

29/13



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFFECTO HORMONAL SOBRE LA INDUCCION  
DE CALLO Y CONTENIDO DE ALCALOIDES  
TOTALES EN CULTIVOS in vitro DE**

*Datura innoxia* Mill.

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
MIRIAM LADD OTERO

FALLA DE ORIGEN

1989



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## RESUMEN.

En el presente trabajo, se investigó el efecto de diferentes hormonas y medios de cultivo sobre la generación de callo proveniente de diversos explantes de Datura innoxia, así como en la producción de alcaloides del tropano. Para ello se emplearon hoja, tallo, embrión y meristemo como explantes; ANA, AIA y 2,4-D como auxinas solas o en combinación con BA y medios basales MS, B5, MSB5 y B5MS (los dos últimos intercambiando las sales y las vitaminas del MS y B5). También se investigó el efecto de la concentración de sacarosa y del nitrato de amonio sobre la producción de biomasa y sobre la producción de alcaloides del tropano.

La producción de biomasa se evaluó en base a los pesos fresco y seco; la determinación de alcaloides totales espectrofotométricamente, previa reacción con el p-dimetilaminobenzaldehído. La cuantificación de atropina y escopolamina se realizó mediante Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas.

Los resultados indican, que la mayor producción tanto de biomasa como de alcaloides totales se obtuvo bajo la aplicación de 2,4-D <sup>-6</sup> 10 M con o sin BA <sup>-8</sup> 10 M. Por otro lado, los explantes de embrión y de tallo, así como el medio B5 fueron los que mejor respondieron en cuanto a la síntesis de alcaloides totales.

La concentración de nitrato de amonio en el medio, tuvo un efecto marcado tanto sobre la producción de biomasa como de alcaloides totales, observándose un efecto inverso; ya que a la mayor concentración empleada (2,500 mg/l) el efecto fué

inhibitorio para la producción de biomasa; en tanto que la síntesis de alcaloides totales se vió incrementada.

Se detectó la presencia de atropina y escopolamina en los callos indiferenciados, aunque en bajas concentraciones. Los contenidos mayores se observaron en los callos provenientes de tallo y embrión.

Los resultados son discutidos en función del posible efecto de las diferentes hormonas, medios, tipos de explante y otros factores del cultivo sobre la producción de biomasa y alcaloides del tropano en callos de Datura innoxia.

## INDICE

### INTRODUCCION

- a) Producción de Metabolitos Secundarios por Cultivo de Tejidos Vegetales.....1
- b) Aspectos Generales e Importancia Farmacológica de la Atropina y la Escopolamina.....5

### ANTECEDENTES

- a) Biosíntesis de Hiosciamina y Hioscina.....9
- b) Fuentes Vegetales Productoras de Alcaloides del Tropano.....11
- c) Cultivo de Tejidos Vegetales en la Producción de Alcaloides del Tropano.....18
  - i) Origen del Explante.....22
  - ii) Condiciones de Cultivo.....24
  - iii) Líneas Sobreproductoras y su Mantenimiento.....37
  - iv) Cultivos de Raíz.....39
  - v) Cultivos de Células inmobilizadas.....40

### MATERIALES Y METODOS

- a) Material Biológico.....42
- b) Esterilización y Siembra del Material.....42
- c) Tratamientos Experimentales.....44
- d) Establecimiento de los callos.....46
- e) Curvas de Crecimiento.....46
- f) Extracción de Alcaloides Crudos.....47
- g) Determinación de Alcaloides Totales.....48
- h) Cuantificación de Atropina y Escopolamina.....48

## RESULTADOS

a) Inducción de Callo.....	50
b) Curvas de Crecimiento.....	52
c) Producción de Biomasa.....	55
d) Determinación de Alcaloides Totales.....	64
e) Determinación de Atropina y Escopolamina.....	69

## DISCUSION

a) Efectos Hormonales en la Diferenciación del Cultivo.....	76
b) Producción de Biomasa.....	78
c) Producción de Alcaloides Totales.....	81
d) Producción de Atropina y Escopolamina.....	85

BIBLIOGRAFIA.....	93
-------------------	----

ANEXO.....	100
------------	-----

## INTRODUCCION

### a) PRODUCCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS POR CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

Hace aproximadamente 30 años, Routier y Nickel de la corporación Pfizer, plantearon claramente la posibilidad de emplear el Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) como un medio para la producción de metabolitos secundarios de origen vegetal (citado en Fowler, 1986b). Sin embargo en ese tiempo las metodologías de CTV no se encontraban lo suficientemente desarrolladas para abordar tal objetivo; no fué sino hasta 10 años más tarde que esta idea fue retomada por Crew y Staba, 1975 (citado en Luckner y Diettrich, 1987). En realidad es a partir de la segunda década de los 70's que el interés por este tema se incrementó, dando como resultado la publicación de numerosos artículos y revisiones en los que se han puntualizado tanto las ventajas como las limitaciones que representaría la utilización de estas técnicas sobre los métodos que convencionalmente se emplean para la obtención de metabolitos secundarios de origen vegetal.

Algunas de las ventajas que han sido señaladas por diversos autores (Zenk, 1978; Dougal, 1979; Sheler et al., 1984; Fowler, 1986), pueden resumirse en función de factores ambientales, económicos y políticos. Factores ambientales, porque los rendimientos de estos productos en las plantas, pueden verse afectados por variaciones en el clima, ataque de plagas y otros fenómenos naturales capaces de alterar el ciclo normal de la planta.

En lo económico puede mencionarse que frecuentemente el

cultivo de estas plantas compete con el uso de la tierra para cultivo de especies de interés alimenticio, o bien no son cultivadas por no ser culturalmente tradicional su cultivo. Estos factores originan en muchas ocasiones, sobre todo en el caso de plantas que no han sido domesticadas, que la colecta continua de estas especies pueda exceder la tasa de reproducción de las poblaciones y como consecuencia llevar al agotamiento del recurso. Este hecho además incide, en que al decrecer la disponibilidad de la materia prima, el precio del producto aumente. Por último, de los factores políticos pueden derivar problemas difíciles de superar para la accesibilidad de la materia prima, dadas las políticas de comercio internacional que imperan en algunos países.

Aunados a esos problemas se encuentra la dificultad de adaptar a otros habitat ciertas plantas nativas que pueden ser de interés potencial para la producción de compuestos secundarios.

El Cultivo de Tejidos Vegetales, puede potencialmente plantear soluciones que lleven a la superación de las situaciones anteriormente citadas, debido al manejo que se tiene de las condiciones de cultivo, que permiten mantener independiente y bajo un control más estricto los rendimientos de los compuestos de interés. Además ofrece la factibilidad de obtener un producto de mayor pureza, ya que se presentan menor cantidad de otros compuestos no deseados; así como la posibilidad de obtener productos que normalmente no se encuentran en la planta madre, ya sea por ser intermediarios de vida media corta, o por que la información genética aunque presente, no se expresa; pero bajo las condiciones de cultivo in vitro se manifiestan.



Estas metodologías han sido cuestionadas en cuanto a su factibilidad económica, debido a los altos costos de producción, por lo que varios investigadores (Fowler, 1986; Zenk, 1978) han señalado la conveniencia de aplicar estas técnicas particularmente a productos de un alto valor comercial, que se requieran en bajos volúmenes y que tengan un mercado asegurado, además de que la metodología alternativa (síntesis) no sea capaz de competir y desplazar la producción del compuesto mediante esta tecnología. Entre estos productos se encuentran diversos fármacos, esencias, saborizantes, colorantes y otros.

No obstante, a pesar de las posibilidades potenciales, la producción de estos compuestos via Cultivo de Tejidos Vegetales ha tenido que afrontar algunos problemas que derivan básicamente de los bajos rendimientos que se presentan en muchos de los casos.

Luckner y Diettrich (1987), junto con otros investigadores sostienen que esto puede deberse a que en la mayoría de las plantas la biosíntesis y acumulación de estos metabolitos está limitada a ciertos estadios del organismo productor y a tipos especiales de células que se desarrollan durante la formación de determinados tejidos u órganos. En muchas ocasiones, la expresión del metabolismo secundario está integrada a programas que coordinan al metabolismo secundario, con otras actividades morfológicas y bioquímicas del organismo. Aún, cuando los principios integradores de la expresión del metabolismo secundario, en los programas de diferenciación de las células vegetales, no son del todo conocidos y de hecho no hay un criterio que explique porque, en algunos casos se dispara la

biosíntesis de productos secundarios; en algunas líneas celulares se ha observado, que bajo determinadas condiciones de cultivo se forman estos compuestos en células no especializadas. Por ello, resulta importante el estudio y elucidación de todos aquellos factores que influyen en la formación y acumulación de estos metabolitos en la planta madre y paralelamente, los que están implicados en su producción via CTV.

En contraparte con lo citado, existen también referencias en las que se mencionan rendimientos iguales e incluso mayores de los compuestos, en relación a los que se encuentran en la planta madre. En 1982 se citaban un total de 30 casos en que esto se había presentado (Staba, 1982). El caso más relevante, está representado por la producción de shikonina a partir de cultivos de células en suspensión de Lithospermum erithrorhizon, en los que se han logrado establecer las condiciones para elevar su rendimiento entre 10 y 15 veces sobre el de la planta intacta (Zenk, 1978). Como además se ha logrado mantener estable su producción ha sido posible el escalamiento y desarrollo a niveles comerciales, en fermentadores de 750 l. Este caso pone de manifiesto la factibilidad de que estas técnicas puedan aplicarse a otras especies vegetales, con el fin de producir compuestos de interés comercial.

Fowler 1986, cita que actualmente el 25 % de los medicamentos de patente tienen su origen en fuentes vegetales, lo que explica el creciente interés en la búsqueda de otras alternativas para su obtención. Este hecho se ha visto reflejado en que, de los trabajos de investigación presentados en el VI Congreso Internacional de Cultivo de Tejidos Vegetales, llevado a

cabo en Minnesota (1986), relacionados con la producción de metabolitos secundarios. el 72 % se refirieron a productos de interés farmacéutico y dentro de estos el 67 % específicamente a alcaloides (Collinge, 1986).

#### **b) ASPECTOS GENERALES E IMPORTANCIA FARMACOLOGICA DE LA ATROPINA Y LA ESCOPOLAMINA.**

La atropina (DL-hiosciamina) y la escopolamina (DL-hioscina), son alcaloides derivados del tropano, ampliamente utilizados por sus efectos en el sistema nervioso central y periférico. De sus efectos destaca: su empleo como midriáticos, ya que causan la dilatación de la pupila, paralizan el iris y el músculo ciliar. Como se mencionó, estos alcaloides afectan al sistema nervioso central, la atropina causa activación mientras que la hioscina (escopolamina) actúa como depresivo. Se usan además como hipnóticos y en general como antiespasmódicos.

La atropina se aplica también para aliviar los espasmos musculares del estómago y del tracto intestinal, inhibe la secreción salival y suprime la hiperacidez; tiene acción contra la tos, sobre todo convulsiva, contra el enfisema pulmonar y en particular el asma. A dosis bajas, entre 0.5 y 1.0 mg disminuye la frecuencia cardíaca y en dosis mayores de 2.0 mg la incrementa. Es antídoto de la morfina, del gas neurotóxico (dialquilfluorofosfatos) y de los insecticidas fosfatados, además se emplea en las intoxicaciones por hongos.

La escopolamina presenta efectos drásticos sobre la corteza cerebral, con depresión inmediata particularmente de las áreas motoras. La intoxicación con escopolamina produce inconciencia. a

veces alucinaciones seguidas de confusión mental, pérdida de la memoria e incluso la muerte (Guerra y Olivera, 1954; Leete, 1959; Font Quer, 1973; Anozie, 1986).

Por otra parte, el bromuro de N-butilioscina, que deriva de la escopolamina y es el principio activo de las presentaciones farmacéuticas de patente, tiene acción anticolinérgica suave y también espasmolítica, al igual que la atropina pero con menor duración. Se sabe que bloquea el sistema nervioso inhibiendo las neuronas colinérgicas ganglionicas, solo que como sal cuaternaria tiene la característica de que su acción anticolinérgica sobre el sistema nervioso central desaparece, manteniéndose sólo la acción sobre el sistema nervioso periférico. De esta manera, reduce la peristálsis sin pérdida del tono en la terapia contra la úlcera péptica. Finalmente, reduce los espasmos renales, biliares y gastrointestinales (Henry, 1949; Rosentein, 1985; Anozie, 1986).

Una de las fuentes tradicionales de estos compuestos ha sido Atropa belladonna, de la cual los laboratorios Boeringer Ingelheim/fher, llegaron a cultivar hasta 6.57 hectáreas en Bandajoz España. Sin embargo, su cultivo se abandonó desde 1984, ya que produce mucha más atropina que escopolamina, que es el compuesto de mayor interés. Este cultivo ha sido reemplazado por el de Datura innoxia, de la que en 1987 se cultivaron 350 hectáreas por esta misma empresa (T. Adzet Porredón, comunicación personal \*).

\* Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, España.

En México, D. innoxia es una especie que se encuentra naturalmente distribuida a lo largo de toda la república, desde Sinaloa hasta Yucatán; no obstante no ha sido estudiada para su posible domesticación, lo cual permitiría el desarrollo de la tecnología para su explotación racional. Esto sería de particular importancia, ya que en el país la atropina y la escopolamina son compuestos que se importan en su totalidad, representando una salida de divisas importante.

Además de Atropa y Datura, existen otros géneros de la familia Solanaceae, que tienen la capacidad de sintetizar estos alcaloides, tales como Hyoscyamus, Scopolia, Solandra, Duboisia y Brygmannia. Sin embargo, hay una gran variabilidad tanto en el rendimiento total de alcaloides, como en el tipo de alcaloides producidos. Esta variación es notable aún en el mismo género y especie y esta en función de condiciones geográficas, climatológicas, etapa fenológica de la planta, existencia de razas químicas, híbridos, etc. (Evans, 1979). Por estas razones resulta de interés el estudio de otras posibles alternativas para la producción de estos alcaloides.

Por todo lo anteriormente mencionado, se planteó la conveniencia de investigar y desarrollar las condiciones para establecer cultivos de callo de Datura innoxia Mill \*, utilizando material biológico colectado en México y determinar el contenido

\* La descripción original de la especie se hizo bajo el nombre de Datura innoxia, no con el de Datura innoxia. Con este criterio en el presente trabajo se emplea el nombre original (R. A. Bye, comunicación personal).

de alcaloides totales en callos derivados de diferentes explantes, al ser sometidos a diversas condiciones en cuanto a medios de cultivo empleados, tipos y concentración de hormonas vegetales y otros factores. Además de detectar la presencia de atropina y escopolamina en cultivos indiferenciados.

## ANTECEDENTES

### a) BIOSINTESIS DE HIOSCIAMINA Y HIOSCINA.

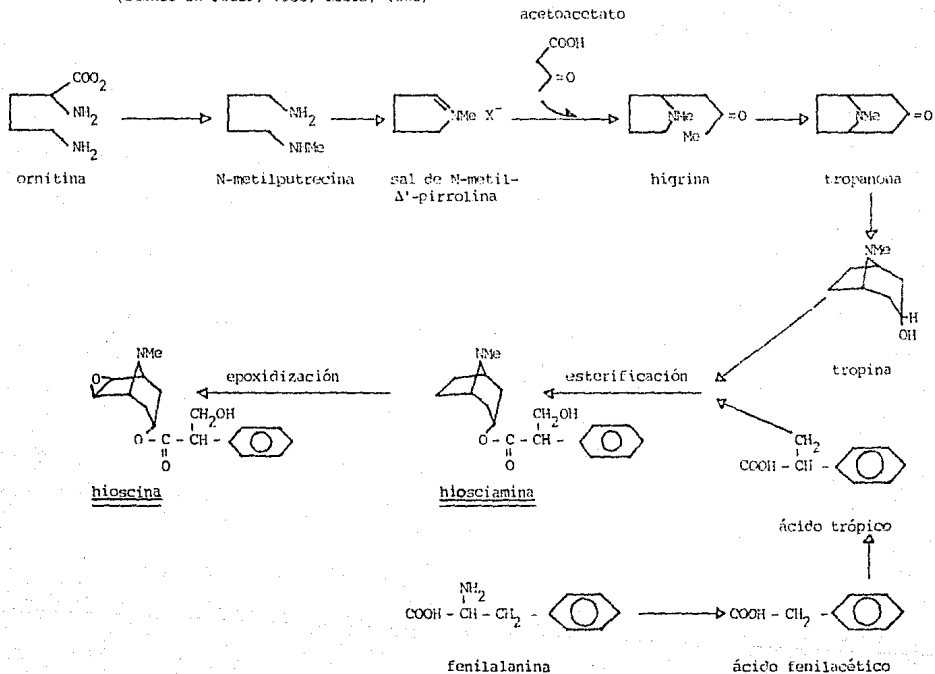
Dada la importancia farmacológica de estos alcaloides, se han llevado a cabo numerosas investigaciones con el fin de elucidar su vía metabólica. Se ha establecido, que la síntesis de estos alcaloides implica la esterificación de 2 moléculas; por un lado la tropina, que es básica y aporta el N como grupo amino a la molécula (Fodor, 1971); por otro el ácido trópico, cuya formación involucra una desaminación y un rearrreglo intramolecular de la cadena lateral de la fenilalanina ( Fodor, 1968).

La tropina por su parte, se biosintetiza a partir de la ornitina (aminoácido que a su vez deriva del ácido glutámico), e involucra reacciones de metilación, descarboxilación, oxidación y condensación con el acetoacetato, para formar la higrina. Esta última se incorpora posteriormente para constituir la tropina, probablemente vía dehidrohigrina y tropanona (Leete, 1980), o bien vía ésteres de la higrolina (McGraw et al., 1982) en el caso del género Datura.

La hioscina es el producto final de esta ruta biosintética y se forma de la epoxidización de la L-hiosciamina. Esta reacción toma lugar probablemente vía 6B-hidroxi-hiosciamina con la pérdida de los hidrógenos Beta del C-6 y C-7; esta es una reacción interconvertible, pero por su misma cinética se ve favorecida hacia la formación de la hioscina (Leete, 1980; Hashimoto et al., 1987; Staba, 1980). En la figura No 1, se presentan en forma resumida los principales eventos de la biosíntesis de estos

FIGURA 1.- Principales eventos de la Biosíntesis de la hioscina y la hiosciamina.

(basado en Podor, 1968; Leite, 1980)





alcaloides (basado en Fodor, 1968; Leete, 1980).

El sitio de síntesis de la hiosciamina y la hioscina en la planta ha sido objeto de discusión, pero en general se ha planteado la necesidad de la presencia de la estructura de la raíz para la eficiente incorporación de la fenilalanina en el ácido trópico (Staba, 1968; Nowacky, 1978), por lo tanto se señala a la raíz como sitio de síntesis para la hiosciamina. En cuanto a la hioscina hay evidencias de que pueda llevarse a cabo en las partes aéreas de la planta (hojas) (Yamada y Endo, 1984) y/o en la raíz (Hashimoto y Yamada, 1983; Hashimoto et al., 1986; Oksman-Caldentey et al., 1987). Sin embargo, se ha visto que la adición de fenilalanina, ácido trópico, ornitina, tropina, higrina y otros precursores a cultivos *in vitro*, puede aumentar la producción de los alcaloides del tropano, aunque su efecto varía en las diferentes especies (Aitchinson et al., 1977; Leete, 1980; Staba, 1980; Kitamura et al., 1986).

#### b) FUENTES PRODUCTORAS DE ALCALOIDES DEL TROPANO.

Los alcaloides del tropano constituyen un grupo de metabolitos secundarios que se encuentran en varios géneros de la familia Solanaceae. En la tabla 1, se presenta brevemente como esta distribuida la síntesis de los alcaloides del tropano dentro de la familia (basado en Evans, 1979).

Existe una gran variación en cuanto a la composición y contenido de estos alcaloides entre los diferentes géneros, así en Atropa belladonna L. se citan contenidos que van desde 0.2 % \*\*

\*\* En el presente trabajo todos los porcentajes de alcaloides están dados en base al peso seco, cuando no es así se especifica.

TABLA 1.- PRODUCCION DE ALCALOIDES DEL TROPANO EN LA FAMILIA SOLANACEAE (EVANS, 1979)

TRIBU	SUBTRIBU	ALCALOIDES DEL TROPANO	GENEROS QUE CONTIENEN HIOSCIAMINA Y/O HIOSCINA
Mitandreae		Un solo genero que sintetiza higrina y tropinona	
Solaneae	Lyciinae	Solo 3 generos que sintetizan del tipo de la hiosciamina	Atropa, Latua y Achnistus
	Hyoscyaminae	Todos lo generos sintetizan del tipo hiosciamina-hioscina	Scopolia, Hyoscyamus, Physochlaina y Przewalskia
	Solaninae	Solo 2 generos que sintetizan tigoyl esteress	
	Mandragorinae	Grupo heterogeneo, solo 2 generos sintetizan alcaloides del tropano	Mandragora y probablemente Salpichroa
Datureae		Todas las especies producen un rango amplio de alcaloides del tropano, particularmente del tipo hiosciamina-hioscina	Datura, Solandra y Brugansia
Cestreae		no se reportan alcaloides del tropano	
Salpiglossideae		Alcaloides del tropano restringidos a 3 generos australianos, frecuentemente junto con alcaloides derivados del pirrol	Duboisia, Anthocersis y Anthotroche

a 1.0 % de alcaloides totales, de los cuales la atropina (DL-hiosciamina) es el principal componente (Henry, 1949), aunque estas concentraciones varían en las diferentes partes de la planta. Así, en la raíz se reportan concentraciones de 0.340 % de atropina y de 0.008 % de escopolamina, en tanto que en tallos se han encontrado contenidos de hasta 0.15 % de atropina y sólo trazas de escopolamina (Kamada et al., 1986).

En Hyoscyamus muticus L. se presenta también una variación en el contenido de alcaloides del tropano en función tanto de la etapa fenológica de la planta como de la parte anatómica de la misma. De acuerdo con algunas investigaciones, en la hoja se alcanza un máximo de 0.4 % de escopolamina justo antes de la floración, en tanto que el mayor contenido de hiosciamina (1.2 %) ocurre durante la época de floración en pleno. En la raíz no se presentan variaciones tan evidentes en las diferentes etapas fenológicas, pero sí hay una tendencia a que se incremente la concentración de hiosciamina (0.5 %) durante la maduración del fruto; así como de escopolamina (0.19 %) antes de la floración (Sharma et al., 1986). Por otra parte se ha encontrado que aún cuando existe una gran variabilidad en el contenido de estos alcaloides entre las plantas de una misma población, en general hay de 2 a 6 veces más hiosciamina que escopolamina (Oksman-Caldentey et al., 1987).

Del género Scopolia se han estudiado varias especies, encontrándose que en rizomas de S. carniolica Jacq. los contenidos de los alcaloides totales varían de 0.43 % a 0.51 %, siendo en su mayor parte hiosciamina y hioscina (Henry, 1949). Por otra parte, en las hojas de S. japonica Maxim. el contenido

de alcaloides totales reportado es de 0.18 %, que en su mayor parte fueron hiosciamina y norhiosciamina (Henry, 1949). En otros estudios con S. parviflora Nakai, se han reportado concentraciones de 0.340 % en rizoma y de 0.043 % de alcaloides totales en la hoja (Tabata et al., 1972).

El género Duboisia resulta de amplio interés, ya que las plantas de este género pueden sintetizar tanto alcaloides del tropano como de la piridina. Además, dentro de los alcaloides del tropano producen principalmente escopolamina (Cosson y Vaillant, 1976; Evans, 1979).

Así, para plantas de D. myoporoides F. Muell, existen reportes en los que se menciona que el contenido de escopolamina varía de 0.185 % a 0.470 % dependiendo de las condiciones de temperatura y fotoperíodo y que el contenido de hiosciamina fluctúa entre 0.032 % y 0.160 % bajo las mismas condiciones. Cuando las plantas se mantienen a temperaturas de 24 °C durante el día y de 22 °C por la noche y con un fotoperíodo de 16 horas luz, el contenido de escopolamina ha alcanzado hasta 0.680 % (Cosson y Vaillant, 1976).

En esta misma especie, se han encontrado concentraciones de 0.175 % de escopolamina 0.100 % de atropina en la hoja; de 0.035% de escopolamina y 0.203 % de atropina en tallos y de 0.006 % de escopolamina y 0.014 % de atropina en la raíz. Es interesante hacer notar el bajo contenido de estos alcaloides en la raíz, que es el órgano propuesto como sitio de síntesis, esto probablemente sea debido a que se ha registrado una alta actividad de la atropina esterasa en este órgano, lo cual no sucede en la hoja que es donde se acumulan en mayor cantidad los alcaloides del

tropano en esta especie (Kitamura et al., 1985).

D. hopwoodii F. Muell difiere de las otras especies de este género en que tiene mayor proporción de alcaloides derivados de la piridina y es importante resaltar, que si bien en las hojas el principal alcaloide es la nornicotina, en la raíz es la hioscina, que llega a representar hasta el 55.6 % del total de alcaloides en este órgano (Luarantana y Griffin, 1982).

Existen reportes en los que se ha demostrado la existencia de hiosciamina y de hioscina en las especies del género Mandragora, tales como M. officinarum L., M. autumnalis Bestrol. y M. vernalis Bartrol. (Jackson y Berry, 1979).

Las plantas pertenecientes al género Solanandra, tienen también la capacidad de biosintetizar alcaloides del tropano, aunque han sido menos estudiadas que otros géneros. Sin embargo, se ha encontrado que el contenido en plantas de S. laevis Hook es del orden de 0.16 %, en su mayor parte hiosciamina (Hebry, 1949). Otras especies en las que se ha estudiado el contenido de alcaloides del tropano son S. longiflora Tuss., S. guttata Dun. S. glandiflora Swartz, y S. hirsuta Don., encontrándose en todos hiosciamina como principal alcaloide (Evans, 1979).

Del género Datura, son varias las especies estudiadas, pero destacan D. metel L., D. stramonium L. y D. inoxia Mill. En estas especies como en otras ya mencionadas, el contenido de alcaloides fluctua en función de diversos factores. En el caso de D. metel, se observa un aumento gradual en la concentración de alcaloides totales conforme la planta avanza en su desarrollo hasta alcanzar 0.62 % en la raíz cuando la planta tiene una edad de 3 a 4 meses. En cuanto al contenido de alcaloides en diferentes órganos de la

planta (ver tabla 2), se puede observar que mientras el mayor contenido de hioscina esta en la semilla, la apostropina es más abundante en la raíz, que por otro lado es el órgano donde la acumulación de hioscina es menor (Bí et al., 1985).

En las partes aéreas de D. innoxia, se reporta que existe una mayor concentración de escopolamina que de hiosciamina y una relación inversa en la raíz, como puede verse en la tabla 3 (Witte et al., 1987). Como en D. metel, también en D. innoxia el contenido de alcaloides totales se ve afectado por la etapa fenológica de la planta, alcanzando su nivel más alto durante la etapa reproductiva (Nandi y Chatterjee, 1975). En la tabla 4 se presentan las variaciones en el contenido de alcaloides totales en diferentes órganos de plantas de D. innoxia en función de diferentes etapas fenológicas.

Se han estudiado también los efectos de las condiciones edáficas, de humedad y estrés salino sobre la síntesis de alcaloides del tropano en D. innoxia, pudiendose notar que las condiciones edáficas y de humedad afectan tanto al desarrollo de la planta y la cantidad de semillas producidas, como al contenido total de alcaloides (Kapahi y Sorin, 1978).

Cuando las plantas de D. innoxia se someten a estrés salino, la concentración de alcaloides del tropano se ve incrementada. Por ejemplo, se ha obtenido una concentración de 0.44 % en hojas de plantas sometidas durante 15 días a tratamiento de estrés, contra 0.15 % en hojas de las plantas control. Sin embargo, este efecto no se manifiesta en las raíces, donde el contenido de alcaloides fue de 0.71 % en las plantas sometidas a estrés, que es ligeramente menor que el observado en las plantas sin tratar

TABLA 2.- CONTENIDO DE ALCALOIDES DEL TROPANO EN  
 DIFERENTES ORGANOS DE *Datura metel*  
 (Bi et al., 1985)

ORGANO	HIOSCINA (%)	APOATROPINA (%)
Raiz	0.0931	0.1280
Hoja	0.4900	0.5300
Fruto	0.4870	0.0181
Semilla	1.000	0.0964

TABLA 3.- CONTENIDO DE ALCALOIDES DEL TROPANO EN  
 DIFERENTES ORGANOS DE *Datura innoxia* Mill  
 (Witte et al., 1987)

ORGANO	ESCOPOLAMINA % DE PESO FRESCO	HIOSCIAMINA % DE PESO FRESCO
Raiz	0.0100	0.0172
Hoja	0.0250	0.0054
Tallo	0.0019	0.0025
Flor	0.052	0.0042

TABLA 4.- CONTENIDO DE ALCALOIDES TOTALES DE *Datura innoxia*  
 EN DIFERENTES ORGANOS Y TRES ETAPAS FENOLOGICAS  
 (Nandi y Chatterjee, 1975)

ETAPA FENOLOGICA	ALCALOIDES TOTALES (%)		
	HOJA	TALLO	RAIZ
Prerreproductiva	0.35	0.22	0.29
Reproductiva	0.49	0.30	0.36
Postreproductiva	0.41	0.24	0.31

(0.77 %) en un periodo de tiempo igual (Brachet y Cosson, 1986).

Se ha evaluado además la respuesta de plantas de D. innoxia a la aplicación de diferentes fertilizantes, tales como: sulfato de amonio, superfosfato de amonio, nitrato de potásio dibásico y mezcla de sulfato de amonio con superfosfato de amonio 1:1. La mejor respuesta se obtuvo al fertilizar con nitrato de potásio, tanto para la producción de biomasa por planta (22.7 g en peso seco considerando únicamente hojas y flores) como para el contenido de alcaloides totales, que fué de 0.38 % en este caso (Sinha y Varma, 1966).

Como se puede apreciar de estas investigaciones, la síntesis de alcaloides del tropano en las diversas especies mencionadas, varía significativamente en función de diferentes factores, como son: las condiciones ambientales, edáficas, etapa fenológica de la planta, etc. (Yamada y Endo, 1984)). Aún en la misma planta se presentan fluctuaciones en las concentraciones de alcaloides en los diversos órganos (hoja, flor, raíz, etc.). A lo anterior hay que agregar el factor genético, ya que dentro de la misma especie hay diferencias entre unas poblaciones y otras (Evans, 1979).

Por todo esto, resulta de interés la búsqueda de vías alternativas para la obtención de los alcaloides del tropano, que permitan tener en alguna forma un control más estricto sobre su producción.

#### **c) CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES EN LA PRODUCCION DE ALCALOIDES DEL TROPANO.**

La aplicación de las técnicas de CTV como vía alterna para la producción controlada de compuestos secundarios vegetales de



interés, esta enfocada a lograr que las células sean capaces de producir y acumular cantidades substanciales de metabolitos secundarios que normalmente se sintetizan en cantidad limitada en las células de la planta intacta; ya sea que se involucre toda la vía biosintética o sólo etapas que comprenden 1 o 2 enzimas, como sucede en la biotransformación (Dix, 1986).

La acumulación del metabolito secundario en cualquier etapa, es el resultado del balance dinámico entre procesos de síntesis, biotransformación y degradación. Esta es una situación muy compleja y es probablemente la razón por la que los estudios que se han llevado a cabo, acerca de las condiciones de cultivo que influyen en la acumulación y síntesis de los metabolitos secundarios, sean hasta el momento básicamente empíricos en su mayoría.

La producción de alcaloides del tropano en cultivos de células ha sido muy variable, aunque en general los contenidos han sido bajos con respecto a los de la planta intacta y en la mayor parte de los casos el alcaloide más abundante ha sido la hiosciamina, aún cuando el cultivo provenga de un tejido rico en escopolamina. Por ejemplo, en cultivos indiferenciados de Datura metel se ha reportado 0.171 % de alcaloides totales, de los cuales únicamente 0.0825 % es escopolamina (Misawa y Samejiina, 1978).

Se ha discutido la posibilidad de que como sucede en las plantas, los metabolitos secundarios sean degradados en el CTV. Sin embargo, esto no se ha probado y en cambio se ha visto que adicionando alcaloides del tropano a cultivos de células en suspensión de Atropa belladonna, ha sido posible recuperarlos

hasta en un 50 a 70 % después de 4 semanas (Bohm, 1978). En otros estudios con Duboisia myoporoidea, se ha reportado la actividad de la atropina esterasa (enzima que degrada la hiosciamina) en la raíz de la planta intacta, en tanto que en cultivos de células de esta misma planta tal actividad no ha sido detectada, por lo que la baja concentración de alcaloides del tropano en los cultivos de células, al parecer no se debe a una degradación enzimática como sucede en la raíz de D. myoporoidea.

Tampoco parece probable que se deba a cambios de origen genético en las células, tales como mutaciones, endorreduplicación, fragmentación nuclear, etc. (Bohm, 1978), ya que al regenerar plantas de cultivos de células en suspensión de Datura innoxia, el patrón original del tipo y concentraciones de alcaloides se recupera (Bhom, 1978; Hiraoka y Tabata, 1974). En ocasiones se ha superado incluso la concentración de alcaloides en las plantas regeneradas con respecto a la original, como se ha reportado en Duboisia leichhardtii F. Muell (Yamada y Endo, 1984), donde se pudo observar que el contenido de atropina y escopolamina en hojas de la planta madre es de 1.38 % y 0.15 % respectivamente, en tanto que en las hojas de las plantas regeneradas es de 1.16 % de atropina y 0.74 % de escopolamina, esto representa 4.9 veces más escopolamina de lo obtenido en la planta original.

Lo anterior demuestra que todo el potencial genético y fisiológico necesario para la síntesis de estos alcaloides esta presente en la célula aislada, pero que hay que encontrar las condiciones adecuadas para superar los procesos de control metabólico de la planta. Sin embargo, hasta el momento no es

posible estimar como es que los tipos de ploidias que se sabe se presentan en los cultivos de células, pueden influir en la expresión de la información genética existente, ya que aunque las plantas regeneradas mantienen cierta inestabilidad genética, esta depende de factores tales como el tipo de explante empleado para generar el cultivo, edad del cultivo in vitro etc. (Reish, 1983). Con respecto a plantas productoras de alcaloides del tropano, se ha visto que en Datura innoxia (Hiraoka y Tabata, 1974) el porcentaje de ploidias va disminuyendo al regenerarse las plantas, siendo muy alto en los cultivos de células (70 % aprox.) y mucho menor en las plantas regeneradas (20 % aprox.).

Básicamente las formas de incrementar la productividad de los cultivos de células vegetales pueden resumirse en:

- 1) La manipulación de varios factores dentro del establecimiento y condiciones de cultivo, de tal manera que todas o la mayoría de las células de la población sean capaces de expresar la vía biosintética involucrada. Estos factores son, por un lado el tejido del que se origina el cultivo y por otro las condiciones en que se cultivan las células.

Estas condiciones pueden ser:

- a) Químicas, tales como las sales de los macro y micronutrientes, hormonas, fuente de carbono, precursores, etc., además de otros componentes que pueden inducir estrés, como la adición de compuestos inductores (elicitores), de sustancias que aumenten la presión osmótica, etc.

- b) Físicas, como la intensidad y calidad de la luz, fotoperíodo, temperatura, etc.

- 2) El estudio de las rutas de síntesis, de las enzimas

involucradas, etc.

- 3) La selección de líneas hiperproductoras estables. Si bien este aspecto ha presentado cierta dificultad, ya que generalmente las líneas seleccionadas no mantienen su alta productividad por tiempos largos.
- 4) Por último en una etapa posterior están los aspectos referentes a la bioingeniería, como el desarrollo de un tanque de cultivo adecuado para la producción a gran escala (Dix, 1986; Becker, 1987; Fujita y Yamada, 1987).

Los aspectos a considerar dentro del primer punto son complejos, y por lo tanto es conveniente revisarlos.

#### 1) ORIGEN DEL EXPLANTE.

La selección del material apropiado para iniciar el cultivo ha sido objeto de controversia, ya que como se ha mencionado se considera que las células de cultivos in vitro son totipotentes, y por ende cualquier célula debe poder reproducir las características de la planta madre bajo las condiciones adecuadas. De acuerdo a esto se ha planteado la conveniencia de iniciar los cultivos in vitro a partir de plantas con altos rendimientos, no obstante los resultados reportados en diversos trabajos son muy contradictorios, aún en investigaciones con la misma especie. Así, por ejemplo al estudiar la respuesta de Catharanthus roseus, ZenK et al., 1977 (citado en Fowler, 1983) observaron que plantas hiperproductoras originaban cultivos altamente productores y viceversa; en tanto que Roller, 1978 (citado en Fowler, 1983) no encontró ninguna relación entre el contenido de serpentina en callos y el de las plantas de las que

fueron originados. No obstante, al parecer no existen reportes que indiquen la obtención de cultivos altamente productores que se originen de plantas con bajos rendimientos (Fowler, 1986).

Igualmente conflictiva es la selección del tejido que se toma como explante, pero al parecer hay evidencias de que aun cuando los cultivos rara vez exhiben características idénticas a las de los tejidos que los originaron, si presentan propiedades específicas que se mantienen por largo tiempo (Meins, F., 1986). Así por ejemplo el patron de isoenzimas en los extractos de cultivos en suspensión, iniciados de raíz, hipocótilo y cotiledón de la misma planta, son diferentes y esta diferencia se mantiene por mucho tiempo. Por otro lado, se ha observado que en cultivos derivados de distintos tejidos de plántulas de lino (Linum usitatissimum), se retienen las mismas características en cuanto a la concentración de la enzima peroxidasa, que aquellas que presentaron los tejidos de los cuales se originaron. Sin embargo existen otros reportes en los que no se ha observado relación alguna entre las concentraciones de metabolitos secundarios en los cultivos y la concentración de los mismos en los tejidos que sirvieron como fuente del explante (Staba, 1982). De hecho, bajo el principio de la totipotencialidad, cualquier célula de cualquier parte de la planta debe tener la capacidad de expresar las características de la planta madre.

En los estudios efectuados con plantas productoras de alcaloides del tropano, se han usado diversos explantes como hoja, tallo, rizoma, puntas apicales y brotes florales sin que en general se hayan reportado diferencias notables en el contenido de alcaloides de los cultivos derivados de ellos (Tabata e

Hiraoka, 1976). No obstante, en los cultivos desarrollados a partir de los órganos que sintetizan el metabolito de interés, podría esperarse que los controles de represión no se encuentren activos y por lo tanto, la posibilidad de que se exprese la vía biosintética que implica la formación del compuesto buscado, sea mayor. Como se ha mencionado, aún en algunos casos en los que en la planta madre la producción de tales metabolitos se realiza sólo en determinadas etapas fenológicas, o bien su expresión esta aparentemente relacionada con otras actividades morfológicas y bioquímicas del organismo, ha sido posible observar en ocasiones la producción del metabolito secundario en células no especializadas en cultivos *in vitro* bajo determinadas condiciones.

Considerando todos estos aspectos, resulta aconsejable tomar el explante de la planta y órgano que produzcan la mayor cantidad del metabolito deseado (Staba, 1982).

#### 11) CONDICIONES DE CULTIVO.

Las condiciones de cultivo, tanto físicas como químicas, pueden ser manipuladas con el fin de permitir la expresión del metabolismo secundario, ya sea induciendo y/o activando algunas enzimas o por el contrario ejerciendo el efecto inverso en el caso de posibles enzimas que repriman la vía secundaria.

De los factores involucrados, probablemente uno de los que más influyen es la composición del medio de cultivo. La base de todos los medios de cultivo, es una mezcla de sales que comprende a los macro y micronutrientes, junto con una fuente de carbono. Sin embargo, para poder iniciar y mantener tanto el cultivo,

indiferenciado en este caso, como las características de expresión genética deseadas, es necesario agregar otros compuestos tales como vitaminas y reguladores del crecimiento (auxinas, citocininas, etc.).

Las auxinas tiene efectos substanciales en la desdiferenciación celular y tanto estas como las citocininas, tienen efectos en la síntesis y rendimientos de los metabolitos secundarios. Es importante hacer notar que para cada especie que se ensaya deben establecerse los requerimientos adecuados de los reguladores del crecimiento.

En relación con lo anterior, se ha visto que al comparar los contenidos de alcaloides totales en cultivos de células de Hyoscyamus muticus, mantenidos en medios suplementados con ANA, AIA o 2,4-D la máxima concentración (0.067 %) se registró cuando se usó AIA a una concentración de  $2 \times 10^{-5}$  M (Koul et al., 1983), en tanto que para ANA y 2,4-D la mayor concentración fue de  $10^{-5}$  M, detectándose 0.029 % y 0.038 % de alcaloides totales respectivamente.

Al comparar los contenidos de alcaloides del tropano alcanzados en cultivos de Datura metel, empleando las mismas auxinas a concentraciones de 1, 3 y 5 ppm, se encontró que el máximo valor (0.017 %) se presentó cuando se empleó ANA a 1 ppm y fue disminuyendo al aumentar la concentración de la auxina. Por otro lado cuando se empleó AIA o 2,4-D, si bien se encontró un mayor contenido de alcaloides en concentraciones de 1 ppm (0.09 % y 0.045 % respectivamente), la cantidad de alcaloides fue menor a concentraciones de 3 ppm que cuando se usaron a 5 ppm donde se recuperó más del 50 % de alcaloides totales con respecto a lo

obtenido cuando se empleó la auxina a 1ppm. Aún cuando se detectó escopolamina en las 3 concentraciones empleadas de ANA, el máximo contenido se observó cuando se empleó AIA a 1 ppm, en ninguna de otras concentraciones de AIA ni de las 3 de 2,4-D se detectó la presencia de escopolamina (Khanna y Khanna, 1976).

En callos de Scopolia acutangulus (Kuang-Chi y Cheng, 1981) se ha observado que bajas concentraciones de 2,4-D estimulan la síntesis de alcaloides pero retardan el crecimiento, en tanto que altas concentraciones promueven el crecimiento pero inhiben la síntesis. El máximo contenido de escopolamina se obtuvo al utilizar una concentración de 0.2 mg/l de 2,4-D. Por otro lado el ANA estimuló notablemente el crecimiento celular cuando se administró a una concentración de 1.5 mg/l, sin embargo, al emplearse a una concentración de 2.0 mg/l se obtuvo la mayor cantidad de alcaloides, sobre todo de escopolamina

En este mismo estudio, pudo detectarse que en general la cinetina inhibe ligeramente tanto el crecimiento del cultivo como la síntesis de alcaloides, no obstante, si los callos se cultivan en un medio sin cinetina y 2 semanas después se transfieren a un medio con 1.0 mg/l de cinetina, la concentración de alcaloides se ve aumentada considerablemente, en especial la escopolamina la cual alcanza hasta 0.485%.

En cuanto al efecto de las citocininas, en Hyoscyamus niger (Hashimoto y Yamada, 1987) se ha mencionado que la BA no ejerce un efecto significativo sobre la concentración de alcaloides del tropano, mientras que en Datura tatula la cinetina no afecta al crecimiento celular pero baja los rendimientos de alcaloides totales, lo que no sucede en Scopolia maxima donde la cinetina



promueve la síntesis de alcaloides (Mantell y Smith, 1983).

En contraste con estas observaciones se cita que en Atropa belladonna al compararse los contenidos de alcaloides totales en callos mantenidos en medios suplementados con cinetina en combinación con 2,4-D, ANA ó AIA y medios con BA sola o conteniendo ANA, no se encontraron diferencias notables, aún cuando presentaron respuestas morfológicas diferentes (Benjamin et al., 1987).

En otros estudios con cultivos de células en suspensión de Anisodus acutangulus (Scopolia acutangulus) se ha observado que cuando se suplementa con cinetina (0.1 mg/l) y fenilalanina (5mM), los cultivos de 12 días incrementan tanto el crecimiento celular como el rendimiento de alcaloides, en particular la hiosciamina que se eleva de 0.0203% a 0.0217% y la hioscina que se incrementa de 0.0178% a 0.0412% (Zheng, 1986).

La adición de precursores de los alcaloides del tropano al medio de cultivo, presenta a menudo respuestas contradictorias en cuanto a los rendimientos. Para poder explicar esto, deben tenerse en cuenta todas las interacciones posibles que conducen a estas respuestas, por ejemplo, se sabe que en el caso de los aminoácidos estos pueden actuar no sólo como precursores, sino también como inductores del metabolismo secundario. Además, como el aminoácido se adiciona al medio externo, el problema puede ser el que alcance o no el sitio de síntesis del metabolito dentro de la célula (Bohm, 1978).

Existen reportes que indican que la adición de ornitina o fenilalanina, solas o en combinación a cultivos de Atropa belladonna incrementa el contenido de alcaloides, en especial

promueve la síntesis de alcaloides (Mantell y Smith, 1983).

En contraste con estas observaciones se cita que en Atropa belladonna al compararse los contenidos de alcaloides totales en callos mantenidos en medios suplementados con cinetina en combinación con 2,4-D, ANA ó AIA y medios con BA sola o conteniendo ANA, no se encontraron diferencias notables, aún cuando presentaron respuestas morfogénicas diferentes (Benjamin et al., 1987).

En otros estudios con cultivos de células en suspensión de Anisodus acutangulus (Scopolia acutangulus) se ha observado que cuando se suplementa con cinetina (0.1 mg/l) y fenilalanina (5mM), los cultivos de 12 días incrementan tanto el crecimiento celular como el rendimiento de alcaloides, en particular la hiosciamina que se eleva de 0.0203% a 0.0217% y la hioscina que se incrementa de 0.0178% a 0.0412% (Zheng, 1986).

La adición de precursores de los alcaloides del tropano al medio de cultivo, presenta a menudo respuestas contradictorias en cuanto a los rendimientos. Para poder explicar esto, deben tenerse en cuenta todas las interacciones posibles que conducen a estas respuestas, por ejemplo, se sabe que en el caso de los aminoácidos estos pueden actuar no sólo como precursores, sino también como inductores del metabolismo secundario. Además, como el aminoácido se adiciona al medio externo, el problema puede ser el que alcance o no el sitio de síntesis del metabolito dentro de la célula (Bohm, 1978).

Existen reportes que indican que la adición de ornitina o fenilalanina, solas o en combinación a cultivos de Atropa belladonna incrementa el contenido de alcaloides, en especial

al agregarse juntas y adicionandose al 35avo. día de iniciado el cultivo, cuando se encuentra en la fase estacionaria. En estas condiciones la concentración de alcaloides totales ha podido incrementarse hasta 0.06% (Benjamin et al., 1987).

En hyoscyamus muticus la adición de la ornitina junto con el ester del acetoacetato y ácido cítrico como agente reductor, incrementa la concentración de alcaloides del tropano hasta 2.5 veces con respecto al control (Koul et al., 1983). Por otro lado al agregar N-metilputrescina ó fenilalanina a cultivos de H. niger al principio de la incubación, los rendimientos de alcaloides se elevan; en tanto que al agregar un precursor más cercano como la tropina, el efecto inductor es más marcado si se adiciona a los 12 días de iniciado el cultivo.

El precursor que más incrementa el contenido de los alcaloides del tropano en H. niger es el ácido trópico, tanto si se adiciona al principio como a los 12 días del inicio del cultivo. No obstante, al añadir el ácido trópico en una concentración de 1 mM el crecimiento se ve inhibido, esto puede evitarse agregando ácido carboxílico cuando el cultivo se encuentra a la mitad del periodo de crecimiento (Hashimoto y Yamada, 1987).

En estudios efectuados con Scopolia parviflora, se ha reportado que al adicionar individualmente fenilpiruvato, L-fenilalanina, L-ornitina o L-prolina al medio de cultivo, no se observa ningún efecto sobre la concentración de alcaloides, pero el crecimiento se reduce en un 60% (Tabata et al., 1972).

En contraste, investigaciones con Duboisia leichhardtii no han detectado ninguna influencia del ácido trópico, a

concentraciones entre 1.0 mM y 9.1 mM, sobre la síntesis de los alcaloides del tropano y en cambio a concentraciones de 1.0 mM se registra una inhibición del crecimiento (Yamada y Endo, 1984).

Estudios en callos provenientes de hojas o semillas de Datura stramonium y D. tatula, han demostrado que la administración de fenilalanina al medio provoca que se incrementen los niveles de alcaloides. Sin embargo, en otros estudios con callos generados de raíz de D. stramonium, se ha observado que sólo la adición de ornitina y ácido trópico juntos incrementa el nivel de alcaloides (Aitchinson et al., 1977).

Como se mencionó, se ha reportado que la adición del ácido trópico a cultivos de Scopolia parviflora, provoca un incremento en la concentración de alcaloides del tropano, lo que no sucede al suplementar el medio con fenilalanina, ácido fenilpiruvico u ornitina. Esta misma respuesta se ha observado en cultivos de Datura innoxia y sugieren una posible represión de la síntesis del ácido trópico a partir de la fenilalanina (Aitchinson et al., 1977). No obstante en otros trabajos se ha encontrado positiva la administración de ornitina, fenilalanina, tirosina y N-fenilpiruvato para la síntesis de alcaloides del tropano en cultivos de células de Datura sp., pero debido a que al mismo tiempo se observa una inhibición en el crecimiento del cultivo, no es posible saber si es una influencia directa o indirecta sobre el metabolismo secundario (Bohm, 1978).

Se ha mencionado que los alcaloides del tropano se sintetizan a partir de algunos intermediarios del ciclo de Krebs, por lo tanto la adición de ácidos orgánicos de este ciclo al medio de cultivo, podrían promover no sólo el crecimiento

celular, sino también la síntesis de estos alcaloides (Kuang-Chi y Cheng, 1981). Basados en esta posibilidad, se han realizado experimentos suplementando el medio con algunos ácidos orgánicos y se ha observado que en Scopolia acutangulus la administración de los ácidos succínico, cítrico, málico y acetoglutárico, favorecen el crecimiento de los cultivos pero reducen el contenido de los alcaloides, en especial el de la escopolamina. Por otro lado cuando se agrega ácido fumárico se incrementa la concentración de estos alcaloides, principalmente el de la hiosciamina, no obstante el crecimiento se ve inhibido en un 27% con respecto al control. La administración de succinato de sodio al medio de cultivo incrementa tanto el crecimiento como la concentración de alcaloides en cultivos en suspensión de Hyoscyamus muticus (Koul et al., 1983).

En lo referente a la fuente de carbono, se ha mencionado que en general una elevación del contenido de sacarosa, da como resultado un incremento en los rendimientos de metabolitos secundarios en cultivos in vitro. Probablemente este efecto sea debido a un aumento en la presión osmótica, causando un efecto de estrés que podría explicar el incremento en la producción de varios metabolitos secundarios (Collinge, 1986). En apoyo a esta propuesta se ha observado que en cultivos de células de tabaco (Nicotiana sp.) adicionados con 5% de sacarosa, esta no se agota como sucede cuando se inicia el cultivo con niveles más bajos de sacarosa (Mantell y Smith, 1983).

Sin embargo, en la producción de alcaloides del tropano, se ha visto que al probar concentraciones de 1, 3 y 5% de sacarosa en cultivos de células en suspensión de Hyoscyamus muticus, los

resultados indican que a 5% se obtiene el máximo crecimiento a los 21 días de iniciado el cultivo, pero el porcentaje de alcaloides totales es de sólo 0.018% a la segunda semana y es aún menor después de ese tiempo. Finalmente, la concentración de alcaloides más alta se observa en los cultivos mantenidos con 1% de sacarosa en la cuarta semana, correspondiéndoles el valor más bajo en cuanto a crecimiento (Koul et al., 1983).

Otro aspecto que se ha evaluado es el efecto de la adición de componentes complejos al medio, sobre el crecimiento y la síntesis de alcaloides. y se ha observado que en cultivos de callos de Scopolia parviflora la administración de 2 g/l de casaminoácidos, de peptona o extracto de levadura, elevan el contenido de los alcaloides totales a 0.012%, 0.016% y 0.017% respectivamente en comparación con 0.003% del cultivo control (Tabata et al., 1972).

En otras observaciones se menciona también que al añadir lactoalbumina hidrolizada, peptona o extracto de levadura a cultivos de Scopolia acutangulus, se aumenta la concentración de alcaloides, pero para el caso de los dos últimos compuestos, el crecimiento se ve severamente reprimido, lo que no ocurre con la adición de la lactoalbúmina hidrolizada, donde en particular la concentración de escopolamina alcanza un valor de 0.149% mientras que en el control fué de 0.033% (Kuang-Chí y Cheng, 1981).

Las vitaminas son componentes de los medios de cultivo, que han sido poco evaluadas en cuanto a su efecto sobre la formación de alcaloides del tropano. Sin embargo, se ha experimentado con cultivos en suspensión de Hyoscyamus muticus manteniéndolos en un medio que contiene, las sales del medio MS, sacarosa al 3% y ANA

en una concentración de  $10^{-5}$  M, pero variando la fuente de vitaminas. Así se ha observado que cuando el medio carece de vitaminas, el crecimiento es lento y no se detecta la presencia de alcaloides, mientras que cuando se emplea el medio suplementado con las vitaminas normales del medio MS, se obtiene una respuesta positiva tanto para el crecimiento como para la acumulación de alcaloides del tropano; habiéndose reportado hasta 0.032% en la 4a. semana de iniciado el cultivo. Por otra parte, en presencia de las vitaminas del medio RF (que es un medio modificado para el cultivo de células de tabaco, y que contiene un mayor número y concentración de vitaminas que el MS), la concentración de alcaloides alcanza sólo un valor de 0.016% durante la segunda semana de cultivo y declina rápidamente después de ese tiempo; bajo esta condición el crecimiento es ligeramente menor con respecto al medio con vitaminas del MS (Koul et al., 1983).

Otros componentes del medio que pueden influir en la producción de alcaloides son los macro y micronutrientes. Hay varios ejemplos que muestran que una reducción en la concentración de estas sales, particularmente de nitratos, amonio y fosfatos puede resultar en un incremento del contenido de los metabolitos secundarios (Morris et al., 1985; Becker, 1987; Fujita y Tabata, 1987). En este sentido, se ha visto que niveles bajos de fosfatos (0.02 mM), dejando el usual de nitrógeno total (60 mM), favorecen la concentración de alcaloides del tropano en cultivos en suspensión de Hyoscyamus niger, aunque inhiben el crecimiento (Hashimoto y Yamada, 1987).

Anteriormente se hizo mención, de que las condiciones ambientales de cultivo también pueden afectar el rendimiento de los metabolitos secundarios (Fowler, 1983; Mantell y Smith, 1983; Morris et al., 1985). De acuerdo a ello, se ha tratado de establecer el efecto de la luz sobre la síntesis de los alcaloides del tropano, siendo los resultados contradictorios, ya que mientras en cultivos de Scopolia japonica aparentemente inhibe su formación (Mantell y Smith, 1983), en cultivos de células de Datura sp. se detecta un mayor contenido de alcaloides en cultivos mantenidos bajo una luz intensa que los que se mantuvieron a baja intensidad luminosa (Bohm, 1978).

Otro aspecto que se ha estudiado con resultados interesantes, ha sido la aeración en los cultivos en suspensión, ya que se ha visto que un aumento en el nivel de ésta, resulta en un incremento tanto en el contenido de alcaloides del tropano como en el crecimiento en cultivos de Datura innoxia (Misawa y Sanejima, 1978) y de Hyoscyamus niger (Hashimoti y Yamada, 1987).

En otras investigaciones, se ha reportado que el pH del medio afecta también el contenido de alcaloides totales en cultivos en suspensión de Hyoscyamus muticus de manera que la mayor concentración (0.15%) se detecta a pH de 3.5, pero se observa que el crecimiento celular es mayor a pH's entre 4.5 y 5.0 (Koul et al., 1983).

Los datos hasta aquí descritos en cuanto al efecto de las condiciones químicas del cultivo sobre la producción de alcaloides del tropano, se resumen en la tabla No. 5. Como puede observarse no todos los factores que pueden ser determinantes en



TABLA 5.- FACTORES DEL CULTIVO *in vitro* QUE AFECTAN EL CONTENIDO DE ALCALOIDOS DEL TROPANO EN VARIOS GENEROS DE LA FAMILIA SOLANACEAE

genero y especie	hormonas	precursores	compuestos complejos	otros
<b>Atropa</b>				
belladonna	Cinetina + ANA Cinetina + AIA Cinetina + 2,4-D BA BA + ANA (Benjamin et al., 1987)	Ornitina Fenilalanina (Benjamin et al., 1987)		
<b>Scopolia</b>				
acutangulus	2,4-D 0.2 mg/l ANA 2.0 mg/l Cinetina (Kuang-Chi y Cheng, 1981)		lactoalbumina peptona extr. de levadura (Kuang-Chi y Cheng, 1981)	Ac. Succinico Ac. citrico acetoglutarico (Kuang-Chi y Cheng, 1981)
	Cinetina y fenilalanina Juntas (Zheng, 1986)			
maxima	Cinetina (Mantell y Smith, 1983)			
<b>parviflora</b>				
		fenilpiruvato fenilalanina ornitina prolina (Tabata et al., 1972)	casaminoacidos peptona extr. de levadura (Tabata et al., 1972)	
<b>japonica</b>				
				presencia de luz (Mantell y Smith, 1983)
<b>Hyoscyamus</b>				
-5				
muticus	AIA 2 x 10 <sup>-6</sup> M (Koul et al., 1983)	Ornitina + acetosacetato + ac. citrico Juntos (Koul et al., 1983)		Succinato de Na Sacarosa 1% Ph 3.5 vitaminas MS Sacarosa 5% vitaminas NT Sin vitaminas (Koul et al., 1983)
<b>niger</b>				
	Cinetina (Hashimoto y Yamada, 1983)	Hetilputrecina Fenilalanina tropina Ac. tropico (Hashimoto y Yamada, 1983)		bajos niveles de fosfatos aeracion (Hashimoto y Yamada, 1987)

TABLA 5.- Continuation.

genero y especie	hormonas	precursores	compuestos complejos	otros
<i>Datura</i> sp.				alto nivel de luminosidad < A.T. (Bohm, 1978)
<i>Inoxia</i>		Ac. tropico < A.T.		Aeracion < A.T. (Misawa y Sanejima, 1978)
		Fenilalanina Ornitina Fenilpiruvato (Aitchinson et al., 1977)	} no afecta A.T.	
		Fenilalanina Ornitina Tirosina Fenilpiruvato (Bohm, 1978)	} < A.T.	
<i>metel</i>	AHA lppm < A.T. AIA lppm < escop (Khanna y Khanna, 1976)			
<i>stramonium</i>		Fenilalanina Fenilalanina + ac. tropico juntos (Aitchinson et al., 1977)	} < A.T.	
<i>tatula</i>	Cinetina < A.T. (Mantell y Smith, 1983)	Fenilalanina < A.T. (Aitchinson et al., 1977)		
<i>Duboisia</i> <i>leichhardtii</i>		Ac. tropico no afecta A.T. (Yamada y Endo, 1984)		

< A.T. = incrementa alcaloides totales  
> A.T. = decrementa alcaloides totales  
< escop = incrementa escopolamina

no A.T. = no produce alcaloides totales  
no afecta A.T. = no afecta produccion de alcaloides  
totales

la producción de estos alcaloides han sido estudiados en todas las especies, por tanto sería difícil indicar afinidades en el comportamiento de estos de acuerdo a su parentesco filogenético. De hecho, como ya se ha mencionado algunos datos resultan aparentemente contradictorios. Todo esto hace evidente la necesidad del estudio más detallado sobre los efectos de estos factores en cada sistema.

En general se puede notar que las condiciones que promueven el metabolismo secundario no son las mismas que se requieren para un óptimo crecimiento. Este es un fenómeno que puede deberse a que mientras el metabolismo primario es un proceso que mantiene a la célula creciendo y reproduciéndose, al parecer el metabolismo secundario no está implicado en estos procesos y por lo tanto su manifestación no está asociada a la división y aumento de volumen de la célula (Mantell y Smith, 1983), sino más bien a procesos de diferenciación y especialización; de hecho, en muchos casos se observa una correlación negativa entre la producción de un compuesto secundario y el crecimiento. Parece además lógico suponer, que si bien en la planta completa la regulación de estas vías (primaria y secundaria), están estrictamente controladas dentro de los programas de desarrollo y diferenciación, en CTV las condiciones de cultivo puedan modificarlas y favorecer la expresión de una u otra vía. Así, cuando prevalecen las condiciones de cultivo que favorecen un rápido crecimiento entonces operarán las rutas del metabolismo primario, pero si por el contrario el crecimiento se bloquea por alguna razón, entonces probablemente se favorecería el que entraran en juego las rutas del metabolismo secundario.

Por estas razones, se ha sugerido el cultivo en 2 etapas para la producción de compuestos secundarios, en este caso el cultivo se desarrolla inicialmente en un medio adecuado para el crecimiento y proliferación celular (acumulación de biomasa) y posteriormente en un medio limitante para el crecimiento pero que sea óptimo para la producción del compuesto deseado (Fowler, 1986; Becker, 1987). Este procedimiento ha sido sugerido para la producción de alcaloides del tropano, particularmente para el cultivo de órganos, en este caso de raíz (Hashimoto et al., 1986).

#### 111) LINEAS SOBREPDUCTORAS Y SU MANTENIMIENTO.

Al principio del inciso c), se hizo mención de que otra forma de mejorar los rendimientos de los cultivos, es la selección de líneas sobreproductoras (Dix, 1986; Fowler, 1986b). Esto puede hacerse tomando como base la variación que ocurre dentro de una población de células cuando se genera callo, a este fenómeno se le conoce como variación somaclonal y hace posible la selección de agregados celulares que provienen de una ó de un grupo reducido de células que hiperproducen el compuesto. Tomando en cuenta este tipo de fenómeno se ha seleccionado una línea hiperproductora denominada H15 proveniente de cultivos de HyoScyamus niger la cual se reporta como altamente productora de hiosciamina (Yamada y Hashimoto, 1982). Sin embargo estas líneas pueden presentar problemas en cuanto a su estabilidad para seguir hiperproduciendo el compuesto.

Otra alternativa para generar líneas sobreproductoras, es mediante el empleo de radiaciones o mutágenos químicos y la

posterior selección de agregados celulares, que por medio de la aplicación de estos métodos tengan como consecuencia una alteración genética, que los conduzca a una mayor producción de tales compuestos. Esta metodología se ha aplicado a cultivos de Anisodus acutangulus (Scopolia acutangulus) que fueron irradiados con 400 R de rayos  $\gamma$ , observándose que tanto el crecimiento como el contenido de escopolamina de las líneas de callos seleccionadas fueron altos y estables (Zheng et al., 1982).

Sin embargo, para la aplicación de estas técnicas es recomendable el contar con un sistema de detección y cuantificación que sea confiable, específico y altamente sensible, capaz de detectar cantidades muy pequeñas del metabolito. Con este fin se han establecido algunas técnicas finas para la detección y cuantificación de los alcaloides del tropano, tales como el radioinmunoensayo (Oksman-Caldentey et al., 1987), enzimoimmunoensayo (Oksman-Caldentey et al., 1987; Fliniaux y Jacquín-Dubreuil, 1987), HPLC, densitometría de cromatografía en placa fina (Duez et al., 1985) o la cromatografía capilar gas-liquido acoplada a espectrofotometría de masas (Witte et al., 1987).

Aun cuando estas metodologías son muy prometedoras, existe el problema, del que ya se hizo mención, de que en varios casos las líneas seleccionadas no mantienen su estabilidad y pueden revertirse nuevamente a su estado original, perdiendo la capacidad de producir cantidades elevadas del metabolito de interés. Una posible solución a esta situación, sería la criopreservación o el mantenimiento a bajas temperaturas de las líneas obtenidas, con el objeto de disminuir el número de

subcultivos necesarios para el mantenimiento del cultivo, que es lo que en general provoca la reversibilidad de las mismas. A este respecto se ha visto, que mientras especies tolerantes a bajas temperaturas como Atropa belladonna, pueden ser buenos candidatos para su mantenimiento por estas estrategias; otras, como Datura innoxia que normalmente es sensible a las bajas temperaturas, no soporta más de 2 meses este proceso sin menoscabo de su viabilidad y productividad (Hiraoka y Kamada, 1983), lo que pudiera crear una situación limitante en la aplicación de esta metodología. Por otro lado, diversos investigadores han aplicado las técnicas de criopreservación a Atropa belladonna, Datura stramonium y Hyoscyamus muticus con resultados positivos particularmente en la última. De estas investigaciones ha sido posible detectar que, tanto la etapa de crecimiento en que se encuentra el cultivo, como el tamaño de las células, son factores importantes para el éxito de este tratamiento (Winthers, 1984).

#### iv) CULTIVOS DE RAIZ.

En la literatura revisada, existen reportes en los que se menciona al cultivo de raíz como otra opción en la producción de alcaloides del tropano. Esto debido a que algunos investigadores se inclinan a pensar que es necesaria la organización morfológica de la raíz, para llevar a cabo una adecuada síntesis de escopolamina en cultivos in vitro. Así, se han establecido cultivos de raíz en Atropa belladonna, Hyoscyamus niger, Scopolia parviflora y Datura innoxia (Deno et al., 1987; Flores et al., 1987; Hamill et al., 1987; Kitamura et al., 1986; Mano et al.,

1986; Shimomura et al., 1986).

Esta técnica representa una alternativa potencial a futuro para la producción de estos compuestos, ya que actualmente aún existen problemas de bioingeniería que deberán superarse antes de pensar en un posible escalamiento de esta técnica a niveles comerciales.

#### v) CULTIVOS DE CELULAS INMOVILIZADAS.

Se maneja aún otra alternativa para la producción de metabolitos secundarios, que es la inmovilización de células. Esta metodología se basa en el concepto de que la agregación celular parece ser importante para la productividad de algunos cultivos, sugiriéndose que un adecuado nivel de agregación puede ser posible sólo en cultivos de lento crecimiento. Esta agregación, da como resultado un mayor contacto intercelular, que sugiere una probable comunicación física y química entre las células y el establecimiento de gradientes también físicos y químicos que pueden ser la clave de la relación entre cierta organización celular y la acumulación de altos niveles del metabolito secundario (Lindsey y Yeoman, 1983; Lindsey y Yeoman, 1986).

Con este criterio se ha aplicado la técnica de inmovilización de células vegetales a plantas productoras de alcaloides del tropano, como es el caso de Datura innoxia, donde se ha observado un patrón y un contenido de alcaloides totales más parecido a los de la planta madre que los que se han reportado para los cultivos de células en suspensión (Lindsey y Yeoman, 1986). Sin embargo, no ha sido posible lograr que estos

alcaloides se liberen al medio, lo cual se ha intentado favorecer añadiendo solventes tales como cloroformo, que si bien ha permitido una liberación ligeramente mayor de los alcaloides al medio, también ejerce un efecto negativo sobre la viabilidad de las células, lo que aún limita la aplicación de este sistema por el momento (Lindsey y Yeoman, 1983b).

Con estos antecedentes, se pretende dar un panorama general del estado actual de la investigación para la producción de alcaloides del tropano, particularmente de la hiosciamina y la escopolamina, mediante el uso de las técnicas de CTV.



## MATERIALES Y METODOS.

### a) MATERIAL BIOLÓGICO.

En la presente investigación se utilizaron semillas de Datura innoxia Mill., las cuales fueron proporcionadas por el Dr. R. Bye\*. Estas semillas fueron empleadas para generar el material biológico necesario para la obtención de explantes. Una parte de las semillas se sembró en macetas de plástico conteniendo la siguiente mezcla de tierra, tierra negra, tierra de hoja y arena de río 1:1:1, para disponer así de un aporte continuo de material vegetal, de la otra parte de las semillas se aislaron directamente los embriones.

Los explantes empleados en este estudio fueron embrión, meristemo, tallo y hoja. Los meristemos fueron aislados a partir de plántulas de 4 semanas de edad a la emergencia. Los tallos y hojas jóvenes de plantas de 3 a 6 meses de edad.

### b) ESTERILIZACION Y SIEMBRA DEL MATERIAL.

Semillas.- La esterilización se realizó sumergiéndolas durante 15 minutos en una solución de cloro al 1.5% (cloralex comercial 30% v/v). Posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se dejaron remojando al menos durante 24 horas, con el objeto de provocar el ablandamiento de la testa y del endospermo, lo que facilitó la extracción del embrión. Lo anterior se realizó en condiciones asépticas bajo una campana de

\* Laboratorio de Etnobotánica del Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM.  
Las semillas correspondían a los números de colecta 14368 y 14384 de su registro personal.

flujo laminar y con la ayuda de un microscopio de disección (Zeiss mod. 47 50 52-9901).

Los embriones aislados se sembraron en frascos de 120 ml conteniendo 25 ml del medio de cultivo, colocando 5 embriones por frasco.

**Meristemos.**- Se disectaron las secciones apicales de las plántulas eliminando las dos hojas terminales y se lavaron con agua destilada con el fin de eliminar la tierra que pudieran contener. Posteriormente se colocaron en una solución de cloro al 0.75% (cloralex al 15% v/v) y se dejaron en agitación lenta durante 10 minutos. Los meristemos se aislaron al igual que los embriones bajo la campana de flujo laminar y con la ayuda de un microscopio de disección.

La disección se realizó de modo que quedara sólo el domo con los dos primordios foliares (de aprox. 0.5mm). Los meristemos así aislados se sembraron en el mismo tipo de frasco y la misma cantidad de medio de cultivo que en el caso de los embriones, colocando tres meristemos en cada frasco.

**Hojas y tallos.**- Las hojas jóvenes completas y secciones de tallos de aproximadamente 3 cm se lavaron con agua corriente durante 30 minutos. Inmediatamente después se sumergieron en alcohol etílico al 70% durante 30 seg y se esterilizaron en cloro al 0.75 %, como en el caso de los meristemos. Posteriormente bajo la campana de flujo laminar en condiciones de asepsia se lavaron hasta quitar el exceso de cloro.

Los tallos se dividieron en fragmentos de aproximadamente 0.5 cm de longitud y las hojas en secciones de unos 1.5 cm<sup>2</sup>. Se colocaron de 3 a 4 explantes por frasco.

Los explantes en los medios se incubaron en una cámara de crecimiento bajo las siguientes condiciones de cultivo:

temperatura	27 °C
intensidad luminosa	2000 lux
fotoperíodo	16 horas

### c) TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.

Se empleó medio Murashige y Skoog (MS) (ver apéndice) suplementado con diferentes auxinas (AIA, 2,4-D y ANA) en tres concentraciones distintas 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-7</sup> M, solas o en combinación con BA a una concentración de 10<sup>-8</sup> M.

Además se estimó la respuesta del cultivo a varias concentraciones de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, a saber: 825, 1200, 1650, 1900 y 2500 mg/l. Se probaron 2 concentraciones de sacarosa, que fueron 3 y 5% todo esto en medio MS suplementado con 2,4-D 10<sup>-6</sup> M.

En otros experimentos se evaluó la respuesta en 4 medios basales: el MS, el B5 y otros 2 más en los que se intercambiaron las sales y vitaminas de los dos primeros.

Tanto los medios como el material utilizado para la disección de explantes, fué esterilizado en autoclave durante 15 minutos a una temperatura de 121 °C y una presión de 1.5 kg/cm<sup>2</sup>.

La relación de los tratamientos ensayados para evaluar las respuestas a la inducción de callo, producción de biomasa y contenido de alcaloides se enlistan en la tabla 6.

TABLA 6.- TRATAMIENTOS ENSAYADOS PARA LA INDUCCION DE CALLO DE *Datura innoxia* Mill  
Y LA EVALUACION DE SU CONTENIDO DE ALCALOIDES DEL TROPANO

MEDIO	MEDIO	AUXINAS	CITOCININAS	SACAROSA	MH NO	EXPLANTES
No	BASAL	[M]	[M]	[g/l]	4 3 [mg/l]	
1	MS	---	BA 10	30	1,650	E
2	MS	ANA 10	BA 10	30	1,650	K
3	MS	ANA 10	BA 10	30	1,650	K
4	MS	ANA 10	BA 10	30	1,650	E
5	MS	ANA 10	---	30	1,650	E
6	MS	AIA 10	BA 10	30	1,650	E
7	MS	AIA 10	---	30	1,650	K
8	MS	2,4-D 10	BA 10	30	1,650	K
9	MS	2,4-D 10	BA 10	30	1,650	K
10	MS	2,4-D 10	---	30	1,650	E, M, T, H
11	MS	2,4-D 10	---	50	1,650	K, M, T, H
12	MS	2,4-D 10	---	30	850	M
13	MS	2,4-D 10	---	30	1,200	M
14	MS	2,4-D 10	---	30	1,900	M
15	MS	2,4-D 10	---	30	2,500	M
16	BS	2,4-D 10	---	20	1,650	K, M
17	MSBS	2,4-D 10	---	30	1,650	K, M
18	BSMS	2,4-D 10	---	20	1,650	E, M

E = esbrion  
M = meristemo  
T = tallo  
H = hoja

ANA = acido naftalenoacetico  
AIA = acido indolacetico  
2,4-D = acido 2,4-diclorofenoacetico  
BA = 6-benciladenina

#### d) ESTABLECIMIENTO DE LOS CALLOS.

Una vez formado el callo de los explantes, este se subcultivó cada 30 días en el mismo medio, hasta estabilizar su proliferación, lo que generalmente ocurría en el 3er. subcultivo. Todas las pruebas para la producción de biomasa y determinaciones de alcaloides, se realizaron con callos del 4o. subcultivo.

#### e) CURVAS DE CRECIMIENTO.

Las curvas de crecimiento se establecieron utilizando callos provenientes de meristemo y de embrión, que fueron desarrollados en frascos de cultivo conteniendo cada uno 25 ml de medio MS suplementado con 2,4-D  $10^{-6}$  M. Se partió de un inóculo inicial de 3 gr para cada frasco. El crecimiento del cultivo se evaluó cada 5 días durante un periodo total de 30 días, en cada fecha de incubación se determinó el peso fresco y el peso seco expresado en gramos. El valor de cada punto es el resultado de la media de tres repeticiones.

El peso fresco se registró pesando directamente el callo producido en cada repetición en una balanza electrónica con platillo superior SARTORIUS 1212MP (30/300 g  $\pm$  0.001/0.05 g). El peso seco, el cual es referido tanto para las curvas de crecimiento como para la producción de biomasa y las determinaciones de alcaloides totales, se obtuvo una vez que el tejido de cada repetición perdió su humedad al mantenerse en un horno desecador por 4 días a una temperatura constante de 38 °C (el tiempo y la temperatura seleccionados permitieron asegurar la estabilización del peso del tejido y evitar la degradación térmica de los alcaloides a evaluar).

#### f) EXTRACCION DE LOS ALCALOIDES CRUDOS.

Una vez obtenidos los pesos fresco y seco de las muestras, estas se pulverizaron con la ayuda de un mortero y se procedió a la extracción, para la que se tomó un peso conocido del tejido y se le sometió al siguiente proceso:

- 1.- A cada muestra contenida en un matríz erlenmeyer de 150 ml, se le agregó 10 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 28% y se le dejó reposar durante 8 horas.
- 2.- Posteriormente se añadieron 40 ml de cloroformo y se colocó en una plataforma de agitación durante 12 a 16 horas.
- 3.- La mezcla se centrifugó a 1600 rpm durante 10 minutos. El extracto clorofórmico se separó utilizando una jeringa y se midió el volumen final.

De este extracto crudo se separaron 20 ml que fueron utilizados para la determinación colorimétrica y se le purificó en los siguientes pasos:

- i) Los 20 ml se colocaron en un embudo de separación y se extrajo 3 veces con volúmenes de 6, 12 y 6 ml de una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.1N.
- ii) Se descartó la fase clorofórmica y la fase acuosa se alcalinizó con 10 ml de una solución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  6N.
- iii) Se extrajo 4 veces con 10 ml de una solución de cloroformo - alcohol isopropílico (9:1).
- iv) Se desechó la fase acuosa y la clorofórmica se lavó con 10 ml de agua destilada llevandose posteriormente a sequedad a temperatura ambiente, bajo la campana de extracción.
- v) Finalmente se resuspendió en 1 ml de cloroformo.

### **g) DETERMINACION COLORIMETRICA DE ALCALOIDES TOTALES.**

Se tomaron alicuotas de 0.4ml por duplicado de cada uno de los extractos obtenidos del paso e)-v). se llevaron a sequedad en baño maría a 40 C y se les procesó de la siguiente manera:

Primero se le agregó a cada tubo 0.25 ml de una solución que se preparó disolviendo 1 g de p-Dimetilaminobenzaldehido en 6 ml de ácido sulfúrico al 80% v/v y se dejó agitando alternativamente durante 2 minutos. posteriormente se sumergieron en baño maría a 70 C por 6 minutos agitando los tubos alternadamente.

Inmediatamente después se enfriaron en un baño de agua con hielo durante 3 minutos y se les agregó cuidadosamente 0.25 ml de anhídrido acético a cada uno. Se agitaron y dejaron reposar por 15 minutos.

Para leer las absorbancias, las muestras se colocaron en celdas de 1 cm. Las lecturas se realizaron a 515 nm, empleando un espectrofotómetro Bausch & Lomb mod. 501.

Paralelamente se corrió una curva patrón de atropina. Para ello se preparó una solución de atropina de concentración conocida y se colocaron alicuotas de 0.1, 0.3, 0.5 y 0.8ml de esta solución en tubos de ensayo. Se llevaron a sequedad y se procesaron de la misma manera que las muestras de los extractos. El cálculo de la concentración de alcaloides totales en las muestras, se hizo tomando como referencia la gráfica de la curva patrón.

### **h) CUANTIFICACION DE ATROPINA Y ESCOPOLAMINA.**

La cuantificación de atropina y escopolamina se realizó por

cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-  
ME)\*.

Para estas determinaciones se emplearon las muestras del extracto sin purificar (ver paso e)-3 de la extracción de alcaloides), las cuales se llevaron a sequedad y se resuspendieron en 1 ml de cloroformo el cual contenía 2.5 ppm de ácido benzoico como control interno. De esta solución se tomó una alícuota que se inyectó en el cromatógrafo de gases.

Se detectó el espectro de masas correspondiente para la atropina y la escopolamina. Finalmente la cuantificación se realizó tomando en cuenta algunos de los picos característicos de los espectros de masas de estos compuestos y refiriéndolos a la señal del control interno.

\* Estas determinaciones fueron realizadas por el M. en C. H. Gómez del Departamento de Química analítica del Posgrado de la Facultad de Química, UNAM.



## RESULTADOS:

### a) INDUCCION DE CALLO.

En la primera etapa de este estudio, se estimó la respuesta de los embriones a los diferentes tratamientos hormonales, que fueron establecidos con base en experiencias previas obtenidas con Lycopersicon esculentum (Quintero, 1986) y con Datura innoxia (García E. M. A.,\* comunicación personal).

Esto con el propósito de conocer las condiciones para la producción de tejido indiferenciado (callo), para ello se empleó medio MS adicionado con:

	-5			-8
ANA 10	M + BA 10			M
	-5			-8
ANA 10	M + BA 10			M
	-7			-8
ANA 10	M + BA 10			M
	-6			
ANA 10	M			
	-6			-8
2,4-D 10	M + BA 10			M
	-7			-8
2,4-D 10	M + BA 10			M
	-6			
2,4-D 10	M			
	-5			-8
AIA 10	M + BA 10			M
	-5			
AIA 10	M			

Los resultados se resumen en la tabla 7, donde se muestra la acción hormonal sobre la inducción de callo, raíz, brotes y plántulas, (a partir de embrión) así como la capacidad de propagación en los subcultivos de los mismos y el grado de diferenciación en cada caso.

Como se muestra en esta tabla, en todos los casos la

\* Lab. de Cultivo de Tejidos Vegetales, Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM.

TABLA 7.- RESPUESTA DEL EXPLANTE DE EMBRION AL SUMINISTRO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS HORMONALES  
 SOBRE LA INDUCCION Y DIFERENCIACION DE TEJIDO EN CULTIVOS in vitro DE  
*Datura innoxia* Mill.<sup>a</sup>

HORMONAS	INDUCCION	PROPAGACION	CALLO (%)	RAIZ (%)	BROTOS Y PLANTULAS SIN RAIZ (%)	PLANTULAS COMPLETAS (%)
-6 ANA 10 M	(+)	poca	100	---	---	---
-5 -8 ANA 10 M + BA 10 M	(+)	moderada	100	---	---	---
-6 -8 ANA 10 M + BA 10 M	(+)	moderada	60	10	30	---
-7 -8 ANA 10 M + BA 10 M	(+)	moderada	20	---	---	80
-6 2,4-D 10 M	(+)	abundante	100	---	---	---
-6 -8 2,4-D 10 M + BA 10 M	(+)	abundante	100	---	---	---
-7 -8 2,4-D 10 M + BA 10 M	(+)	moderada	30	---	---	70
-6 AIA 10 M	(+)	moderada	20	---	80	---
-5 -8 AIA 10 M + BA 10 M	(+)	abundante	40	5	55	---
-6 BA 10 M	(+)	abundante	---	---	---	100

\*medio basal MS

(+) = positiva

inducción fué positiva, variando la respuesta para los otros factores evaluados, de los cuales destacan, el efecto a la aplicación de 2,4-D  $10^{-6}$  M y de 2,4-D  $10^{-6}$  M + BA  $10^{-8}$  M donde se observó una abundante propagación al subcultivo y un 100% de formación de callo. En el caso de la aplicación de NA  $10^{-6}$  M y de NA  $10^{-5}$  M + BA  $10^{-8}$  M, se obtuvo también un 100% de formación de callo pero la propagación fué moderada y poca respectivamente. En cambio cuando se aplicó NA  $10^{-7}$  M + BA  $10^{-8}$  M, 2,4-D  $10^{-7}$  M + BA  $10^{-8}$  M o bien BA  $10^{-8}$  M, se obtuvieron plántulas completas con alguna formación de callo en la base de los dos primeros. Por último, la aplicación de AIA  $10^{-5}$  M dió como resultado la formación escasa de callo y una elevada proliferación de brotes y plántulas sin raíz.

#### b) CURVAS DE CRECIMIENTO.

Las curvas de crecimiento se establecieron utilizando callo generado a partir de meristemo y embrión, sembrados en medio MS adicionado con 2,4-D  $10^{-6}$  M ya que el callo así obtenido es un tejido friable e indiferenciado, lo que facilita su manejo y además presenta una alta proliferación a los subcultivos subsecuentes, lo cual permite contar con suficiente tejido para las evaluaciones de cada fecha.

En las figuras 2 y 3 se muestran las curvas obtenidas. Analizando la curva de crecimiento del callo generado a partir de embrión, se observa que la fase lineal se mantiene hasta el día 10 a partir de la resiembra, seguida de la fase de desaceleración entre los días 10 y 15 y la fase estacionaria a partir del día 20. Por otro lado, en el callo generado a partir de meristemo, la

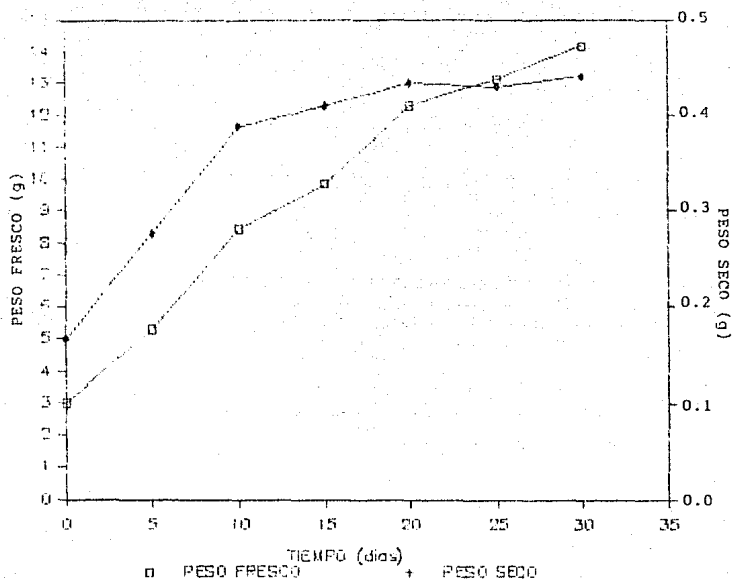


FIGURA 2.- Curva de crecimiento de cultivos de callo generado de embrión, en medio MS adicionado con 2,4-D  $10^{-6}$  M.

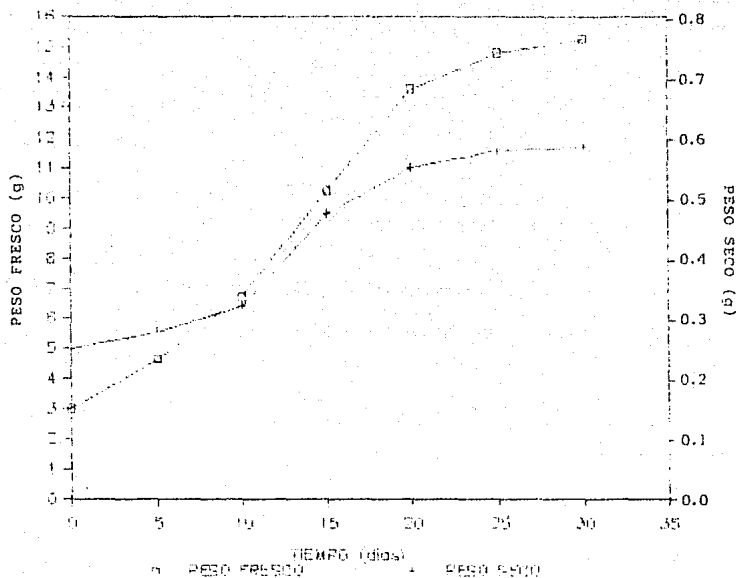


FIGURA 3.- Curva de crecimiento de cultivos de callo generado de meristemo, en medio MS adicionado con 2,4-D  $10^{-6}$  M.

fase lineal esta emboracada hasta el dia 17 aproximadamente, la fase desaceleración entre los dias 20 y 25 y la fase estacionaria a partir del dia 25 (considerando el peso seco).

En base a estos resultados, se decidió realizar las determinaciones de peso (fresco y seco) y de alcaloides el dia 25 a partir de la resiembra en todos los experimentos.

### c) PRODUCCION DE BIOMASA.

Establecidas las respuestas de los experimentos anteriores, se procedió a evaluar la producción de biomasa en los casos en que se obtuvo una mayor cantidad de tejido indiferenciado, no considerando aquellos en los que se observó una clara tendencia a la producción de estructuras diferenciadas (organogénesis). La finalidad fué evaluar la cantidad de biomasa producida bajo los diferentes tratamientos hormonales y poder seleccionar el que presentara un mayor rendimiento.

En la figura 4 se muestra el peso seco y fresco obtenidos para diferentes tratamientos hormonales en callos obtenidos de embrión (cada valor representa la media de 3 a 7 determinaciones). Como se observa en esta figura, los valores más altos para la producción de peso fresco se presentaron bajo la administración de 2,4-D  $10^{-6}$  M (10.0914 g) y de 2,4-D  $10^{-6}$  M + BA  $10^{-8}$  M (9.539 g), seguidos de los registrados en los tratamientos con AIA  $10^{-5}$  M y AIA  $10^{-5}$  M + BA  $10^{-8}$  M; mientras que los resultados más bajos se localizaron al suministrar ANA  $10^{-6}$  M (4.2901 g) y ANA  $10^{-6}$  M + BA  $10^{-8}$  M (4.4196 g).

Con respecto a los pesos secos, no se observa una correlación directa con los pesos frescos, probablemente debido a diferencias

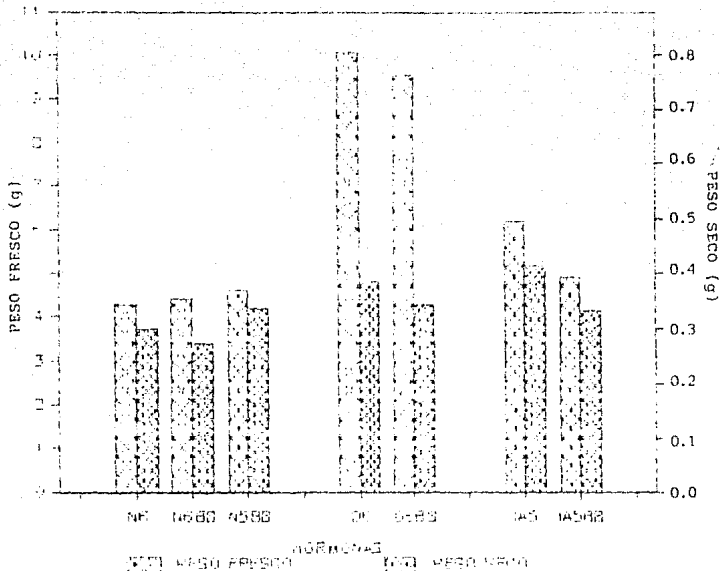


FIGURA 4.- Biomasa producida bajo diferentes tratamientos hormonales a partir de callos generados de embrión, cultivados en medio MS.

- N6 = ANA  $10^{-6}$  M.  
 N6BB = ANA  $10^{-6}$  M + BA  $10^{-8}$  M.  
 N5BB = ANA  $10^{-5}$  M + BA  $10^{-8}$  M.  
 D6 = 2,4-D  $10^{-6}$  M  
 D6BB = 2,4-D  $10^{-6}$  M + BA  $10^{-8}$  M.  
 IA5 = AIA  $10^{-5}$  M.  
 IA5BB = AIA  $10^{-5}$  M + BA  $10^{-8}$  M.

en el contenido de humedad en los callos sujetos a los diferentes tratamientos. Se puede observar que el mayor rendimiento es en los callos a los que se les adicionó AIA 10 M (0.4163 g) y 2,4-D 10 M (0.3877 g) lo que muestra una producción de biomasa ligeramente mayor para el caso del tejido crecido en AIA 10 M, sin embargo bajo la aplicación de este tratamiento se genera un tejido duro, compacto y con una clara tendencia a la diferenciación (producción de brotes y plántulas sin raíz). Por otro lado, el tejido que se forma al adicionar 2,4-D 10 M, es un callo friable con una abundante proliferación en los siguientes subcultivos, por lo que en realidad es en este último tratamiento en el que se obtiene una mayor biomasa de tejido totalmente indiferenciado. A estos tratamientos les siguieron los de AIA 10 M + BA 10 M y el de 2,4-D 10 M + BA 10 M en cuanto a la producción de peso seco. Por último, los 2 tratamientos en que el peso seco detectado fue menor, correspondió a los de ANA 10 M y ANA 10 M + BA 10 M.

Por otra parte se evaluó también la biomasa producida variando la fuente del explante, para ello se utilizó medio MS suplementado con 2,4-D 10 M o bien con 2,4-D 10 M + BA 10 M y se ensavaron explantes de embrión, meristemo, tallo y hoja.

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 5. En este caso la diferencia en el peso seco producido es poco relevante, sin embargo permite apreciar cierta tendencia a un menor rendimiento cuando se empleó el explante de hoja, en el medio que contenía 2,4-D 10 M + BA 10 M. Por otra parte el explante que tendió a producir un mayor peso seco fue el de embrión en el medio adicionado con 2,4-D 10 M.



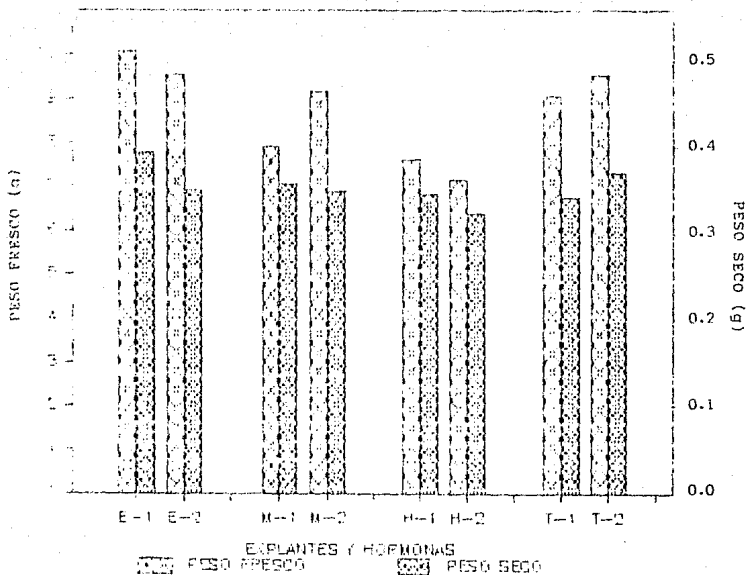


FIGURA 5.- Biomasa producida por diferentes explantes bajo el efecto de dos combinaciones hormonales. El medio básico fué MS.

E = embrión

1 = 2,4-D  $10^{-6}$  M.

M = meristemo

2 = 2,4-D  $10^{-6}$  M + BA  $10^{-8}$  M.

T = tallo

H = hoja

Como en general se observó que la adición de BA  $10^{-8}$  M tenía poco efecto sobre la producción de biomasa, se decidió seguir trabajando sólo con medio adicionado con 2,4-D  $10^{-6}$  M en los subsiguientes experimentos.

En la figura 6 se presenta la respuesta en producción de biomasa en los diferentes explantes crecidos en medio MS y suplementado con 2,4-D  $10^{-6}$  M, pero variando la concentración de la fuente de carbono (sacarosa), para ello se probaron 2 concentraciones que fueron, 3% (que es la que comunmente se emplea en el medio MS) y 5%. Como puede verse la producción de biomasa se incrementó notablemente en todos los explantes cuando se colocaron en medio con sacarosa al 5%, aunque en el caso del explante de embrión este incremento se observa unicamente en cuanto al peso seco, ya que el peso fresco por el contrario, disminuye. Además fué posible observar que en general en el medio con sacarosa al 5% el callo era más compacto, presentando en los casos del tejido generado de embrión y hoja algunas zonas duras, en las que incluso se detectaron puntos verdes y duros parcialmente diferenciados. Todo lo cual podría indicar un posible efecto de la concentración de sacarosa sobre la diferenciación del tejido.

Paralelamente se evaluó el efecto de la fuente de nitrógeno mediante un experimento en el que se empleó meristemo como explante y como medio de cultivo el MS adicionado con 2,4-D  $10^{-6}$  M, al cual se le varió la concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Para establecer las concentraciones a ensayar, se tomó como base la del medio MS que es de 1650 mg/l y se consideraron dos concentraciones menores, 825 mg/l y 1200 mg/l, y dos mayores, 1900 mg/l y 2500 mg/l. Este experimento se planteó, ya que se tienen

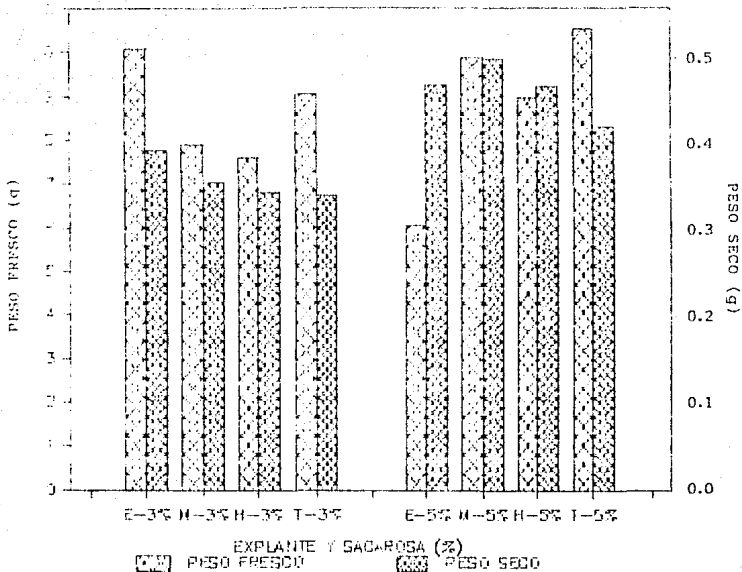


FIGURA 6.- Efecto del incremento de la concentración de sacarosa sobre la producción de biomasa en tejidos generados de diferentes explantes: embrión (E), meristemo (M), tallo (T) y hoja (H).

Se empleó medio básico MS adicionado con 2,4-D  $10^{-6}$  M.

antecedentes de que la fuente de N ejerce efectos importantes tanto en el crecimiento celular, como sobre la síntesis de metabolitos secundarios (Gamborg, 1984; Fujita y Tabata, 1987; Becker, 1987).

Los resultados se presentan en la figura 7, en donde se pudo detectar que los pesos frescos aumentaban al incrementarse la concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . En lo que respecta a los pesos secos, no se observaron diferencias tan relevantes entre las respuestas a concentraciones de amonio entre 625 y 1900 mg/l, mostrando sólo un ligero incremento en la producción de peso seco a una concentración de 1900 mg/l. Sin embargo, al incrementarse más esta concentración (2500 mg/l), hay una marcada disminución en el peso seco.

Por último, se realizó un experimento con el fin de evaluar la respuesta a medios basales diferentes, para este caso se utilizaron medios MS y B5, los cuales tienen composiciones distintas en cuanto a concentraciones de sales y vitaminas. Además, se estimó la respuesta en otros dos medios en los que se intercambiaron las sales y vitaminas del MS y del B5, quedando un medio con las sales del MS y las vitaminas del B5 (MSB5) y otro con las sales del B5 y las vitaminas del MS (B5MS). En todos los casos se adicionó  $2,4\text{-D } 10^{-6} \text{ M}$  y se ensayaron explantes de embrión y meristemo.

Los resultados se muestran en la figura 8, donde puede observarse que la mayor cantidad de peso seco se presentó al utilizar el medio MSB5 seguido por el MS y que en los otros 2 medios (B5 y B5MS), la producción es claramente menor. Este comportamiento es igual tanto si se emplea como explante embrión

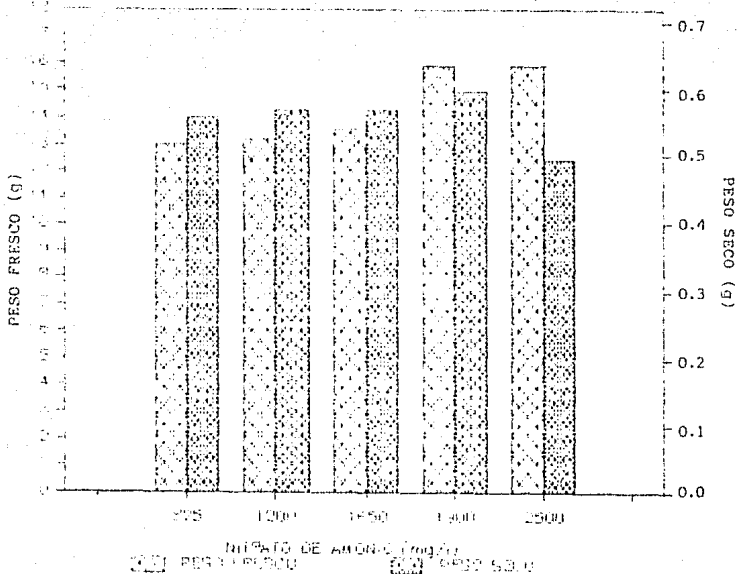


FIGURA 7.- Efecto de la concentración de nitrato de amonio sobre la producción de biomasa en callos generados de meristemo de Datura innoxia.

Se empleó medio MS adicionado con 2,4-D  $10^{-6}$  M.

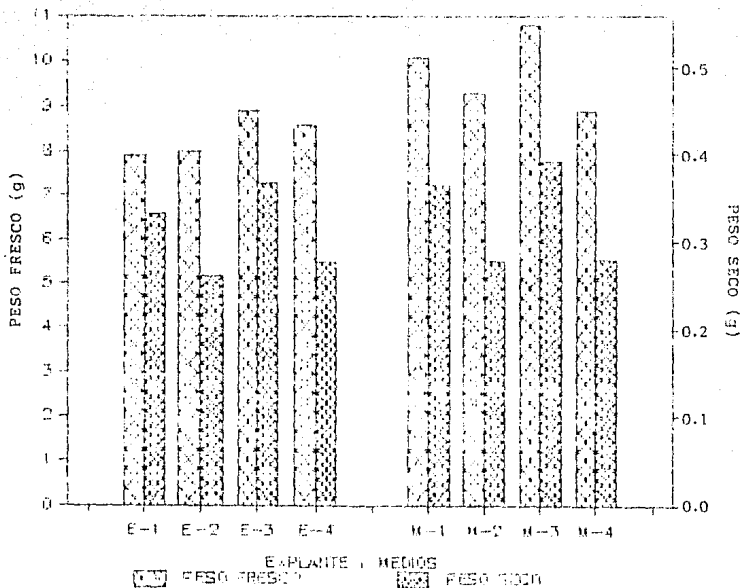


FIGURA 8.- Biomasa producida por cultivos de meristemo (M) y embrión (E) en diferentes medios: MS (1), B5 (2), MSB5 (3) y con B5MS (4). Todos los medios fueron adicionados con 2,4-D a una concentración de  $10^{-6}$  M.

como meristemo.

**d) DETERMINACIONES DE ALCALOIDES TOTALES.**

Una vez evaluada la producción de biomasa, se procedió a realizar las determinaciones de alcaloides totales (A.T.) por el método colorimétrico, en los siguientes experimentos.

Con la finalidad de conocer la respuesta en cuanto a la producción de A.T. en los tejidos sometidos a los distintos tratamientos hormonales, se utilizó tejido generado de embrión, desarrollado en medio MS y suplementado con hormonas en las siguientes concentraciones:

	-6	
2,4-D 10	M	
	-6	-8
2,4-D 10	M + BA 10	M
	-6	-8
ANA 10	M + BA 10	M
	-6	-8
ANA 10	M + BA 10	M
	-5	-8
ANA 10	M + BA 10	M
	-5	-8
AIA 10	M + BA 10	M

No se estimaron las determinaciones para el tejido generado en medio con ANA 10 M, ya que su proliferación y respuesta en el subcultivo es pobre y a partir de la 2a resiembra entra en una etapa de necrosamiento, lo cual hace difícil la obtención de suficiente cantidad de tejido. Así mismo, no se estimó el contenido de A.T. para el tejido generado bajo el tratamiento con AIA 10 M por ser poca la producción de callo; ya que como se mencionó anteriormente, en su mayor parte es un tejido duro y compacto con alta tendencia hacia la diferenciación.

En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos en este experimento con respecto a la producción de alcaloides totales. Se puede notar que de los tratamientos hormonales ensayados, el

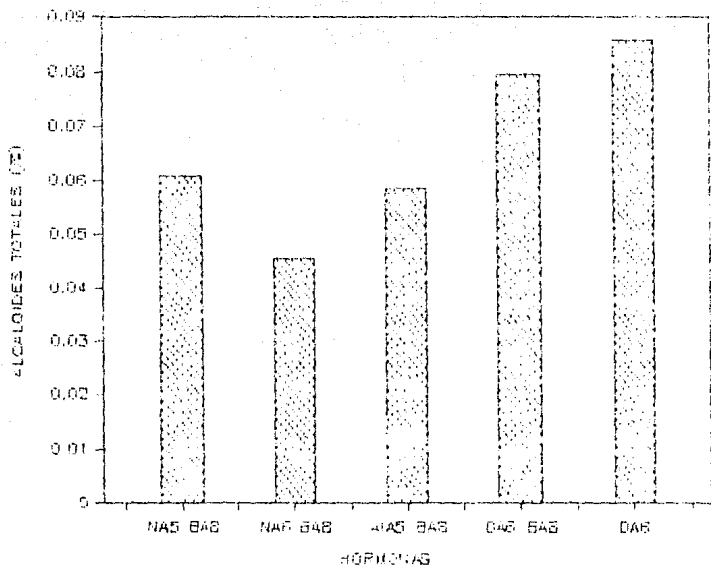


FIGURA 9.- Contenido de alcaloides totales en callos de Datura innoxia incubados en diferentes concentraciones y combinaciones hormonales. Se empleó medio básico MS y como explante embrión.

NA5 BA8 = ANA  $10^{-5}$  M + BA  $10^{-8}$  M.

NA6 BA8 = ANA  $10^{-6}$  M + BA  $10^{-8}$  M.

AIA5 BA8 = AIA  $10^{-5}$  M + BA  $10^{-8}$  M.

DA6 BA8 = 2,4-D  $10^{-6}$  M + BA  $10^{-8}$  M.

DA6 = 2,4-D  $10^{-6}$  M.



mayor contenido de alcaloides totales, expresado en % de peso seco, se observó en los tejidos cultivados en medios adicionados con 2,4-D  $10^{-5}$  M, y con 2,4-D  $10^{-6}$  M + BA  $10^{-8}$  M, en tanto que los de menor producción fueron los tejidos desarrollados en los medios que concenian ANA  $10^{-6}$  M + BA  $10^{-8}$  M y AIA  $10^{-5}$  M + BA  $10^{-8}$  M.

En otro experimento, se realizaron las determinaciones de los callos provenientes de los diversos explantes, todos ellos incubados en medio MS suplementado con 2,4-D  $10^{-6}$  M. Los explantes ensayados fueron embrión, meristemo, tallo y hoja. Los resultados se resumen en la tabla 8, donde además se presentan algunas de las características de los callos obtenidos. Estos datos muestran que la concentración más elevada de A.T., fué para el tejido proveniente de embrión, donde se alcanzó un nivel de 0.087% seguido por el tejido generado de tallo (0.074%), mientras que en los tejidos de meristemo y de hoja, las concentraciones son las más bajas y prácticamente iguales entre si. Por otro lado, no se observó correlación alguna entre la pigmentación del callo y la concentración de alcaloides totales.

Por otra parte, con el fin de conocer el efecto de la fuente de nitrógeno sobre el contenido de alcaloides totales, se efectuó un experimento en el que se empleó callo generado de meristemo desarrollado en medio MS suplementado con 2,4-D  $10^{-6}$  M y variando las concentraciones de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> en la misma forma que ya se ha mencionado para la producción de biomasa. Los resultados se presentan en la figura 10, donde es posible observar una tendencia hacia un incremento en el contenido de alcaloides totales conforme la concentración de nitrato de amonio es mayor, siendo este incremento muy notorio cuando se alcanza un contenido de

TABLA 8.- CARACTERISTICAS OBSERVADAS EN CALLOS DE *Datura innoxia* Mill  
 PROVENIENTES DE DIFERENTES TEJIDOS Y SU CONTENIDO DE  
 ALCALOIDES TOTALES\*

EXPLANTE	AUSENCIA DE PARTES DIFERENCIADAS (%)	GRADO DE CRECIMIENTO	PIGMENTACION	ALCALOIDES (%)
Embrion	100	abundante	verde	0.087
Meristemo	100	abundante	verde	0.056
Tallo	100	abundante	beige	0.074
Hoja	100	abundante	verde claro	0.055

-6

\* la incubacion se efectuo en medio MS conteniendo 2,4-D 10 M

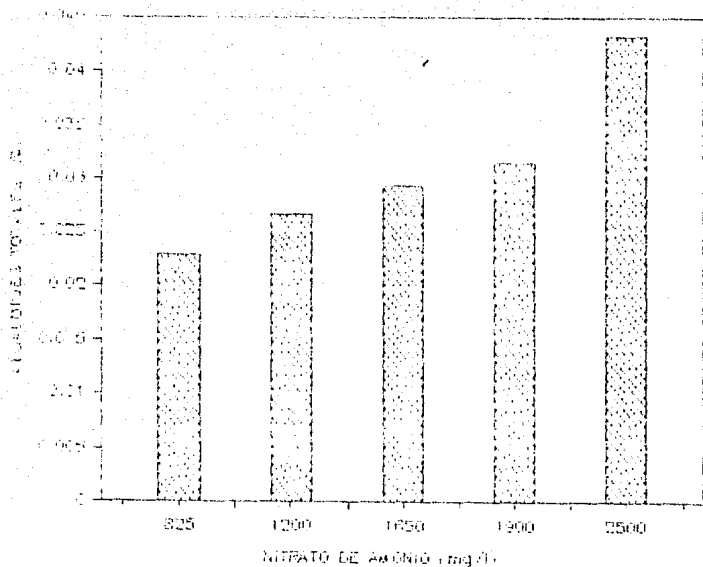


FIGURA 10.- Contenido de alcaloides totales en callos generados de meristemo de Datura innoxia, por efecto de diferentes concentraciones de nitrato de amonio. Se empleó medio MS suplementado con 2,4-D  $10^{-6}$  M.

2500 mg/l de NH NO .

<sup>4 3</sup>  
Posteriormente, se determinó la concentración de alcaloides totales en callos generados de meristemo e incubados en 2 medios basales distintos, el MS y el B5, ambos suplementados con 2,4-D a una concentración de 10<sup>-6</sup> M. Estos resultados se muestran en la tabla 9, y puede advertirse que el mayor contenido de alcaloides totales se detecta en el tejido desarrollado en el medio B5.

#### e) DETERMINACION DE ATROPINA Y ESCOPOLAMINA.

Con la finalidad de conocer específicamente el contenido de atropina y escopolamina, se empleó un método más fino y sensible, en el que se pudieran detectar separadamente las concentraciones de estos alcaloides. Así se evaluó el contenido relativo de atropina y escopolamina en los tejidos obtenidos cuando se sometieron a diferentes concentraciones de nitrato de amonio, a distintos medios basales y al emplear diversos explantes. En las tablas correspondientes se muestran, el valor promedio (media), y el rango dentro del que fluctuaron los valores obtenidos.

El efecto de la variación en el contenido de NH NO (825, 1200, 1650, 1900 y 2500 mg/l) en la síntesis de atropina y escopolamina se realizó empleando tejido generado de embrión y mantenido en medio MS adicionado con 2,4-D 10<sup>-6</sup> M.

Los resultados de este experimento se muestran en la tabla 10. Para cada concentración de nitrato de amonio se realizaron de 3 a 4 repeticiones. Como puede verse en la columna correspondiente a la atropina, el contenido más alto se registró en la concentración de 1900 mg/l de NH NO (0.525% X 10<sup>-3</sup>),

TABLA 9.- CONTENIDO DE ALCALOIDES TOTALES EN CULTIVOS DE CALLOS DE *Datura innoxia* CRECIDOS EN DOS DIFERENTES MEDIOS\*

MEDIO	AUSENCIA DE PARTES DIFERENCIADAS (%)	GRADO DE CRECIMIENTO	HORMONAS	ALCALOIDES (%)
MS	100	abundante	2,4-D 10 <sup>-6</sup> M	0.0564
BS	100	abundante	2,4-D 10 <sup>-6</sup> M	0.1140

\*se empleo meristemo como explante

TABLA 10.- CONTENIDO DE ATROPINA Y ESCOPOLAMINA EN  
 CALLOS DE *Datura innoxia* Mill. MANTENIDOS  
 EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE  
 NITRATO DE AMONIO

NH NO 4 3 [mg/l]	ATROPINA -3 [% x 10 ]	ESCOPOLAMINA -3 [% x 10 ]
	rango	rango
825	0.209 a 0.326	ND a 0.054
	X 0.156	X 0.040
	rango	rango
1,200	ND a 0.130	ND a ND
	X 0.078	X ND
	rango	rango
1,650	0.164 a 0.520	+ a 0.220
	X 0.380	X 0.175
	rango	rango
1,900	ND a 0.680	ND a 0.296
	X 0.525	X 0.296
	rango	rango
2,500	0.360 a 0.428	ND a 0.045
	X 0.401	X 0.045

ND = no detectado

+ = trazas

\* los medios se adicionaron con

-6  
2.4-D 10<sup>-6</sup> M, y se empleo

embrion como explante.

seguida de la de 2500 mg/l con  $0.401\% \times 10^{-3}$  y la de 1650 mg/l con un contenido de atropina de  $0.380\% \times 10^{-3}$ . En el caso de la escopolamina el valor máximo que se obtuvo fué de  $0.296 \times 10^{-3}$  en las muestras sometidas a una concentración de 1900 mg/l de nitrato de amonio y un rendimiento ligeramente inferior de  $0.220\% \times 10^{-3}$  en las que crecieron a concentraciones de 1650 mg/l. En ninguno de los callos provenientes del tratamiento con 1200 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  se pudo detectar escopolamina.

En la tabla 11, se presentan los resultados obtenidos del análisis de los tejidos al emplear los siguientes medios MS, B5, MSB5 y B5MS. Para cada caso se realizaron 4 determinaciones. Todos los medios fueron suplementados con  $2,4\text{-D} \times 10^{-6}$  M y se empleó callo generado de embrión.

En este experimento la concentración mayor de atropina se registró en los tejidos incubados en los medios B5 ( $0.480\% \times 10^{-3}$ ) y B5MS ( $0.490\% \times 10^{-3}$ ). Con respecto a la escopolamina, el máximo rendimiento se observó en el tejido proveniente del medio MS con  $0.175\% \times 10^{-3}$  seguido del MSB5 con  $0.127\% \times 10^{-3}$ .

Por último, en la tabla 12 se pueden observar los resultados que se obtuvieron de los callos generados de embrión, meristemo, tallo u hoja. Aquí se pone de manifiesto que los rendimientos más altos, tanto de atropina como de escopolamina, se registraron en los tejidos generados a partir de tallo, que fueron  $0.675\% \times 10^{-3}$  y  $0.211\% \times 10^{-3}$  respectivamente. En los cultivos generados de embrión los rendimientos fueron aproximadamente la mitad de los detectados en tallo, esto es de  $0.380\% \times 10^{-3}$  de atropina y  $0.175\% \times 10^{-3}$  de escopolamina. Por otra parte, los rendimientos

TABLA 11.- CONTENIDO DE ATROPINA Y ESCOPOLAMINA EN CALLOS DE *Datura innoxia* Mill. MANTENIDOS EN DIFERENTES MEDIOS BASALES\*

MEDIOS	ATROPINA	ESCOPOLAMINA
	-3 [ % x 10 ]	-3 [ % x 10 ]
	rango	rango
MS	0.164 a 0.520	+ a 0.220
	X 0.380	X 0.175
	rango	rango
B5	0.440 a 0.567	ND a 0.102
	X 0.480	X 0.071
	rango	rango
MSB5	0.184 a 0.600	0.050 a 0.182
	X 0.370	X 0.127
	rango	rango
B5MS	0.480 a 0.549	+ a 0.166
	X 0.490	X 0.090

ND = no detectado

\* los medios se adicionaron con

+ = trazas

2,4-D 10 M, y se empleo

embrion como explante.



TABLA 12.- CONTENIDO DE ATROPINA Y ESCOPOLAMINA EN CALLOS DE *Datura innoxia* Mill. ORIGINADOS DE DIVERSOS EXPLANTES\*

EXPLANTES	ATROPINA	ESCOPOLAMINA
	-3 [% x 10 ]	-3 [% x 10 ]
	rango	rango
TALLO	0.506 a 0.831	ND a 0.720
	X 0.675	X 0.211
	rango	rango
EMBRION	0.164 a 0.520	+ a 0.220
	X 0.380	X 0.175
	rango	rango
MERISTEMO	ND a 0.145	ND a 0.030
	X 0.092	X 0.030
	rango	rango
HOJA	ND a 0.280	ND a ND
	X 0.280	ND

ND = no detectado \* medio MS adicionado con  
-6  
+ = trazas 2,4-D 10 M

menores se observaron en los tejidos provenientes de hoja, donde se detectó  $0.280\% \times 10^{-3}$  de atropina sin que se observara la presencia de escopolamina y finalmente en el tejido generado de meristemo, con  $0.092\% \times 10^{-3}$  de atropina y  $0.030\% \times 10^{-3}$  de escopolamina.

## DISCUSION.

### B) EFECTOS HORMONALES EN LA DIFERENCIACION DEL CULTIVO.

De los resultados obtenidos en la primera etapa de este trabajo como se muestra en la tabla 7, puede observarse que la respuesta de los tejidos a los diferentes tratamientos hormonales fué morfogenéticamente distinta, pudiendose notar diferencias a la aplicación de auxinas y citocininas cuando se suministraron solas o en combinación.

Así, se observó que bajo la aplicación de ANA  $10^{-6}$  M, se generó callo sin formación de estructuras diferenciadas, en tanto que al aplicarse conjuntamente con BA  $10^{-8}$  M se presentaron estructuras diferenciadas tales como raíces aisladas junto con brotes y plántulas sin raíz. Por otro lado, cuando se mantuvo fija la concentración de BA, pero se aumentó la concentración de ANA a  $10^{-5}$  M se obtuvo callo en un 100%, el cual presentaba una mejor respuesta al subcultivo que el callo generado en ANA  $10^{-6}$  M solo. Por el contrario, cuando la concentración de ANA se disminuyó a  $10^{-7}$  M, hubo una mayor diferenciación, presentando plántulas completas pero con formación de callo en la base de éstas. Este callo no pudo ser subcultivado ya que se necrosaba desde la primera resiembra.

La respuesta a la combinación de ANA  $10^{-7}$  M + BA  $10^{-8}$  M fué similar a la que se obtuvo bajo la aplicación de BA  $10^{-8}$  M sola, en donde se obtuvieron plántulas completas, una por embrión y sin ninguna formación de callo. Estos resultados permiten inferir, que en el caso de Datura innoxia, el ácido naftalenacético induce la formación de callo, mientras que la benciladenina genera

estructuras diferenciadas; y que al suministrarse conjuntamente la manifestación de la respuesta se ve alterada en función de la concentración en este caso del ANA, ya que la de la benciladenina se mantuvo fija. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores, en relación al efecto del ANA y de la benciladenina en cultivos in vitro en otras especies (Flick et al., 1983).

En esta misma tabla se puede observar, que al comparar las respuestas a la aplicación de  $2,4-D 10^{-6} M + BA 10^{-8} M$  con la de  $2,4-D 10^{-6} M$ , no se aprecia un efecto claro de la benciladenina hacia la formación de tejido diferenciado, ya que en ambos casos siempre se obtuvo callo en un 100%; aunque en el caso de la aplicación de 2,4-D solo, el callo generado es más friable. Sin embargo, al disminuir la concentración de 2,4-D a  $10^{-7} M$ , la formación de callo fue mínima y la respuesta se dirigió más bien hacia la formación de plántulas completas.

El efecto a la aplicación de AIA fue distinta, ya que al suministrar  $AIA 10^{-5} M$  al medio, la formación de callo fue muy escasa, siendo más bien un tejido muy compacto del cual se generaron abundantes brotes y plántulas muy robustas pero sin raíz.

Cuando se aplicó  $AIA 10^{-5} M$  junto con  $BA 10^{-8} M$ , la respuesta fue distinta, pues la formación de callo fue mayor que bajo la aplicación el AIA solo y la formación de plántulas también disminuyó, aunque el número de brotes continuó siendo alto. Sin embargo, a diferencia de lo que se observó cuando se aplicó el ácido indolacético solo, en este tratamiento se pudo apreciar la presencia de raíces. La respuesta en cuanto a la presencia de raíces en este caso, es similar a lo registrado bajo la

-b                    -g

aplicación de ANA <sup>-b</sup> 10 M + BA <sup>-g</sup> 10 M, de donde puede inferirse que la presencia de la benciadenina siempre favoreció la producción de estructuras diferenciadas, lo que concuerda con los efectos generalmente reportados para estas hormonas tanto en Datura como en otras especies (Flick et al., 1983; Gamborg, 1984).

#### b) PRODUCCION DE BIOMASA.

En los que respecta a la biomasa producida, cabe hacer la aclaración de que en este trabajo se maneja en función del peso de los tejidos obtenidos. Por otro lado, dada la heterogeneidad en el contenido de humedad de los tejidos sometidos a diferentes tratamientos, se considera que el peso seco es más representativo.

En la figura 4, se puede observar que al comparar la biomasa producida bajo los diferentes tratamientos hormonales, con el tipo de tejido obtenido; la mayor producción de peso seco fué en los tratamientos con 2,4-D, solo o en combinación con BA. En estos casos la diferencia entre el peso fresco y peso seco fué mayor indicando probablemente un contenido más alto de humedad; lo que parece estar relacionado con las características morfológicas del tejido, que es indiferenciado, friable y no compactado. Por otra parte, los pesos secos más altos se registraron bajo el suministro de AIA <sup>-5</sup> 10 M y de 2,4-D <sup>-6</sup> 10 M. Sin embargo, el tejido crecido en AIA <sup>-5</sup> 10 M fué compacto y muy diferenciado con una elevada proporción de brotes y plántulas sin raíz; en tanto que el tejido crecido en medio con 2,4-D <sup>-6</sup> 10 M fué morfológicamente indiferenciado. Por lo que es en realidad en este último tratamiento en donde se obtiene una mayor

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

producción de tejido indiferenciado.

De la evaluación de los diferentes explantes empleados con respecto a la producción de peso seco, como se observa en la figura 5 no se presentaron diferencias relevantes, y solo pueden sugerirse, aunque con cierta reserva, algunos comentarios acerca de las tendencias observadas. Así parece apreciarse que el tejido que tendió a producir mayor biomasa bajo el tratamiento con 2,4-D  $10^{-6}$  M sólo, fué el de embrión y el de menor producción fué el de tallo. En cambio con el tratamiento de 2,4-D  $10^{-6}$  M + BA  $10^{-8}$  M el que más biomasa produjo fué precisamente el de tallo. Se puede observar que mientras en los casos en que se empleó embrión, meristemo u hoja la producción de biomasa fué ligeramente mayor bajo la aplicación de 2,4-D  $10^{-6}$  M solo, el tejido proveniente de tallo se comportó diferente con una producción de peso seco un poca más elevada en el tratamiento de 2,4-D  $10^{-6}$  M + BA  $10^{-8}$  M. Sin embargo, como ya se ha mencionado, las diferencias en la generación de biomasa por los diferentes explantes no son importantes y este comportamiento pudo deberse a que la variación de peso de las muestras en este último tratamiento fué muy elevada.

Cuando se estudió el efecto de la concentración de sacarosa sobre la producción de biomasa, como se puede apreciar en la figura 6, se observó que al aumentar su concentración, el peso seco tuvo un considerable aumento en todos los explantes. Esto parece indicar que el aumento en la concentración de carbono es incorporado rápidamente al metabolismo primario, traduciendo en un mayor crecimiento. En cuanto a estos resultados, si bien Gamborg (1968) menciona que en cultivos de frijol de soya,

concentraciones de sacarosa mayores de 2% no incrementan el crecimiento; otros autores reportan una relación directa entre el contenido inicial de sacarosa en el medio y la biomasa obtenida (Fowler, 1986b).

Por otra parte, es interesante hacer notar que el callo crecido en el medio con 5% de sacarosa, fué menos friable y en el caso de los explantes de hoja y tallo se observaron partes que incluso parecían empezar a diferenciarse. Esto podría indicar un posible efecto de la concentración de sacarosa sobre la diferenciación del tejido.

En otras especies se ha reportado, que la morfogénesis depende de la concentración relativa entre auxinas, citocininas y sacarosa. Además, se ha comprobado que la presencia de sacarosa es esencial para el enraizamiento de varias especies (George y Sherrington, 1984), observaciones que apoyan los resultados aquí expuestos.

De la curva de dosis-respuesta de Nitrato de amonio (fig 7), fué posible apreciar un aumento en el peso fresco al incrementar la concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Este comportamiento sin embargo, no fué tan evidente en el peso seco, denotando probablemente un contenido mayor de humedad en el tejido conforme aumenta la concentración del nitrato de amonio. No ostante, al llegar a una concentración de 2500 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , el peso seco disminuye notablemente, lo que permite deducir que esta es una concentración inhibitoria para el crecimiento, probablemente por producir un efecto de estrés al tejido. A este respecto Gamborg y colaboradores (1968), mencionan que al parecer contenidos altos de iones amonio, tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento

de los cultivos, probablemente por una inhibición de algunas enzimas del ciclo del PCA (ácido tricarbóxico).

Con referencia a los medios basales ensayados, como se muestra en la figura 8, se registró un mayor rendimiento en la producción de peso seco en el medio MS con respecto a lo producido en el medio B5. Si se considera que el medio MS contiene una mayor concentración de sales que el medio B5, y que este último posee un contenido mayor de vitaminas (hasta 100 veces más tiamina) con respecto al MS, puede sugerirse la posibilidad de que se ejerza una influencia mayor sobre el crecimiento atribuible más a la presencia de las sales que a la de las vitaminas. Sin embargo, al comparar estos resultados con los obtenidos cuando se empleó el medio que contenía las sales del MS con las vitaminas del B5, el peso seco fue aún más elevado que el obtenido en el medio MS; de donde puede pensarse entonces que se produce un efecto conjunto de sales y vitaminas en el medio sobre la producción de biomasa. Estos resultados concuerdan con lo citado por otros investigadores en cuanto a la acción tanto de sales como de vitaminas sobre el crecimiento de los cultivos *in vitro* (Gamborg, 1968; Constabel, 1984; George y Sherrington, 1984).

#### c) PRODUCCION DE ALCALOIDES TOTALES.

Como se ha mencionado anteriormente, los alcaloides del tropano son producidos en mayor proporción durante la fase estacionaria, cuando ya el metabolismo primario es menos activo (Fowler, 1986b). Tomando esto en consideración, se planteó evaluar las muestras para las determinaciones transcurridos 25



días a partir de la resiembra, ya que del análisis de las curvas de crecimiento se estimó que para esa fecha los cultivos se encontraban en la fase estacionaria.

Con respecto a la producción de alcaloides en función del tratamiento hormonal (figura 9), la mayor concentración se detectó en los tejidos crecidos en los medios que contenían  $2.4-D 10^{-6} M$ , ya sea en presencia o ausencia de  $BA 10^{-8} M$ , seguidos de los tejidos desarrollados en el medio que contenía  $ANA 10^{-5} M + BA 10^{-8} M$ . Todos estos tratamientos se caracterizaron por generar callo, mientras que aquellos con tendencia a la diferenciación ( $AIA 10^{-5} M + BA 10^{-8} M$  v  $ANA 10^{-6} M + BA 10^{-8} M$ ) mostraron un menor contenido de alcaloides totales.

Estos resultados difieren de algunos de los reportes citados en la literatura, en el sentido de que los tejidos indiferenciados tienden a tener una menor producción de estos alcaloides (Hashimoto y Yamada, 1963; Misawa y Samajiina, 1977). Sin embargo, debe mencionarse que esta información se maneja más bien en relación a la diferenciación de raíz, que es el órgano propuesto como sitio de síntesis para estos alcaloides (Hashimoto y Yamada, 1963; Hiraoka y Tabata, 1974). En el caso de este trabajo, si bien se observó la presencia de raíz en estos tejidos ( $AIA 10^{-5} M + BA 10^{-8} M$  y  $ANA 10^{-6} M + BA 10^{-8} M$ ), ésta fue en una proporción muy baja tendiendo más hacia la formación de brotes y plántulas sin raíz.

De las evaluaciones de alcaloides totales de los tejidos generados de los diferentes explantes, fue posible establecer una diferencia notable entre ellos (tabla 8). La concentración más alta de alcaloides totales fue de 0.087% y se observó en

el tejido generado de embrión. Una concentración un poco menor, de 0.074% se encontró en el tejido generado de tallo, mientras que las concentraciones más bajas correspondieron a meristemo y a hoja, que fueron 0.056% y 0.055% respectivamente, siendo prácticamente iguales. Los resultados anteriores pudieran indicar que, el estado previo de las células en el tejido diferenciado (hoja, tallo, etc.) del cual proviene el cultivo, pudiese influir en la regulación de esta vía metabólica en el cultivo in vitro. Como se mencionó en los antecedentes, hay evidencias de que los callos generados de diferentes tejidos, aún perteneciendo a la misma planta, exhiben propiedades diferentes y específicas (Meins, 1986), por lo que las diferencias en el contenido de alcaloides totales que se observaron en este trabajo, en los callos generados de los diferentes explantes, coinciden con lo propuesto en estas investigaciones.

Por otro lado, si bien el tejido que se generó de los diferentes explantes fué morfológicamente indiferenciado, pudo notarse una mayor o menor presencia de pigmentos por la coloración del callo, sin embargo no hubo ninguna relación entre esta pigmentación y el contenido de alcaloides totales; ya que de los 2 cultivos en los que se observó una concentración más elevada de alcaloides totales, el que provenía de embrión tenía una pigmentación verde mientras que el que procedía de tallo era beige.

Como se observa en la figura 10. los resultados indican un aumento progresivo en la concentración de alcaloides totales al incrementar el contenido de nitrato de amonio en el medio. Este aumento sin embargo, fué mucho más marcado cuando se empleó

una concentración de 2500 mg/l de  $\text{NH NO}_{43}$ . Aquí resulta interesante comparar estos resultados con los obtenidos en la producción de biomasa, ya que a la concentración de nitrato de amonio mencionada, la producción de peso seco se ve notablemente reprimida. Como se mencionó en la introducción existen varios ejemplos en la producción de estos alcaloides vía CTV, en los que existe una relación inversa entre el crecimiento y la producción de alcaloides (Tabata et al., 1972; Kuang-Chi y Cheng, 1976; Bohm, 1978). En este caso podría especularse que a esta concentración de  $\text{NH NO}_{43}$  el exceso de nitrógeno en el medio influye de una manera directa o indirectamente en la regulación del metabolismo, favoreciendo la expresión de esta vía secundaria, pero inhibiendo el crecimiento. En apoyo a estos resultados, varios investigadores han reportado que bajas concentraciones de algunas sales, especialmente fosfatos y amonio, pueden aumentar la concentración de metabolitos secundarios en varias especies, probablemente por un efecto de estrés sobre el crecimiento (Morris et al., 1985; Becker, 1987; Fujita y Tabata, 1987).

Con respecto a las determinaciones de A.T. en los tejidos crecidos en medios MS y B5 (tabla 9), se pudo detectar una concentración 2 veces mayor en el tejido del medio B5, el cual como se ha mencionado tiene un contenido de vitaminas entre 10 y 100 veces mayor que el MS, y una concentración menor de sales (ver apéndice).

Comparando estos resultados con los obtenidos en otras investigaciones donde se ha reportado que un incremento de vitaminas, mayor al que normalmente contiene el MS, no sólo no

incrementa sino que incluso disminuye el contenido de alcaloides del tropano en cultivos de Hyoscyamus muticus (Koul et al., 1983), entonces se podría plantear que el incremento en la producción de alcaloides totales que se observó en este trabajo, pudiera estar asociado probablemente al bajo contenido de sales. Esto estaría de acuerdo con otras investigaciones en cultivos de Hyoscyamus niger (Hashimoto y Yamada, 1987), en las que se muestran que los niveles bajos de sales favorecen la producción de alcaloides totales, aún cuando inhiben el crecimiento.

En la tabla 13, se comparan los resultados obtenidos por otros autores, en cuanto a contenido de alcaloides del tropano (totales) en cultivos in vitro, con los reportados en el presente trabajo. Como puede observarse las concentraciones reportadas son variables, probablemente porque difieren tanto en las especies ensayadas como en las condiciones de cultivo empleadas en cada caso, pero en general los resultados se encuentran dentro de los rangos reportados, lo que contribuye a dar confiabilidad a los que aquí han sido mencionados. Es interesante hacer notar, que el máximo contenido de alcaloides totales observado en el presente trabajo, es hasta 3.4 veces mayor que el reportado por Hiraoka y Tabata (1974) en cultivos in vitro de Datura innoxia.

#### d) PRODUCCION DE ATROPINA Y ESCOPOLAMINA.

En lo que respecta a los resultados mostrados en las tablas 10, 11 y 12, correspondientes a los porcentajes (base en peso seco) de atropina y escopolamina, es conveniente hacer notar que la metodología empleada es sólo indicativa, ya que en Datura innoxia se pueden encontrar otros alcaloides del tropano,

TABLA 13.- COMPARACION DEL CONTENIDO DE ALCALOIDES TOTALES EN CULTIVOS *in vitro* DE DIFERENTES ESPECIES.

AUTORES	ESPECIE	ALCALOIDES TOTALES (%)
1 Benjamin et al., 1987	Atropa belladonna	0.060
2 Hiraoka y Tabata, 1974	Datura innoxia	0.033
3 Koul et al., 1983	Hyoscyamus muticus	0.150
4 Tabata et al., 1972	Scopolia parviflora	0.012
5 Presente trabajo, 1988	Datura innoxia	0.114

Las metodologías seguidas para la cuantificación de A.T. en los trabajos anteriores, siguiendo el mismo orden fueron:

- 1 Espectrofotometría, después de la reacción de Vitali-Morin modificada
- 2 Espectrofotometría, después de la reacción de Vitali-Morin modificada
- 3 Volumetricamente, titulando con NaOH, con Rojo de metilo como indicador
- 4 Espectrofotometría, después de la reacción de Vitali-Morin modificada
- 5 Espectrofotometría, después de la reacción con p-dimetilamino benzaldehído.

intermediarios de la misma vía metabólica (Witte et al., 1987) que pudieran dar señales semejantes a las que se utilizaron para cuantificar atropina y escopolamina y que podrían sumarse a las señales de éstos. Sin embargo, los valores calculados permiten tener una estimación del comportamiento de los cultivos en respuesta a las variables estudiadas.

En general se puede ver que la variación entre las muestras es grande, ya que para un mismo tratamiento se pudieron detectar desde porcentajes relativamente altos de alguno de los alcaloides, hasta muestras en las que no fué posible detectar la presencia del alcaloide. Esto es particularmente cierto para el caso de la escopolamina y puede deberse a variaciones en la capacidad de los callos (variación somacional) para llevar a cabo la última parte de esta vía metabólica. No obstante, es posible tratar de establecer tendencias que puedan ayudar a estimar las condiciones para la mejor síntesis de estos alcaloides en cultivos de callo.

Los resultados obtenidos al variar la concentración de nitrato de amonio (tabla 10), sugieren una posible tendencia a una mayor síntesis de atropina al aumentar la concentración de esta sal, ya que los valores más altos se dieron a concentraciones de 1900 y 2500 mg/l, aunque fué ligeramente menor en la última. Por otro lado, al analizar los rendimientos de escopolamina, se podría sugerir igualmente una tendencia a una mayor síntesis del alcaloide al incrementarse el contenido de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el medio, hasta llegar a una concentración de 1900 mg/l. No obstante, al emplear una concentración de 2500 mg/l de nitrato de amonio, la síntesis de escopolamina baja drásticamente. Este comportamiento

podría sugerir una inhibición de la última parte de la vía metabólica a altas concentraciones de nitrato de amonio. Estos resultados aparentemente no concuerdan con lo obtenido en las determinaciones de alcaloides totales, donde se observó un mayor rendimiento al aplicar una concentración de 2500 mg/l de nitrato de amonio. Sin embargo podría sugerirse que el aumento detectado en los alcaloides totales esta dado en otros intermediarios de esta vía y no en una mayor síntesis de escopolamina, cuando menos en el tiempo en que se incubó a los cultivos en este trabajo (25 días).

El efecto de los diferentes medios basales en el rendimiento de atropina y escopolamina, resumidos en la tabla 11, no muestra una diferencia marcada. Sin embargo, parece haber un mayor contenido de atropina en los tejidos crecidos en los medios que contenían las sales del medio B5, esto es en los medios B5 y BSMS; en tanto que la síntesis de escopolamina es mayor en los medios MS y MSB5. Esto podría indicar una mayor o menor eficiencia de los tejidos para llevar a cabo la última parte de esta vía metabólica, en función del medio en que se desarrollan. Sin embargo, dada la variabilidad que existe, sería necesario contar con un mayor número de muestras.

De la tabla 12, los resultados muestran que los callos obtenidos de tallo, tienen al parecer una menor variabilidad en lo que respecta a los contenidos de atropina y escopolamina, además de las concentraciones más altas de estos dos alcaloides. Con rendimientos un poco menores estan los tejidos generados de embrión y finalmente, en donde se observaron los rendimientos menores de estos alcaloides fué en los callos provenientes de

meristemo y hoja. De este último, sólo en una muestra se detectó atropina y en ninguna se encontró escopolamina. Los resultados antes mencionados son congruentes con lo que se obtuvo en las pruebas de alcaloides totales, donde también se observó que fueron los tejidos generados de tallo y embrión los que tuvieron los rendimientos más altos.

Como puede deducirse de la tabla 14, los rendimientos de atropina y escopolamina fueron bajos comparados con los obtenidos por otros autores. Sin embargo debe considerarse que en este trabajo no se llevó a cabo una selección de líneas y por lo tanto los cultivos pueden estar formados tanto de células productoras como de células no productoras, lo que puede ser una de las razones que contribuyeron para que los rendimientos obtenidos sean tan bajos.

En síntesis, del presente trabajo es posible establecer que bajo nuestras condiciones experimentales los tratamientos con 2,4-D  $10^{-6}$  M sólo o en combinación con BA  $10^{-8}$  M, fueron los que generaron un callo de características más adecuadas, siendo los explantes de tallo y embrión en los que se obtuvo una mejor respuesta tanto en la producción de biomasa como de alcaloides totales y específicamente de atropina y escopolamina.

Cabe destacar, que un aumento en la fuente de carbono (sacarosa a 5%), ejerce un efecto promotor en el crecimiento y probablemente en la diferenciación celular.

Se observó también un aumento en la producción de biomasa al incrementar el contenido de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , en el medio hasta alcanzar una concentración de 1900 mg/l, concentraciones mayores provocan una reducción notable en el crecimiento, aunque inducen una mayor



TABLA 14.- COMPARACION DEL CONTENIDO DE HIOSCIAMINA Y HIOSCINA EN CULTIVOS in vitro DE DIFERENTES ESPECIES.

AUTORES	ESPECIE	HIOSCIAMINA	HIOSCINA
1 Hashimoto y Yamada, 1983	Hyoscyamus niger	0.0600 %	0.0050 %
2 Khanna y Khanna, 1976	Datura metel	0.0825 %	0.0219 %
3 Oksman-Caldentey, 1987	Hyoscyamus muticus	0.0198 %	0.001689 %
4 Presente trabajo, 1988	Datura innoxia	0.0006675 %	0.000211 %

Las metodologías seguidas para la cuantificación de atropina y escopolamina en los trabajos anteriores, en el mismo orden fueron:

- 1 Cromatografía gas-liquido
- 2 Cromatografía gas-liquido
- 3 Radicinmunoensayo y enzimoimunoensayo
- 4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

síntesis de alcaloides totales. Como se mencionó, también parece haber una mayor concentración de atropina y escopolamina al aumentar la fuente de  $NH_4NO_3$ , aunque a 2500 mg/l el efecto en la síntesis de escopolamina parece ser inhibitorio.

En cuanto a los medios basales que se ensayaron, fué posible observar una mayor producción de biomasa en el medio MSB5, seguido por el MS. Por otro lado al comparar la respuesta en los medios B5 y MS en relación a la síntesis de alcaloides totales, fué clara la mayor producción en el medio E5 (2 veces mayor). Sin embargo, esta relación no se observó al comparar los contenidos relativos de atropina y escopolamina. En este caso lo que se detectó fué una mayor producción de atropina en los medios B5 y BSMS y de escopolamina en los medios MS y MSB5, pero como ya se mencionó existe una gran variabilidad en los resultados, lo cual hace necesario tomarlos con cautela.

Probablemente la contribución más importante en cuanto a la presencia de atropina y escopolamina, sea el hecho de que al detectar estos alcaloides en los callos, permite concluir que esta ruta metabólica se expresa en el tejido indiferenciado y por lo tanto es potencialmente posible su optimización.

Resulta interesante señalar que en algunos de los tratamientos probados, parece haber una relación inversa entre el crecimiento y la síntesis de alcaloides. Esto concuerda con lo citado por algunos investigadores, quienes en relación a este fenómeno han propuesto el cultivo en dos etapas, una con un medio que favorece un rápido crecimiento, pero no la producción de alcaloides y una segunda, donde el crecimiento se reduce pero la biomasa producida durante la primera etapa aporta una mayor

síntesis de los alcaloides.

Por último podemos destacar algunas perspectivas a seguir en subsiguientes investigaciones, para las cuales el presente trabajo serviría de base:

- a) Estudiar la regulación de la vía metabólica de los alcaloides del tropano.
- b) Seleccionar posibles líneas sobreproductoras para atropina y escopolamina.
- c) Probar la estabilidad de las líneas sobreproductoras.
- d) Establecimiento de cultivos de células en suspensión y optimización del medio.
- e) Finalmente, una vez obtenidas líneas sobreproductoras estables, y optimizadas las condiciones para la producción de estos alcaloides en cultivos en suspensión, eventualmente intentar un escalamiento.

## BIBLIOGRAFIA.

- Aitchinson, P. A., McLeod, A. J. y Yeoman, M. M. 1977. Growth Patterns in Tissue (Callus) Cultures. in Plant tissue and Cell Culture. (Street, H.E., ed.), pp. 267-306. University of California Press.
- Anozie, V. C. 1986. Pharmacognostic Studies on Datura metel Lin. The Anatomy of the Leaf. Int. J. Crude Drug Res. 24(4):206-216.
- Becker, H. 1987. Regulation of Secondary Metabolism in Plant Cell Culture. in Plant Tissue and Cell Culture. (Green, C.E., Somers, G.A., Hackett, W.F. y Biesboer, D.D., eds.), pp. 199-212, Alan. R. Lin. Inc.
- Benjamin, P. C., Roja, M. R., Heble, M. R. y Chadcha, M. S. 1987. Multiple Shoot Cultures of Atropa belladonna: Effect of Physico-Chemical Factors on Growth and Alkaloid Formation. J. Plant Physiol. 129: 129-135.
- Bi, F., Kapadia, Z., Qureshi, W. y Bader, Y. 1982. A Study of the alkaloid Content of Datura metel (Solanaceae) Grown in Pakistan. Pakistan J. Sci. Ind. Res. 25(3): 66-67.
- Bohm, H. 1978. Regulation of Alkaloid Production in Plant Cell Cultures. in Frontiers of Plant Tissue Culture 1978. (Thorpe, A.T., ed.). pp. 201-210. Int. Ass. Plant Cell Cult. Canada.
- Brachet, J. y Cosson, L. 1986. Changes in the Total Alkaloid Content of Datura innoxia Mill. Subjected to Salt Stress. J. Exp. Bot. 37(178): 650-656.
- Collinge, M. 1986. Ways and Means to Plant Secondary Metabolites. Trends in Biotech. 4(12): 299-301.
- Constabel, F. 1984. Callus Culture: Induction and Maintenance. in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. (Vasil, I.K. ed.) pp 27-35. Academic Press, Inc. New York.
- Cosson, L. y Naillant, J. CH. 1976. Les Alcaloides Tropaniques des feuilles du Duboisia myoporoides Neocaledonien. Phytochem. 15: 818-820.
- Deno, H., Yamagata, H., Emoto, T., Yoshioka, T., Yamada, Y. y Fujita, Y. 1987. Scopolamine Production by Root Cultures of Duboisia myoporoides. - II. Establishment of Hairy Root Cultures by Infection with Agrobacterium rhizogenes. J. Plant Physiol. 131: 315-323.
- Dix, P. H. 1986. Cell Line Selection. in Plant Cell Culture Technology. (Yeoman, M. M., ed.), pp. 143-200. Blackwell Scientific Publ., Oxford.

- Dougal, D. K. 1979. Production of Biologicals by Plant Cell Cultures. *Adv. Exp. Med. & Biol.* 118: 135-152.
- Duez, P., Chamart, S., Hanocq, M., Molle, L., Vanhaelen, M. y Vanhaelen-Fastré, R. 1985. Comparison Between Thin-Layer Chromatography-densitometry and High-performance Liquid Chromatography for the determination of Hyoscyamine and Hyoscyne in leaves, fruits and seeds of Datura (Datura spp.). *J. Chromat.* 329: 415-421.
- Evans, W. C. 1979. Tropane Alkaloids of the Solanaceae. in *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*. Hawkes, J.G., Lester, R.N. and Kelding, A.D., eds.), pp 241-254. Academic Press Inc. Limited, London.
- Flick, C. E., Evans, D. A. y Sharp, W. K. 1983. Organogenesis. in *Handbook of Plant Tissue Culture Vol. 1*. (Evans, D. A., Sharp, W. K., Ammirato, P. V. and Yeoman, Y. eds.) pp 13-81. MacMillan Publ. Co. New York.
- Fliniaux, M. A. y Jacquín-Dubreuil, A. 1987. A Competitive Solid-Phase Enzyme Immunoassay for the Evaluation of Tropane Alkaloids in Plant Material Using Anti-DL-tropine Acid Antibodies. *Planta Med.* 53(1):87-90.
- Flores, H. E., Hog, M. W. y Pickard, J. J. 1987. Secondary Metabolites from Root Cultures. *Trends Biotech.* 5(3): 64-69.
- Fodor, G. 1968. The Tropane Alkaloids. in *Progress in Phytochemistry*. (Reinhold, C., Liwschitz, Y. eds.), Vol. 1:491-543. Interscience Pub. London.
- Fodor, G. 1971. The Tropane Alkaloids. in *The Alkaloids*. (Manke, R.H.F. ed.) XIII: 383. London Academic Press. London.
- Font Quer, P. 1973. *Plantas Medicinales - El Dioscorides Renovado*. Labor, España pp. 595-598.
- Fowler, M. W. 1983. Commercial Applications and Economic Aspects of Mass Plant Cell Culture. in *Plant Biotechnology*. (Mantell, S.H. y Smith, H., eds.), pp. 3-37, Cambridge University Press, Cambridge.
- Fowler, M. W. 1986a. Process Strategies for Plant Cell Cultures. *Trends in Biotech.* 4(8): 214-219.
- Fowler, M. W. 1986b. Industrial Applications of Plant Cell Culture. in *Plant Cell Culture Technology*. (Yeoman, M.M., ed.), pp. 202-227. Blackwell Scientific Publ., Oxford.
- Fujita, Y. y Tabata, M. 1987. Secondary Metabolites from Plant Cells - Pharmaceutical Applications and Progress in Commercial Production. in *Plant Tissue and Cell Culture*.

(Green, C.E., Somers, D.A., Hackett, W.P. y Biesboer, D.D. eds.), pp. 169-185. Alan. R. Lin. Inc.

- Gamborg, O. L., Miller, R.A. and Ojima, K. 1968. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Gamborg, O. L. 1984. Plant Cell Cultures: Nutrition and Media. in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. (Vasil, I.K. ed.) pp 19-25. Academic Press, Inc. New York.
- George, E. F. y Sherrington, P. D. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture, Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics Ltd. England 709 p.
- Guerra, F. y Olivera, H. 1954. Las Plantas Fantásticas de México (Tolache). Imprenta del Diario Español Mex. pp. 97-102.
- Hamill, D. J., Parr, A. J., Rhodes, J. C., Robins, R. J. y Walton, J. N. 1987. New Routes to Plant Secondary Products. *Bio/technol.* 5: 800-804.
- Hashimoto, T. y Yamada, Y. 1983. Scopolamine Production in Suspension Cultures and Redifferentiated Roots of Hyoscyamus niger. *Planta Med.* 47: 195-199.
- Hashimoto, T., Yukimune, Y. y Yamada, Y. 1986. Tropane Alkaloid Production in Hyoscyamus Root Cultures. *J. Plant. Physiol.* 124: 61-75.
- Hashimoto, T., Kohono, J. y Yamada, Y. 1987. Epoxidation in vivo of Hyoscyamine to Scopolamine does not Involve a Dehydration Step. *Plant Physiol.* 84: 144-147.
- Hashimoto, T. y Yamada, Y. 1987. Effects of Culture Conditions on Tropane Alkaloid Formation in Hyoscyamus niger suspension Cultures. *Agric. Biol. Chem.*, 51(10): 2769-2774.
- Henry, T. A. 1949. The Plant Alkaloids. 4a. ed. Blakiston Co. pp 64-115. Philadelphia.
- Hiraoka, N. y Tabata, M. 1974. Alkaloid Production by Plants Regenerated from Cultured Cells of Datura innoxia. *Phytochem.* 13: 1671-1675.
- Hiraoka, N. y Kamada, T. 1983. Effects of non-Frozen Cold Storage on the Growth, Organogenesis and Secondary Metabolism of Callus Cultures. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 3: 349-357.
- Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H., y Shimomura, K., 1986. Alkaloid Production by Hairy Root Cultures in Atropa belladonna. *Plant Cell Rep.* 5: 239-242.
- Kapahi, B. K. y Sorin, Y. K. 1978. Natural Factors Governing the

Growth and Alkaloid Yield in *Datura innoxia* Mill.  
Ind. J. Pharm. 1: 14-15.

- Khanna, P. y Khanna, R. 1976. Effect of Various Auxin on Growth and Production of Tropic Alkaloid from *in vitro* Tissue Culture of *Datura metel* Linn. Ind. J. Pharm. 38(S): 120-123.
- Kitamura, Y., Miura, H. y Sugii, M. 1985. Alkaloid Composition and Atropine Esterase Activity in Callus and Differentiated Tissues of *Duboisia myoporioides* R. Br. Chem. Farm. Bull. 33(12): 5445-5448.
- Kitamura, Y., Miura, H. y Sugii, M. 1986. Esterification of tropine in Cultured Tissues of *Duboisia myoporioides*. Phytochem. 25(11): 2541-2542.
- Koul, S., Ahuja, A. y Grewal, S. 1983. Growth and Alkaloid Production in Suspension Cultures of *Hyoscyamus muticus* as influenced by Various Cultural Parameters. Planta Med. 47: 11-16.
- Kuang-Chi, Ch. y Cheng, L. 1981. Callus Cultures of the Three Well-Known Chinese Herbs and Their Medicinal Contents. in Plant Tissue Culture Proceedings of the Beijing (Pekin) Symposium 1978. pp 469-479. Pitman Publishing Ltd., London.
- Leete, E. 1959. The Alkaloids of *Datura*. in Blakeslee: The Genus *Datura*. (Avery, G.A., Satina, S. y Rietsema, J. eds.), pp. 48-56. The Ronald Press, Co. New York.
- Leete, E. 1980. Alkaloids Derived from Ornithine, Lysine and Nicotinic Acid, in Secondary Plant Products. (Bell, E.A. y Cherlwood, B.V., eds.), pp. 67-71. Springer-Verlag, Berlin.
- Lindsey, K. y Yeoman, M.M. 1983. Novel Experimental Systems for Studying the Production of Secondary Metabolites by Plant Tissue Cultures. in Plant Biotechnology. (Mantell, S.H. y Smith, H., eds.), pp. 39-66. Cambridge University Press. Cambridge.
- Lindsey, K. y Yeoman M.W. 1986. Immobilized Plant Cells. in Plant Cell Culture Technology. (Yeoman, M.W., ed.), pp. 228-269. Blackwell Scientific Publications., Oxford.
- Luarantana, O. y Griffin, W. J. 1982. Alkaloids of *Duboisia hopwoodii*. Phytochem. 21(2): 449-451.
- Luckner, M. y Diettrich, B. 1987. Biosynthesis of Carbenolids in Cell Cultures of *Digitalis lanata* - The Results of a New Strategy. in Plant Tissue and Cell Culture. (Green, C.E., Somers, D.A., Hackett, W.P. y Biesboer, D.D., eds.), pp. 187-197. Alan R. Liss Inc.

- Mano, Y., Nabeshima, S. y Matsui, Ch. 1986. Production of Tropane Alkaloid by Hairy Root Cultures of Scopolia japonica. Agric. Biol. Chem. 50(11): 2715-1722.
- Mantell, S. H. y Smith, H. 1983. Cultured Factors that Influence Secondary Metabolite Accumulations in Plant Cell and Tissue Cultures. in Plant Biotechnology. (Mantell, S.H. y Smith, H., eds.), pp 75-108. Cambridge University Press. Cambridge.
- McCraw, A. E. y Wooley, J. G. 1982. Biosynthesis of the Tropane Ester Alkaloids in Datura. Phytochem. 21(11): 2653-2657.
- Meins, L. A. 1986. Determination and Morphogenetic Competence in Plant Tissue Culture. in Plant Cell Culture Technology. (Yeoman, M. M., ed.), pp 7-26. Blackwell Scientific Publ.
- Misawa, M. y Samejiina, H. 1978. Production of Biologically Active Substances by Plant Tissue Culture. in Frontiers of Plant Tissue Culture 1978. (Thorpe, A.T., ed.), pp. 353-362, Int. Ass. Plant Cell Cult. Univ. Calgary, Canada.
- Morris, P., Scragg, A. H., Smart, N. J. Y Stafford, A. 1985. Secondary Product Formation by Cell Suspension Cultures. in Plant Cell Culture, a Practical Approach. (Dixon, R.A., ed.), pp. 127-167. IRL Press. Oxford.
- Nanddi, R. P. y Chatterjee, S. K. 1975. Relation Between Nitrogen & Alkaloid Contents During Different Developmental Stages of Datura innoxia Mill. Ind. J. Exp. Biol. 13: 215-216.
- Oksman-Caldentey, K. M., Vourela, H., Straub, A. y Hiltunen, R. 1987. Variation in the Tropane Alkaloid Content of Hyoscyamus muticus Plants and Cell Culture Clones. Planta Med. 53(4):349-354.
- Quintero, R. A., Baeza, A. y Soriano, J. 1986. Tomato Tissue Culture and Isolation of Metabolically Active Protoplasts. Phyton 46(1): 61-68.
- Reish, B. 1983. Genetic variability in Regenerated Plants. in Handbook of Plant Tissue Culture, Vol. 1 (Evans, D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P. V. y Yeoman, Y. eds.), pp 748-769. MacMillan Publ. Co. New York.
- Rosentein, E., Alvarado, O. H., Friehteder, B. L., Gaitan, V. G., Folch, A. P., González, C., Ordoñez, A. A., Ordoñez, R., Ramírez, N. Ch. y Shults, M. C. 1985. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Ediciones P.L.M., S.A., 1075pp., México.
- Sharma, J. R., Lal, R. R., Lavania, V. C., Gupta, M. M. y Mishra, O. H. 1986. Productivity and Cytogenetic Analysis of an Unbranched Mutant in Hyoscyamus niger L. Plant Breeding 97: 375-378.



- Sheler, M. L., Pyne, J. W. y Hallsby, G. A. 1984. Prospects and Problems in the Large Scale Production of Metabolites from Plant Tissue Cultures. *J.A.O.C.S.*, 61(11): 1724-1728.
- Shimomura, K., Satake, M. y Kamada, H. 1986. Production of Useful Secondary Metabolites by Hairy Roots Transformed with Ri Plasmid. in VI International Congress of Plant Tissue & Cell Culture (Abstracts). (Somers, D.A., Gengenbach, B.G., Bresboer, D.D., Rackett, W.P. and Green, C.E., eds.), pp 250. Int. Ass. Plant Tissue Cult. Minnesota.
- Sinha, A. S. y Varma, K. C. 1966. Effect of Fertilizers on the Growth and Alkaloid Content of *Datura innoxia* Miller. *Indian J. Pharm.* 28(1): 3-4.
- Staba, E. J. 1980. Production of Useful Compounds from Plant Tissue Cultures. in Plant Tissue Cultures as Source of Biochemicals. (Staba, E. J., ed.), pp. 59-97. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Staba, E. J. 1982. Production of Useful Compounds from Plant Tissue Cultures. in Plant Tissue Culture 1982, Proc. 5th. Int. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. (Fujiwara, A., ed.), pp. 25-30. Jpn. Ass. Plant Tissue Cult. Tokio.
- Tabata, M., Yamamoto, H., Hiraoka, N. y Konoshima, M. 1972. Organization and Alkaloid Production in Tissue Cultures of *Scopolia parviflora*. *Phytochem.* 1: 949-955.
- Tabata, M. e Hiraoka, N. 1976. Variation of Alkaloid Production in *Nicotiana rustica* Callus Cultures. *Physiol. Plant.* 38: 19-23.
- Waller, G. R. y Nowacky, E. K. 1978. Alkaloid Biology and Metabolism in Plants. Plenum Press, New York. pp. 249.
- Winthers, L.A. 1983. Germplasm Storage in Plant Biotechnology. in Plant Biotechnology. (Mantell S.H. y Smith, H. eds.) pp 187-218. Cambridge University, Cambridge.
- Witte, L., Muller, K. y Arfmann, H. A. 1987 Investigation of the Alkaloid Pattern of *Datura innoxia* Plants by Capillary Gas-Liquid-Chromatography-Mass-Spectrometry. *Planta Med.* 53(2):192-197.
- Yamada, Y. y Hashimoto, T. 1982. Production of Tropane Alkaloids in Cultured Cells of *Hyoscyamus niger*. *Plant Cell Rep.* 1: 101-103.
- Yamada, Y. y Endo, T. 1984. Tropane Alkaloid Production in Cultured Cells of *Duboisia leichhardtii*. *Plant Cell Rep.* 3: 186-188.
- Zenk, H. M. 1978. The Impact of Plant Cell Culture on Agriculture. in *Frontiers of Plant Tissue Culture 1978.*

(Thorpe, A. T., ed.). pp 1-11. Int. Ass. for Plant Cell Culture. Univ. Calgary. Calgary, Canada.

Zheng, G. Z., He, J. B. v Wang, S. L. 1982. An Anisodus acutangulus Callus Strain of High and Stable Growth Rate Selected from the Callus after Irradiation with Co ray in Plant Tissue Culture 1982, Proc. Sth. Int. Cong. Plant Tissue & Cell Culture. (Fujiwara, A., ed.), pp 339-342. Jpn. Ass. Plant Tissue Cult. Tokio, Japon.

Zheng, G. Z. 1986. Identification of Hyoscyamine and Scopolamine Crystal from Fermenter Culture Cells of Anisodus acutangulus. in VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture (Abstracts). (Somersa, D. A., Gengenbach, B.G., Biesboer, D.D., Hackett, W.P. and Green, C.E., eds), pp. 251, Int. Ass. Plant Tissue Cult. Minnesota.

## ANEXO

### 1.- REACTIVOS

- |  |                   |
|--|-------------------|
| - Acido 2,4-diclorofenoxiacético                           | ICN Pharm. Inc.   |
| - Acido 1-naftalenacético                                  | ICN Pharm. Inc.   |
| - Acido indol-3-acético                                    | ICN.R&K Lab. Inc. |
| - 6-benciladenina  | J.T. Baker        |
| <br>   |                   |
| - Acido sulfúrico  | J.T. Baker        |
| - Alcohol isopropílico                                     | J.T. Baker        |
| - Atropina   | Merck             |
| - Cloroformo   | J.T. Baker        |
| - Hidróxido de amonio                                      | J.T. Baker        |
| - p-dimetilaminobenzaldehido                               | Merck             |
| - Sacarosa   | Bioxon            |
| <br>   |                   |
| - Todas las sales inorgánicas utilizadas fueron grado R.A. |                   |

## 2.- MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO	MS	B5
SALES	(mg/l)	(mg/l)
Macronutrientes		
NH NO 4 3	1,650	-----
KNO <sub>3</sub>	1,900	2,500
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	150
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	250
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-----
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-----	134
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-----	150
Micronutrientes		
KI	0.830	0.750
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.200	3.000
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.300	-----
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-----	10.000
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.600	2.000
Na MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.250	0.250
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
EDTA-Sal disodica	37.300	37.300
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.800	27.800
Sacarosa	30.000	20,000
glicina	2.000	-----
pH	5.8	5.5
VITAMINAS		
Inositol	100.000	100.000
Acido nicotnico	0.500	1.000
Piridoxina	0.500	1.000
Tiamina	0.100	10.000