



Artículo Original

Efecto sinérgico del 2,4-Diclorofenoxiacético y el Bencilaminopurina en la inducción de callos de *Jatropha macrantha* (Euphorbiaceae)

Synergistic effect of 2,4-Diclorofenoxiacético and Bencilaminopurina in the callus induction of *Jatropha macracantha* (Euphorbiaceae)

Angélica López Zavaleta¹ y Eloy López Medina²

¹E.A.P. de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo (Perú). ²Instituto de la Papa y Cultivos Andinos de la Universidad Nacional Trujillo

RESUMEN

Jatropha macrantha, Mull. Arg, conocido comúnmente como “Huanarpo macho” (Euphorbiaceae), es un arbusto propio de las vertientes occidentales y valles interandinos del Perú. Esta especie presenta en su raíz al alcaloide jatrofano, similar a la yohimbina, además de saponinas, esteroides, flavonoides y proantocianidinas, que son compuestos químicos con actividad antiinflamatoria y anti artritis. El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto sinérgico del 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y del 6-bencil aminopurina (BAP) en la inducción de callos in vitro, libre de patógenos, como base para la producción masiva de este vegetal. Se utilizaron segmentos de hoja y se cultivaron en M & S (1962) completo, suplementado con 2,4-D y BAP a diferentes concentraciones. Se logró el desarrollo de callos de *J. macrantha* de consistencia compacta y de color blanquecino, con mayor porcentaje en el Tratamiento N° 2, en donde se observó callos de Grado 2 y Grado 3 de la Escala propuesta por Santana (1982), en un 50%. Se concluye que existe un efecto sinérgico de estos reguladores de crecimiento en la inducción de callos de *J. macrantha* en condiciones de laboratorio.

Palabras clave: *Jatropha macrantha*, inducción de callo, 2,4-Diclorofenoxiacético, Bencilaminopurina.

ABSTRACT

Jatropha macrantha, Mull. Arg, (Euphorbiaceae), is a shrub typical of the western slopes and inter-Andean valleys of Peru. This species has in its root alkaloid jatrophane, similar to yohimbine, as well as saponins, steroids, flavonoids and proanthocyanidins, which are chemical compounds with anti-inflammatory and anti-arthritis activity. The aim of the present investigation was to determine the synergistic effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic (2,4-D) and 6-benzyl aminopurine (BAP) in the induction of calluses in vitro, free of pathogens, as a basis for the production massive of this vegetable. Leaf segments were used and cultivated in complete M & S (1962), supplemented with 2,4-D and BAP at different concentrations. The development of callus of *J. macrantha* of compact consistency and of whitish color was achieved, with a higher percentage in Treatment No. 2, where callus of Grade 2 and Grade 3 of the Scale proposed by Santana (1982) was observed, in 50%. It is concluded that there is a synergistic effect of these growth regulators in the induction of callus of *J. macrantha* under laboratory conditions.

Keywords: *Jatropha macrantha*, callus induction, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, Benzylaminopurine.

INTRODUCCIÓN

Pertenece a la Familia Euphorbiaceae, *Jatropha macrantha* Mull. Arg., conocida comúnmente como huanarpo macho, barbasco, huanarpo de canta, palo de grado o urco huanarpo, es un arbusto de tamaño mediano (1.5 a 2 m. de altura), ramificado con ramas extendidas, carnosas y visiblemente marcadas por los callos de las cicatrices del peciolo caído; posee raíz conoidea y pivotante con pocas raíces secundarias y una corteza de regular espesor; las estípulas son glanduliformes, con yemas ligeramente pedunculadas en el período seco las hojas son tempranamente parduzcas y pegajosas como la savia de la rama carnosas; las flores, de color rojo anaranjado, poseen brácteas pequeñas, foliáceas, ovaladas, lanceoladas y de aproximadamente 10 mm de largo. Los sépalos de las flores masculinas son oblongo-ovaladas, agudos, dentadas glandulares, libres, de 4 a 5 mm. de largo, los pétalos son de 2 cm de largo oblongo obtusos, parecidos a las uñas y libres, el androceo presenta 10 estambres, con el exterior más corto y el interior monadelfo alargado. Las inflorescencias son capituladas, de color escarlata, que aparecen tardíamente durante el periodo seco¹.

J. macrantha crece entre los 1500 y 2600 m.s.n.m, es autóctona del Perú y se distribuye mayormente en el valle fluvial del Marañón, en la Amazonia, y en Puno; ha sido utilizada por nuestros antepasados para mejorar la disfunción eréctil, motivo por el cual se le conoce también como viagra peruano, siendo los tallos jóvenes, los que se utilizan de la planta. Actualmente se sabe que contiene saponinas, esteroides, flavonoides, aceites esenciales y alcaloides², así como, gran cantidad de proantocianidinas que son compuestos químicos con actividad antiinflamatoria y útiles para el tratamiento de la artritis y la disfunción eréctil¹.

La formación de callos, masa amorfa surgida de la proliferación de células del parénquima como consecuencia de una herida, puede ser inducida en numerosos órganos y tejidos de plantas que usualmente no desarrollan callos en respuesta a un daño. El material vegetal comúnmente cultivado incluye, cambium vascular, parénquima de reserva, periciclo de raíz, cotiledones, mesófilo de la hoja y tejido provascular³. Los callos no tienen patrones predecibles de organización, están presentes en centros localizados de actividad meristemática y a menudo aparecen en regiones cambiales rudimentarios con zonas de diferenciación vascular. Una de las características importantes de callo, desde un punto de vista funcional, es su irregular crecimiento, teniendo el potencial para desarrollar raíces normales, brotes y embriones que forman plántulas⁴. El cultivo de callos puede ser una alternativa para la obtención de algunos de estos metabolitos secundarios lo que podría permitir la producción a gran escala de dichos compuestos. El cultivo de callos puede ser utilizado para diferentes propósitos, tales como la micropropagación y el mejoramiento vegetal, que requiere de un explante inicial, el que puede tener una alta diferenciación de sus tejidos, como un trozo de raíz, tallo u hoja, o bien la utilización de tejidos menos diferenciados como hipocótilos y cotiledones de plántulas recién germinadas e incluso embriones zigóticos maduros e inmaduros. También, aunque con menor frecuencia, se han utilizado tejidos florales como estambres, pétalos y ovarios. En cualquier caso, la inducción de callo representa un proceso de desdiferenciación y división celular intensiva, el cual depende principalmente del explante, genotipo, medio de cultivo, tipo de regulador de crecimiento como también su concentración y combinación^{3,5}. Existe escasa información sobre la callogénesis en Huanarpo.

La presencia y acción conjunta de dos fitohormonas (por ejemplo auxinas y citocininas) puede inducir y fijar un tipo determinado de expresión morfogénica de acuerdo a los niveles relativos entre sí, o de cada una de ellas, en un tejido. Así por ejemplo, auxinas y citocininas, de acuerdo a su nivel relativo pueden conducir a la formación de brotes, alternativamente de raíces y/o a la proliferación de masas celulares sin mayor organización. Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales naturales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de plantas, promueven el crecimiento principalmente por un aumento de la expansión celular⁶. Las citocininas son hormonas esenciales en el accionar de varios procesos vinculados al crecimiento y desarrollo de las plantas y relacionados a la acción de varios genes. Su efecto hormonal fue visualizado rápidamente al inducirse, en compañía de auxinas, diferentes tipos de morfogénesis en tejidos de tabaco y de otras especies bajo condiciones *in vitro*. Un alto nivel de citocininas vs. auxinas provocaba la formación de brotes en tejidos derivados de explantes de médula, mientras que con niveles bajos de citocininas y/o conjuntamente niveles altos de auxina, se observaba la formación de masas celulares no organizadas (callos) y la formación de raíces con gradientes mayores de auxina. Junto a auxinas, promueven la producción de tejidos no

organizados denominados callos, de los cuales es también posible inducir la formación de brotes y/o raíces⁷.

El objetivo de la investigación es determinar el efecto sinérgico del 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y la Bencilaminopurina (BAP) en la inducción de callos de *Jatropha macrantha* Mull. Arg, “huanarpo”, a partir de explantes de mesófilo foliar.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Papa y Cultivos Andinos, Facultad de Ciencias Biológicas, campus de la Universidad Nacional de Trujillo, (Trujillo, Perú), utilizando explantes de limbos foliares de un centímetro cuadrado procedentes de plantas crecidas en el invernadero de Fisiología y Biotecnología de la misma Facultad.

Los explantes fueron cultivados en medio MS (1962), suplementado con vitaminas, conteniendo sacarosa (30 g/l) y agar (0.8%), al cual se adicionó Ácido 6-Bencil Aminopurina y 2,4-Diclorofenoxiacético a diferentes concentraciones (Tabla 1). El pH se ajustó a 5.8 con NaOH 1N o HCl, llevado a baño maría, servido en frascos de penicilina 2 ml por frasco, y tapados con papel aluminio previamente esterilizados en autoclave a 121°C y 1 atm de presión durante 20 minutos.

Tabla 1. Concentraciones de 6-Bencil Aminopurina (BAP) y 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), para la inducción de callos de *Jathropha macrantha* Mull. Arg, “huanarpo macho”.

Tratamiento	BAP (ppm)	2,4-D (ppm)
1	0,0	0,0
2	1,0	1,0
3	1,0	0,0
4	0,0	1,0

Los explantes fueron lavados cuidadosamente con agua de caño, luego se colocaron en una solución de benlate al 1% y se mantuvieron durante cinco minutos en agitación continua. A continuación, se trasladaron a la cabina de flujo laminar, donde se desinfectaron con alcohol al 70% por 30 segundos y en hipoclorito de sodio al 3%, durante 3 minutos, y se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril. Los limbos foliares se seccionaron en porciones de 01 cm² aproximadamente, luego de ser introducidos a condiciones *in vitro*, fueron llevados al cuarto de incubación donde se distribuyeron en un diseño en Bloques Completos al azahar, con Tres repeticiones y 8 unidades muestrales, donde permanecieron durante 45 días a temperatura de 26± 1°C y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

A los 45 días se evaluó el porcentaje de formación de callos de grado 3 según la escala propuesta por Santana (1982)⁸. Además, se realizó una evaluación cualitativa del callo en cuanto a color (amarillo, crema y blanco) y consistencia (compacto, friable y esponjoso).

Descripción de la escala empleada por Santana, 1982:

- 1-No formación del callo.
- 2- Ligera formación del callo (se observa una débil proliferación en zonas del borde del explante).
- 3- Formación del callo (hay proliferación de células por todos los bordes del explante, sin llegar a formar una masa).
- 4- Abundante formación del callo (formación de una masa voluminosa de callos).

Finalmente, se aplicó el test de comparación de proporciones para evaluar el efecto en la inducción de callos, tomando como resultados los callos morfogénicos pertenecientes al grado 3 de la escala de Santana (1982) obtenidos en el experimento.

RESULTADOS

Se logró el desarrollo de callos de *J. macrantha* de consistencia compacta y de color blanquecino, con mayor porcentaje en el Tratamiento N° 2, en donde se observó callos de Grado 2 y Grado 3 de la Escala propuesta por Santana (1982), en un 50% (Fig. 1 y Tabla 2)



Fig. 1. Callo de *Jatropha macrantha*, “huanarpo macho”, obtenido mediante el efecto sinérgico del 2,4-diclorofenoxiacético y del 6-bencilaminopurina a concentración de 1.00 ppm.

Tabla 2. Presencia de callos, grado de desarrollo según la escala de Santana, 1982, Color y consistencia, expresados en porcentaje obtenidos a partir de explantes de hoja de *Jatropha macrantha* Mull. Arg, “huanarpo macho”, mediante la aplicación combinada de 2.4-Diclorofenoxiacético y 6-Bencilaminopurina, en condiciones de laboratorio.

Tratamiento	Callo (%)	Desarrollo de callos, (%) según Santana, 1982.				Color (%)		Consistencia (%)	
		1	2	3	4	Blanco	Cre moso	Compacto	Friable
1	25.0	75.0	25.0	0	0	100.0	0.0	100.0	0.0
2	100.0	0	50.0	50	0	87.5	12.5	62.5	37.5
3	37.5	62.5	37.5	0	0	100.0	0.0	100.0	0.0
4	12.5	87.5	12.5	0	0	100.0	0.0	100.0	0.0

DISCUSIÓN

El 100% de callos obtenidos en el tratamiento 2,(Fig.1 y tabla 2), respecto al tratamiento 3 solo con BAP y al tratamiento 4 solo con 2,4-D, demuestra el efecto sinérgico de estos fitorreguladores que al trabajar juntos permiten la formación completa de callos, debido probablemente a que, el BAP, bioquímicamente refuerza la acción del 2,4-D, mediante la estimulación en la formación de enzimas responsables de la síntesis del 2,4 D, lo cual incrementa la actividad de las auxinas que se encargan de estimular el crecimiento y la división celular, ocurriendo el incremento de la velocidad de formación de células de manera organizada a partir de las células del explante^{9,10}. El 50% de grado 2 y 50% de grado 3 según la escala de Santana encontrados, indica que ambos reguladores tienen efecto complementario debido a que la formación de callos obtenido va desde pequeños a completamente formados, la coloración blanquecina en un 87.5% nos confirma que son verdaderos callos así como su consistencia compacta. demostrando una fuerte actividad sinérgica de estos reguladores del

crecimiento, así como su capacidad de producir un crecimiento desordenado en las células del explante, lo cual concuerda con una investigación efectuada en camote⁸, donde el medio con 2,4-D (0,50 mg/L) y 6-BAP (0,25 mg/L) resultó superior en la formación de callos desde el punto de vista cuantitativo (total de callos formados) con valores de 100% y cualitativo (callos potencialmente embriogénicos), con valores entre 90,0 y 96,0%, formándose callos pertenecientes al grado 3, de color crema y amarillo, nodulares y friables, el resultado alcanzado indicó el efecto positivo del 2,4-D y el 6-BAP en el indicador evaluado⁸.

Según Rodríguez et al³, al trabajar en hojas de *Ugni molinae* Turcz, el tratamiento que obtuvo el porcentaje más alto de callo-génesis fue 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ de BAP con un 60 %, a diferencia de los demás, presentó mejores respuestas en los tratamientos combinados y menores porcentajes en los tratamientos con 2,4-D y testigo. Siendo estos resultados semejantes a los encontrados en el presente trabajo con un 100 % en la igualdad de concentraciones entre hormonas⁹⁻¹². En conclusión: el empleo de 2,4-D y BAP a un 1.00 ppm en el medio de cultivo, propició la formación de callos en explantes de hojas *Jatropha macrantha* Müll. Arg, "Huanarpo macho", en un 100%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar C. Efecto Broncodilatador del extracto metanólico de hojas y tallos de *Jatropha macrantha* Müll. Arg. "huanarpo macho" en cobayos. [Tesis de Químico Farmacéutico]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú. 2012.
2. Heredia I, Burga J, Flores E. Extracción de alcaloides del huanarpo macho (*Jatropha macrantha* Muell. Arg) en un equipo soxhlet con mezcla de solventes clclohexanoetanol. [Tesis de Ingeniero Químico]. Universidad Nacional del Callao. Perú. 2016.
3. Rodríguez M, Latsague M, Chacón M, Astorga P. Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. Bosque (Valdivia), 2014; 35(1):24-29. Doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011.
4. Hurtado MDV, Merino ME. Cultivo de Tejidos Vegetales. México, DF: Edit. Trillas. 1994.
5. Matos A, Sánchez A. Evaluación de reguladores de crecimiento para la inducción de callo en *Aloe vera* L. Multiciencias, 2011; 11(1):7-14.
6. Jordán M, Casaretto J. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En, FA Squeo & L. Cardemil, eds., Fisiología Animal. Chile: Ediciones Universidad de La Serena, 2006; pp.1-28.
7. González O, Hernández M, Silva J, Espinosa A. Evaluación de la dinámica del crecimiento in vitro en callos de *Ipomoea batatas*. Rev. Colomb. Biotecnol. 2011; 13:148-155.
8. Bidwell RGS. Fisiología Vegetal. México D.F., México: Edit. AGT. 1999.
9. Barceló J, Nicolás G, Sabater B, Sánchez R. Fisiología Vegetal, Madrid, España: Editorial Pirámide. 2009
10. Tinco A, Arroyo J, Bonilla P. Efecto del extracto metanólico de *Jatropha macrantha* Müll. Arg., en la disfunción eréctil inducida en ratas. An Fac med. 2011; 72(3):161-8.
11. Castañeda B, Castro de la Mata R, Gamarra F. Evaluación del efecto farmacológico del extracto de *Jatropha macranta* Muell. Arg "huanarpo macho" en pene aislado de conejo. Universidad de San Martín de Porres. CULTURA: Lima (Perú) 23:1-100.
12. Lallana V, Lallana M del C. Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal - Edición digital. 2003; pp.81-84.

Correspondencia: angylz@outlook.es