

Desinfección e influencia del bencil aminopurina (BAP) y ácido naftalén acético (ANA) en la multiplicación *in vitro* de *Perezia coerulescens* Wedd, planta medicinal altoandina

Disinfection and influence of naftalen acetic acid and benzil aminopurine on the *in vitro* multiplication of *Perezia coerulescens*, high-land medicinal plant

Percy Olivera G^a, Carmen Tamariz A^a, Marcel Gutierrez-Correa^a

RESUMEN

Para el establecimiento del cultivo *in vitro* de yemas de *Perezia coerulescens* Wedd, se evaluaron seis métodos de desinfección usando hipoclorito de sodio (NaOCl) y dicloruro de mercurio (HgCl₂) a diferentes concentraciones y tiempos; se evaluó el porcentaje de contaminación, supervivencia y fenolización de las yemas. El establecimiento se realizó en medio Murashige y Skoog a la mitad de concentración de sales suplementado con sacarosa (2%), agar-agar (0,75%), un fotoperíodo de 16 horas y temperatura ambiental (16 – 20 °C). Para la multiplicación se probó cuatro tratamientos, usando bencil amino purina (BAP) y ácido naftalén acético (ANA): TO-S4 (sin hormona), T1-S4 (1 mgL⁻¹ de BAP y 0,01 mgL⁻¹ de ANA), T2-S4 (1 mgL⁻¹ de BAP), T3-S4 (2 mgL⁻¹ de BAP y 0,02 mgL⁻¹ de ANA). Se encontró que el mejor tratamiento de desinfección fue con HgCl₂ al 0,1% (p/v) por 5 minutos, el mejor método para obtener el mayor número promedio de brotes por yema (explante) fue el T3-S4 y además se encontró cierta evidencia de que el ANA a bajas concentraciones tiene influencias negativas en la producción de brotes.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*; Fitohormonas; Reguladores de crecimiento; Auxina; Citocinina.

ABSTRACT

For establish the *in vitro* culture of *Perezia coerulescens* Weed. shoots. it was evaluated six disinfection methods using differ concentrations and exposure times of disinfection of sodium hypochlorite (NaOCl) and mercury (II) chloride (HgCl₂). It was evaluated the microbial contamination percentage, the survival and phenolization of shoots. The establishment was on half concentration of Murashige and Skoog medium supplemented with sucrose (2%), agar-agar (0,75%) with 16 hours of photoperiod and environment temperature (15-20°C). For the multiplication it was assayed four treatments using bencil amine purine (BAP) and naftalen acetic acid (NAA): TO-S4 (without hormone), T1-S4 (1 mgL⁻¹ of BAP with 0,01 mgL⁻¹ of NAA), T2-S4 (1 mgL⁻¹ of BAP), T3-S4 (2 mgL⁻¹ of BAP with 0,02 mgL⁻¹ of NAA). It was found that the best disinfection treatment was using HgCl₂ (0,1%) by 5 minutes, the best method to get more shoots by explants was T3-S4, and there is some evidence that low concentration of NAA has negative influence on shoot production.

Key words: *In vitro* culture; Phytohormones; Growth regulators; Auxin; Cytokinin

^a Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo.
^a Biólogo

INTRODUCCIÓN

Perezia coerulescens es una planta medicinal altoandina conocida como “valeriana”, “sutuma”, “sut’uma” “contrahierba” y “china valeriana” (Mostacero et al. 1996, Mantilla y Olazabal 2008), se distribuye desde el Perú, Bolivia hasta Argentina (Franquemont et al. 1990). En la medicina popular se utiliza toda la planta para aliviar una diversidad de dolencias tales como tos, heridas, post-parto, gripe, afecciones del riñón, mal viento, aerofagia; así mismo, se utiliza como febrífugo, sedante, y sudorífico (Mantilla y Olazabal 2008, Gibaja 1998). Sin embargo, al ser una planta silvestre, su recolección y comercialización en las ferias populares es informal y es una actividad económica de los pobladores altoandinos. Por lo tanto, es necesario desarrollar metodologías para que su uso sea sostenible. En términos generales, se indica que el aprovechamiento de la biodiversidad mediante la biotecnología permite lograr valorizaciones sostenibles con potencial de aumentar la productividad agrícola e industrial, mejorar la salud y nutrición, restaurar y proteger el medio ambiente (Roca 2004); es decir, las herramientas biotecnológicas son importantes para la multiplicación y el mejoramiento genético de las plantas medicinales mediante las técnicas de regeneración *in vitro* y transformación genética (Tripathi y Tripathi 2003), porque a diferencia de las técnicas tradicionales de cultivo, la propagación *in vitro* permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en menor tiempo y espacio (Roca y Mroginski 1991).

En algunos países la propagación *in vitro* se utiliza para la conservación de las especies endémicas, plantas en peligro de extinción (Izquierdo 2006, Cristea et al. 2010) y para la propagación de plantas medicinales (Tripathi y Tripathi 2003). En el Perú, a pesar de que las biotecnologías más utilizadas son las de cultivo de tejidos (multiplicación y conservación *in vitro*), los trabajos están orientados hacia los de productos de panllevar más que a uno de los sectores con mayores oportunidades como la bioprospección de plantas medicinales, debido a la existencia de una gran variedad de plantas con información de sus usos tradicionales (Roca 2004). En este contexto, dado que la propagación *in*

vitro de las plantas tiene un gran potencial para la producción de plantas medicinales de alta calidad (Murch et al. 2000), y posee muchas ventajas comparada con los métodos convencionales de propagación vegetativa, y por otro lado que *P. coerulescens* es una especie que presenta alto grado de extravismo (De la Cruz et al. 2005), declarada como una especie vulnerable (El Peruano 2006); la presente investigación está orientada a buscar una metodología apropiada para la propagación de *Perezia coerulescens* mediante el cultivo *in vitro*. reportándose en esta ocasión los resultados de la influencia de la citocinina bencil amino purina (BAP) y la auxina ácido naftalen acético (ANA) como fitoreguladores en la multiplicación de esta especie, lo cual contribuirá finalmente a su conservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Las plantas frescas de *Perezia coerulescens* Wedd. fueron adquiridas en las ferias populares de plantas medicinales en la ciudad de Huaraz, las cuales fueron determinadas botánicamente en el laboratorio de Biología de la UNASAM.

Selección de individuos para la propagación in vitro

Se seleccionó las plantas que no evidenciaban síntomas de enfermedades infecciosas, preferentemente sin flores y con las mejores características morfológicas, tales como: color de hojas, hojas más duras y resistentes, con yemas de aproximadamente 1cm de longitud, rizomas sin daños mecánicos y 1cm de diámetro aproximadamente, raíces de 0,3 a 0,4 cm de diámetro y 2 cm de largo aproximadamente.

Desinfección del material seleccionado

Las plantas seleccionadas fueron lavadas con agua corriente para retirar los residuos de tierra y restos de hojas secas de su superficie. Luego se retiraron las hojas grandes para dejar una yema con hojas pequeñas de 1,5 cm aproximadamente; los rizomas debajo de las yemas fueron cepillados y lavados con

con sales completas, produce hasta en un 90% la fenolización; mientras que en medio MS a la mitad de concentración de sus sales no se observó el problema de fenolización. Esto podría deberse a que los medios ricos en nitrógeno pueden favorecer la necrosis de los tejidos (Margara 1988). Este medio fue escogido para las siguientes etapas porque además se conoce que en algunos casos la disminución de la concentración de los medios de cultivo favorece el desarrollo y vigor de los explantes (Uribe et al. 2008).

Para la formación de brotes o yemas, algunas plantas no requieren la aplicación de fitohormonas al medio de cultivo (Izquierdo 2006, Cerna y Tafur 2009, Khan et al. 2006, Severín et al. 2008); sin embargo los resultados en *P. coeruleus* indican la necesidad de fitoReguladores para esta etapa. Los tipos de reguladores de crecimiento, sus combinaciones, y rangos de concentraciones deben ser optimizados para cada especie, genotipo y etapa de multiplicación determinada (Olmos et al. 2004). Las citocininas estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos y la inducción de brotes, siendo las más usadas el BAP (Bencil amino purina), KIN (6-furfuril- aminopurina) y ZEA (zeatina). Por otro lado, las auxinas promueven el crecimiento, la diferenciación celular y la diferenciación de raíces, y las más usadas son el IBA (ácido indol-3-butírico y el ANA (ácido naftalén acético) que sirven para el enraizamiento (Roca y Mroginski 1991). En el presente trabajo se evaluó la influencia del BAP solo y en combinación con una baja concentración de ANA. Todos los tratamientos con hormonas generaron brotes, lo cual indicaría una respuesta positiva al BAP, mientras que se observa que la incorporación del ANA en el tratamiento T1 disminuye la brotación respecto al tratamiento T2 (BAP a la misma concentración pero solo). Los resultados del tratamiento T1 no concuerdan con lo reportado para otras especies que responden a concentraciones bajas de BAP (Oviedo y Guevara 1988, Begum et al. 2002).

El tratamiento que presenta el mejor resultado es el T3-S4 con 2 mg/L de BAP y 0,02 mg/L de ANA, y concuerdan con resultados reportados para otras plantas (Sarker et al. 2006, Anis et al. 2003). Sin embargo, existen especies que requieren concentraciones mayores de BAP (Anand y Jeyachandran 2004, Farzana et al. 1998, Lara et al. 2003). Por lo que sería necesario evaluar el efecto de la misma concentración de BAP o mayores concentraciones solo y en combinación con el ANA para determinar y verificar la influencia negativa del ANA que se observa en los tratamientos T1 y T2.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento de desinfección con Dicloruro de mercurio ($HgCl_2$) al 0,1% (p/v) por 5 minutos permite obtener el mayor número de yemas vivas.
2. El medio Murashige y Skoog a la mitad de concentración de sales no produce fenolización en las yemas de *Perezia coeruleus*.
3. Con el tratamiento T3-S4 (2 mg/L de BAP y 0,02 mg/L de ANA) se obtiene el mayor promedio de brotes por yema.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anand, S. y R. Jeyachandran. 2004. "In vitro multiple shoot regeneration from nodal explants of *Zehneria scabra* (L.f.) sonder – an important medicinal climber". *Plant Tissue Culture* 14(2): 101-106.
- Anis, Mohammad., Mohammad Faisal and S. Singh. 2003. "Micropropagation of Mulberry (*Morus alba* L.) through *in vitro* culture of shoot tip and nodal explants". *Plant Tissue Culture* 13(1):47-51.
- Azofeifa, Álvaro. 2009. "Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*". *Agronomía Mesoamericana* 20(1): 153-175.
- Cerna, Marco y Valdano Tafur. 2009. "Cultivo *in vitro* de *Scoparia dulcis* L. (Scrophulariaceae)". *La Granja* 9(1): 44-51.
- Concepción, O., Lelurlys Nápoles, Aurora Pérez, Martha Hernández, Ninel Peralta y R. Trujillo. 2005. "Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos". *Cultivos Tropicales* 26(1):33-39.
- Cristea, Victoria., Alexandra-Timea Brummer, Liliana Jarda and Mihai Miclaus. 2010. "In vitro culture initiation and phytohormonal influence on *Dianthus henteri* – a Romanian endemic species". *Romanian Biotechnological Letters* 15(1): 25-33.
- De la Cruz, Horacio., Percy Zevallos y Graciela Vilcapoma. 2005. "Status de conservación de las especies vegetales silvestres de uso tradicional en la Provincia de Canta, Lima – Perú". *Ecología Aplicada* 4(1-2): 9-16.
- El Peruano. 2006. "Aprueban categorización de Especies amenazadas de flora silvestre: Decreto Supremo N° 043-2006-AG". *Normas Legales*, 13 Julio.
- Farzana, Khanum., Tayyab Husnain and Sheikh

- Riazuddin. 1998. "Effect of age seedling and phytohormones on micropropagation of indica rice (*Oryza sativa* L.) from meristem culture". *Journal of Plant Biology* 41(2): 93-96.
- Gibaja, Segundo. 1998. Pigmentos naturales quinónicos. Lima: Fondo Editorial UNMSM.
 - Izquierdo, Pablo. 2006. "Development of micropropagation protocols for two species critically endangered Asteraceae endemic of the Galapagos Island". *Lyonia* 9(2): 57-62.
 - Khan, Saifullah., Sheeba Naz, Kashif Ali and Samreen Zaidi. 2006. "Direct organogenesis of *Kalanchoe tomentosa* (Crassulaceae) from shoot-tips". *Pakistan Journal of Botany* 38(4): 977-981.
 - Mantilla, Justo y Oscar Olazabal. 2008. "Pachamama hampi qhoranchiskuna: las plantas medicinales de nuestra tierra". Cusco: Instituto de Ecología y Plantas Medicinales.
 - Margara, J. 1988. "Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Los meristemos y la organogénesis". Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
 - Mostacero, José., Freddy Mejía y Freddy Peláez. 1996. *Fitogeografía del norte del Perú*. Lima: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC).
 - Murashige, Toshio y Folke Skoog. 1962. "A revised medium for rapid grow and bioassays with tobacco cultures". *Physiologia Plantarum* 15(3): 472-497.
 - Murch, S., Krishna Raj, P. Saxena. 2000. "Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in in-vitro regenerated *St. John's wort* (*Hypericum perforatum* L. cv. Athos)". *Plant Cell Report* 19: 698-704.
 - Olmos, Sofia., Graciela Luciani y Ernestina Galdeano. 2004. "Métodos de propagación y conservación de germoplasma". En: *Biotechnología y mejoramiento vegetal*, eds. Viviana Echenique, Clara Rubinstein y Luis Mroginski, pp. 161-172. Buenos Aires: Ediciones INTA.
 - Oviedo, Yvonne y Eric Guevara. 1988. "Propagación in vitro de la estacía *Limonium sinatum* CV. Mindnigth blue". *Agronomía Costarricense* 12(1): 113-122.
 - Roca, William y Luis Mroginski. 1991. "Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones". Lima: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
 - Roca, William. 2004. "Tendencias en el desarrollo de capacidades biotecnológicas e institucionales para el aprovechamiento de la biodiversidad en los países de la Comunidad Andina". Lima. <http://www.caf.com/attach/9/default/Tendencias-desarrollo-capacidadesbiotecno%C3%B3gicas-institucionales-aprovechamiento-biodiversidad-ComunidadAndina.pdf>.
 - Sarker, R., Sabina Yesmin and M. Hoque. 2006. "Multiple shoot formation in eggplant (*Solanum melongena* L.)". *Plant Tissue Culture* 16(1): 53-61.
 - Severin, Cecilia., Osvaldo Di Sapio, Angel Scandizzi, Luciano Taleb, Graciela Giubileo y Susana Gattuso. 2008. "Efecto de algunos fitorreguladores y estudio histológico sobre la regeneración *in vitro* de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas* 7(1): 18-24.
 - Tripathi, Leena y Jindra Tripathi. 2003. "Role of biotechnology in medicinal plants". *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2(2): 243-253.
 - Uribe, Matilde., Catherine Delaveau, Marcelo Garcés y René Escobar. 2008. "Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales". *Bosque* 29(1): 58-64.

Correspondencia:

Percy Olivera Gonzales
 Facultad de Ciencias - UNASAM
 Huaraz - Perú
 943682608
 olivgon2002@yahoo.com