

EFECTO DEL NaClO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA POLIFENOL OXIDASA EN EXPLANTES DE HOJA Y PECIOLO DE DOS GENOTIPOS DE *Jatropha curcas* L.

Iván Pequeño-Granado¹, Guillermo Martínez-Ávila², Víctor Aguirre-Arzola², Leobardo Iracheta-Donjuan³, Virgilio Mojica-Marín⁴, Gilberto Rodríguez-Pérez⁵ y María Ojeda-Zacarías¹

RESUMEN

La implementación del cultivo de tejidos vegetales de *Jatropha curcas* enfrenta importantes problemas como es el oscurecimiento producido por la oxidación fenólica. Por tal razón, es necesario el desarrollo de una metodología rápida para la comparación de tratamientos que puedan controlar el oscurecimiento de los tejidos vegetales. La determinación de la actividad de la enzima polifenol oxidasa (PPO) puede ser utilizada con este fin, debido a la asociación que existe entre el oscurecimiento y la actividad de esta enzima en *J. curcas*. En la presente investigación se analizó el efecto del agente desinfectante hipoclorito de sodio (NaClO) sobre la actividad de la enzima PPO en explantes de hoja y peciolo en los genotipos INI-3 y INI-6 de esta especie. Los resultados mostraron que el NaClO al 3,24 % ocasionó el aumento en la actividad de la PPO en hojas y pecíolos de ambos genotipos, lo que indica que este desinfectante es causante indirecto del oscurecimiento de los tejidos de la planta. Además se encontraron diferencias significativas en la actividad de la PPO entre explantes y entre genotipos.

Palabras clave adicionales: Desinfección superficial, *in vitro*, oscurecimiento, PPO

ABSTRACT

NaClO effect on polyphenol oxidase activity in leaf and petiole explants of two of *Jatropha curcas* L. genotypes

The implementation of plant tissue culture of *Jatropha curcas* encounters many problems such as the browning caused by phenolic oxidation. Therefore, a rapid methodology for comparison of treatments that can prevent this oxidation of the plant tissue is required. The determination of the enzyme polyphenol oxidase (PPO) activity could be used for this purpose due to the association between browning and the activity of the enzyme in *J. curcas*. In the present investigation the effect of sodium hypochlorite (NaClO) as a disinfecting agent on PPO enzyme activity in leaf and petiole explants of INI-3 and INI-6 genotypes of the species was evaluated. The results showed that the NaClO caused an increase in the PPO activity of leaves and petioles in both genotypes, thus indicating that the disinfectant is an indirect agent that can promote tissue browning in the plant. In addition, significant differences of PPO activity were found in both explant types and genotypes.

Additional key words: Browning, *in vitro*, PPO, surface disinfection

INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta de la biotecnología, comúnmente

utilizada en estudios de mejoramiento de plantas, producción de metabolitos secundarios, transformación genética y propagación clonal (Bhojwani y Dantu, 2013). No obstante, la

Recibido: Febrero 13, 2015

Aceptado: Agosto 31, 2015

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. C.P. 66700. Marín, Nuevo León, México.

² Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía.. C.P. 66050. Escobedo, Nuevo León, México.

³ Instituto Nacional Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Rosario Izapa. C.P. 30870. Chiapas, México.

⁴ Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas. Durango, Durango, México.

⁵ Instituto Tecnológico de Roque. C.P. 38110. Roque Celaya, Guanajuato, México.

implementación de esta herramienta presenta importantes problemas como la contaminación microbiana (Hernández y González, 2010), la cual puede producir cuantiosas pérdidas de material, tanto en los trabajos de investigación como en la micropropagación comercial a causa del desarrollo de microorganismos patógenos y no patógenos que crecen rápidamente en medios de cultivo e infestan el material vegetal de crecimiento lento (Cassells, 2011). Debido a esto, es preponderante llevar a cabo la desinfección de tejidos vegetales para su establecimiento *in vitro*.

Uno de los métodos más empleados para el control de la contaminación microbiana en cultivo de tejidos vegetales consiste en la inmersión de los explantes en etanol, seguido de una inmersión en NaClO de 1 a 3 % (Mroginski et al., 2010). Sin embargo, este procedimiento que puede ocasionar daño a los tejidos vegetales. Por otro lado, en numerosas plantas, principalmente en especies leñosas, los explantes liberan fenoles dentro del medio de cultivo que se oxidan desarrollándose una tonalidad oscura o marrón en los tejidos y perjudicando su crecimiento en el cultivo *in vitro* (De Filippis, 2014).

La oxidación fenólica en el cultivo de tejidos es causada por la acción de la enzima polifenol oxidasa (PPO) que se libera o sintetiza cuando los tejidos sufren lesiones (Azofeifa, 2009). Los tejidos seleccionados para el cultivo *in vitro* sufren lesiones principalmente en la extirpación y desinfección del explante, donde ambas prácticas son un factor importante sobre el oscurecimiento, y por lo tanto en la tasa de supervivencia del material (Tabiyeh et al., 2006; Chien-Ying et al., 2009).

La enzima PPO ocasiona oscurecimiento en *J. curcas* L., debido a que cataliza la reacción entre variados compuestos fenólicos y oxígeno molecular para producir quinonas (He et al., 2009), las cuales pueden inhibir el crecimiento e incluso causar la muerte celular de explantes. Por lo anterior, el presente estudio tuvo por objetivo analizar el efecto del NaClO sobre la actividad enzimática de la PPO en explantes de hojas y

pecíolos de dos genotipos de *J. curcas* L., una planta de la familia Euphorbiaceae utilizada como medicinal y cuyas semillas contienen un aceite no comestible que se utiliza como biocombustible en motores diesel.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL), Marín, N.L. México, durante el periodo de agosto-septiembre de 2014. El material vegetal se colectó en la FAUANL de árboles en campo de *J. curcas*, proporcionados por el banco de germoplasma de *J. curcas* del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Rosario Izapa, ubicada en el municipio Tuxtla Chico, estado de Chiapas, México.

La desinfección consistió en la selección de hojas y pecíolos del tercer nudo a partir de la yema terminal de manera descendente hacia la base del tallo recolectados de árboles establecidos en campo en condiciones óptimas de saneamiento. El material vegetal fue lavado en una solución de jabón líquido y agua potable, seguido del tratamiento de desinfección el cual se realizó en condiciones asépticas bajo una campana de flujo laminar donde se establecieron los tratamientos. Con la finalidad de determinar el comportamiento de la enzima PPO se utilizaron ocho tratamientos con tres repeticiones bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2 x 2 donde el factor A estuvo representado por la presencia o ausencia de NaClO, el factor B por tipo de explante (hojas y pecíolos) y el factor C por los genotipos (INI-3 e INI-6). En todos los tratamientos se realizó la inmersión de explantes en etanol al 70 % durante 30 segundos. La solución de NaClO al 3,24 % fue adicionada con 0,1 % de tween-20, seguido del tratamiento se realizaron tres enjuagues con agua estéril y por último, se incubaron los tejidos en agua durante una hora.

Para determinar la actividad de la PPO, los extractos enzimáticos se prepararon a partir de un gramo de hoja o pecíolo después de la aplicación de los tratamientos. Los explantes se trituraron en mortero con buffer de fosfato potásico (0,1 M, pH 7) y se centrifugaron a 10.000 g por 15 min a 4 °C. Por último se extrajo el sobrenadante, para ser utilizado como extracto crudo enzimático.

Se determinó la actividad enzimática en relación al aumento en la absorbancia con base en el sustrato ácido gálico mediante espectrofotometría a 420 nm, después de incubar las muestras en los tiempos: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 y 120 min a 35 °C, con el fin de encontrar el punto en el cual la absorbancia se vuelve constante.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción se determinó la actividad enzimática por espectrofotometría a 420 nm después de incubar las muestras a 35 °C por 120 min. La mezcla de reacción consistió en 1,7 mL de una solución amortiguadora de fosfato potásico (0,1 M, pH 7), 0,5 ml de extracto enzimático y 0,5 mL de sustrato (ácido gálico 1 mM). Se realizaron controles en donde el extracto enzimático o sustrato se reemplazó por el buffer según fuera el caso. Una unidad de actividad enzimática (UE) se definió como la cantidad de enzima que causa la variación en la absorbancia de 0,001 a los 120 min de reacción. La variable actividad enzimática se evaluó en un análisis de varianza. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS versión 20.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de actividad enzimática. La máxima actividad enzimática se encontró a los 120 min para el ácido gálico bajo las condiciones de ensayo. Se seleccionó este mismo tiempo para la determinación de la actividad de la PPO en este estudio (Figura 1).

Efecto del NaClO sobre la actividad de la PPO. El análisis de varianza presentó diferencias significativas para los factores de estudio: NaClO, explante y genotipo aunque no fueron

significativas las interacciones (Cuadro 1). Se encontró que la aplicación de NaClO influyó significativamente la actividad de la PPO en comparación a la del tratamiento control (Cuadro 2), debido probablemente al efecto oxidante y/o hidrolizante de éste compuesto sobre los compuestos fenólicos presentes en los tejidos vegetales o sobre la misma enzima. Del mismo modo, los explantes de hoja presentaron una mayor actividad de la PPO comparados con los explantes de pecíolo (Cuadro 3), posiblemente atribuido al alto contenido de fenoles totales en este tipo de explante, sobre los cuales actúa la PPO. De acuerdo con Sabandar et al. (2013), los flavonoides y taninos se encuentran dentro de los principales compuestos presentes en las hojas de diversos géneros de *Jatropha*, compuestos sobre los cuales actúa la enzima. Esto sugiere que sería mejor usar pecíolos en lugar de hojas en la micropropagación de esta especie.

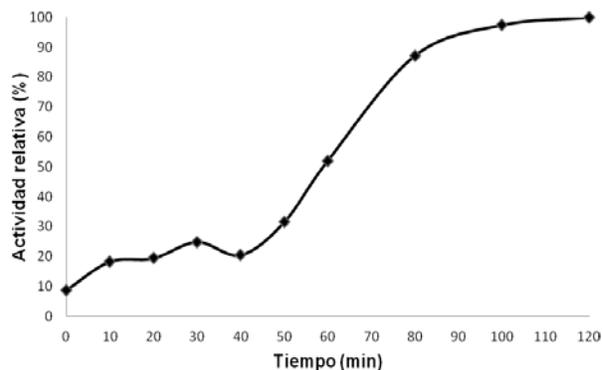


Figura 1. Comportamiento de la enzima polifenol oxidasa (PPO) en función del tiempo de incubación

Por otro lado, el genotipo INI-3 presentó una actividad superior de la PPO a diferencia del genotipo INI-6 (Cuadro 4). La comparación de medias de tratamientos demostró que los explantes de hoja del genotipo INI-3 presentaron la mayor actividad de la PPO al ser tratados con hipoclorito de sodio al 3,24 %, mientras que la menor actividad se encontró en los explantes de pecíolo del genotipo INI-6 sin aplicación del hipoclorito (Cuadro 5).

Cuadro 1. Análisis de varianza para la actividad de la PPO en factores de estudio y sus interacciones

Fuente	gl	F	Significancia
NaClO	1	58,251	0,000
Explante	1	335,474	0,000
Genotipo	1	15,037	0,001
NaClO x explante	1	1,022	0,327
NaClO x genotipo	1	1,270	0,276
Explante x genotipo	1	2,462	0,136
NaClO x explante x genotipo	1	3,153	0,095
Error	15		
Total	23		

Cuadro 2. Medias marginales estimadas para las unidades de actividad enzimática (UE) del factor NaClO

NaClO	UE
3,24 %	53,158 a
Control	45,845 b

Cuadro 3. Medias marginales estimadas para las unidades de actividad enzimática (UE) del factor explante

Explante	UE
Hoja	58,276 a
Pecíolo	40,727 b

En términos porcentuales, la actividad de la PPO en los explantes de hoja tratados del INI-3

superó a la actividad en los explantes de pecíolo del genotipo INI-6 sin tratar en 83,9 %. Las diferencias entre los tratamientos de NaClO en contraste con el control se podrían atribuir al efecto oxidante del agente desinfectante al aumentar la actividad de la PPO lo cual es muy importante en la selección del desinfectante y sus dosis de aplicación en el establecimiento *in vitro* del material vegetal.

Cuadro 4. Medias marginales estimadas para las unidades de actividad enzimática (UE) del factor genotipo

Genotipo	UE
INI-3	51,359 a
INI-6	47,644 b

Cuadro 5. Unidades de actividad enzimática en *Jatropha curcas* en función del genotipo, explante y aplicación de NaClO (media \pm SD).

Genotipo	NaClO (3,24 %)	Explante	
		Hoja	Pecíolo
INI-3	Con aplicación	66,4 \pm 1,50	44,7 \pm 0,58
	Sin aplicación	55,4 \pm 0,17	39,0 \pm 1,79
INI-6	Con aplicación	58,4 \pm 0,17	43,1 \pm 0,57
	Sin aplicación	52,9 \pm 0,69	36,1 \pm 2,12

Además los altos niveles de actividad de la PPO en los tratamientos donde se emplearon explantes de hoja guardan correspondencia con los resultados de Tomar et al. (2014), quienes demostraron que las hojas presentan un mayor

contenido de fenoles totales en comparación de otras partes de la planta de *J. curcas*; en consecuencia, dichos compuestos fenólicos son oxidados por la enzima PPO y de esta forma promueven el oscurecimiento del material vegetal.

Asimismo, Brandelli y Lopes (2005) encontraron una correlación positiva entre el grado de oscurecimiento de duraznos (*Prunus persica*) y la actividad de la PPO. Resultados similares fueron obtenidos por Scalzo et al. (2005) quienes demostraron diferencias en el contenido de fenoles entre diferentes genotipos de fresa (*Fragaria x ananassa*), albaricoque (*Prunus armeniaca* L.) y durazno (*Prunus persica* L.). Por estos antecedentes se puede atribuir que el contenido de fenoles y la actividad de la PPO están relacionados con el genotipo. En consecuencia, la metodología empleada en este trabajo podría ser aplicada para la comparación de diferentes tratamientos antioxidantes en el control de oxidación fenólica de *J. curcas* y otras especies que presenten una correlación positiva entre el oscurecimiento fenólico y la actividad de la PPO.

CONCLUSIONES

La aplicación de NaClO al 3,24 % como agente desinfectante en hojas y pecíolos de dos genotipos de *J. curcas* aumentó la actividad de la PPO, lo que indica que este desinfectante es causante indirecto del oscurecimiento de los tejidos de la planta; además, se encontraron diferencias estadísticas entre explantes y entre genotipos de estudio según las cuales el genotipo INI-6 y los explantes de pecíolo presentan la menor actividad de la PPO.

LITERATURA CITADA

1. Azofeifa, Á. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20: 153-175.
2. Bhojwani, S.S. y P.K. Dantu. 2013. Micropropagation. *In: S. Bhojwani y P. Dantu (eds.). Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer India. New Delhi. pp. 245-274.*
3. Brandelli, A. y C.H. Lopes. 2005. Polyphenoloxidase activity browning potential and phenolic content of peaches during postharvest ripening. *Journal of Food Biochemistry* 29: 624-637.
4. Cassells, A.C. 2011. Detection and elimination of microbial endophytes and prevention of contamination in plant tissue culture. *In: R. Trigiano y D. Gray (eds.). Plant Tissue Culture, Development and Biotechnology. CRC Press. Boca Raton, FL. pp. 223-238.*
5. Chien-Ying, K., A. Al-Abdulkarim, S. Al-Jowid y A. Al-Baiz. 2009. An effective disinfection protocol for plant regeneration from shoot tip cultures of strawberry. *African Journal of Biotechnology* 8: 2611-2615.
6. De Filippis, L.F. 2014. Crop Improvement through tissue culture. *In: P. Ahmad, M. Wani, M. Azooz y L. Tran (eds.). Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes. Springer. NY. pp. 289-346.*
7. He, Y., X. Guo, R. Lu, B. Niu, V. Pasapula, P. Hou, F. Cai, Y. Xu y F. Chen. 2009. Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 98: 11-17.
8. Hernández, Y. y M.E. González. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales* 31(4): 58-69.
9. Mroginski, L., P. Sansberro y E. Flaschland. 2010. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. *In: G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires. pp. 17-25.*
10. Sabandar, C.W., N. Ahmat, F. Jaafar e I. Sahidin. 2013. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. *Phytochemistry* 85: 7-29.
11. Scalzo, J., A. Politi, N. Pellegrini, B. Mezzetti y M. Battino. 2005. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition* 21: 207-213.
12. Tabiyeh, D., F. Bernard y H. Shacker. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA₃ effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. *Acta Horticulturae* 726: 201-204.
13. Tomar, N.S., M.A. Ahanger y R.M. Agarwal. 2014. *Jatropha curcas*: An Overview. *In: P.*

Ahmad, y M. Wani (eds.). Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in

Plants Under Changing Environment. Springer. NY. pp. 361-383.