo aproximadamente). En el medio de crecimiento sin reguladores, este fue más lento pero con mayor número de nudos (de 2 a 3 nudos aproximadamente 4 a 7 yemas por individuo). Debido probablemente a la acción del  $AG_3$ , se ha informado que las giberelinas propician la elongación del tallo por inducción de la división y elongación

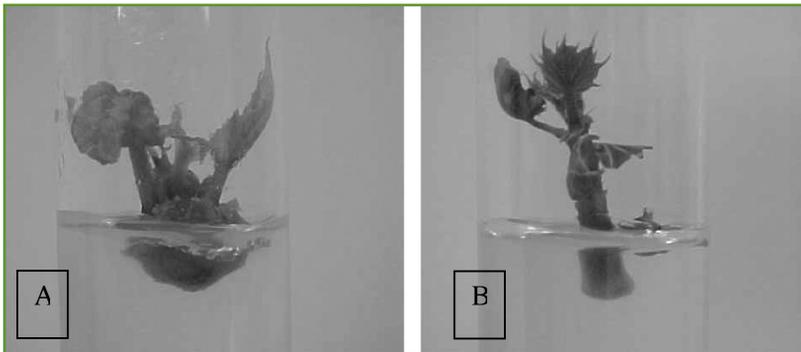
celular (Villeg, 1996), lo que probablemente provocó un acelerado crecimiento de las plántulas y una mayor longitud de los entrenudos, en comparación con los individuos que se inocularon en medio M&S (1962) simple. Por otra parte, en los medios de cultivo que contenían reguladores de crecimiento, se produjo la formación de un callo en la base de la plántula.

### **Multiplicación *in vitro***

El medio de cultivo más efectivo para la multiplicación *in vitro* fue el M & S (1962), sin reguladores de crecimiento. A las pocas días de la inoculación se observó la regeneración de las vitroplantas. La formación de raíz se obtuvo al cabo de 30 días de multiplicado el material.

Se determinó que el regulador del crecimiento Benciladenina (BA), fomenta la formación de callo en *Jatropha curcas*. Según Solomon *et al.*, (1998) en el cultivo de tejidos de tabaco el empleo de una dosis de auxina alta (2mg/L) y de citocinina baja (0,2 mg/L) favorece la formación de callo. En este caso, la posible presencia de auxinas endógenas en los tejidos de *Jatropha curcas* al entrar en contacto con la BA añadida al medio de cultivo, posiblemente incidió en la formación y crecimiento de callo.

La formación de callo en algunos explantes produjo cambios en la forma y color de las hojas y un acelerado desarrollo de yemas (Figura 4); muchas veces la formación de callos a partir de tejidos somáticos y la diferenciación posterior de plantas a partir de estos, puede ocasionar variabilidad genética. Esta se produce debido a que los tejidos de la planta, al cultivarse *in vitro*, manifiestan como producto del mosaico cromosómico que poseen, una alta frecuencia de variación, que da como resultado plántulas con características diferentes a las de la planta de donde se tomó el material de propagación (Arias *et*



**Figura 4**  
**Ensayo de multiplicación. A) Formación de callo en la base de la microestaca inoculada en medio con BA. B) Microestaca inoculada en medio M&S simple (no presenta callo)**



**Figura 5**  
**Calogénesis en hoja expuesta a luz directa, en medio M & S (1962) con 2 mg/L de AIB.**

*al.*, 1987). El aumento en el número de brotes en el caso de los individuos que formaron callo, podría atribuirse a que las citocininas se han citado como promotores del crecimiento de yemas laterales, limitando la dominancia apical (Solomon *et al.*, 1998).

### Inducción de la calogénesis

El inicio del desarrollo del callo se observó a los 5 días de establecido el cultivo. Se obtuvieron callos con diferentes características morfológicas (Fig. 5) y microscópicas (Cuadro 4), a partir de hojas de plantas cultivadas in vitro de *Jatropha curcas*.

Según García *et al.* (1987), un análisis microscópico de secciones de hojas de café, sometidas a la acción de sustancias de crecimiento, reveló que el callo se origina a partir del mesófilo esponjoso y la proliferación de este tejido ocasiona posteriormente la desorganización del parénquima empalizada y luego ocurre una ruptura de la epidermis. Es por ello que cuando se hizo este tipo de análisis en callos obtenidos de hojas de *Jatropha curcas* se pudo observar partes de tejido del mesófilo como, por ejemplo, las células tubulares.

**Cuadro 4**

#### **Análisis macroscópico y microscópico de los callos obtenidos a partir de secciones de hoja de *Jatropha curcas***

Observación	Desarrollo en oscuridad	Desarrollo en luz difusa	Desarrollo en luz
Macroscópicas	Callos friables: se podían separar fácilmente, de color blanco.	Callos friables y callos compactos de color verde claro.	Callos compactos: muy duros y difíciles de separar, de color verde oscuro.
Microscópicas a un aumento de 40 X	Presencia de células tubulares con menor cantidad de cloroplastos. Células meristemáticas pequeñas, con menor cantidad de cloroplastos.	Presencia de células tubulares con mayor cantidad de cloroplastos. Células meristemáticas pequeñas, con mayor cantidad de cloroplastos	Presencia de células tubulares con mayor proliferación de cloroplastos. Células meristemáticas pequeñas, con mayor cantidad de cloroplastos.

Para la inducción de callo se usan medios de cultivos con auxinas como el Ácido Indol Butírico (AIB). Se ha reportado que si se desea inducir a callo en un medio que no contenga auxinas, la producción de callo es casi nula o muy baja, pero si se incrementa la concentración de auxinas se podría incrementar la producción de callo (García *et al.*, 1987).

Según el cuadro 4, el mejor tratamiento para establecer un ensayo de suspensiones celulares en esta especie, fue el que propició el desarrollo de callo en la oscuridad, debido a que se obtienen callos friables, lo que permite una buena separación de las células (Cuadro 4).

### Conclusiones

- El medio de cultivo M&S (1962), sin reguladores de crecimiento y con 3% de sacarosa, fue el óptimo para el cultivo de embriones *in vitro* de *J. curcas*.
- Aunque la literatura reporta que el AG<sub>3</sub> promueve la enlongación en los tallos, en este ensayo con *J. curcas* se favoreció la formación de callo.
- Los resultados obtenidos coinciden con lo que indica Solomon *et al.*, (1998) acerca de que la Benciladenina (BA) utilizada en el medio de cultivo induce a callogénesis y fomenta la formación y el crecimiento de brotes laterales.
- Los tejidos de *Jatropha curcas* son muy sensibles a la formación de callo, la presencia de concentraciones bajas de reguladores en el medio de cultivo o tejidos dañados indujeron a callogénesis. Este proceso morfológico requiere de mayor seguimiento.
- El cultivo de segmentos de hoja en un medio que contiene el 50% de las sales de M & S(1962), complementado con las vitaminas de Morel (1958), 2mg/L de AIB, y 1% de sacarosa e incubado en condiciones de oscuridad produjo el desarrollo de callos friables.

### Agradecimiento

Este proyecto fue apoyado y financiado por el Fondo de Proyectos Estudiantiles de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

### Bibliografía

- Alvarenga, S., Alan, E., Peraza, J. 2002. *Estudio de la Biología, la propagación y el cultivo in vitro de Uncaria tomentosa (uña de gato). Informe Final.* Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 89p.
- Arias, O y Villalobos, I. 1987. *Inducción y multiplicación de callos in vitro en tres cultivares comerciales de caña de azúcar (Saccharum spp).* Agronomía Costarricense 11 (1): 39-44.
- Burger, W and Huft, M. 1995. "Flora costarricensis: Family # 113: Euphorbiaceae". Fieldiana: Botany . Field Museum of Natural History: USA. 165p.
- Duque, J. 1983. "*Jatropha curcas* L." <<http://www.tropilab.com/jatropha-cur.html>> (7/10/2000).
- House, P.; Lagos, S.; Mejia, T.; Ochoa, L.; Torres, C y Rivas, M. 1995. *Plantas Medicinales Comunes de Honduras.* Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Litografía López S. De R.L. Tegucigalpa Honduras. p: 234 – 235.
- INBIO (Instituto Nacional de Biodiversidad). 2001. "Lista de especímenes de *J. curcas*". <<http://www.inbio.ac.cr/bims/k03/p13/c045/o0129/f01640/g007652/s022805.htm>>. (25/03/2001)
- Jones, N and Miller, J. 1996. "*Jatropha curcas, a Multipurpose Species for Problematic Sites*". Land Resources Series, No 1. The World Bank Asia Technical Department Agriculture Division. 38p.
- Mittelbach, M.; Trabi, M. 1997. "Biofuels and Industrial Products from *Jatropha curcas*". <<http://www.biodiesel.at/references.html>> (7-12-2000)
- Murashige, T. And Skoog, F. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Solomon, E y Vilee, C. 1998. *Biología.* 3ed. Interamericana McGraw Hill. México D.F. 1305p.
- Vilee, C. 1996. *Biología.* 8ed. McGraw Hill. México, D. F., Mexico. 994p.