



03072 4  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL  
Y DE POSGRADO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

SEDE: FACULTAD DE QUÍMICA

ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES  
DE CULTIVO *in vitro* DE DIVERSOS EXPLANTES DE  
*piqueria trinervia cav* PARA LA PRODUCCIÓN  
DE PIQUEROL A.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA  
P R E S E N T A ;  
Q.I. ARELI FLORES MORALES

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL Y GENETICA DEL JARDIN BOTANICO DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA DE LA U.N.A.M. Y EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES DEL INSTITUTO DE QUIMICA DE LA U.N.A.N., BAJO LA DIRECCION DEL DR. MANUEL JIMENEZ ESTRADA Y EL APOYO DEL COMITE TUTORIAL INTEGRADO POR EL DR. ABRAHAM RUBLUO ISLAS, Y M.C. FERNANDO GARCIA.

## **AGRADECIMIENTOS**

QUIERO EXPRESAR MI MAS PROFUNDO AGRADECIMIENTO, PRINCIPALMENTE A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE DE UNA U OTRA FORMA AYUDARON A LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO.

A LOS DOCTORES MANUEL JIMENEZ ESTRADA Y ABRAHAM RUBLUO ISLAS POR EL APOYO Y DISPOSICION QUE SIEMPRE MOSTRARON PARA EL DESARROLLO Y CULMINACION DE LA PRESENTE INVESTIGACION.

A LA DRA. AMELIA FARRER, A LOS DOCTORES CARLOS ARIAS, MIGUEL LARA Y VICTOR M. CHAVEZ. POR SU AMABLE DISPOSICION Y SUS VALIOSAS APORTACIONES PARA ESTE TRABAJO.

A MIS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL Y GENETICA Y DEL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES, ASI COMO AL PERSONAL DEL INSTITUTO DE QUIMICA, POR SU APOYO Y AYUDA CONSTANTE.

**EL PRESENTE TRABAJO ESTA DEDICADO  
ESPECIALMENTE A MI PEQUEÑA HIJA NUTZEL.**

**A MIS PADRES Y HERMANOS**

## INDICE

CONTENIDO	PAGINA
ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCION	5
ANTECEDENTES	7
-Clasificación y distribución de la planta	7
- Propiedades medicinales de la planta <i>Piqueria trinervia Cav.</i>	7
- Estudios fitoquímicos de <i>Piqueria trinervia Cav</i> y confirmación de la estructura química del piqueroí A.	8
- Actividad biológica de la planta.	9
- Aplicación de la Biotecnología Vegetal en la producción de metabolitos secundarios.	11
- Estudios biotecnológicos de la familia Compositae.	18
OBJETIVOS	20
DESARROLLO EXPERIMENTAL	21
DISCUSION DE RESULTADOS	31
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	55
ANEXO (TABLAS Y FIGURAS)	57
BIBLIOGRAFIA	61

#### ABREVIATURAS EMPLEADAS

2,4-D	ACIDO 2,4-DICLOROFENOXIACETICO
ANA	ACIDO NAFTALEN ACETICO
4-CPA	ACIDO 4-CLOROFENOXIACETICO
K	CINETINA (6-FURFURIL AMINO PURINA)
MS	MEDIO DE CULTIVO DE MURASHIGE AND SKOOG (1962)
KC	MEDIO DE CULTIVO KNUDSON C. (1946)
PF	PESO FRESCO
Ps	PESO SECO
TLC	CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA
CG	CROMATOGRAFIA DE GASES
<sup>1</sup> HRMN	RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE PROTONES

## RESUMEN

Los esfuerzos para producir agroquímicos de origen natural han conducido a la búsqueda y desarrollo de nuevos productos de especies vegetales potencialmente útiles y que tengan actividad biológica, como alelopatía, insecticida, atrayentes sexuales, etc. Un ejemplo de ello es la planta *Piqueria trinervia Cav* (Compositae) la cual presenta la propiedad de alelopatía sobre diversas especies silvestres. De ésta se extrae un monoterpeno denominado piquerol A, que se ha probado que posee actividades biológicas como molusquicida, garrapaticida, insecticida e inhibidor de la germinación de especies silvestres y agronómicas, por lo que se propone emplearlo como agroquímico de origen natural.

El presente trabajo se orientó hacia analizar la potencialidad de la biotecnología vegetal para la producción de un compuesto de interés sin que se destruyan las poblaciones silvestres, es decir, en la búsqueda de rutas que conduzcan a un desarrollo sustentable. Para lograr esto se enfocó la investigación hacia el estudio del efecto de las hormonas, composición del medio nutritivo y condiciones ambientales de cultivo para la inducción de callo y células en suspensión provenientes de diversos explantes de *Piqueria trinervia Cav*, así como a la producción de piquerol A. Para ello se emplearon como explantes hoja, entrenudo y secciones de raíz, 2,4-D como auxina y K como citocinina, solas o combinadas, cuatro niveles de concentración de 0 a 3 mg/l. Se empleó medio MS como medio basal y se incubaron los explantes en condiciones de fotoperíodo y oscuridad

Los resultados iniciales mostraron que había producción de callo y de estructuras globulares, las cuales sufrieron un proceso de oxidación. Para evitar este fenómeno se emplearon el medio nutritivo KC y los antioxidantes ácido ascórbico y nor-leucina y se incubaron los cultivos en oscuridad. Para inducir la proliferación de callo se empleó la auxina 4-CPA en niveles de concentración de 1 y 2 mg/l y 2,4-D en 0.5 mg/l y cinetina (K), en concentración de 1 y 2 mg/l.

Las mejores condiciones para la producción de callo *P. trinervia Cav.*, son: Explante entrenudo, medio de cultivo MS, adicionado de 2 mg/l de K cultivados en condiciones de fotoperíodo (2000 lux, 16 hrs luz y 8 hrs oscuridad), la cantidad de biomasa registrada fue de 3713.34 mg Pf y para la producción de piquerol A fue cuando el explante procedente de entrenudo se cultivo en medio nutritivo MS, adicionado de 3 mg/l, la cantidad del metabolito cuantificada fue de K de 0.345 y 0.42 mg/mg Pf y en la combinación de 1 mg/l de 2,4-D y 3 mg/l de K se cuantificó una cantidad de 0.27 mg/mg Pf

La identidad del compuesto fue evaluada por IHRMN en cultivo de células en suspensión, el cual fue excretado por las células al medio de cultivo, obteniéndose de  $1.44 \times 10^{-2}$  a  $7.0 \times 10^{-2}$  mg/ml de medio.

Con estos resultados se demuestra que es factible la producción sustentable de un metabolito de interés, al tiempo que se protegen las poblaciones silvestres de una eventual depredación, dejando abiertas las posibilidades para una optimización de la producción de piquerol A que después de un escalamiento pueda alcanzar una producción industrial.

## I. INTRODUCCION

La mayoría de las plantas superiores producen sustancias de gran valor económico, como aceites, fragancias, colorantes aditivos, fármacos y pesticidas. Muchos de éstos son metabolitos secundarios, los cuales no tienen ninguna función fisiológica aparente, pero establecen una interacción entre planta y medio ambiente (Balandrín y col., 1985).

Sin embargo, de las miles de especies de plantas clasificadas, realmente existen pocas que ya se han caracterizado químicamente y una cantidad mínima de compuestos químicos (metabolitos secundarios) han sido analizados para probar su actividad biológica. Esto abre la posibilidad para investigar nuevos productos de interés aplicables en diferentes áreas, como alimentos, perfumería, farmacéuticos y agroquímica.

Ante este hecho, muchas de las especies con principios potencialmente activos se pueden encontrar en peligro de extinción debido a diversas causas como son la sobreexplotación irracional, trastornos del medio ambiente, cambios de clima, presencia de plagas, etc. De ahí que se haya incrementado el interés sobre la posibilidad de producir metabolitos secundarios en condiciones controladas empleando las técnicas de la biotecnología vegetal, tales como sistemas de cultivo de células en suspensión, tejidos u órganos vegetales.

Esta tecnología crea la posibilidad de un mejoramiento en la producción a gran escala de metabolitos secundarios mediante la manipulación de los factores que intervienen en la diferenciación celular como son los componentes del medio nutritivo, reguladores de crecimiento y las condiciones de cultivo entre otras. A la fecha la explotación industrial de los cultivos de tejidos de plantas está limitada por el poco conocimiento de los fenómenos como es la relación entre el crecimiento celular con la acumulación de metabolitos secundarios, entre otros (Morris y col., 1986).

Sin embargo, las técnicas biotecnológicas han sido aplicadas únicamente a metabolitos secundarios obtenidos a partir de plantas que son cultivadas solo por su valor agregado y su importancia industrial y en aquellas que presentan compuestos con actividad biológica (Tabata, 1977 y Balandrín y col., 1985). Loyola y col. (1990) presentan casos de cultivo de tejidos vegetales de plantas que producen metabolitos secundarios en cantidades similares o mayores que en la planta completa. No obstante, la mayor parte de esos sistemas tienen un valor comercial limitado, o bien no son competitivos con otras metodologías existentes. Tal es el caso de los fitoquímicos de importancia, como son los alcaloides morfnicos y glucósidos cardíacos, aceites esenciales y los pesticidas naturales. Estos últimos aún no se pueden producir por cultivo de tejidos vegetales en suspensión en niveles que se aproximen al que produce la planta y desafortunadamente esta metodología no es aplicable a todas las especies vegetales (Flores y col., 1989).

Sin embargo la perspectiva de desarrollar nuevos sistemas experimentales para el estudio del metabolismo secundario en los que se pueda relacionar la dediferenciación morfológica con la bioquímica para aquellos productos que puedan ser potencialmente útiles como fuentes potenciales de nuevos productos naturales, abren una atractiva área de investigación, particularmente en el desarrollo de nuevos agroquímicos.

En base a estos antecedentes, surge el interés por desarrollar a partir de las técnicas biotecnológicas un sistema para la producción de productos de interés sin destruir los recursos genéticos. La figura 1 muestra las estrategias a seguir en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales para el uso sustentable de especies productoras de metabolitos de interés (Rubluo y col. en preparación).

El piquerol A es un compuesto al que se le han encontrado diversas actividades biológicas (tabla 1), lo que le confiere tener una potencial aplicación tanto en el área de la medicina como en las actividades agrícolas pues se podría emplear como pesticida o como conservador de especies agrícolas en almacén y transporte.

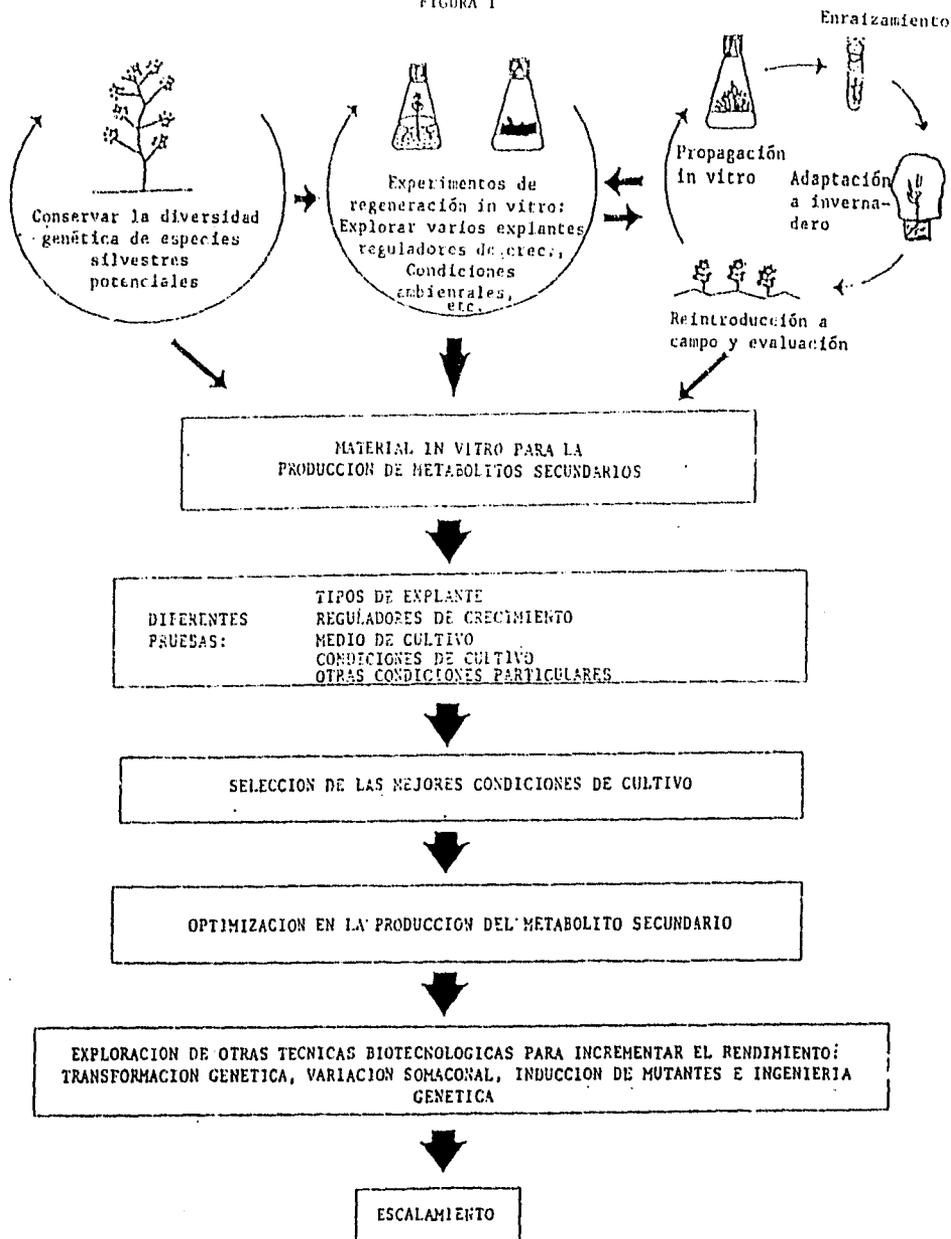
Por lo tanto, en el presente trabajo se propone establecer las condiciones de cultivo *in vitro* de la planta *Piqueria trinervia Cav* para la obtención de piquerol A. Se analizó el efecto que sobre diversos explantes ejercen los reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones adicionados al medio basal y probando dos condiciones ambientales de cultivo y así lograr la expresión del metabolito de interés en condiciones *in vitro*.

TABLA 1

APLICACIONES POTENCIALES DEL PIQUEROL A.

EFECTO CONFIRMADO	REFERENCIAS
EFEECTO ALELOPÁTICO	GONZALEZ DE LA PARRA Y COL. 1981
ACTIVIDAD MOLUSQUICIDA	CRUZ REYES Y COL. 1989
ACTIVIDAD ACARICIDA <i>Boophilus microplus</i>	GONZALEZ DE LA PARRA Y COL. 1991
ACTIVIDAD CONTRA EL <i>Tripanosoma cruzi</i>	CASTRO Y COL. 1992
ACTIVIDAD INSECTICIDA	JIMENEZ Y COL. 1991
ACTIVIDAD INHIBITORIA EN LA GERMINACION DE SEMILLAS Y RAICES DE ESPECIES DE INTERES ECONOMICO	GONZALEZ DE LA PARRA Y COL. 1980

FIGURA 1



METODOLOGIAS BIOTECNOLOGICAS PARA LA OBTENCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS POTENCIALES Y TRATAMIENTO A ESPECIES SILVESTRES

Rubluo y Col. (1994). En preparación.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Clasificación y distribución.

La planta *Piqueria trinervia* Cav., pertenece a la familia Compositae, de la tribu Eupatorieae, es una herbácea la cual crece en poblaciones más o menos puras y tiene una altura aproximada de 1 m. Es altamente ramificada con pocas hojas opuestas, estrechamente lanceoladas y acuminadas, con tres nervios bien visibles que es lo que caracteriza a la especie *P. trinervia*. La inflorescencia es eimosa, corimbosa y tiene cuatro flores blancas como cabezuela.

Esta especie es nativa de México, América central y Haití. En México se encuentra ampliamente distribuida en diversos estados de la República, por lo cual es conocida popularmente con diversos sinónimos (Paray, 1953):

- Hierba de San Nicolás (Valle de México y Jalisco).
- Hierba del tabartillo (Valle de México).
- Hierba del perro (Chiapas).
- Hierba del zopilote (Molango, Hidalgo).
- Xoxonitsal y Xoxonitzac (Mesa Central).
- Tzotzoniztale (Morelos).
- Cuimic (Tabasco y Michoacan)
- Xexenitzal.
- Yoloxitlic.
- Alta Reina (Taxco, Guerrero).
- Empueshte (Otomí, México).
- Caupopolchi (Teloloapan, Guerrero).

Esta planta ha sido cultivada como planta ornamental, se utiliza en arreglos florales y los agricultores la conocen con el nombre erróneo de *Stevia serrata*.

Crece en zonas templadas y tropicales de México, se le encuentra en lugares abiertos y soleados, raramente se localiza en los bosques sombreados. En el Valle de México se le encuentra a una altura de 2500 m de altitud.

Florece abundantemente en los meses lluviosos de Julio a Octubre. Frecuentemente se encuentra esta especie como pionera de la sucesión secundaria que sigue al abandono de los campos agrícolas (Robinson., 1906 y Paray., 1953 ).

### 2.2. PROPIEDADES MEDICINALES DE LA PLANTA *Piqueria trinervia* Cav.

Paray (1953) describió que *Piqueria trinervia* Cav. era usada en la medicina popular para combatir el tifo y en tratamientos de cálculos biliares. Tradicionalmente se utiliza en varias regiones del país, como antimalárico, antipirético, antirreumático y contra el paludismo. En nuestros días se sigue usando para curar algunos de estos padecimientos.

### 2.3. ESTUDIOS FITOQUIMICOS DE *Piqueria trinervia Cav.*, Y CONFIRMACION DE LA ESTRUCTURA QUIMICA DEL PIQUEROL A.

Desde el siglo pasado *Piqueria trinervia Cav.* ha sido objeto de estudios sobre su composición química. En 1890 González aisló una resina, un tinte, un aceite esencial, una goma y otras sustancias no determinadas incluyendo un compuesto que determinó como un alcaloide.

Posteriormente en 1968, Bohlmann y Zdero aislaron (-)alfa - santanal (1), un terpeno de bajo peso molecular. En 1978, Bohlmann y Suwita reportaron la presencia de compuestos terpenoides.

Romo y col., (1970) aislaron el acetato de carquejilo (2) y dos monoterpenos diastereoisómeros llamados Piquerol A (3) y Piquerol B (4) de las partes aéreas de la planta. Estos últimos se extrajeron de diferentes poblaciones de *Piqueria trinervia Cav.*

En 1977 Bohlmann y Suwita aislaron un terpeno con esqueleto similar al carquejilo (5a). Al mismo tiempo González y Jiménez,(1977) aislaron e hicieron el estudio químico del trinervinol (6), el cual tiene un sistema tricyclico que se propuso con esqueleto del rosano.

En 1981 R. Sangaiah y Krishna hicieron una revisión de la estructura asignada a otro monoterpeno aislado por Bohlmann y Suwita realizando la síntesis de los éteres metílicos derivados del fenólico (5a) y (5b).

En 1983 Jiménez y González establecieron la estructura química del trinervinol por datos espectroscópicos como el isopinara-8 (14)-en-3-b,15,16,17-tetraol (6)

En 1983 Soriano y Jiménez por estudios de rayos X confirmaron la estructura molecular del piquerol A y establecieron su estructura cristalina (7).

En 1984 Rubio y Jiménez realizaron un estudio de la estructura electrónica del Piquerol A y Piquerol B, cuyo objetivo principal fué determinar la correlación de su estructura con las propiedades químicas y biológicas que manifiesta (8 y 9).

En 1985 Chavarin y Jiménez realizaron modificaciones químicas al piquerol A por reacciones de esterificación y de eterificación y establecieron que se produce un cambio de conformación del anillo de seis miembros al sustituir los hidrógenos de los grupos hidroxilo por grupos más voluminosos. Finalmente un análisis más detallado de este comportamiento fue realizado por Jiménez y col. (1986) quienes establecieron la conformación preferida del piquerol A (9) y la de sus derivados.

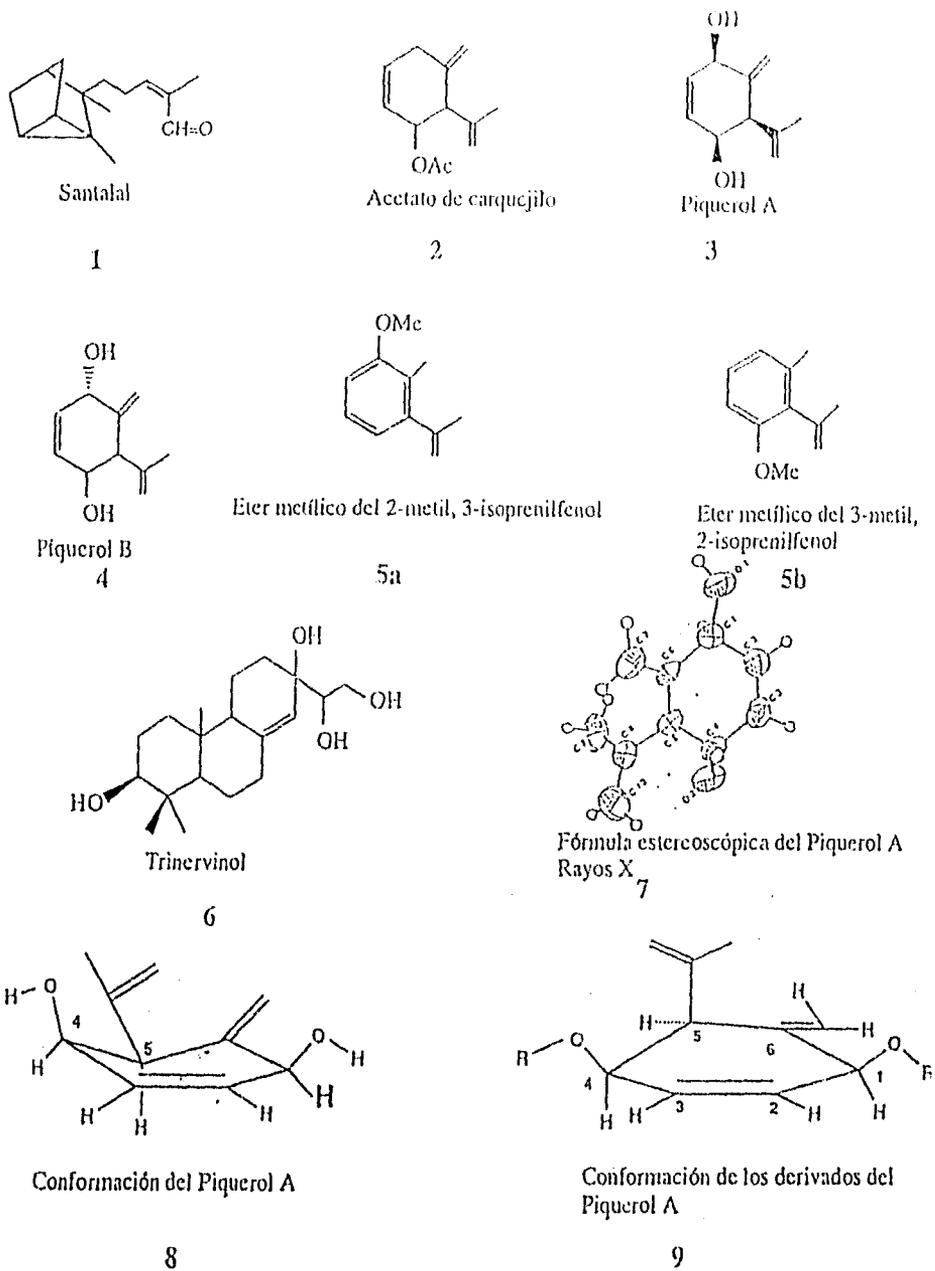


Figura 2. Metabolitos secundarios aislados de *Piqueria trinervia*, Cav y fórmulas que confirman la estructura química del Piquerol A.

#### 2.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

La planta *Piqueria trinervia* Cav. crece aislada formando poblaciones más o menos puras, lo cual sugiere la posibilidad de que tenga acción alelopática al inhibir el crecimiento de otras especies a su alrededor. González de la Parra y col., (1981) describen los bioensayos que hicieron para probar el efecto alelopático del Piquero A y Piquero B, demostrando que inhiben la germinación de las semillas de especies que se desarrollan en las zonas en la que crece *P. trinervia*. Se probó esa actividad en semillas de 6 especies de pastos y el porcentaje de inhibición fue alto, del 50 al 100 %. Las concentraciones de piquero que se utilizaron fueron de 50, 100, 150 y 200 mg/l. En el mismo ensayo el piquero A mostró ser más activo en la inhibición del crecimiento de raíces, mientras que el piquero B tuvo un efecto inhibitorio en el crecimiento del tallo pero en las raíces fue nulo e incluso estimuló su desarrollo a muy bajas concentraciones. El extracto de la hoja causó una inhibición de 50 a 95 % en las radículas de las semillas probadas.

De igual forma se probó la actividad inhibitoria del piquero A (González de la Parra y col., 1980) en semillas de interés económico (frijol, maíz, trigo, pepino, rábano, acelga, col, nabo y cebolla) resultando que para todos los casos el piquero A es un potente inhibidor de la germinación en una concentración de 100 ppm, además de presentar una actividad de tipo reversible, lo que indica que el piquero A podría aplicarse como conservador en la latencia de las semillas lo cual sería útil para su almacenamiento y transporte. Igualmente el piquero A inhibe la formación de raíces de cebollas (Taboada, 1989) y ajos (Rubluo I. 1990) en concentraciones de 50 y 100 mg/l. Este efecto es de interés para la conservación de estas especies en almacén, como también para la conservación de germoplasma.

En 1990 Cruz y col., determinaron que la H-ATPasa, enzima de interés en el sistema de transporte de las membranas del protoplasto y plasma era inhibida por el monoterpeno piquero A y su derivado diacetato de piquero, pues el transporte y sistema enzimático localizado en la membrana celular puede ser un sitio posible de la acción de los productos naturales. Este efecto se probó con fracciones microsomales de *Ipomoea purpurea* L. Los resultados mostraron que el porcentaje de inhibición radicular fue total con 50 ppm de diacetil piquero y con piquero A fue de 72.9 %.

Cruz-Reyes y col. (1989) demostraron la acción del piquero A como molusquicida, probándolo con 8 especies de caracoles pulmonados y se observó que a una concentración mínima de 5 ppm, el porcentaje de mortalidad fue de 60 - 100 % y a una concentración de 50 ppm todos los ejemplares murieron en un período de 24 hrs. Por lo que el piquero A es considerado activo con el 90 % de las especies, por lo que podemos decir que el piquero A es un producto molusquicida de amplio espectro, ya que actúa sobre otros grupos de caracoles importantes, como son algunos limnácidos transmisores de fasciola hepática y también sobre parásitos de peces, aves y otros huéspedes gastrópodos de agua dulce transmisores de numerosas especies de tremátodos parásitos de peces, aves y otros huéspedes vertebrados.

Jiménez y col. en 1991 probaron la actividad insecticida del piquero A en larvas de *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero del maíz), cuyo porcentaje de mortalidad fue de 73.3% en dosis de 150 mg /4 ml. En larvas de *Aedes aegypti* (mosquito transmisor de la fiebre amarilla) en una concentración de 500 ppm causó el 100 % de mortalidad en 24 hrs., lo que motivo probarlo en larvas de *Culex quinquefasciatus* (mosquito doméstico) causando una mortalidad del 100 % en una dosis de 443 ppm en el tiempo de observación de 24 hrs.

González de la Parra y col. (1991) determinaron la actividad acaricida del piquerol A y piquerol B en garrapatas de *Boophilus microplus*. En México es el más común de los ectoparásitos que causa serios problemas en el sector ganadero y por lo tanto en la economía del país. Los resultados de los bioensayos probaron que ambos piqueroles A y B previenen la ovoposición. La actividad acaricida del piquerol A causa el 100 % de mortalidad en larvas de garrapatas en una concentración de 300 mg/ml, después de 3 días de observación. Este efecto es similar al que se produce por la actividad acaricida de compuestos sintéticos organofosforados como coumaphos y diazinon. De igual manera González de la Parra y col., probaron que la toxicidad de ambos piqueroles en el hombre es moderada.

González de la Parra y col., en 1992, probaron el efecto inhibitorio del piquerol A sobre el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* agente causante de Tripanosomiasis americana ó enfermedad de Chagas, la cual afecta a millones de personas en América Latina y Asia.

En el estudio *in vitro* de su posible inhibición de epimastigotes de *T. cruzi*, se emplearon diferentes concentraciones de Piquerol A. El efecto inhibitorio se presentó en una concentración de 200 mg/ml, en 4 días de observación, estos datos de concentración son similares a los reportados para Ofloxacin (compuesto sintético) que inhibe el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* en un 80 %.

## 2.5. APLICACION DE LA BIOTECNOLOGIA VEGETAL EN LA PRODUCCION DE METABOLITOS SECUNDARIOS.

La biotecnología vegetal actualmente permite el cultivo *in vitro* de cualquier parte de la planta desde una célula simple hasta un tejido u órgano bajo condiciones asépticas y controladas, lo cual induce al investigador a orientar las respuestas morfogénicas deseadas ya sea hacia la regeneración de plantas ó maximizar la producción y acumulación de metabolitos secundarios.

Entre las ventajas que hacen atractivo el cultivo de células vegetales para la obtención de metabolitos secundarios sobre los procedimientos tradicionales de cultivo cabe destacar lo siguiente:

- 1.-Independencia de los factores ambientales, tales como clima, pestes, situación geográfica, etc.
- 2.-Sistema de producción definido con mayores posibilidades de control (cuánto, cuándo y dónde).
- 3.-Producción más consistente en cuanto a la calidad y rendimiento del producto.
- 4.-Posibilidad de incrementar los rendimientos con respecto a los obtenidos por el cultivo de la planta completa.
- 5.-Finalmente el de evitar la destrucción de poblaciones de plantas silvestres o cultivadas, permitiendo el desarrollo de sistemas sustentables de producción.

Por lo tanto, la Biotecnología Vegetal permite establecer sistemas de producción estrictamente controlados debido al manejo de las condiciones de cultivo y dentro de los aspectos a considerar que son convenientes a revisar son:

### 2.5.1. ORIGEN DEL EXPLANTE.

Generalmente se considera que las células son totipotenciales, lo que quiere decir que cualquier célula debe poder producir las características de la planta madre en condiciones de cultivo apropiadas. Bajo este esquema se ha planteado por conveniencia el de iniciar los cultivos a partir de plantas con altos rendimientos. Sin embargo en la práctica los resultados reportados en diversos trabajos son contradictorios, aún en investigaciones de la misma especie. Por ejemplo Zenk y col., 1977 (Citado en Mantell, 1983) al estudiar la respuesta de *Catarantus roseus*, observaron que plantas hiperproductoras produjeron cultivos con altos rendimientos, en contraste con Roller, 1978 (Citado en Mantell, 1983) que no encontró relación alguna entre el contenido de serpentina en callos y el de las plantas de las que fueron originados. Sin embargo algunos reportes indican que bajo el principio de totipotencialidad cualquier parte de la planta, hojas, tallos, puntas ápicales, meristemas, etc., tienen un sistema de transporte o bien pueden ser el sitio de síntesis de metabolitos secundarios, por lo tanto es recomendable tomar como explante aquél que produzca una mayor cantidad del producto deseado.

### 2.5.2. FACTORES NUTRICIONALES.

El éxito de los métodos de cultivo *in vitro* es debido entre otros factores al mejor entendimiento de los requerimientos nutricionales de las células vegetales. Para satisfacer los requerimientos nutricionales de células cultivadas *in vitro* es necesario suministrarle cada uno de los componentes orgánicos e inorgánicos que requieren, factores que se discuten a continuación.

#### a).- MEDIO DE CULTIVO

Las condiciones de cultivo tanto físicas como químicas pueden ser manipuladas con el fin de permitir la expresión del metabolismo secundario de las plantas. Entre las condiciones químicas el principal factor involucrado para la obtención y expresión de metabolitos secundarios es el medio de cultivo y se clasifican en medios de crecimiento celular y medios de mantenimiento los cuales influyen en la síntesis del producto, ya que la formulación del medio no solamente afecta la iniciación del cultivo, sino también la velocidad de crecimiento en términos de productividad.

Los principales componentes del medio del cultivo son:

- a). Macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg y S)
- b). Micronutrientes (Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo y Co)
- c). Fuente de carbono (sacarosa, glucosa, etc.)
- d). Fuente de nitrógeno ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4$ , glutamato)
- e). Vitaminas y aminoácidos (tiamina y glicina, básicamente).

Para mantener un medio adecuado de cultivo de células el cual determinará la velocidad de la división celular es necesario agregar reguladores de crecimiento (George and Serrington, 1984).

#### b).- MACRO Y MICRONUTRIENTES.

El efecto de nutrientes empleados en el medio de cultivo asociados al crecimiento celular tanto del metabolismo primario como el secundario ha sido revisado por Dougall en 1980 (citado por Mantell, 1983) y considera principalmente a los siguientes:

**b.1) Fuente de nitrógeno.** Se ha reportado que la cantidad de nitrógeno ( $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ ) afecta la síntesis del metabolismo secundario, pero no hay un patrón consistente que emerja. Entre las diferentes fuentes de nitrógeno a varias concentraciones se ha utilizado una gran variedad de fuentes de nitrógeno en el medio de cultivo de células vegetales, desde fuentes inorgánicas como nitrato y amonio hasta una variedad de aminoácidos y mezclas complejas de éstos. Por ejemplo; la relación amonio/nitrato en el medio M9 para la producción de shikonina es 0/6.7, si ésta se cambia a 1/6.7, la síntesis disminuye más del 90 % sin afectar el crecimiento celular (Yazaki y col., 1987).

Figueiredo y col., (1991) consideran que la cantidad de nitrógeno en el medio es determinante en la producción de metabolitos secundarios y que la cantidad de amonio en el medio, en algunos casos puede ser tóxico para las células. Durzan y col., (1987) informan que en los cultivos de células en suspensión que crecen en un medio que contiene  $\text{NH}_4$  y  $\text{NO}_3$  como fuente de nitrógeno, la velocidad de absorción de amonio y nitrato depende de la concentración de potasio en el medio y determinan que a bajas cantidades de potasio hay una absorción más reducida de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ .

**b.2) Fuente de fosfatos.** Se ha reportado que la concentración de fosfato suministrado al medio de cultivo tiene un efecto en la formación de metabolitos secundarios, ya que el fosfato es asimilable durante los primeros días del ciclo de crecimiento, en donde inicialmente es almacenado en las vacuolas y posteriormente es distribuido para la división celular (Ukaji y col., 1987).

Knobloch y Berlin (1981 y 1983) al trabajar con cultivos de *Catarantus roseus* y *Nicotiana tabacum*, mostraron que bajos niveles de fosfatos en el medio de inducción incrementan la

producción de metabolitos secundarios, aumentando la triptamina, alcaloides indólicos, nicotina y fenoles. Recientemente se encontró que al incrementar la concentración de fosfato se induce y eleva la síntesis de antraquinona en *Guayule verum* (Strobel y col., 1990), mientras que el contenido de antocianinas no es afectado por la concentración de fosfato en *E. millii* (Yamamoto y col., 1989).

Por otro lado, se ha sugerido que el efecto general de usar bajos niveles de fosfatos, para la biosíntesis de metabolitos secundarios, pueden tener como resultado una disminución de las pozas de fosfato internas y este efecto baja la carga energética celular y desreprime la síntesis enzimática de los metabolitos secundarios (Loyola, 1990). Aunque también hay reportes que indican el efecto contrario, por ejemplo Matsumoto y Obi (1982) (Citado por Loyola, 1990) muestran que al incrementar tres veces la concentración de fosfato en cultivos de *C. roseus* se presentó un aumento en el crecimiento celular y contenido de digitoxina.

**b.3) Fuente de carbono.**- De forma general se ha demostrado que la naturaleza y la calidad de la fuente de carbono afectan el rendimiento del producto y de forma particular, el incremento en los niveles de sacarosa tienden a mejorar la síntesis del producto. Las mejores fuentes de carbono usadas son: sacarosa, glucosa, fructosa, lactosa, manosa y almidón (George and Sherrington, 1984).

En 1987, Smith y col. mostraron que el contenido de catarantina aumenta en presencia de sacarosa y se incrementa al doble con lactosa, esto también se presenta con la producción de antocianina en *Daucus carota* donde hay un ligero aumento en presencia con sacarosa y lactosa. Sin embargo, hay casos donde no se produce ningún cambio en el contenido del metabolito, como es el caso de *Digitalis purpurea* en donde en presencia de sacarosa, glucosa y arabinosa se encontró la misma cantidad de digitoxina (Hagimori y col. 1982).

Otro caso donde el nivel de concentración de sacarosa es determinante para la producción celular es en los cultivos de *Achillea millefolium*, pues altas concentraciones de sacarosa dan buen rendimiento de biomasa al inicio del cultivo pero disminuye progresivamente después de varios subcultivos (Figueiredo y col., 1991). Finalmente, Battat y col. (1989) mencionan que altos niveles de sacarosa promueven la producción de fenoles.

### 2.5.3. REGULADORES DE CRECIMIENTO.

Se sabe que los reguladores de crecimiento tienen un efecto sobre el metabolismo primario y secundario de las plantas, por lo que la gran mayoría de los cultivos celulares presentan un requerimiento absoluto de ellos. Una gran cantidad de estudios muestran que tanto los reguladores de crecimiento de tipo auxínico como el de tipo de citocininas y su concentración intervienen tanto en la diferenciación en el crecimiento de cultivos celulares como en la acumulación ó producción del metabolito. (Loyola, 1991).

El efecto de la auxina en la síntesis de metabolitos secundarios ha sido investigado en numerosas especies. En general el AIA, la auxina natural, parece ser la más favorable en la síntesis y acumulación de productos secundarios (Kim y Chang, 1990) que ANA y 2,4-D, auxinas sintéticas.

Sin embargo, un gran número de especies cultivadas *in vitro* tales como *Catharantus roseus* (Merillon y col., 1986), *Nicotiana tabacum* (Sahai y Shuler, 1984), *Lythospermum erythorizon* (Hoekstra y col., 1990) entre otras sintetizan altas cantidades de metabolito secundario cuando son expuestas a bajas concentraciones de 2,4-D.

En casos excepcionales, el tipo de auxina y su concentración en el medio se ha reportado que pueden tener o no efecto en la producción de metabolitos secundarios y por consecuencia se

considera que otros son los factores que limitan la biosíntesis o bien, da como resultado la morfogénesis. Esto se observó en cultivos de *Scoploia paviflora* (Tabata, 1972 ; George y Sherrington, 1984).

Las citocininas (un grupo de reguladores de crecimiento diferentes a las auxinas) manifiestan un efecto diferencial, dependiendo del metabolito y el origen de la línea celular (Constabel, Shyluk y Gamborg (1971), citado en Vasil 1987) George y Sherrinton (1984) reportan que un nivel ligeramente elevado de cinetina tiene un efecto estimulante sobre la producción de antocianina en cultivos de *Scopolia maxima*. En contraste, Shio y Otha (1973) encontraron que niveles elevados de cinetina suprimen totalmente la síntesis de alcaloides en cultivos de *N. tabacum*. Sahai y col. (1984) mencionan que la cinetina incrementa los polifenoles en callos de *N. tabacum*, pues estimula la formación de lignina en los callos, además informan que la cinetina tiene una función importante pues facilita el balance entre la división celular y la producción. Sin embargo Kimmerley y Dougall (1980) demuestran que con altos niveles de citocinina endógena se producen agregados celulares y hay una inhibición en la acumulación de antocianina que esta relacionada al tamaño de los agregados.

En otros estudios las auxinas son aplicadas en combinación con las citocininas en los cultivos y su efecto es limitado para el metabolismo secundario pues también se consideran los niveles endógenos de ambos reguladores de crecimiento contenidos en la planta. Un ejemplo de ello son los cultivos de *Solanum aviculare* en donde se establecieron los niveles de concentración de auxina-citocinina en el medio para la producción de células en suspensión y obtención de esteroides (Mantell, 1983).

También se ha argumentado que la asociación célula-célula y la producción de características morfológicas diferentes pueden jugar (junto con la actividad de los reguladores de crecimiento) una parte clave en el desarrollo de sistemas que sintetizan metabolitos secundarios (Lindsey y Yeoman, 1983).

Los datos que indiquen un efecto claro de los reguladores de crecimiento sobre la síntesis de metabolitos secundarios son escasos. Existen varios problemas en esta área primero la concentración efectiva del regulador de crecimiento en las células vegetales está por debajo de los límites de detección. Otro problema es que hay pocos datos disponibles que indiquen el destino del regulador, una vez que se ha aplicado al medio en los cultivos celulares. Finalmente está la ausencia de un modelo bioquímico de acción de los reguladores de crecimiento. Esto indica que hay una necesidad urgente de tener una mejor comprensión de la bioquímica de la acción de los reguladores de crecimiento para futuras manipulaciones para que no se realice de manera empírica (Loyola y col., 1990).

#### 2.5.4. OXIDACION

La oxidación es un problema que presentan algunas especies, particularmente las especies tropicales en cultivo *in vitro*. Tanto los explantes como los tejidos celulares adquieren un aspecto café o negro que inhibe el crecimiento celular y finalmente mueren. La oxidación es más severa en especies que contienen altos niveles de taninos o hidroxifenoles, en explantes obtenidos de plántulas maduras o bien por la presencia de elevados niveles de auxina en el medio (Robechault y Martín, 1976, citado en George y Sherrington, 1984). También ocurre por la reacción entre las enzimas oxidativas tales como la polifenoloxidasas, tirosinasas, sustratos de tirosina y o-hidroxifenol como el ácido clorogénico. Estas generalmente se encuentran en diferentes

compartimientos dentro de la célula y ésta al ser seccionada se liberan dichas sustancias provocando la oxidación y toxicidad del tejido. Esto probablemente se debe a los enlaces reversibles de hidrógeno en las proteínas, donde los fenoles son oxidados a compuestos quinónicos activos, los cuales se ciclizan y polimerizan y las proteínas ya oxidadas forman compuestos melanínicos (Gorge y Sherrinton, op.cit.).

El control de la oxidación en los explantes bien puede hacerse removiendo los compuestos fenólicos producidos mediante un pretratamiento de las semillas o explantes sumergiendo estos últimos en agua y agitación continua de tal forma que se puedan remover e inhibir los compuestos fenólicos, o bien transfiriendo los explantes o la biomasa dañada por el efecto de oxidación en un intervalo de 3 o 4 semanas a medio fresco adicionado de antioxidantes como ácido ascórbico o ácido cítrico, en una concentración de 100 mg/l, los cuales reducen la actividad de la peroxidasa (Standarti y col., 1990. Citado en Herman, 1991). Se puede emplear polivinilpirrolidona en una concentración de 0.2 a 2.0 %, para inhibir la formación de polifenoles y taninos en los cultivos (Gorge y Sherrinton, 1984). También se ha empleado nor-leucina para controlar la oxidación, Barnum y Meyer (1983), la utilizaron para evitar la oxidación en cultivos de células de tabaco, logrando suprimir la actividad de la catecoloxidasas, causante de la oxidación celular y su inhibición en el crecimiento.

Finalmente cabe señalar que de acuerdo con Standarti y Romani (1990), los antioxidantes pueden influenciar positiva ó negativamente en los cultivos dependiendo del tiempo de aplicación de éstos.

De igual forma se ha observado que la oxidación de los cultivos se incrementa por la influencia de la luz, por lo que se recomienda que una forma de evitar la inhibición de crecimiento y muerte celular de los explantes afectados es reduciendo la intensidad de luz o colocarlos en oscuridad total (Herman, 1991).

Estas formas de evitar o prevenir la oxidación *in vitro* no siempre son aplicables ni efectivas en todas las especies y en algunas plantas este problema puede ser más grave.

#### **2.5.6. EFECTO DE LA LUZ.**

De acuerdo a la literatura consultada es evidente que la producción de metabolitos secundarios de cultivos en suspensión se ve influenciada por la calidad e intensidad de la luz, o bien, cultivos celulares que son expuestos a oscuridad total, la cual es requerida para la expresión de la biosíntesis y crecimiento celular.

Norton y col., 1991 muestran que la luz tiene un efecto marcado en la formación de la goma de guayule en los callos, que si éstos son expuestos en oscuridad. En contraste con Figueiredo y col., 1991 quienes reportan que la oscuridad total promueve el crecimiento de los cultivos en suspensión de *Achillea millefolium*, con un alto grado de diferenciación celular y menos oxidación que los cultivos mantenidos en fotoperiodo. Sin embargo, Goleniowski y col. (1992) demuestran que en cultivos de *Ambrosia tenuifolia*, no hay diferencias significativas en la producción de lactonas sesquiterpénicas si los cultivos de células en suspensión se encuentran expuestos a una intensidad luminosa o en oscuridad.

Existen cultivos que son crecidos inicialmente en oscuridad total y posteriormente son puestos en condiciones de intensidad luminosa constante o bajo la irradiación de luz ultravioleta y éstos incrementan la producción de metabolitos secundarios. Un ejemplo es en la producción de antocianina en cultivos de células en suspensión de *Centaurea cianus* (Takeda y col., 1991).

### **2.5.7. SISTEMAS DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES PARA LA OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS (ESTABLECIMIENTO Y DESARROLLO DEL CULTIVO).**

Para la obtención de metabolitos secundarios, la primera expresión de crecimiento es un callo (agregados celulares, los cuales crecen de forma desorganizada de cualquier parte de la planta) que sugiere que éste no corresponde a un tejido totalmente desdiferenciado si no que persisten mecanismos de regulación inherentes al tejido que le dió origen (Street, 1977)

El cultivo de callos permite una proliferación continua que hace posible la repetición de ciclos de selección de células y del subcultivo de éstas con el contenido enriquecido del metabolito de interés. Esto es posible lograrlo por un proceso controlado de nutrientes en el medio de cultivo, los reguladores de crecimiento y la manipulación de los parámetros del medio ambiente.

Generalmente el callo tarda de 3 a 8 semanas para alcanzar un tamaño suficiente dependiendo de la expresión genética del tejido en particular y de las cantidades relativas del regulador de crecimiento. También depende de la velocidad de crecimiento de la diferenciación celular. Una vez que se establece el cultivo se evalúa el crecimiento celular y se caracteriza el cultivo, mediante curvas o cinéticas de crecimiento, las cuales siguen el mismo comportamiento de las curvas de crecimiento bacterianas y constan de las siguientes etapas:

1. Inducción. El inóculo inicia su crecimiento (en número y tamaño, fase lag).
2. Proliferación celular. Se incrementa la masa celular (fase exponencial).
3. Inducción de la desdiferenciación celular (fase estacionaria).
4. Envejecimiento y pérdida de la capacidad de crecimiento acelerado (fase de desaceleración).

Para obtener un cultivo de células en suspensión, el callo formado se transfiere a un medio líquido, el cual se coloca en agitación a bajas revoluciones aproximadamente entre 80 a 120, rpm estos cultivos consisten en agregados celulares de 2 ó más células y de células individuales y su crecimiento se ve influenciado por un intercambio gaseoso promovido por agitación. (Figueiredo y col., 1991).

A partir de los cultivos de células en suspensión es posible una recuperación fácil de los metabolitos sintetizados ya que éstos se acumulan en las vacuolas de las células en lugar de ser expulsados al medio de cultivo (Dodds y Roberts, 1982). Sin embargo reportes recientes indican que algunos metabolitos son excretados al medio de cultivo si se modifica el pH del mismo, lo que le hace ser un sistema con un mejor rendimiento y fácil de manejar (Wagner y col., 1991).

La mayoría de los cultivos en suspensión alcanzan su máxima densidad celular entre 18 y 25 días, aunque existen cultivos activos que entre 6 y 9 días llegan a esa fase e igualmente hay cultivos lentos donde esta etapa se alarga más. Por lo tanto, los rendimientos obtenidos en cuanto a la producción de biomasa son variables. Esto se debe principalmente al régimen del cultivo, (lo que incluye la formulación de nutrientes en el medio, los reguladores de crecimiento, etc.) que mejore el crecimiento celular, la velocidad de división y los niveles de síntesis de metabolitos secundarios. En lo que se refiere a esto último, existen reportes donde se menciona que la síntesis de metabolitos está típicamente dissociada del crecimiento celular. (Figueiredo y col., 1991).

El crecimiento celular puede expresarse cuantitativamente como:

1. Peso fresco ó Peso seco.
2. El número de células por unidad de volumen
3. Contenido de proteína o DNA.
4. Viabilidad celular.
5. Índice mitótico.
6. Conductividad del medio de cultivo.
7. Componentes del medio, ejemplo: Carbohidratos, nitrato o fosfato.

Estos parámetros están relacionados por cambios del metabolismo celular en el crecimiento (Street, 1977 y Dodds, 1982).

#### **2.5.7.a). RENDIMIENTO DEL PRODUCTO Y MEJORAMIENTO DEL SISTEMA DE PRODUCCION.**

Esta es una de las facetas más importantes en el desarrollo de un proceso biotecnológico, donde el producto debe presentar ventajas en términos de concentración y productividad, comparado con los sistemas de producción tradicionales.

En los reportes sobre cultivos de células en suspensión para la producción de metabolitos secundarios deseados no se han podido definir claramente las condiciones de cultivo para su desarrollo, pues en algunas especies es necesario que existan asociaciones morfológicas en donde; a) El desarrollo del tejido u órgano es, hasta el momento un requerimiento absoluto. b) donde el cultivo se caracteriza, por algún grado de diferenciación celular y c) donde no se presentan señales aparentes de desarrollo o diferenciación y el cultivo tiene la apariencia de un grupo de células meristemáticas. A pesar de ello, se está avanzando de forma acelerada, dado que cuando es necesario cierto nivel de organización para que la síntesis del metabolito se presente se pueden emplear cultivos de órganos, como es el caso de cultivo de raíces. O bien, crear sistemas de células vegetales inmovilizadas. La optimización del medio a través de la manipulación de los nutrientes, los reguladores de crecimiento en niveles óptimos y la adición de precursores ( como elicitores fúngicos ó enzimas entre otros) son estrategias para aumentar los rendimientos (Loyola y col. 1994).

La selección del sistema apropiado consiste primero en tener una población con altos rendimientos del producto y desarrollar estrategias para lograr, mediante el uso de herramientas biotecnológicas, incrementar la producción como se muestra en la figura 1 (Rubluo y col., en preparación).

El crecimiento celular puede expresarse cuantitativamente como:

1. Peso fresco ó Peso seco.
2. El número de células por unidad de volumen
3. Contenido de proteína o DNA.
4. Viabilidad celular.
5. Índice mitótico.
6. Conductividad del medio de cultivo.
7. Componentes del medio, ejemplo: Carbohidratos, nitrato o fosfato.

Estos parámetros están relacionados por cambios del metabolismo celular en el crecimiento (Street, 1977 y Dodds, 1982).

#### **2.5.7.a). RENDIMIENTO DEL PRODUCTO Y MEJORAMIENTO DEL SISTEMA DE PRODUCCION.**

Esta es una de las facetas más importantes en el desarrollo de un proceso biotecnológico, donde el producto debe presentar ventajas en términos de concentración y productividad, comparado con los sistemas de producción tradicionales.

En los reportes sobre cultivos de células en suspensión para la producción de metabolitos secundarios deseados no se han podido definir claramente las condiciones de cultivo para su desarrollo, pues en algunas especies es necesario que existan asociaciones morfológicas en donde: a) El desarrollo del tejido u órgano es, hasta el momento un requerimiento absoluto. b) donde el cultivo se caracteriza, por algún grado de diferenciación celular y c) donde no se presentan señales aparentes de desarrollo o diferenciación y el cultivo tiene la apariencia de un grupo de células meristemáticas. A pesar de ello, se está avanzando de forma acelerada, dado que cuando es necesario cierto nivel de organización para que la síntesis del metabolito se presente se pueden emplear cultivos de órganos, como es el caso de cultivo de raíces. O bien, crear sistemas de células vegetales inmovilizadas. La optimización del medio a través de la manipulación de los nutrientes, los reguladores de crecimiento en niveles óptimos y la adición de precursores ( como elicitores fúngicos ó enzimas entre otros) son estrategias para aumentar los rendimientos (Loyola y col. 1994).

La selección del sistema apropiado consiste primero en tener una población con altos rendimientos del producto y desarrollar estrategias para lograr, mediante el uso de herramientas biotecnológicas, incrementar la producción como se muestra en la figura 1 (Rubluo y col., en preparación).

## 2.6.- ESTUDIOS BIOTECNOLÓGICOS DE LA FAMILIA COMPOSITAE.

Numerosas compuestas poseen un gran valor económico, destacan las que sirven para la extracción de aceites comestibles como *Carthamus tinctorius* (cártamo), *Helianthus annuus* (girasol), o las comestibles *Cichorium endivia* (escarda), *Cichorium intybus* (achicoria), *Cynara scolymus* (alcachofa), *Lactuca sativa* (lechuga), etc., y en otros casos las ornamentales, *Dahlia spp.*, *Crysanthemum spp.*, *Gazania spp.*, *Senecio spp.*, etc. (Rzedowski, 1972).

La importancia en la industria de la familia Compositae como fuente de metabolitos secundarios de interés comercial es grande ya que se emplean como saborizantes, en las fragancias, en los fármacos y como pesticidas (Tabla 2) los cuales han sido reconocidos desde hace ya varias décadas (Warner, 1977). Actualmente se han incrementado el número de investigaciones de nuevos compuestos activos de algunos miembros de la familia. Sin embargo en biotecnología vegetal existe una escasa información en la producción de metabolitos secundarios. La tabla 2 muestra algunos ejemplos. En el caso de la planta *Piqueria*, estudios *in vitro* a la fecha no se han reportado.

Hasta donde sabemos, la especie *Piqueria trinervia* Cav. no ha sido explorada por las herramientas de la biotecnología vegetal y si consideramos el potencial biológico de esta especie y en particular sus actividades biológicas, el piquero! A podría colocarse en el mercado como un posible agroquímico de origen natural. Esto pondría a la planta en peligro de extinción ya que para la extracción de piquero! A por métodos fitoquímicos convencionales se requeriría de 9.7 toneladas de planta para obtener un kilogramo de piquero! A (Jiménez, comunicación personal). Por lo tanto, es necesario crear estrategias para satisfacer una posible demanda en el mercado de agroquímicos y a la vez de preservar el recurso genético.

En base a esto en el presente trabajo se trata de establecer las condiciones de cultivo de tejidos vegetales (callo y células en suspensión) de diversos explantes de la especie *Piqueria trinervia* Cav., para la producción de piquero! A.

TABLA 2

COMPUESTOS ACTIVOS OBTENIDOS *IN VITRO* DE ALGUNAS  
COMPUESTAS

ESPECIE	COMPUESTO	CULTIVO <i>in vitro</i>	REFERENCIAS
<i>Echinacea purpurea</i>	Polisacáridos con actividad inmunológica	Células en suspensión	Wagner y col. (1988)
<i>Carthamus tinctorium</i>	alfa-tocoferol	Células en suspensión	Gan y col. 1990
<i>Tagetes patula</i>	Tiofenos	hairy roots	Buiteaar y col 1991
<i>Atractylodes macrocephala</i>	Aceites esenciales	Células en suspensión	Chen y col. 1991
<i>Taxacum officinale</i>	Aceites esenciales	Células en suspensión	Hook y col. 1991
<i>Centaurea cyanus</i>	Antocianina	Células en suspensión	Kakegawa y co. 1991
<i>Pharthenium argentatum</i>	Hule	Callo	Norton y col. 1991
<i>Arnica montana</i>	Polisacáridos con actividad inmunológica	Células en suspensión	Trautman y col.1991
<i>Stevia rebaudiana</i>	Esteviosidos	Células en suspensión	Stredner y col. . 1991
<i>Achillea millefolium</i>	Aceites esenciales	Células en suspensión	Figueiredo y col. 1991
<i>Artemisia annua L.</i>	Flavonoides	Células en suspensión	Chiung-S. y col. 1992
<i>Ambrosia tenuifolia</i>	Lactonas sesquiterpénicas	Callo	Goleniowski y col. 1992
<i>Artemisia annua L.</i>	fitosterol y Ac. artemisuico	Cálulas en suspensión	Kin y col. 1992
<i>Artemisia absinthium</i>	Aceites esenciales	Hairy roots	Kennedy y col. 1993

### 3. OBJETIVOS.

1. Establecer las condiciones de cultivo *in vitro* de diversos explantes (hojas, entrenudos y secciones de raíces jóvenes) para la inducción de callo y células en suspensión de la planta *Piqueria trinervia Cav.* Evaluando los siguientes parámetros:
  - a). medio nutritivo.
  - b). reguladores de crecimiento y su concentración.
  - c). condiciones ambientales de cultivo..
2. Cuantificación de piquerol A en las diversas respuestas de cultivo *in vitro*, a los tratamientos experimentales.

#### 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

##### 4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

En la presente investigación se utilizaron semillas de *Piqueria trinervia Cav.*, las cuales se recolectaron sobre la carretera al Ajusco, km 12 de México D.F., en octubre de 1989. Parte de este lote de semillas se almacenó en un sobre de papel manila para disponer de forma continua del material.

##### 4.2. MATERIALES Y METODOS

###### 4.2.a.- Desinfestación y germinación de las semillas.

La mayoría de las plantas se encuentran normalmente contaminadas por microorganismos que no son patogénicos en condiciones normales. Sin embargo al estar expuestos en un medio enriquecido, el crecimiento de los microorganismos es acelerado a un grado tal que puede limitar el desarrollo de células vegetales. Debido a esto, se prefiere emplear como fuente de material vegetativo a plántulas obtenidas de semillas germinadas bajo condiciones asépticas. Las técnicas y los productos utilizados para la desinfestación superficial de las semillas, varían de acuerdo a las condiciones en que se desarrolla la planta y a la disponibilidad de los desinfectantes. Diversos compuestos químicos han sido utilizados para la desinfestación, como las soluciones de blanqueadores comerciales a base de hipoclorito de sodio (Villegas, 1985).

Para efectuar la germinación de las semillas en condiciones de asepsia, éstas fueron sometidas a diferentes tratamientos con una solución de cloralex comercial en distintas concentraciones (5 a 30 %, v/v) e intervalos de tiempo (10 a 20 minutos) en agitación continua, como se indica en la tabla 3.

**TABLA 3. TRATAMIENTOS DE DESINFESTACION DE LAS SEMILLAS DE *Piqueria trinervia Cav.***

TRATAMIENTO	HIPOCLORITO (v/v)	TIEMPO DE GERMINACION (días)
Testigo	0	0
1	5	20
2	10	20
3	15	15
4	20	15
5	30	10

Las semillas siempre fueron enjuagadas 4 o 5 veces con agua destilada estéril hasta eliminar el exceso de cloro. Bajo condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar previamente desinfectada con alcohol etílico industrial al 96 % y en el área estéril proporcionada por la flama del mechero Bunsen se sembraron las semillas desinfectadas en frascos gerber de 120 ml que contenían medio basal MS (Murashige y Skoog; 1962) en un volumen de 30 ml por cada uno. Se colocaron 5 semillas por frasco, con un número de frascos de 5 por tratamiento y un total de 25 semillas.

Todos los frascos se incubaron a  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$  en fotoperiodo de 16 hrs, una intensidad luminosa de 2000 lux y 8 hrs oscuridad.

#### 4.3. - Medios de cultivo.

##### 4.3.a.- Composición y preparación.

Los medios de cultivo empleados fueron los de Murashige y Skoog (1962) y Knudson C (1946), denominados MS Y KC respectivamente (Anexo 1).

Los medios de cultivo fueron suplementados con los reguladores de crecimiento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cinetina (K) y ácido 4-clorofenoxiacético (4-CPA), en diferentes concentraciones, como se muestra en la tablas 4 y 5.

**TABLA 4. CONCENTRACION DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO ADICIONADOS A LOS MEDIOS : MS Y KC EN LOS QUE SE DESARROLLARON LOS EXPLANTES HOJA, ENTRENUDO, RAIZ Y BIOMASA DE PIQUERIA TRINERVIA CAV.**

TRATAMIENTO	REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg/l)	
	K	2,4-D
T	0	0
1	0	1
2	0	2
3	0	3
4	1	0
5	1	1
6	1	2
7	1	3
8	2	0
9	2	1
10	2	2
11	2	3
12	3	0
13	3	1
14	3	2
15	3	3

T : Testigo

**TABLA 5. CONCENTRACION DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO EN MEDIO MS EN LAS QUE SE DESARROLLARON LOS CALLOS DE ENTRENADO.**

TRATAMIENTO	REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg/l)	
1	K	2.0
2	2,4-D	0.5
3	K : 2,4-D	2:0.5
4	K : 4-CPA	2:1.0
5	K : 4-CPA	2:2.0

Los medios se prepararon de la siguiente forma: en una parrilla de agitación se colocó un vaso de precipitados con un volumen de agua destilada de aproximadamente igual al 50 % del volumen final del medio de cultivo. Se adicionaron primero las soluciones stock de macro y micronutrientes, posteriormente se adicionaron los reguladores de crecimiento de acuerdo a las tablas 4 y 5. Se incorporó la sacarosa (3 %) y cuando ésta se disolvió, se llevó a un volumen determinado con agua destilada, el pH se ajustó a 5.6 ó 5.7 y finalmente se agregó el agar (8 gr/l). El medio de cultivo ya preparado se vació en frascos gerber de 120 ml, agregando 30 ml de medio nutritivo a cada uno. Estos se esterilizaron en un autoclave a 21 lb/pug.<sup>2</sup> de presión, 121°C por 15 minutos.

En los experimentos de cultivo en suspensión se emplearon matraces de 125 ml y el medio de cultivo se preparó en la forma antes descrita, omitiendo la adición del agar.

Para la recuperación de callo oxidado se emplearon como antioxidantes ácido ascórbico y norlucina en una concentración de 100 mg/l, que se adicionaron al medio de cultivo.

#### **4.4.- Disección de los explantes y método de siembra.**

Se tomaron de las plántulas germinadas *in vitro* los siguientes explantes :

Hojas de 2 y 4 meses de edad de aproximadamente 0.5 a 1.0 cm de longitud eliminando hojas de los extremos terminales.

Secciones de tallo (entrenado) de 2 meses de edad, se disectaron fragmentos de 0.5 y 1.0 cm. de longitud, evitando cortar zonas de yemas axilares.

Secciones de raíces de 2 meses de edad de la plántula de 1.0 cm de longitud.

La siembra de los explantes se realizó en el área estéril de una campana de flujo laminar, se introdujo el material requerido para la siembra de los explantes que constó de frascos con 30 ml medio de cultivo adicionado de los reguladores de crecimiento de acuerdo a la tabla 4, cajas petri previamente esterilizadas y de instrumental; se utilizaron navajas de acero inoxidable, bisturí y pinzas, las cuales se sumergieron en un frasco que contenía etanol al 96 %. Antes de su utilización se flamearon y se dejaron enfriar en agua destilada estéril.

La disección de los explantes se realizó sobre las cajas petri estériles, colocando 5 explantes por cada frasco con un número de repetición de 5 por tratamiento.

#### 4.5. - Condiciones de Cultivo.

Se emplearon 2 condiciones ambientales para crecer los cultivos.

- 1). A  $27 \pm 2$  °C. En fotoperiodo (16 hr luz, 2000 lux de intensidad luminosa y 8 hrs. oscuridad).
- 2). A  $27 \pm 2$  °C y en oscuridad.

Para lograr esta segunda condición, los frascos se cubrieron con papel aluminio y se mantuvieron en cajas cerradas para evitar la filtración de la luz.

#### 4.6. INDUCCION Y ESTABLECIMIENTO DE CALLO Y CELULAS EN SUSPENSION.

##### 4.6.a. Determinación de las condiciones de cultivo *in vitro* para la obtención de callo.

Con el fin de establecer las condiciones de cultivo *in vitro* de callo y células en suspensión de la planta *Piqueria trinervia Cav.*, para la producción de piquero A, se emplearon 3 tipos de explantes : Hojas, entrenudos y secciones de raíz de plántulas de 2 a 4 meses de edad y se sembraron en medio de cultivo MS adicionado de los reguladores de crecimiento como se muestra en la tabla 4. Los explantes se cultivaron en las condiciones ambientales de cultivo de fotoperiodo y oscuridad.

Inicialmente para la inducción de callo se realizaron 6 experimentos. Cada experimento se formó de 16 tratamientos cada uno con 5 repeticiones (frascos) y con 5 explantes por cada frasco. Se emplearon un total de 400 explantes por cada experimento. En el diseño del tratamiento hormonal, los reguladores de crecimiento se utilizaron de tal manera que hubiera una auxina y una citocinina o bien una de ellas produciéndose así todas las posibles combinaciones entre los niveles de las concentraciones de los reguladores de crecimiento. Lo mencionado con anterioridad en términos estadísticos se refiere a un diseño de tratamiento factorial 4x4, completo y balanceado (Cochran y Cox., 1990).

En base a los resultados obtenidos de estos primeros experimentos, se realizaron otros más para determinar las condiciones del cultivo *in vitro* y producción de piquero A a partir de explantes de *P. trinervia*, con un total de 26 experimentos, así como 2 experimentos para evaluar las curvas de crecimiento en medio semi-sólido y líquido (Anexo II).

##### 4.6.b. Establecimiento de las clónicas de crecimiento en medio semi-sólido y líquido.

###### 4.6.b.1.- Curva de crecimiento en medio semi-sólido.

La curva de crecimiento se estableció con callo generado a partir del cuarto subcultivo, proveniente del tipo de explante entrenudo que fue desarrollado en frascos de cultivo de 120 ml, conteniendo cada uno 30 ml de medio MS suplementado con 2 mg/l de K, 100 mg/l de ácido ascórbico como antioxidante y en condiciones de fotoperiodo.

La curva de calibración se hizo empleando como estandar interno una solución de nonano de concentración conocida ( $7.22 \times 10^{-2}$  mg/ml), adicionando diferentes concentraciones del estandar de piquero A, la mínima fué de 0.00001 mg/ml y la máxima de 1.0 mg/ml. A partir de la curva de calibración, se calcularon los factores de respuesta para el piquero A y del estandar interno, el cual sirvió de referencia y con estos factores se cuantificaron las muestras.

Se identificó el piquero A al tomar como referencia el tiempo de retención ( $T_r$ ), refiriéndose al de la señal del estandar. Previamente se realizó la cromatografía a una muestra de piquero A puro para determinar las condiciones de operación del cromatógrafo mencionadas con anterioridad. El tiempo de retención registrado para el estandar y las muestras fué de ;  $T_r = 3.53$  ( Anexo III)

Para todas las determinaciones se emplearon las muestras sin purificar. Se agregaron 50 microlitros de cloroformo y de esta solución se tomó una alícuota de 2 microlitros que se inyectó al cromatógrafo de gases. Se realizaron tres inyecciones a cada una de las muestras para obtener reproducibilidad. La cuantificación del piquero A se reporta como mg/mg de peso fresco ( se realizó la cuantificación en peso fresco, debido a que en peso seco, el terpeno se pierde al exponerlo al calor, además las muestras eran muy pequeñas en cantidad de biomasa de aproximadamente 150 mg ).

#### 4.8. Establecimiento del cultivo en suspensión.

Los cultivos de células en suspensión proporcionan una población de células relativamente homogénea, accesible a sustancias químicas aplicables exógenamente. La mayoría de los cultivos en suspensión se obtienen transfiriendo una masa de callo friable a medio líquido de la misma composición que el usado para el crecimiento del callo. En el primer subcultivo se remueven los agregados grandes del inóculo inicial.

Para cada línea celular, hay un tamaño de inóculo mínimo abajo del cual el cultivo no crece. El crecimiento de los cultivos en suspensión, puede ser monitoreado midiendo uno ó más de los siguientes parámetros: volumen del paquete celular, número de células, peso fresco, peso seco, contenido de proteína o DNA y viabilidad celular (Morris, 1985).

Para iniciar la determinación de la curva del cultivo en suspensión se tomó callo ya establecido, que se originó a partir del explante entrenado, en condiciones de cultivo de fotoperíodo, en medio MS adicionado de 2 mg/l de K y ácido ascórbico (100 mg/l) como antioxidante.

Se partió de un inóculo inicial de aproximadamente  $2 \pm 0.3$  gr de callo y se depositaron en matraces erlenmeyer de 125 ml que contenían 25 ml de medio nutritivo (MS), adicionado de la misma concentración de K que le dió origen al callo. Los matraces (120) se colocaron en una plataforma de agitación a 90 rpm, en condiciones de cultivo de fotoperíodo.

Para la curva de crecimiento se tomaron 6 matraces del cultivo a diferentes tiempos y se evaluaron los siguientes parámetros:

**4.8.1- Peso fresco :** El cultivo de células en suspensión se filtró sobre un papel filtro de peso previamente conocido. El peso real se obtuvo por diferencia de pesos.

Peso fresco (Pf) = Peso de la muestra - Peso del filtro

**4.8.2.- Peso seco :** Se obtuvo del mismo paquete celular que se empleó para peso fresco, éste se mantuvo en un horno desecador por 48 hrs a una temperatura constante de 60 °C. El peso real se tomó como la diferencia entre la pérdida de la humedad del peso fresco y peso seco.

**4.8.3.- Extracción de piquero A de las células en suspensión.**

**4.8.3.a.-** Para células en suspensión se realizó en la forma ya descrita.

**4.8.3.b.-** Para el medio de cultivo. A cada muestra se agregaron 10 ml de cloroformo para extraer la fase orgánica del medio, éste se homogeneizó y se filtró ( este proceso se realiza 3 veces). Al filtrado se le secó con sulfato de sodio anhidro. Finalmente se evaporó el cloroformo en rotavapor y la muestra se pesó para cuantificar el contenido de piquero A por TLC y C.G.

**4.8.4.- Análisis de Piquero A por Cromatografía de gases.**

Se empleó el cromatografo de gases Hewlett-Packard, 5889 B.

En este equipo se emplearon las siguientes condiciones:

- Detector de ionización de flama.
- Columna metil 5 % fenil silicon, 25 m x 0.35 mm de sílice fundida.
- Gas acarreador : Nitrógeno; 2 ml/minuto.
- Split 1 : 50.
- Temperatura programada : 100 - 160 a 10 °C/minuto, hasta 240° a 10 °C / minuto.
- Temperatura del inyector detector 270 °C.

El piquero A, se cuantificó a partir de una curva de calibración, para la cual se empleó nonano como estandar interno en una concentración conocida de  $7.22 \times 10^{-2}$  mg y se utilizaron diferentes concentraciones del estandar de piquero A (0.00001 a 0.1 mg). Para cada una de las concentraciones se obtuvo el área bajo la curva para obtener la concentración de piquero A de cada muestra.

Para cada una de las determinaciones se emplearon muestras sin purificar, se les agregó 50 microlitros de la solución de cloroformo que contenía el estandar interno y de esta solución se tomó una alícuota de 0.5 microlitros, que se inyectaron al cromatografo (se realizaron 3 inyecciones por cada muestra). Se identificó el piquero A, tomando como referencia, el tiempo de retención referido a la señal originada con el estandar ( $T_r \approx 5.0$ ).

El procedimiento de extracción y detección del piquero A también se realizó a toda la biomasa obtenida (callo, estructuras globulares y raíces pilosas) generada en todos los experimentos.

Finalmente, en una de las muestras para obtener la curva de crecimiento de células en suspensión se observaron pequeños cristales. A ésta muestra sin purificar se le hizo cromatografía preparativa (CCF) para separar los cristales de piquero A. La placa ( $\text{SiO}_2$ ) de 10 x 4 cm , se colocó en una cámara de elución que contenía 8:2 Acetato de etilo : hexano. El revelado de la placa se realizó asperjando sobre ella (solo en la parte lateral izquierda) una solución de sulfato cérico ( $\text{CeSO}_4$  ). La extracción de la parte correspondiente al piquero A (de acuerdo a su  $R_f$ ) se realizó con  $\text{CHCl}_3$  que al evaporarlo dió lugar a la formación de cristales (6 mg) que permitió identificar el piquero A por  $^1\text{HRMN}$ .

#### 4.9. Análisis estadístico de los datos.

Para el análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS-PC y la captura de datos se realizó con el procesador de palabras WordStar (versión 6.0).

En los diferentes diseños experimentales se determinaron los parámetros estadísticos básicos:

La media, la varianza y la desviación estándar y se realizaron diferentes métodos de análisis de varianza para obtener una comparación estadística entre dos o más tratamientos los cuales fueron asignados aleatoriamente en cada experimento para confirmar o refutar la hipótesis de la no diferencia entre sus medias.

Para definir formalmente las respuestas preliminares se efectuaron pruebas de homogeneidad de la varianza para determinar el efecto de repeticiones en los experimentos realizados. Estas indicaron que fueron las adecuadas por experimento. Esto nos permitió realizar los análisis de varianza para analizar el efecto del tipo de material vegetal, reguladores de crecimiento y su concentración, así como las condiciones de cultivo sobre la producción de biomasa y piquero A. Al detectar diferencias significativas entre tratamientos se efectuó una prueba de comparaciones mínimas de Duncan para determinar el mejor tratamiento de cada experimento.

Los análisis de varianza probados fueron:

a). Diseño Completamente Aleatorio. - Este es la forma más simple del análisis de varianza e implica el estudio de una variable dependiente por medio de una variable independiente. El modelo esta representado por la siguiente ecuación matemática:

$$X_{ij} = \mu + \tau_i + E_{ij}$$

En donde:  $\mu$  es la media global del experimento o poblacional,  $\tau_i$  es un parámetro único para el  $i$ -ésimo tratamiento llamado el efecto del tratamiento y  $E_{ij}$  es un componente del error aleatorio. Cuando  $i = 1$  hasta  $i = t$  número de tratamientos y  $j = 1$  hasta  $j = r$  número de repeticiones.

b). Diseño en Bloques. - Este permite reducir el error experimental en los casos en donde la aleatorización es restringida para una de las variables estudiadas. Así la variable que puede afectar los resultados experimentales se separa en bloques y dentro de cada bloque se distribuyen al azar los tratamientos a estudiar.

El modelo esta representado de la siguiente forma:

$$X_{ij} = \mu + \tau_i + B_j + E_{ij}$$

En donde:  $\mu$  es media del experimento,  $\tau$  es efecto de tratamientos,  $B$  es efecto de bloques,  $E$ , efecto del error experimental. Cuando  $i = 1$  hasta  $i = t$  número de tratamientos y  $j = 1$  hasta  $j = r$  número de repeticiones.

c) Cuadrado Latino. En este diseño la aleatorización de las muestras esta restringida debido a que se agrupan en columnas y renglones. Este diseño controla dos ítemes de variación además del efecto de tratamientos. Presenta la desventaja que el número de columnas, renglones y tratamientos deben de ser iguales en un diseño balanceado.

En los diseños desbalanceados se estudian más de dos fuentes de variación con el fin de conocer el efecto de todas las variables en forma integrada. En sí es una combinación de dos sistemas de bloques.

El modelo para el análisis de varianza se estima de la siguiente forma:

$$x = \mu + t + B + Y + E$$

En donde :  $\mu$  es la media del experimento,  $t$  es el efecto de tratamientos,  $B$  es el efecto de renglones,  $Y$  el efecto de columnas y  $E$  el efecto del error.

d) Diseño factorial con interacciones (dobles, triples y cuádruples). Es un diseño que permite estudiar el efecto de dos o más variables de manera independiente y en todas sus posibles combinaciones. Es decir estudia al mismo tiempo el efecto de cada variable por separado y todas las interacciones entre las variables estudiadas, pero solo se debe interpretar aquellas que presente un significado real.

Existen dos maneras de expresar el diseño factorial:

1.  $2 \times 2$  Significa un factorial con dos factores y cada factor a dos niveles.

2.  $2^2$  El exponente indica que son dos factores y la base indica que cada factor se estudia a dos niveles.

Estos modelos se utilizaron para determinar si la variable independiente presenta o no un efecto significativo sobre la respuesta evaluada y se puede concluir si el efecto de la variable independiente es: Significativo (\*), si  $\alpha = 5\%$ , altamente significativo (\*\*), si  $\alpha = 1\%$  o no significativo (N.S.). En función de la hipótesis de no diferencia y refutada si:

$$F_{estimada} > F_{\alpha, k-1/N-k}$$

en donde  $F_{\alpha, k-1/N-k}$  es el punto de porcentaje de la distribución  $F$ , con el nivel de confianza  $\alpha$  y la relación entre  $k-1$  grados de libertad y  $N-k$  grados de libertad.

Para cada uno de los diseños experimentales se le realizó la "Prueba de homogeneidad de la varianza de Bartlett." La cual es una determinación de la variabilidad en las observaciones a través de un análisis de varianza y es una relación algebraica, por lo que se requiere comprobar que la suposición :

$$Y_{ij} = \mu + t_i + E_{ij}$$

es válida; de ser así, entonces el procedimiento para el análisis de la varianza es una prueba exacta de la hipótesis de no diferencia entre las medias de los tratamientos. Sin embargo, en la práctica tal suposición no siempre se mantiene con exactitud, por lo que la validez del modelo debe ser evaluada mediante pruebas denominadas exigencias del análisis de la varianza. La más importante de ellas es la homogeneidad, que expresa la igualdad de la varianza en todos los tratamientos.

La prueba de Bartlett, involucra elementos estadísticos cuya distribución muestral está estrechamente relacionada con la distribución de  $X^2$  con  $n-1$  grados de libertad, cuando las  $n$  muestras aleatorias provienen de poblaciones normales independientes y se expresa por:

$$Sp^2 = (n-1)S_i^2/N-a$$

Donde  $S_i^2$  es la varianza muestral de la población de la  $i$ -ésima.

$N$  es el número de todas las muestras

$a$  es el número de tratamientos

$n$  es el número de repeticiones

$p$  es proporcional a las diferencias entre las  $S_i^2$ , pero es cero cuando todas las  $S_i^2$  son iguales, por lo tanto, la hipótesis de no homogeneidad no será refutada cuando :

$$X^2_0 > X^2_{a,a-1}$$

$X^2_{a,a-1}$  es el punto de la probabilidad de la distribución  $X^2$  con un nivel de confianza  $\alpha$  y  $a-1$  grados de libertad

#### Prueba de comparación múltiple de Duncan

Es una prueba para determinar el mejor tratamiento después de haber detectado en el análisis de varianza diferencias significativas entre los tratamientos. Las comparaciones se realizan entre todas las medias, considerando que las medias se arreglan en orden creciente.

Esta prueba es la más empleada dentro de las disponibles porque utiliza diferentes rangos para cada comparación dependiendo del espaciamiento que existe entre las medias a comparar. Es la prueba más exigente porque utiliza valores de  $Q$  más pequeños

En el análisis de datos las variables consideradas fueron aquellas que favorecieron el crecimiento celular y producción del metabolito, como son : Peso fresco de la biomasa y cuantificación del piquero A, bajo las condiciones de cultivo que les dieron origen explante, caldo, estructuras globulares, medio de cultivo, condiciones ambientales de cultivo (fotoperiodo y oscuridad), cinetina y auxina y su concentración (0 a 3 mg/l) de cada uno de los tratamientos en experimentación (Anexo II).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION.

### 5.1 Efecto de las condiciones físicas y químicas de cultivo en la inducción de biomasa para la producción de piquero A.

Inicialmente se estudió el efecto sobre la inducción de callo y la producción de piquero A de la concentración de los reguladores de crecimiento 2,4-D y K 7 ( 1, 2 y 3 mg/l, solas y en sus posibles combinaciones), el medio de cultivo (MS) y las condiciones ambientales de cultivo (fotoperíodo y oscuridad), sobre tres explantes (hoja, entrenudo y secciones de raíz).

Las tablas 6, 7 y 8, muestran los resultados de la inducción *in vitro* de cada uno de los explantes de la planta *P. trinervia* Cav cultivados en medio MS adicionado de la combinación de los reguladores de crecimiento en concentraciones de 0 a 3 mg/l en un tiempo de observación entre 2 a 4 meses.

En la tabla 6 y en la figura 3, se presentan la respuesta morfogénica de los entrenudos, los cuales fueron cultivados en medio MS adicionado de los reguladores de crecimiento 2,4-D y K en concentraciones de 0 a 3 mg/l. Ahí mismo se observa que en los tratamientos suplementados con cinetina sola no hubo formación de estructuras globulares, en cambio tuvo lugar la formación de callo con un porcentaje promedio de proliferación del 88 % en condiciones de fotoperíodo y 72.6 % en oscuridad, a la vez se presentó el desarrollo de plántulas (figuras 3a y 3b), en condiciones ambientales de fotoperíodo. En los tratamientos donde se usó la combinación auxina/citocinina se originaron estructuras globulares (figura 4) con un porcentaje de proliferación promedio de 74.75 % en fotoperíodo y 63.25 % en oscuridad como se muestra en la tabla 7. Toda la biomasa (callo y estructuras globulares) originada por los explantes de entrenudo se vió afectada por oxidación y consecuentemente su crecimiento.

Los problemas de oxidación son frecuentes en cultivos de tejidos *in vitro* de vegetales dado que al ser disectada la planta existe un desprendimiento de compuestos fenólicos y estos compuestos en exceso afectan la diferenciación celular del tejido. También se menciona que los compuestos inductores de la diferenciación celular, como son los reguladores del crecimiento en ocasiones favorecen la síntesis de estos compuestos y como consecuencia son perjudiciales para las células del tejido vegetal. Existen reportes de que el 2,4-D favorece la producción de compuestos fenólicos en cultivos *in vitro* e interviene en la ruta biosintética e induce la producción de estas sustancias (Golenioswki y col. ,1992).

TABLA 6

EFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO Y SU CONCENTRACION SOBRE LA PRODUCCION DE BIOMASA (CALLO Y ESTRUCTURAS GLOBULARES) DEL EXPLANTE ENTRENADO DE PIQUERIA TRINERVIA CAV., CULTIVADAS *IN VITRO*, EN MEDIO MS

TRATAMIENTO (mg/l)		FOTOPERIODO		OSCURIDAD	
K	2,4-D	% <sup>1</sup>	PROLIFERACION DE BIOMASA <sup>2</sup>	% <sup>1</sup>	PROLIFERACION DE BIOMASA <sup>2</sup>
0	0	100	Est. globulares +	100	Est. globulares +
0	1	100	Est. globulares +	64	Est. globulares +
0	2	92	Est. globulares +	68	Est. globulares +
0	3	96	Est. globulares +	60	Est. globulares +
1	0*	84	Callo +++	68	Callo +++
1	1	84	Est. globulares +	72	Est. globulares ++
1	2	84	Est. globulares +	76	Est. globulares +
1	3	76	Est. globulares +	76	Est. globulares +
2	0*	88	Callo +++	76	Callo +++
2	1	100	Est. globulares ++	76	Est. globulares ++
2	2	80	Est. globulares +	72	Est. globulares +
2	3	100	Est. globulares +	76	Est. globulares +
3	0*	92	Callo +	88	Callo +
3	1	88	Est. globulares +	100	Est. globulares +
3	2	96	Est. globulares +	100	Est. globulares +
3	3	100	Est. globulares +	72	Est. globulares +

Tiempo de observación : 2 meses.

Condiciones ambientales de cultivo: Fotoperíodo y oscuridad

1 : % de proliferación = No.de explantes que originaron respuesta / No.de explantes totales.

2 : Proliferación de biomasa : + : Pobre (< 500 mg. Pf.)

++ : Moderada (500 - 1000 mg. Pf.)

+++ : Buena (> 1000 mg. Pf.)

\* : Regeneración de plántulas.

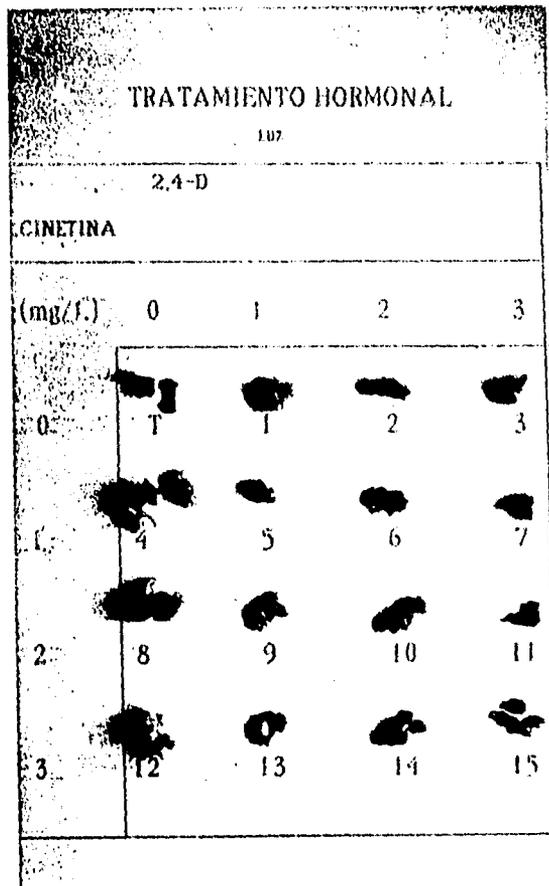


FIGURA 3. RESPUESTA MORFOGENETICA DE LOS EXPLANTES DE ENTRENADO DE *P. trinervia* Cav., CULTIVADOS EN MEDIO MS ADICIONADO DE K Y 2,4-D EN CONCENTRACIONES DE 0 A 3 mg/l.



a) 4 semanas                      b) 6 semanas                      c) 8 semanas

FIG. 3a. RESPUESTA MORFOGENETICA DE *P. TRINERVIA* CAV., A PARTIR DE EXPLANTES DE ENTRENADO CULTIVADAS EN MEDIO MS, ADICIONADO DE 1 mg/l de K.



a) 1 semana    b) 2 semanas    c) 4 semanas

FIG. 3b. DESARROLLO DEL CALLO A PARTIR DE EXPLANTES DE ENTRENADO EN MEDIO MS ADICIONADO DE 2 mg/l DE K EN CONDICIONES AMBIENTALES DE FOTOPERIODO.



FIG. 4. ESTRUCTURAS GLOBULARES DESARROLLADAS POR EL EXPLANTE HOJA CULTIVADOS EN MEDIO MS ADICIONADO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO 2, 4-D, (2 mg/l) Y K (1 mg/l) EXPUESTOS EN CONDICIONES AMBIENTALES DE FOTOPERIODO (8 SEMANAS DE OBSERVACION).

Una respuesta morfogénica similar se presentó con los explantes de secciones de raíz (tabla 7). A diferencia de que la mayor parte de la biomasa generada por estos explantes fué severamente afectada por oxidación tanto en condiciones de fotoperiodo como de oscuridad. Los porcentajes de proliferación de callo promedio fué de 89.3 % en fotoperiodo y 72.0 % en oscuridad, los callos generados eran de apariencia compacta con una coloración amarilla oscura y de lento crecimiento y conforme pasó el tiempo se observó que la biomasa (callo y estructuras globulares) se oxidaban más aceleradamente sin registrar ya un crecimiento en un tiempo de observación de 4 meses, por lo tanto después de este período se realizó la extracción y cuantificación de piquero A.

TABLA 7

**EFFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO Y SU CONCENTRACION SOBRE LA PRODUCCION DE BIOMASA (CALLO Y ESTRUCTURAS GLOBULARES) DEL EXPLANTE DE SECCIONES DE RAIZ DE *Piqueria trinervia Cav.*, CULTIVADOS *IN VITRO* EN MEDIO MS.**

TRATAMIENTO (mg/l)		FOTOPERIODO		OSCURIDAD	
R	2,4-D	% <sup>1</sup>	PROLIFERACION DE BIOMASA <sup>2</sup>	% <sup>1</sup>	PROLIFERACION DE BIOMASA <sup>2</sup>
0	0	0	Est. globulares -	0	Est. globulares -
0	1	100	Est. globulares +	100	Est. globulares +
0	2	100	Est. globulares +	100	Est. globulares +
0	3	96	Est. globulares +	76	Est. globulares +
1	0*	96	Callo +++	68	Callo ++
1	1	92	Est. globulares +	76	Est. globulares +
1	2	92	Est. globulares +	72	Est. globulares +
1	3	96	Est. globulares ++	76	Est. globulares +
2	0*	92	Callo +++	76	Callo ++
2	1	84	Est. globulares ++	76	Est. globulares ++
2	2	88	Est. globulares +	100	Est. globulares +
2	3	84	Est. globulares +	64	Est. globulares +
3	0*	80	Callo +	72	Callo ++
3	1	92	Est. globulares +	100	Est. globulares +
3	2	100	Est. globulares +	100	Est. globulares +
3	3	92	Est. globulares +	100	Est. globulares +

Tiempo de observación : 4 meses.

1 : % de proliferación = No.de explantes que originaron respuesta / No.de explantes totales.

2 : Proliferación de biomasa : - : Nula,

+ : Pobre (< 300 mg. Pf.)

++ : Moderada (300 - 500 mg. Pf.)

+++ : Buena (500 A 800 mg. Pf.)

\* : Formación de callo.

La tabla 8 muestra los resultados morfogénéticos obtenidos para los explantes de hojas cultivados en medio MS adicionado de los reguladores de crecimiento 2,4-D y K en concentraciones de 0 a 3 mg/l, después de 2 meses de observación, en todos los tratamientos probados hubo la formación de estructuras globulares definidas con un porcentaje de proliferación promedio de 67.2 % en condiciones de fotoperiodo y 45.7 % en oscuridad.

Estas estructuras sugerían que se trataba de callo embriogénico (embriones somáticos) por lo que se tomo la decisión de utilizar la biomasa para la realización de otros experimentos cuya finalidad fué la de inducir la embriogénesis somática que es un vía alterna para la producción a gran escala de la planta y por consiguiente la del metabolito sin afectar las poblaciones silvestres.

TABLA 8

**EFFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO Y SU CONCENTRACION SOBRE LA PRODUCCION DE BIOMASA (ESTRUCTURAS GLOBULARES) DEL EXPLANTE HOJAS (JOVENES) DE PIQUERIA TRINERVIA CAV., CULTIVADAS IN VITRO, EN MEDIO MS**

TRATAMIENTO (mg/l)		FOTOPERIODO		OSCURIDAD	
K	2,4-D	% 1	PROLIFERACION DE BIOMASA <sup>2</sup>	% 1	PROLIFERACION DE BIOMASA <sup>2</sup>
0	0	4	Est. globulares +	0	Est. globulares -
0	1	0	Est. globulares -	0	Est. globulares -
0	2	0	Est. globulares -	0	Est. globulares -
0	3	0	Est. globulares -	0	Est. globulares -
1	0	84	Est. globulares ++	32	Est. globulares ++
1	1	96	Est. globulares ++	32	Est. globulares ++
1	2	92	Est. globulares ++	72	Est. globulares ++
1	3	92	Est. globulares ++	72	Est. globulares ++
2	0	92	Est. globulares ++	64	Est. globulares ++
2	1	88	Est. globulares +	64	Est. globulares +
2	2	88	Est. globulares +	64	Est. globulares +
2	3	84	Est. globulares +	64	Est. globulares +
3	0	88	Est. globulares ++	64	Est. globulares ++
3	1	88	Est. globulares +	64	Est. globulares +
3	2	88	Est. globulares +	64	Est. globulares +
3	3	92	Est. globulares ++	76	Est. globulares ++

Tiempo de observación : 2 meses.

1 : % Proliferación : No. de explantes que originaron respuesta/ No. de explantes totales.

2 : Proliferacion de biomasa : - : Nula,

+ : Pobre (< 500 mg Pf.)

++ : Moderada (500 - 1000 mg, Pf.

En base a los resultados presentados en las tablas 6 y 7, la inducción de callo y su proliferación fué más estable al emplear entrenudos cultivados en medio MS adicionado de 2 y 3 mg/l de K expuestos en fotoperiodo y oscuridad. El callo obtenido de estos tratamientos fué de apariencia disgregable con una coloración amarilla verdosa translúcida con un rápido crecimiento (fig. 5).

Por otro lado hay que mencionar que los callos obtenidos a partir de los explantes de entrenudo y de secciones de raíz sintetizaban piquero A en una cantidad considerable pues era detectable por TLC (Anexo IV). A diferencia de las estructuras globulares obtenidas en donde solo en algunos tratamientos se detectó piquero A.

Los primeros resultados se muestran en la tabla 9 cuyo análisis de varianza mostró un efecto significativo para todas las variables consideradas. Además de presentar homogeneidad de la varianza presentó para repeticiones diferencias altamente significativas.

La producción de biomasa no se vió afectada al interactuar los tres tipos de explantes con las condiciones ambientales, ocurrió lo mismo al interactuar la variable que involucra a los explantes con la cinetina. Sin embargo el efecto de las auxinas al interactuar con los tres explantes presentó diferencias altamente significativas (tabla 9). Las condiciones ambientales no tuvieron efecto de interacción en presencia de ambos reguladores de crecimiento. Pero la acción combinada de ambos reguladores de crecimiento mostraron altos niveles de significancia, no obstante en la interacción entre el tipo de explante, las condiciones ambientales y los reguladores de crecimiento no fué importante y no presentó diferencias significativas a diferencia del efecto de interacción entre los tres tipos de explante y ambos reguladores de crecimiento en donde mostró diferencias altamente significativas.

En vista de lo anterior se procedió a realizar un análisis de diferencia mínima significativa utilizando la prueba de Duncan (tabla 9-A). Esta mostró que en concentraciones de 0, 1 y 2 mg/l de K y en los tratamientos con 1 mg/l de 2,4-D, empleando como fuente de material vegetal los entrenudos es donde se registró la mayor producción de biomasa (callo y estructuras globulares) la cual fue de 3713.34 mg. el cual incluso se presentó en un grupo aislado (tabla 9-A).

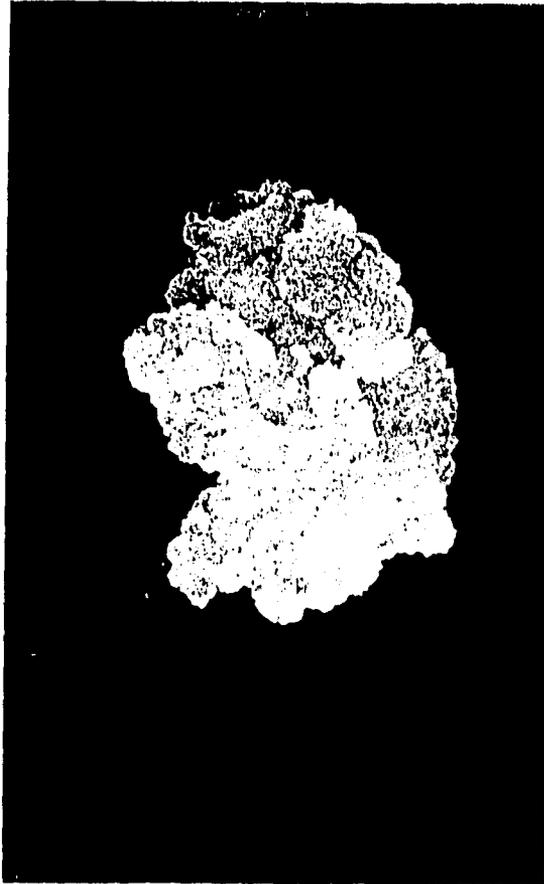


FIG. 5. CALLO DESARROLLADO POR EL EXPLANTE ENTRENADO, CULTIVADO EN MEDIO MS ADICIONADO DE 3 mg/l DE K, EXPUESTOS EN FOTOPERIODO (7 MESES DE OBSERVACION).

**TABLA 9**

Análisis de varianza para determinar el efecto de 3 tipos de explantes (hojas, entrenudo y raíz), 2 condiciones ambientales de cultivo (fotoperiodo y oscuridad), reguladores de crecimiento (K, 2,4-D) y su concentración (0 a 3 mg/l) sobre la producción de biomasa.

**FACTORIAL EN BLOQUES CON INTERACCIONES TRIPLES**

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculada	F Tablas 5% 1%
Tipo de explante (V1)	2	66015024.00	33007512.00	38.17838	3.02 - 4.76 **
Cond. Amb. (V2)	1	4742085.554	4742085.554	5.484968	3.86 - 6.70 *
Cinetina (V3)	3	17893049.95	5964349.983	6.898709	2.62 - 3.85 **
Auxina (V4)	3	27938365.52	9312788.507	10.771706	2.62 - 3.85 **
Repeticiones (V5)	4	159401103.3	39850275.81	46.09312	2.39 - 3.56 **
<b>Interacciones</b>					
V1 x V2	2	1818156.911	909078.456	1.051492	3.02 - 4.76 N.S
V1 x V3	6	6348330.208	1058055.035	1.223807	2.12 - 2.85 N.S
V1 x V4	6	37945330.095	6324221.683	7.314958	2.12 - 2.85 **
V2 x V3	3	3381201.424	1127067.141	1.303631	2.62 - 3.85 N.S
V2 x V4	3	2271718.913	757239.638	0.875867	2.62 - 3.85 N.S
V3 x V4	9	36743847.641	4082649.738	4.722227	1.90 - 2.46 **
V1 x V2 x V3	6	7233689.083	1205614.847	1.394483	2.12 - 2.85 N.S
V1 x V2 x V4	6	7376372.561	1229395.427	1.421989	2.12 - 2.85 N.S
V1 x V3 x V4	18	40306975.690	2239276.427	2.590076	1.60 - 1.92 **
V2 x V3 x V4	9	7122736.182	791415.131	0.915396	1.90 - 2.46 N.S
Error	398	344094980.368	864560.252		
Total	479	770632967.4			

\* significativo al 5 %

\*\* Altamente significativo al 1 %

N.S No significativo

TABLA 9-A

Prueba de Duncan del análisis de varianza para determinar el efecto de la interacción entre los 3 tipos de explantes (hojas, entrenudo y raíz), la combinación de los reguladores de crecimiento (K, 2,4-D) y su concentración (0 a 3 mg/l) sobre la producción de biomasa.

Explante	Tratamientos		Medias (mg)	clasificación *							
	Conc. 2,4-D.	Conc. de K.		Producción de biomasa	Grupos de medias						
sec de raíz	0 mg/l	0 mg/l	0.0	a							
hoja	1 mg/l	0 mg/l	164.10	a	b						
entrenudo	3 mg/l	0 mg/l	667.33	a	b	c					
hoja	0 mg/l	2 mg/l	926.19	a	b	c	d				
sec de raíz	0 mg/l	2 mg/l	1112.89	a	b	c	d	e			
entrenudo	1 mg/l	2 mg/l	1446.79	a	b	c	d	e			
entrenudo	1 mg/l	3 mg/l	1641.65		b	c	d	e			
entrenudo	0 mg/l	3 mg/l	2139.92			c	d	e			
entrenudo	0 mg/l	1 mg/l	2352.77				d	e	f		
entrenudo	1 mg/l	0 mg/l	2531.71					e	f		
entrenudo	0 mg/l	2 mg/l	3713.34							e	f

\* Las literales significan la clasificación entre los grupos de medias

El análisis de varianza (diseño factorial aleatorio con interacciones cuádruples) que se muestra en la tabla 10 para analizar el efecto las condiciones de cultivo sobre la producción de piquero A indicó que con respecto a los tres tipos de explantes se presentaron diferencias significativas y altamente significativas en la evaluación de las condiciones ambientales y para la concentración de la K. En la evaluación de la concentración de auxina no presentó diferencias significativas.

En la tabla 10 también se observan diferencias significativas en la interacción entre el material vegetal con las condiciones de cultivo y en la interacción con la concentración de la auxina. La interacción entre el tipo de explante con respecto a la concentración de la K mostraron niveles altamente significativos, lo mismo se presentó en la interacción de las condiciones de cultivo con respecto a la concentración de K. Pero en la interacción de las condiciones de cultivo con la concentración de la auxina no se presentaron diferencias significativas, lo mismo ocurre en la interacción de las concentraciones de ambos reguladores de crecimiento. Cuando se practican interacciones triples con las variables involucradas se observan niveles altamente significativos en la interacción entre el tipo de explante, las condiciones de cultivo y la concentración de la K, se presentan diferencias significativas en la interacción que implica el tipo de explante, la concentración de 2,4-D con la concentración de K. En la interacción de las 4 variables implicadas en el análisis no muestran niveles significativos.

Para establecer con precisión el efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de piquero A se practicó la prueba de Duncan a las variables que muestran niveles altamente significativos y significativos.

La tabla 10-A presenta la prueba de Duncan para la interacción triple entre el tipo de explante, las condiciones de cultivo y la concentración de la citocinina. Esta prueba mostró que en los tratamientos donde se utilizó como explante secciones de entrenudo y la concentración de 3 mg/l de K en condiciones de fotoperiodo fue el tratamiento que registró una mayor producción del metabolito (0.34 mg/mg Pf), el cual incluso forma un solo grupo claramente diferente estadísticamente del resto. Hay que recordar que en estas condiciones de cultivo la respuesta morfogénica obtenida fue callo friable de buenas características (tabla 6).

La tabla 10-B presenta la prueba de Duncan que involucra la interacción entre el tipo de explante y las concentraciones de K con la auxina. Esta mostró que en los tratamientos donde se utilizó como explante secciones de entrenudo y la combinación de 3 mg/l de K y 1 mg/l de 2,4-D forma un grupo con una cantidad del metabolito de 0.27 mg/mg Pf. Sin embargo una vez más el mejor tratamiento fue con 3 mg/l de K y su producción de piquero A fue de 0.42 mg/mg Pf, este forma un solo grupo diferente al resto (tabla 10-B).

TABLA 10

Análisis de varianza para determinar el efecto de 3 tipos de explantes (hojas, entrenudo y raíz), 2 condiciones ambientales de cultivo (fotoperiodo y oscuridad), reguladores de crecimiento (K, 2,4-D) y su concentración (0 a 3 mg/l) sobre la producción de piquero A.

FACTORIAL ALEATORIO CON INTERACCIONES CUADRUPLES

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculada	F Tablas 5 % 1 %
Materiales (V1)	2	.219	.110	4.544	3.02 - 4.76 *
Cond. Amb.(V2)	1	.165	.165	6.830	3.86 - 6.70 **
Cinetina (V3)	3	.333	.111	4.602	2.62 - 3.85 **
Auxina (V4)	3	.110	.037	1.523	2.62 - 3.85 N.S
Interacciones					
V1 x V2	2	.158	.079	3.286	3.02 - 4.76 *
V1 x V3	6	.504	.084	3.480	2.12 - 2.85 **
V1 x V4	6	.407	.068	2.811	2.12 - 2.85 *
V2 x V3	3	.316	.105	4.372	2.62 - 3.85 **
V2 x V4	3	.061	.020	0.848	2.62 - 3.85 N.S
V3 x V4	9	.283	.031	1.304	1.90 - 2.46 N.S
V1 x V2 x V3	6	.485	.081	3.350	2.12 - 2.85 **
V1 x V2 x V4	6	.297	.050	2.053	2.12 - 2.85 N.S
V1 x V3 x V4	18	.719	.040	1.656	1.60 - 1.92 *
V2 x V3 x V4	9	.268	.030	1.236	1.90 - 2.46 N.S
V1 x V2 x V3 x V4	18	.684	.038	1.576	1.60 - 1.92 N.S
Error	384	9.259	.024		
Total	479	14.268	.030		

\* significativo al 5 %

\*\* Altamente significativo al 1%

N.S No significativo

TABLA 10-A

Prueba de Duncan para evaluar el efecto de la interacción entre el tipo de explante, condiciones ambientales de cultivo y la concentración de la K sobre la producción de piquerol A.

Tratamientos			Medias Prod. Piquerol (mg/mg PI)	Clasificación *	
Explante	Cond. de Cultivo	Conc. de K			
hoja	fotoperiodo	0 mg/l	0.0	a	
entrenado	oscuridad	1 mg/l	0.01	a	
entrenado	oscuridad	2 mg/l	0.01	a	
entrenado	oscuridad	3 mg/l	0.01	a	
entrenado	fotoperiodo	1 mg/l	0.04	a	
hoja	fotoperiodo	2 mg/l	0.05	a	
hoja	fotoperiodo	3 mg/l	0.05	a	
entrenado	fotoperiodo	3 mg/l	0.34		b

\* Las literales significan los grupos de medias

TABLA 10-B

Prueba de Duncan para evaluar el efecto de la interacción entre el tipo de explante, la concentración de la K con 2,4-D sobre la producción de piquerol A.

Tratamientos			Medias Prod. Piquerol A mg/mg PI	Clasificación *	
Explante	Conc. de K	Conc. de 2,4-D			
entrenado	0 mg/l	0 mg/l	0.0	a	
entrenado	1 mg/l	1 mg/l	0.01	a	
entrenado	2 mg/l	0 mg/l	0.03	a	
entrenado	1 mg/l	0 mg/l	0.06	a	
hoja	3 mg/l	2 mg/l	0.10	a	
hoja	2 mg/l	3 mg/l	0.10	a	
entrenado	3 mg/l	1 mg/l	0.27		b
entrenado	3 mg/l	0 mg/l	0.42		c

\* Las literales significan los grupos de medias

De lo expuesto con anterioridad nos llevan a confirmar que el entrenudo cultivado en medio MS adicionado de 1 y 2 mg/l de K tienen efecto en la producción de biomasa y en combinación los reguladores de crecimiento en concentración de 1 mg/l de 2,4-D con 3 mg/l de K ejercen un efecto en la producción de piquerol A (tabla 10-A y B). Esto nos indica que tenemos un sistema de dos fases, una en la cual es necesaria la presencia de la citocinina (K) para inducir la diferenciación celular y otra en la que la combinación de la concentración de los reguladores de crecimiento (2,4-D / K) y en especial de la cinetina siendo esta la que influye en la producción del metabolito. Por lo tanto hay que señalar que existen reportes de la literatura en donde se manifiesta que la interacción de ambos reguladores de crecimiento promueven la diferenciación celular y que estos no actúan por sí solos en los cultivos *in vitro* de plantas, por lo que es necesario adicionar la cantidad óptima de ambos reguladores de crecimiento a estos cultivos (Figueiredo y col., 1991). Sin embargo, existen tejidos los cuales contienen suficiente auxina endógena que puede interactuar con la citocinina exógena o viceversa y favorecer la diferenciación celular como el metabolismo secundario ( Mantel, 1983 y George and Serrington, 1984). Por otro lado existen sistemas de cultivo *in vitro* para la producción de metabolitos secundarios en que primero se establecen las condiciones de cultivo que involucren principalmente el medio de cultivo y la concentración de reguladores de crecimiento adecuados para inducir la proliferación celular e incrementar la cantidad de biomasa para posteriormente pasar a otro sistema en otras condiciones de cultivo que favorezcan el metabolismo secundario (Vasil, 1987).

Por otro lado, como ya se ha mencionado, los explantes de hoja, entrenudo y secciones de raíz en presencia de cualquier concentración de la auxina generaron estructuras globulares bien definidas semejantes a embriones somáticos. Esta respuesta morfogenética fué más reproducible en los explantes de hoja, estas estructuras se subcultivaron en medio MS sin la adición de los reguladores de crecimiento y con la adición al medio de cultivo de K en concentraciones de 1, 2 y 3 mg/l de acuerdo a los tratamientos originales (formando los experimentos 7, 8, 9 y 10, anexo II) con el fin de que se expresara la embriogénesis somática.

Las estructuras al inicio del subcultivo presentaban una coloración violeta en sus puntas que posteriormente desaparecía dando una coloración amarilla blanquecina lo que indicaba que posiblemente se trataba de una señal la cual nos manifestaba el principio de un proceso de iniciación meristemática sin embargo, en ambos tratamientos al cabo de 12 semanas de observación las estructuras globulares meristemáticas se vieron afectadas por el fenómeno de oxidación y después de un segundo subcultivo en medio MS adicionado de ácido ascórbico como antioxidante y en los tratamientos donde la K se encontraba en una concentración de 1 mg/l y en algunos tratamientos donde no se encontraba presente dichas estructuras dieron lugar a la formación de raíces pilosas (hairy roots) de forma abundante como se muestra en la figura 6 y en las siguientes 4 semanas de observación a partir de éstas se formó callo friable con una coloración blanquecina y en proliferación libre de oxidación tanto en condiciones de fotoperíodo como de oscuridad. Sin embargo, después de 2 semanas el callo formado se oxidó de forma rápida y solamente uno de los tratamientos en medio MS sin reguladores de crecimiento que mostraba estructuras globulares perfectamente definidas después de 5 meses generó embriones somáticos (figura 7), sin llegar a desarrollar una planta completa.

Estos resultados concuerdan con los reportes de Saunders y col., (1987) quienes describen que en los explantes de *Phaseolus vulgaris* se identificó que el 2,4-D es un agente que induce la formación de estructuras globulares (preembriones) describiéndolos como formas aberrantes de embriones somáticos, pero a la vez inhibe el desarrollo de embriones viables pues al removerlo del medio en forma gradual no se favorece la formación de la embriogénesis somática. Sin embargo

Nessler y col. (1982 y 1989) informan que las estructuras globulares denominadas como meristemoides tienen la capacidad de crecer y diferenciarse, ya sea para la formación de brotes, al remover la auxina del medio y adicionando la citocinina, o formar embriones somáticos con el desplazamiento de la citocinina del medio de cultivo y que además en este paso es donde hay una alta acumulación de alcaloides morfínicos en cultivos en suspensión de *Papaver somniferum*.

Debido a la variabilidad morfogénica que se originó de las estructuras globulares provenientes del explante de hoja acompañada del proceso de oxidación el cual afectó el crecimiento de la biomasa en las condiciones de cultivo mencionadas originando en algunos casos que la biomasa tomara una coloración café oscuro y su peso fué disminuyendo por lo tanto se realizó el análisis de extracción y detección del metabolito por TLC. Las estructuras globulares oxidadas no sintetizaron el metabolito. Por lo tanto no se realizó un análisis de varianza que nos determinara el efecto de las condiciones de cultivo en la obtención de biomasa y producción de piquero A.

Los tratamientos donde se determinó la cantidad del metabolito fueron en donde la K se encontraba en una concentración de 1 mg/l y en un tratamiento donde no se encontraba presente. La cantidad de piquero A cuantificada fué  $4.4 \times 10^{-2}$  mg/mg Pf y  $3.2 \times 10^{-2}$  mg/mg de Pf y fué en la etapa de transformación de raíces pilosas a callo, donde se cuantificó el terpeno a diferencia de las estructuras globulares, en las cuales no se encontró piquero A en ninguno de los tratamientos.

Cabe hacer mención que el callo generado de los explantes de hoja era disgregable y en constante proliferación, por lo tanto, se podría decir que si se estandariza el sistema del proceso de transformación de estructuras globulares a raíces pilosas y de estas a callo controlando la oxidación y detectando en que parte del proceso existe una mayor frecuencia de aparición de piquero A, éste sería un buen sistema de optimizar la producción de piquero A.

En base a estas respuestas podemos concluir que las condiciones de cultivo *in vitro* para la formación de callo de *P. trinervia Cav.*, son: Explante entrenudo, medio de cultivo MS, adicionado de 2 mg/l de K cultivados en condiciones de fotoperiodo la cantidad de biomasa registrada fue 3713.34 mg Pf (tablas 6 y 9-A) El callo obtenido en estas condiciones fué de apariencia disgregable y en continua proliferación (figura 5). Para la producción del terpeno es en medio MS adicionado de 3 mg/l de K, la cantidad de piquero A fue de 0.345 y 0.42 mg/mg Pf (tablas 10-A y B) y en la combinación de 1 mg/l de 2,4-D y 3 mg/l de K cuantificando una cantidad de 0.27 mg/mg Pf.

En cuanto a la formación de embriones somáticos viables es necesario realizar un estudio más profundo de las condiciones de cultivo que los originan y como salen de los objetivos de nuestro estudio no se le dió ningún seguimiento adecuado pero ha sido objeto de estudio del laboratorio.

Para la generación de plántulas de los explantes de entrenudo, se les dió un seguimiento con la finalidad de observar si estas se desarrollaban como plantas completas y poder ofrecer un método de propagación *in vitro*. Estos datos no se muestran en el presente trabajo por considerarlos fuera de los objetivos propuestos pero también ha sido objeto de estudio en el laboratorio, sin embargo si podemos confirmar que el método de propagación ensayado originó plantas vigorosas (figura 8).

A partir de estas respuestas se realizaron una serie de experimentos para establecer las condiciones de cultivo *in vitro* de callo, principalmente porque la mayor parte de la biomasa obtenida estaba afectada por oxidación.



FIGURA 6. RAICES PILOSAS DESARROLLADAS POR ESTRUCTURAS GLOBULARES, GENERADAS A PARTIR DEL EXPLANTE DE HOJA, ORIGINALMENTE CULTIVADO EN MEDIO NS + 1 mg/l K (2 MESES) Y SUBCULTIVADO EN MS SOLO (2 MESES DE INCUBACION).



FIG. 7. FORMACION DE EMBRIONES DESARROLLADOS POR LAS ESTRUCTURAS GLOBULARES GENERADOS A PARTIR DEL EXPLANTE DE HOJA, DESARROLLADOS EN MEDIO MS, SIN LA ADICION DE REGULADORES DE CRECIMIENTO, EXPUESTOS EN FOTOPERIODO (5 MESES DE INCUBACION).



FIG. 8. PLANTA DE PRIQUERIA TRINERVIA, OBTENIDA A PARTIR DEL EXPLANTE ENTRENUDO, CULTIVADO EN MEDIO MS ADICIONADO DE 2 mg/l DE K. TIEMPO DE INCUBACION 8 MESES.

## 5.2. Efecto de los medios de cultivo, reguladores de crecimiento y condiciones ambientales de cultivo sobre la biomasa oxidada generada a partir de los explantes de hoja, entrenado y raíz.

Para evitar la oxidación de la biomasa generada de los tratamientos experimentales, inicialmente se empleó ácido ascórbico como antioxidante, el cual no tuvo efecto al exponer la biomasa oxidada de los explantes de hoja, entrenado y raíz en las condiciones de cultivo que les dieron origen después de un mes de observación.

Posteriormente, se empleó como antioxidante en el medio de cultivo nor-leucina, cuyo poder como antioxidante fue probado por Barnun and Mayer (1983) quienes lograron disminuir la actividad de la catecol-oxidasa, enzima promotora de oxidación en células de Tabaco. En nuestro caso, después de 12 semanas se observó que ésta no ejerció efecto sobre la biomasa oxidada proveniente de explantes de entrenado y secciones de raíz cultivados en medio MS. Al mismo tiempo, parte de esta biomasa se subcultivó en medio KC, considerado como un medio pobre en nutrientes pues de acuerdo a Phillips y Hershaw (1977), citados por Figueiredo (1990) la disminución de nutrientes en el medio reduce la síntesis de compuestos fenólicos a nivel celular en cultivos *in vitro*. Esto ocurre mediante un mecanismo en el cual el tejido oxidado inicia un proceso de adaptación y de mantenimiento a nivel biosintético, lográndose en algunos casos una nueva proliferación celular libre de oxidación. Resultados similares han sido descritos por George and Serrington (1984) y lo recomiendan para revertir el proceso de oxidación. Otro método que se recomienda para evitar la oxidación es el de incorporar un antioxidante al medio de cultivo o bien del subcultivo periódico de la biomasa oxidada o el de exponer los cultivos vegetales en condiciones de oscuridad total de tal manera que se evita en algunos casos la síntesis de fenoles y con ello el proceso de oxidación de los explantes (Loyola y col., 1995).

Específicamente en nuestro caso, parte de la biomasa oxidada (callo y estructuras globulares) de los explantes de hoja, entrenado y raíz al ser expuesta en medio MS y KC adicionado de las concentraciones hormonales de 0 a 3 mg/l de 2,4-D y K y empleando nor-leucina como antioxidante, después de 3 meses de observación y de haber realizado subcultivos cada 20 días en las mismas condiciones de cultivo, no registraron incremento en la diferenciación de la biomasa oxidada lo que quiere decir que el medio de cultivo y el antioxidante no tuvieron influencia sobre la diferenciación celular.

Sin embargo cuando los callos formados por los explantes entrenado y raíz subcultivados en los medios de cultivo MS y KC adicionados de ácido ascórbico como antioxidante, el formado por el explante entrenado cultivado en medio MS, se recuperó de la oxidación después de un cuarto subcultivo, el cual se realizó cada 20 días generando un callo de apariencia disgregable con una coloración amarilla verdosa translúcida (figura 5), pero con un crecimiento lento en comparación de los callos compactos generados del explante de raíz, subcultivados en medio MS y KC. Estos callos no se recuperaron de la oxidación (figura 9), a pesar del subcultivo periódico a un medio con antioxidante, por lo que se tomó la determinación de analizar toda la biomasa (callo y estructuras globulares) generada por estos tratamientos para detectar y cuantificar la presencia del metabolito.

En la tabla 11 se presenta el análisis de varianza (factorial aleatorio) para determinar el efecto de los medios de cultivo (MS y KC), los 3 tipos de material vegetal (hojas, entrenado y raíz), 2 condiciones ambientales de cultivo (fotoperiodo y oscuridad), reguladores de crecimiento (K, 2,4-D) y su concentración (0 a 3 mg/l) sobre la producción de biomasa oxidada. Este mostró que los

tres tipos de explantes, presentaron diferencias significativas con respecto a la producción de biomasa. Los medios de cultivo (MS y KC) mostraron niveles altamente significativos, sin embargo la concentración de los reguladores de crecimiento y las condiciones ambientales no presentaron niveles significativos, tampoco se observa que existiera interacción entre estas variables evaluadas. Por lo tanto al realizar la prueba de Duncan (tabla 11-A) para observar el efecto de los tres tipos de explantes sobre la producción de biomasa notamos que con cualquiera de estos materiales se obtiene la diferenciación celular, siendo las hojas las que dieron una mayor cantidad de biomasa la cual fue de 2233.7294 mg Pf (tabla 11-A).

Para determinar el efecto de los medios de cultivo sobre la producción de biomasa se observaron de forma directa los valores de las medias (tabla 11-B) debido a que solo tenemos 1 grado de libertad y no es posible realizar la prueba de Duncan para esta variable. Los valores de las medias indican que el medio MS es el que originó una mejor respuesta en la producción de biomasa. Esto nos indica que la biomasa oxidada subcultivada en el medio KC permaneció en un estado de latencia o sea que al emplear este medio no se dió un proceso de adaptación de la biomasa ni se observó un crecimiento de la misma por lo cual el medio no tuvo un efecto significativo para evitar la oxidación y que además el antioxidante (ácido ascórbico) posiblemente tampoco ejerció un efecto a considerar sobre la biomasa oxidada puesto que si tomamos en cuenta el tiempo durante el cual se realizaron los subcultivos realmente no se observó crecimiento de esta. Esto nos conduce a pensar que el fenómeno de oxidación es difícil de controlar en la planta *P. trinervia* en las condiciones ambientales propuestas.



FIG. 9. PERDIDA DE LA BIOMASA (CALLO Y ESTRUCTURAS GLOBULARES) GENERADA DEL EXPLANTE RAIZ CULTIVADOS EN MEDIO MS ADICIONADO DE 3 mg/l K, POR OXIDACION EN 4 MESES DE INCUBACION.

**TABLA 11**

Análisis de varianza para determinar el efecto de los subcultivos de la biomasa oxidada generada de los 3 tipos de material (hojas, entrenudo y raíz) sobre los medios de cultivo (MS y KC), adicionados de los reguladores de crecimiento (K, 2,4-D) y su concentración (0 a 3 mg/l) en 2 condiciones ambientales de cultivo (fotoperiodo y oscuridad), sobre la inducción de nueva biomasa.

**FACTORIAL ALEATORIO PARA BIOMASA**

Fuente de Variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculada	F Tablas 5 % 1 %
Material veg.	2	22901180.60	11450590.3	3.4319	3.02 - 4.76 *
Cond. amb.	1	132.76	132.76	0.00004	3.86 - 6.70 N.S
Cinetina	3	686643.36	228881.12	0.0686	2.62 - 3.85 N.S
Auxina	3	10955953.72	3651984.57	1.09455	2.62 - 3.85 N.S
Medio de cul.	1	87113685.41	87113685.41	26.1092	3.86 - 6.70 **
Interacciones					
V1 x V2	2	177540.58	88770.29	0.02661	3.02 - 4.76 N.S
V1 x V3	6	2441405.42	406900.9	0.122	2.12 - 2.85 N.S
V2 x V3	3	2298906.33	766302.11	0.22967	2.62 - 3.85 N.S
V2 x V4	3	497275.45	165758.48	0.04968	2.62 - 3.85 N.S
V2 x V5	1	726513.70	726513.7	0.2177	3.86 - 6.70 N.S
V3 x V4	9	12514229.01	1390469.89	0.41674	1.90 - 2.46 N.S
V3 V5	3	1601783.87	533927.96	0.16003	2.62 - 3.85 N.S
V1 x V4	6	1812379.60	302063.27	0.09053	2.12 - 2.85 N.S
Error	340	1134414520.235	3336513.295		
Total	383	1799036328			

\* significativo al 5%      \*\* Altamente significativo al 1%      N.S No significativo

**TABLA 11-A**

Prueba de Duncan para determinar el efecto del subcultivo de la biomasa oxidada generada de los explantes (hojas, entrenudo y secciones de raíz) sobre la inducción de nueva biomasa.

Tratamientos	Medias Producción de biomasa (mg)	Clasificación de * grupos de medias
Secciones de raíz	441.9469	a
Secciones de entrenudo	1002.6363	b
Secciones de hoja	2233.7294	c

\* Las literales significan la clasificación entre los grupos de medias

TABLA 11-B

Efecto del medio de cultivo (MS y KC) en la producción de biomasa oxidada

Tratamientos	Medias Produc. biomasa (mg)
M.S	2233.7294
K.C	722.2916

En la tabla 12 se presenta el análisis de varianza (cuadrado latino en bloques) para determinar el efecto que tuvo la biomasa oxidada generada de los 3 tipos de material vegetal (hojas, entrenudo y raíz), al ser subcultivada en los los medios de cultivo (MS y KC), modificados por la adición de los reguladores de crecimiento (K, 2,4-D) y su concentración (0 a 3 mg/l ) expuestos en 2 condiciones ambientales de cultivo (fotoperiodo y oscuridad), sobre la producción de piquero A. En esa tabla se observan ceros en la columna que comprende la suma de cuadrados y en la de cuadrado medio, esto se debe a que el programa estadístico que se utilizó para realizar este análisis no nos permitió aumentar el número de decimales pero sin embargo realizó todos los calculos correspondientes para determinar el valor de F calculada y el error. Esto nos permitió obtener los valores de la F de tablas (Fa k-1/N-k) a niveles de significancia de 1 y 5 %.

Del análisis de varianza (cuadrado latino en bloques) para evaluar la producción de piquero A de la biomasa oxidada podemos apreciar que unicamente la concentración de la cinetina presenta diferencias significativas. Los tres explantes, las condiciones ambientales de cultivo, la concentración de la auxina y los medios de cultivo mostraron no tener efecto sobre la producción de piquero A pues no se observan niveles significativos. Para poder determinar específicamente el tratamiento que origina la mejor respuesta observamos los valores de las medias en la tabla 12-A y vemos que el tratamiento que contiene 1 mg/l de K es donde se presenta la mayor cantidad del metabolito y es de  $1.1 \times 10^{-3}$  mg/mg Pf.

La prueba de Duncan no se realizó debido a que no tenemos el valor del cuadrado medio. Por otro lado hay que mencionar al respecto que en el cultivo de células en suspensión de plantas superiores la oxidación reprime totalmente a nivel biosintético la producción de metabolitos de interés (Pierik, 1995). Posiblemente a ello se deba el bajo rendimiento del metabolito presente en la biomasa oxidada del experimento.

TABLA 12

Análisis de varianza para determinar el efecto del subcultivo de la biomasa oxidada generada a partir de los 3 tipos de material vegetal (hojas, entrenudo y raíz), en los medios de cultivo (MS y KC) adicionados de los reguladores de crecimiento (K, 2,4-D) en su concentración (0 a 3 mg/l). expuestos en 2 condiciones ambientales de cultivo (fotoperíodo y oscuridad), sobre la producción de piquero A.

CUADRADO LATINO EN BLOQUES

Fuente de Variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculada	F Tablas 5% 1%
Tipo de explante	2	.000	.000	0.000	3.02 - 4.76 N.S
Cond. amb.	1	.000	.000	0.031	3.86 - 6.70 N.S
Cinetina	3	.000	.000	2.930	2.62 - 3.85 *
Auxina	3	.000	.000	0.009	2.62 - 3.85 N.S
Medio de cul.	1	.000	.000	1.928	3.86 - 6.70 NS
Repeticiones	47	.001	.000	2.173	1.47 - 1.71 *
Error	327	.003	.000		
Total	383	.004	.000		

\* significativo al 5%      \*\* Altamente significativo al 1%      N.S No significativo

TABLA 12-A

Efecto de la concentración de la K sobre la producción de piquero A cuantificado a partir de la biomasa oxidada.

Tratamientos	Medias Producción de Piquero A (mg/mg PF)
0 mg/l	0.0003
1 mg/l	0.0011
2 mg/l	0.0000
3 mg/l	0.0000
Total	0.0003

5.3. Efecto de los reguladores de crecimiento y su concentración sobre la diferenciación de callo y producción de piquero A.

Para incrementar la proliferación de callo proveniente de entrenudos, éste se subcultivo en los siguientes tratamientos; empleando 2,4-D (0.5 mg/l) y su análogo 4-CPA (1 y 2 mg/l) por separado y combinándolos con K (1 y 2 mg/l). Esto se realizó con el fin de verificar si realmente era necesaria la interacción de auxina, citocinina para incrementar la proliferación celular o bien si existía la suficiente auxina endógena para mantener el desarrollo del callo. Los resultados se presentan en la tabla 13 y figura 10.

TABLA 13

EFFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO (2,4-D, 4-CPA Y K) SOBRE LA INDUCCIÓN DE CALLO DE *P. trinervia Cav.*

Tratamiento		Frecuencia de inducción de callo	Aspecto del callo
Auxina (mg/l)	Cinellina (mg/l)		
0	K (1.0)	++	Callo verde, friable, poco crecimiento ligeramente oxidado
0	k (2.0)	+++	Callo verde friable de buen crecimiento, libre de oxidación.
2,4-D (0.5)	0	+++	Callo friable, crecimiento moderado y ligeramente oxidado
2,4-D (0.5)	k (2.0)	+++	Callo friable, crecimiento lento y ligeramente oxidado
4-CPA (1.0)	k (2.0)	++	Callo compacto, escaso y oxidado
4-CPA (2.0)	k (2.0)	++	Callo compacto, escaso y oxidado

Proliferación de biomasa por frasco (3 repeticiones):  
 + : Pobre (< 3.0 gr. Pf.)  
 ++ : Moderada (3.0 - 4.0 gr. Pf.)  
 +++ : Buena (> 4.0 gr. Pf.)

Como se observa en la tabla 13 el crecimiento del callo se presentó en todos los tratamientos, sin embargo en los tratamientos donde existía la cinetina sola es donde hubo un mayor crecimiento de callo seguido de los tratamientos donde se empleó la auxina sola y en la combinación de K con una concentración de 2 mg/l y 2,4-D en concentración de 0.5 mg/l., el callo generado fué de apariencia friable con una coloración verde - amarilla y blanco ligeramente oxidado. Estos callos al subcultivarse siguieron presentando las mismas características. Sin embargo en los tratamientos donde se empleó 4-CPA (homólogo del 2,4-D, su efecto como regulador es menor que el 2,4-D en cultivos *in vitro*) en concentraciones de 1 y 2 mg/l combinado con K el callo presentó lento crecimiento su apariencia era compacta, de color amarillo a café con oxidación.

Estos resultados nos indican que es posible que existan niveles de auxina endógena en los tejidos que permite mantener el crecimiento activo celular pero que a la vez es necesario adicionar auxina iniciando con niveles de concentración mínimos hasta lograr una interacción óptima de auxina-cinetina de manera que se favorezca el crecimiento del callo.

Golenioswki y col., (1992) reportan que el nivel de concentración de la hormona endógena es insuficiente para mantener la diferenciación celular, por lo que es recomendable la adición de otro regulador de crecimiento, una vez establecido el sistema de inducción de callo de tal manera que exista un balance hormonal auxina / citocinina y se incremente la proliferación celular y a la vez promueva la formación del metabolito.

Al realizar el análisis de varianza para determinar el efecto de 2 tipos de auxina (2,4-D y 4-CPA) en concentraciones de 0.0, 0.5 y 1 mg/l y K en concentración de 1 y 2 mg/l y condiciones ambientales de cultivo (fotoperíodo y oscuridad) sobre la producción de callo (tabla 14), se encontró un efecto significativo con respecto a la concentración de la cinetina a diferencia de las otras variables evaluadas las cuales no mostraron niveles de significancia. Lo mismo sucede cuando interactúan las condiciones ambientales con la concentración de la K y la auxina. Sin embargo cuando interactúan ambas concentraciones auxina / cinetina se observa un efecto altamente significativo, lo que no se ve cuando hay una interacción entre la concentración de la cinetina con el tipo de auxina o bien la concentración de la auxina con el tipo de auxina no se observan niveles de significancia. Tampoco se detectaron niveles de significancia en las interacciones triples y cuádruples que evalúan estas variables.

En vista de lo anterior se practicó una prueba de Duncan la cual se presenta en la tabla 14-A para determinar el efecto concreto de la interacción de las concentraciones de auxina / cinetina. La prueba mostró que efectivamente el tratamiento que contiene 1 y 2 mg/l de K en ausencia de la concentración de la auxina y en la interacción de la K (1 y 2 mg/l) con 0.5 mg/l de 2,4-D es donde ejerció un mejor efecto en el crecimiento del callo, con una producción de 4056.17 mg de Pf.



FIG. 10. PROLIFERACION DE CALLO A PARTIR DEL EXPLANTE ENTRENADO EN MEDIO MS ADICIONADO DE K (2 mg/l), 2,4-D (0.5 mg/l) Y 4-CPA/k (1:2 mg/l) RESPECTIVAMENTE, EN CONDICIONES DE CULTIVO DE FOTOPERIODO EN UN MES DE OBSERVACION)

**TABLA 14**

Análisis de varianza para determinar el efecto de 2 tipos de auxina (2,4-D y 4-CPA) en 3 concentraciones (0.0, 0.5 y 1 mg/l) y K, su concentración (1 y 2 mg/l) y condiciones ambientales de cultivo (fotoperiodo y oscuridad) sobre la producción de biomasa (callo).

**FACTORIAL ALEATORIO**

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculada	F Tablas 5 %	1 %
Cond. Amb.(V1)	1	887838.11	887838.11	0.38	4.08 - 7.31	N.S
Cinetina (V2)	1	14922859.03	14922859	6.42	4.08 - 7.31	*
Auxina (V3)	2	5691065.79	1897021.9	0.82	4.08 - 7.31	N.S
Tipo de auxina (V4)	1	.00	0	0	0	0 N.S
<b>Interacciones</b>						
V1 x V2	1	893595.13	893595.13	.38	4.08 - 7.31	N.S
V1 x V3	3	51020.69	17006.90	.01	2.84 - 4.31	N.S
V1 x V4	0	0	0	0	0	0 N.S
V2 x V3	2	27005644.63	13502822	5.81	3.23 - 5.18	**
V2 x V4	0	0	0	0	0	0 N.S
V3 x V4	0	0	0	0	0	0 N.S
V1 x V2 x V3	2	60236.32	30118.16	.01	3.23 - 5.18	N.S
V1 x V2 x V4	0	0	0	0	0	0 N.S
V1 x V3 x V4	0	0	0	0	0	0 N.S
V2 x V3 x V4	0	0	0	0	0	0 N.S
V1 V2 V3 V4	0	0	0	0	0	0 N.S
Error	28	65078644.84	2324237.3			
Total	41	115169888.9	.030			

\* significativo al 5 %

\*\* Altamente significativo al 1 %

N.S No significativo

TABLA 14-A

Prueba de Duncan para evaluar el efecto de la concentración de los reguladores de crecimiento (K y 2,4-D) sobre la producción de callo.

Tratamientos		Medias	Clasificación *			
Conc. K (mg/l)	Conc. 2,4-D (mg/l)	Produc. callo (mg)				
2	1.0	0.0	a			
1	0.0	498.40	a	b		
2	2.0	1358.60	a	b	c	
1	1.0	1789.15		b	c	
1	2.0	2003.43		b	c	
1	0.5	2146.29		b	c	d
2	0.5	3096.37			c	d
2	0.0	4056.17				d

\* Las literales significan la clasificación de los grupos de medias

El análisis de varianza ( factorial aleatorio) para determinar el efecto de 2 tipos de auxina (2,4-D y 4-CPA) en tres concentraciones (0, 0.5 y 1 mg/l) y K, a dos concentraciones (1 y 2 mg/l) y condiciones ambientales de cultivo sobre la producción de piquero A, se muestra en la tabla 15. El análisis mostró que las condiciones ambientales, la concentración de auxina como el tipo de auxina y la cinetina no ejercen un efecto directo sobre la producción del metabolito. Sin embargo en la interacción entre la concentración de la auxina y la K si presentaron niveles significativos, mientras que las interacciones dobles, triples y cuádruples de las variables evaluadas no mostraron niveles significativos

Al observar los valores de las medias de forma directa en el análisis de la interacción entre los niveles de concentración de los reguladores de crecimiento nos reveló que con 2 mg/l de K y en ausencia de la auxina es donde se obtiene la mayor producción del metabolito y fué de  $1.0 \times 10^{-2}$  mg/mg Pf (la prueba de Duncan no se realizó debido a que no se tiene el valor del cuadrado medio).

Esto nos lleva a confirmar que la K juega un papel importante en la producción de biomasa y de piquero A. Al mismo tiempo pensamos que el tejido diferenciado debe tener la suficiente auxina endógena que interactúa con la cinetina exógena para inducir la proliferación celular y a la vez que ya establecida la diferenciación celular es necesario adicionar una cantidad óptima de auxina para que el tejido continúe la diferenciación celular. Este mismo proceso se observó en la inducción de callo de *Ambrosia tenuifolia* (Golenioswki y col., 1992) con la variante de que solo emplearon 2,4-D para inducir la proliferación celular.

TABLA 15

Análisis de varianza para determinar el efecto de 2 tipos de auxina (2,4-D y 4-CPA) en 3 concentraciones (0.0, 0.5 y 1 mg/l) y K, su concentración (1 y 2 mg/l) y condiciones ambientales de cultivo (fotoperiodo y oscuridad) sobre la producción piquerol A.

FACTORIAL ALEATORIO PARA PRODUCCION DE PIQUEROL A

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F Calculada	F Tablas 5% 1%	
Cond. Amb.(V1)	1	.00	.00	.12	4.20 - 7.64	N.S
Cinetina (V2)	1	.00	.00	3.78	4.20 - 7.64	N.S
Auxina (V3)	3	.00	.00	2.09	3.34 - 5.45	N.S
Tipo auxina (V4)	0	.00	0	0	0 0	N.S
Interacciones						
V1 x V2	1	.00	.00	.13	4.20 - 7.64	N.S
V1 x V3	3	.00	.00	.41	2.95 - 4.57	N.S
V1 x V4	0	0	0	0	0 0	N.S
V2 x V3	2	.00	.00	4.57	3.34 - 5.45	*
V2 x V4	0	0	0	0	0 0	N.S
V3 x V4	0	0	0	0	0 0	N.S
V1 x V2 x V3	2	.00	.00	0.93	3.34 - 5.45	N.S
V1 x V2 x V4	0	0	0	0	0 0	N.S
V1 x V3 x V4	0	0	0	0	0 0	N.S
V2 x V3 x V4	0	0	0	0	0 0	N.S
V1 V2 V3 V4	0	0	0	0	0 0	N.S
Error	28	.00	.00			
Total	41	.0004				

\* significativo al 5%      \*\* Altamente significativo al 1%      N.S No significativo

#### 5.4. Determinación de la curva de crecimiento de callo en medio semi-sólido.

Las figuras 11 y 12 muestran el crecimiento del callo, evaluado como peso fresco y seco, en el medio MS suplementado con 2 mg/l de K, expuestos en fotoperíodo. En dichas gráficas se observa la fase de adaptación y crecimiento. La mayor acumulación de peso fresco se presentó a los 75 días sin llegar a observar claramente la fase de muerte celular. También se muestran las características de la cinética de crecimiento como es la velocidad específica de crecimiento, el tiempo de duplicación celular y el consumo total de sacarosa en el medio de cultivo (% Fuente de carbono = Biomasa total en gr./Fuente de carbono suministrada, en gr., Fowler., 1982).

Las características del crecimiento celular de *Piqueria trinervia* Cav., en medio semi-sólido, son las siguientes:

$$M = dx/dt \cdot 1/x = M \text{ (1/días)} = 0.0459$$
$$td = \ln 2/M = 15.10 \text{ (días)}$$

Donde :

- \* M : Es la velocidad específica de crecimiento celular.
- dx/dt = crecimiento celular (Pf) con respecto al tiempo ( en días).
- td : Tiempo de duplicación (días).

El consumo de sacarosa al final del crecimiento fué de 8.65 % en un tiempo de 90 días, la cual es relativamente poca, comparativamente a otros cultivos. Goleniowski y col. (1990) mencionan que el consumo de sacarosa esta relacionada con la velocidad de crecimiento del cultivo y en optimos niveles se favorece la acumulación del metabolito. Sin embargo, Figueiredo y col (1991) en el cultivo en suspensión de *Achillea millefolium* indican que niveles elevados de sacarosa disminuyen la velocidad de crecimiento y promueven la formación de fenoles e inhiben la síntesis de metabolitos.

En la figura 13 y 13a se observa un punto a los 45 días donde hubo una acumulación mayor del metabolito cuya producción fué de  $7.2 \times 10^{-2}$  mg/mg Pf. Este punto se consideró para evaluar la cinética de crecimiento del cultivo de células en suspensión de *P. trinervia* y aumentar la producción de metabolito.

#### 5.4.1. Determinación de la curva de crecimiento del cultivo de células en suspensión.

Para obtener un cultivo de células en suspensión, el callo formado se transfirió a un medio de cultivo líquido, el cual nos proveyó un cultivo en suspensión homogéneo, lo que implica que hay mayor difusión de los nutrientes en el medio, de los reguladores de crecimiento y del contenido de oxígeno entre otros factores a considerar, de tal manera que se incremente el crecimiento celular y por consiguiente la acumulación de metabolitos.

El éxito de establecer un cultivo en suspensión va a depender de la disgregación del callo. El callo empleado para establecer el cultivo en suspensión presentaba estas características y se partió de un inóculo inicial de  $2 \pm 0.3$  gr, cultivados en medio MS adicionado de 2 mg/l de K y en fotoperíodo.

La figura 14 muestra el crecimiento celular expresado como peso fresco (mg) y se observa que en los primeros 10 días hubo un crecimiento acelerado de la biomasa y la máxima acumulación de peso fresco fué entre 60 y 80 días, sin observarse claramente la fase estacionaria. A diferencia de la figura 15, la cual muestra el peso seco (mg/mg Pf) donde se observa que hubo un crecimiento acelerado y posteriormente se mantuvo semi-estacionario, posiblemente debido al alto contenido de agua en las células, por lo que no se establece claramente su cinética de crecimiento.

Hay que señalar que el crecimiento es más acelerado en el cultivo en suspensión, lo que indica que hay una mejor adaptación de las células al sistema en suspensión. Cabe hacer notar que el cultivo formó una suspensión fina sin la presencia de agregados celulares.

Las características del crecimiento celular de *Piqueria trinervia Cav.*, en el medio líquido son las siguientes:

Velocidad específica de crecimiento (M) =  $dx/dt.1/x = \mu$  (1/días) = 0.0120

Tiempo de duplicación (td) =  $\ln 2/M = 57.762$  (días)

La cantidad de sacarosa consumida durante el cultivo en suspensión fué de 21.3 %, a los 100 días.

Estos resultados muestran que el cultivo es muy lento en su crecimiento en relación a otros cultivos en suspensión donde el tiempo de duplicación es más corto, pero a la vez es comparable con cultivos que crecen a la misma velocidad como se observa en la tabla 16 y se debe principalmente a las características del cultivo, como es el volumen del cultivo, la disgregación celular, del oxígeno suministrado, la cantidad de sacarosa entre otros parámetros principalmente (Kreis y Reinhard, 1989).

**TABLA 16. COMPARACION DE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO Y EL TIEMPO DE DUPLICACION EN CULTIVOS EN SUSPENSION.\***

ESPECIES	TIEMPO DE DUPLICACION (hrs)	VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO (1/hrs)
<i>Nicotiana tabacum</i>	15.0	0.046
<i>Malus cuminum</i>	31.5	0.022
<i>Morinda citrifolia</i>	45.0	0.015
<i>Coleus blumei</i>	53.0	0.013
<i>Catharanthus roseus</i>	72.0	0.010
<i>Digitalis lanata</i>	120.0	0.006

\* Kreis y Reinhard (1989).

De acuerdo a las figuras 13 y 16, se observa que el contenido de piquero A fué mayor en el cultivo en suspensión de células de *P. trinervia Cav* y fué de  $1.44 \times 10^{-1}$  mg/mg Pf a los 40 días a diferencia del cultivo en medio semi-sólido, la cual fué de  $7.2 \times 10^{-2}$  mg/mg Pf en 45 días.

En cuanto a la cuantificación del metabolito, que se excretó al medio de cultivo (figura 17 y 17a), la mayor cantidad promedio que se registró fué de  $7.8 \times 10^{-2}$  mg/mg Pf. Esta característica de excretar el metabolito al medio de cultivo hace que este sea un buen sistema de producción pues se facilitaría el proceso de recuperación. Esto no ha sido observado en otros sistemas de cultivo *in vitro* debido a que los metabolitos secundarios en las vacuolas de las plantas pero sin embargo existen reportes en la literatura donde se menciona que controlando el pH del medio nutritivo las células excretan el metabolito al medio (Loyola y col., 1990)

Finalmente para confirmar la presencia de piquero A en todos los experimentos realizados una de las muestras de los puntos evaluados en la curva de crecimiento del cultivo en suspensión cristalizó espontáneamente, estos cristales fueron purificados por TLC preparativa, obteniendo 6 mg. de cristales a los cuales se les hizo un espectro de  $^1\text{HRMN}$ . Los espectros obtenidos se muestran en la figura 18. El espectro (A) fué hecho con  $\text{CDCl}_3$ , al (B) se le añadió  $\text{D}_2\text{O}$  para intercambiar los protones de los grupos hidroxilos de la molécula por deuterio y establecer que existen esos grupos  $-\text{OH}^*-\text{OD}$  en la molécula, ambos espectros corresponden a los cristales de la muestra obtenida *in vitro* y el espectro (C) corresponde al estandar de piquero A (cristales puros). Los espectros A y B sirvieron para identificar que realmente era piquero A el que se cuantificó en todas las muestras experimentales, ya que se observan las siguientes señales en los tres espectros : 6.06 (2H, m, H2 e H3), 5.8 (1H, m), 5.4 (1H, d, H4), 5.27 (2H, d, H7), 4.45 (2H, m, H10), 3.6 (1H, d, H5), 1.8 (3H, s, H9) ppm, se observa una señal en 7.3 ppm que corresponde a  $\text{CDCl}_3$ . Además se observan unas señales en los espectros A y B que no aparecen en el espectro (C) a 1.3 y 0.85 ppm que se deben a la presencia en mayor proporción de un hidrocarburo de alto peso molecular que se obtiene del proceso de separación y purificación que se hizo al extracto de las células en suspensión con cloroformo y que fué por cromatografía en capa fina preparativa ( $\text{SiO}_2$ ). Cabe aclarar que las señales correspondientes a la muestra *in vitro* son muy pequeñas y presentan ruido debido a la cantidad de la muestra (6.0 mg). Sin embargo, se observa una total semejanza con las señales con respecto al espectro de una muestra estandar de piquero A puro (40 mg).

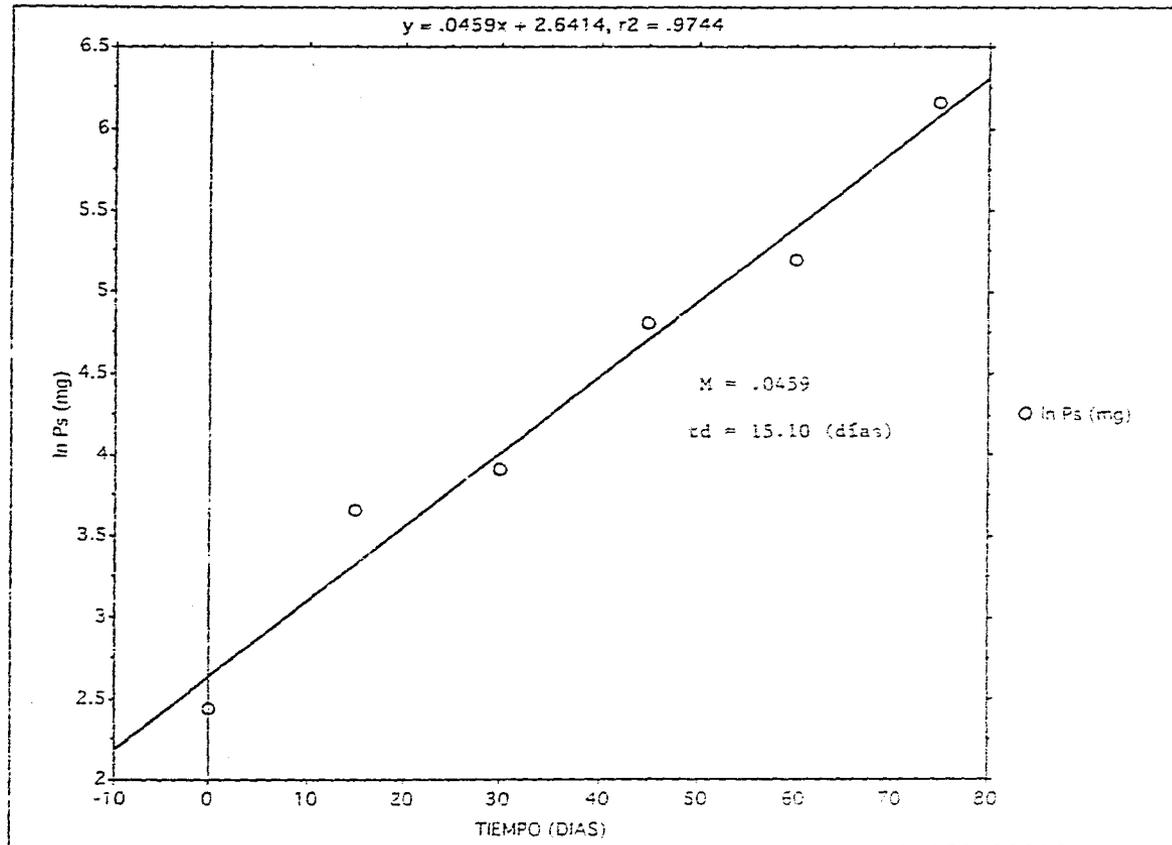


FIG. 11. CINETICA DE CRECIMIENTO DEL CALLO DE P. TRINERVIA CAV. EN MEDIO MS+2 mg/l K.  
 (ln Ps vs Tiempo).  
 % DE SACAROSA CONSUMIDA = 8.65.

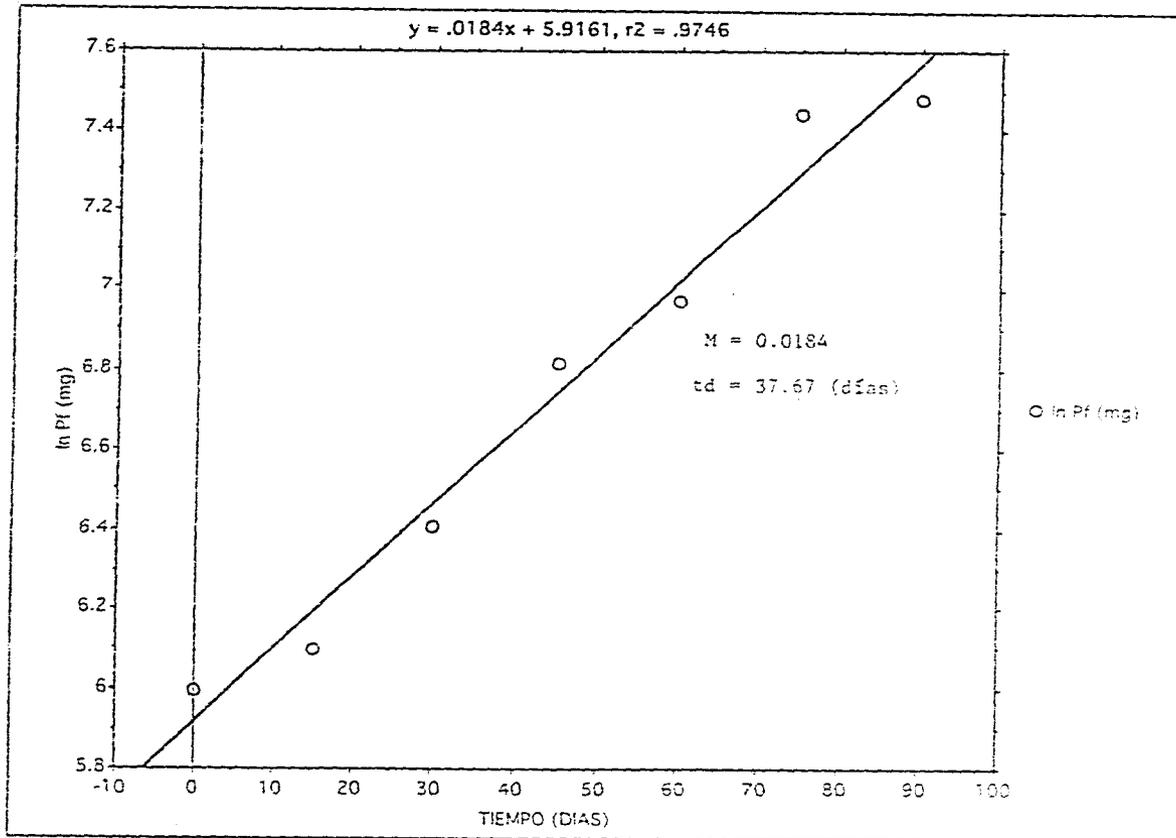
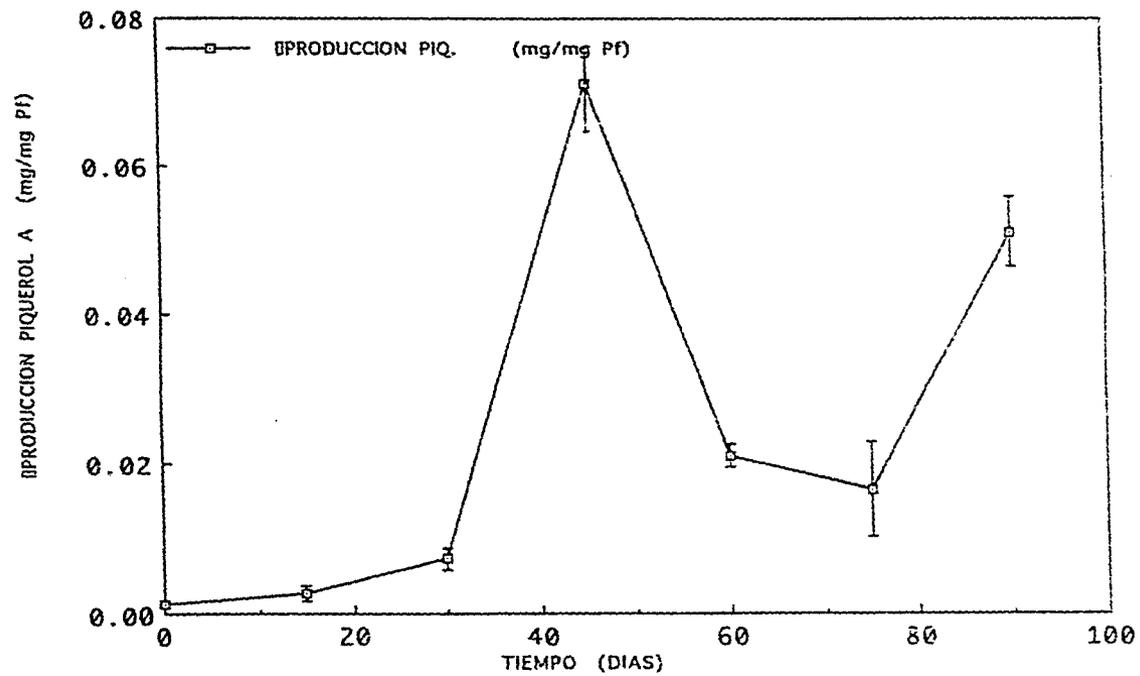


FIG. 12. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DEL CALLO DE *P. TRINERVIA* CAV. EN MEDIO MS+2 mg/l K.  
 (ln Ps vs. Tiempo)  
 % DE SACAROSA CONSUMIDA = 8.65.

FIG.13 CINETICA DE PRODUCCION DE PIQUEROL A EN CALLO DE *P. trinervia* EN MEDIO MS CON 2 mg/l DE K.



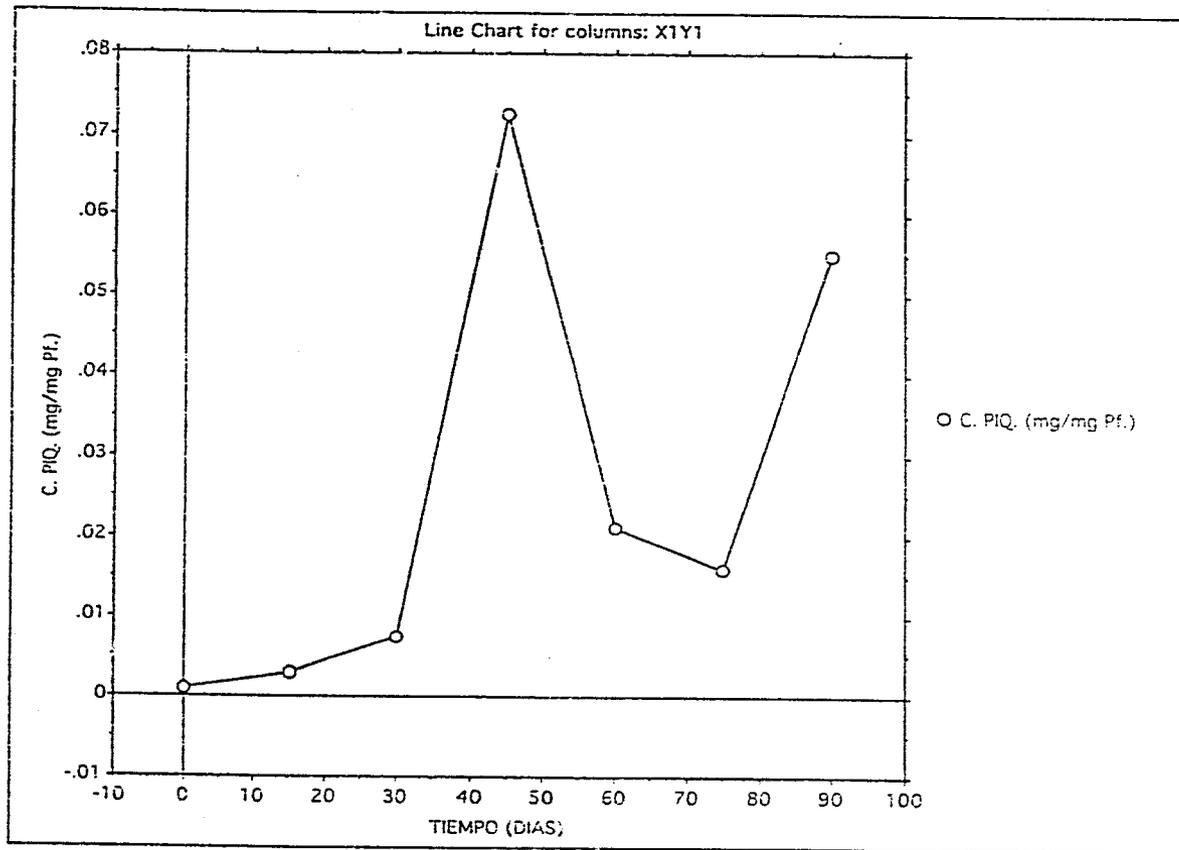


FIG. 13a. CINETICA DE PRODUCCION DE PIQUEROL A (C. PIQ.), EN CALLO DE P. TRINERVIA, EN MEDIO MS + 2 mg/l DE K.

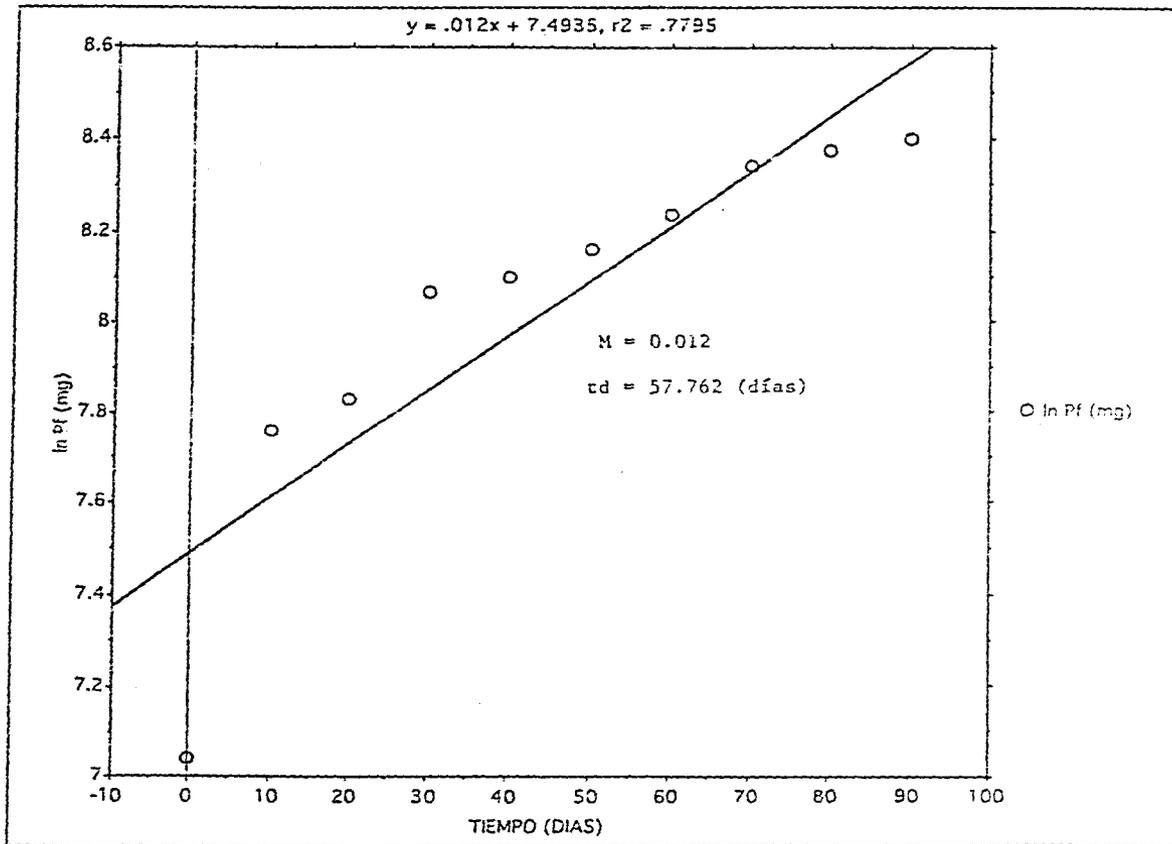


FIG. 14. CINETICA DE CRECIMIENTO DE CELULAS EN SUSPENSION DE P. TRINERVIA CAV. EN MEDIO MS+2 mg/l K (ln Ps vs. Tiempo).

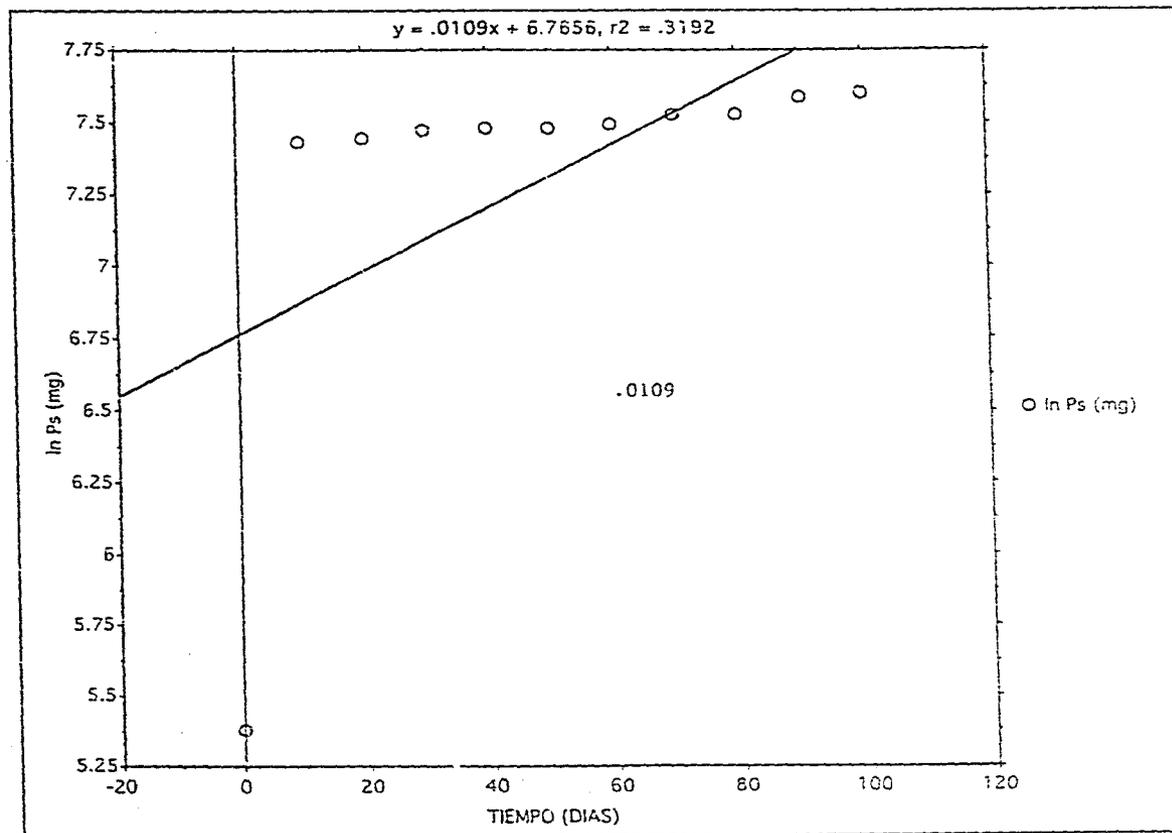
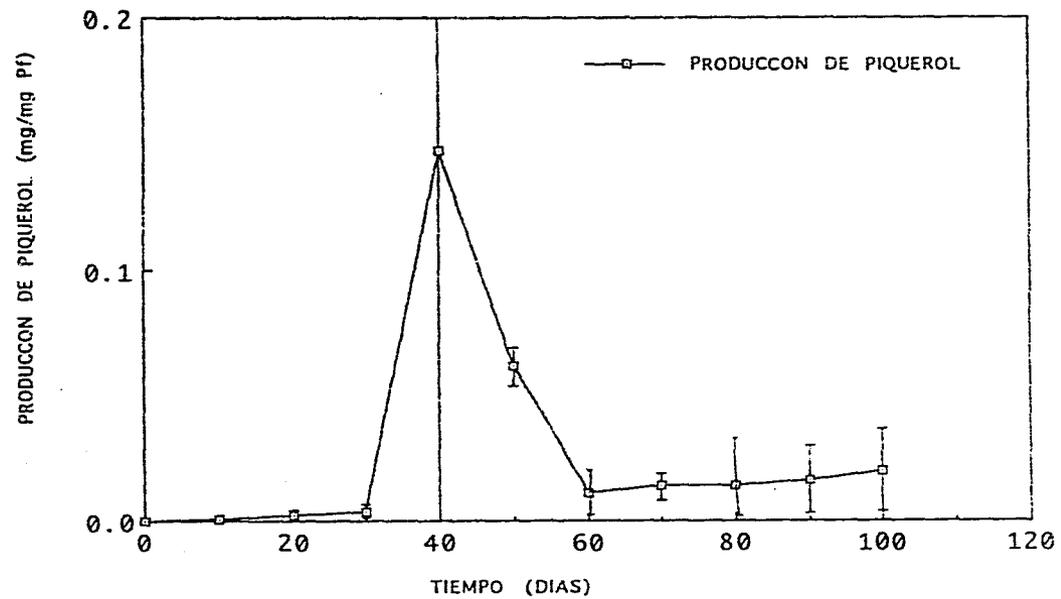


FIG. 15. CINETICA DE CRECIMIENTO DE CELULAS EN SUSPENSION DE P. TRINERVIA CAV, EN MEDIO MS+2 mg/l DE K.  
 (ln Ps vs. Tiempo).

FIG. 16 CINETICA DE PRODUCCION DE PIQUEROL A DE CELULAS EN SUSPENSION DE *P. trinervia* EN MEDIO MS CON 2 mg/l DE K. 28 % DE SACAROSA CONSUMIDA.



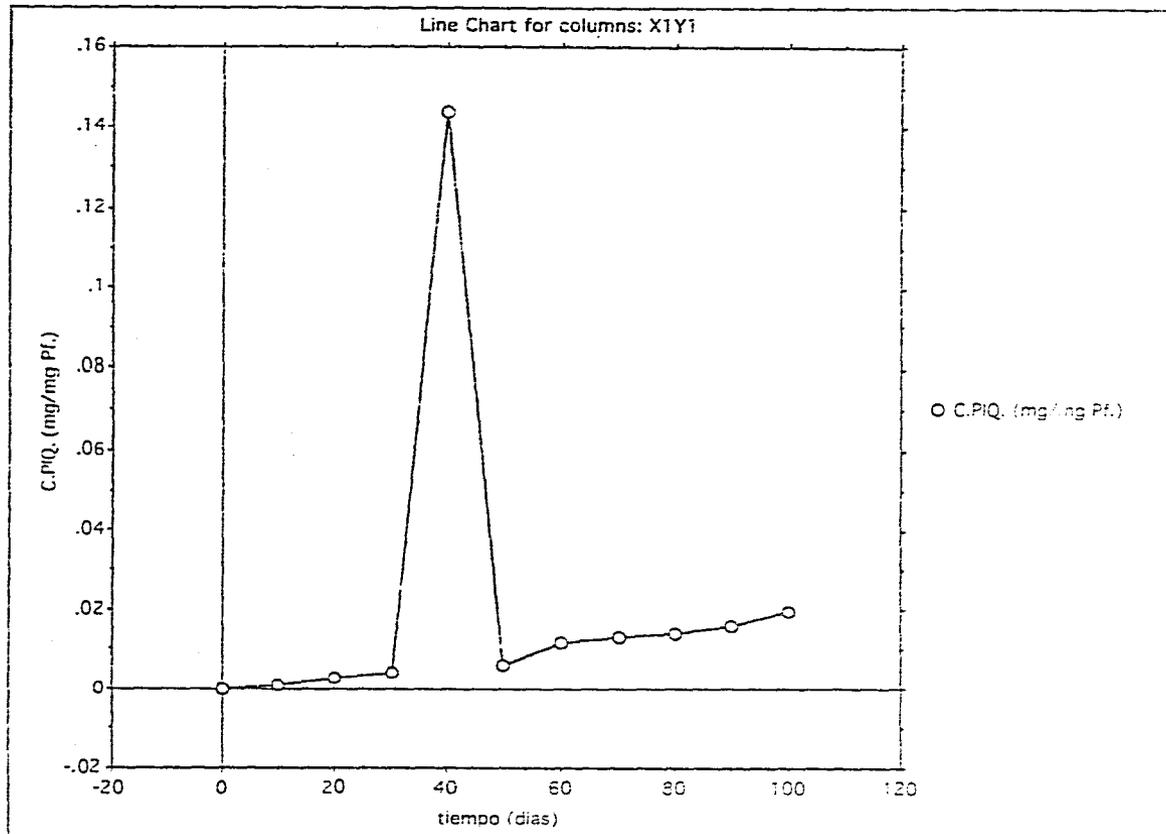


FIG. 16a. CINETICA DE PRODUCCION DE PIQUEROL A (C. PIQ) DE CELULAS EN SUSPENSION PARA LA PRIMERA TRANSFERENCIA DE CALLO DE P. TRINERVIA EN MEDIO MS+2 mg/l DE K. Z DE SACAROSA CONSUMIDA = 28.

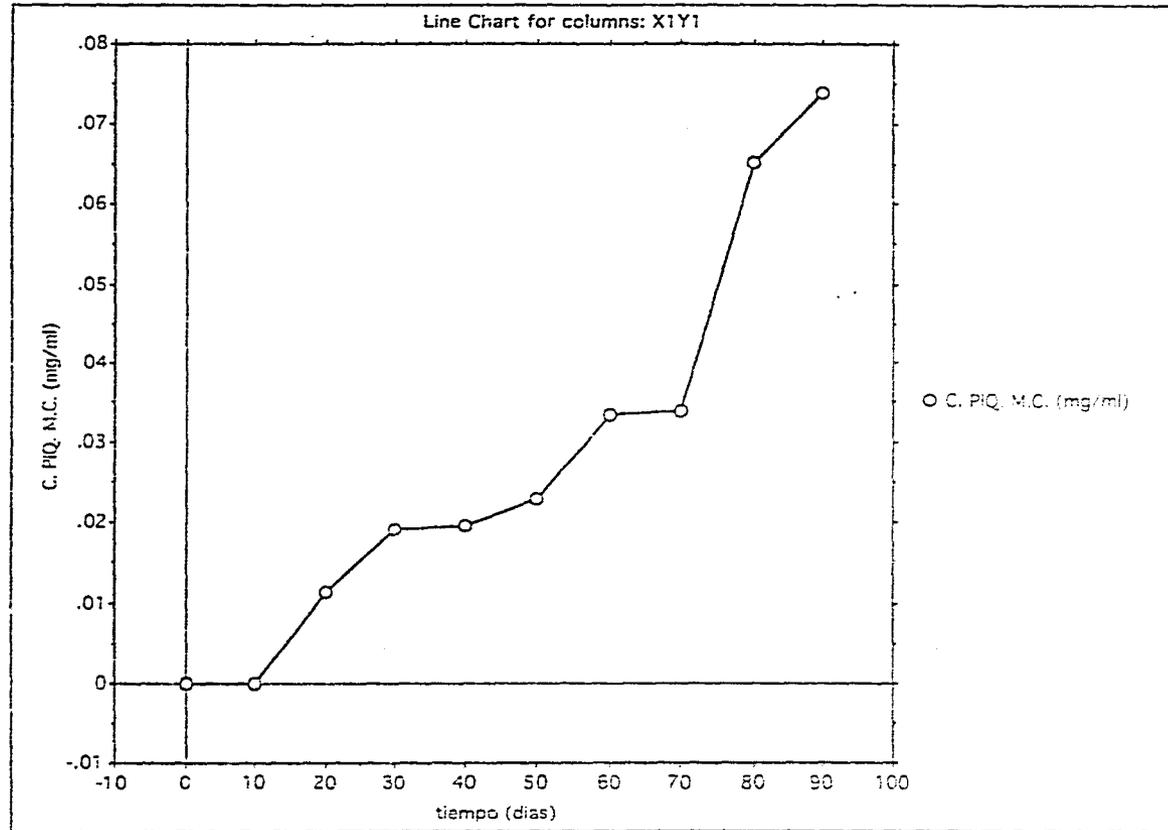
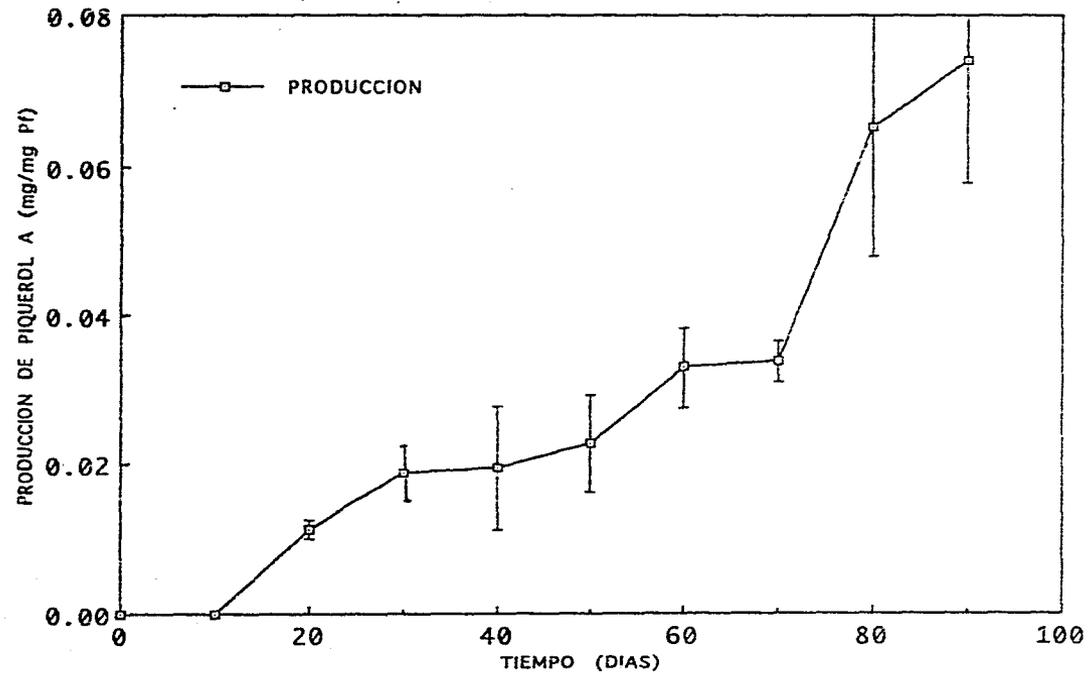


FIG. 17a. CIENCIA DE PRODUCCION DE PIQUEROL A EN EL MEDIO DE CULTIVO (C. PIQ. M. C.) DE LA PRIMERA TRANSFERENCIA DE CALLO DE P. TRINERVIA CAV, EN MEDIO MS+2 mg/l DE K. Z DE SACAROSA CONSUMIDA = 28.

FIG. 17 CINETICA DE PRODUCCION DE PIQUEROL A EN EL MEDIO DE CULTIVO (MS, 2 mg/l K) DE CELULAS EN SUSPENSION DE LA PRIMERA TRANSFERENCIA DE CALLO DE *P. trinervia*. 28 % DE SACAROSA CONSUMIDA.



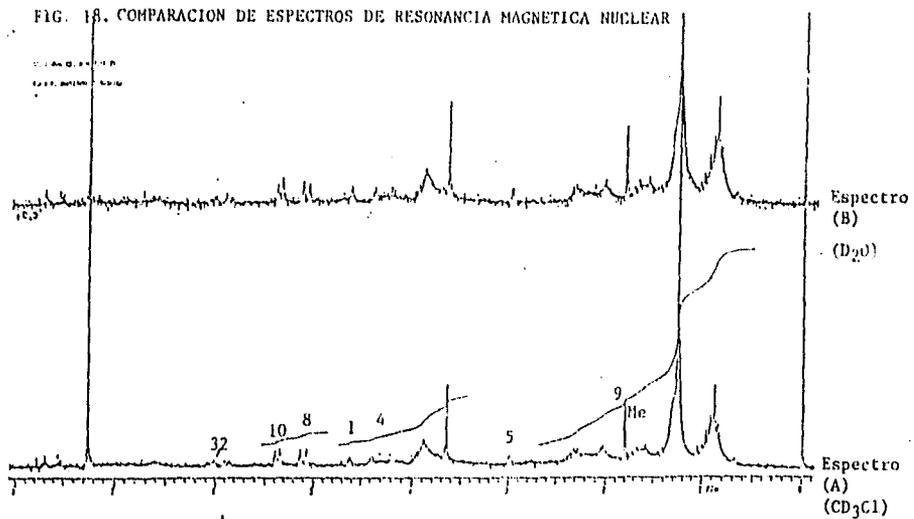


FIG. 18.a ESPECTRO DE <sup>1</sup>H RMN DE LOS CRISTALES OBTENIDOS DE CELULAS CULTIVADAS IN VITRO DE PIQUERIA TRINERVAI CAV.

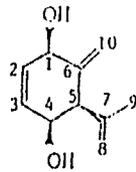
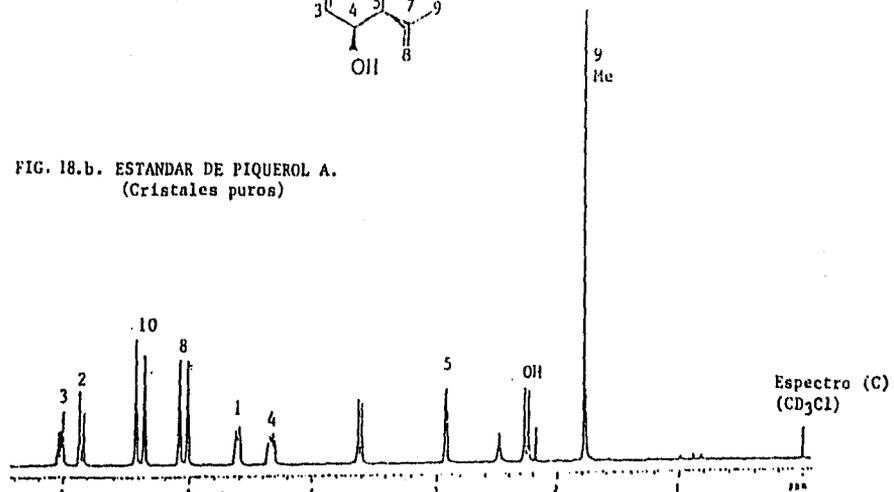


FIG. 18.b. ESTANDAR DE PIQUEROL A.  
(Cristales puros)



<sup>1</sup>H RMN (ppm): 6.06 (2H, m, H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub>), 5.8 (1H, m, H<sub>3</sub>), 5.4 (1H, d, H<sub>4</sub>), 5.27 (2H, d, H<sub>7</sub>), 4.45 (2H, m, H<sub>10</sub>), 3.6 (1H, d, H<sub>5</sub>), 1.8 (3H, s, H<sub>9</sub>).

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

De los experimentos realizados y de su análisis estadístico podemos concluir que se encontraron las condiciones de cultivo para la formación de callo de *P. trinervia Cav.*, y son : Explante entrenado, medio de cultivo MS, adicionado de 2 mg/l de K cultivados en condiciones de fotoperiodo (2000 lux, 16 hrs luz y 8 hrs oscuridad), la cantidad de biomasa registrada fue 3713.34 mg Pf. Para la producción del terpeno es en medio MS adicionado de 2 mg/l de K la cantidad de piquero A cuantificada en estas condiciones fue de  $1.1 \times 10^{-2}$  y con 3 mg/l fue de K de 0.345 y 0.42 mg/mg Pf y en la combinación de 1 mg/l de 2,4-D y 3 mg/l de K se cuantificó una cantidad de 0.27 mg/mg Pf

Los diferentes experimentos realizados en la presente investigación demostraron la importancia que tuvo la K y su concentración sobre la inducción del callo originado a partir de explantes de entrenado de la planta *P. trinervia Cav* y en la producción del metabolito. Los diseños experimentales efectuados definieron y concretaron esta aseveración.

De acuerdo a las cinéticas de crecimiento, el cultivo de células en suspensión mostró una velocidad de crecimiento mayor que el cultivo de callo en medio semi-sólido, en este sistema se tuvo una producción de piquero A de  $7.2 \times 10^{-2}$  mg /mg Pf. En el cultivo en suspensión presentó un mayor contenido del metabolito ( $1.44 \times 10^{-1}$  mg /mg Pf), además éste es excretado por las células al medio de cultivo, lo que le hace ser un buen sistema de producción y el más adecuado para continuar los estudios de obtención del metabolito de interés a una escala mayor.

Otro sistema que se propone para la producción de piquero A es emplear el callo ó las raíces pilosas generadas en el proceso de transformación de las estructuras globulares formadas del explante hoja cultivadas en medio MS adicionado de K en concentración de 0 a 3 mg/l o en ausencia de los niveles de concentración en donde se obtuvo  $4.4 \times 10^{-2}$  y  $3.2 \times 10^{-2}$  mg/mg Pf de piquero A. O bien generar raíces pilosas a través de una transformación genética con la infección de *Agrobacterium rhizogenes* a la planta o partes de ella, de tal manera que se pueda incrementar la producción del metabolito

Por otro lado si se estandarizará la técnica de embriogénesis somática tomando en cuenta los resultados obtenidos durante el desarrollo del trabajo, esto generaría una forma de reproducción vegetativa y al mismo tiempo la posibilidad de generar un método de mejoramiento genético de la especie y consecuentemente de obtener líneas celulares hiperproductoras del metabolito ya sea por técnicas tradicionales o de ingeniería genética. Además esta técnica de micropropagación garantizaría la conservación de la especie.

Finalmente, podemos decir que el modelo generado para *P. trinervia Cav* es factible de llevar a cabo para incrementar la producción del terpeno basándose en la técnicas de biotecnología vegetal. Aun considerando que la planta es silvestre y que no hubo una selección del material genético de la planta utilizada para el establecimiento de los cultivos lo cual es un parámetro importante para establecer un sistema de cultivo *in vitro*. En el presente trabajo se ha demostrado que en los diferentes explantes, condiciones de cultivo y concentraciones de los reguladores de crecimiento el metabolito se esta sintetizando *in vitro* independientemente de las respuestas de diferenciación celular obtenidas.

Hay que recalcar que el objetivo del presente trabajo fue de aprovechar la planta *P. trinervia Cav* la cual es una de las plantas silvestres mexicanas más estudiadas desde el punto de vista fitoquímico pues se han purificado y caracterizado varios de sus metabolitos secundarios (ver figura 2) y se conoce la actividad biológica de algunos de ellos principalmente del monoterpeno piquerol A, al que se le han encontrado diversas actividades biológicas (ver tabla 1). Por lo tanto su potencial de aplicación es amplio particularmente en el desarrollo de nuevos agroquímicos, por ello podría ser una especie conizada en el mercado. De esta forma con el presente proyecto se da inicio a estudios del aprovechamiento integral de este recurso.

Las perspectivas de este trabajo, se concluyen también de la figura 1, en la cual se plantea la optimización del sistema basados en los experimentos preliminares, esta optimización incluye las diversas fuentes que influyen en la diferenciación celular: medio de cultivo, reguladores de crecimiento, su concentración, el explante, las condiciones físicas de cultivo y particularmente de otras metodologías como es la transformación genética, variación somaclonal, mutantes inducidos y el uso de elicitores.

**ANEXO**

**TABLAS Y FIGURAS**

ANEXO I

MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO	MS	KC
SALES	(mg/l)	(mg/l)
<b>MACRONUTRIMENTOS</b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.00	-
KNO <sub>3</sub>	1900.00	2020.00
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440.00	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370.00	738.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00	272.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	1000.00
NaNO <sub>3</sub>	-	2040.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	500.00
<b>MICRONUTRIMENTOS</b>		
KI	0.830	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20	-
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.0	-
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	-
ZnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	8.6	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	-
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	-
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	-
EDTA-sal disodica	37.3	-
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8	-
Glicina	2.0	-
SACAROSA	30.0	25.0
pH	5.7	5.8
<b>VITAMINAS</b>		
Inositol	100.00	-
Piridoxina	0.50	0.5
Acido nicotínico	0.50	0.5
Tiamina	0.10	-

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ANEXO II.

EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA ESTABLECER LAS CONDICIONES DE CULTIVO *IN VITRO* DE *P. TINERVIA CAV* Y LA PRODUCCION DE PIQUEROL A.

No. Experimento	No. tratamiento por experimento	Total U. E / tratamiento	Explantado y tamaño de U.E	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento (mg/l)	Condiciones de cultivo
1	16	80	Hojas Jóvenes 5 explantes	MS	2,4-D - K 0,1,2 y 3	Fotoperiodo
2	16	80	Hojas Jóvenes 5 explantes	MS	2,4-D - K 0,1,2 y 3	oscuridad
3	16	80	Entrenado 5 explantes	MS	2,4-D - K 0,1,2 y 3	Fotoperiodo
4	16	80	Entrenado 5 explantes	MS	2,4-D - K 0,1,2 y 3	oscuridad
5	16	80	Sec. Rafz 5 explantes	MS	2,4-D - K 0,1,2 y 3	Fotoperiodo
6	16	80	Sec. Rafz 5 explantes	MS	2,4-D - K 0,1,2 y 3	oscuridad
7	16	80	Biomasa * 1 a 3 g	MS	2,4-D - K 0,1,2 y 3	Fotoperiodo
8	16	80	Biomasa * 1 a 3 g	MS	2,4-D - K 0,1,2 y 3	oscuridad
9	16	80	Biomasa * 1 a 3 g	MS	2,4-D - K 0,1,2 y 3	Fotoperiodo
10	16	80	Biomasa * 1 a 3 g	MS	2,4-D - K 0,1,2 y 3	oscuridad
11	16	48	Biomasa *** 1 a 2 g.	MS	2,4-D - K 0,1,2 y 3	Fotoperiodo
12	16	48	Biomasa *** 1 a 2 g.	MS	2,4-D - K 0,1,2 y 3	oscuridad
13	16	48	Biomasa *** 1 a 2 g.	KC	2,4-D - K 0,1,2 y 3	Fotoperiodo
14	16	48	Biomasa *** 1 a 2 g.	KC	2,4-D - K 0,1,2 y 3	oscuridad
15	1	3	Callo ** 2.0g.	MS	ninguna	Fotoperiodo
16	1	3	Callo ** 2.0g.	MS	ninguna	oscuridad
17	1	3	Callo ** 2.0g.	MS	k 2.0 g.	Fotoperiodo
18	1	3	Callo ** 2.0g.	MS	k 2.0 g.	oscuridad
19	1	3	Callo ** 2.0g.	MS	4-CPA - K 2.0 y 2.0	Fotoperiodo
20	1	3	Callo ** 2.0g.	MS	4-CPA - K 2.0 y 2.0	oscuridad
21	1	3	Callo ** 2.0g.	MS	2,4-D 0.5	Fotoperiodo

22	1	3	Callo ** 2.0g.	MS	2,4-D 0.5	oscuridad
23	1	3	Callo ** 2.0g.	MS	4-CPA - K 1.0 y 2.0	Fotoperiodo
24	1	3	Callo ** 2.0g.	MS	4-CPA - K 1.0 y 2.0	oscuridad
25	1	3	Callo ** 2.0g.	MS	2,4-D - K 0.5 - 2.0	Fotoperiodo
26	1	3	Callo ** 2.0g.	MS	2,4-D - K 0.5 - 2.0	oscuridad
27	1	48	Callo ** 2.0g.	MS	k 2.0 g.	Fotoperiodo
28	1	90	Callo ** 2.0g.	MS	k 2.0 g.	Fotoperiodo

U.E : Unidad experimental = 1 frasco conteniendo explantes ó una cantidad de biomasa (callo y estructuras globulares).

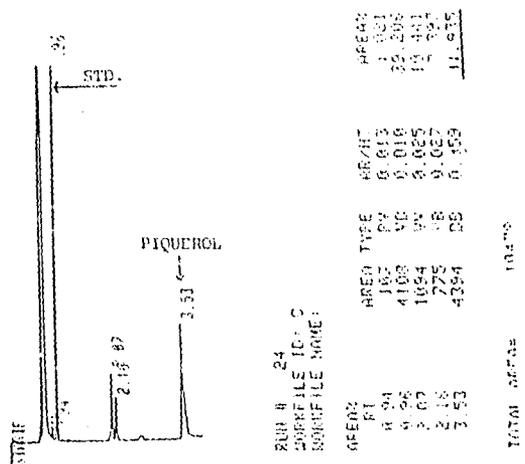
Tamaño de U.E. : Número de explantes por repetición (1 frasco) y cantidad de biomasa expuestos a las diferentes condiciones de cultivo.

Condiciones ambientales de cultivo: Fotoperiodo 16 hrs, 2000 lux y 8 hrs oscuridad y oscuridad.

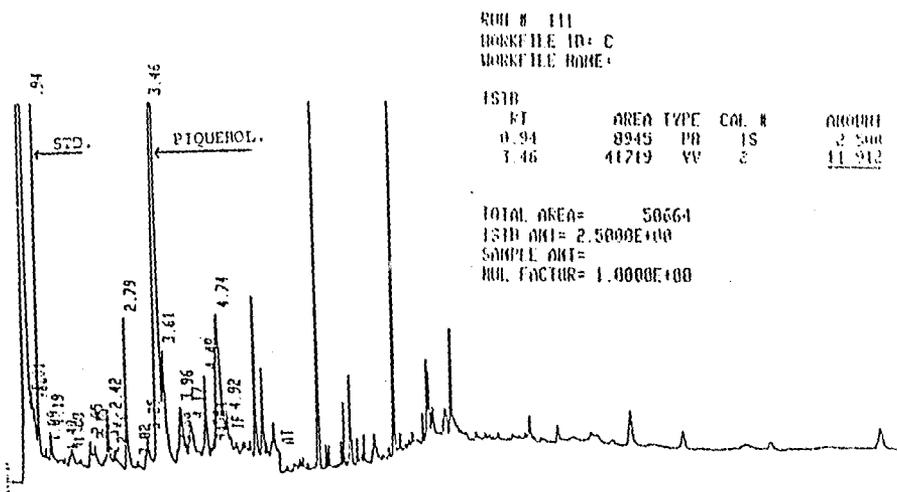
\* : Estructuras globulares desarrolladas por explantes de hojas jóvenes (experimentos 1 y 2). Se tomó una submuestra de 1 a 3 grs. para observar el desarrollo en particular de ésta a esas condiciones de cultivo (experimentos 7 al 10).

\*\* : Callo generado del explante entrenado (experimentos 3 y 4), cuyas condiciones iniciales de cultivo fueron: Medio MS adicionado de 2 mg/l de K en fotoperiodo y oscuridad, se tomó una submuestra de 2.0 grs, originando 3 unidades experimentales por tratamiento (experimentos 15 al 26).

\*\*\*: Biomasa (estructuras globulares y callo) generada de explantes de secciones de raíz (experimentos 5 y 6). Se tomó una submuestra de 0.5 a 2 grs originando 48 unidades experimentales por tratamiento (experimentos 11 al 14).



a) Cromatografía del estándar de Piquerol A



b) Cromatograma del extracto obtenido de callo proveniente del explante entrenado

ANEXO IV

ANÁLISIS QUÍMICO

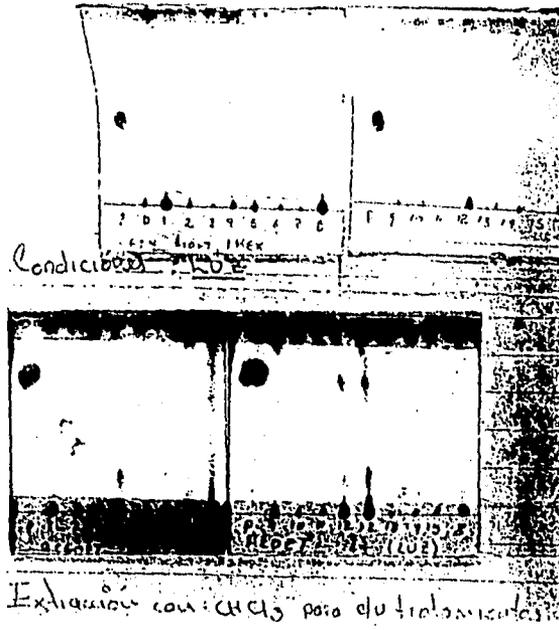
CRONATOGRAFIA EN PLACA FINA (TLC).

EXPLANTE: TALLO

TRATAMIENTOS: 15

TESTIGO (0)

CONDICIONES : LUZ Y OSCURIDAD.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Balandrin FM., Klocke AJ., Wurtele SE. and Bollinger AH. 1985. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. *Science*. 218:1154-1160.
- 2.- Barnum y Meyer. 1983. Suppression of catechol oxidase by nor-leucine in plant suspension cultures. *Phytochemistry*. 22 (6):1329-1333.
- 3.- Battat E., Roken I. and Goldberg J. 1989. *Plant. Cell. Rep.* 7:652-654.
- 4.- Berlin 1983. Plant cell cultures a future source of natural products. *End. New. S.* 8: 5-8.
- 5.- Bhattacharya P., Dey S. and Bhattacharya BC. 1990. Rapid mass propagation of *Chrysanthemum morifolium* by callus derived from stem and leaf explants. *Plant. Cell. Report.* 9 (8):434-439.
- 6.- Bohlmann F y Zdero C. 1968. Isolierung von (-)-Santalal aus *Piqueria trinervia*. *Tetrahedron Letters* 12:1533-1535.
- 7.- Bohlmann F, Suwita A. 1978. New terpene derivatives from *Piqueria trinervia*. *Phytochemistry*. 17:560-561.
- 8.- Buiteloar RM; Langenhoff AAH, Heidstra R. 1991. Growth thiophene production by hairy root cultures of *Tagetes patula* in various two liquid-phase bioreactors. *Enzyme and Microbial. Tech.* 13:487-494.
- 9.- Chavarin C y Jimenez M. 1985. Contribución a la química del piquerol A. UNAM, Fac. de Química, México. Tesis.
- 10.- Chen HT, Marawitch J and Thompson BG. 1987. Genotypic effects on somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of alfalfa. *Plant. Cell. Tissue and Organ Culture.* 8(7):77-81.
- 11.- Chung-Shevek, Yang S., Roberts M., Elford BC and Lipson JD. 1992. Antimalarial of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures. *Plant Cell Reports*. 11:637-640.
- 12.- Cosio GE., Towers HN and Pherson Mc. Joan. 1987. Endogenous growth regulator levels and polyacetylene accumulation in crown gall tumor lines of *Chaenactis*. *J. Plant. Physiol.* 129:1-11.
- 13.- Cochran y Cox. 1990. *Diseños Experimentales*. Ed. Trillas, México, D.F.
- 14.- Cruz OR., Anaya AL., Gavilanes RM., Sánchez NS. and Jiménez EM. 1990. Effect of diacetyl Piquerol on H-ATPase activity of microsomes from *Ipomoea purpurea*. *J. Chem. Ecol.* 16 (7):
- 15.- Cruz-Reyes A, Chavarin C., Campos AM., Taboada J., and Jiménez EM. 1989. The molluscicide activity of piquerol A isolated from *Piqueria trinervia* (Compositae) against eight species of pulmonate snails. *Ints. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 84:35-40.
- 16.- Dodds H. John and Roberts W. Lorin. 1982. *Experiments in Plant Tissue Culture*. Ed. Cambridge University Press, Cambridge, London, N.Y.
- 17.- Douglas CG. 1985. Formation of adventitious bud in stem internodes of *Populus hybrid* TT32 cultures in vitro: Effects of sucrose, Zeatin, IAA and ABA. *J. Plant. Physiol.* 121:225-231.
- 18.- Figueiredo S., Cristina A. and Pais SS. 1991. *Achillea millefolium* (Yarrow) cell suspension cultures: Establishment and growth conditions. *Biotechnology Letters* 13:63-68.
- 19.- Flores Hector E., Ayora T., Mendez M y Loyola VM. 1989. Obtención de metabolitos secundarios a partir de raíces transformadas. *Ciencia y Desarrollo*. XV(86):86-94.

- 20.- Fowler W. M. 1982. Substrate utilization by plant-cell cultures. J. Chem Tech. Biotechnol. 32, 338-346.
- 21.- Gan F., Zheng Z and Wang L. 1990. Effects of phytol and oligosaccharides on cell growth and alpha-tocopherol production in cell suspension culture of *Carthamus tinctorius*. Acta Phytophysiologica Sinica. 16(4):361-366.
- 22.- Goleniowski EM., Silva LG. and Trippi SV. 1990. Sesquiterpene lactone production in callus culture of *Ambrosia tenuifolia*. Phytochemistry. 29(9): 2889- 2891.
- 23.- Goleniowski E., Silva ML. and Trippi SV. 1992. Effect of phytohormones on sesquiterpene-lactone production in callus culture of *Ambrosia tenuifolia*. Phytochemistry . 31(7):2359-2361.
- 24.- George EF. and Sherrington PD. 1984. Plant propagation by tissue culture handbook and directory of comercial laboratories. Ed. Exegetics Limited. Gran Bretaña 1984.
- 25.- Gonzalez de la Parra y Jimenes EM. 1977. Aislamiento y estudio químico de un diterpeno de la planta *Piqueria trinervia Cav.*, UNAM, Fac. de Química, México., Tesis.
- 27.- Gonzales V. 1890. Breve estudio sobre la Yerba del Tabardillo (*Piqueria trinervia Cav.*) Fac.Medicina de la Universidad de Guanajuato, Gto. Tesis.
- 28.- González de la Parra M, García J y Jimenez EM. 1980. actividad del piquerol A sobre semillas de interés económico. Datos no publicados.
- 29.- González de la Parra M, Anaya AL., Espinoza F., Jimenez EM and Castillo R. 1981. Allelopathic potential of *Piqueria trinervia* (Compositae) and piquerol A and B. J. Chem. Ecology. 7(3):509-515.
- 30.- González de la Parra M., Chavez PD., Jimenez EM. and Ramos MC. 1991. Acaricida potential of piquerols A and B against *Boophilus microplus*. Pestic. Sci. 33:78-80.
- 31.- González de la Parra M., Jimenez EM. and Castro C. 1992. Inhibitory effect of piquerol A on growth of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Planta Med. 58:281-282.
- 32.- Hagimori M., Matsumoto T and Obi Y. 1982. Studies on the production of Digitalis Cardenolides by plant tissue culture III: Effects of nutrients on digitoxin formation by shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. growth in liquid media. Plant Cell Physiol. 23(7):1205-1211.
- 33.- Herman B Edwin. 1991. Recent Advances in plant tissue Culture. Agritech Consultants, Printer INC., SHRBOAK, New York, U.S.A. 1991.
- 34.- Hoekstra SS., Harkes PA., Verpoorte R. and Libbenga RK. 1990. Effect of auxin on sytodifferentiation and production of quinoline alkaloids in compact globular structures of *Cinchona ledgeriana*. Plant. Cell. Rep. 8:571-574.
- 35.- Hook I., Sheridan H. and Wilson G. 1991. Volatile metabolites from suspension cultures of *Taxacum officinale*. Phytochemistry. 50(12): 3977-3979.
- 36.- Jiménez E. M. and Gonzales 1983. Rev. Latinoamer. Quím. 14:20-22.
- 37.- Jiménez EM 1986. comunicación personal.
- 38.- Jiménez EM y Rodríguez HC. 1990. XXV Congreso Nacional de Entomología y II Simposio Nacional sobre sustancias Vegetales y Minerales en el combate de plagas. Oaxaca, México. 1990.
- 39.- Kennedy AI., Deans SG., Souboda KP., Gram AI and Waterman PG. 1993. Volatile oils from normal and transformed root of *Artemisia absinthium*. Phytochem. 32:1449-1451.

- 40.- Kim DJ and Chang HN. 1990. Effect of growth hormone modifications on shikoinin production from *Lithospermum-erythrorhizon* cell cultures with in situ extraction. *Biotechnol. Lett.* 12:289-294.
- 41.- Kim NC., Lim HJ and Hahn TR. 1992. Production of secondary metabolites by tissue culture of *Artemisia annua* L. *J. Korean Agricultural Chemical Society.* 35(2):99-105.
- 42.- Kinnerslay AM and Daugall PK. 1980. Correlation between the nicotine content of tobacco plant and callus culture. *Planta.* 149:204-206.
- 43.- Knobloch KH and Berlin J. 1981. Phosphate-mediated regulation of cinnamoyl putrescine biosynthesis in cell suspension culture of *Nicotiana tabacum*. *Plant. Med.* 42:167-172.
- 44.- Konthari SL and Chandra N. 1986. Adventitious shoot production from stem internode and callus cultures of *Artemisia scoparia* waldst. et Kit. *J. Plant. Physiol.* 124: 409-412.
- 45.- Lawrence R. Griffing and Craig L. Nessler. 1989. Immunolocalization of the major latex proteins in developing laticifers of Opium poppy (*Papaver somniferum*). *J. Plant. Physiol.* 134:357-362.
- 46.- Lindsey K and Yeoman M. 1983. Novel experimental system for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. In: *Plant Biotechnology.* Mantell SH and Smith H. (eds) Cambridge University Press. Cambridge: 36-66.
- 47.- Loyola VM. 1990. Obtención de Metabolitos Secundarios a partir de Cultivo de Tejidos Vegetales y sus Perspectivas Biotecnológicas. CICY., México.
- 48.- Loyola VM. 1995. Obtención de Metabolitos Secundarios Empleados como agroquímicos y Fármacos a partir de Cultivo de Tejidos Vegetales. CICY., México.
- 49.- Mantell SH and Smith H. 1983. Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue culture. In: *Plant Biotechnology.* Mantell SH and Smith H. (eds) Cambridge University Press. Cambridge. 75-100.
- 50.- Mantell SH and Smith H. 1983. *Plant Biotechnology* Cambridge University Press, Cambridge: 334.
- 51.- Murashige T. and Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* 15:473-497.
- 52.- Merillon JM., Rideau M. and Chenieux. 1984. Influence of sucrose on levels of ajmalicine, serpentine and tryptamine in *Catharanthus roseus* cell in vitro. *Planta Med.* 50:497-501.
- 53.- Morris P., Scragg AH., Smart NJ. and Safford A. 1985. Secondary product formulation by cell suspension cultures. In: *Plant Cell Cultures a Practical approach.* Dixon RA. (eds) IRL, Press. Oxford-Washington D.C. 127.
- 54.- Norton AR., Radin ND and Rodriguez E. 1991. Environmental and Chemical effects on growth, resin and rubber production in *Guayule* Tissue Cultures. *Phytochemistry.* 30(8):2615-2618.
- 55.- Norton AR., Radin ND. and Rodriguez E. 1991. Morphogenetic influences on rubber content and molecular weight in tissue cultures of *Guayule*. *Phytochemistry* 30(8):2611-2614.
- 56.- Nessler Craig L. 1982. Somatic embryogenesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Physiol. Plant.* 55: 453-458.
- 57.- Nessler CL and Galewsky S. 1986. Synthesis of morphinane alkaloids during opium poppy somatic embryogenesis. *Plant. Science.* 45:215-222.

- 58.- Ordas RJ., Tavozza R. and Ancoro G. 1990. In vitro morphogenesis in the globe artichoke (*Cynara scolymus* L). Plant. Science. 71(2):233-238.
- 59.- Paray L. 1953. Las Compuestas del Valle Central de México. Biol. Soc. Bot. 15:1- 12.
- 60.- Pierik R.L.M. 1995. El cultivo de tejidos de plantas superiores : micropropagación. Boltesti informativo: Departamento de Horticultura. Universidad Agrícola, Wagengen, Holanda.
- 61.- Quattrocchio F., Benvenuto E., Tovazza R., Couzzo L. and Ancora G. 1986. A study on the possible role of auxin in potato hairy roots tissues. J.Plant Physiol. 123:143-149.
- 62.- Robinson BL. 1906. Revisión of the genus Piqueria. Proc. Amer. Acad. 42:4-16.
- 63.- Romo J., Romo de Vivar A., Quijano L., Rios T y Díaz E. 1970. Los componentes terpenoides de la *Piqueria trinervia* Cav., Rev. Latino. Ann. de Química. 1:72-81.
- 64.- Rubio M., Viver AB. y Jiménez EM. 1984. Estructura electrónica de piquerol A y piquerol B. Rev. Latinoamericana de Química. 16(2):69-72.
- 65.- Rubluo JA., Estrategias para la preservación de germoplasma vegetal in vitro En: El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. Compiladores: Manuel L. Robert y Victor M. Ioyola. CICY-CONACyT. 1985. México:35-53.
- 66.- Rzedowski 1972. Contribuciones a la fitogeografía florística e historia de México III. Algunas tendencias en la distribución geográfica y ecológica de las Compositae mexicanas. Ciencia 27:123-132.
- 67.- Sangaiah R. and Krishna SG. 1981. Tetrahedron letters (22):1843-1845.
- 68.- Sahai S and Shuler ML. 1984. Environmental parameters influencing phenolics production by Batch cultures of *Nicotiana tabacum*. Biotechnology and Bioengineering. XXVI: 11-120.
- 69.- Saunders JW., Hosfield GL. and Levi A. 1987. Morphogenetic effects of 2,4-D on pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaf explants in vitro. Plant. Cell. Reports. 46:51-54.
- 70.- Shijo I. and Otha S. 1973. Nicotine production by tobacco callus tissue and effect of plant growth regulators. Agric. Biol. Chem. 37:1857-1864.
- 71.- Schmidt JA., Lee MJ. and Gynheung AN. 1989. Media and Environmental effects on phenolics production from Tobacco cell cultures. Biotechnology and Bioengineering. 33:1437-1444.
- 72.- Schuchmann R and Wellman E. 1983. Somatic embryogenesis of tissue cultures of *Papaver somniferum* and *Papaver orientalis* and its relationship to alkaloid and lipid metabolism. Plant. Cell. Rep. 2: 88-91.
- 73.- Soriano MG, Jiménez EM., Góñez M., Hernández A., Schtz M. and Campana C. 1983. Crystal and molecular structure of Piquerol A a potent growth-inhibiting factor. Chemistry Letters: 617-620.
- 74.- Standarti A. and Romani F. 1990. Hort.Sci.25:1435-1437.
- 75.- Street HE., 1977. Plant Tissue and Cell Culture. (Ed.) Academic Press. U.S.A.
- 76.- Sriedner J., Gutjahr E., Czygan F. and BrauneGG G. 1991 Contribution to the biotechnological production of sweeteners from *Stevia reboudiana* Bertoni. Acta Biotechnologica. 11(5):501-504.
- 77.- Strobel J., Hieke M., Gebaver E., Wind E. and Grilger D. 1990. The influence of organic and inorganic chemical factors on cell growth and anthraquinone formation in suspension cultures of *Galium verum*. Biochem. Physiol. Pflzen. 186:117-124.
- 78.- Tabata M., Yamamoto H., Hiraoka N. and Konoshima M. 1972 Organization and alkaloid production in tissue cultures of *Scopolia perviflora*. Phytochemistry. 11:949-955.