

181
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTABLECIMIENTO Y PROPAGACION DEL CULTIVO
DE TEJIDO CELULAR DE *Anredera scandens* Y
CUANTIFICACION DE LA PRODUCCION DE LA
2,4-dihidroxi-6-metoxi-5-formil-3-metilchalcona**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
EDIC RIVERA GUTIERREZ

MEXICO, D. F.

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

CONTENIDO

I.	Indice de figuras.....	III
II.	Indice de cuadros.....	IV
1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCION.....	2
3.	ANTECEDENTES.....	6
3.1	Biología de <u>Anredera scandens</u>	6
3.2	Estudio químico de <u>Anredera scandens</u>	7
3.3	Empleo de cultivos de tejidos celulares en la biosíntesis de flavonoides.....	8
4.	OBJETIVOS.....	10
4.1	Objetivo general.....	10
4.2	Objetivos específicos.....	10
5.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	11
6.	PARTE EXPERIMENTAL.....	14
6.1	Material vegetal.....	14
6.2	Equipo.....	14
6.3	Reactivos.....	14
6.4	Fitorregulador.....	15
6.5	Inducción y establecimiento del callo de <u>A.scandens</u>	15
6.5.1	Esterilización del material biológico.....	15
6.5.2	Preparación y caracterización de los medios de cultivo para la inducción de callo.....	16
6.5.2.1	Medio MS.....	16
6.5.2.2	Medio N ₆	18
6.5.2.3	Medio N ₆ (2).....	20
6.5.2.4	Medio B ₅	22
6.5.3	Inducción y establecimiento del callo de <u>A.scandens</u>	24

6.6	Propagación del callo.....	24
6.7	Evaluación del crecimiento del tejido calloso.....	25
6.8	Curva de crecimiento.....	25
6.9	Análisis fitoquímico.....	26
6.9.1	Material vegetal.....	26
6.9.2	Procedimientos de extracción.....	26
6.9.2.1	Extracción de las partes aéreas.....	26
6.9.2.2	Extracción del tejido calloso.....	27
6.9.3	Análisis cromatográfico.....	27
6.9.4	Procedimientos de aislamiento y purificación de la retrochalcona (2).....	28
6.9.5	Análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas para la detección de la retrochalcona (2).....	29
7.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	30
7.1	Inducción y establecimiento del callo.....	30
7.2	Caracterización y obtención del callo.....	30
7.3	Evaluación morfológica del callo en los cultivos celulares de los diferentes medios.....	33
7.4	Evaluación cuantitativa del crecimiento del tejido calloso	38
7.5	Curva de crecimiento.....	42
7.6	Evaluación preliminar del contenido de la retrochalcona.....	45
7.6.1	Aislamiento y purificación de la retrochalcona (2) a partir de las partes aéreas de <u>A.scandens</u>	45
7.6.2	Detección cualitativa de la retrochalcona (2) en los callos de <u>A.scandens</u>	51
7.6.2.1	Cromatografía en capa fina.....	51
7.6.2.2	Cromatografía de gases-espectrometría de masas.....	51
8.	CONCLUSIONES.....	55
9.	BIBLIOGRAFIA.....	56

I. Índice de figuras

Figura 1. Estrategias de selección para la producción de metabolitos secundarios en CTV.....	5
Figura 2. Diagrama de flujo para el diseño experimental utilizado durante la inducción y la propagación del callo <u>A.scandens</u>	12
Figura 3. Diagrama de flujo para el diseño experimental utilizado durante el análisis químico de los callos y las partes aéreas de <u>A.scandens</u>	13
Figura 4. Curva de incremento del peso fresco (g) en los diferentes medios utilizando como fitorregulador al 2,4-D en mg/l.....	40
Figura 5. Curva de crecimiento del callo de <u>Anredera scandens</u> cuantificado en peso fresco.....	44
Figura 6. Cromatografía en capa fina de la fracción IV del extracto de las partes aéreas de <u>A.scandens</u> y retrochalcona (2).....	47
Figura 7. Cromatograma desarrollado por el extracto del tejido calloso la retrochalcona (2) y las fracciones III-VI del extracto de las partes aéreas.....	53
Figura 8. Cromatografía de gases de la fracción IV, estándar y extracto del tejido calloso.....	56

II. Índice de cuadros

Cuadro 1. Medio basal Murashige-Skoog MS (1962).....	17
Cuadro 2. Medio basal N ₆ (Chu et al., 1975).....	19
Cuadro 3. Composición de los "cocteles" del medio N ₆ (2).....	21
Cuadro 4. Medio basal de Gamborg B ₅ (1968).....	23
Cuadro 5. Valores de apreciación para la inducción del callo de <u>A.scandens</u> en diferentes medios sólidos.....	32
Cuadro 6. Efecto del 2,4-D sobre la apariencia de los cultivos celulares de <u>A.scandens</u> en el medio MS.....	34
Cuadro 7. Efecto de las concentraciones de 2,4-D sobre la apariencia del tejido calloso en el medio B ₅	35
Cuadro 8. Efecto del 2,4-D sobre la apariencia del tejido calloso en el medio N ₆	36
Cuadro 9. Efecto de las concentraciones de 2,4-D sobre la apariencia del tejido calloso en el medio N ₆ (2).....	37
Cuadro 10. Incremento en peso fresco del tejido calloso de <u>A.scandens</u> durante las tres primeras resiembras en diferentes medios.....	39
Cuadro 11. Valores promedio para la curva de crecimiento del cultivo de tejido celular de <u>A.scandens</u>	42
Cuadro 12. Fraccionamiento del extracto orgánico de <u>Anredera scandens</u>	46
Cuadro 13. Constantes físicas y espectroscópicas de la 2,4-dihidroxi-6-metoxi-5-formil-3-metilchalcona (2) aislada de tejido aéreo de <u>A.scandens</u>	48

1. RESUMEN

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) representa una alternativa potencial para la producción de metabolitos secundarios destinados a la industria farmacéutica, alimenticia y/o agronómica. Dentro de este contexto, el sacasil (Anredera scandens) es un agente antiséptico ampliamente utilizado en la medicina tradicional de nuestro país y representa una interesante fuente de posibles agentes antimicrobianos de interés terapéutico. La presente investigación describe los resultados obtenidos para la inducción, el establecimiento y la propagación del tejido calloso de Anredera scandens. Al mismo tiempo, se realizó un estudio fitoquímico preliminar para detectar la presencia de la retrochalcona, 2,4-dihidroxi-6-metoxi-5-formil-3-metilchalcona.

La inducción del tejido calloso se realizó a partir de explantes de tallo y hoja en cuatro medios de cultivo (MS; B₅; N₆ y N₆(2)), suplementados con el regulador de crecimiento 2,4-D en las concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 mg/l.

Al final del período de inducción, se evaluó la respuesta de formación del callo para cada uno de los explantes en los medios de cultivo seleccionados y se cuantificó la producción de tejido calloso en términos del peso fresco. La mejor respuesta se observó en el medio N₆(2) para los explantes de tallo a una concentración de 0.5 mg/l del fitorregulador 2,4-D. Este tejido calloso se propagó mediante diez resiembras sucesivas con el objeto de incrementar la cantidad del material biológico disponible para cuantificar la síntesis de la 2,4-dihidroxi-6-metoxi-5-formil-3-metilchalcona en los cultivos celulares de esta especie. La concentración de esta retrochalcona en los cultivos fue semejante con la observada en las partes aéreas de la planta.

2. INTRODUCCION

Las plantas continúan siendo, hasta nuestros días, una fuente importante para la obtención de fármacos de origen natural o sus productos intermedios obtenidos de las especies vegetales que gozan de una reputación en la medicina tradicional (Loyola y Reyes, 1985).

El cultivo de plantas medicinales atraviesa por serias dificultades, tales como las provocadas por las variaciones en las condiciones climáticas, la presencia de plagas y problemas asociados con los disturbios del medio ambiente, así como la sobreexplotación de muchas especies silvestres (Cordell et al., 1991).

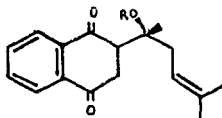
De ahí el interés suscitado en relación a la posibilidad de producir metabolitos secundarios mediante el empleo de cultivos de células y tejidos vegetales. El cultivo de células vegetales consiste en la inducción in vitro de cualquier tejido vegetal bajo condiciones asépticas y ambientales controladas, en medios nutritivos adecuados (Berlin, 1985). Las células resultantes en estos cultivos se encuentran desdiferenciadas, creciendo como una masa desorganizada a la que se le denomina callo. Este tejido calloso, puede ser mantenido mediante subcultivos (cultivo de tejido). Dichas células deben tener el potencial para sintetizar cualquier compuesto asociado con la planta completa. Esta es la característica central que ha orientado al cultivo de células vegetales hacia la comercialización (Balandrin et al., 1985).

La aplicación de esta técnica puede variar de acuerdo a los objetivos que se persigan, como la propagación vegetal (Fowler y Allan., 1985), la obtención de metabolitos secundarios hasta el estudio de los procesos ontogénicos o bioquímicos básicos del metabolismo vegetal (Hashimoto y Yamada., 1991), entre otros.

Estos sistemas pueden proveer un suministro continuo y homogéneo de materia prima en un estado fisiológico uniforme debido a su independencia del medio ambiente y, de esta forma, aumentar los rendimientos de metabolitos secundarios. Por lo tanto, el CTV representa una alternativa atractiva para la obtención de productos secundarios importantes para su escalamiento industrial (Hashimoto y Yamada., 1991).

Sin embargo, los rendimientos de producción de metabolitos secundarios obtenidos por cultivo de células vegetales hasta la década de los 60 fueron demasiado bajos al compararlos con los obtenidos a partir de la planta in vivo. A finales de los 70 se iniciaron los estudios sobre el comportamiento bioquímico y fisiológico de la célula vegetal en condiciones in vitro para así pensar en el desarrollo de nuevos procesos dirigidos a la producción de metabolitos secundarios de interés económico (Fujita y Tabata., 1987)

En base a estos estudios se llegó a establecer una estrategia general para el desarrollo de procesos biotecnológicos con células vegetales, la cual se representa en la figura 1. Gracias a la aplicación de esta estrategia general se han logrado resultados satisfactorios a nivel industrial de varios productos como la producción y comercialización de la shiconina (1) que es un agente bactericida, colorante y antiinflamatorio, compuesto producido por las células de Lithospermum erythrorhizon, e industrializado por la compañía japonesa Mitsui Petrochemical (Fujita et al., 1981; Mizukami et al., 1978).



shiconina (1). R=H

Aun cuando el potencial de esta técnica ha sido ampliamente reconocido, es claro que existen severos problemas que impiden la industrialización de estos sistemas. Uno de ellos es la lenta velocidad de crecimiento de las células, por lo tanto la experimentación resulta muy tediosa (Fowler y Allan., 1985).

Entre las alternativas que se han propuesto para el incremento en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro se encuentran las siguientes:

- la manipulación del medio (principalmente reguladores de crecimiento --

- o en la fuente de carbono).
- la manipulación de las condiciones ambientales (luz, temperatura, aeración y pH).
 - la inducción de mutantes y
 - el desarrollo de métodos de selección para aislar líneas celulares con altas productividades.

A pesar de las alternativas propuestas que han dado buenos resultados siguen siendo en su mayor parte, acercamientos semiempíricos debido a la falta de conocimientos de las rutas biosintéticas de la mayoría de los metabolitos (Loyola y Reyes, 1985).

En México, el sacasil (Anredera scandens) es una planta utilizada en la medicina tradicional debido a sus propiedades curativas en el tratamiento de enfermedades infecciosas de la piel. Por tal motivo surgió el interés por aplicar las técnicas de CTV para su estudio fitoquímico.

En el presente trabajo se describen las metodologías para la inducción y el crecimiento de callo de Anredera scandens con el fin de obtener las mejores condiciones para su desarrollo y propagación.

Cabe mencionar que es la primera vez que esta especie se somete a -- dichas metodologías para inducir una masa de células desdiferenciadas (callo). De manera adicional, se realizó un estudio fitoquímico para cuantificar la producción de la 2,4-dihidroxi-6-metoxi-5-formil-3-metilchalcona (2) un metabolito secundario del grupo de los flavonoides.

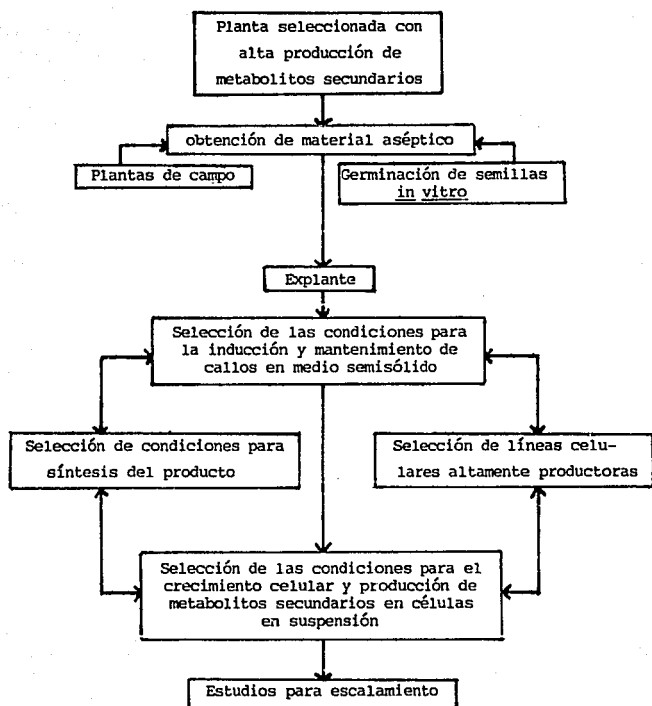


Figura 1. Estrategias de selección para la producción de metabolitos secundarios en CTV.

(Stafford et al., 1986)

3. ANTECEDENTES

3.1 Biología de Anredera scandens.

El género Anredera está compuesto de una sola especie (Cronquist, A.,- 1981) llamada Anredera scandens, la cual pertenece a la familia Basellaceae y es conocida vulgarmente con el nombre de sacasil y hiedra de monte.

La clasificación taxonómica de esta especie según A.Cronquist (1981) - es la siguiente:

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Caryophyllidae
Orden	Caryophylliales
Familia	Basellaceae
Género	<u>Anredera</u>
Especie	<u>scandens</u>

La sinonimia presentada por la especie Anredera scandens (Lam) es la siguiente:

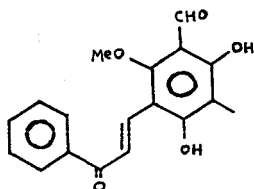
- Polygonum scandens
- Basella vesicaria
- Anredera vesicaria

En México, Anredera scandens se encuentra distribuida principalmente en los estados de Nayarit, Sinaloa, Hidalgo, Durango y Guerrero. También se distribuye en Guatemala, Cuba, Jamaica y el Salvador. Es una especie -- trepadora provista de un rizoma alargado y grueso, su tallo es carnoso y muy ramificado, sus hojas son alternas ovadas u oblongadas de 3-6.5 cm y de 2-4 cm de ancho, la base apical de la hoja puede ser aguda o acuminada, flores pequeñas blancas pediceladas agrupadas en espigas axilares con cinco pétalos y estambres filamentosos subulados dirigidos al ápice, las anteras sagitales, conteniendo 3 estilos unidos, el estigma dilatado con 2-3 lóbulos membranosos incluidos en el perianto, estipitado (Martínez, 1979; Standley y Steyermark, 1987).

En la medicina tradicional el rizoma de la raíz de sacasil se utiliza en emplastos antiinflamatorios y como agente antiséptico, las hojas de esta planta también se usan para bilmas en los casos de fracturas y en Guatemala se utiliza como shampoo para el cabello (Martínez, 1979; Standley y Steyermark, 1987).

3.2 Estudio químico de Anredera scandens

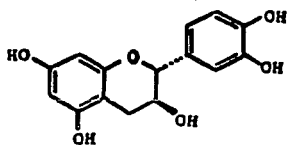
Desde el punto de vista químico sólo se ha realizado un estudio del rizoma de A.scandens (Calzada, 1989), el cual permitió el aislamiento y la purificación de un nuevo producto natural la retrochalcona 2,4-dihidroxi-6-metoxi-5-formil-3-metilchalcona (2), el cual constituye el agente antimicrobiano mayoritario del extracto de A.scandens (Pareda, 1992). La elucidación estructural permitió su caracterización como la 2,4-dihidroxi-6-metoxi-5-formil-3-metilchalcona (Calzada et al., 1990).



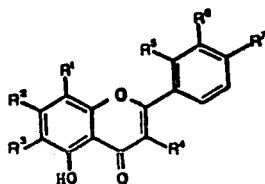
(2)

3.3 Empleo de cultivos de tejidos celulares en la biosíntesis de flavonoides.

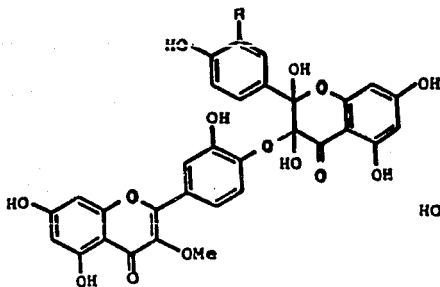
Ningún antecedente existe en la literatura en relación con el crecimiento en cultivo de tejidos celulares de Anredera scandens. Sin embargo, esta técnica de investigación bioquímica se ha utilizado para la caracterización de flavonoides en tejidos celulares de origen vegetal in vitro. Así por ejemplo, el estudio sobre la formación y el crecimiento del cultivo celular de Uncaria elliptica permitió cuantificar el contenido de flavonoides de importancia farmacológica como la epicatequina (3) (Munitch, M y Fletcher, J., 1984). Las estructuras (4-6) se propusieron para los componentes fisiológicamente activos de los cultivos en suspensión de Podophyllum versipelle (Ayabe et al., 1980). Otro ejemplo de obtención de flavonoides in vitro son los cultivos celulares de Glycyrrhiza echinata (Ayabe et al., 1980) que proporcionaron una mezcla compleja de chalconas, retrochalconas y flavonas. La retrochalcona equinatina (7), se cuantificó con un rendimiento de aproximadamente 0.003 % del peso fresco y se aisló junto con la licodiona (8), el precursor biosintético de la equinatina (7) y las flavonas (9) y (10).



(3)

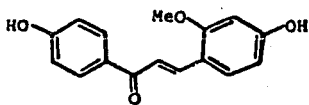


(4) $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}$
 $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}$

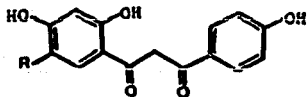


(5) R-OH

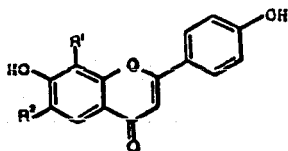
(6) R-H



(7)



(8) R-H



(9) $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}$

(10) $R^1, R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, R^9, R^{10}$

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Lograr la inducción, el establecimiento y la propagación del cultivo celular de Anredera scandens para predecir las condiciones óptimas de su crecimiento y de la producción de la 2,4-dihidroxi-6-metoxi-5-formil-3-metilchalcona en los tejidos callosos.

4.2 Objetivos específicos.

- 1.- Establecer el mejor medio sólido de cultivo celular de A.scandens.
- 2.- Determinar la curva de crecimiento para el mejor cultivo celular de A.scandens.
- 3.- Determinar la presencia de retrochalcona (2) en las partes aéreas de la planta madura.
- 4.- Cuantificar la presencia de la retrochalcona (2), en los cultivos de tejidos celulares de A.scandens.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la realización del presente trabajo experimental se diseñó un protocolo que consta de varias etapas:

En la primera etapa, se procedió a inducir callo a partir de explantes de tallo y hoja de Anredera scandens, en medios de cultivo adicionados de 2,4-D en diferentes concentraciones ($MS(1.0-2.0 \text{ mg/l})$; $B_5(0.5, 1.0-2.0 \text{ mg/l})$; $N_6(1.0-2.0 \text{ mg/l})$ y $N_6(2)(0.5, 1.0-2.0 \text{ mg/l})$, de tal forma que al final de esta etapa (5-6 semanas) se determinó el explante que presentó la mejor respuesta. De esta manera, se procedió a realizar el primer subcultivo para la obtención del callo primario.

En la segunda etapa, se llevó a cabo la primera resiembra en los mismos medios (mencionados anteriormente), con la finalidad de evaluar el efecto de cada uno de ellos en el crecimiento del tejido caloso, y determinar la fase óptima del crecimiento del callo para efectuar la propagación y el mantenimiento de los subcultivos. Al mismo tiempo, se evaluó cualitativa y cuantitativamente cada uno de los cultivos obtenidos durante las tres primeras resiembras.

En la última etapa, se realizó una evaluación en el medio de cultivo -- que resultó más favorable a través de una curva de crecimiento con la finalidad de definir el tiempo necesario para obtener una cantidad suficiente de callo. La figura 2 representa el diagrama de flujo que resume los tres procedimientos realizados durante la inducción y la propagación del callo de A.scandens. Los cultivos se resembraron durante diez ocasiones sucesivas y se procedió a su análisis químico (figura 3).

DIAGRAMA DE FLUJO

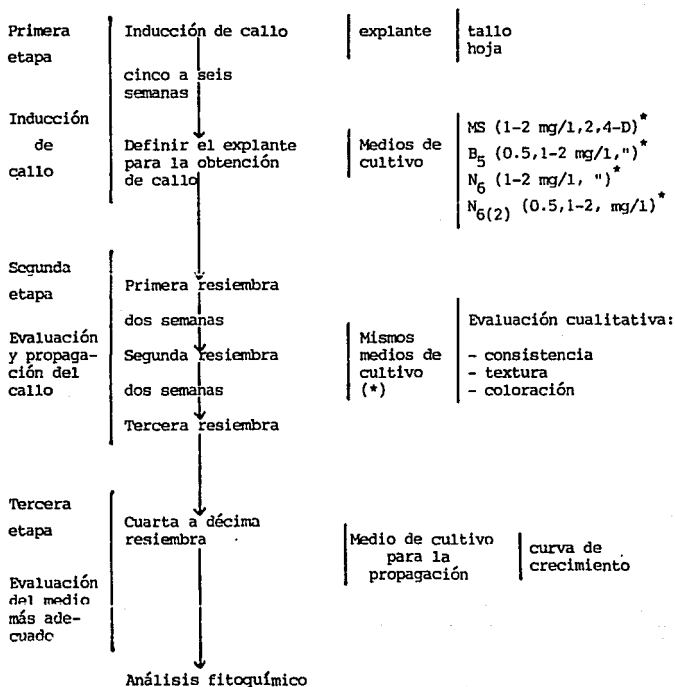
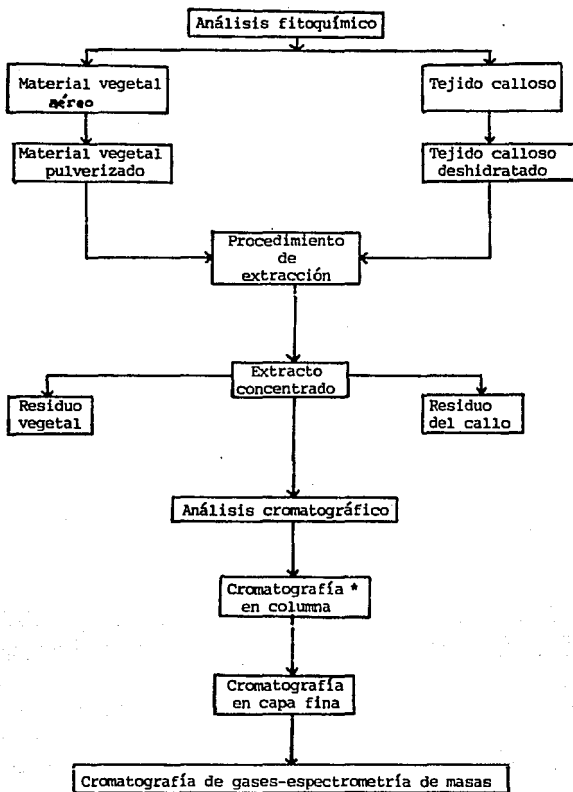


Figura 2. Diagrama de flujo para el diseño experimental utilizado durante la inducción y la propagación del callo de -- A.scandens.



Nota:(*) Solamente para material vegetal aéreo.

Figura 3. Diagrama de flujo para el diseño experimental utilizado durante el análisis químico de los callos y las partes aéreas de *A.scandens*.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Material vegetal.

Para la realización del presente trabajo se utilizaron las partes aéreas de A.scandens obtenidas de ejemplares cultivados en invernadero.

6.2 Equipo:

- Campana de flujo laminar VECO
- Balanza analítica Sartorius
- Incubadora Freas 818
- Autoclave AESA CU-300
- Potenciómetro Cole Palmer 6996
- Parrilla con agitador magnético Corning Pc-351
- Refrigerador
- Rotavapor (Büchi)

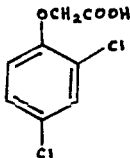
6.3 Reactivos.

- etanol absoluto Merck
- solución de hipoclorito de sodio (1:1)
- agua desionizada
- vitaminas, aminoácidos y fitohormona marca Sigma

Para todos los reactivos utilizados en la preparación de los medios nutritivos véanse los cuadros 1, 2, 3 y 4.

6.4 Fitorregulador.

La hormona de crecimiento vegetal utilizada para completar los medios de cultivo fue el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).



Estructura del ácido 2,4-D

6.5 Inducción y establecimiento del callo de Anredera scandens.

6.5.1 Esterilización del material biológico.

Bajo condiciones de asepsia total, las hojas y tallo de A.scandens se desinfectaron, distribuyendo el material biológico en matraces Erlenmeyer-estériles sumergiéndolos en 100 ml de una solución de etanol al 70 % v/v - con un tiempo de exposición de 30 segundos. seguido de cuatro enjuagues -- con agua desionizada estéril. Una vez eliminados los residuos del etanol, se agregó la solución de hipoclorito de sodio al 10 % v/v durante 10 minutos, decantando esta solución. Por último, el material vegetal se enjuagó cuatro veces con agua desionizada estéril.

Los explantes de hojas y tallos de A.scandens se obtuvieron a partir de la región que circunda a la zona apical. El tamaño de los explantes obtenidos fue de aproximadamente 0.5 cm^2 , los cuales se colocaron en cajas - de Petri para ser sembrados en el medio de cultivo adecuado.

6.5.2 Preparación y caracterización de los medios de cultivo para la inducción de callo.

Los medios que se emplearon para el cultivo in vitro de A.scandens -- fueron: Murashige-Skoog (1962), denominado MS; N_6 (Chu et al., 1975) y -- $N_6(2)$ que es una modificación del medio N_6 y el de Gamborg (1968), denominado B_5 .

Para facilitar la preparación de los medios de cultivo, se elaboraron soluciones "stock" con los diferentes compuestos que constituyen a cada -- uno de los medios, tal como se indican en los cuadros 1-4.

6.5.2.1 Medio MS.

Para llevar a cabo la preparación de un litro del medio MS (Murashige Skoog, 1962) en un vaso de precipitado se añadió un volumen de 820 ml de -- agua desionizada, la cual se mantuvo en agitación constante; las solucio-- nes (cuadro 1) se adicionaron de la manera siguiente:

Solución	ml/l
A	10
B	100
C	10
D	10
E	10
F	10
G	10
H	5
I	0.5
J	5
K	2

Sacarosa 30 g/l

Regulador de crecimiento (2,4-D)

(dependiendo de la concentración, 1-2 mg/l)

SOLUCIONES "stock" DEL MEDIO MURASHIGE-SKOOG

Solución	Compuesto	Cantidad (g)	Volumen (ml)
A	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44.0	cbp----1000
B	NH_4NO_3	16.4	
	KNO_3	19.0	cbp----1000
C	KI	0.083	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025	cbp----1000
D	KH_2PO_4	17.0	
	H_3BO_3	0.62	
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	cbp----1000
E	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37.0	
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.89	
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.86	cbp----1000
F*	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.784	
	EDTA $\cdot \text{Na}_2$	3.724	cbp----1000
G	Mio-Inositol	2.5	cbp---- 250
H	Ac.Nicotínico	0.025	cbp---- 250
I	Tiamina-HCl	0.05	cbp---- 250
J	Piridoxina-HCl	0.025	cbp---- 250
K	Glicina	0.25	cbp---- 250

cbp - cantidad basal para ese volumen.

(*) Nota: Para preparar la solución "F", se calienta ligeramente la solución de EDTA y posteriormente se agrega lentamente la solución de fierro.

Cuadro 1. Medio basal Murashige-Skoog MS (1962).

6.5.2.2 Medio N₆

Para preparar un litro de medio N₆ (Chu et al., 1975) se añadieron -- cada una de las soluciones "stock" (cuadro 2) a un volumen de 835 ml de -- agua desionizada; las cantidades que se agregaron son las siguientes:

Solución	ml/l
1	10
2	100
3	10
4	10
(MS) F	10
(MS) H	5
(MS) I	5
(MS) J	5
(MS) K	2

Sacarosa 30 g/l

Regulador de crecimiento (2,4-D)

(dependiendo de la concentración, 1-2 mg/l)

PREPARACION DE SOLUCIONES "stock" DEL MEDIO N₆

Solución	Compuesto	Cantidad (g)	Volumen (ml)
1	CaCl ₂ ·2H ₂ O	16.6	cbp----1000
2	KNO ₃	28.3	cbp----1000
	(NH ₄) ₂ SO ₄	4.63	
3	KI	0.08	cbp----1000
	KH ₂ PO ₄	40.0	
	H ₃ BO ₃	0.16	
4	MgSO ₄ ·7H ₂ O	18.5	cbp----1000
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.33	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.15	
F (MS)	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.784	cbp----1000
	EDTA·Na ₂	3.726	
H (MS)	Ac. Nicotínico	0.025	cbp---- 250
I (MS)	Tiamina-HCl	0.05	cbp---- 250
J (MS)	Piridoxina-HCl	0.025	cbp---- 250
K (MS)	Glicina	0.25	cbp---- 250

Cuadro 2. Medio basal N₆ (Chu et al., 1975).

6.5.2.3 Medio N₆(2)

Para llevar a cabo la preparación de un litro de medio N₆(2) se agregó un volumen de 785 ml de agua desionizada, añadiendo las soluciones "stock" del medio N₆ (cuadro 3) mismas que se adicionaron de la manera siguiente:

Solución	ml/l
1	10
2	100
3	10
4	10
(MS) F	10
(MS) H	5
(MS) I	5
(MS) J	5
(MS) K	2
Glicina	10
Tiamina	9
Coctel-2	10
Coctel-3	10
Adenina	10

Asparagina 150 mg/l

Sacarosa 30 g/l

Regulador de crecimiento (2,4-D)

(dependiendo de la concentración, 0.5,1-2 mg/l)

COMPOSICION DE LOS "cocteles" DEL MEDIO N₆(2)

Coctel 2

Compuesto	Cantidad (g/l)
Glicina	2.0
Inositol	100.0
Ac.Nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5
Tiamina	1.0

Coctel 3

Compuesto	Cantidad (g/l)
Glicina	20.0
L-Aspártico	7.5
L-Asparagina	10.0
L-Arganina	60.0
Urea	45.0
Tiamina	1.0
Ac.Nicotínico	1.0
Piridoxina	1.0
Ac.Fólico	1.0
Biotina	1.0
Riboflavina	0.1
Glutámico	7.5
Inositol	45.0

Cuadro 3. Modificación del medio N₆.

6.5.2.4 Medio B₅.

Para preparar un litro de medio B₅ (Gamborg et al., 1968) se adicionó un volumen de 765 ml de agua desionizada, agregando las siguientes cantidades de las soluciones "stock" (cuadro 4):

Solución	ml/l
I	10
II	100
III	5
IV	10
V	10
(MS) F	10
(MS) G	10
(MS) H	10
(MS) I	50
(MS) J	10

Sacarosa 20 g/l

Regulador de crecimiento (2,4-D)

(dependiendo de la concentración, 0.5, 1-2 mg/l)

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES "stock" DEL MEDIO B₅.

Solución	Compuesto	Cantidad (g)	Volumen (ml)
I	ClCa ₂ .2H ₂ O	15.0	cbp----1000
II	KNO ₃	6.25	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.335	cbp---- 250
III	KI	0.015	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.005	cbp---- 100
IV	H ₃ BO ₃	0.02	
	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1.50	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.002	cbp---- 100
V	MgSO ₄	6.25	
	MnSO ₄	0.25	
	CuSO ₄	0.0006	
	ZnSO ₄	0.05	cbp---- 250
F (MS)	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.696	
	EDTA.Na ₂	0.93	cbp---- 250
G (MS)	Mio-Inositol	2.5	cbp---- 250
H (MS)	Ac.Nicotínico	0.025	cbp---- 250
I (MS)	Tiamina-HCl	0.05	cbp---- 250
J (MS)	Piridoxina-HCl	0.025	cbp---- 250

Cuadro 4. Medio basal de Gamburg B₅ (1968).

Para completar la preparación de cada uno de los medios de cultivo se realizó lo siguiente:

El pH de los medios se ajustó a 5.8 con una solución de HCl 0.1 N o KOH 0.1 N; se completó el volumen a un litro y se agregaron 7 g/l de agar. Posteriormente, se tapó con papel aluminio y se mantuvo en agitación constante, dejando calentar hasta que el agar se disolviera por completo sin permitir que el medio de cultivo hirviera. Finalmente, el medio de cultivo se incorporó en frascos de vidrio (gerber) en alícuotas de 25 ml; estos frascos se sellaron con tapas de plástico y se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1.5 libras de presión durante 15 minutos.

6.5.3 Inducción y establecimiento del callo de A.scandens.

Para inducir la formación del tejido calloso de A.scandens los explantes desinfectados de hoja y tallo se sembraron bajo condiciones estrictas de asepsia en una campana de flujo laminar. Las hojas y tallos se fraccionaron con ayuda de unas pinzas de disección previamente sumergidas con etanol y flameadas. Los explantes se colocaron sobre el medio de cultivo (300 explantes por cada medio), procurando siempre que la parte donde se realizó el corte entrara en contacto con el medio. Una vez sembrado el material biológico se incubaron a 26 ± 2 °C. Después de 2 semanas, se evaluó el porcentaje de explantes de tallo y hoja que presentaron inducción. Se dejaron incubar de cinco a seis semanas, según el medio, y se procedió a resembrar.

6.6 Propagación del callo.

La primera resiembra del tejido calloso se realizó una vez lograda la inducción del mismo en cada uno de los medios de cultivo y para cada tipo de explantes con el propósito de mantener el callo y propiciar su crecimiento. Las resiembras consecutivas se realizaron cada 16 días, con el objeto de cuantificar la producción del tejido calloso. De esta manera, cada

uno de los frascos se pesó antes y después de colocar 0.5 g de callo. La apariencia del tejido calloso se evaluó visualmente tomando en cuenta su consistencia, textura y coloración.

A partir de la primera resiembra, se separó la porción del callo del resto del explante que no presentó respuesta para evitar necrosamientos -- posteriores y como consecuencia la pérdida del tejido calloso. Estos procedimientos se repitieron consecutivamente durante diez resiembras.

6.7 Evaluación del crecimiento del tejido calloso.

Antes de realizar cada una de las resiembras, se realizó la evaluación cualitativa de los cambios en la morfología, la textura y la coloración -- del tejido calloso con el propósito de establecer parámetros para determinar la calidad del material obtenido y que permitiera el mantenimiento del cultivo celular de A.scandens. Al mismo tiempo, se cuantificó la producción del tejido calloso, tomando como parámetro el peso fresco.

6.8 Curva de crecimiento.

El crecimiento del tejido celular se determinó en función del peso -- fresco en gramos, para lo cual se sembraron un total de 40 frascos a partir de tejido inducido en el medio $N_6(2)$, iniciando con un inóculo de 1 g de callo en cada frasco para cada una de las repeticiones. Los frascos se mantuvieron en una incubadora a 26 ± 2 °C y con luz continua. Cada 72 horas se tomó un lote de 4 frascos por un periodo de 20 días, teniendo así diez puntos para la curva de crecimiento.

6.9 Análisis fitoquímico.

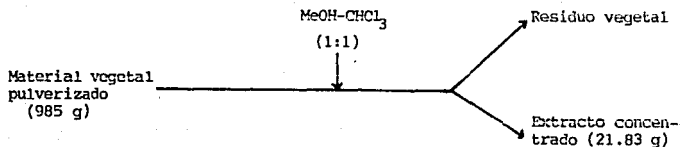
6.9.1 Material vegetal.

Para la realización del estudio fitoquímico se utilizaron las partes aéreas de A.scandens cultivadas en invernadero, así como los callos de 18-días de desarrollo obtenidos de la curva de crecimiento y mantenidos en el medio N₆(2).

6.9.2 Procedimientos de extracción.

6.9.2.1 Extracción de las partes aéreas.

El material vegetal (tallos y hojas) (985 g) se dejaron secar a temperatura ambiente y se trituró utilizando un mortero. La maceración de este material se realizó con CHCl₃-MeOH (1:1) a temperatura ambiente dejándose reposar durante cuatro días. Posteriormente, el disolvente de extracción se decantó y filtró para ser concentrado por destilación a presión reducida.- Esta operación se repitió dos veces, obteniéndose un total de 21.83 g de extracto orgánico.



6.9.2.2 Extracción del tejido caloso.

La obtención del extracto orgánico a partir de los callos de A. scan--dens se realizó de la siguiente manera:

128.88 g del tejido caloso se expusieron a una corriente continua de aire caliente durante 7 horas. Una vez seco, el material vegetal (aproximadamente 7.131 g) se extrajo con AcOEt (50 ml) durante 48 horas. Posteriormente, se procedió a la preparación del extracto mediante la filtración y eliminación del residuo sólido amorfo y la concentración del disolvente de extracción. Este procedimiento proporcionó 370 mg de un extracto color ---ámbar.

6.9.3 Análisis cromatográfico.

El análisis cromatográfico de los extractos preparados se realizó mediante cromatografía en capa fina (gel de sílice de 60 F, 250 Merck) de la siguiente manera: se aplicó con un capilar una o varias veces la solución-problema sobre un cromatofolio. Los cromatogramas se obtuvieron al desarrollar cada una de las placas en algunos de los siguientes sistemas de elución:

n-Hexano- CHCl_3 (1:1)
" " (95:5)
 CHCl_3 -Acetona (95:5)
" " (9:1)
n-Hexano- CHCl_3 -Acetona (3:6.5:0.5)
Acetona (100 %)
" -MeOH (95:5)
" " (1:1)

Posteriormente, para la visualización de los constituyentes presentes, el primer paso consistió en exponer las placas cromatográficas previa evaporación del eluyente a la luz ultravioleta de onda corta. Cualquier zona que exhibiera fluorescencia fue marcada inmediatamente. Las placas se humedecieron mediante un aspersor con una solución de H_2SO_4 -sulfato cérico y se revelaron por calentamiento sobre una parrilla a una temperatura de --- 80 °C.

6.9.4 Procedimientos de aislamiento y purificación de la retrochalcona (2).

El extracto orgánico total de las partes aéreas de la planta (21.83 g) se fraccionó en una columna empacada con 1 Kg de gel de sílice (70-230 --- Mesch), para lo cual el extracto se adsorbió en 100 g del mismo adsorbente, utilizándose n-hexano- $CHCl_3$ (1:1) como sistema de elución e incrementando la polaridad del disolvente con cloroformo y acetona.

El volumen de los eluatos fue de 50 ml y cada uno se concentró hasta un volumen de 3 ml aproximadamente. Por último, la semejanza y homogeneidad de los constituyentes detectados mediante el análisis en cromatografía en capa fina permitió la reunión de cada una de las fracciones, obteniéndose XII fracciones combinadas, las cuales se trataron por separado a fin de -- poder detectar y purificar la retrochalcona (2). Este compuesto se obtuvo en la fracción IV y en menor proporción en la fracción V. La purificación posterior de estas fracciones se realizó mediante cromatografía en capa -- fina preparativa utilizando una cromatoplaque de gel de sílice (20 x 20 cm x 2 mm) y como sistema de elución la mezcla n-hexano- $CHCl_3$ -Acetona (3:6.5: 0.5). Una vez desarrollada la cromatografía se observó a la luz ultravioleta de onda corta, con el objeto de visualizar la banda correspondiente a -- la retrochalcona (2).

Posteriormente, cada uno de los extremos (1 cm) de la cromatoplaque se expusieron a una solución de ácido sulfúrico-sulfato cérico y revelándola por calentamiento.

Este procedimiento permitió detectar la banda con un $R_f = 0.55$ al utilizar el sistema de eluyente formado por hexano- CHCl_3 -Acetona (3:6.5:0.5). La separación de esta banda se realizó de la siguiente manera: la zona no expuesta al revelador y que correspondía a la fracción de interés fue separada del resto de la cromatoplaca. La extracción de la retrochalcona se realizó mediante su desadsorción del soporte cromatográfico con acetona. Esta suspensión se mantuvo en agitación continua durante 3 horas y una vez transcurrido este tiempo, la gel de sílice se eliminó por filtración. La solución acetónica resultante se concentró a presión reducida en un rotavaporador, con un calentamiento de $40\text{ }^\circ\text{C}$ en baño de agua. Este procedimiento proporcionó 61 mg de un sólido de color amarillo claro cuyas constantes físicas y espectroscópicas correspondieron a las descritas para la retrochalcona (2) (Caizada et al., 1990).

6.9.5 Análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas para la detección de la retrochalcona (2).

Tanto las fracciones IV y V obtenidas de los procedimientos de purificación del extracto preparado a partir de las partes aéreas de A. scandens, así como la extracción del tejido calloso se sometieron a un análisis de tipo cualitativo y cuantitativo mediante la secuencia instrumental de cromatografía de gases-espectrometría de masas, para detectar y cuantificar la presencia de la retrochalcona (2).

Este análisis utilizó las siguientes condiciones instrumentales: los espectros de masas se registraron con un espectrómetro equipado con una columna capilar de sílice fundida ($10\text{ m} \times 0.11\text{ mm}$) recubierta con silicón-OV-101, el programa de temperatura fue isotérmico a $50\text{ }^\circ\text{C}$ durante un minuto y posteriormente se incrementó a una velocidad de $4.5\text{ }^\circ/\text{min}$ hasta alcanzar $280\text{ }^\circ\text{C}$, con un flujo de He de 1.5 ml/min . La temperatura del inyector y de la interfase fue de $220\text{ }^\circ\text{C}$. Cada espectro se midió con un voltaje de ionización de 70 eV y la temperatura de la fuente iónica de $260\text{ }^\circ\text{C}$.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Inducción y establecimiento del callo.

El cuadro 5 resume los porcentajes de inducción obtenidos en cada uno de los medios a partir de explantes de tallo y hoja. Estos resultados permitieron seleccionar a los explantes de tallo como los idóneos para lograr la inducción y el crecimiento del tejido calloso de A.scandens.

Es importante señalar que el explante de hoja generó poco tejido calloso con un crecimiento lento en comparación con el observado para los explantes de tallo. Por lo tanto, estos resultados indicaron que los explantes de hoja no respondieron a los medios de cultivo utilizados (MS; B₅; N₆ y N₆(2)), en ninguna de las diferentes concentraciones del fitoregulator (2,4-D), en los casos más afortunados, sólo se observó el hinchamiento en la periferia del tejido vegetal con indicios de callo. En la mayoría de las ocasiones se observó solamente la necrosis del tejido vegetal.

De esta manera, se utilizaron los callos compactos obtenidos en mayor cantidad a partir de los explantes de tallo, obtenidos del medio N₆(2) para determinar la curva de crecimiento del cultivo de A.scandens y para realizar su posterior análisis químico.

7.2 Caracterización y obtención del callo.

Al término de la inducción de tejido calloso (5-6 semanas), se llevó a cabo la evaluación cualitativa para determinar el comportamiento de cada uno de los explantes en los diferentes medios de cultivo empleados en este trabajo. En dicha evaluación se consideraron sólo aspectos morfológicos -- tomando en cuenta los siguientes parámetros: la textura, la consistencia y la coloración, con la finalidad de describir las características que presentaba el tejido calloso en cada medio.

Los cultivos se resembraron durante diez ocasiones bajo las mismas condiciones de cultivo. Sin embargo al término de la décima resiembra se -

realizó una segunda evaluación cualitativa, permitiendo dividir los cultivos en los grupos siguientes:

Grupo I. Estos callos se desarrolló en el medio MS, y las características que presentaron fueron: consistencia mucilaginososa y textura lisa, su crecimiento sumamente lento, presentando un necrosamiento rápido, con una coloración verdosa, esto ocurre en ambas concentraciones del fitoregulator.

Todas las características antes mencionadas se observaron generalmente para este medio a partir de la segunda resiembra.

Grupo II. Estos callos se presentaron en el medio B₅, con una consistencia friable y textura lisa en las concentraciones de 0.5 y 1.0 del fitoregulator, con un buen crecimiento, el cual se mantuvo en la parte superficial del tejido calloso manifestandose un necrosamiento en la base antes de realizar el subcultivo. En ocasiones esta necrosis fue tan abundante que provocaba la pérdida del material biológico. La coloración presentada fue de verde claro-verde amarillo.

Grupo III. Tejido calloso de consistencia compacta y textura granular con un crecimiento rápido. La consistencia del callo permitió que se propagara durante diez subcultivos. Los callos que se ubicaron dentro de este grupo desarrollaron a partir de la segunda resiembra una coloración que varió desde ámbar hasta café rojizo tenue. Esta pigmentación suponía a priori la síntesis de algún cromóforo relacionado con la retrochalcona (2). Los medios N₆ y N₆(2) indujeron este tipo de callo, destacando las concentraciones de 0.5 y 1.0 del fitoregulator.

Medio de cultivo	Regulador de crecimiento	Concentración (mg/l)	Inducción (%)			
			Hoja #	%	Tallo #	%
MS	2,4-D	1.0	78	26	222	74
MS	2,4-D	2.0	55	18	231	77
B ₅	2,4-D	0.5	69	23	293	97
B ₅	2,4-D	1.0	57	19	284	95
B ₅	2,4-D	2.0	0	0	254	85
N ₆	2,4-D	1.0	43	14	287	96
N ₆	2,4-D	2.0	0	0	280	93
N ₆ (2)	2,4-D	0.5	33	11	298	99
N ₆ (2)	2,4-D	1.0	51	17	288	96
N ₆ (2)	2,4-D	2.0	49	16	288	96

Cuadro 5. Valores de apreciación para la inducción del callo de A.scandens en diferentes medios de cultivo.

Nota.: el #, indica el No. de explantes que dieron callo.

En todos los casos se sembraron 300 explantes.

De acuerdo a estas evaluaciones se eligió al medio N₆(2) como base -- para la obtención del material biológico. La consistencia compacta del tejido calloso se utilizó como un parámetro de evaluación para establecer el mejor cultivo celular de A.scandens y poder cuantificar la producción de -- éste expresada en relación al peso fresco obtenido en cada uno de los medios utilizados. Cabe mencionar que para el establecimiento del cultivo -- celular, sólo se utilizaron los callos del grupo III (específicamente los del medio N₆(2), ya que en los grupos I y II no se logró establecer el tejido calloso de forma adecuada.

La posible explicación que se sugiere para el crecimiento lento observado en callos provenientes de tejido foliar puede asociarse con la baja -- adaptación durante la inducción.

7.3 Evaluación morfológica del callo en los cultivos celulares en los diferentes medios.

En este trabajo se establece por primera vez el cultivo de tejido vegetal de la especie A.scandens. Para el logro de los objetivos específicos se evaluó el incremento en el crecimiento del tejido calloso y su grado de pigmentación, estos parámetros constituyeron un factor importante para poder realizar el estudio fitoquímico de estos cultivos. Por otra parte, el tejido calloso mejor establecido sirvió como fuente para la propagación y el mantenimiento del cultivo in vitro.

Con el fin de hacer un análisis comparativo en relación al tallo también se describen las características que presentaron algunos de los explantes de hoja. Así el comportamiento de los explantes en los diferentes medios fue el siguiente: Para tallo en todos los medios utilizados se obtuvo la formación del tejido calloso en el transcurso de las primeras 5-6 semanas.

En el medio MS el hinchamiento de los explantes se inició seis días - después de la siembra. En tallo la proliferación del callo se inició a las cinco semanas, tiempo en el cual los cultivos presentaron un tamaño adecuada para poder efectuar subcultivos cada 16 días.

El cuadro 6 se presentan los resultados relacionados con las dos concentraciones del fitorregulador para los cultivos celulares de A.scandens obtenidos a partir de explantes de hoja y tallos en el medio MS.

Origen del explante	Tallos	Hoja
C O N C E N T R A C I O N	1.0 mg/l	Callo de color verde claro, consistencia mucilaginosa, textura lisa y poca inducción.
C O N C E N T R A C I O N	2.0 mg/l	Callo de color verde-amarelo, consistencia mucilaginosa, textura lisa y poca inducción.
		Callo de color café oscuro, con una -- mínima inducción.
		Indicios de callo en la periferia del explante.

Cuadro 6. Efecto del 2,4-D sobre la apariencia de los cultivos celulares de A.scandens en el medio MS.

En el medio B₅ (Gamborg, 1968) el hinchamiento de los explantes se --
 inició a los cinco días de la siembra en las concentraciones ya menciona--
 das y la proliferación del callo (en tallo) se inició a las seis semanas.--

En el cuadro 7 se describen los resultados relacionados con los cam--
 bios morfológicos ocasionados por la diferencia en la concentración del --
 2,4-D sobre los cultivos celulares.

Origen del explante		Tallo	Hoja
C O N C E N T R A C I O N	0.5 mg/l	Callo de color café amari- lento de apariencia cris- talina, friable con buena inducción y textura lisa.	Callo color verde claro poca inducción en la pe- riferia del explante,-- consistencia compacta.
	1.0 mg/l	Callo color café verdoso - con buena inducción, fri- able y de apariencia opaca.	Callo color café verdo- so opaco, poca induc- ción en la periferia,-- consistencia compacta.
	2.0 mg/l	Callo de color café amari- lento, friable con aparien- cia opaca y una inducción regular.	Solo hubo hinchamiento- de la periferia del ex- plante sin inducción de callo.

Cuadro 7. Efecto de las concentraciones del 2,4-D sobre la
 apariencia del tejido calloso en el medio B₅.

En el medio N₆ (Chu et al., 1975) el hinchamiento se inició a los seis días de la siembra en ambas concentraciones del fitorregulador. De esta forma, la proliferación del callo (en tallo) se inició a las cinco semanas.

En el cuadro 8 se resumen los resultados obtenidos en los cambios morfológicos por las variaciones en la concentración del fitorregulador sobre los cultivos celulares.

Origen del explante	Tallo	Hoja
C O N C E N T R A C I O N	1.0 mg/1 Callo de color verde pálido consistencia compacta, con buena inducción. Pobre acumulación de pigmentos.	Callo de color café obscuro, poca inducción en la periferia y friable.
	2.0 mg/1 Callo de color ámbar, poco friable, inducción regular. Pobre acumulación de pigmentos.	No hubo inducción, explantes necrosados.

Cuadro 8. Efecto de las concentraciones del 2,4-D en la apariencia morfológica del tejido calloso en el medio N₆.

En el medio N₆(2) una modificación del medio N₆, el hinchamiento de los explantes (en tallo) se inició a los cinco días después de la siembra en las concentraciones ya mencionadas. Posteriormente, la proliferación del callo se inició a las seis semanas.

En el cuadro 9 se resume brevemente los resultados relacionados con los cambios morfológicos ocasionados por las variaciones en la concentración del fitoregulador sobre los cultivos celulares obtenidos de los explantes.

Origen del explante	Talio	Hoja
C O N C E N T R A C I O N	0.5 mg/l Callo de color ámbar, compacto y con buena inducción. Acumulación abundante de pigmentos.	Indicios de callo en la periferia del explante -- sin pigmentación.
	1.0 mg/l Callo de color café, compacto, con una inducción regular. Abundante acumulación de pigmentos.	Indicios de callo en la periferia del explante. -- Pobre acumulación de pigmentos.
	2.0 mg/l Callo color amarillo, transparente, compacto, inducción regular. Pobre acumulación de pigmentos.	Mínima inducción de callo color café verdoso en la periferia de la hoja. Pobre acumulación de pigmentos.

Cuadro 9. Efecto de las concentraciones de 2,4-D en la apariencia morfológica del tejido calloso en el medio N₆(2).

Estos resultados permiten concluir que los callos que desarrollaron una mejor apariencia morfológica en cada uno de los medios de cultivo empleados fueron los generados a partir de los explantes de tallo. Al considerar la morfología y el grado de pigmentación observados para cada uno de los callos obtenidos, se concluye que las concentraciones de 0.5 y 1.0 mg/1 del fitorregulador 2,4-D en los diferentes casos fueron las más apropiadas para la realización de su estudio fitoquímico, así como su inducción y establecimiento celular.

7.4 Evaluación cuantitativa del crecimiento del tejido calloso.

La evaluación cuantitativa del incremento en peso fresco durante el crecimiento del tejido calloso en los diferentes medios empleados para la inducción constituyó un segundo criterio utilizado. De esta forma, se decidió evaluar el peso de los callos durante tres resiembras y esto se realizó para cada uno de los medios de cultivo en las concentraciones apropiadas: MS (1.0 mg/1); B₅ (0.5 mg/1); N₆ (1.0 mg/1) y N₆(2) (0.5 mg/1), obteniéndose diferencias en el aumento celular (de 1 a 5 g aproximadamente) -- para cada uno de ellos. Sin embargo, en el medio N₆(2) a 0.5 mg/1 se presentó un crecimiento del tejido calloso satisfactorio (5 g), el cual se terminó a través del peso fresco en gramos. El cuadro 10 y la figura 4 muestran el incremento de los tejidos celulares expresados en peso fresco durante las primeras tres resiembras en cada uno de los medios utilizados.

Medio de cultivo	Concen. 2,4-D (mg/l)	Párametro	Primera resiembra	Segunda resiembra	Tercera resiembra
MS	1.0	Peso (g)	15.73	21.39	34.16
		\bar{x}	0.58	0.79	1.27
		% de incremento	-----	35.9	117.1
		DS	-----	0.2755	0.3856
B ₅	0.5	Peso (g)	18.27	49.76	61.2
		\bar{x}	0.88	2.37	4.1
		% de incremento	-----	170.8	233.6
		DS	-----	0.4900	0.5212
N ₆	1.0	Peso (g)	13.02	38.42	73.95
		\bar{x}	0.87	2.65	4.4
		% de incremento	-----	195.0	467.9
		DS	-----	0.5213	0.4920
N ₆ (2)	0.5	Peso (g)	12.96	41.75	98.1
		\bar{x}	0.65	2.9	4.9
		% de incremento	-----	222.1	656.9
		DS	-----	0.7520	0.8786

Nota: \bar{x} -valor promedio
DS-desviación estandar

Cuadro 10. Incremento en peso fresco del tejido calloso de *A.scandens* durante las tres primeras resiembras en diferentes medios sólidos.

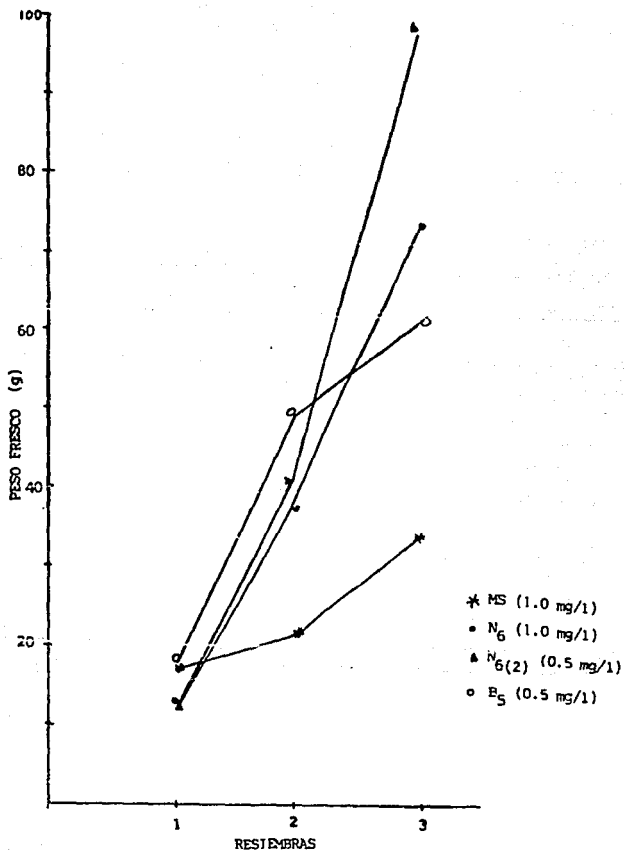


Figura 4. Curva del incremento del peso fresco (g) en los diferentes medios, utilizando como fitorregulador al 2,4-D en mg/l

Para la inducción se partió de la misma cantidad de material vegetal. Sin embargo en el transcurso de las resiembras se observaron diferencias -- significativas en relación al peso fresco alcanzado por cada uno de los callos propagados en los diferentes medios sólidos utilizados. Al realizar la segunda resiembra se observó que el crecimiento de los callos en el medio MS alcanzó un incremento del 35.9 %, seguido del medio B₅ con un incremento del 170.8 % y del medio N₆ con un crecimiento de los callos del 195.0 %. En tanto que el medio N₆₍₂₎ alcanzó un crecimiento significativo del 222.1 %.- Finalmente, al determinar el segundo incremento en peso como resultado de -- la tercera resiembra, se observó con mayor claridad el comportamiento de -- cada uno de los cultivos. De esta forma el medio N₅₍₂₎ presentó el mayor -- incremento alcanzando casi a triplicar su masa celular en un 656.9 %. Esta evaluación del crecimiento del tejido calloso estableció que el medio N₆₍₂₎ era el apropiado para la propagación y el mantenimiento del tejido calloso de A.scandens

7.5 Curva de crecimiento.

El crecimiento del tejido celular se determinó únicamente en función del peso fresco (g) permitiendo observar la velocidad de incremento del cultivo inducido con el fitorregulador 2,4-D a 0.5 mg/l.

En el cuadro 11 se enlistan los datos de peso fresco obtenidos para la determinación de la curva de crecimiento de los callos de A.scandens.

	DIAS									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Peso fresco (g)	1.15	1.15	1.57	1.97	2.32	2.72	3.02	3.77	3.99	3.9

Cuadro 11. Valores promedio para la curva de crecimiento del cultivo de tejido celular de A.scandens.

La curva de crecimiento para los callos de A.scandens presentó el comportamiento típico de los sistemas biológicos una curva sigmoidal en la cual se observaron las cuatro etapas de crecimiento, las cuales se describen de la siguiente manera:

- La fase lag abarcó los cuatro primeros días, durante este periodo se observó muy poco crecimiento.

- b) La fase exponencial se registró a partir del sexto día y se inició por un incremento significativo en el crecimiento del callo, aumentando su masa celular hasta alcanzar un máximo a los 18 días.

- c) La fase de desaceleración comenzó a los 20 días y se inició la fase estacionaria con el envejecimiento y la pérdida de la capacidad de crecimiento del tejido calloso.

Esta curva de crecimiento permitió determinar que el día 18 era el más satisfactorio para realizar los subcultivos y así poder propagar el tejido calloso para la acumulación de una cantidad suficiente de material biológico y realizar una posterior evaluación de la retrochalcona (2) figura 3.

Por lo tanto, los procedimientos de la resiembra del cultivo para la propagación del callo se repitieron de manera consecutiva durante diez ocasiones proporcionando un total de 39.80 g de callo.

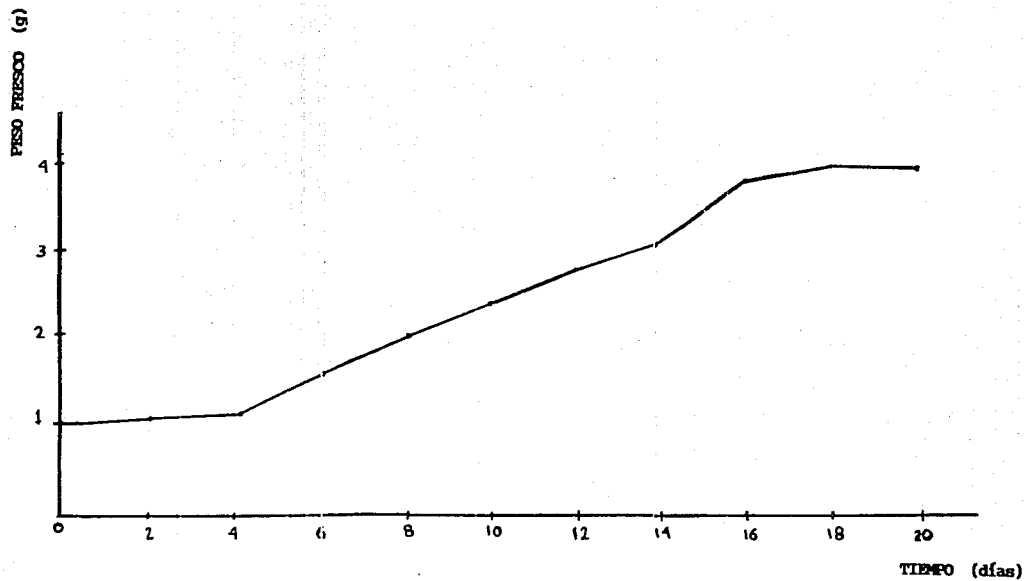


Figura 5. Curva de crecimiento del callo de A.scandens cuantificado en peso fresco.

7.6 Evaluación preliminar del contenido de la retrochalcona (2).

Con el objeto de verificar la capacidad de biosíntesis de este producto en las células desdiferenciadas, se procedió a realizar un análisis químico para demostrar la producción de la retrochalcona (2) en las partes aéreas y en los cultivos celulares de A.scandens.

7.6.1 Aislamiento y purificación de la retrochalcona (2) a partir de las partes aéreas de A.scandens.

Se realizó un fraccionamiento mediante cromatografía en columna de gel de sílice con el extracto orgánico (985 g) preparado a partir de las plantas cultivadas en invernadero. El cuadro 12 resume la secuencia desarrollada durante este proceso de separación.

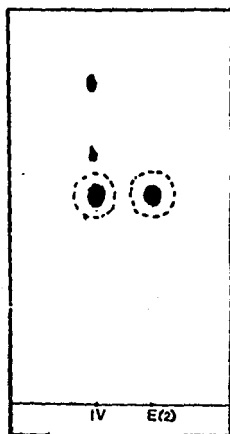
De la reunión de eluatos, se obtuvieron 12 fracciones numeradas en orden creciente de polaridad. Cada uno de los eluatos se analizaron por ccf. Este análisis preliminar permitió identificar en la fracción IV una banda activa en el ultravioleta (uv) que correspondió al $R_f = 0.55$. Esta banda desarrollo un color café intenso al exponer la placa a vapores de yodo. El cromatograma obtenido se ilustra en la figura 6 y se compara con el desarrollado por el estandar utilizado. Se observa que la fracción IV es una mezcla de la retrochalcona (2) y dos constituyentes menos polares (figura 6).

La purificación posterior de esta fracción permitió el aislamiento de la retrochalcona (2). El rendimiento de este metabolito fue del 0.006 % expresado en función del peso seco total del material vegetal analizado.

La identificación de este metabolito secundario como la 2,4-dihidroxi-6-metoxi-5-formil-3-metilchalcona se realizó al comparar sus constantes físicas y sus propiedades espectroscópicas con las descritas en la literatura (Calzada et al., 1990).

Sistema de elución	Fracción	No. de eluatos	Sistema de elución ccf
n-Hex-CHCl ₃			n-Hex-CHCl ₃
95:5	----	1-80	95:5
1:1	I	81-151	1:1
CHCl ₃ -Acetona			CHCl ₃ -Acetona
95:5	II	152-196	95:5
9:1	III	197-275	9:1
n-Hex-CHCl ₃ -Acetona			n-Hex-CHCl ₃ -Acetona
3:6.5:0.5	IV	276-308	3:6.5:0.5
" " "	V	319-328	" " "
Acetona			Acetona
100 %	VI	319 328	100 %
Acetona-MeOH			Acetona-MeOH
95:5	VII	329-336	1:1
95:5	VIII	337-348	85:15
95:5	IX	349-362	65:25
1:1	X	363-369	1:1
1:1	XI	370-374	85:15
1:1	XII	375-376	75:25

Cuadro 12. Fraccionamiento del extracto orgánico de A.scandens.




IV = Fracción IV del extracto de las partes aéreas.

E = Estandar retrochalcona (2).

Sistema de elución.

CHCl_3 -Hexano-Acetona
(6.5:3:0.5)

Banda visualizada con luz UV = 


Banda revelada con $\text{CeSO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ = 

Figura 6. Cromatografía en capa fina de la fracción IV del extracto de las partes aéreas de A.scandens y de la retrochalcona (2)

El cuadro 13 incluye las constantes físicas obtenidas para este producto - natural.

PF: 162-164 °C.

UV: λ ^{MeOH} (log ϵ): 290(4.25), 335(3.46)
máx

IR: ν ^{KBr} (cm^{-1}): 3300-3100, 3100-3000, 2900, 1630, 1610, 1560,
máx 1280, 990, 870.

(Espectro 1).

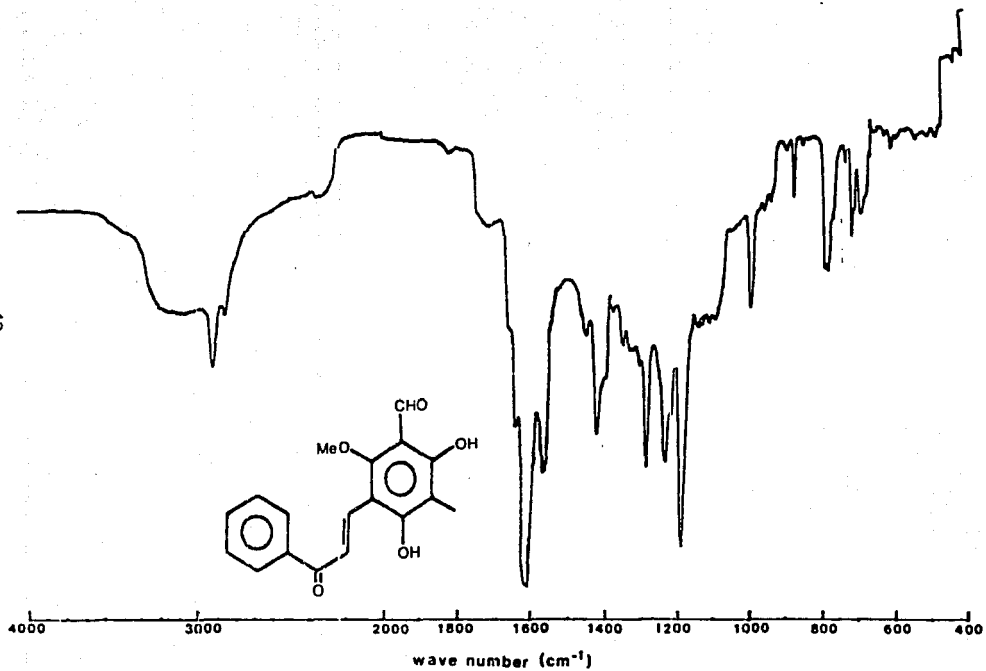
EM-IE, 70 eV: m/e (% int. relativa): 312(3), 295(7.5), 282(19.3),
281(100), 105(23), 77(23).

FMN-¹H, (300 MHz, DMSO): δ : 2.05(s, Me); 3.62(sa, OH); 3.85(s, MeO);
7.5-8.2(m, 5H); 7.92(d, 1H, J=15 Hz);
8.01(d, 1H, J=15 Hz), 10(s, 1H, CHO);
12.6(s, 1H, -OH).

(Espectro 2)

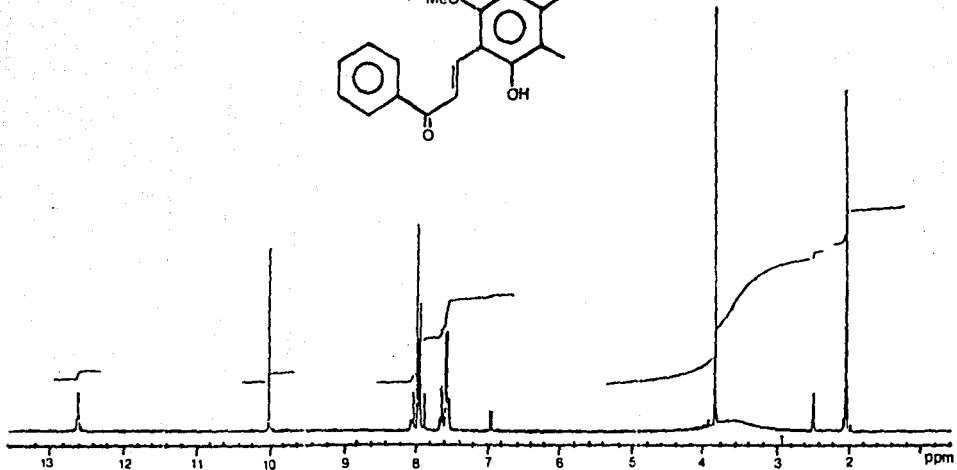
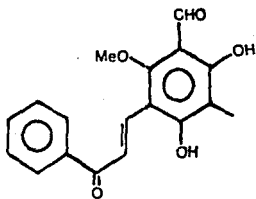
Cuadro 13. Constantes físicas y espectroscópicas de la
2,4-dihidroxi-6-metoxi-5-formil-3-metilchalcona
(2), aislada de tejido aéreo de A.scandens

- 49 -



Espectro 1.

- 50 -



Espectro 2.

7.6.2 Detección cualitativa de la retrochalcona (2) en los callos de A.scandens.

7.6.2.1 Cromatografía en capa fina.

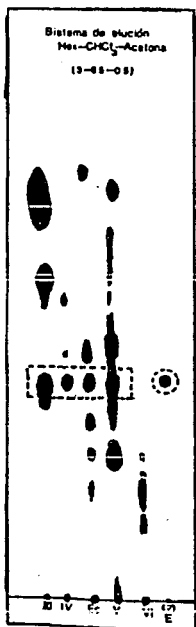
Una vez obtenida en forma pura la retrochalcona (2) a partir del material vegetal, se procedió a detectar la presencia de este metabolito en el callo obtenido de A.scandens en el medio N₆₍₂₎.

Se utilizó la cromatografía en capa fina como herramienta comparativa. El cromatograma obtenido para las fracciones IV y V, obtenidas del fraccionamiento del extracto de las partes aéreas, presentó una gran similitud -- con el desarrollado por el extracto clorofórmico del tejido calloso inducido y propagado en el medio N₆₍₂₎. La figura 5 muestra de manera comparativa cada uno de los cromatogramas para las fracciones III-VI, el extracto orgánico del callo de A.scandens y el estándar utilizado, el cual correspondía a la retrochalcona (2) en forma pura. En las fracciones IV y V se detectó la presencia de la retrochalcona mediante su intensa absorción en el ultravioleta y al desarrollar una banda con el Rf = 0.55 similar al desarrollado por el estándar utilizado.

7.6.2.2 Cromatografía de gases-espectrometría de masas.

El análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas de la banda de Rf = 0.55 (hexano-CHCl₃-Acetona (3:6.5:0.5)) permitió identificar como constituyente mayoritario a la retrochalcona (2) que correspondió a un tiempo de retención (Rt) de 28.5 min. La figura 8 ilustra el cromatograma obtenido para esta fracción y se compara con el desarrollado por el estándar utilizado. De esta manera, al pico con un tiempo de retención (Rt) de 28.5 min. se identificó inequívocamente como la retrochalcona (2). Al realizar este mismo análisis para el extracto del tejido calloso, se demostró por ccf una mayor complejidad en el contenido metabólico de --

éste, en comparación (figura 5) con el observado para las fracciones IV y V. Sin embargo, el constituyente mayoritario nuevamente correspondió al -- pico de $R_t = 28.5$ min. Por lo tanto, este análisis cuantitativo demostró -- la biosíntesis de la retrochalcona (2) por el tejido calloso y su rendi--- miento correspondió al 0.01 % del peso fresco del callo, calculado median--- te el área de integración para el cromatograma obtenido.



III-VI = Fracciones III-VI del extracto de las partes aéreas.

Ec = Extracto del tejido calloso.

E = Estandar retrochalcona (2).

Banda visualizada con UV = ○

Banda revelada con $\text{CeSO}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ = ●

Figura 7. Cromatograma desarrollado por el extracto del tejido calloso, la retrochalcona (2) y las fracciones III-VI del extracto de las partes aéreas.

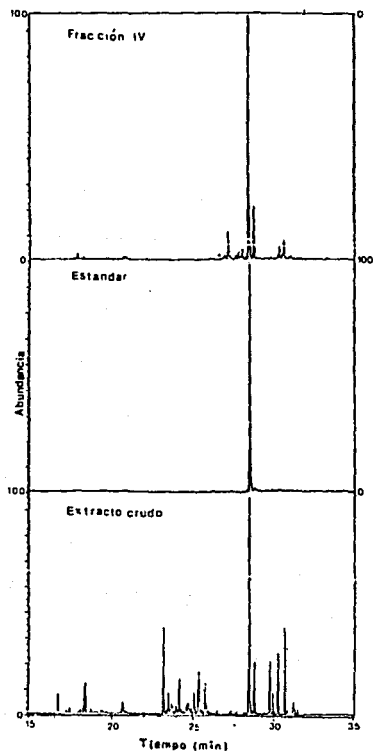


Figura 8. Cromatografía de gases de la fracción IV, estandar y extracto del tejido calloso.

8. CONCLUSIONES

La inducción, el establecimiento y la propagación del cultivo de tejido celular de Anredera scandens propuestos como objetivo fundamental de la presente investigación, permitieron generar las siguientes conclusiones:

- 1.- La máxima proliferación celular en los callos de A.scandens se obtuvo a partir de los explantes de tallo, bajo condiciones de luz y temperatura ambiente constantes.
- 2.- Se logró la inducción y el establecimiento del cultivo celular de A.scandens en el medio sólido al utilizar 2,4-D como fitorregulador - para la inducción del callo en las concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 mg/l en los medios B₅, N₆(2), N₆ y MS.
- 3.- La evaluación cualitativa y cuantitativa del tejido caloso de A.scandens permitió establecer que el medio N₆(2) es el más apropiado para su propagación y mantenimiento sólo en la concentración de 0.5 mg/l - del fitorregulador 2,4-D.
- 4.- La cuantificación de la 2,4-dihidroxi-6-metoxi-5-formil-3-metilchalcona (2) en el cultivo de tejido celular de A.scandens demostró que - este mantiene la capacidad de biosíntesis de dicho metabolito secundario.
La concentración de retrochalcona en los cultivos celulares (0.01 %) - fue semejante a la cuantificada (0.006 %) en las partes aéreas de la planta.

9. BIBLIOGRAFIA

- Achenbach, H., Stocker, M. y Constenla, M.A. (1988). Flavonoid and --- other constituents of Bachinia manca. Phytochemistry, 27, 1835-1841.
- Allan, E.J. y Fowler, M.W. (1985). Biologically active plant secondary metabolites perspectives for the future. Chemistry and Industry, 17, - 408-410.
- Ayabe, S., Kobayashi, M., Hikichi, M., Matsumoto, K. y T. Furuya. --- (1980). Flavonoids from the cultured cells of Glycyrrhiza echinata. - Phytochemistry, 19, 2179-2183.
- Balandrin, F.M., A.J. Klocke, S.E. Wurtele y H. Bollinger. (1985). Natural plant chemicals: sources of industrial and medical materials. -- Science, 228, 1154-1160.
- Berlin, J. (1986). Secondary products from plant cell cultures. In --- "Biotechnology. Microbial Products II". Eds. Rehm, J. y Reed G. Verlag sangabe Wienheim, Alemania, pp. 629-658.
- Calzada, B. Metilenquinonas triterpénicas y alcaloides sesquiterpéni-- cos de Hippocratea excelsa H.B.K., Tesis maestría, Facultad de Química. UNAM, 1990.
- Calzada, F., R. Mata., R. Bye y E. Linares (1990). A Retrochalcone --- from Anredera scandens, Phytochemistry, 29, 2737-2738.
- Carl, A.L. (1975). Auxinas and Plant Growth. University of California- Press. Los Angeles, USA, pp. 13-14.

- Cordell, G.A., C.W.W. Beecher y J.M. Pezzuto. (1991). Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs. Journal of Ethnopharmacology, 32, 117-133.
- Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. New York. pp. 1687-1691.
- Chu, C.C; Wang, C.C; Sun, C.S; Hsu, C; Yin, K.C; Chu, C.Y; Bi, F.Y. --- (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica*. Peking. 18, 659-668.
- Fowler, M.W. y Allan, E.J. (1985). Biologically active plant secondary-metabolites perspectives for the future. Ed. Staba, E.J. CRC. Press, -- Boca Raton Florida. pp. 408-410.
- Fujita, Y., Hara, Y., Suga, Ch. y Marimoto, T. (1981). Production of -- shikonin derivatives by cell suspension cultures of Lithospermum erythrorhizon. A new medium for the production of shikonin derivatives. Plant Cell Reports. 1, 61-63.
- Fujita, Y. y Tabata, M. (1987). Secondary metabolites from plant cells, pharmaceutical applications and progress in commercial production. Proc. of the VIth Int. Cong. on Plant Tissue and Cell Culture. Univ. Minnesota. Green, E.C, Somers, D.A., Hackli, W.P. y Biesboer, D.D. (Eds). pp. 169-185.
- Gamburg, O.L., Miller, R.A. y Ojima, K. (1968). Nutrient requirements - of suspension cultures of soybean root cell. Experimental Cell Research. 50, 151-158.

- Gautheret; R.J. (1982). Plant tissue culture: The history. In "Plant -- Tissue and Cell Culture" Ed. Fujimara, A. IAPTC. Tokyo. pp. 7-12.
- Loyola, V.M. y Reyes, L.J. (1985). El cultivo de tejidos vegetales en - México. Ed. Conacyt, México, pp. 111-128.
- Hashimoto, T.. y Yamada, Y. (1991). Organ Culture and Manipulation Me-- thods in Plant Biochemistry, Faculty of Agriculture, Kyoto University - Kyoto 606, Japan. 323-348.
- Martínez, M. (1979). Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plan tas Mexicanas. Ed. Fondo de Cultura Económica, México, p. 729.
- Mizukami, H., Konoshima, M. y Tabata, M. (1978). Effect of nutritional- factors on shikonin derivative formation in Lithospermum callus cultures Phytochemistry, 16, 1183-1186.
- Murashige, T. y Skoog, T. (1962). Arevised medium for rapid growth and- bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15, 473-497.
- Pereda, Miranda, R. (1992) Comunicación personal.
- Shuler, M. (1981). Production of secondary metabolites from plant cell- Tissue: problems and prospects. Science. 369, 65-80.
- Staba, E.J. (1985) Milestones in plant tissue culture systems for the - production secondary products. Journal of Natural Products. 48, 203-209.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Stafford, A., Morris, P. y Fowler, M. (1986). Plant cell biotechnology: a perspective. Enzyme Micro. Technology, 8, 578-586.
- Standley y Steyermark. (1987). Flora of Guatemala. Ed. Fieldiana. Botany. 4, p. 215.
- Street, E.H. (1973). Plant Tissue and Cell Culture. Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford. Edinburg Melbourne. pp. 308-335.