



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES IZTACALA**



**ESTABLECIMIENTO DE CALLOS Y CELULAS EN
SUSPENSION DE Trigonella foenum-graecum L.,
EVALUANDO LA PRODUCCION DE TRIGONELINA
Y SAPOGENINAS**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
GONZALO MOYA ESPINOZA

LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEX.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

ESTABLECIMIENTO DE CALLOS Y CELULAS EN SUSPENSION
DE *Trigonella foenum-graecum* L., EVALUANDO LA
PRODUCCION DE TRIGONELINA Y SAPOGENINAS

" ¿Porque hay que levantarse cotidianamente en las mañanas, comer, beber y luego volver a la casa?"
..."Si el individuo no piensa mucho, siente agrado al levantarse" y hacer estas cosas, porque "siente satisfacción y no piensa en cambiarlas"

"Pero sino acepta las cosas tal y como vienen, busca con ansiedad y esperanza durante el curso del día por hallar momentos de un verdadero concepto de la vida, cuyo esplendor le trae regocijo y borra la sensación del tiempo y todas las nociones que señalan el propósito de todas las cosas"

Porque la esencia de la vida del hombre sea el encuentro consigo mismo.

Adaptado de H. Hess

"Gertrude"

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología de Células Vegetales en el departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., bajo la asesoría del M en C Graciano Calva Calva y de la Q.F.B. Elvira Ríos Leal.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis con profundo agradecimiento a mi hermano José Luis Espinoza Salazar quien siempre me brindo su apoyo incondicionalmente.

Gracias

A mi madre Dolores Espinoza Salazar quien en los momentos más difíciles siempre estuvo conmigo apoyandome.

Gracias

A mis hermanos: Marta, Narciso, Juan, Pilar e Isabel que me brindaron su apoyo cuando lo necesite.

A Aida por todo lo que hemos vivido juntos.

A mis amigos por su amistad y por todos los momentos que compartimos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al M en C Graciano Calva Calva, que por su asesoría y sugerencias enriquecieron el presente trabajo y contribuyeron a mi formación; por su amistad y apoyo en aquellos momentos en que más se requería.

A la Q.F.B. Elvira Ríos Leal por su asesoría y apoyo brindado durante el desarrollo del presente trabajo.

Y a todas aquellas personas e Instituciones que de alguna manera contribuyeron a la conclusión de esta carrera que culminó con este trabajo de tesis.

CONTENIDO

	pag.
INDICE DE TABLAS.....	IX
INDICE DE FIGURAS.....	X
ABREVIATURAS.....	XII
RESUMEN.....	XIV
CAPITULOS	
1. INTRODUCCION.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Cultivo de Tejidos Vegetales.....	5
2.2 <i>Fragaria foenum-graecum</i> L. (fenogreco).....	13
3. OBJETIVOS.....	19
4. PLAN DE TRABAJO.....	21
5. MATERIALES Y METODOS.....	23
5.1 Material biológico.....	24
5.2 Preparación del material biológico.....	24
5.2.1 Desinfestación	
5.3 Medios de cultivo.....	24
5.3.1 Medio para inducción de callos	
5.3.2 Medio para establecimiento de cultivos en suspensión	
5.4 Ensayos.....	25
5.4.1 Determinación de peso fresco de callos (PF)	
5.4.2 Determinación de peso seco de callos (PS)	
5.4.3 Determinación de peso seco en cultivos en suspensión(PS)	
5.5 Técnicas analíticas.....	25
5.5.1 Equipo	

5.5.2	Determinación de trigonelina en callo y células en suspensión	
5.5.3	Determinación de sapogeninas y esteroides en callo y células en suspensión	
5.5.4	Determinación de sacarosa residual	
5.5.5	Determinación de fosfato residual	
5.5.6	Determinación de amonio y nitrato residual	
5.6	Modelo estadístico.....	28
6.	RESULTADOS.....	29
6.1	Obtención de material biológico.....	30
6.1.1	Obtención de plántulas asépticas	
6.2	Estudios con cultivos de callos.....	31
6.2.1	Efecto del balance 2,4-D/cinetina sobre la inducción y crecimiento de callos de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	
6.2.2	Efecto de los medios de cultivo MS, SH y B5 sobre la inducción y crecimiento de callos de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	
6.2.3	Efecto del tipo de explante sobre la inducción y crecimiento de callos de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	
6.2.4	Perfil de producción de trigonelina y sapogeninas en callos de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	
6.3	Estudios con cultivos de células en suspensión..	35
6.3.1	Efecto del tamaño de inóculo sobre el mantenimiento de cultivos de células en suspensión de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	
6.3.2	Efecto de los medios de cultivo MS, SH y B5 sobre el crecimiento de células en suspensión de <i>Trigonella foenum-graecum</i> L. y su producción de trigonelina y sapogeninas	

7. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.....	40
7.1 Obtención del material biológico.....	41
7.2 Estudios con cultivos de callos.....	42
7.3 Estudios con cultivos de células en suspensión..	47
8. CONCLUSIONES.....	50
9. RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIONES FUTURAS.....	53
10. TABLAS.....	55
11. FIGURAS.....	68
12. BIBLIOGRAFIA.....	84

INDICE DE TABLAS

- Tabla I. Agentes desinfectantes utilizados en cultivo de tejidos vegetales.
- Tabla II. Medios de cultivo utilizados para el cultivo de tejidos vegetales.
- Tabla III. Composición de las semillas de *Trigonella foenum-graecum* L.
- Tabla IV. Composición de ácidos grasos en aceite fijo de semillas de *Trigonella foenum-graecum* L.
- Tabla V. Composición de minerales de semillas de *Trigonella foenum-graecum* L.
- Tabla VI. Composición de aminoácidos de caseína y fenogreco (g/100 g proteína).
- Tabla VII. Sapogeninas presentes en diferentes partes de la planta de *Trigonella foenum-graecum* L.
- Tabla VIII. Compuestos obtenidos por la técnica de cultivo de tejidos de *Trigonella foenum-graecum* L.
- Tabla IX. Frecuencia de germinación (%) de semillas de *Trigonella foenum-graecum* L. a diferentes tiempos en luz y oscuridad en medio MS.
- Tabla X. Peso promedio de explantes de hipocotilo de plántulas obtenidas en diferentes intensidades de luz en medio MS.
- Tabla XI. Arreglo experimental empleado para estudiar el efecto del balance 2,4-D/cinetina sobre la inducción de tejido calloso en medio MS a partir de hipocotilo de *Trigonella foenum-graecum* L.
- Tabla XII. Parámetros cinéticos de células en suspensión de *Trigonella foenum-graecum* L. en diferentes medios de cultivo.

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Corte transversal de la semilla de *Trigonella foenum-graecum* L.
- Figura 2. Estructuras de la trigonelina, fenogrequina y diosgenina.
- Figura 3. Diagrama de flujo para la desinfestación de semillas de *Trigonella foenum-graecum* L.
- Figura 4. Diagrama de flujo para la determinación de trigonelina en callo y células en suspensión de *Trigonella foenum-graecum* L.
- Figura 5. Diagrama de flujo para la determinación de esteroides y sapogeninas en callo y células en suspensión de *Trigonella foenum-graecum* L.
- Figura 6. Influencia del balance 2,4-D/cinetina sobre la inducción y crecimiento de callos de *Trigonella foenum-graecum* L.
- Figura 7. Influencia del balance 2,4-D/cinetina sobre la inducción y crecimiento de callos de *Trigonella foenum-graecum* L.
- Figura 8. Influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento de callos de hipocotilo de *Trigonella foenum-graecum* L.
- Figura 9. Cinética de crecimiento de callos a partir de diferentes tipos de explantes de *Trigonella foenum-graecum* L. en medio MS.
- Figura 10. Cinética de crecimiento y producción de trigonelina (A), sapogeninas y esteroides (B) de callos de *Trigonella foenum-graecum* L. en medio MS.
- Figura 11. Influencia de diferentes tamaños de inóculo sobre el crecimiento de células en suspensión de *Trigonella foenum-graecum* L. en medio MS.
- Figura 12. Cinéticas de crecimiento de células en suspensión de *Trigonella foenum-graecum* L. en diferentes medios de cultivo.
- Figura 13. Distribución de trigonelina en medio y biomasa de células en suspensión de *Trigonella foenum-graecum* L. en los medios MS(A), SH(B) y B5(C).

- Figura 14. Cinética de crecimiento y producción de esteroides y saponinas de células en suspensión de *Trigonella foenum-graecum* L. en los medios MS(A), SH(B) y B5(C).
- Figura 15. Cinética de consumo de nutrientes de células en suspensión de *Trigonella foenum-graecum* L. en los medios MS(A), SH(B) y B5(C).

ABREVIATURAS

MS:	Medio Murashige & Skoog, 1962.
SH:	Medio Schenk & Hildebrandt, 1972.
B5:	Medio Gamborg, Miller & Ojima, 1968.
2,4-D:	Acido 2,4-diclorofenoxiacético.
IAA:	Acido indolacético.
NAA:	Acido naftalenacético.
IPA:	Acido indolpropiónico.
CLAR:	Cromatografía líquida de alta resolución.
CG:	Cromatografía de gases.
ml/min:	Mililitros por minuto.
atm:	Atmósferas.
hr(s):	Hora(s).
ppm:	Partes por millón.
rpm:	Revoluciones por minuto.
lux:	Iluminación en lux.
μ M:	Concentración micromolar.
μ :	Velocidad específica de crecimiento.
td:	Tiempo de duplicación.
w/w:	Peso en peso.
PF:	Peso fresco.
PS:	Peso seco.
mg PS/expl:	Miligramos de peso seco por explante.
mg PF/callo:	Miligramos de peso fresco por callo.
mg PS/callo:	Miligramos de peso seco por callo.
g/callo:	Gramos por callo.

g PS/l:	Gramos de peso seco por litro.
mg PS/ml:	Miligramos de peso seco por mililitro.
mg/g PS:	Miligramos por gramo de peso seco.
μg/g PS:	Microgramos por gramo de peso seco.
CG/EM:	Cromatografía de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas.
CLARUV-AR:	Cromatografía líquida de alta resolución con arreglo de diodos.
Creci:	Crecimiento.
B-Sit:	β -Sitosterol.
A-Sit:	α -Sitosterol.
Est:	Estigmasterol.
Dios:	Diosgenina.

RESUMEN

RESUMEN

Desde hace milenios, el reino Plantae por su gran versatilidad biosintética se ha utilizado como fuente de diversos compuestos que el hombre ha usado como fármacos, aromas, cosméticos, agroquímicos, colorantes, saborizantes, insecticidas, etc.

No obstante, su abasto y cultivo es cada vez más difícil debido a la creciente demanda de los productos naturales y a los problemas para el cultivo usando los métodos tradicionales. Las técnicas para el cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos vegetales, es actualmente una alternativa viable para la propagación de muchas variedades de plantas, obteniendo también grandes avances en la obtención de sus productos naturales.

Así, en este trabajo se estableció la metodología para crecer células de *Trigonella foenum-graecum* L. (fenogreco) *in vitro* evaluando su producción de trigonelina y sapogeninas. Esta planta es atractiva desde un punto de vista económico y de investigación en México, debido a que es importada para usarse en medicina tradicional como agente hipocolesterolémico e hipoglucemiante y en la industria alimentaria como saborizante en forma de extracto para imitar el sabor del maple. Esta planta contiene trigonelina, colina, α -sitosterol, β -sitosterol, estigmasterol, diosgenina, entre otros compuestos biológicamente activos.

Los estudios realizados con cultivos de callos indicaron que las concentraciones de 2,4-D y cinetina que soportaron bien el crecimiento fueron 13.5 μ M y 11.6 μ M, respectivamente. Cuando se estudió la influencia de los medios de cultivo, MS, SH y B5, sobre la inducción y crecimiento de callos, se observó que el crecimiento se incrementó en este orden; MS, B5 y SH, con respecto al peso fresco. En cuanto al peso seco el MS fue el que mostró mejor crecimiento, después el SH y finalmente el B5. Los resultados para el estudio de la influencia del tipo de explante sobre la inducción y crecimiento de callos, indicaron que los tres tipos de explantes, hipocotilo, cotiledón y raíz fueron capaces de formar tejido calloso. De los tres el que mostro mayor crecimiento fue el cotiledón con poco más de 1 g de PF/callos, después fueron los explantes de raíz con 332 mg PF/callos y al final los de hipocotilo con 250 mg PF/callos. Para el peso seco se presentó la misma relación que con el peso fresco: el cotiledón en primer lugar con 64.7 mg PS/callos, después los explantes de raíz con 23 mg PS/callos y finalmente el hipocotilo con 15 mg PS/callos. La cinética de crecimiento realizada con este tejido presentó la típica curva sigmoide obtenida para microorganismos; antes de los 20 días hubo un incremento en el crecimiento y otro antes de los 50. A los 48 días el crecimiento disminuyó para entrar a la fase estacionaria. La curva de producción de trigonelina mostró un pico máximo al inicio de la cinética, sin embargo, la concentración decreció en la fase exponencial, la producción máxima fue de 1,500 μ g/g PS. Los compuestos que se detectaron

cuando se realizó la cinética de producción de esteroides y sapogeninas fueron el α y β -sitosterol, estigmasterol, colesterol y diosgenina, y el que se produjo en mayor concentración fue el β -sitosterol.

Con los cultivos de células en suspensión se encontró que el inóculo que presentó un buen índice de crecimiento, así como un crecimiento adecuado fue 1.5 g PS/l. Cuando se estudió la influencia de los medios de cultivo MS, SH B5 sobre el crecimiento de células en suspensión y su producción de trigonelina y sapogeninas; las curvas de crecimiento obtenidas presentaron la sigmoide típica obtenida para microorganismos, la fase lag duró de 6-8 días y la biomasa obtenida para cada medio fue 10.43, 8.97 y 5.89 g PS/l, para MS, SH y B5, respectivamente. La máxima producción de trigonelina en biomasa en los tres medios de cultivo fue al inicio de la cinética; en el medio de cultivo el patrón de acumulación fue prácticamente constante, para los tres medios. La producción en biomasa para MS fue de 8,223 $\mu\text{g/g}$ PS, para SH de 6,874 y para B5 de 7,180. En cuanto a la curva de producción de esteroides y sapogeninas, se observó que los cultivos produjeron: α y β -sitosterol, estigmasterol y diosgenina, en general, ninguno de estos metabolitos alcanzó una concentración de un mg/l. En las curvas de consumo de nutrientes se observó que no hubo un consumo total de estos en ninguno de los tres medios de cultivo.

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

Desde hace milenios, el reino Plantae por su gran versatilidad biosintética se ha utilizado como fuente de diversos compuestos químicos que el hombre ha usado como fármacos, aromas, cosméticos, agroquímicos, colorantes, saborizantes, insecticidas, etc., (Stafford, Morris y Fowler, 1986).

Actualmente, a pesar de los avances en química orgánica, que permiten la obtención de compuestos idénticos a los producidos por las plantas, el reino Plantae continúa contribuyendo en forma importante a la industria química en general. Por ejemplo, en la industria farmacéutica, las plantas contribuyen con un 25% de todas las medicinas preescritas (Stafford, Morris y Fowler, 1986; Fowler 1981, 84; Petiard y Bariaud-Fontanel, 1985).

No obstante, el abasto de plantas, de extractos, de resinas, u órganos, se ve afectado por las condiciones climáticas, económicas y políticas del país de origen (Yeoman y col., 1980; Petiard y Bariaud-Fontanel, 1985). Es en este contexto, que la técnica de cultivo de tejidos vegetales se presenta como una alternativa viable para la obtención de esos compuestos.

Una planta atractiva, desde el punto de vista económico y de investigación, es la planta de *Trigonella foenum-graecum* L. (fenogreco) que se usa en medicina tradicional, como agente hipocolesterolémico e hipoglucemiante; en la agroindustria, como forraje y en la industria alimentaria como saborizante en forma de extracto para la imitación del sabor a maple. El valor medicinal de la planta de fenogreco, estriba en que las semillas de esta planta contienen trigonelina, diosgenina, colina, y sapogeninas, entre otras sustancias biológicamente activas (Radwan y Kokate, 1980). De estos metabolitos, la trigonelina y las sapogeninas son los que revisten mayor importancia desde el punto de vista económico y de investigación. La trigonelina

tiene importancia en estudios básicos, en bioquímica y en taxonomía, y es a este metabolito al que se le han atribuido las propiedades hipoglucemiantes de la planta. Las sapogeninas, por otro lado, son materia prima importante para la elaboración de hormonas esteroidales.

Por lo anteriormente mencionado y debido a que México importa las semillas, así como el extracto de esta planta, en este trabajo se presenta una estrategia para establecer cultivos de callos y células en suspensión, como una alternativa biotecnológica para obtener algunos de los metabolitos secundarios de interés presentes en esta planta.

2. ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1 Cultivo de Tejidos Vegetales.

Se calcula que existen de 250,000 a 750,000 especies de plantas sobre la tierra y continuamente se están descubriendo nuevas especies. De las conocidas, solamente alrededor de 2,500 han sido estudiadas con respecto a su actividad farmacológica, por lo que las posibilidades de hacer nuevos hallazgos de plantas interesantes comercialmente, debido a sus compuestos químicos, son altas. Esto se manifiesta en el hecho de que cada año se descubren alrededor de 1,500 nuevos compuestos de las que más de la tercera parte pueden tener alguna actividad biológica (Fowler, 1984).

Los compuestos provenientes de las plantas se han clasificado para su estudio, en metabolitos primarios y secundarios. Los primarios son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de la planta (Rosenthal, 1986). Por otro lado, los metabolitos secundarios son aquellos compuestos no esenciales para la sobrevivencia de las plantas (Fowler, 1984), pero que, frecuentemente tienen una función ecológica importante, muchos de ellos proveen mecanismos de defensa contra infecciones bacterianas, virales y fungales, son atrayentes de polinizadores, algunos son de gran utilidad en taxonomía vegetal, sistemática y en estudios de evolución, como marcadores quimiotaxonómicos (Vikery y Vikery, 1981).

Los metabolitos secundarios, biosintéticamente son derivados de los metabolitos primarios (Whitaker y Evans, 1987), pero su distribución está limitada, a un grupo taxonómico particular (especies, géneros o grupos de familias relacionadas estrechamente) (Balandrin y col., 1985). Los metabolitos secundarios, contrario a los primarios, tienden a ser sintetizados en células especializadas, en fases de desarrollo definidas y generalmente en bajas concentraciones. Como consecuencia, los metabolitos secundarios usados comercialmente son, normalmente, productos de alto valor agregado (Balandrin y

col., 1985).

No obstante, el abasto de plantas, sus extractos, sus resinas, u órganos, se ve afectado por las condiciones climáticas, económicas y políticas del país de origen (Yeoman y col., 1980; Petiard y Bariaud-Fontanel, 1985). Es en este contexto, que la técnica de cultivo de tejidos vegetales se presenta como una alternativa viable para la obtención de esos compuestos.

Ya desde hace mucho tiempo se sugirió que el cultivo de células y tejidos vegetales era una alternativa biotecnológica viable para la obtención de esos productos (Carew y Staba, 1965). El término cultivo de tejidos vegetales, es muy amplio y se refiere al cultivo *in vitro* de cualquier parte de la planta, ya sea como células libres, tejidos u órganos, bajo condiciones asépticas y controladas (Biondi y Thorpe, 1981).

Gamborg y Shyluk, 1981, basandose en el material vegetal usado, dividen la técnica de cultivo de tejidos en cinco clases: 1) cultivo de callos, 2) cultivo de células en suspensión, 3) cultivo de órganos, 4) cultivo de meristemos y morfogénesis, para el propósito de propagación y 5) cultivo de protoplastos.

El cultivo de tejidos vegetales se basa en el principio de totipotencia, que establece que cada célula de una planta, tiene la información genética necesaria para regular la división y la diferenciación celular para el crecimiento y desarrollo de una nueva planta (Bidwell, 1979; Burgess, 1985).

Las etapas fundamentales implicadas en la técnica son tres: 1.- la parte vegetal o explante debe ser aislada del resto del cuerpo de la planta, 2.- el explante debe ser colocado en un medio ambiente controlado, en el que, pueda expresar su potencial intrínseco o inducido y 3.- debe mantenerse en condiciones de asepsia. La mayoría de los medios de cultivo usados para cultivo de células sostienen bien el crecimiento de microorganismos y si su presencia no se previene, pueden crecer junto con las células vegetales, inhibiendo el desarrollo de las

mismas (Biondi y Thorpe, 1981; Brown y Thorpe, 1984; Constabel, 1984).

Existen diversos agentes desinfectantes que se pueden usar para el material vegetal. En la Tabla I se pueden ver las propiedades y efectividad de algunos de ellos. La selección de esta sustancia y el tiempo de exposición depende de la sensibilidad del material vegetal a ser desinfectado, ya que un agente desinfectante puede resultar letal para el tejido vegetal (Yeoman y Macleod, 1977).

La técnica de cultivo de tejidos involucra el crecimiento de callos sobre un medio semisólido. Un callo, puede definirse como una masa celular amorfa de células "indiferenciadas" y poco organizadas, obtenidas a partir de un fragmento de tejido u órgano diferenciado llamado explante. La fuente de explantes para la obtención de callos pueden ser piezas de tallo, hoja, raíz, flores o frutos (Yeoman y Macleod, 1977).

Las plantas jóvenes proveen los mejores explantes para la inducción de callo, ya que la fase juvenil se caracteriza por un desarrollo vegetativo vigoroso y ausencia de estructuras reproductivas. Las plantas más viejas tienen el problema de ser fisiológicamente maduras y tener a veces mayor contenido sistémico de microorganismos (Seabrook, 1980).

Durante la inducción de un callo, no todas las células de un explante responden de igual forma a los estímulos externos, solamente las células de las regiones externas del tejido son inducidas para dividirse y esto da como resultado una capa periférica que se divide activamente rodeando un núcleo de células o tejido que no se divide (Aitchison y col., 1977; Gamburg y Shyluk, 1981). Una diferencia morfológica importante en los callos, es su grado de disgregación. Algunos callos son duros y compactos, otros son fácilmente disgregables, éste tipo de callos, es el más adecuado para la obtención de un cultivo de células en suspensión (Aitchison y col., 1977).

Para el mantenimiento de un cultivo de callos, es necesario

subcultivarlos periódicamente. Las partes que se subcultivan deben ser visiblemente saludables, es decir, que no muestren señales de envejecimiento o necrosamiento. La vejez de un callo puede deberse a varios factores: 1) agotamiento de nutrientes, 2) inhibición de la difusión de nutrientes, 3) evaporación de agua acompañada por un incremento en la concentración de algunos constituyentes del medio y 4) acumulación de metabolitos, algunos de los cuales, pueden ser tóxicos (Constabel, 1984).

Dado que solo una parte del callo esta en contacto con el medio nutritivo, esto ocasiona desigualdades en el crecimiento y como consecuencia de esto se establecen gradientes de nutrientes entre el callo y el medio. También pueden formarse gradientes en el intercambio gaseoso y gradientes de productos de desecho (Yeoman y Macleod, 1977). A pesar de estas limitaciones, el callo sigue siendo adecuado para própositos de mantenimiento de líneas celulares y regeneración (Gamborg y Shyluk, 1981).

Las razones para obtener cultivos de células en suspensión usualmente incluyen el querer producir rápidamente cantidades grandes de material celular, muestrear una población celular homogénea, o simplemente para examinar cuantitativamente el crecimiento y/o producción de metabolitos secundarios en un cultivo homogéneo (King, 1984).

Aunque tales cultivos generalmente se inician pasando porciones de un callo disgregable a un medio líquido con agitación, también se han obtenido a partir de explantes puestos en medio líquido (Street, 1977). Los cultivos de células en suspensión se usan ampliamente como modelo para el estudio de rutas del metabolismo secundario, inducción de enzimas y expresión genética, como una fuente de material para la purificación de enzimas y para la producción de metabolitos secundarios (Dixon, 1985).

Un aspecto importante en los cultivos de células en suspensión es el tipo de agitación. Las velocidades de agitación sobre agitadores orbitales cae en un rango de 30-150 rpm. El

movimiento del medio líquido originado por la agitación sirve para mantener las células y agregados celulares uniformemente distribuidos y promover adecuadamente el intercambio gaseoso (Street, 1977).

Cuando se inicia un cultivo de células en suspensión a partir de porciones de un callo, es recomendable que el inóculo inicial sea grande para asegurar de esta forma la proliferación del cultivo. Los cultivos de células en suspensión requieren subcultivo regular a intervalos más frecuentes que los cultivos de callos de los cuales ellos se derivaron (Dixon, 1985). Para cada cultivo de células hay un tamaño de inóculo mínimo abajo del cual el cultivo no crece. Un inóculo correspondiente a 0.5-1.5 mg PS/ml, generalmente es suficiente (Gamborg y Shyluk, 1981).

Cuando las células se subcultivan en medio fresco, muestran las fases típicas de un ciclo de crecimiento microbiano. El crecimiento de un cultivo de células en suspensión se puede seguir, midiendo uno o más de los siguientes parámetros (Dixon, 1985):

- 1) Volumen celular empacado (paquete celular).
- 2) Número de células.
- 3) Peso fresco y seco.
- 4) Contenido de proteína y/o DNA.
- 5) Conductividad del medio.
- 6) Viabilidad celular.

Un factor importante en el éxito que se tenga en la aplicación de cultivo de tejidos y células vegetales, es el medio de cultivo. Los componentes del medio para el crecimiento de callos y células en suspensión pueden clasificarse en seis grupos, de acuerdo a la preparación de soluciones "stock":

- 1) Nutrientes inorgánicos.
- 2) Elementos traza.
- 3) Fuente de Hierro.
- 4) Vitaminas.
- 5) Fuente de carbono.
- 6) Reguladores del crecimiento vegetal.

Los nutrientes inorgánicos de un cultivo de células vegetales son los mismos requeridos por la planta en condiciones naturales. Las concentraciones óptimas de cada uno, varía considerablemente para cada especie o variedad vegetal.

Algunas fuentes de nitrógeno utilizadas para el crecimiento son: NO_3^- , NH_4^+ , urea, glutamina e hidrolizado de caseína.

El potasio se requiere en concentraciones de 20 mM o más y es generalmente abastecido junto con el nitrato o como cloruro (Gamborg y Shyluk, 1981).

Las concentraciones de P, Ca, S y Mg, para el crecimiento celular varían de 1 a 3 mM.

Los nutrientes esenciales, requeridos en concentraciones micromolares incluyen: Fe, Mn, Zn, B, Cu y Mo. El fierro y algunas veces el Zn son abastecidos en forma de complejo.

Los medios para cultivo de tejidos vegetales, de uso general, contienen vitaminas del grupo B, por ejemplo, tiamina, ácido nicotínico, piridoxina y ácido pantoténico. La Tabla II muestra las vitaminas empleadas en diferentes medios de cultivo.

La fuente de carbono más usada es la sacarosa y la glucosa. Otros carbohidratos utilizados son la lactosa, maltosa, galactosa y almidón. La sacarosa generalmente se usa en concentraciones de 2 a 3%. La mayoría de los medios contienen también mioinositol, aunque no se ha demostrado un requerimiento absoluto de este compuesto, la inclusión en el medio de cultivo de 100 mg/l ha mejorado el crecimiento en algunos casos (Gamborg y Shyluk, 1981).

Los reguladores del crecimiento vegetal, actúan para coordinar los procesos que conducen al desarrollo normal de la planta. El crecimiento, como la diferenciación de tejidos y

células, así como el metabolismo secundario, esta influenciado por estos compuestos, que se pueden dividir en los siguientes grupos: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. De estos, las auxinas y las citocininas son de especial importancia en cultivo de tejidos vegetales. Una característica de las auxinas es la de inducir la elongación celular (Gamborg, 1984). La auxina producida naturalmente es el ácido indolacético (IAA), que se usa en concentraciones de 10^{-5} a 10^{-10} M. Dentro de las auxinas sintéticas usadas en cultivo de tejidos, está el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Otros compuestos con actividad de auxina son: el ácido indol-3-butírico (IBA) y el ácido p-clorofenoxiacético. La auxina más utilizada es el 2,4-D y en muchos casos es activo en concentraciones de 10^{-5} a 10^{-7} M (Seabrook, 1980).

Las citocininas son derivados de la adenina. Las más frecuentemente usadas son la cinetina, benziladenina (BA), zeatina e isopentiladenina (IPA).

Otro grupo de reguladores del crecimiento son las giberelinas, muy utilizadas en la regeneración de plantas, después de la formación de primordios (Gamborg, 1984).


Algunas veces se incluyen en los medios de cultivo complejos naturales de composición indefinida. Ejemplos de estos son los siguientes:

COMPLEJO	CANTIDAD
Pulpa de plátano	150 g/l
Endospermo de coco	10 a 20%
Emulsión de pescado	1 cu/l
Extracto de malta	500 mg/l
Jugo de naranja	3 a 30%
Hidrolizados proteícos (caseína, lactoalbumina, peptona y triptona)	3 a 30%
Jugo de tomate	30%
Extracto de levadura	50 a 5000 mg/l

Fuente: Merino, 1987.

Los hidrolizados proteicos se emplean principalmente como fuente de aminoácidos. El jugo de naranja contribuye con el ácido cítrico. La pulpa de plátano y la emulsión de pescado se usan principalmente en los medios para cultivo de orquídeas, mientras que el endospermo de coco, extracto de levadura y extracto de malta tienen un uso más general.

Se han llevado a cabo muchas investigaciones con el fin de encontrar medios que satisfagan las necesidades de diferentes plantas, esto ha originado la formulación de varias mezclas de sales, en la Tabla II se dan algunos ejemplos de ellas.

El pH del medio de cultivo generalmente se ajusta de 5.0 a 6.0 previo a la adición de agar y a la esterilización. 

Las aplicaciones de la técnica de cultivo de tejidos son diversas. En la agricultura, por ejemplo, esta técnica puede ser aplicada en: a) propagación de plantas en peligro de extinción o de plantas económicamente valiosas, b) producción comercial de plantas libres de virus, producción de nuevas variedades genéticas y preservación de germoplasma. También muy a menudo, la técnica se usa como un modelo, para investigar problemas fisiológicos, bioquímicos, genéticos y estructurales relacionados a las plantas y en general, como una herramienta de gran valor en investigación básica y aplicada (Biondi y Thorpe, 1981).

Otra aplicación importante del cultivo de tejidos vegetales, es en la producción de sustancias económicamente importantes. Los cultivos de tejidos vegetales pueden manipularse adecuadamente para que ciertas sustancias puedan extraerse de la biomasa o del medio en el cual se crecen (Seabrook, 1980). Algunas ventajas que ofrecen los sistemas de cultivo de tejidos vegetales, con respecto a la producción de metabolitos secundarios, sobre el cultivo convencional de plantas, son las siguientes: a) los compuestos útiles pueden producirse en condiciones medioambientales controladas, b) las células están libres de microorganismos y c) pueden producir

metabolitos específicos con un control automatizado del crecimiento y una regulación racional de los procesos metabólicos. Esto puede contribuir, a la reducción de costos y al mejoramiento de la productividad (Tabata, 1977).

2.2 *Trigonella foenum-graecum* L. (fenogreco).

La planta de *Trigonella foenum-graecum* L., conocida comunmente como "fenogreco", "methy", "helba" o "alholva", es una herbácea anual, originaria al Oeste de Asia, crece y se distribuye principalmente en la parte oriental de la región del Mediterráneo, extendiéndose desde el centro al norte de Europa, Norte de Africa y partes templadas de Asia, donde crece en forma silvestre (Agarwal y Gupta, 1983, Fazli y Hardman, 1971 y Casamada, 1977).

En América, se ha reportado que el fenogreco sólo crece en Argentina y E.U.A., en éste último crece en las partes templadas de California, en huertos (Santos, Dos y col., 1983). Los principales países exportadores de fenogreco son India, Francia, Líbano, Egipto y Argentina (Sankarikutty y col., 1978).

El fenogreco, pertenece a la familia Leguminosae (Fabacea), subfamilia Papilionaseae. El género *Trigonella* pertenece a la tribu Trifolieae y esta representado por cerca de 100 especies (Agarwal y Gupta, 1983).

Esta herbácea robusta tiene hojas verde encendido, es de 30-60 cms de alto y produce vainas puntiagudas y delgadas de 10-15 cms de largo. Cada vaina contiene de 10-20 semillas, duras de color amarillo-café, las cuales son lisas y oblongas, alrededor de 5 mm de largo, cada una es estriada, lo cual da una apariencia de gancho. El fenogreco crece mejor en suelos bien drenados, en climas templados con una precipitación pluvial de 20-60 pulgadas. Las semillas son poliédricas, de forma irregular, cuadrangulares y trapezoidales. Recubiertas por un tegumento de color variable, de amarillo a pardo. Pequeña

depresión central, conteniendo el hilo y el micrópilo. Tienen un surco profundo que divide la semilla en dos porciones desiguales (Wallis, 1960 y Casamada, 1977). En corte transversal del exterior al interior, la semilla presenta: a) células tegumentarias, espermodermo de tres series: la externa, esclerosada tipo empalizada, la media, compuesta por células cortas de forma de base de columna y la interna, de células poliédricas rectangulares de fuerte membrana; b) endospermo de células de paredes gruesas con grasa y aleúrona, capa de glúten y debajo, células de cavidad grande, cuyas paredes están transformadas casi íntegramente en mucilago; c) los cotiledones, de células pequeñas irregulares, con grasa, aleúrona y fécula, figura 1 (Casamada, 1977).

Los usos que se le dan a la planta son diversos y se pueden agrupar como medicinales y alimenticios. En cuanto a los medicinales, se usa en cólicos, hinchazones, disenteria, diarrea, tos crónica, ensanchamiento de hígado y bazo, útil en el tratamiento de la hidropesía y en la caída de pelo (Varshney y Sharma, 1966 y Shankaracharya y Natarajan, 1972). Además se ha encontrado que tanto las semillas como las hojas tienen efectos hipoglucemiantes e hipocolesterolémicos (Singhal y col., 1982; Madar, 1984 y Sharma, 1986).

En cuanto a su uso en alimentos, las hojas se usan como legumbre y acompañadas de las semillas se incluyen en platos vegetarianos. En la práctica culinaria, el fenogreco se usa para sazónamiento, para hacer el "curry" y para dar sabor a los alimentos (Sharma, 1984). El extracto de las semillas de fenogreco se usa para la imitación del sabor de maple, muy útil en composiciones de vainilla, ron, confite o jarabe de azúcar y mantequilla, regaliz (oruzuz y alcazuz), encurtidos y condimentos para quesos (Arctander, 1960 y Merory, 1968). El extracto de fenogreco también se usa en: bebidas no alcohólicas y alcohólicas, helados, dulces, gelatinas y budines, goma de mascar, jarabes y carnes (Furia y Bellanca, 1975). La oleoresina

de fenogreco se usa en: bebidas no alcohólicas, helados, dulces, gelatinas, budines y jarabes.

La semilla fresca es inodora y tiene un sabor agrio, en cambio las semillas maduras tienen un aroma fuerte, agradable y se asemeja al aroma del azúcar quemada, las semillas molidas liberan un aroma dulce intenso (Arctander, 1960). La producción anual de semilla de fenogreco es de miles de toneladas, pero solamente una fracción pequeña se usa en perfumes y sabores (Arctander, 1960).

El análisis bromatológico de las semillas se puede ver en la Tabla III, la composición de ácidos grasos en la Tabla IV y la composición de minerales en la Tabla V. Esta leguminosa es tan rica en proteínas (26 %) como el frijol de soya (30 %), y tiene una proporción baja de lisina/arginina (Sharma, 1984). El fenogreco, como otras leguminosas, es rico en arginina, alanina y glicina, pero pobre en contenido de lisina en comparación con caseína (Tabla VI).

El mucilago de fenogreco, es rico en manosa, menos en galactosa y pobre en xilosa, su viscosidad relativa es de 13.7 centipoises, valor que se puede considerar relativamente alto. Su viscosidad lo hace buen agente emulsificante para ser usado en industrias farmacéuticas y alimentarias. Resulta ventajoso, también, debido a sus propiedades neutras, que lo hacen compatible con muchos fármacos o compuestos sensibles a ácidos (Karawya y col., 1980).

Otros compuestos de importancia considerable para la industria farmacéutica, presentes en semillas, tallos y hojas de fenogreco son las sapogeninas, estas se encuentran unidas glucosídicamente. Son precursores de fármacos esteroidales, incluyendo corticosteroides y anticonceptivos (Saunders y col., 1986). En la Tabla VII se presenta un resumen de la distribución de sapogeninas presentes en diferentes partes de la planta de fenogreco. Las principales, obtenidas por hidrólisis ácida de las semillas de fenogreco, son la diosgenina y su epímero

yamogenina, en una proporción 3:2 (Cornish y col., 1983). la semilla de fenogreco puede producir de 1-1.5% de diosgenina (w/w) (Saunders y col., 1986). Ensayos para diosgenina en diferentes variedades de semillas de fenogreco, muestran que el contenido de este compuesto varía de acuerdo al lugar de origen y que aunque la diosgenina puede obtenerse de semillas de fenogreco, la explotación comercial de estas resulta incosteable (Bakshi y Hamied, 1971).

Un compuesto relacionado con las sapogeninas es el compuesto conocido como "fenogrequina", que es un complejo sapogenina-péptido, al que se le han atribuido actividades farmacológicas significativas que incluyen acciones cardiovasculares, diuréticas y antiflogísticas (Ghosal y col., 1974) (figura 2).

Otro compuesto que se ha aislado de fenogreco es el alcaloide trigonelina (figura 2). Este alcaloide es interesante no sólo desde el punto de vista terapéutico, sino también debido a su significancia en estudios básicos de bioquímica y taxonomía (Radwan y Kokate, 1980 y Martidale, 1982). Siendo un derivado del ácido nicotínico, se considera un producto de detoxificación de las células (Radwan y Kokate, 1980) y puede servir como una forma de almacenamiento del ácido nicotínico (Antony y col., 1975).

La exclusiva ocurrencia de trigonelina y/o ácido N-L-arabinosido en cultivos de células de plantas superiores se ha sugerido como un criterio quimiosistemático para identificación a nivel de subclase y orden, por ejemplo, el arabinosido solamente se encontró en cultivos de células de la subclase Asteridae y en ordenes superiores de la subclase Rosidae y Dilleniidae, mientras todos los cultivos de células pertenecientes a las Dicotiledoneas, las Monocotiledoneas y las Gimnospermas formaron trigonelina (Willeke y col., 1979).

La trigonelina también se ha detectado en muchas otras plantas y animales.

El fenogreco también contiene un aminoácido en forma libre identificado como 4-hidroxiisoleucina. Este se ha propuesto como un posible precursor del componente saborizante característico de fenogreco y representa aproximadamente el 80% de los aminoácidos libres de las semillas secas (Sauvaire y col., 1984). En una fracción con sabor típico, obtenida por extracción con solventes, se identificó un compuesto dominante y característico como 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona, éste compuesto presentó el aroma característico de las semillas de fenogreco, cuando se diluyó (Girardon y col., 1986).

Algunos de los compuestos anteriormente mencionados que la planta produce en condiciones naturales, también se han obtenido por la técnica de cultivo de tejidos vegetales. Estos compuestos incluyen sapogeninas (Brain y Lockwood, 1976, Hardman y Stevens, 1978, Jain y col., 1977, Khana y Jain, 1973 y Khanna y col., 1975), trigonelina (Radwan y Kokate, 1980 y Antony y col., 1975) y mucilago (Kokate y Radwan, 1979). La Tabla VIII presenta en más detalle los compuestos obtenidos en callos y células en suspensión.

Algunos aspectos de investigación *in vitro* relacionados con la producción de sapogeninas por *Friqonella foenum-graecum* L. incluyen, tanto cultivo de callos como células en suspensión. Un trabajo al respecto es el de Khanna y Jain, 1973; en este trabajo se aisló e identificó diosgenina, gitogenina y tigogenina, así como los esteroides β -sitosterol y estigmasterol. De estos compuestos el que se produjo en mayor cantidad fue la diosgenina, con un 1.82%, continuando con ese trabajo Khanna y col., 1975; estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de colesterol, sobre la producción de sapogeninas en cultivos en suspensión de *Friqonella foenum-graecum* L., encontrando que el colesterol estimuló la producción de sapogeninas, aumentandola de 1.82 a 2.23%. En otro trabajo Brain y Lockwood, 1976, estudiaron el efecto del 2,4-D, cinetina y agua de coco, sobre la producción de esteroides y sapogeninas en callos y células en

suspensión. En general, tanto la cinetina como el agua de coco, estimularon el crecimiento pero no la producción.

La trigonelina, se ha usado en estudios de quimiosistemática (Willeke y col., 1979). Dichos estudios consistieron en "alimentar" células en suspensión con ácido nicotínico marcado (compuesto precursor de la trigonelina y del arabinosido) para formar trigonelina o arabinosido, dependiendo a la subclase que perteneciera el grupo vegetal. Otro estudio, enfocado exclusivamente a la producción de trigonelina por cultivo de células fue el de Radwan y Kokate, 1980. En éste, se investigó el efecto de diferentes reguladores del crecimiento, así como, el tipo y edad del cultivo y el efecto de precursores, sobre la producción de trigonelina. Los resultados obtenidos mostraron que los callos produjeron 3 a 4 veces más trigonelina que las semillas y de 12 a 18 veces más que las raíces y brotes de esta planta y los cultivos en suspensión produjeron aproximadamente el doble de trigonelina que los callos.

Por último, se tiene un trabajo en el que se estudió la producción de mucilago por cultivo de callos (Kokate y Radwan, 1979). En este trabajo los cultivos de callos de *Trigonella foenum-graecum* L., fueron capaces de producir un 21.2%, las semillas un 20.3 y las plántulas un 10.8%.

De acuerdo a los antecedentes antes mencionados, y debido a que México importa las semillas, así como el extracto de esta planta, en este trabajo se presenta una estrategia para establecer cultivos de callos y células en suspensión, como una alternativa biotecnológica para obtener algunos de los metabolitos secundarios de interés presentes en esta planta.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

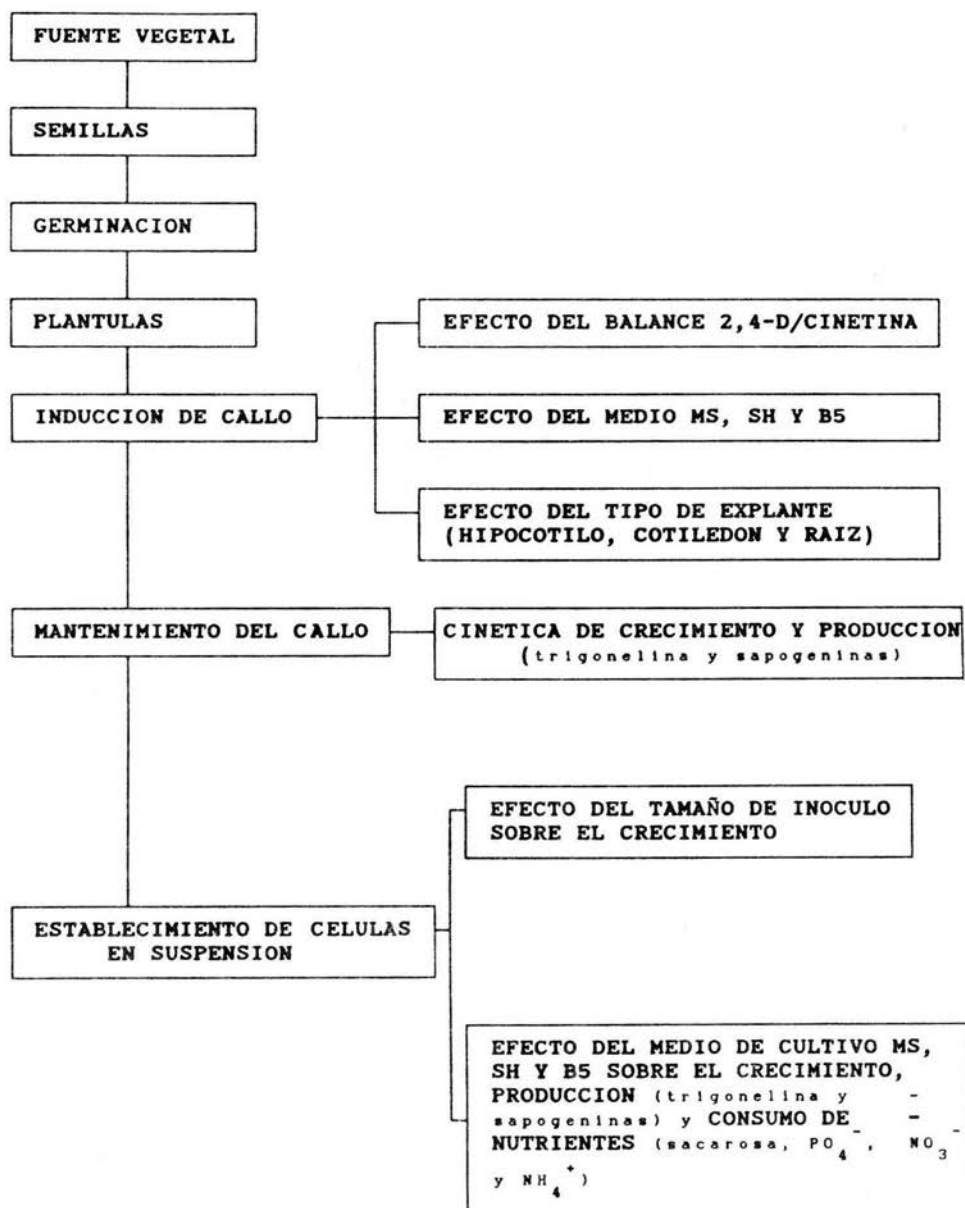
ESTABLECER LOS CULTIVOS DE CALLOS Y CELULAS EN SUSPENSION
DE *Trigonella foenum-graecum* L. EVALUANDO
LA PRODUCCION DE TRIGONELINA
Y SAPOGENINAS

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) ESTABLECER LOS CULTIVOS DE CALLOS Y CELULAS EN SUSPENSION
- 2) ESTABLECER LOS METODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION DE TRIGONELINA Y SAPOGENINAS EN CALLOS Y CELULAS EN SUSPENSION
- 3) ESTUDIAR LAS CINETICAS DE CRECIMIENTO DE CALLOS Y CELULAS EN SUSPENSION Y SU PRODUCCION DE TRIGONELINA Y SAPOGENINAS

4. PLAN DE TRABAJO

4. PLAN DE TRABAJO



5. MATERIALES Y METODOS

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Material biológico.

Fueron plántulas de *Trigonella foenum-graecum* L. (fenogreco) que se obtuvieron a partir de semillas desinfestadas, que se germinaron en 25 ml de medio Murashige & Skoog (MS), suplementado con 1.6 g/l de "gel-rite" y 30 g/l de sacarosa, en frascos de 125 ml e incubados a 27 ± 1 °C en oscuridad. Las plántulas se crecieron por 10 días, y se utilizaron como fuente de explantes para la inducción de callo.

5.2 Preparación del material biológico.

5.2.1 Desinfestación.

Las semillas se sumergieron en agua destilada, por 30 minutos, posteriormente en H_2SO_4 0.5 N, por 30 minutos. Se lavaron 3 veces con H_2O destilada estéril y se colocaron en etanol al 70% por 30 segundos, luego se lavaron 3 veces con H_2O destilada estéril y finalmente se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 5% más 3 gotas de "Tween-20" por 20 minutos y se lavaron 5 veces con agua destilada estéril (figura 3). Las semillas, así desinfestadas, se incubaron para su germinación como se indicó en el punto 5.1.

5.3 Medios de cultivo.

5.3.1 Medio para inducción de callos.

Se usó el medio MS suplementado con 1.6 g/l de "gel-rite", 30 g/l de sacarosa y diferentes concentraciones de 2,4-D y cinetina según el diseño factorial de la Tabla XI.

5.3.2 Medio para establecimiento de cultivos en suspensión.

Fue el medio MS suplementado con 30 g/l de sacarosa más $13.5 \mu M$ de 2,4-D y $11.6 \mu M$ de cinetina.

5.4 Ensayos.

5.4.1 Determinación de peso fresco de callos (PF).

Se determinó por triplicado y calculando el promedio de la biomasa de un callo pesado inmediatamente después del muestreo en charolas de aluminio previamente llevadas a peso constante en una estufa de vacío a 0.5 atm por 24 hrs y a 65 °C. La diferencia entre el peso de la charola y el de la misma con la biomasa correspondió al peso fresco del callo.

5.4.2 Determinación de peso seco de callos (PS).

Las charolas en las que se determinó el peso fresco de los callos se llevaron a peso constante como se describió en 5.4.1. La diferencia entre los pesos constantes de las charolas más la biomasa y de las charolas, constituyó el peso seco de los callos.

5.4.3 Determinación de peso seco en cultivos en suspensión (PS).

Se llevó a cabo por triplicado filtrando un volumen conocido de cultivo con un embudo "Buchner" y un papel filtro Whatman No 4 previamente puesto a peso constante a 65 °C y 0.5 atm de vacío. El papel filtro más la biomasa se llevó a peso constante bajo las mismas condiciones. El peso seco se calculó como el promedio de las tres evaluaciones y la diferencia entre el peso de la biomasa más el papel, menos el peso del papel puesto a peso constante.

5.5 Técnicas Analíticas.

5.5.1 Equipo.

Equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).

Se usó un equipo Tracor 970A, acoplado a un detector U.V. de longitud de onda variable. El integrador fue un Hewlett Packard 3392A; integrado por una bomba LDC Analytical Constametric 3200.

Equipo de Cromatografía de Gases (CG).

Se usó un equipo Hewlett Packard 5710A acoplado a un detector de ionización de flama y a un integrador Hewlett Packard 3392A.

Espectrofotómetro

Se usó un equipo Perkin Elmer Lambda 3A UV/VIS.

5.5.2 Determinación de trigonelina en callo y células en suspensión.

El método de extracción que se utilizó para trigonelina fue una modificación al propuesto por Trugo y col., 1983. La biomasa seca, correspondiente a un cultivo (callo o suspensión) se maceró en un mortero y se colocó en 20 ml de agua destilada a 80 °C por 30 minutos. La mezcla obtenida se filtró sobre papel Whatman No 1, después se pasó por un cartucho "Sep-Pak", el líquido recuperado se aforó a 10 ml con agua desionizada, de ahí se tomó 1 ml y nuevamente se aforó a 10 ml con agua desionizada. De esta dilución se tomaron muestras de 20 µl para su análisis por CLAR. La fase móvil consistió de una mezcla de metanol-"buffer" de citrato de potasio pH 4, 60:40 con un flujo de 0.2ml/min. Se utilizó una columna supelcosil C18, a 45 °C con un detector UV a una longitud de onda de 265 nm (figura 4). Para la determinación de trigonelina en el medio de cultivo líquido, se tomo 1 ml del medio y se aforó a 10 ml con agua desionizada y se procedió a analizar las muestras por CLAR, bajo las condiciones de análisis anteriormente descritas.

5.5.3 Determinación de sapogeninas y esteroides en callo y células en suspensión.

A la biomasa seca de un cultivo se le adicionaron 40 ml de KOH 0.5 N preparada en metanol y se calentó a 68 °C hasta sequedad. El residuo se resuspendió en una mezcla de éter etílico-éter de petróleo 50:50, se filtró y el filtrado se evaporó a sequedad a temperatura ambiente. El residuo se aforó con cloroformo a 0.1 ml de los cuales se tomaron 5 µl para inyectarlos en un Cromatógrafo de Gases (CG). Se utilizó un cromatógrafo con detector de ionización de flama, empleando como gas acarreador nitrógeno a un flujo de 30 ml/min. La columna empleada fue la OV17-3% en Cromosorb W 80/100 M, a 270 °C. Las temperaturas del detector y del inyector fueron 350 y 300 °C, respectivamente (figura 5).

5.5.4 Determinación de sacarosa residual.

Fue el reportado por Loewis, F.A., 1952. Se utilizaron 3 µl de medio de cultivo y las muestras se leyeron a 620 nm. Para determinar la concentración de sacarosa se realizó una curva patrón con sacarosa grado reactivo (Merck) en un rango de 0-150 µg.

5.5.5 Determinación de fosfato residual.

Se usó el método de Berenblum y Chain, reportado por Lindeverg y Ernst L., 1957. Se usó 1 ml de medio de cultivo. Las muestras, se leyeron en un espectrofotómetro a 724 nm. Para la determinación de la concentración de fosfato, se realizó una curva patrón en el rango de 0-25 µg.

5.5.6 Determinación de amonio y nitrato residuales.

Se usó el método de la aleación de Devarda, publicado por Bremer, J.M., 1965. Se usaron 2 ml de medio de cultivo y se diluyó con agua desionizada a 10 ml. Como recipiente de reacción, se utilizó un matraz bola de 125 ml, acoplado a un sistema de destilación por arrastre de vapor y un embudo para la adición de la aleación.

5.6 Modelo estadístico

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

($i=1,2,\dots,a$; $j=1,2,\dots,b$; $k=1,2,\dots,k$)

donde:

Y_{ijk} = Valor de la K -ésima observación para el i -ésimo nivel de A y el j -ésimo nivel de B.

μ = Media general o gran media.

α_i = Efecto medio del i -ésimo nivel debido al factor auxina.

β_j = Efecto medio del j -ésimo nivel debido al factor citocinina.

γ_{ij} = Efecto medio del i -ésimo nivel de auxina/ j -ésimo nivel de citocinina debido al factor de interacción auxina/citocinina.

ϵ_{ijk} = Error experimental (variación debida al azar).

i = niveles de auxina ($i=1,2,\dots,I$) donde $I=5$.

j = niveles de citocinina ($j=1,2,\dots,J$) donde $J=4$.

k = K -ésima replica ($K=1,2,\dots,r$) donde $r=3$.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de material biológico.

6.1.1 Obtención de plántulas asépticas.

La metodología utilizada, para desinfectar las semillas de *Trigonella foenum-graecum* L. (fenogreco), se muestra en la figura 3. De 20 frascos de cultivo con 5 semillas cada uno, sólo 4 se contaminaron y la frecuencia de germinación fue del 89%. Los frascos se dejaron incubando para la obtención de plántulas asépticas en condiciones de luz y oscuridad, por un tiempo total de 10 días, registrando periódicamente la frecuencia de germinación en ambas condiciones (Tabla IX). El factor luz-oscuridad no tuvo influencia sobre la germinación, sin embargo, hubo diferencias en cuanto a coloración y tamaño de las plántulas. Las obtenidas en luz fueron completamente verdes y relativamente pequeñas, en contraste, las que crecieron en oscuridad fueron más altas y mostraron hipocotilos hialinos y cotiledones ligeramente pigmentados. En otro experimento en relación con esto, se determinó el peso promedio de explantes de hipocotilo de aproximadamente 1 cm de tamaño obtenidos de plántulas germinadas en diferentes intensidades luminosas. Las intensidades, así como los pesos promedios por explante en cada una de ellas se presentan en la Tabla X. Como se puede apreciar, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los explantes obtenidos a diferentes intensidades luminosas.

En base a estos resultados, se decidió seguir propagando plántulas para posteriores experimentos en oscuridad, dado que el número de explantes de hipocotilo por planta fue mayor bajo estas condiciones.

6.2 Estudios con cultivos de callos.

6.2.1 Efecto del balance 2,4-D/cinetina sobre la inducción y crecimiento de callos de *Trigonella foenum-graecum* L.

Para este experimento se usaron explantes de hipocotilo de 10 mm de longitud, que se colocaron en frascos de cultivo (3 por frasco) de 125 ml con 25 ml de medio MS, suplementado con las combinaciones de 2,4-D y cinetina indicadas en la matriz de la Tabla XI. Los tratamientos se realizaron aleatoriamente y por triplicado. A los 31 días de iniciado el experimento se sacaron los callos obtenidos y se les determinó peso fresco y seco.

Los resultados de este estudio se pueden observar en la figura 6, donde se muestran las superficies de respuesta obtenidas con el PF(A) y con el PS(B). Como se puede apreciar en estas figuras, cuando no se usó ningún regulador, el crecimiento fue pobre, la misma situación se presentó cuando sólo se usó 2,4-D o cinetina individualmente. Sin embargo, cuando ambos reguladores se combinaron el crecimiento se incrementó notablemente con un pico máximo alrededor de 11 μM de cinetina con 11-13 μM de 2,4-D, tanto para el peso fresco, como para el peso seco. Para estudiar concentraciones de 2,4-D y cinetina alrededor de ese pico se realizó otro experimento usando un diseño factorial de 5x5 donde los niveles de 2,4-D fueron: 4.5, 9, 13.5, 18 y 22.5 y los de cinetina; 2.32, 6.96, 11.6, 16.24 y 20.88 μM de reguladores del crecimiento. Los resultados de crecimiento, evaluados como peso fresco y seco se muestran en la figura 7. En la figura 7A de peso fresco, se observa que a concentraciones mayores de 11 μM de cinetina y 10 μM de 2,4-D el crecimiento aumentó y hubo un pico máximo de crecimiento a concentraciones entre 15-20 μM de cinetina y 20 μM de 2,4-D. En cuanto al peso seco si bien no se observó una tendencia clara hacia donde estaba el mejor crecimiento, vemos que al igual que en la gráfica de peso fresco, en las concentraciones más altas de cinetina y 2,4-D hubo buen crecimiento. En este estudio se

repiteieron los resultados mostrados en la figura 6 con respecto a que nuevamente hubo un pico máximo alrededor de 11 μM de cinetina con 11-13 μM de 2,4-D. El análisis estadístico de los datos de ambos experimentos indicaron que tanto el 2,4-D como la cinetina, así como la interacción entre ellos, tuvieron efectos significativos en el crecimiento. Debido a ello, y en base a las superficies de respuesta, se decidió seleccionar como niveles de trabajo, para los siguientes experimentos 13.5 μM de 2,4-D y 11.6 μM de cinetina, que fue donde se obtuvo el máximo crecimiento.

6.2.2 Efecto de los medios de cultivo MS, SH y B5 sobre la inducción y crecimiento de callos de *Trigonella foenum-graecum* L.

Para este experimento se tomaron explantes de hipocotilo de 10 mm de longitud, obtenidos de plántulas asépticas de 10 días de edad y se colocaron en frascos de cultivo de 125 ml con 25 ml de medio MS, SH o B5 suplementados con 13.5 μM de 2,4-D y 11.6 μM de cinetina más 30 g/l de sacarosa. A los 33 días después de inocular los cultivos, se tomaron los callos completos y se les determinó peso fresco y seco, para cada medio de cultivo. Los resultados se presentan en la figura 8, e indican que en cuanto al peso fresco el mayor crecimiento fue en el medio B5 después en el SH y finalmente en el MS. En cambio, con el peso seco, la respuesta fue totalmente opuesta, aunque con esta variable de respuesta la diferencia en el crecimiento no fue estadísticamente significativa. Es interesante hacer notar que los callos inducidos en los medios SH y B5 acumularon mayor cantidad de agua que los del MS.

6.2.3 Efecto del tipo de explante sobre la inducción y crecimiento de callos de *Trigonella foenum-graecum* L.

Se utilizaron explantes de hipocotilo, cotiledón y raíz, de plántulas de 16 días de edad, crecidas en condiciones de oscuridad. Los explantes se inocularon en frascos de cultivo de 125 ml con 25 ml de medio MS, suplementado con 13.5 μM de 2,4-D y 11.6 μM de cinetina más 30 g/l de sacarosa. Cada 4 días se tomaron 3 frascos de cada tipo de explante y se les determinó peso fresco y seco durante un ciclo de crecimiento. Los explantes de hipocotilo al inicio del experimento, tuvieron un peso fresco de 27 mg y 1.5 mg de peso seco; los de cotiledón, un cotiledón completo, tuvo un peso fresco promedio de 10 mg y 1.4 mg de peso seco y finalmente los de raíz tuvieron un peso fresco de 52 mg y un peso seco de 3.3 mg. Los valores indicados representan la media de 10 explantes.

Los resultados de peso fresco y seco de las cinéticas de inducción de callos a partir de esos explantes (figura 9) indicaron que, en general, el cotiledón fue el que presentó mayor crecimiento. Sin embargo, desde el inicio del cultivo hasta aproximadamente los 14 días no hubo diferencias considerables en el crecimiento entre los tres tipos de explantes. No obstante, el cotiledón a partir de los 14 días incrementó su crecimiento hasta los 21 días, a partir de aquí hubo una serie de fluctuaciones hasta los 32 días después de las cuales, el crecimiento volvió a incrementarse hasta alcanzar poco más de 1 g de peso fresco por callo. Después del cotiledón, fueron los explantes de raíz los que mostraron un crecimiento considerable con 332 mg PF/callos y al final los provenientes de hipocotilo con 250 mg PF/callos. En cuanto al peso seco, hubo un comportamiento muy similar entre los tres tipos de explantes; nuevamente el cotiledón fue el que registró mayor crecimiento con 64.7 mg PS/callos, le siguió la raíz (23 mg PS/callos) y finalmente el hipocotilo (15 mg PS/callos).

6.2.4 Perfil de producción de trigonelina y sapogeninas en callos de *Trigonella foenum-graecum* L.

Una vez determinadas las concentraciones de reguladores de crecimiento adecuadas para la inducción y mantenimiento de callos, se determinó la producción de trigonelina y sapogeninas en esos cultivos.

Este estudio se llevó a cabo en frascos de cultivo de 125 ml con 25 ml de medio MS suplementado con 13.5 μM de 2,4-D y 11.6 μM de cinetina más 30 g/l de sacarosa. El inóculo inicial, para éste estudio, fue 1 gramo de callo fresco por frasco de cultivo. Los callos tenían 8 resiembras mensuales incubados a una intensidad luminosa de 1600 lux y a 27+-1° C.

Periódicamente, se tomaron 3 frascos de cultivo y se les determinó peso fresco y seco, al tejido seco se le trató para la cuantificación de su contenido de trigonelina y sapogeninas. Los resultados de crecimiento se representan gráficamente en la figura 10. Se puede observar que hubo un incremento en el crecimiento antes de los 20 días y otro antes de los 50, lo que indica que probablemente hubo un crecimiento diáuxico. La fase lag de crecimiento fue muy larga (8-9 días) y durante ésta hubo una serie de fluctuaciones. A los 48 días el crecimiento disminuyó para entrar a la fase estacionaria. En cuanto a la producción de trigonelina (figura 10A), se puede ver que al inicio del cultivo hubo un pico máximo de este alcaloide y que a partir de ahí la concentración decreció notoriamente, sin embargo, se observaron dos incrementos que coincidieron con el momento en que la biomasa iniciaba un incremento exponencial. A partir de los 34 días la concentración disminuyó gradualmente hasta mantenerse prácticamente constante, en 1,500 $\mu\text{g/g}$ PS. Como se observa en la figura 10, la disminución en la concentración coincidió con un aumento en el crecimiento.

La cinética de producción de esteroides y sapogeninas en callo se presenta en la figura 10B. Como se puede ver, el colesterol se detectó en muy bajas concentraciones hasta el día

48 desapareciendo el día 55, momento en que el cultivo estaba en la fase estacionaria. El α -sitosterol, se detectó a partir del día 48 y se prolongó hasta el 58, en general la producción fue mucho mayor, en comparación con la del colesterol. Para el estigmasterol, la producción varió con las fases de crecimiento del cultivo, siempre se observaron picos de máxima concentración cuando el cultivo presentaba una $\mu=0$. El β -sitosterol, fue el que se produjo en mayor cantidad, y su relación con la curva de crecimiento fue muy similar a la del estigmasterol. En el caso de la diosgenina, la curva de producción mostró tres picos máximos, exactamente al inicio de las mesetas donde la μ era igual a cero en la primera y segunda fase estacionaria de la diáuxica.

Habría que hacer notar que los niveles de producción más altos en el caso de los esteroides y sapogeninas se presentaron en las mesetas de las fases estacionarias, mientras que las de trigonelina fue cuando los cultivos iniciaron su fase exponencial de crecimiento.

6.3 Estudios con cultivos de células en suspensión.

6.3.1 Efecto del tamaño de inóculo sobre el mantenimiento de cultivos de células en suspensión de *Trigonella foenum-graecum* L.

En este estudio se usaron matraces de 125 ml con 25 ml de medio MS cada uno, suplementado con $13.5 \mu\text{M}$ de 2,4-D y $11.6 \mu\text{M}$ de cinetina y 30 g/l de sacarosa. Los cultivos se incubaron a 27 ± 1 °C, con una intensidad luminosa de 8400 lux, en una agitadora orbital a 90 rpm con una amplitud de 1 pulgada.

Los resultados se evaluaron a los 15 días y se representan gráficamente en la figura 11. Como se puede apreciar a concentraciones de inóculo menores de 1.5 g de PS/l el crecimiento fue lineal e inversamente proporcional al índice de

crecimiento. Pero cuando el inóculo fue mayor de 1.5-2 g de PS/l el incremento de biomasa disminuyó gradualmente, lo que se vió reflejado en un índice de crecimiento cada vez menor. En base a estos resultados se decidió utilizar 1.5 g PS/l como inóculo para el mantenimiento de los cultivos.

6.3.2 Efecto de los medios de cultivo MS, SH y B5 sobre el crecimiento de células en suspensión de *Trigonella foenum-graecum* L. y su producción de trigonelina y sapogeninas.

Los cultivos se realizaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 25 ml de medio MS, SH y B5, que se inocularon con 5 ml de una suspensión de 18 días de edad (1-1.5 mg PS/ml). Los matraces se incubaron a 27 ± 1 °C, a una intensidad luminosa de 8400 lux, en una agitadora orbital a 90 rpm. Los medios fueron suplementados con $13.5 \mu\text{M}$ de 2,4-D y $11.6 \mu\text{M}$ de cinetina más 30 g/l de sacarosa.

En la figura 12 se representan las cinéticas de crecimiento obtenidas con los tres medios de cultivo utilizados para este experimento. Como se puede apreciar, en los tres casos la fase lag fue semejante (6-8 días), a partir de ese tiempo el crecimiento evolucionó a diferentes velocidades para cada medio (Tabla XII) hasta alcanzar su máximo alrededor de los 20-24 días en los tres casos. Estas curvas de crecimiento se apegan a las curvas típicas sigmoides obtenidas para microorganismos. Debe hacerse notar que la cantidad final de biomasa fue diferente para cada medio; 10.43 en MS, 8.97 en SH y 5.89 g PS/l en B5. Es posible que al igual que con la inducción de callos, las curvas sean diáuxicas, en tal caso la de SH estaría un poco desfasada de las de los medios MS y B5.

En cuanto a la producción de trigonelina en cultivos en suspensión (figura 13) se observó que para el medio MS (13A) la concentración en el medio de cultivo fue prácticamente constante

a lo largo de toda la cinética, registrando ligeras fluctuaciones, mientras que para la producción en la biomasa, ésta presentó un punto máximo al inicio del cultivo pero después declinó. La producción de trigonelina en el medio de cultivo no guardó ninguna relación aparente con las diferentes fases de crecimiento de la cinética. Lo que se observó con el medio SH (figura 13B), fue muy semejante a lo ocurrido en el medio MS. La concentración en el medio de cultivo también fue prácticamente constante durante toda la cinética y tampoco se observó una relación entre la concentración en el medio de cultivo y las diferentes fases de la curva de crecimiento. En cuanto a la concentración en la biomasa se observó un máximo al inicio de la cinética y una caída gradual de ésta conforme avanzó el crecimiento. Finalmente, en la figura 13C se muestran las curvas de crecimiento y distribución de trigonelina en el medio y biomasa de cultivos crecidos en el medio B5. El comportamiento fue similar al de los otros dos medios de cultivo usados, pero en este caso, hubo mayor número de variaciones. Así, en los tres medios se observó una caída en la concentración intracelular de trigonelina cuando hubo un incremento gradual en la biomasa.

Debe hacerse notar que la cantidad de trigonelina producida con los tres medios, fue similar, tanto en el medio como en la biomasa.

En la figura 14, se presentan los resultados de producción de esteroides y sapogeninas por células en suspensión crecidas en los medios MS(A), SH(B) y B5(C). En los tres medios el compuesto que se produjo en mayor concentración fue el β -sitosterol. La máxima producción de este compuesto en los tres medios fue durante la fase exponencial, aunque para el medio SH (figura 14B) el perfil de producción indica que este máximo se alcanzó en la segunda fase exponencial del crecimiento diáuxico. En este caso se presentaron mayor número de fluctuaciones durante toda la cinética correspondiendo a las observadas en la curva de

crecimiento. En el día 18 hubo un pico de producción de todos los compuestos, coincidiendo con la segunda fase exponencial en el crecimiento y posteriormente en la fase lineal, una disminución clara de todos ellos. En el caso del medio B5 (figura 14C) la máxima concentración de β y α sitosterol también fue en la fase exponencial. En el caso del estigmasterol y diosgenina, la concentración fue constante durante todo el ciclo de crecimiento.

En cuanto al consumo de nutrientes por los cultivos de células en suspensión, en la figura 15 se muestran los resultados obtenidos. Se observó que para MS(15A), las curvas de sacarosa, fosfatos, nitratos y amonio muestran una disminución típica en su concentración. Debe notarse que al inicio de la cinética durante la fase lag, hubo una ligera alza en la concentración de nutrientes residuales, arriba del 100%. Al final del cultivo ninguno de los nutrientes evaluados se consumió totalmente: la sacarosa sólo se consumió en un 75%, el fosfato se consumió en un 80% aunque en el último punto de la cinética se registró una alza de fosfato residual hasta el 65%; para el caso del nitrato las células consumieron el 60% de la concentración total. Por otro lado, para el amonio no hubo un perfil definido, aunque el consumo máximo fue del 85%. Al final del cultivo hubo una alza en el porcentaje de amonio residual, subió hasta un 33% y se incrementó al final hasta un 111%. En el caso del medio SH, también al inicio de la cinética, se registró una ligera alza en los porcentajes de nutrientes. Posteriormente, las células en éste medio, consumieron aproximadamente un 60% de la sacarosa y fosfato total. En tanto que el nitrato se consumió casi en su totalidad, sin embargo, hubo una alza del nitrato residual hasta del 50%. El amonio residual casi al final de la cinética (22 días) desapareció y al final de ésta aumentó hasta el 75%. En el medio B5, los perfiles de las curvas de los nutrientes no cambió demasiado con respecto a los otros dos medios, observándose que los porcentajes de

sacarosa y fosfatos consumidos fueron 40%, y 70%, respectivamente. El nitrato residual desde el inicio de la cinética aumentó hasta el día 15, en este caso las células consumieron aproximadamente el 50% del nitrato inicial en el medio, al final de la cinética el porcentaje residual de éste aumentó hasta el 94%. El amonio, desde el inicio de la cinética mostró una disminución hasta el día 11 de la cinética a partir del cual aumentó hasta el día 20 para después disminuir hasta llegar a cero de amonio residual. En ninguno de los tres medios hubo una correlación clara entre el consumo de nutrientes y la producción de esteroides y sapogeninas. Sin embargo, con respecto a la trigonelina se pudo observar que su concentración intracelular disminuyó conforme los nutrientes en su conjunto, se iban agotando del medio de cultivo.

7. ANALISIS Y DISCUSION

7. ANALISIS Y DISCUSION

7.1. Obtención de material biológico.

Para la desinfestación de las semillas de *Trigonella foenum-graecum* L., en la literatura se han reportado diferentes sustancias, así como técnicas. Entre, ellos hay tratamientos con H_2O_2 (Brain y Lockwood, 1976), β -Propiolactona (Hardman y Stevens, 1978) e hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones y a diferentes tiempos de exposición (Radwan y Kokate, 1980 y Jain y col., 1977). Estos autores reportan el uso individual de estas sustancias, obteniendo buenos resultados. No obstante, aquí se tuvo que contemplar la combinación de pretratamientos físicos y químicos, previos al tratamiento con el desinfestante debido a la dureza y rugosidad de las semillas de *Trigonella* ya que en pruebas preliminares que se realizaron se observó, que sí se usaba sólo el hipoclorito de sodio, la frecuencia de contaminación era bastante alta (algunas ocasiones hasta 100% de los cultivos) y los que no se contaminaban tardaban en germinar de 3-4 semanas, cuando las semillas en esta especie germinan normalmente en 10 días. El uso de pretratamientos con H_2O y H_2SO_4 , contribuyeron sustancialmente al reblandecimiento de la testa, la cual es muy dura en esta especie, para que finalmente el método adoptado para la desinfestación permitiera una frecuencia de contaminación del 20% y de germinación del 89%, a los 10 días de incubación. Cabe mencionar que sí el tiempo para evaluar la frecuencia de germinación hubiera sido mayor (15 días), probablemente hubiera aumentado hasta un 95% de las semillas.

Tal y como se esperaba, en la evaluación del efecto luz/oscuridad sobre la frecuencia de germinación, se observó que las plántulas crecidas en luz fueron completamente verdes y relativamente más pequeñas, en comparación con aquellas que crecieron en oscuridad, que fueron ligeramente pigmentadas y mucho más grandes. Esto corrobora la incapacidad de la planta

para producir clorofila en ausencia de luz y el efecto inhibitorio de esta sobre la elongación de las plantas. (Wain, 1980 y Goodwin y Mercer, 1983)

Inicialmente, se decidió trabajar con explantes de hipocotilo y no de cotiledón o de raíz, debido a que la facilidad con la que se manipulan es mayor que con los otros órganos y a que el número de explantes que se obtuvieron por planta fue también mayor que con cotiledón o raíz, aprovechando el material vegetal más eficientemente.

7.2. Estudios con cultivos de callos.

Al estudiar el efecto de los reguladores del crecimiento, 2,4-D y cinetina, sobre la inducción y crecimiento de callos de *Trigonella foenum-graecum* L. (figura 6), se observó, que ni el 2,4-D ni la cinetina individualmente dieron buenos resultados para el crecimiento. Dichos resultados no concordaron con los reportados por otros investigadores como Khanna y Jain, 1973 y Khanna y col., 1975; quienes usando sólo 2,4-D en una concentración de 1 y 0.1 ppm, respectivamente, obtuvieron buenos resultados para crecer callos de *Trigonella foenum-graecum* L. en medio MS. Por otra parte, en el presente trabajo se observó que cuando ambos reguladores se combinaron, el crecimiento mejoró notoriamente, comprobándose de esta manera, que hay un efecto potenciado entre las auxinas y citocininas y que ese efecto, tal y como lo indicó el análisis estadístico de los datos, puede ser positivo para el crecimiento dependiendo de la combinación de ellos con respecto a su concentración en el medio de cultivo. Dichos resultados concuerdan con lo encontrado por otros investigadores que han visto que la adición de cinetina y 2,4-D al medio puede resultar beneficioso para el cultivo de callos y células en suspensión (Gamborg y Shyluk, 1981).

De este estudio, aunque hay varios máximos relativos en la superficie de respuesta, debido a las interacciones entre el

2,4-D/cinetina más que a errores experimentales, se pudo apreciar que el crecimiento se centraba alrededor de un pico localizado a los 11 μM de cinetina con 11-13 μM de 2,4-D. Estas concentraciones en comparación con las que usaron otros investigadores, son notablemente más altas. Como este estudio no dió información respecto a que ocurrió a concentraciones más altas de cinetina ya que el efecto debido a la interacción 2,4-D/cinetina no permite extrapolaciones a rangos de concentraciones fuera de los evaluados, fue necesario realizar otro estudio en el que se contemplaron concentraciones de cinetina hasta de 20.88 μM estrechando también el rango para el 2,4-D. Los resultados indicaron que estas concentraciones de reguladores no fueron tóxicas al tejido, y nuevamente sostuvo un pico máximo de crecimiento localizado alrededor de 11 μM de cinetina con 11-13 μM de 2,4-D. Esta reproducibilidad de resultados comprobó la capacidad para la inducción y mantenimiento de callo por estos reguladores.

Una vez definidas las concentraciones de 2,4-D (13.5 μM) y de cinetina (11.6 μM) se procedió a estudiar el efecto de los medios de cultivo: MS, SH y B5, sobre el crecimiento de callos. Este experimento se planteó en base a que en diversos trabajos se ha demostrado la importancia del medio mineral sobre el desarrollo de los cultivos de células vegetales *in vitro* y su producción de metabolitos secundarios (Kato y col., 1972; Wescott y Henshaw, 1976 y Fukui y col., 1983). En este trabajo, la composición de los medios no se alteró, siendo la que originalmente reportaron sus autores respectivos. Los resultados obtenidos mostraron que con el medio B5 se obtuvo mayor peso fresco, sin embargo, con respecto al peso seco, el que mostro mejores resultados de crecimiento fue el MS. Esta diferencia indicó claramente que la capacidad de captación de agua y por tanto la compactibilidad y friabilidad de los callos, está en función del medio mineral en el cual se desarrollaron. Estos resultados también han sido observados por varios autores en

otras variedades de plantas. Aparentemente los callos originados sobre medio MS deberían de haber sido compactos y duros, para que de esta manera se pudiera explicar su mayor peso seco con respecto a los otros dos medios. Sin embargo, cualitativamente no se observaron tales diferencias morfológicas entre los callos obtenidos en los diferentes medios usados en este estudio que indicaran que esta había sido la causa de las diferencias de peso en los medios.

Por otro lado, diversos estudios han demostrado la importancia del explante sobre la inducción y crecimiento de callos y la capacidad biosintética de los cultivos *in vitro*. Este estudio resulta de particular interés debido a que el éxito que se tenga en el establecimiento de un tejido calloso depende en parte de la fuente vegetal usada y de las condiciones de cultivo empleadas. En el presente trabajo los explantes que se probaron fueron hipocotilo, raíz y cotiledón (figura 9). Todos los tipos de explantes examinados dieron buena respuesta respecto al crecimiento y pudieron formar tejido calloso. Otros autores para esta misma especie, han reportado el uso de meristemas de raíz (Antony y col., 1975) y el uso de cotiledones (Hardman y Stevens, 1978), obteniendo buenos resultados, pero el uso de explantes de hipocotilo no se ha reportado. Un dato interesante que presentó este estudio fue que, a pesar que el cotiledón al inicio de la cinética tenía menor peso fresco y seco, al final del experimento mostro mayor crecimiento que los explantes de raíz e hipocotilo, resultados semejantes fueron encontrados para cultivos de *Capsicum* (Calva, 1989). Los explantes de raíz e hipocotilo en cierta forma guardaron una relación de crecimiento de acuerdo con su peso fresco y seco inicial ya que después del cotiledón los explantes que mostraron un crecimiento considerable fueron los de raíz y finalmente los de hipocotilo. El hecho de que los callos provenientes de cotiledón alcanzaran al final del estudio, mayor peso fresco y seco, podría explicarse en base a

su contenido de agua y biomasa efectiva y debido también a que tienen mayor área superficial con respecto al hipocotilo y raíz. La primera hipótesis se ve apoyada por los siguientes datos de la relación de agua y de biomasa efectiva, la cual fue de 95:5, 94:6 y 86:14 para los callos provenientes de hipocotilo, raíz y cotiledón, respectivamente. Una vez establecidos los cultivos de callos, se procedió a estudiar su cinética de crecimiento y su producción de trigonelina, esteroides y sapogeninas. Los resultados de este estudio se muestran en la figura 10. En esta gráfica, se observó que el cultivo presentó una fase lag de 12 días, tanto para el peso fresco como para el peso seco. La meseta presente entre los 12-35 días, aproximadamente, indican un claro crecimiento diáuxico en este cultivo, por otra parte, en los 4 últimos puntos de la cinética, el aumento de peso que se presentó no necesariamente se debió a la acumulación de biomasa, sino la causa pudo haber sido la acumulación de agua por el tejido, provocando un aumento en el volumen celular en la fase final del cultivo.

En cuanto al alcaloide trigonelina, en la literatura se han reportado estudios que incluyen: biosíntesis (Antony y col., 1975), quimiotaxonomía (Willeke y col., 1979) y producción por cultivos *in vitro* (Radwan y Kokate, 1980), aspecto del que se ocupó este trabajo. Estos autores estudiaron la producción de trigonelina por tejido calloso, pero sólo reportan estudios que se limitan a evaluarla en un tiempo determinado del ciclo de crecimiento. En el presente estudio se monitoreo la producción de trigonelina durante todo el ciclo de crecimiento de este tejido; revelando que la máxima producción de trigonelina se encontró al inicio del ciclo (fase lag), manifestando posteriormente una disminución sin tendencias a recuperarse (figura 10A), es decir, se observó que hubo una relación inversa entre el incremento de biomasa y la concentración intracelular de este compuesto. Este comportamiento en la producción de

trigonelina puede ser debido al efecto de dilución producido cuando se transfiere un cultivo a un medio nuevo, provocando, en algunos casos liberación de metabolitos secundarios lo cual ha sido observado por diversos autores para otros metabolitos secundarios, como capsaicinoides (Calva, 1989), ácido rosmarínico (Wagner y Vogelmann, 1977) y nicotina (Ogino y col., 1978). Podría suceder también que el cultivo haya estado biosintetizando precursores en otra fase de crecimiento (fase estacionaria, por ejemplo) y que al pasar el cultivo a un medio nuevo la transformación a trigonelina se halla llevado a cabo, como sucede por ejemplo, para diosgenina (Tal y col., 1984).

La concentración máxima de trigonelina encontrada bajo estas condiciones experimentales (12.6 mg/g PS), es comparable con la que encontré, Radwan y Kokate, 1980, para esta misma especie y para el mismo tejido, pero bajo otras condiciones; en este caso utilizaron el medio B5 modificado y sólo cuantificaron a las 4 semanas donde la concentración que encontraron fue de 14.2 mg/g PS.

Respecto a la producción de esteroides y sapogeninas, en general, se observaron una serie de fluctuaciones para todos los metabolitos evaluados, no se encontró un patrón de acumulación definido. Sin embargo, se observaron ciertas tendencias de acumulación alrededor del día 50, más o menos al inicio de la fase estacionaria. No obstante, el nivel de acumulación fue pobre, ya que, ninguno de los metabolitos evaluados alcanzó 1 mg/g PS, en comparación con la encontrada por otros autores; quienes han reportado producciones de 18.20 mg/g PS para diosgenina, 10.70 para gitogenina, 11.70 para estigmasterol, 13.0 para tigogenina y 8.70 para β -sitosterol (Khanna y Jain, 1973). En otro estudio, Khanna y col., 1975, se incrementó la producción de diosgenina de 1.82% a 2.23% en cultivos suplementados con colesterol, como una estrategia de biotransformación.

7.3. Estudios con cultivos de células en suspensión.

Dado que la cantidad de inóculo para iniciar un cultivo en suspensión varía para cultivos de diferentes especies y depende de la planta y condiciones de cultivo, los experimentos con células en suspensión se iniciaron realizando un estudio con el objeto de encontrar el tamaño de inóculo óptimo para establecer los cultivos de células en suspensión de *Trigonella foenum-graecum* L. Como se observa en la figura 11, el crecimiento fue muy bajo con inóculos de 0.5 y 1 mg PS/ml, pero a partir de 1.5 hasta 5 mg PS/ml la cantidad final de biomasa se mantuvo prácticamente constante al final de los cultivos. En cuanto al índice de crecimiento, este fue más alto con inóculos de 0.5 y 1 mg PS/ml, pero el crecimiento fue más bajo. Sin embargo, cuando el inóculo fue de 1.5 mg PS/ml no hubo una diferencia considerable en el índice de crecimiento, no obstante que la cantidad de biomasa se vió notoriamente incrementada. Así, de este estudio se seleccionó un tamaño de inóculo (1-1.5 g PS/l) que presentó un buen crecimiento, así como un adecuado índice de crecimiento.

Posteriormente, teniendo como antecedente estos resultados, se procedieron a realizar las cinéticas de crecimiento y producción con células en suspensión en los medios MS, SH y B5. En la figura 12 se muestran las curvas de crecimiento con los tres medios usados. Estas curvas en términos generales son las típicas de un perfil de crecimiento microbiano. Por otro lado, en esta figura se observó también que el medio MS fue el que provocó mayor crecimiento (10.43 g PS/l), después el SH (8.97 g PS/l) y al último el B5 (5.89 g PS/l). Este comportamiento indica un claro efecto por el tipo de medio de cultivo sobre esta especie.

Respecto a la producción de trigonelina por las células en suspensión, se observó el mismo patrón que el obtenido con callos, las posibles explicaciones para tal comportamiento son las mismas que se dieron para callos. En este caso, también se

realizaron evaluaciones en el medio de cultivo, y como previamente se indicó en los resultados, la excreción del metabolito al medio fue prácticamente constante, en cambio, la cantidad en la biomasa, sí presentó variaciones. Este comportamiento en conjunto con el porcentaje del metabolito encontrado en biomasa (que fue alrededor del 90% para los tres medios) y el porcentaje en el medio (que fue alrededor del 10% para los tres medios), indican que el metabolito es predominantemente intracelular, lo que puede representar un problema para la extracción del metabolito si el proceso se quiere escalar con fines de producción masiva, tal y como lo han indicado Mavituna y col., 1987. Cabe mencionar que otros autores (Radwan y Kokate, 1980) reportan porcentajes de trigonelina intra y extracelulares diferentes a los obtenidos en este trabajo; para el medio de cultivo reportan un porcentaje del 30% y para la biomasa del 70%.

Las curvas de producción de esteroides y sapogeninas, así como las curvas de crecimiento obtenidas en los tres medios utilizados se pueden observar en la figura 14. En ésta, se observaron claramente picos máximos de producción para MS (8 días) y SH (18 días), no así para B5, lo que indica que el medio de cultivo ejerce un efecto significativo sobre la biosíntesis y acumulación de estos metabolitos. En el medio B5 no se observó una curva de crecimiento tan definida como para MS y SH, aspecto que podría afectar el patrón de acumulación de metabolitos. En los tres medios la producción de estos compuestos fue considerablemente muy baja en comparación con la obtenida por otros autores, como Khanna y col., 1975 que lograron obtener producciones de hasta 3.54%, PS para diosgenina, a través de la adición de colesterol a los medios de cultivo.

Como se sabe, el medio ambiente nutricional ejerce una fuerte influencia sobre el crecimiento y producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales, y la manipulación de éste puede dar como resultado cambios en la

pocos datos respecto a las condiciones nutricionales del cultivo en el momento de la formación del producto (Eknambul y Ellis, 1984). Es por estas razones, que en este trabajo se monitoreó la cinética de consumo de nutrientes con respecto al crecimiento y producción de los cultivos. Este estudio permitió dilucidar que bajo las condiciones experimentales utilizadas, ninguno de los nutrientes evaluados, se puede considerar limitante ni para el crecimiento ni para la producción de trigonelina y sapogeninas, ya que en ningún caso hubo un consumo total por las células. Debido a ello, las concentraciones de estos compuestos se podrían disminuir en el medio de cultivo reduciendo de esta manera los costos del proceso. Otro aspecto igualmente importante que arrojó este estudio, fue el hecho que no se observó ninguna relación entre la producción de los metabolitos evaluados y el consumo de nutrientes. Las fluctuaciones por arriba del 100% al inicio de la cinética de consumo de nutrientes se podría deber a que el inóculo llevaba consigo cantidades de nutrientes que aumentarían el porcentaje inicial o a que las células liberaran al medio sus "pozas" almacenadas intracelularmente como respuesta a la tensión producida por el cambio de su medio ambiente nutricional o por efecto de dilución. Las otras fluctuaciones durante la cinética se podrían deber a cuestiones de errores experimentales (figura 15).

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. El 2,4-D y cinetina tienen un efecto sinérgico sobre la inducción y crecimiento de callos. Las concentraciones de 2,4-D (13.5 μM) y de cinetina (11.6 μM) seleccionadas, resultaron adecuadas para el crecimiento de callos y células en suspensión.

2. No se encontraron diferencias considerables entre los cultivos crecidos en los medios MS, SH y B5 sobre la inducción y crecimiento de callos, pero para cultivo de células en suspensión el MS dió mejor resultado.

3. Los explantes de hipocotilo, raíz y cotiledón tuvieron capacidad para formar callos, y ninguno presentó estructuras diferenciadas. De los tres, el que dió mejor crecimiento fue el cotiledón, después la raíz y finalmente el hipocotilo.

4. Los cultivos de callos fueron capaces de producir trigonelina en concentraciones de 12.6 mg/g PS, que fueron comparables con las encontradas por otros autores (14.6 mg/g PS).

5. Las concentraciones de esteroides y sapogeninas encontradas, fueron más bajas, menos de 1 mg/g PS, que las encontradas por otros autores. El metabolito encontrado en mayor concentración fue β -sitosterol (24.5 y 27.9 $\mu\text{g/g}$ PS para callo y células en suspensión, respectivamente en medio MS).

6. La producción máxima de trigonelina en cultivos de células en suspensión se obtuvo en el medio MS (8.2 mg/l) después en el SH (6.9 mg/l) y finalmente en el B5 (5.9 mg/l).

7. La trigonelina fue predominantemente intracelular (90%). Las concentraciones de trigonelina obtenida en estos

estudios con los cultivos *in vitro* de *Trigonella* (en los tres medios), fueron más altas que las encontradas para semillas (0.39%).

9. RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIONES FUTURAS

9. RECOMENDACIONES PARA INVESTIGACIONES FUTURAS

1. Probar otros reguladores como IAA, NAA y IPA y observar su influencia sobre el crecimiento y producción.
2. Obtener líneas de callos y células en suspensión de explantes de hipocotilo, cotiledón y raíz, y realizar cinéticas de crecimiento y producción de cada uno de ellos.
3. Cuantificar producción de aroma y sabor, tanto en la biomasa como en medio de cultivo.
4. Se sugiere que se siga trabajando con el medio MS, y que en éste se hagan estudios de manipulación de medio, observando su influencia sobre el crecimiento y producción.
5. Iniciar estudios a nivel de biorreactor.
6. Evaluar los metabolitos obtenidos por técnicas analíticas más específicas como CG/EM y CLAR UV arreglo de diodos.

10. TABLAS

TABLA I
AGENTES DESINFESTANTES UTILIZADOS EN CULTIVO DE TEJIDOS
VEGETALES.

AGENTE EFECTIVIDAD	CONCENTRACION (X)	FACILIDAD DE ELIMINACION	TIEMPO DE EXPOSICION
Hipoclorito de Ca Muy Buena	9-10	XXXX	5-30 MIN.
Hipoclorito de Na Muy Buena	2	XXXX	5-15 MIN.
Peróxido de Hidrógeno Buena	10-12	XXX	5-15 MIN.
Agua de bromo Muy buena	1-2	XXXX	2-10 MIN.
Nitrato de Plata Buena	1	XXX	5-30 MIN.
Cloruro Mercuríco Satisfactoria	0.1-1	XX	2-10 MIN.
Antibióticos Regular	4-50 mg/l	X	30-60 MIN.

Fuente: Modificado de Yeoman y Macleod, 1977.

TABLA II

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

COMPONENTE	CONCENTRACION EN EL MEDIO DE CULTIVO (mg/l)		
	SH(1)	B ₅ (2)	MS(3)
Ca(NO ₃) ₂	-	-	-
KNO ₃	2500	3000	38000
NaNO ₃	-	-	-
NH ₄ NO ₃	-	-	33000
NH ₄ H ₂ PO ₄	300	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	400	500	7400
CaCl ₂ ·2H ₂ O	200	150	8800
KCl	-	-	166
KH ₂ PO ₄	-	-	3400
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	150	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	10	10	-
MnSO ₄ ·4H ₂ O	-	-	4460
KI	1	0.75	166
H ₃ BO ₃	5	3	1240
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1	2	1720
CuSO ₄	0.2	0.025	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	-	5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.1	0.25	50
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.1	0.025	5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	15	-	5560
Sequestreno 330 Fe	-	28	-
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	20	-	7460
Mio-Inositol	1000	100	20000
Tiamina-HCl	5	10	100
Acido nicotínico	5	1	100
Piridoxina-HCl	0.5	1	100
Glicina	-	-	400
Sacarosa	30000	20000	30000
pH	5.9	5.5	5.7

(1). SH: Schenk & Hildebrandt, 1972.

(2). B₅: Gamborg, Miller & Ojima, 1968.

(3). MS: Murashige & Skoog, 1962.

Fuente: Modificado de Dixon, 1985.

TABLA III
COMPOSICION DE LAS SEMILLAS DE *Trigonella foenum-graecum* L.

COMPONENTES	%
Húmedad	9.0
Cenizas	3.2
Lípidos	7.0
Proteína (nx 6.25)	26.0
Almidón	1.6
Fibra _____	48.0
Mucilago _____	20.0
Hemicelulosa _____	17.3
Celulosa _____	8.2
Lignina _____	2.5
Saponinas	4.8
Trigonelina	0.37

Fuente: Sharma, 1984.

TABLA IV
 COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS EN ACEITE FIJO DE
 SEMILLAS DE *Fragonella foenum-graecum* L.

ACIDO GRASO	%
Acido Palmítico	9.68
" Esteárico	4.92
" Araquídico	2.00
" Behénico	0.90
" Oleico	35.11
" Linoleico	33.72
" Linolénico	13.80

Fuente: Shankaracharya y Natarajan, 1972.

TABLA V

COMPOSICION DE MINERALES DE SEMILLAS DE *Trigonella foenum-graecum* L.

MINERAL	CONTENIDO EN MINERALES/100 g
Minerales total	3.00 g.
Calcio	160.00 mg.
Fosforo total	370.00 mg.
Hierro total	14.10 mg.
Sodio	19.00 mg.
Potasio	530.00 mg.

Fuente: Shankaracharya y Natarajan, 1972.

TABLA VI
COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE CASEINA Y FENOGRECO
(g/100 g proteina).

AMINOACIDO	CASEINA	FENOGRECO
Lisina	8.11	5.66
Histidina	2.91	2.10
Arginina	3.74	9.47
Acido aspartico	7.12	9.30
Treonina	4.65	3.28
Serina	6.03	4.66
Acido glutámico	22.03	14.96
Glicina	1.97	4.34
Alanina	3.07	3.70
Valina	7.05	2.72
Metionina	2.78	-
Isoleucina	5.40	4.44
Leucina	9.51	5.52
Tirosina	5.81	2.50
Fenilalanina	3.14	3.90

Fuente: Sharma, 1984.

TABLA VII
 SAPOGENINAS PRESENTES EN DIFERENTES PARTES DE LA
 PLANTA DE *Frigonella foenum-graecum* L

SAPOGENINA	TALLO	HOJA	SEMILLA
Diosgenina	X	X	X
Yamogenina	-	-	X
Tigogenina	-	X	X
Neotigogenina	-	-	X
Gitogenina	-	X	X
Neogitogenina	-	-	X
Yucagenina	-	-	X
Lilagenina	-	-	X
Esmilagenina	-	-	X
Sarsasapogenina	-	-	X

TABLA VIII

COMPUESTOS OBTENIDOS EN CULTIVOS DE CALLOS Y CELULAS EN
SUSPENSION DE *Trigonella faenum-graecum* L.

COMPUESTO	CALLO	CELULAS EN SUSPENSION
Trigonelina	X	X
Mucilago (galactosa-manosa)	X	-
Diosgenina	X	X
Gitogenina	X	X
Tigogenina	X	X
β -sitosterol	X	X
Estigmasterol	X	X
Colesterol	X	-
Campesterol	X	-

Nota: - Datos no reportados.

TABLA IX

FRECUENCIA DE GERMINACION (%) DE SEMILLAS DE
Frigonella faenum-graecum L. A DIFERENTES TIEMPOS EN LUZ
 Y OSCURIDAD EN MEDIO MS.

	TIEMPO (días)			
	0	4	6	10
Oscuridad	0	77.77	86.66	88.88
Luz*	0	73.91	84.78	89.13

* Este estudio se llevó a cabo a 27 ± 1 °C y 5,400 lux.

TABLA X

PESO PROMEDIO DE EXPLANTES DE HIPOCOTILO DE PLANTULAS
OBTENIDAS EN DIFERENTES INTENSIDADES DE LUZ EN MEDIO MS.

INTENSIDADES LUMINOSAS (lux)				
	A	B	C	D
	8,400	5,400	1,600	OSCURIDAD
mg/PS ----- EXPL.	27.56 ⁽¹⁾	38.02	31.33	29.69

(1): Las plántulas empleadas se crecieron por 10 días, de estas se obtuvieron explantes de hipocotilo de 10 mm de longitud, los valores presentados en la tabla representan la media de 10 explantes. El estudio se llevó a cabo a 27±1 °C.

TABLA XI

ARREGLO EXPERIMENTAL EMPLEADO PARA ESTUDIAR EL EFECTO DEL BALANCE 2,4-D/CINETINA SOBRE LA INDUCCION DE TEJIDO CALLOSO EN MEDIO MS A PARTIR DE HIPOCOTILO DE *Trigonella foenum-graecum* L

Acido 2,4-Diclorofenoxiacético (μM)						
C i n e t i n a (μM)		0	0.45	4.5	11.25	22.5
	0	1	2	3	4	5
	0.46	6	7	8	9	10
	2.32	11	12	13	14	15
	11.60	16	17	18	19	20

- Los tratamientos se realizaron aleatoriamente y por triplicado por 31 días a 27 ± 1 °C y 1600 lux.

TABLA XII

PARAMETROS CINETICOS DE CELULAS EN SUSPENSION DE
Friganella faenum-graecum L. EN DIFERENTES
MEDIOS DE CULTIVO.

PARAMETRO	MEDIO DE CULTIVO		
	MS	SH	B5
$\mu^{(1)}$ (d^{-1})	0.1010	0.0586	0.0712
Td ⁽²⁾ (d)	6.8600	11.8200	9.7200
biomasa máxima (g PS/l)	10.43	8.97	5.89
tiempo (días)	22	25	25

(1): μ = vel. específica de crecimiento, (d^{-1}).

(2): Td = Tiempo de duplicación, (d).

Este estudio se llevó a cabo a $27 \pm 1^\circ C$ a 8400 lux.

11. FIGURAS

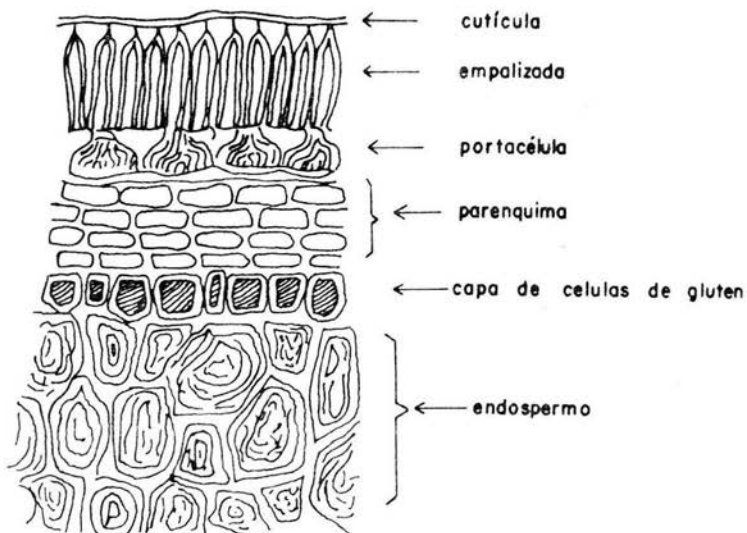


FIGURA 1. CORTE TRANSVERSAL DE LA SEMILLA DE
Trigonella foenum-graecum L.
 Adaptado de Casamada, 1977

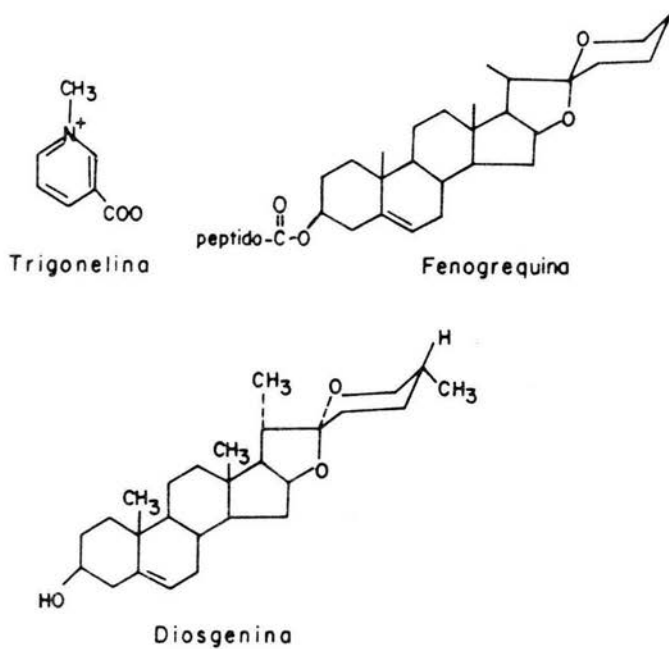


FIGURA 2. ESTRUCTURAS DE LA TRIGONELINA, FENOGREQUINA Y DIOSGENINA.

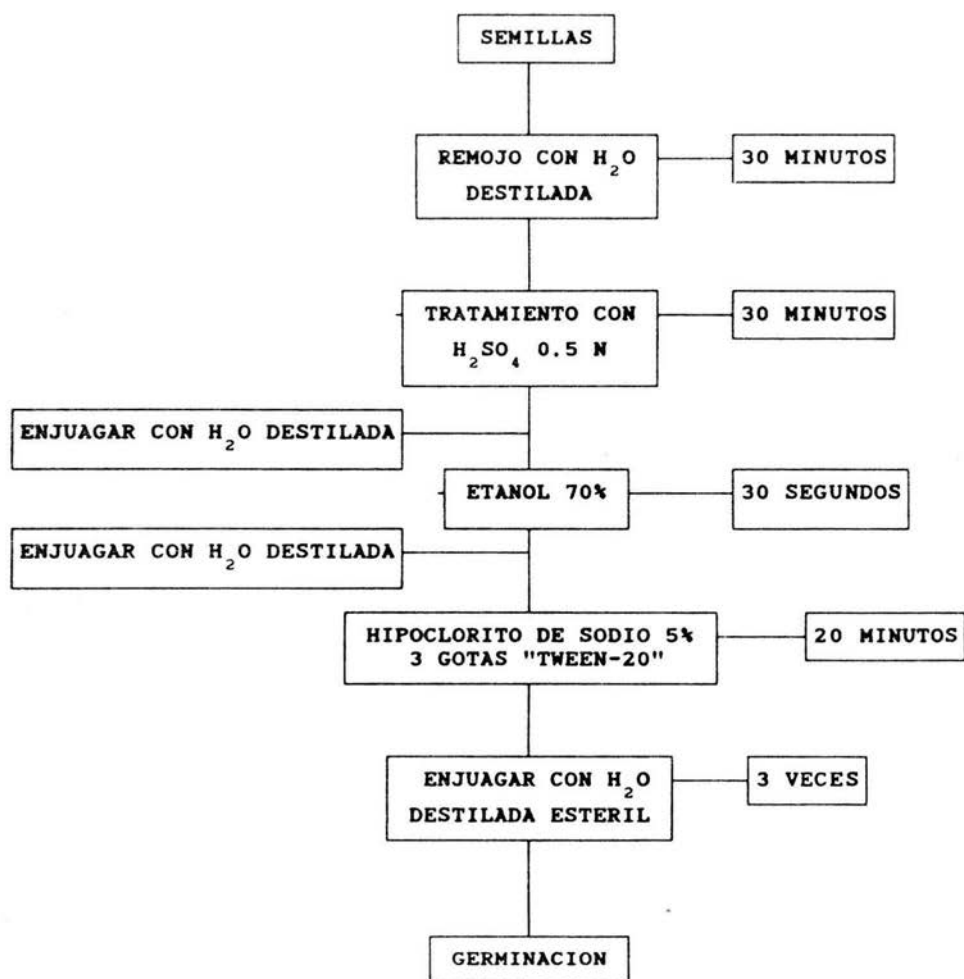
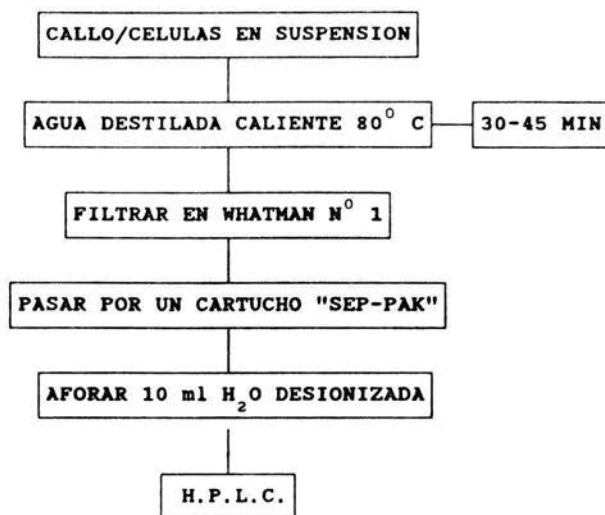


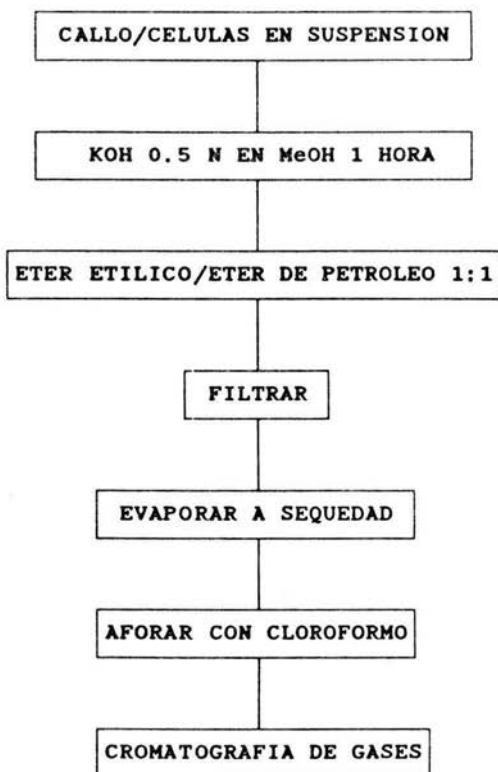
FIGURA 3. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DESINFESTACION DE SEMILLAS DE *Trigonella faenum-graecum* L.



Condiciones del análisis:

Columna: supelcosil (C18) a 45° C.
 Fase móvil: MeOH-Buffer de citrato de potasio
 (60:40) a pH=4.
 Flujo: 0.2 ml/min.
 Longitud de onda: 265 nm.

FIGURA 4. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETERMINACION DE TRIGONELINA EN CALLO Y CELULAS EN SUSPENSION DE *Trigonella foenum-graecum* L.



Condiciones del análisis:

Detector: ionización de flama
 Gas acarreador: nitrógeno 30 ml/mn
 Columna: OV17-3% en cromosorb W 80/100M
 Temperatura: Columna: 280 °C
 Detector: 350 °C
 Inyector: 300 °C

FIGURA 5: DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA DETERMINACION DE ESTEROLES Y SAPOGENINAS EN CALLO Y CELULAS EN SUSPENSION DE *Triphonella faenum-gnaecum* L.

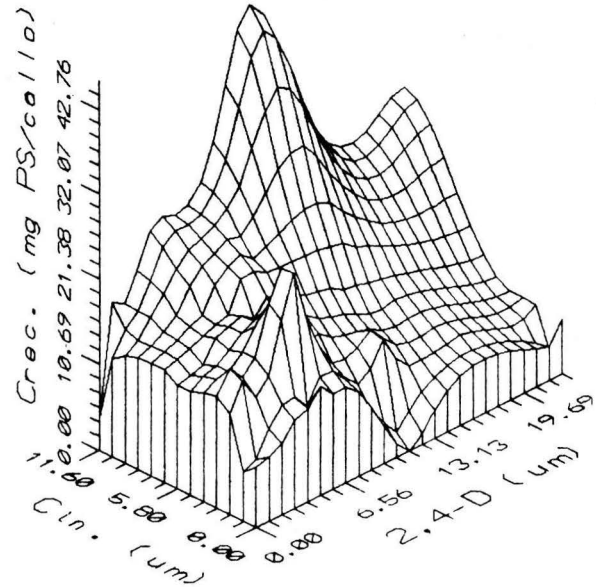
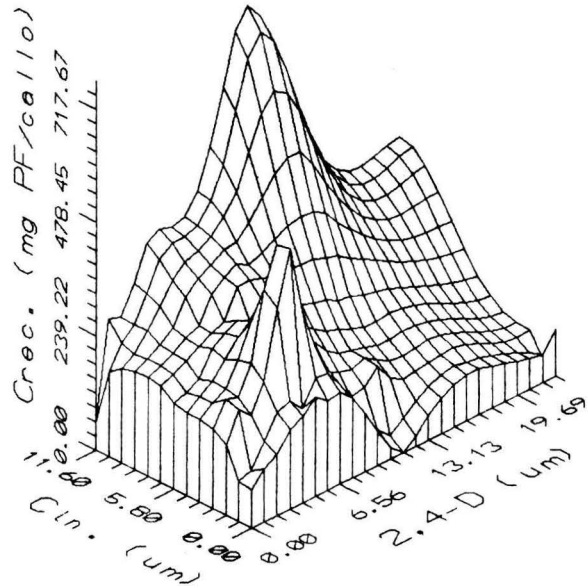


FIGURA 6. INFLUENCIA DEL BALANCE 2,4-D/CINETINA SOBRE LA INDUCCION Y CRECIMIENTO DE CALLOS DE *Trigonella foenum-graecum* L.

Este estudio se realizó en medio MS a 27±1 °C y 1,600 lux, los cultivos se evaluaron por triplicado a los 31 días.

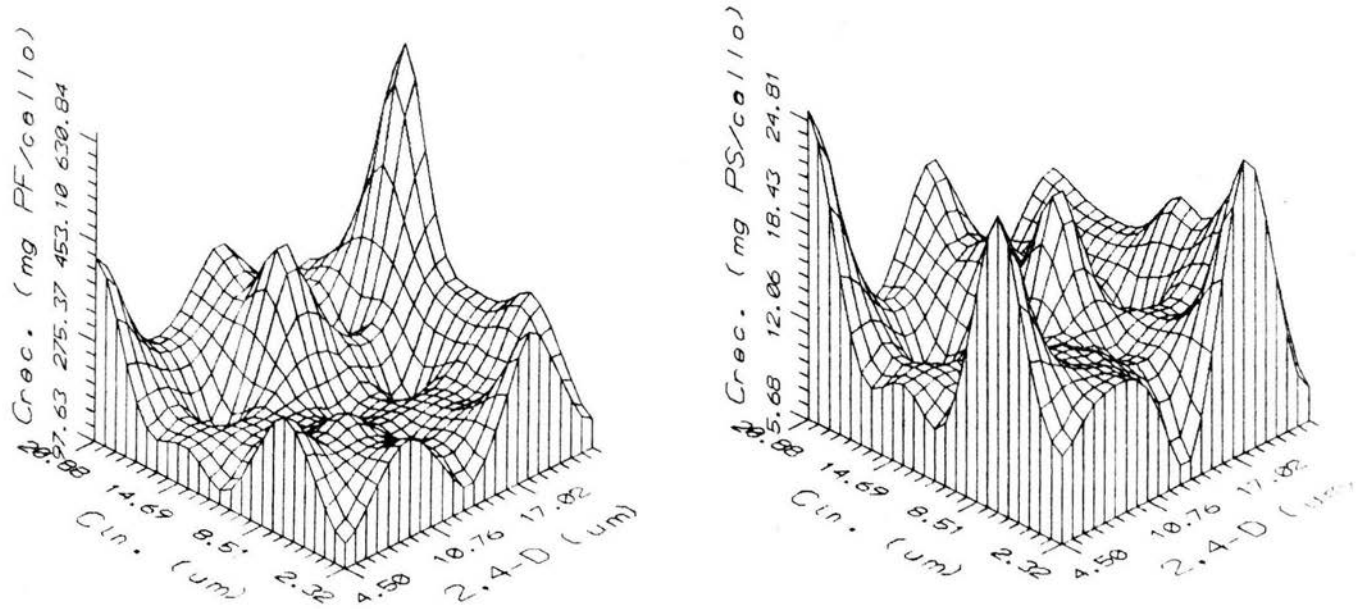


FIGURA 7. INFLUENCIA DEL BALANCE 2,4-D/CINETINA SOBRE LA INDUCCION Y CRECIMIENTO DE CALLOS DE *Trigonella foenum-graecum* L.

Este estudio se realizó en medio MS a 27±1 °C y 1,600 lux, los cultivos se evaluaron por triplicado a los 29 días.

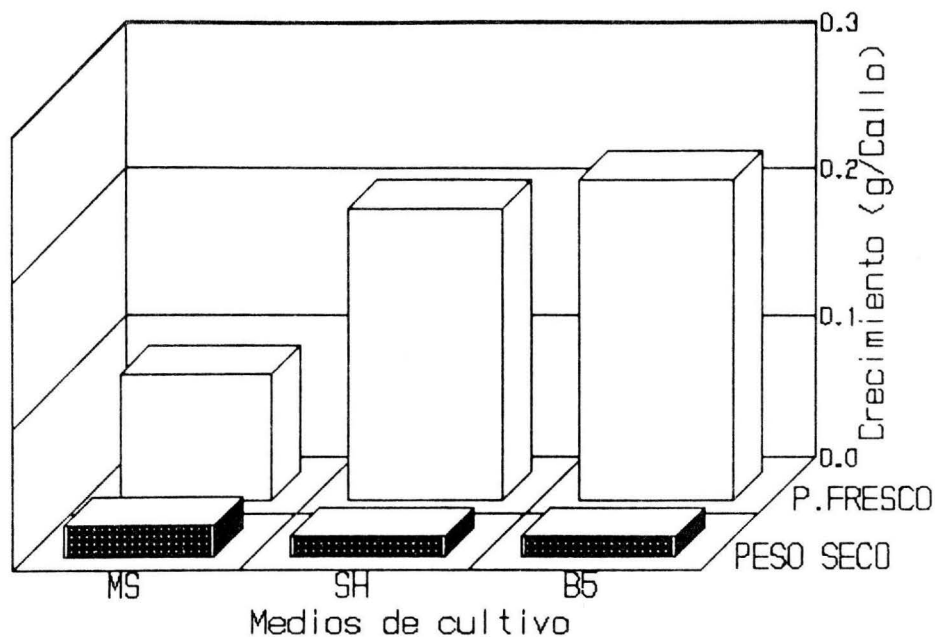


FIGURA 8. INFLUENCIA DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO DE CALLOS DE HIPOCOTILO DE *Trigonella foenum-graecum* L.

Este estudio se realizó a 27 ± 1 °C y 1,600 lux, los cultivos se evaluaron por triplicado a los 33 días.

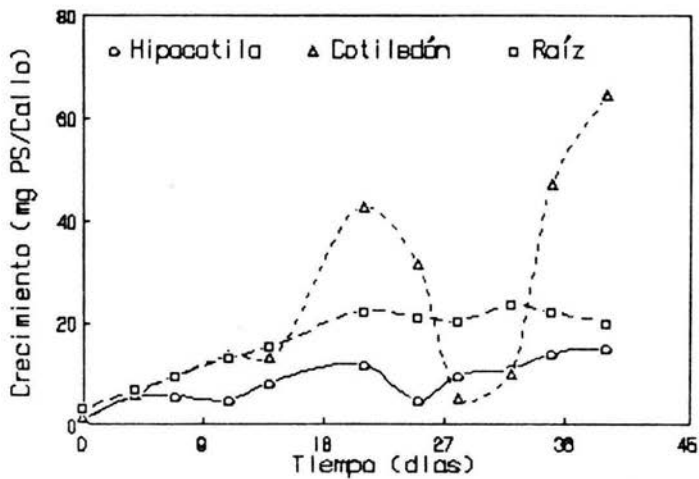
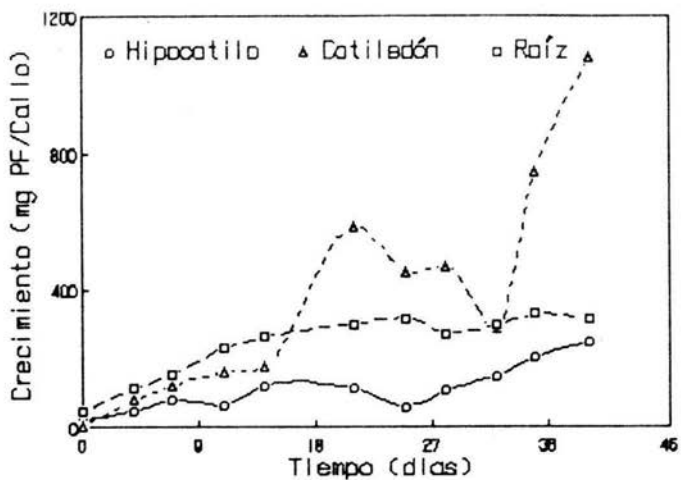


FIGURA 9. CINETICA DE CRECIMIENTO DE CALLOS A PARTIR DE DIFERENTES TIPOS DE EXPLANTES DE *Trigonella foenum-graecum* L. EN MEDIO MS.

Este estudio se realizó a 1,600 lux a 27 ± 1 °C, las plántulas utilizadas como fuente de explantes se crecieron por 16 días.

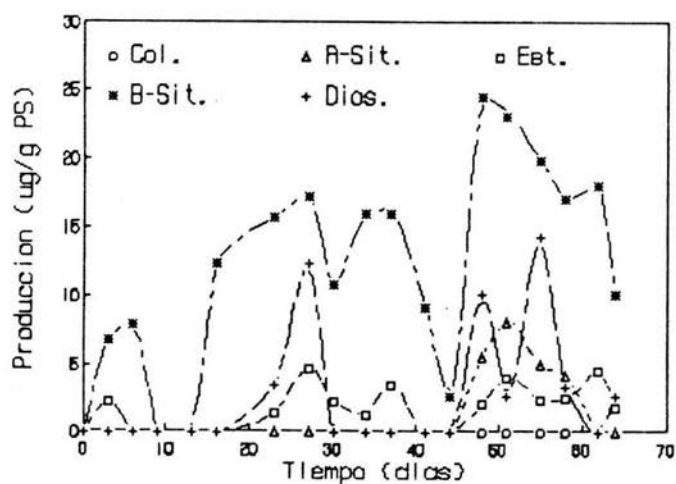
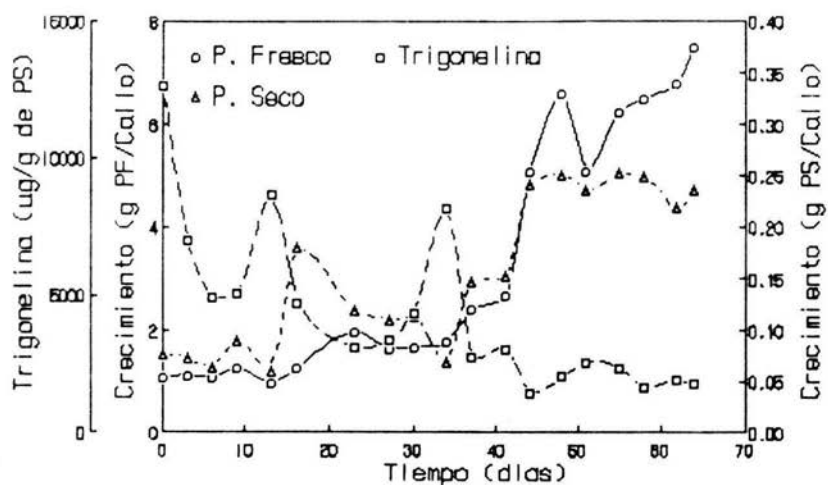


FIGURA 10. CINETICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE TRIGONELINA (A), SAPOGENINAS Y ESTEROLES (B) DE CALLOS DE *Trigonella foenum-graecum* L. EN MEDIO MS.

Este estudio se realizó a 1,600 lux a 27 ± 1 °C

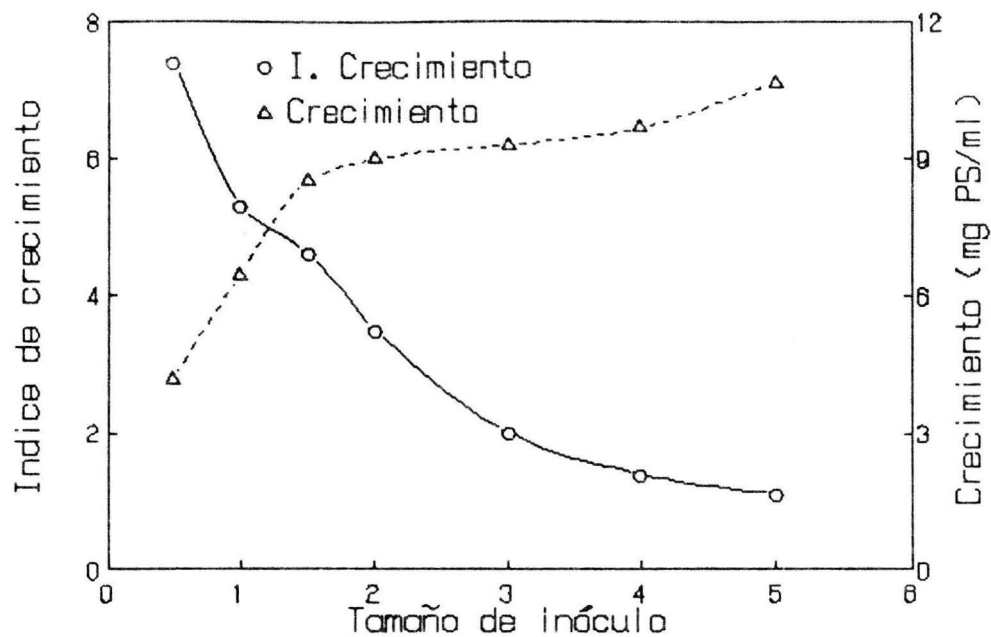


FIGURA 11. INFLUENCIA DE DIFERENTES TAMAÑOS DE INOCULO SOBRE EL CRECIMIENTO DE CELULAS EN SUSPENSION DE *Trigonella foenum-graecum* L. EN MEDIO MS.

Este estudio se realizó a 27 ± 1 °C y 8,400 lux, los cultivos se evaluaron por triplicado a los 15 días.

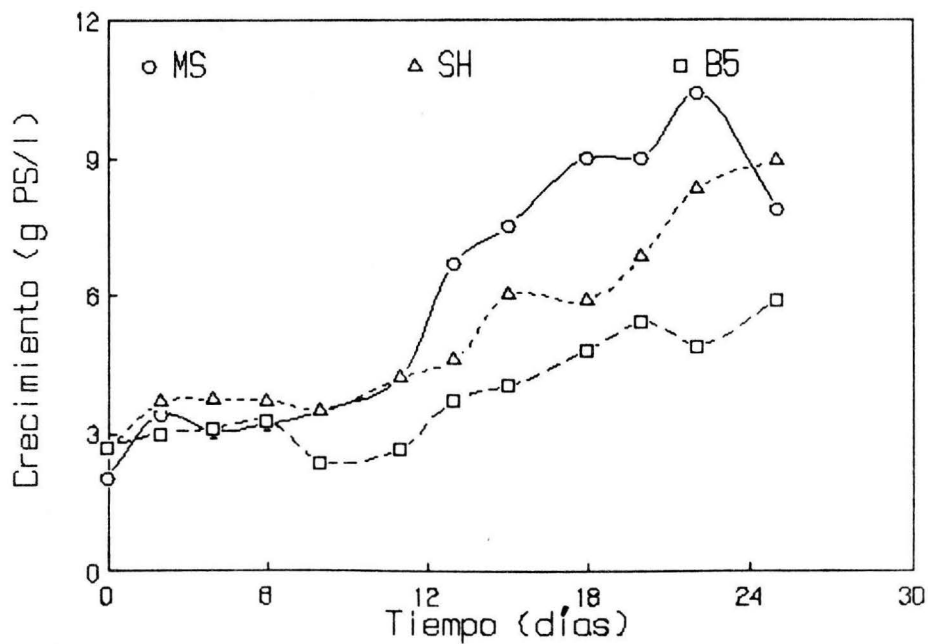


FIGURA 12. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE CELULAS EN SUSPENSIÓN DE *Trigonella foenum-graecum* L. EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.

Este estudio se llevó a cabo a 27 ± 1 °C a 8,400 lux.

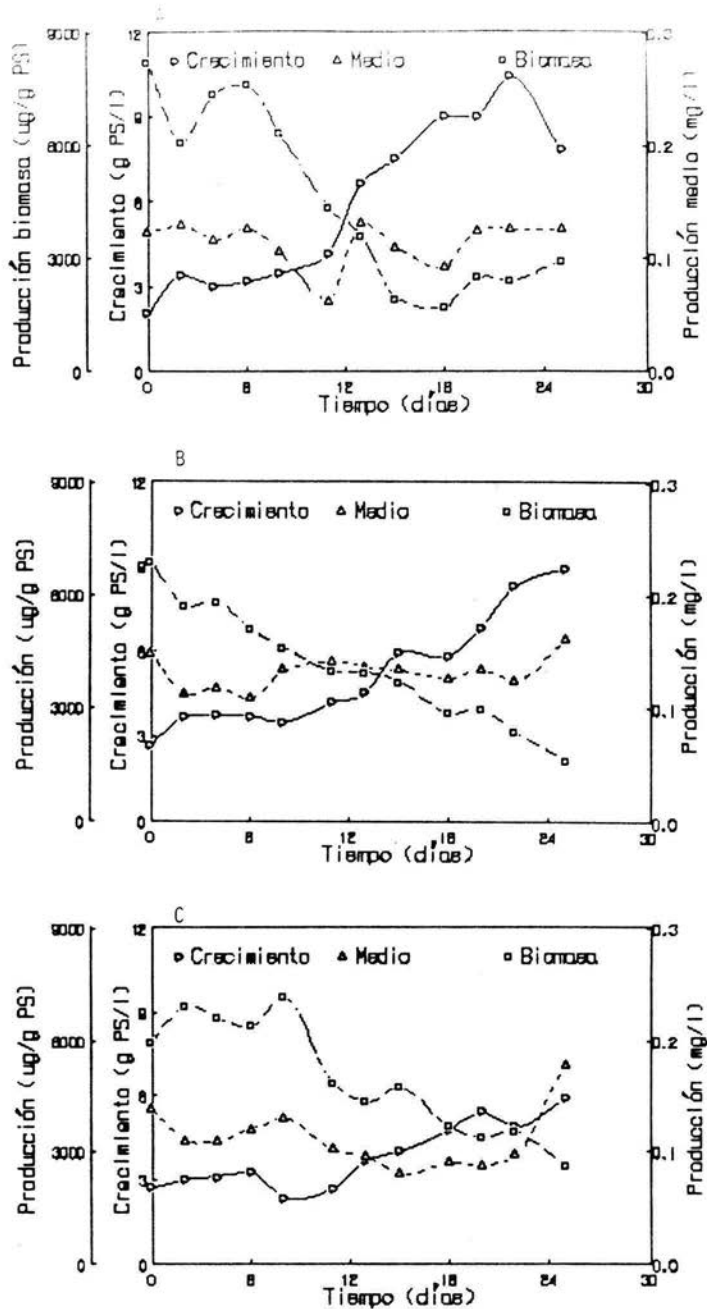


FIGURA 13. DISTRIBUCION DE TRIGONELINA EN MEDIO Y BIOMASA DE CELULAS EN SUSPENSION DE *Trigonella foenum-graecum* L. EN LOS MEDIOS MS(A), SH(B) Y B5(C).

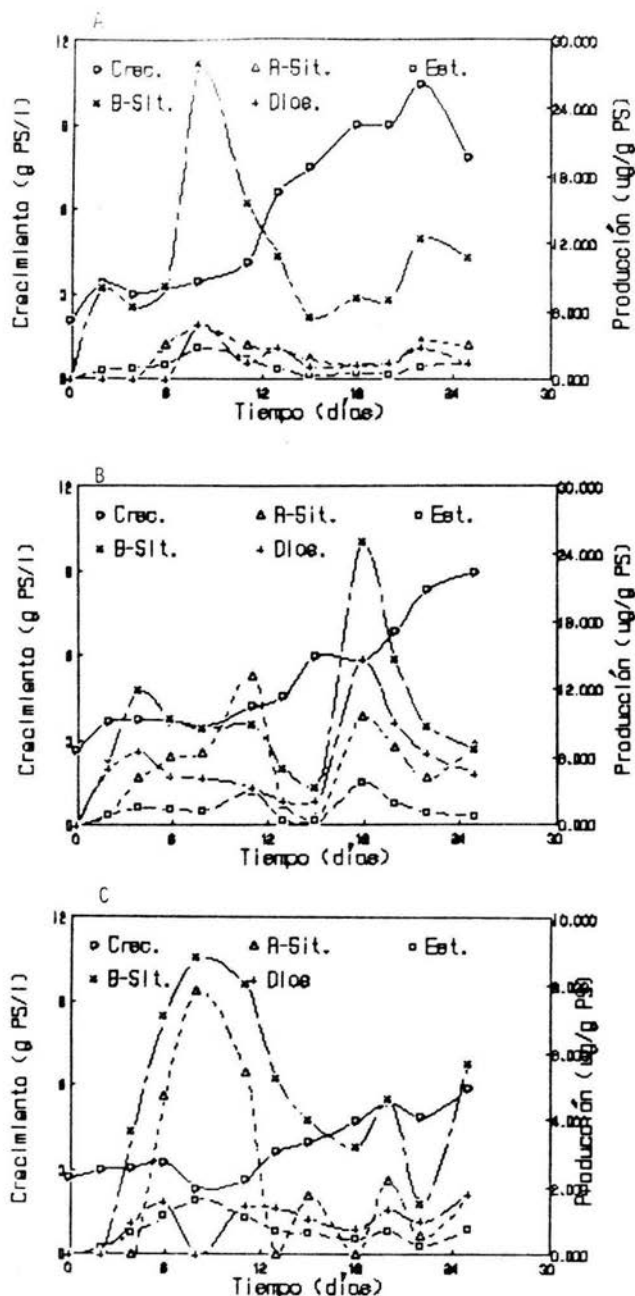


FIGURA 14. CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE ESTEROLES Y SAPOGENINAS DE CELULAS EN SUSPENSIÓN DE *Trigonella foenum-graecum* L. EN LOS MEDIOS MS(A), SH(B) Y B5(C).

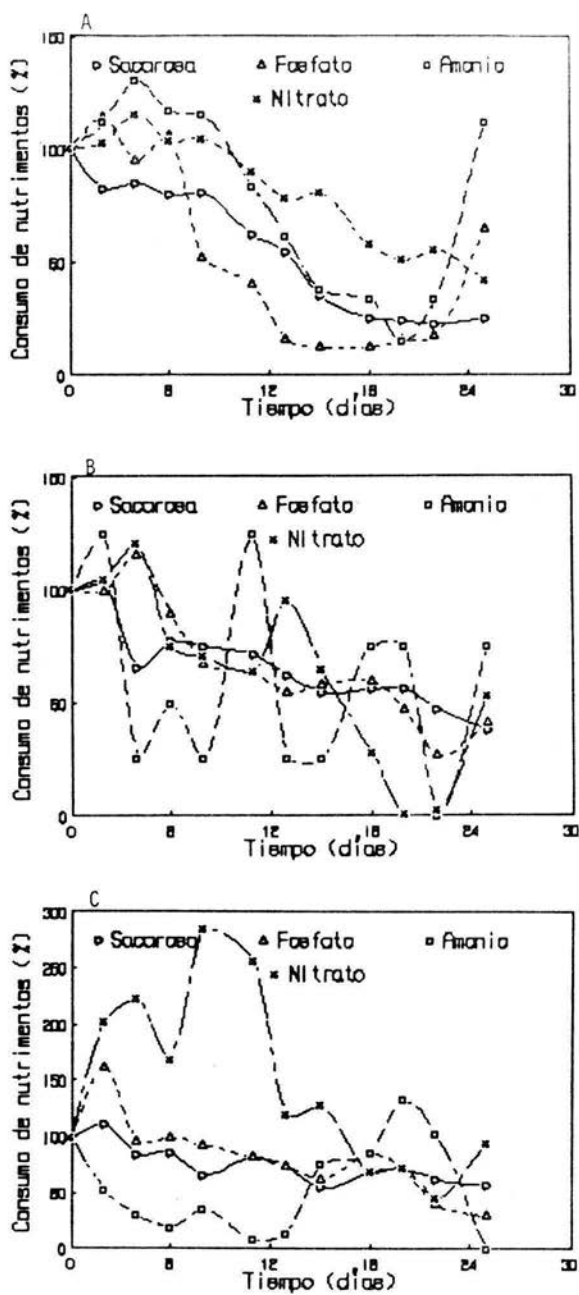


FIGURA 15. CINETICA DE CONSUMO DE NUTRIENTES DE CELULAS EN SUSPENSION DE *Trigonella faenum-graecum* L. EN LOS MEDIOS MS(A), SH(B) Y B5(C).

12. BIBLIOGRAFIA

12. BIBLIOGRAFIA

Agarwal, K. y P. K. Gupta, 1983. Cytological studies in the genus *Trigonella* Linn. *Cytologia* 48(4) 771-780.

Aitchison, P. A., A. J. Macleod y M. M. Yeoman, 1977. Growth pattern in tissue (callus) cultures. In "Plant Tissue and Cell Culture". (Street, H. E. ed.) Blackwell scientific publication Oxford, Second edition, Botanical monograph, vol. II.

Antony, A., K. P. Gopinathan y C. S. Vaidyanathan, 1975. Biosynthesis of trigonelline in root callus cultures of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Indian Journal of Experimental Biology* 13: 39-41.

Arctander, S., 1960. Perfume and Flavour Materials of Natural Origin. Elizabeth, N. J., U.S.A.

Bakshi, V. M. y Y. K. Hamied, 1971. Isolation of diosgenin from fenugreek seeds. *The Indian Journal of Pharmacy*. (33)3 55-56.

Balandrin, M. F., J. A. Klocke, E. S. Wortele y Wm. H. Bollinger, 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228: 1154-1160. +

Bidwell, R. G. S., 1979. Fisiología Vegetal. A. G. T. Editor, 1ª Edición. D. F., México. —

Biondi, S y T. A. Thorpe, 1981. Requirements for a tissue culture facility. In: "Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture". T. A. Thorpe (ed). University of Calgary, Canada. Academic press. +

Brain, K. R. y G. B. Lockwood, 1976. Hormonal control of steroidal levels in tissue cultures from *Trigonella foenum-graecum*. *Phytochemistry* 15: 1651-1654.

Bremner, J. M., 1965. Inorganic forms of nitrogen. In: "Methods of Soil Analysis. P. 2. Chemicals and Microbiological Properties" (Balack, C. A. ed.) pp. 1179-1236. Amer. Soc. of Agron. Inc. Publishers, Madison Wisconsin, U. S. A.

Brown, D. C. W. y T. A. Thorpe, 1984. Organization of a plant tissue culture laboratory. In: "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. vol. 1, Laboratory Procedures and their Applications. Vassil, K. J., Academic Press, Inc., Florida, U. S. A.

Burgess, J., 1985. An Introduction to Plant Cell Development. Cambridge University (ed). Cambridge, England.

Calva, C. G. 1989. Establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Capsicum annuum* var. *annuum* para la producción de capsaicinoides en biorreactor. Tesis de Maestría. Realizada en el CINVESTAV. IPN D. F. México.

Carew, D. P. y E. J. Staba, 1965. Plant tissue culture: its fundamentals, application and relationship to medicinal plant studies. *Lloydia* 28: 1-26.

Casamada, R. S. M., 1977. Tratado de Farmacognosia. Editorial Científico Medica. D. F., México 188-190.

Constabel, K. 1984. Callus culture: induction and maintenance. In: "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants" (Vasil, K. J., ed) 1984 vol.1 Laboratory procedure and their applications. Academic press, Inc. Florida U. S. A.

Cornish, M. A., R. Hardman y R. M. Sadler, 1983. Hybridisation for genetic improvement in the yield of diosgenin from fenugreek seed. *Planta Medica* 48: 149-152.

De-Eknambul, W. y B. E. Ellis. 1984. Rosmarinic acid production and characteristics of *Anchusa officinalis* cell suspension cultures. *Planta Medica* 50(4) 346-350.

Dixon, A. R., 1985. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. In: "Plant Cell Culture One Approach." (Dixon, R. A., ED). J. R. L. Press; England.

Fazli, F. R. Y. y R. Hardman, 1971. Isolation and characterization of steroids and other constituents from *Frigonella foenum-graecum* L. *Phytochemistry* 10: 2497-2503.

Fowler, M. W., 1981. Plant cell biotechnology to produce desirable substances. *Chemistry and Industry* 4 April 229-233.

Fowler, M. M., 1984. Plant cell culture: natural products and industrial application. *Biotechnology and Genetic Engineering Review* 2: 41-67.

Fukui, H., N. Yoshikawa y M. Tabata, 1983. Induction of shikonin formation by agar in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. 22(11) p.p. 2451-2453.

Furia, T. E. y N. Bellanca, 1975. Fenaroli's Handbook of Flavour Ingredients. vol. 1, Second edition, C. R. C. press.

Gamborg, O. L.; R. A. Miller y K. Ojima, 1972. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.

Gamborg, O. L. y J. P. Shyluk, 1981. Nutrition, media and

characteristics of plant cell and tissue cultures. In: "Plant Tissue Cultures Methods and Applications in Agriculture." (Thorpe, T. A., ed). University of Calgary, Canada. Academic press.

Gamborg, O. L., 1984. Plant cell culture: nutrition and media. In: "Cell and Somatic Cell Genetics of Plants." vol. 1. Laboratory Procedures and their Applications. (Vassil, K. J., ed.). Academic press. Inc., Florida, U.S.A.

Ghosal, S., R. S. Srivastava, D. C. Chatterjee y S. K. Dutta, 1974. Fenugreekine, a new steroidal sapogenin-peptide ester of *Trigonella foenum-graecum* L. *Phytochemistry* 13: 2247-2251.

Girardon, P., Y. Sauvaire, J. C. Baccou y J. M. Bessiere, 1986. Identification of 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone in aroma volatiles of fenugreek seed *Trigonella foenum-graecum* L. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 19(1) 44-46.

Goodwin, T. W. y E. I. Mercer, 1983. Introduction to plant biochemistry . Second edition, Pergamon press, Great Britain, pp. 475-478.

Hardman, R. y R. G. Stevens, 1978. The influence of NAA and 2,4-D on the steroidal fractions of *Trigonella foenum-graecum* L. static cultures. *Planta Medica* 34: 414-419.

Jain, S. C., H. Rosemberg y S. J. Stohs, 1977. Steroidal constituents of *Trigonella occulta* tissue cultures. *Planta Medica* 31: 109-111.

Karawya, M. S., G. M. Wasel, H. H. Baghdad y N. M. Ammar, 1980. Mucilaginous contents of certain Egyptian plants. *Planta Medica* 38: 73-78.

Kato, K.; T. Matsumoto; A. Koiwai; S. Mizusaki; K. Nishida; M. Noguchi y E. Tamaki, 1972. Liquid suspension culture of tobacco cells. *Proc. N. IFS: Ferment. Technol. Today*. pp. 689-695.

Khanna, P y S. C. Jain, 1973. Diosgenin and tigogenin from *Trigonella foenum-graecum* tissue cultures. *Lloydia* 36(1) 96-98.

Khanna, P., S. C. Jain y R. Bansal, 1975. Effect of cholesterol on growth & production of diosgenin, gitogenin, tigogenin & sterols in suspension cultures. *Indian Journal Experimental Biology* 13(2) 211-213.

King, J. P., 1984. Induction and maintenance of cell suspension cultures. In: "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants" (Vassil, K. J., ED.) 1984 vol.1. Laboratory Procedure and their Applications. Academic press, Inc., Florida, U. S. A.

- Kokate, C. K. y S. S. Radwan, 1979. Mucilage in callus cultures of higher plants. *Phytochemistry* 18: 662-663.
- Lindeverg, D. y L. Ernst, 1957. Determination of organic phosphorus compounds by phosphate analysis. *Methods of Biochemical Analytical* 3: 7-9.
- Loewis, F. A., 1952. Improvement in anthrona method for determination of carbohidratos. *Analytical Chemistry* 24: 219.
- Madar, Z., 1984. Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) as a means of reducing posprandial glucose level in diabetic rats. *Nutrition Report International* 29(6) 1267-1273.
- Martindale, 1982. The Extra Pharmacopeia. 28th ed. Pharmaceutical press, pp. 1710. London.
- Mavituna, F., A. K. Wilkinson y P. D. Williams, 1987. Liquid-liquid extraction of a plant secondary metabolic as an integrated stage with bioreactor operation. In: Separations for Biotechnology, (Verral, M. S. and M. J. Hudson eds.). Society of Chemical Industry. London.
- Merino, M. M. E., 1987. Medio de cultivo. En: "Cultivo de Tejidos Vegetales" Editorial Trillas, D. F., México.
- Merory, J., 1968. Food flavourings composition, manufacture and use. Second edition, The Avi Publishing Company, Inc.
- Murashige, T. y F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth an bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Ogino, T. N., Hiraoka y M. Tabata, 1978. Selection of high nicotine-producing cell lines of tobacco callus by single-cell cloning. *Phytochemistry* 17: 1907-1910.
- Petiard y Bariaud-Fontanel, 1985. El cultivo de Células Vegetales. *Mundo Científico* 7(71) 730-736.
- Radwan, S. S. y C. K. Kokate, 1980. Production of higher level of trigonelline by cell cultures of *Trigonella foenum-graecum* than by the differentiated plant. *Planta* 147: 340-344.
- Rosenthal, G. A., 1986. The Chemical defenses of higher plants. *Scientific American* 254(1).
- Sankarikutty, S.; M. A. Sumathykutty; A. V. Bhat y A. G. Mathew, 1978. Studies on extraction of oils and oleoresins from cumin, fennel y fenugreek. *Indian Spices & Cococ Journal* 11(2) 25-30.

Santos, A. V. P. Dos, M. R. Davey y E. C. Cocking, 1983. Cultural studies of protoplasts and leaf callus of *Trigonella corniculata* and *T. foenum-graecum*. Z. Pflanzenphysiol Bd. 109S 227-234.

Saunders, R., P. S. J. Cheetman y R. Hardman, 1986. Microbial transformation of crude fenugreek steroids. Enzyme Microbiological Technology 9: 549-555.

Sauvaire, Y. D., J. C. F. Baccou y K. Kobrehel, 1984. Solubilization and characterization of fenugreek seed proteins. Journal Agricultural Food Chemistry 32(1) 41-47.

Sauvaire, Y. D., P. Girardon, J. C. F. Baccou y A. M. Risterucci, 1984. Changes in growth, proteins and free amino acids of developing seed pod of fenugreek. Phytochemistry 23(3) 479-486.

Seabrook, J. E. A., 1980. Laboratory culture. In: "Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals" (Staba, E. J., ed). C. R. C. press, Boca Raton, Florida, U. S. A.

Schenk, R. V. y A. C. Hildebrandt, 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany 50: 199-204.

Shankaracharya, N. B. y C. P. Natarajan, 1972. Fenugreek chemical composition and uses. Indian Spices 9(1) 2-12.

Sharma, R. D., 1984. Hypocholesterolemic activity of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) an experimental study in rats. Nutrition Reports International 30(1) 221-231.

Sharma, R. D., 1986. An evaluation of hypocholesterolemic factor of fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum*) in rats. Nutrition Reports International 33(4) 669-677.

Singhal, P. C., R. K. Gupta y L. D. Joshi, 1982. Hypocholesterolemic effect of *Trigonella foenum-graecum* (Methy) Current Science 51(3) 136-137.

Stafford, A., P. Morris y M. W. Fowler, 1986. Plant cell biotechnology: a perspective. Enzyme Microbiological Technology 8: 578-587.

Street, E. H., 1977. Cell (suspension) cultures techniques. In: "Plant Tissue and Cell Culture". (Street, E. H., ed). Blackwell scientific publication, Oxford. Second edition. Botanical monograph, vol. II.

Tabata, M., 1977. Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures. In: "Plant Tissue Culture and

It's Biotechnology Application" (Barz, W. E., Reinhard M. H. y Zenk eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 3-16.

Tal, B., J. S. Rokem y I. Goldberg, 1984. Timing of diosgenin appearance in suspension cultures of *Dioscorea deltoidea*. *Planta medica* 50, 239-241.

Trugo, C. L., R. Macrae y J. Dick, 1983. Determination of purine alkaloids and trigonelline in instant coffee and other beverages using high performance liquid chromatography. *Journal Science Food Agricultural* 34: 300-306.

Varshney, I. P. y S. C. Sharma, 1966. Saponins and sapogenins: part XXXII. studies on *Trigonella foenum-graecum* L. seeds. *Journal Indian Chemistry Society* 43(8) 564-567.

Vikery y Vikery, 1981. *Secondary Plant Metabolism*. The MacMillan press, LTD. London and Basingtoke, pp. 1-19.

Wagner, F. y H Vogelman, 1977. Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. In: "Plant tissue culture and its biotechnology applications" (Barz W., E. Reinhard and M. H. Zenk Eds.) pp. 245-252. Springer Verlag. New York, U. S. A.

Wain, R. L., 1980. El control químico del crecimiento de las plantas. En : "Los reguladores de plantas y de los insectos" (Ondarza, N. R. ed.) p. p. 475-478.

Wallis, T. E., 1960. *Textbook of Pharmacognosy*. J & A Churchill LTD, Fourth edition, pp. 222-223, London.

Westcott, R. J. y Henshaw, 1976. Phenolic synthesis and phenilalanine ammonia-lyase activity in suspension cultures of *Acer pseudoplatanus* L. *Planta* 131 67-73.

Whitaker, R. J. y D. A. Evans, 1987. Plant biotechnology and the production of flavour compounds. *Flavour trends & technologies*. *Food Technology Sep.* 1987 (Donald E. Pszczola, ed.).

Willeke, V. V., Heeger, M. Meise, H. Neuhann, I. Schinndelmeise, K. Vordemfelde y W. Barz, 1979. Mutually exclusive occurrence and metabolism of trigonelline and nicotinic acid arabinoside in plant cell cultures. *Phytochemistry* 18: 105-110.

Yeoman, M. M., K. Miedzybrodzka, Lindsey y W. F. Mclauchlan, 1980. The synthesis potential of cultured plant cells. In: "Plant Cell Cultures Results and Perspectives" (F. Sala B., R. Parisi, R. Cells y O. Cifferi, eds.). Elsevier Noth-Holland, Biomedical Press, New York. U.S.A. pp. 327-343.

Yeoman, M. M. y A. J. Macleod, 1977. Tissue (callus) cultures

techniques. In: "Plant Tissue and Cell Culture" (Street, H. E. ed) Blackwell scientific publication, Oxford, second edition, Botanical monoghrاف, vol. II.