



45
24'

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**"ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO CELULAR DE
Hyptis suaveolens L. POIT Y ESTUDIO QUIMICO
PRELIMINAR DE SU CONTENIDO METABOLICO".**

T E S I S

Que para obtener el Título de:

LICENCIADA EN BIOLOGIA

Presenta:

GABRIELA DOMINGUEZ RAMIREZ

FALLA DE ORIGEN



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.

CONTENIDO

	Pag.
I. Índice de figuras	II I
II. Índice de cuadros	IV
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 Posición taxonómica y descripción de la especie	4
3. Antecedentes	6
4. Objetivos	10
4.1 Objetivo general	10
4.2 Objetivos específicos	10
5. Metodología	11
5.1 Material vegetal	11
5.2 Medios nutritivos y reguladores del crecimiento	11
5.3 Cultivo de tejido	14
5.4 Establecimiento del cultivo de células en suspensión	15
5.5 Curvas de crecimiento	15
5.6 Aislamiento de los constituyentes metabólicos	15
5.7 Análisis cromatográfico preliminar del extracto para la dete <u>c</u> ción de constituyentes fenólicos y terpénicos	16
5.8 Aislamiento y cuantificación de los esteroides	17
5.9 Análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas de la fracción de fitosteroides	18

	Pag.
5.10 Caracterización de los fitosteroles.	18
5.11 Análisis anatómico	18
6. Resultados y discusión	21
6.1 Inducción del callo de <u>Hyptis suaveolens</u>	21
6.2 Cultivo de células en suspensión	28
6.3 Curvas de crecimiento	29
6.4 Evaluación preliminar del contenido metabólico	36
6.5 Análisis anatómico	45
6.5.1 Morfología y estructura de los callos	45
6.5.2 Origen del callo	45
6.5.3 Características del callo	46
7. Conclusiones	53
8. Bibliografía	55

I, INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Pitorreguladores usados en el medio basal	13
figura 2. Efecto del 2,4-D sobre el peso fresco del cultivo de <u>Hyptis suaveolens</u>	33
figura 3. Efecto del ANA sobre el peso fresco del cultivo de <u>Hyptis</u> <u>suaveolens</u>	34
figura 4. Efecto del AIA sobre el peso fresco del cultivo de <u>Hyptis</u> <u>suaveolens</u>	35
figura 5. Cromatografía en capa fina de los extractos de acetato de etilo y cloroformo	37
figura 6. Espectro en UV del extracto de acetato de etilo	38
figura 7. Esteres de enol derivados del ac. cinámico	39
figura 8. Cromatograma del extracto cloroformico obtenido mediante cromatografía de gases	40
figura 9. Espectro de masas del campesterol	41
figura 10. Espectro de masas del estigmasterol	42
figura 11. Espectro de masas del β -sitosterol	43
figura 12 Corte histológico de callo inducido a partir de tallo.	49
figura 13 Corte histológico de callo inducido a partir de hoja	49
figura 14 Corte histológico de callo inducido a partir de hoja	50
figura 15 Corte semifino de callo de hoja	50
figura 16 Corte semifino, estructuras provasculares	51
figura 17 Corte semifino, detalle de estructuras provasculares	51
figura 18 Corte histológico de callo de hoja inducido con ANA	52
figura 19 Corte histológico de callo de hoja, diferenciación del tejido vascular	52

II. INDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Componentes del medio basal MS (Murashige and Skoog, 1962)	12
Cuadro 2. Efecto del 2,4-D sobre la apariencia de los cultivos celulares de <u>Hyptis suaveolens</u>	22
Cuadro 3. Efecto del ANA sobre la apariencia de los cultivos celulares de <u>H. suaveolens</u>	23
Cuadro 4. Efecto del AIA sobre la apariencia de los cultivos celulares de <u>H. suaveolens</u>	24
Cuadro 5 Efecto de los diferentes fitorreguladores sobre la producción de esteroides en el cultivo de <u>H. suaveolens</u>	44

1. RESUMEN

Diversos metabolitos secundarios de gran importancia biológica, se han aislado de la especie de Hyptis suaveolens, dentro de los cuales se encuentran aceites esenciales como el timol y algunos monoterpenos, por lo que el cultivo de H. suaveolens presenta una gran alternativa para la producción de diversos compuestos de interés socioeconómico.

En este trabajo se estableció el cultivo de callos a partir del hipocotilo y hojas cotiledonarias de plantulas obtenidas in vitro, - donde se variaron los reguladores de crecimiento 2,4-D, ANA y AIA, - en el medio MS (Murashige and Skoog, 1962). Los resultados obtenidos mostraron que el fitorregulador apropiado para el crecimiento del callo es el 2,4-D a bajas concentraciones (0.01 y 0.1 ppm). Los callos obtenidos con este fitorregulador no presentaron ninguna diferenciación celular, mientras que el ANA y el AIA, aunque fueron inductores menos efectivos para el establecimiento del callo, provocaron la diferenciación de éstos en primordios radiculares.

Para la evaluación del contenido metabólico se realizaron cromatografías en capa fina y cromatografía de gases. Estas técnicas analíticas demostraron que los callos sintetizan derivados fenólicos del ácido cinámico y diversos fitosteroles.

Los estudios histológicos confirmaron la formación de primordios radiculares a partir de los callos de H. suaveolens inducidos por el empleo del ANA. Esta diferenciación ocasiona el inicio de las rutas de biosíntesis involucradas en el metabolismo secundario.

2. INTRODUCCION

Los últimos cuarenta años han sido decisivos en el desarrollo de nuevos fármacos que han permitido el control y, en algunos casos afortunados, la cura de numerosas enfermedades.

Aunque muchos de estos remedios son derivados sintéticos o productos antibióticos, no hay duda acerca de la gran aportación que han hecho las plantas medicinales y sus productos derivados en este sentido. Además resulta evidente que los fármacos o sus productos intermedios de origen natural, se obtienen de las especies vegetales que gozan de una reputación de uso popular por su contenido de principios activos.

Por lo tanto, la medicina tradicional representa una práctica alternativa para la obtención de posibles fuentes de sustancias biológicamente activas. Los estudios químicos de plantas medicinales o de utilidad económica, desempeñan un papel importante como poderosas herramientas para la investigación de los constituyentes químicos de la flora, así como para el descubrimiento de sustancias bioactivas de importancia en estudios farmacológicos.

Durante los últimos años se han desarrollado numerosas metodologías que permiten cultivar una amplia variedad de especies vegetales en medios artificiales perfectamente definidos. Cientos de plantas pueden cultivarse en un estado de diferenciación como el de callos y cultivos en suspensión.

Los beneficios que brinda la investigación con cultivos celulares in vitro, permiten plantear la producción de metabolitos secundarios de interés comercial o terapéutico a partir del cultivo de tejidos vegetales. Entre estos productos se encuentran sustancias de interés económico que representan muchos fármacos utilizados como los alcaloides, aplicados en la terapéutica contemporánea, y los aceites esenciales empleados ampliamente como colorantes y saborizantes de alimentos procesados. (Loyola y Reyes, 1985) . .

La obtención comercial de los metabolitos secundarios, que se realiza mediante la extracción de la planta completa presenta numerosos problemas en la manufactura de tales compuestos. En primer lugar los suministros de la materia prima pueden ser inciertos debido a calamidades naturales, tales como las variaciones del clima o la pérdida de cultivos debido a las plagas. Aun habiendo suficiente materia prima, ésta deberá conservarse en estado de máxima actividad fisiológica para asegurar altos rendimientos de los metabolitos deseados durante el cultivo y el almacenamiento de la planta.

Un segundo problema es la domesticación de las plantas silvestres y la consecuente pérdida, en algunas ocasiones, de su capacidad biosintética en la producción de metabolitos secundarios debido a una sobreexplotación.

Con el objeto de eliminar estos problemas se han propuesto como una alternativa de producción, el empleo de los cultivos de tejidos vegetales (CTV). Estos sistemas pueden proveer un suministro continuo

y homogéneo de materia prima en un estadio fisiológico uniforme debido a su independencia del medio ambiente ya que su crecimiento se realiza en condiciones controladas y estériles. Por otro lado, los ctv se pueden manipular con mayor facilidad que las plantas completas para incrementar los rendimientos en metabolitos secundarios y por lo tanto, el ctv representa un gran potencial de aplicación a nivel industrial.

El presente trabajo describe el estudio del cultivo de Hyptis suaveolens con el fin de obtener las mejores condiciones para su desarrollo y propagación. Al mismo tiempo se describirá el estudio fitoquímico preliminar del contenido metabólico del mismo, con el objeto de reconocer la posible formación de metabolitos secundarios en los cultivos celulares de esta especie.

2.1 POSICION TAXONOMICA Y DESCRIPCION DE LA ESPECIE.

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Genero: Hyptis

Especie: suaveolens L. poit.

Clasificación según Arthur Cronquist, 1988.

Nombres comunes: Chía y hierba del burro.

Descripción: Hierba ermalezada anual, hasta de 3 mm de altura, laminas

foliares de 3-10 cm de largo, peciolo generalmente de 3-5 en cimas pedunculadas. Maleza común y difundida en los trópicos de ambos hemisferios.

La importancia económica de esta especie se debe principalmente a sus usos terapéuticos en la medicina tradicional de México.

Las bondades medicinales asociadas popularmente a esta planta son:

Para el paludismo.- Infusión de toda la planta.

Propiedades carminativas.- infusión de las hojas.

Analgésico estomacal.- Infusión de toda la planta.

Para afecciones intestinales.- triturar la semilla y tomar como bebida.

Como antipirético.- Infusión de las hojas.

Para la tos y enfermedades respiratorias.- Infusión de las hojas.

Para diarrea y disenteria.- Infusión de las hojas.

Como condimento.- Usar las hojas.

Como bebida refrescante.- Las semillas.

3, ANTECEDENTES

El género Hyptis está compuesto aproximadamente por 400sp de la familia de las labiadas y se encuentra distribuido desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina. Son plantas de una gran diversidad en la forma vegetativa, variando desde anuales efímeras hasta árboles pequeños, predominantemente subarbutos o hierbas perenes, sus hojas también son variables pero en la mayoría de los casos son ovaladas y bastante amplias, pecioladas o sésiles y con una estructura floral extraordinariamente uniforme. La corola bilabiada, característica de esta familia, ha experimentado muy pocas modificaciones durante el proceso evolutivo. (Epling, 1949).

El género está conformado por un grupo de plantas de gran importancia económica en la vida diaria de nuestro pueblo, ya que todas las especies de uso medicinal presentan propiedades antisépticas, carminativas y antihelmínticas (Del Amo, 1979; Maseki, 1962 y Wagner, 1973).

Las especies del género Hyptis se caracterizan por ser aromáticas, singularidad que les confieren sus aceites esenciales y las propiedades tónico-estimulantes, se atribuyen a sus aceites volátiles (Roig, 1974). Por lo tanto la importancia de estas plantas se incrementa por el interés económico que representan para la industria, particularmente, la farmacéutica y la de la perfumería, y en menor proporción pero con gran perspectiva, para la industria de los saborizantes, (Paredes, 1973).

La gran diversidad de usos populares de las plantas del género

Hyptis implica en forma indirecta, una amplia diversidad en el metabolismo secundario de estas especies, misma que representa un extenso panorama para la investigación de productos naturales como fuentes potenciales de sustancias biológicamente activas. (Pereda-Miranda et al., 1990).

El aislamiento de diversos compuestos asociados con una actividad biológica de interés terapéutico, a partir de algunas plantas del género Hyptis, ha marcado la pauta a seguir de numerosas investigaciones fitoquímicas. Como por ejemplo la actividad bactericida de las plantas del género Hyptis puede atribuirse, en la mayoría de los casos, a los componentes de los aceites esenciales. Por ejemplo la actividad bacteriostática de los monoterpenos citral, citronelal y linalool, los cuales representan los constituyentes mayoritarios de las esencias de H. suaveolens, se asoció con la respuesta en contra de algunas bacterias patógenas, (Jaín et al, 1974).

Las propiedades antisépticas de estas esencias se relacionan con el contenido en los aceites esenciales como el timol, aplicado en la terapéutica de las inflamaciones de las vías respiratorias y como profiláctico, por su poderosa acción bactericida. (Wagner, 1977).

La especie Hyptis pectinata, que se utiliza en vaporizaciones como remedio en casos de congestión pulmonar y sinofaringitis, presenta un elevado contenido de timol (26%) en su aceite esencial y por lo tanto, a este monoterpeno se asocian las propiedades antibacterianas de la planta.

Como resultado de la continua investigación sobre plantas que presentan

actividad antitumoral, el género Hyptis también ha sido sugeto de estudio (Pereda-Miranda et al., 1990).

Una investigación fitoquímica sobre plantas mexicanas y del Sudeste de los Estados Unidos, con una posible actividad antitumoral, demostró que el extracto clorofórmico de las partes aéreas de Hyptis amoryi era activo contra el carcinoma de Walker en ratas. Este estudio estableció que el responsable de tal acción es el ácido betulínico, triterpeno que también se aisló del extracto de raíz de H. suaveolens. (Misra, 1983) y de las partes aéreas de Hyptis albida (Pereda-Miranda y Delgado, 1990).

Otros triterpenos aislados de la raíz de H. suaveolens y H. capitata, el lupeol y el ácido ursólico han demostrado ser potentes agentes anticancerígenos (Kingston y Munjal, 1978; Lee, 1988).

Por lo tanto, la diversidad de usos populares de las plantas del género Hyptis representan un extenso panorama para la investigación de productos naturales como fuentes potenciales de sustancias activas. Por otra parte, el empleo de cultivo de tejidos vegetales en medios definidos bajo condiciones controladas y asépticas posibilita una mayor manipulación experimental para la obtención de los metabolitos secundarios de interés biológico, que en numerosas ocasiones resulta imposible desde el punto de vista práctico en la fitoquímica convencional. Por esta razón no es sorprendente que dada la gran variedad de productos secundarios en plantas superiores, estos también hayan sido investigados en los cultivos celulares in vitro. (Loyola, 1985).

El cultivo de tejidos ha sido utilizado para estudiar con detalle las rutas metabólicas de biosíntesis de algunos productos y su regulación, y de esta manera, ha sido posible controlar su producción desde una perspectiva más racional (Staba, 1980).

En las familias de las labiadas sólo se han establecido los cultivos de 7 especies de interes económico, ya que son utilizados como condimentos en la culinaria de numerosos países.

Los extractos obtenidos de los cultivos celulares de algunas especies de labiadas: Lavandula angustifolia, Plectranthus caninus, Rosmarinus officinalis, Mentha spicata, Mentha longifolia, Salvia officinalis presentaron una significativa actividad fungicida (1mg) sobre Cladosporium herbaricum y en todos los casos la mezcla de isómeros (Z, E) y (E,E) de ésteres de enol derivados del ácido cafeico fue la responsable de la actividad detectada (Banthorpe, et al , 1988). Otro constituyente fenólico caracterizado en estos estudios fue el ácido rosmarínico.

Los fitosterol, isofucoesterol, sitosterol y estigmasterol fueron aislados de los cultivos celulares de L. angustifolia en un rendimiento en peso seco del 0.01, 0.02, y 0.005 %, respectivamente. (Banthorpe, et al, 1988).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

El objetivo fundamental del presente trabajo experimental es lograr el establecimiento del cultivo celular de Hyptis suaveolens con el propósito de iniciar el estudio químico del contenido metabólico de los callos obtenidos y predecir las condiciones óptimas para la formación de productos naturales de interés para estudios biosintéticos posteriores.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.- Establecer el cultivo celular de H. suaveolens en un medio sólido.
- 2.- Establecer el cultivo de células en suspensión.
- 3.- Determinar la cinética de crecimiento para los cultivos establecidos.
- 4.- Realizar el estudio histológico preliminar y observar el grado de diferenciación inducido en los callos por el efecto de diferentes condiciones experimentales.
- 5.- Evaluar de manera preliminar el contenido metabólico de los callos.

5. METODOLOGIA

5.1 MATERIAL VEGETAL:

Para la realización del presente trabajo se utilizaron semillas de plántulas de la " chía ", Hyptis suaveolens.

La desinfección y la siembra de las semillas se realizó de la siguiente manera:

- a) Las semillas se lavaron con agua corriente
- b) se colocaron en etanol al 70% durante 1 min.
- c) se eliminó el etanol con vacío y se lavaron con agua destilada.
- d) se desinfectaron remojándolas en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 10 min.
- e) se eliminó el hipoclorito al vacío con 4 o 5 lavadas de agua estéril.
- f) por último, se colocaron en el medio Murashige y Skoog (MS) sólido sin fitorreguladores.

La inducción de la germinación se realizó en condiciones de luz y oscuridad total, a 25°C.

5.2 MEDIOS NUTRITIVOS Y REGULADORES DEL CRECIMIENTO:

El medio utilizado durante todo el experimento fue MS (Murashige and Skoog, 1962) sólido, usando como soporte agar (Bogan, 1982). A un volumen de agua determinado se le agregaron las soluciones de sales nutritivas indicadas en el cuadro 1, manteniéndose en agitación continua con la obtención de una suspensión homogénea.

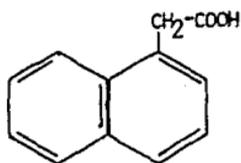
CUADRO 1.

MEDIO BASAL MS (MURASHIGE AND SKOOG, 1962)

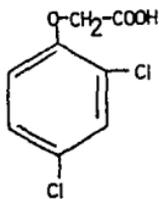
COMPUESTO	CONCENTRACION mg/ml
Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	440.000
Nitrato de Amonio (NH_4NO_3)1650.000
Nitrato de Potasio (KNO_3)1900.000
Yoduro de potasio (KI)	0.830
Cloruro de Cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025
Fosfato de Potasio (KH_2PO_4)170. 000
Acido Bórico (H_3BO_3)	6.200
Molibdato de Sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.250
Sulfato de Magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370.000
Sulfato de Manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	16.900
Sulfato de Cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.025
Sulfato de Zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8.600
Sulfato de Hierro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27.800
E.D.T.A. (2 Na)	37.300
Mio-Inositol	100.000
Acido Nicotínico	0.500
Tiamina HCl	0.100
Piridoxina HCl	0.500
Glicina	2.000
Sacarosa	30000.000
Agar	0.8%

pH = 5.8

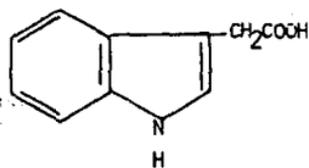
Fig. 1. FITORREGULADORES USADOS,



ACIDO NAFTALENACETICO (ANA)



ACIDO 2,4-DICLOROFENOXIACETICO (2,4-D)



ACIDO INDOLACETICO (AIA)

Posteriormente, se añadió la sacarosa en una concentración de 30 g/l. Los fitorreguladores utilizados fueron el ácido 2,4 Diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalen acético (ANA) y ácido indol acético (AIA), (fig. 1) a una concentración de 0.01, 0.1, 1 y 10 ppm, respectivamente. El pH se ajustó a 5.8 con una solución de NaOH 0.1 N y HCl 0.1 N, aforando por último al volumen requerido. El medio preparado se esterilizó en autoclave por 15 min. a 120°C.

5.3 CULTIVO DEL TEJIDO:

La inducción se realizó a partir de fracciones de hojas cotiledonarias y tallo (Strit, 1979), de las plántulas obtenidas a partir de la germinación de las semillas en condiciones estériles en luz continua. Las hojas se cortaron por la mitad y los tallos en pequeños segmentos de aproximadamente 1 cm. Estos explantes se usaron para la iniciación y formación del callo. Los cultivos se realizaron en frascos de vidrio conteniendo 25 ml del medio nutritivo MS solidificado con agar al 0.8%. Los frascos se sellaron con tapas de plástico o papel aluminio reforzado con ligas.

Los medios se colocaron en cámaras de crecimiento a 25°C \pm 1 °C con luz y oscuridad continua. Los cultivos se observaron durante un periodo de 3 a 4 semanas con resiembras cada 10 días. Las resiembras se realizaron en condiciones estériles, eliminando las zonas necrosadas y transfiriendo el tejido calloso a un medio sólido nuevo, sin alterar la concentración del fitorregulador utilizado a partir de la inducción. Los cultivos se mantuvieron en estas condiciones durante varios meses.

5.4 ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION.

El medio utilizado para la inducción del callo y el medio para el mantenimiento en cultivo en suspensión constó de las mismas concentraciones de sales, vitaminas y fitorreguladores.

El medio que se utilizó fue el MS líquido con 1 mg/l de 2,4-D. Para la iniciación del cultivo se utilizaron 2 gr de callo, disgregándolo dentro de un matraz Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio líquido.

La incubación se realizó en una plataforma de agitación rotacional con una velocidad de 100 rpm y a temperatura ambiente.

5.5 CURVAS DE CRECIMIENTO:

El crecimiento del tejido celular se determinó en función del peso fresco, para lo cual una alícuota de 2 gr de callo se colocó en el medio MS sólido y se determinó el aumento del volumen celular durante 18 días, cuantificando el peso cada tercer día. El tejido se transfirió a un medio nuevo cada 72 hrs. Estas operaciones se realizaron por quíntuplicado.

5.6 AISLAMIENTO DE LOS CONSTITUYENTES METABOLICOS:

5.6.1 Procedimientos de extracción.

40 gr de tejido celular se expusieron a una corriente continua de aire caliente durante 5 hrs. Una vez seco el material vegetal (aprox. 4 g) se extrajo exhaustivamente con Acetato de etilo (AcOET) (20 ml)

a temperatura ambiente durante 72 hrs. Posteriormente, se procedió a la preparación del extracto mediante filtración, eliminación del residuo sólido amorfo y concentración del disolvente de extracción.

De la misma manera, se procedió a extraer 40 g de material celular para obtener un extracto cloroformico.

5.7 ANALISIS CROMATOGRAFICO PRELIMINAR DEL EXTRACTO PARA LA DETECCION DE CONSTITUYENTES FENOLICOS Y TERPENICOS.

Los análisis preliminares del extracto de acetato de etilo se realizaron mediante cromatografías en capa fina (CCF).

Una pequeña cantidad del residuo se disolvió en metanol (MeOH) y se aplicó una gota de esta solución sobre un cromatofolio (gel de sílice 60F₂₅₄ Merck). Para la detección de los constituyentes fenólicos, se utilizó como sistema de elución la mezcla de (Cloruro de metileno-Metanol-ácido acético; 30: 16; 4). Una vez desarrollado el cromatograma, la visualización de los fenoles se realizó de la siguiente manera:

El primer paso consistió en exponer las placas cromatográficas pre via evaporación del eluyente, a la luz ultravioleta de onda corta. Se marcaron aquellas zonas que exhibieran fluorescencia. Inmediatamente, las placas se humedecieron mediante un aspersor con una solución de H₂SO₄ sulfato cérico y se revelaron por calentamiento sobre una parrilla a 80°C para la detección de los constituyentes terpénicos adicionales.

Alternativamente, la visualización de los fenoles se realizó mediante exposición de las cromatoplasmas desarrolladas a vapores de yodo.

5.8 AISLAMIENTO Y CUANTIFICACION DE LOS ESTEROLES:

El extracto cloroformico obtenido del tejido celular se purificó (80 mg) mediante cromatografía a nivel preparativo en CF utilizando una cromatoplasma de gel de sílice de 20 X 20 cm y como sistema de elución la mezcla cloroformo-acetona (9:1).

Una vez desarrollada la cromatografía se observó en UV y las bandas activas correspondieron a los R_f de 0.6 y 0.3. Con el objeto de visualizar la banda correspondiente a la fracción de los fitosteroles, (0.5 cm de la cromatoplasma), cada uno de los extremos de la cromatoplasma se expusieron a una solución de ác. sulfúrico-sulfato cérico, revelándola posteriormente por calentamiento. Este procedimiento permitió detectar la banda con un $R_f=0.46$ correspondiente a estos compuestos y por lo tanto se procesó a su separación mediante el siguiente procedimiento:

La zona no expuesta al revelador y que correspondía en R_f a la fracción de esteroides se separó del resto de la cromatoplasma y la extracción de los metabolitos se realizó mediante la desadsorción de la sílice con cloroformo. Esta suspensión se mantuvo en agitación continua durante 3 hrs y al cabo de este tiempo la gel de sílice se eliminó por filtración. La solución cloroformica resultante se concentró a presión reducida en un rotaevaporador proporcionando 10 mg de la mezcla de esteroides.

La identificación de los constituyentes individuales de esta fracción se realizó mediante la secuencia de análisis instrumental cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas.

5.9 ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE GASES _ ESPECTROMETRIA DE MASAS DE LA FRACCION DE FITOSTEROLES.

Condiciones instrumentales:

Los espectros de masas se registraron con espectrómetro equipado - con una columna capilar de sílica fundida. (10 M X 0.11 mm) recubierta con silicón OV-101, el programa de temperatura fue isotérmico a 50°C durante 1 min y posteriormente se incrementó a un velocidad de 4.5°/min - hasta alcanzar 200°C. Cada espectro se midió por un segundo con un voltaje de ionización de 70 eV y la temperatura de la fuente iónica de 260°C.

5.10 CARACTERIZACION DE LOS FITOSTEROLES.

La identificación individual de cada uno de los esteroides sintetizados por el callo de H. suaveolens se realizó utilizando estándares puros aislados previamente del genero Hyptis (Pareda-Miranda y Delgado, 1990). El criterio fundamental para su caracterización fue la comparación de - los tiempos de retención y los espectros de masas generados por la muestra problema y los diferentes estándares utilizados.

5.11 ANALISIS ANATOMICO.

La técnica utilizada para la obtención de preparaciones histológicas a partir del cultivo vegetal de H. suaveolens consistió en los siguientes procedimientos:

Fijación:

Se tomaron pequeños fragmentos (aprox. 1 cm de diámetro) de los -

callos obtenidos con las tres hormonas (2,4-D; AIA y ANA). Las muestras se fijaron en FAA y en formol durante un periodo de 10 a 20 min.

Deshidratación:

El proceso de deshidratación se realizó en forma gradual transfiriendo a una serie de soluciones de etanol en concentraciones crecientes (30°, 40°, 50°, 70° 96° y 100°) con intervalos de 15 min en cada solución, para posteriormente realizar el proceso de inclusión.

Inclusión y cortes:

La inclusión del material se realizó mediante inmersiones en soluciones de xilol- parafina (1 : 1), xilol - parafina (1 : 2) y parafina pura durante 15 min en cada cambio. La solidificación se realizó con parafina pura de 58°C de fusión, en pequeñas cajas de papel. Los tejidos incluidos se sujetaron de manera individual a prismas de madera y se cortaron con un microtomo rotatorio, obteniendo cintas de 10 micras de grosor, las cuales se seccionaron y se fijaron con portaobjetos, mediante un baño preparado con agua y grenetina (0.2 g/l). Los cortes se dejaron secar durante 24 hrs.

Tinción y montaje:

Para la tinción se utilizaron las técnicas de safranina-verde rápido y azul de metileno-rojo de rutenio. Se realizaron pruebas adicionales de tinción como la de azul de toluidina.

Técnica de tinción con safranina-verde rápido.

Se elimina la parafina de las preparaciones por calentamiento en una estufa a 60°C durante 15 min. Posteriormente se colocan las preparaciones en xilol durante 20 min y se hidratan en alcoholes graduales hasta agua destilada (100°, 15 min; 96° 5 min; 70° 5min; 50°, 5 min y H₂O, 5min) enseguida se sumergen las preparaciones en una solución acuosa de

safranina durante 1 hr. (el tiempo varia según el tejido). Posteriormente se sumergen en alcoholes de 50°, 70° y 96° durante 2 min aproximadamente y se tiñen con verde rápido durante 1 ó 2 min aproximadamente. Por último, se colocan en alcohol absoluto y xilol para montar en bálsamo de Canadá.

Técnica de tinción con Azul de metileno-rojo de rutenio.

Se desparafina e hidrata el material hasta agua destilada, pasando por alcoholes de 100°, 96°, 70° y 50°. Posteriormente se tiñen las preparaciones en una solución acuosa de azul de metileno (1%) durante 5-10 min, lavando enseguida con agua destilada para quitar el exceso de colorante. Enseguida se tiñen de 5-10 min con una solución acuosa de rojo de rutenio (0.1%) y se deshidratan en alcoholes graduales (50°, 70°, 96° y 100°). Una vez terminada la tinción se monta con bálsamo de Canadá.

Técnica de J. B₄.

Se fija el material en FAA o glutaraldehido por 15 min, se deshidrata en alcoholes graduales, 30°, 50°, 70°, 96° y 100° por 15 min. La impregnación se realiza con mezcla A más mezcla B más catalizador 30 min, en capsulas BEEN bien tapadas a temperatura ambiente.

Esta técnica se utilizó para cortes semifinos, los cuales se tiñeron con azul de toluidina.

6, RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 INDUCCION DEL CALLO DE H. suaveolens.

La inducción del callo a partir de las secciones de tallo y hoja colocadas en el medio MS no tuvo los mismos resultados, debido al efecto que ejercen las diferentes auxinas utilizadas para cada uno de los explantes.

En los experimentos realizados con diferentes concentraciones de fitorreguladores, se encontró que los explantes de hojas y tallos con las distintas auxinas administradas presentaron distintos patrones de desarrollo (cuadros 1-3).

El hinchamiento de los explantes mencionado como uno de los cambios que sufre el material en desarrollo en el cultivo (Murashige and Skoog, 1962) se inició a los 5 días de haberse inoculado en el medio MS suplementado con los fitorreguladores, ANA, AIA y 2,4-D en concentraciones de 0.01, 0.1, 1 y 10 ppm, de acuerdo con los procedimientos descritos en la literatura (Yeoman, 1977 y Gressel, 1984). Posteriormente la proliferación del callo se inició a las 4 semanas, tiempo en el cual los cultivos generados presentaron un tamaño adecuado para poder efectuar subcultivos de los mismos. El tiempo que necesitaron los explantes de H. suaveolens para establecer el callo original, se encuentra dentro de los límites descritos en la literatura para que la proliferación del cultivo alcance el tamaño necesario y se pueda realizar el subcultivo. (Hurtado, 1987).

Cuadro 2. Efecto del 2,4-D sobre la apariencia de los cultivos celulares de H. suaveolens.

Origen del explante	Concentraciones			
	0.01 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm
Hoja	Callo de color verde amarillento, duro y con apariencia cristalina.	Callo de color verde amarillento, poco friable.	Callo de color verde pálido no friable.	Callo café, duro, con mínima inducción.
Tallo	Callo de color verde con apariencia poco friable y cristalino.	Callo de color verde claro y poco friable	Callo color verde, con poca inducción.	Solo hubo hinchamiento del tallo sin inducción de callo.

Cuadro 3. Efecto del ANA sobre la apariencia de los cultivos vegetales de H. suaveolens.

Origen del explante	Concentraciones			
	0.01 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm
Hoja	Callo color verde pálido, con poca inducción y poco friable.	Callo color verde con poca inducción y raíces.	Sin inducción o ligera inducción de callo en algunos casos.	Sin inducción de callo.
Tallo	Callo de color verde poco friable con raíces.	Callo de color verde pálido poco friable con abundantes raíces.	Callo verdoso poco friable con raíces.	ligero hinchamiento del <u>ex</u> plante.

Cuadro 4. Efecto del AIA sobre la apariencia de los cultivos vegetales
de H. suaveolens.

Origen del explan-te	Concentraciones			
	0.01 ppm	0.1 ppm	1 ppm	10 ppm
Hoja	Callo de color verde pálido, poca induc- ción.	Callo verde pálido duro y con algunas raíces pequeñas.	Callo gris-café duro, muy poca inducción.	No hubo induc- ción, explan- tes necrosados.
Tallo	Callo verde amari- lento, duro con raíces.	Solo hubo hincha- miento del tallo o poca inducción en algunos, con raíces.	Callo de color verde pálido poco friable.	No hubo hincha- miento ni induc- ción.

Los experimentos preliminares realizados en condiciones de luz continua y oscuridad total utilizando 2,4-D para la inducción del cultivo, resultaron en un porcentaje del 90% de generación del callo en las condiciones de luz continua y una marcada inhibición en el desarrollo de los callos originados en oscuridad total, correspondientes a un 10% del total de inducción.

De los cultivos inducidos con ANA se obtuvo el 80%, mientras que - los inducidos con AIA sólo se obtuvieron en un 40% aproximadamente.

Como se puede observar con la concentración de 10 ppm, en el caso de todos los fitorreguladores, la inducción fue prácticamente nula, por lo que el experimento se repitió utilizando cinetina en dos concentraciones (0.01 y 0.1 ppm) con las tres auxinas antes mencionadas, pero los resultados no presentaron una diferencia marcada y por esta razón sólo se tomaron en cuenta los cultivos obtenidos con las tres auxinas usadas inicialmente.

Los explantes colocados en el medio que contenía AIA, no fueron - proveedores de buenos cultivos debido a que la inducción no fue adecuada, además de que algunos de ellos desarrollaron una coloración grisácea.

La poca inducción y tinción de color grisácea fue más pronunciada - en los cultivos obtenidos con AIA. En consecuencia a la observación general de que los cultivos con AIA, de las secciones de tallo y hoja presentaron una inducción de callo pobre en relación a los demás cultivos que presentaron un mejor desarrollo, se llegó a la conclusión de que

lo más apropiado para realizar la inducción es utilizar el 2,4-D y el ANA.

El 2,4-D fue el inductor de callo más efectivo, seguido por el ANA. La producción de callos se observó en todas las concentraciones usadas de 2,4-D, ANA y AIA. (Tablas 1, 2 y 3). El AIA fue el menos efectivo, al igual que el empleo de altas concentraciones (10 ppm) de cualquiera de los fitorreguladores. Los resultados mostraron que el orden de efectividad fue: 2,4-D con 0.01, 0.1 y 1 ppm; ANA con 0.01, 0.1 y AIA con 0.01 y 0.1 ppm. Estos resultados son congruentes con las observaciones relacionadas con el efecto provocado por la aplicación exógena de fitorreguladores naturales, como el AIA y el producido por los sintéticos, 2,4-D y ANA. El AIA y otras auxinas naturales no se acumulan en grandes cantidades en los cultivos celulares, debido a que existen procesos naturales de inactivación y destrucción de estas, los cuales son menos eficientes con las auxinas sintéticas como el 2,4-D y el ANA, permitiendo así una acumulación y un periodo de actividad auxínica relativamente largo. La estabilidad observada para los fitorreguladores sintéticos se asocia a la existencia de pocos sistemas enzimáticos que los inactiven (Bidwell, 1979).

Las concentraciones de 0.01 y 0.1 ppm en los tres casos son las más apropiadas para el establecimiento de los cultivos vegetales; además de poder observar, de manera adicional, que las altas concentraciones de hormonas (10 ppm) inhiben el crecimiento de H. suaveolens.

En cuanto a la morfología presentada por los callos, se pudieron observar ciertas variaciones. Algunos callos son masas celulares compactas

y duras como en los casos del AIA y en algunas de las concentraciones de ANA (0.01 ppm) y 2,4-D (1 ppm), en otras ocasiones se formaron masas de tejido esponjoso (friables) fácilmente disgregables. Con respecto a la coloración no se presentaron diferencias muy marcadas en los diferentes casos.

Todos los cultivos se manejaron en las mismas condiciones de luz, temperatura, macro y micronutrientes, variando únicamente los fitorreguladores y sus concentraciones.

El tipo y grado de pigmentación está marcadamente influenciado por factores nutricionales y ambientales, y se manifiestan por la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas, etc. Desde el punto de vista morfológico la característica más importante del callo es la totipotencialidad de sus células, ya que en general, con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces embriones, etc. El uso de las auxinas, especialmente ANA Y AIA presentó una frecuente rizogénesis desarrollando pequeñas raíces sobre los callos de H. suaveolens. En los cultivos de Uncaria elliptica se han reportado resultados similares (Knoon y Nagaratman 1990). Las auxinas son un factor esencial en la promoción del crecimiento de las raíces, debido a que en general el AIA puede incrementar significativamente la elongación de segmentos aislados de raíces. (Hurtado et al, 1987).

Por otro lado, los cultivos inducidos con 2,4-D no presentaron ningún tipo de diferenciación, debido a que el 2,4-D suprime la morfogénesis y da por resultado la rápida proliferación de células tipo callo

exclusivamente, siendo necesaria para la mayoría de los cultivos una aplicación al medio de algún compuesto con actividad auxínica y en algunos casos se reduce la concentración inicial para mantener su crecimiento. En ausencia de citocininas, como en este caso, la auxina provoca el alargamiento celular en los tejidos cultivados. Sin embargo un exceso de auxinas puede suprimir esta división y aún el crecimiento celular, como se pudo observar en el caso de la concentración de 10 ppm con los tres fitoreguladores utilizados.

Es importante señalar que los procesos morfogénicos pueden estar controlados por mecanismos más complejos, puesto que están influenciados por otros factores (no hormonales), tales como los azúcares, fosfatos, compuestos fenólicos, etc. (agregados al medio), efectos físicos como luz, temperatura, consistencia del medio (sólido o líquido) y aún por la calidad y tipo de tejido empleado.

Cabe mencionar que durante el desarrollo del presente trabajo los cultivos se vieron fuertemente influenciados por algunos de los factores físicos antes mencionados, puesto que los cultivos manejados en oscuridad no presentaron un buen desarrollo, presentando un color grisáceo y un necrozamiento rápido del tejido. Por otro lado, se observó que a temperaturas mayores de 28°C, el cultivo se tornaba de un color café y se necrosaba rápidamente por lo que los cultivos se mantuvieron a 25°C ± 1°C.

6.2 CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION:

No fue posible obtener las cinéticas de crecimiento por paquete de volumen celular y observar de una manera más precisa el comportamiento

de las células en crecimiento, debido a que los callos no fueron lo suficientemente friables para la obtención del cultivo de células en suspensión (Hurtado, et al 1987).

6.3 CURVAS DE CRECIMIENTO:

El crecimiento del tejido celular se determinó únicamente en relación al peso fresco a partir de los callos inducidos con los diferentes fitorreguladores (figuras 2-4), donde fue posible observar la manera y la velocidad del crecimiento de los cultivos inducidos con cada uno de los fitorreguladores utilizados.

Las fases del desarrollo del callo de H. suaveolens se pueden dividir de la siguiente manera:

a) La etapa de inducción utilizando 2,4-D para explantes tanto de tallo como de hoja, tomó de 6 a 7 días aproximadamente, periodo en que se observó el inicio del crecimiento celular en número y en tamaño.

Para los cultivos inducidos con ANA, el tiempo fue más largo, aproximadamente de 8 a 9 días, tanto para el tallo como para la hoja, los cuales presentaron un crecimiento muy similar durante esta etapa.

Con AIA, se observó un crecimiento celular mucho más lento (de 9 a 10 días aproximadamente) que el obtenido con los fitorreguladores anteriores.

b) Durante la etapa de proliferación celular, los cultivos con 2,4-D aumentaron su masa celular hasta un máximo alcanzado a los 20 días. Los callos a partir del tallo, presentaron un mayor incremento en peso que los inducidos por las hojas.

Los cultivos inducidos con ANA tomaron de 18 a 20 días para aumentar su masa celular con un mayor incremento en el peso de los callos inducidos a partir del tallo.

Encuanto a los cultivos inducidos con AIA, presentan un aumento de su masa celular muy pobre, en comparación a los cultivos que contenían 2,4-D y ANA. Para este fitorregulador la fase de proliferación se alcanzó a los 15 días en el caso de los callos inducidos a partir del tallo y a los 18 días aproximadamente en el caso de los inducidos con hoja. En este caso, estos últimos presentan un mayor aumento celular que los explantes de tallo, mientras que con 2,4-D y ANA es mayor el efecto de proliferación en los callos inducidos a partir del tallo que con los de hoja.

c) Los cultivos en los que se utilizó 2,4-D tardaron en alcanzar la etapa de desaceleración aproximadamente 22 días en el caso de los explantes de tallo, mientras que los callos inducidos a partir de hoja tardaron 20 días aproximadamente. Se pudo observar que el proceso de desaceleración fue más rápido para la hoja que para el tallo. Los callos obtenidos a partir de hoja presentan un peso menor que los obtenidos del tallo.

En el caso de los cultivos en los que se utilizó ANA, alcanzaron la etapa de desaceleración en un tiempo similar que tomó de 20 a 21 días, alcanzando el máximo incremento en peso de los callos inducidos a partir del tallo.

Por otro lado el efecto del AIA fue menos significativo, puesto que la fase de desaceleración comenzó a los 18 días en el caso de los callos

obtenidos de los explantes de hoja y a los 21 días en el caso de los cultivos obtenidos a partir de los explantes de tallo. En este caso se pudo observar que los callos inducidos a partir de explantes de hoja presentaron un crecimiento más rápido que los inducidos a partir del tallo, llegando por lo tanto a la fase estacionaria más rápido.

d) Para la fase estacionaria los cultivos empiezan a envejecer y a perder la capacidad de crecimiento. Esta etapa es por lo tanto la más aconsejable para realizar los subcultivos.

En los cultivos mantenidos con 2,4-D esta etapa empezó a los 22 días en el caso del tallo y a los 21 días en el caso del cultivo inducido a partir de la hoja; en este periodo se observó la falta total de crecimiento en los cultivos, presentándose primero en la hoja que con el tallo.

Con ANA se pudo observar que los cultivos se comportaron de manera muy similar, tanto los callos obtenidos a partir de explantes de tallo como los obtenidos a partir de la hoja.

En éstos se observó la pérdida de capacidad de crecimiento entre los 20 y 21 días aproximadamente, mientras que en los cultivos donde se utilizó AIA, se observó a los 21 días para los dos tipos de cultivo.

En conclusión, estas curvas de crecimiento permiten observar claramente que el fitoregulador de crecimiento más conveniente para la inducción y mantenimiento de los cultivos de H. suaveolens es el 2,4-D.

A pesar de que el ANA produce un efecto notorio de aceleración del crecimiento de las células vegetales, con este fitorregulador no se logró obtener un efecto significativo en relación con el incremento en peso del cultivo celular. El efecto poco notorio en el desarrollo de los callos con el AIA permite concluir que este fitorregulador no es muy recomendable para la inducción y establecimiento de los cultivos vegetales de H. suaveolens.

Los explantes mas convenientes para el establecimiento del cultivo celular de esta especie se obtiene a partir de tallo.

Efecto del 2,4-D sobre el peso fresco del cultivo de
H. suaveolens

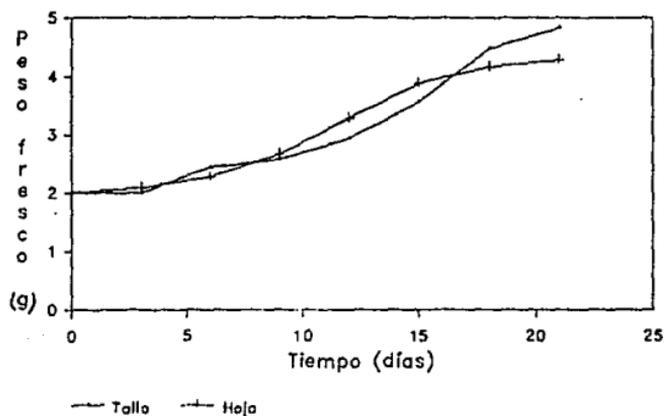


Fig.2 Influencia del 2,4-D sobre los cultivos de callo de *H. suaveolens*, mantenidos a 25°C con luz continua durante 22 días. Cada punto mostrado en la gráfica es el promedio de 5 repeticiones.

Efecto del ANA sobre el peso fresco del cultivo de
H. suaveolens

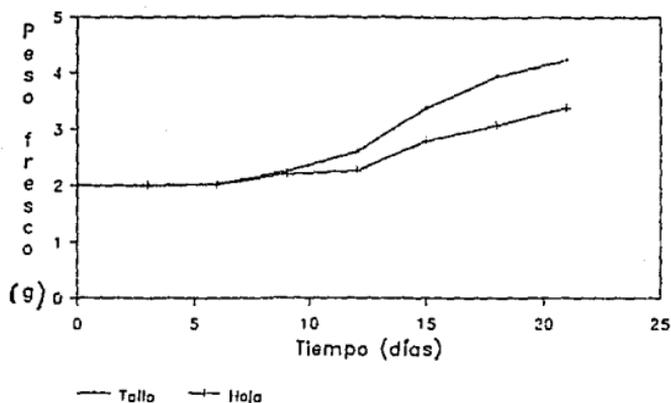


Fig. 3 Influencia del ANA sobre los cultivos de callo de *H. suaveolens* mantenidos a 25°C con luz continua durante 22 días. Cada punto es el promedio de 5 repeticiones.

Efecto del AIA sobre el peso fresco del cultivo de
H. suaveolens

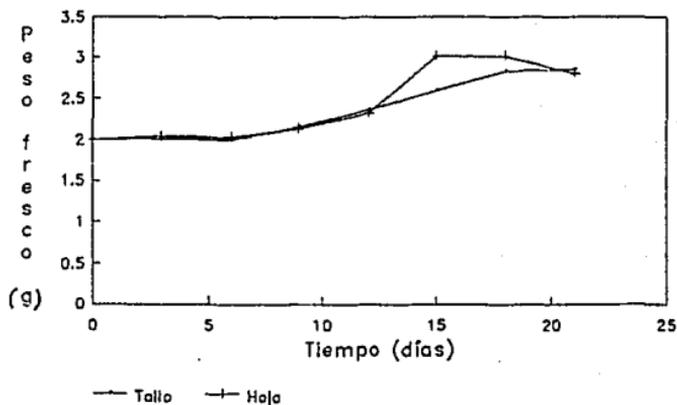


Fig.4 Influencia del AIA sobre los cultivos de callo de *H. suaveolens*, mantenidos a 25°C con luz continua durante 22 días. Cada punto es el promedio de 5 repeticiones.

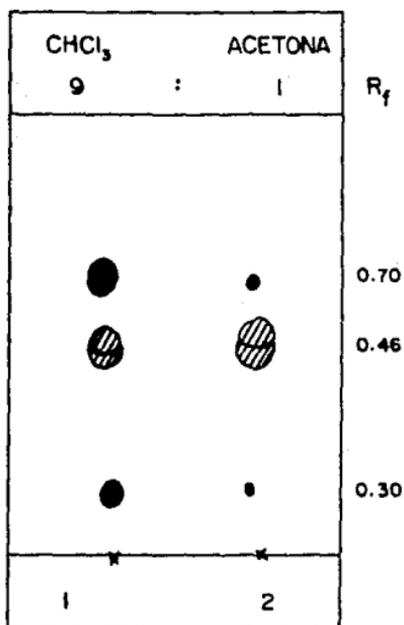
6.4 EVALUACION PRELIMINAR DEL CONTENIDO METABOLICO.

Los análisis preliminares realizados en cromatografía de capa fina (CCF) de los extractos preparados de acetato de etilo y cloroformo (fig 5) permitieron identificar las bandas activas en el ultra violeta (UV) que correspondieron a los $R_f = 0.7$ y $R_f = 0.3$; estas bandas desarrollaron un color café intenso al exponer las placas con vapores de yodo. El registro del espectro en UV (fig. 6) del extracto de acetato de etilo presentó un máximo de absorción en 310 nm, valor que corresponde perfectamente con los valores descritos en la literatura para los derivados del ac. cinámico (Banthorpe et al, 1988 y 1985).

Por lo tanto, estas observaciones permiten suponer que el cultivo de H. suaveolens sintetiza el mismo tipo de derivados fenólicos descritos para los cultivos de otras especies de labiadas (Banthorpe, 1988).

Estos dos pigmentos amarillos se obtuvieron en un rendimiento del 2.3% del peso fresco, calculado mediante cromatografía de gases a partir del callo y observándose que la máxima acumulación de estos pigmentos correspondía al periodo final de la fase estacionaria, aproximadamente a los 21 días (fig. 2-4). Estos resultados experimentales son análogos a los reportados para la formación de los pigmentos fenólicos del callo de Lavandula angustifolia (Banthorpe et al, 1985).

El análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas de la banda de $R_f = 0.7$ (Cloroformo-acetona; 9:1) permitió caracterizar a los pigmentos como la mezcla de ésteres de enol isoméricos (Z,E) y (E,E) formados por la condensación del dopaldehído con el ác.cafeico (fig. 7).



1 Extracto AcoET

2 Extracto CHCl₃

● Activo UV

▨ Visualizado con sulfato cérico

Fig. 5 Cromatografía en capa fina de los extractos preparados de acetato de etilo y cloroformo.

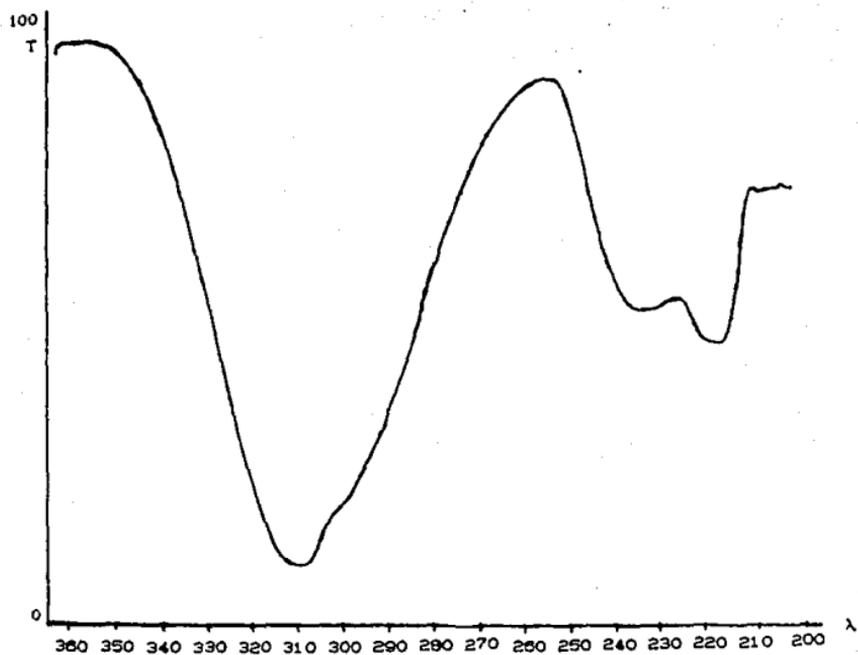
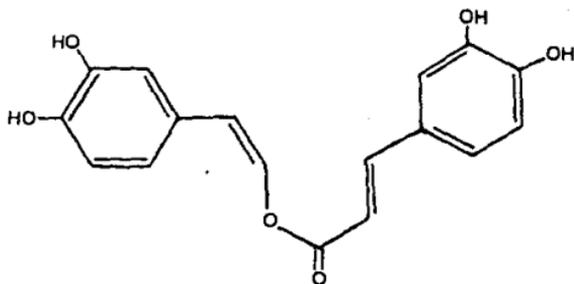


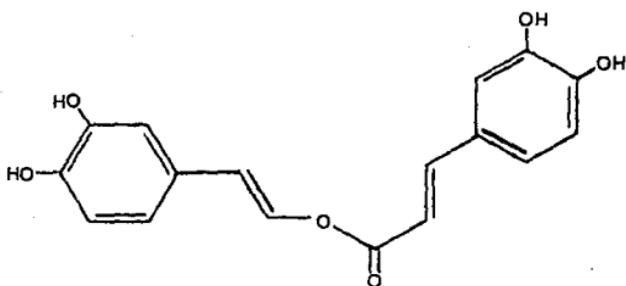
Figura. 6

Espectro en UV del extracto de acetato de etilo.

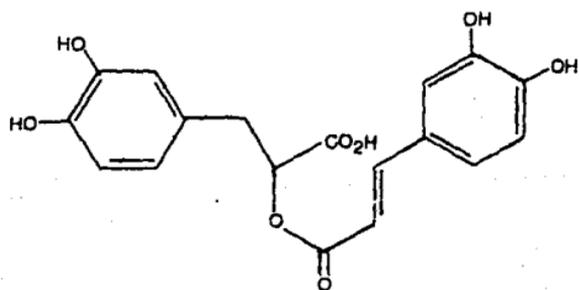
Fig. 7 Esteres de enol derivados del ac. cinámico.



(Z , E)



(E , E)

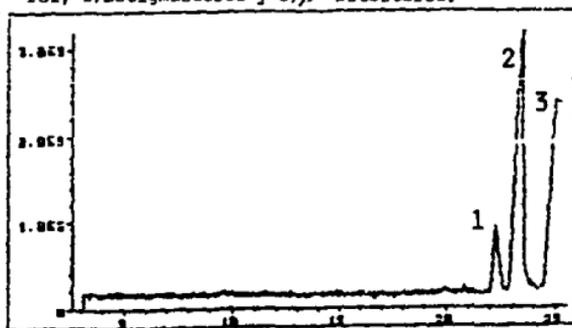


ACIDO ROSMARINICO

En tanto que la banda de $R_f = 0.3$ se identificó como el ácido rosmarínico (Banthorpe, et al, 1985 y 1988).

La fracción de fitosterolos obtenida de la extracción clorofórmica, correspondió a un rendimiento de 0.0025% del peso fresco. La separación de los constituyentes individuales de esta mezcla utilizando la secuencia instrumental de cromatografía de gases-espectrometría de masas, demostró en el cromatograma obtenido (fig. 8) la presencia de tres constituyentes mayoritarios que correspondieron a los tiempos de retención -- (R_t) de 22.26, 23.45 y 25.02 minutos. El constituyente de menor tiempo de retención se caracterizó como el campesterol mediante el análisis del espectro de masas generado (fig. 9). Este metabolito correspondió a un 11.7% de la mezcla total de esterolos. El constituyente mayoritario de la mezcla de esterolos que correspondió al pico de $R_t = 23.45$ se identificó como el estigmasterol (fig. 10) y su abundancia relativa fue de -- 56%. El constituyente de mayor polaridad ($R_t = 25.02$) se identificó como el β -sitosterol (fig. 11) y su rendimiento correspondió al 32.3%.

Fig. 8 Cromatograma del extracto clorofórmico obtenido mediante cromatografía de gases, mostrando tres picos; 1) Campesterol, 2) Estigmasterol y 3) β -sitosterol.



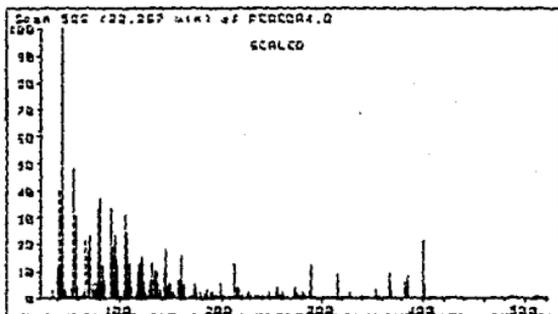
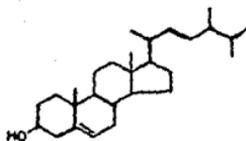


fig. 9 Espectro de masas por impacto electrónico del campesterol.

EM - iE m/e (%): 401 (M+1, 15); 400 (M, 21); 385 (M-15, 8); 382 (M-16, 6);
 367 (M-15-18, 9); 315 (M-18-67, 9); 289 (M-93-18, 12); 274 (M-18-108, 2);
 273 (M-cadena lateral, 4); 261 (M-18-121, 2); 255 (M-18-cadena lateral, 4);
 231 (M-42-cadena lateral, 1); 299 (M-27-17-cadena lateral, 1); 213 (M-42-18-
 cadena lateral, 13); 178 (2); 163 (5); 145 (18); 135 (10); 121 (15); 95 (23);
 81 (37); 57 (31).

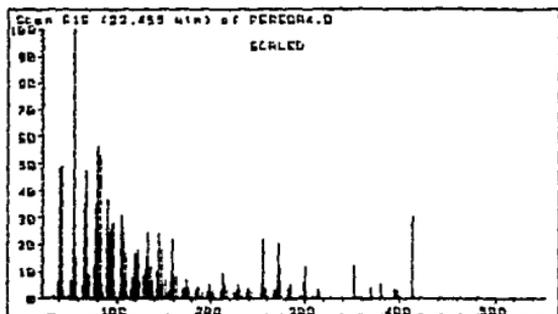
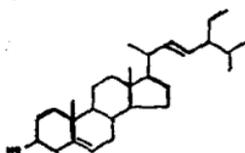


Fig. 10 Espectro de masas por impacto electrónico del estigmasterol.
 EM-1E m/e (%): 413(M+1, 9); 412(M, 30); 397(M-15,3); 379(M-18-15; 5);
 369(M-43, 4); 351(M-43-18, 12); 300(M-19-94, 12); 299(M-15-98, 6); 281
 (M-15-18-98, 2); 273(M-cadena lateral-18-2, 5); 271(M-cadena lateral-2,20)
 255(M-cadena lateral-18, 22); 253(M-cadena lateral-18-2, 5); 231(M-cadena
 lateral-42,3); 213(M-cadena lateral-42-18, 9); 163(8); 145(24); 133(24);
 109(17); 107(25); 95(28); 83(53); 81(56); 69(47).

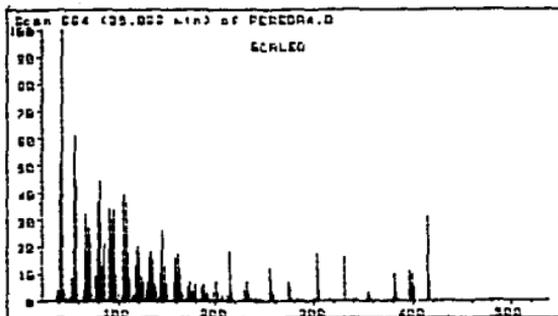
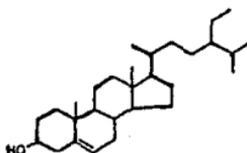


Fig 11. Espectro de masas por impacto electrónico del β -sitosterol.
 EM-iE m/e (%): 416(M+2, 1); 415(M+1, 9); 414(M,31); 399(M-15, 10); 396
 (M-18, 11); 381(M-15-18, 10); 330(M-18-67+1, 4); 303(M-18-93, 17); 275
 (M-18-121, 5); 273(M-cadena lateral, 7); 255(M-cadena lateral-18, 12);
 246(M-cadena lateral-27, 1); 231(M-cadena lateral-27, 7); 213(M-cadena
 lateral-42-18, 18); 145(26); 135(15); 95(34); 81(44).

El cuadro 5 muestra los efectos de los diferentes fitorreguladores sobre la producción de esteroides en el cultivo de H. suaveolens. Estos resultados indican que la producción de fitosteroides se incrementa con el empleo del ANA. resultados análogos se observan en la producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares de Mentha spicata y de O tras especies de labiadas (Banthorpe, et al 1988).

Cuadro 5. Efecto de los fitorreguladores sobre la producción de esteroides.

Fitorregulador	% fitosteroides (10^3 X)
ANA (0.01 mg/l)	2.5
2,4-D (0.01 mg/l)	1.0

6,5 ANALISIS ANATOMICO

6.5.1 MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA DE LOS CALLOS.

La morfología macroscópica de los callos inducidos con los fitorreguladores (auxinas) 2,4-D, ANA y AIA proporcionan la siguiente in formación:

Son masas irregulares de tejido a los cuales llamamos callos, estructuras que varían considerablemente en cuanto a su crecimiento, apa riencia y textura, siendo algunas veces blandos y friables y en otras compactos y duros.

Las características morfológicas en cuanto al crecimiento del callo están estrechamente relacionadas con el medio de cultivo, en especial, con las concentraciones utilizadas de los fitorreguladores, incluyendo otros factores tales como el origen del explante utilizado (hoja o tallo) la edad de la planta y la especie.

6.5.2 ORIGEN DEL CALLO.

Se determinó por medio de las observaciones al microscópio óptico, que a partir de los explantes de H. suaveolens se presentaban diferentes zonas de proliferación del tejido; en especial del tejido parenquimatoso, (fig. 12) y de las zonas de corte. También se observó la presencia de cé lulas del parénquima hacia una diferenciación (fig. 18), siendo en todos los casos tejido poco diferenciado capaz de ser modificado fácilmente hacia un cambio estructural y funcional que lo conduce a la diferenciación en presencia de estímulos adecuados como se muestra en este trabajo, con la aplicación de auxinas en el medio de cultivo.

Los resultados coinciden con los reportados sobre el cultivo de hojas jóvenes de caña de azúcar por Wai-Jane Vasil (1983), donde se observó que la proliferación del callo ocurre a partir de células del mesófilo cercanas a los haces vasculares y a las zonas de corte, así como de células del parénquima vascular, obteniendo en ambos casos células ricas en citoplasma. Esta diferencia celular observada también para los callos de H. suaveolens fue analoga a la descrita para el apio (Apium graveolens) por Zee y colaboradores (1979).

6.5.3 CARACTERISTICAS DEL CALLO:

El estudio microscópico e histológico demostró que los tejidos de tipo calloso generalmente son heterogéneos, es decir, un mismo callo puede presentar varios tipos celulares. Las células que forman los callos son altamente vacuoladas; ésto se atribuyo a la gran cantidad de agua que tiene el callo (Esau, 1976) y son de formas muy variadas que van desde esféricas a alargadas, predominando una gran cantidad de células amorfas.

En el callo de H. suaveolens podemos distinguir básicamente la presencia de 2 tipos celulares con base en su morfología, independientemente de la técnica de tinción aplicada.

Tipo I. Células grandes ocupadas por una gran vacuola, núcleo excéntrico y citoplasma poco denso con pared celular un poco engrosada (células parenquimatosas) (figs. 13 y 14).

Tipo II. Células pequeñas con citoplasma denso y poco vacuoladas con núcleo central grande y difuso y con nucléolo intensamente teñido, presentando pared celular delgada. (fig. 12).

De manera general los callos forman células parenquimatosas indiferenciadas, como lo observamos en los callos inducidos con 2,4-D; estas células frecuentemente se ubican en hileras y al parecer constituye la mayor parte del callo. Inmersas en este tejido, hay agrupaciones celulares meristemáticas, pequeñas y con nucleolo fuertemente teñido, coincidiendo con lo reportado por Sharp (1980) y Williams y Maheswaran (1986). Estas zonas a diferencia de las zonas meristemáticas encontradas por varios autores como Tisserat (1979), Pannetier y Buffard-Morel (1982) mostraban hileras de células, las cuales a veces también rodeaban parcialmente los haces vasculares del callo originado (fig. 12).

En los cortes semifinos se pudo definir claramente la presencia del xilema y el floema (figs. 16 y 17). En el xilema se observaron dos tipos de elementos traqueales, las traqueidas y los elementos de vasos. Las traqueidas son células imperforadas, únicamente provistas de pares de puntuaciones en sus membranas comunes, mientras que los elementos de vasos están perforados en ciertas áreas de contacto con otros elementos (figs. 15, 16 y 17).

Los tipos celulares anteriormente descritos se presentaron en los callos inducidos con 2,4-D, ANA y AIA. En especial, los callos inducidos con ANA presentaron una mayor diferenciación del tejido vascular, con una organización celular particularmente distinta del resto del callo (figs. 18 y 19). Tal diferenciación celular presente en estos cultivos, se debió al desarrollo de una gran cantidad de raíces por el efecto del ANA. Estos resultados coincidieron con los observados experimentalmente para los callos de Helianthus tuberosa, en los cuales se formaron traqueidas como respuesta del ANA y BAP, en presencia de sacarosa o glucosa. (Halperin y Minocha, 1974).

Con base en los resultados histológicos, se puede concluir que las auxinas no solo desempeñan un papel importante en la inducción del cultivo celular, sino que también en la vascularización observada en los callos de H. suaveolens.

Estudios adicionales en cultivos de tejidos han demostrado la necesidad de la presencia de auxinas en el medio de crecimiento para la diferenciación del xilema (Wetmore y Sorokin, 1955) y por lo tanto, no es sorprendente el desarrollo de raíces en los callos de H. suaveolens como respuesta a las auxinas utilizadas. Al mismo tiempo, el contenido metabólico de los callos con un mayor grado de diferenciación celular (figs. 18 y 19) fue superior (cuadro 5) demostrando la necesidad de cierta organización para el inicio de las rutas biosintéticas del metabolismo secundario (Khoon y Nagaratman, 1990).



Fig. 12 Células pequeñas poco vacuoladas con núcleos (Nu) centrales grandes y difusos y con nucleolo (N) intensamente teñido, las cuales se encuentran rodeando los vasos (V). Callo de tallo, inducido con 2,4-D. Técnica Safranina-fast green, 64X.



Fig. 13 Células parenquimáticas con una gran vacuola, núcleo excéntrico (Nu) y nucleolo (N) intensamente teñido, con paredes celular delgada. Tec. Azú de metileno-Rojo de rutenio. 64X.

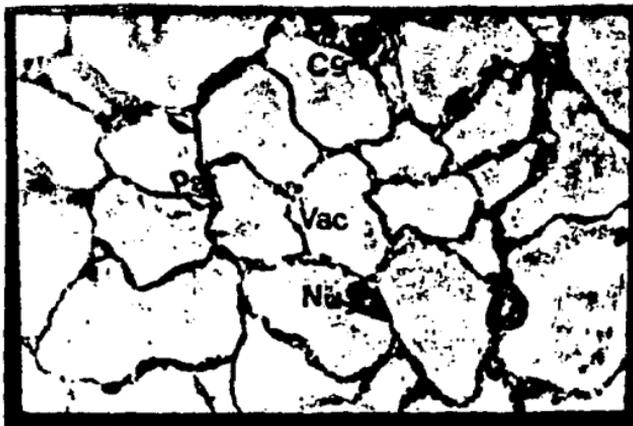


Fig. 14 Callo de hoja. Células del parénquima con vacuola (Vac) muy grande, una pared celular bien delimitada, citoplasma granuloso (Cg) y núcleo excéntrico (Nu). Técnica Safranina-Verde rápido.

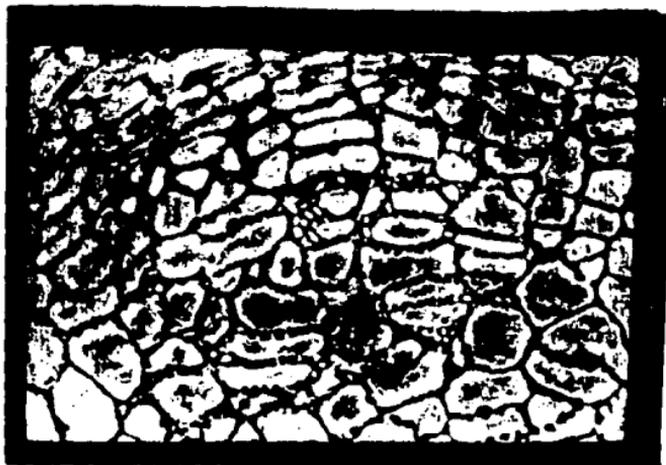


Fig. 15 Callo de hoja. ornamentaciones de vasos (V) rodeadas por células parenquimáticas con una gran vacuola (Vac). Técnica Azul de toluidina. 160X.

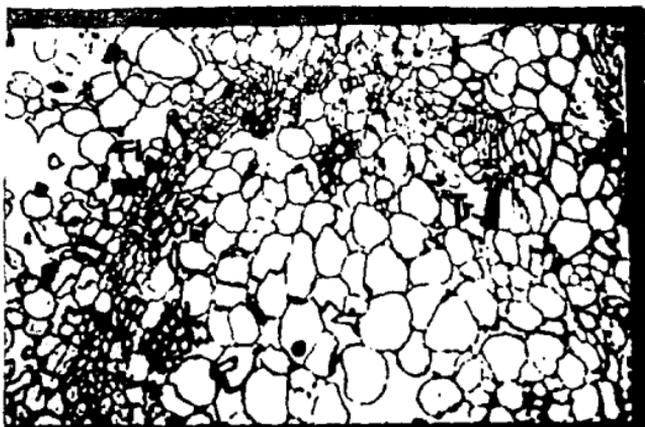


Fig. 16 Estructuras provasculares inmersas en el tejido parenquimatoso.

Las células del floema (F1) se encuentran en hileras rodeando a las células del parénquima y al xilema (X1). En la parte media superior derecha se observa una traqueida (Tr). Tec. Azul de toluidina. 40X.

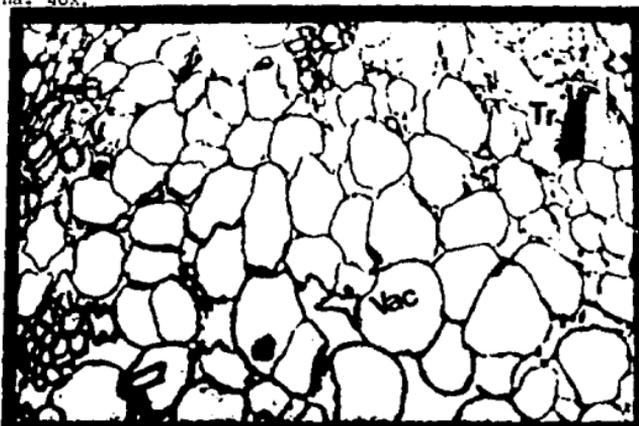


Fig. 17. Estructuras provasculares. Area superior derecha una traqueida (Tr)

y en la superior izquierda, elementos vasculares (V) rodeados por el floema (F1) y las células del parénquima, formadas por una gran vacuola (Vac) y pared celular delgada. Técnica Azul de toluidina. 64X.



Fig. 18 Callo de hoja inducido con ANA, diferenciación del tejido vascular.

Técnica Safranina-verde rápido. 25.2X.



Fig. 19 Callo de hoja. En la región central se observa un Haz vascular (Hz V) cuya organización celular nos indica una diferenciación incipiente, rodeado por células meristemáticas poco diferenciadas con núcleo intensamente teñido. Técnica Safranina-Verde rápido.

7. CONCLUSIONES

El establecimiento del cultivo celular de Hyptis suaveolens, propuesto como objetivo fundamental de la presente investigación, permitió generar las siguientes conclusiones:

1. Se logró el establecimiento del cultivo celular de H. suaveolens - en un medio sólido al utilizar 2,4-D como fitorregulador para la inducción del callo a concentraciones entre 0.1 y 0.01 ppm. El empleo del ANA y AIA fueron inductores menos efectivos, en cualquiera de los casos; el empleo de altas concentraciones de estas auxinas (>10 ppm) inhibió la proliferación celular.
2. La máxima proliferación celular en los callos de H. suaveolens se obtuvo a partir de explantes de tallo, bajo condiciones de luz y a una temperatura constante de 25 °C.
3. El estudio químico preliminar del contenido metabólico de los cultivos celulares de H. suaveolens demostró que los callos sintetizan derivados fenólicos del ac. cinámico y esteroides; la acumulación de estos metabolitos alcanzó un máximo al final de la fase estacionaria.
4. Se determinó que el empleo del ANA favorece la biosíntesis de metabolitos secundarios. Al mismo tiempo, la acumulación de una cantidad significativa de éstos, se asocia a un mayor grado de diferenciación celular. Los estudios histológicos confirmaron la formación de primordios radiculares a partir de los callos de H. suaveolens - inducidos por el empleo del ANA.

5. La diferenciación en raíz, promovió el inicio de las rutas biosintéticas involucradas en el metabolismo secundario.

6. Las condiciones óptimas para el establecimiento de cultivos celulares de H. suaveolens para la producción de productos naturales, involucran el empleo de ANA como fitorregulador.

8. BIBLIOGRAFIA

- Banthorpe, D., Bilyard, H. J. y Watson, D. G. (1985) Pigment formation by callus of Lavandula angustifolia. Phytochemistry 24 2677-2113.
- Banthorpe, D. Bilyard H. J. y Geoffry B. (1989). Enol esteres of cafeic acid in several genera of the Labiatae. Phytochemistry 28, 2109-2113.
- Bidwell, R. S. S. (1979). Fisiología vegetal. AGT, Editor México.
- Bogar J. N. (1982) Tissue culture techniques. pp 4-35.
- Del Amo, R. S. (1979) Plantas medicinales del estado de Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones sobre recursos Bióticos, p 110.
- Epling C. (1949) Revisión del genero Hyptis (Labiatae). Revista del museo de la Plata. secc. Botánica 153-497.
- Esau, K. (1976) Anatomía Vegetal. Omega Barcelona, pp 85-95, 251-255.
- Gressel, J. (1984) Plant tissue culture systems for screening of plant growth regulators: Hormones, herbicides and natural phytotoxins. Adv. Cell. Culture 3, 93-181.
- Halpering, W y Minocha, S. (1974) Hormones and metabolitos which control tracheid differentiation whit or whit out concomitant effects on growth in culture tuber tissue of Helianthus tuberosa L. Planta 116, 319-331.
- Hurtado, M. y Merino, M. (1987) Cultivo de Tejidos Vegetales. Trillas México, D. F. 48-153.
- Jaén, S. R., Jaén, P. R. y Jaén, M. R. (1974) Antibacterial evaluations of some indigenous volatile oils. Planta Médica 26, 196-197.

- Jensen W. A. (1962) Botanical Hystochemistry, Principles and Practice
W. H. Reuman and Co., Londres.
- Kingston, D. G. I. y Munjal, R. C. (1978) Plant Anticancer Agents VIII
Constituents of Inga punctato Lloydia 41, 499-500.
- Kingston D. G. I. Rao, M. N. y Zucker (1979) Plant anticancer agents IX
Constituents of Hyptis tomentosa. 496-499.
- Khoo H. L. y Nagaratnam P. D. (1990) Studies on the formation and growth
of Uncaria elliptica. Tissue culture. Journal of Natural products 53,
125-130.
- Lee, R. H. Y Ww T. S. Zhang D., Yamagishi T., Hayashi T., Hall, I. H.
Chang J. J., Yang, T. H. (1988) The citotoxic Principles of prunella
Psychotria serpens, and Hyptis capitata; Ursolic acid and related deri
vatives. Planta Medica 54, 308-311.
- Leopold, C. A. y Kriedemann, (1975) Plant growth and development, Mc
Graw-Hill Book Co.
- Loyola V. M. y Reyes L. J. (1985) El cultivo de tejidos vegetales en
México. Conacyt 111-128.
- Misra, T. N., Singh, R. S. y Upadhayay, J. (1983) A natural triterpene
from Hyptis suaveolens Phytochemistry 22, 2557-2558.
- Murashige T. y Skoog F. (1962) Arevised medium for rapid growth and
blossys with tabacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15 , 473-497.
- Pannetier C. and Bufard-Morel J. (1982) Premiers resultats concernants
The production the embryos somatiques to the tissues foliaires the
cocotier Cocos nucifera L. oleagineux 37, 349-353.

- Pereda -Miranda, R. y Delgado, G. (1990) Triterpenoids and flavonoids from Hyptis albida. Journal of Natural Products 53, 182-186.
- Pereda-Miranda, R. G. M. y Delgado, G. (1990) Structure and stereochemistry of four p'rones from Hyptis oblongifolia. Phytochemistry 29, 2971-2974.
- Roig, M. J. (1974) Plantas medicinales aromáticas o venenosas de Cuba ed. Instituto del Libro Cuba, p. 596.
- Sharp, W. R. (1980) The physiology of in vitro asexual embryogenesis Horticultura Reviv. 2, 268-310.
- Staba, E. J. (1980) En Plant tissue culture as a source of Biochemicals ed. E. J. Staba, CRC. Florida.
- Strit, H. H. (1979) Plant tissue and cell. culture. sec. ed. Academic Press U.S.A. 1-10.
- Tisserat, B. (1979) Tissue culture of the date palm Phoenix dactilifera in vitro. Jour. Exper. Bot. 30, 1275-1283.
- Wagner H. (1979) Pharmaceutical and Economic use of the Labiatae and Rutaceae families.
- Wetmore, R. H. y Sorokin (1955) On the differentiation of xilema. Arnold arboretum. Jour. 36, 305-317.
- Wetmore, R. H. y Rier, J. P. (1963). Experimental induction of vascular tissues in callus of angiospermas. Amer Jour. Bot. 50, 418-430.

- Williams E. G. y Maheswaran (1986) Somatic embryogenesis Factors influencing coordinated, behavior of cells an embryogenic group Ann. Bot 57, 443-462.
- Yeoman, M. M. (1977) Tissue callus cultures techniques. Plant tissue and cell culture. 31-51.
- Zee, S. y Wv, S. C. (1979) Embriogenesis in the petiole explants of chinese celery Apium graveolens Plan. Physiol. 93, 325-335.