

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN CIENCIAS BÁSICAS Y DE LA SALUD



Formación de callo e inducción de un cultivo de células en
suspensión en *Lophophora williamsii*

Tesis que para obtener el grado de
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

Presenta

RADAID SAUL ESPARZA IZUNSA

Biólogo

Director:

Dr. Francisco Cruz Sosa

Septiembre del 2004

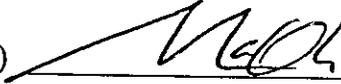
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad
Iztapalapa aprobó la tesis:

**Formación de callo e inducción de un cultivo de células en suspensión en
*Lophophora williamsii***

que presentó:

Radaid Saúl Esparza Isunza

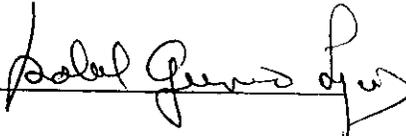
Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa (UAM-I) 

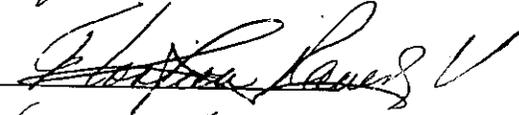
Asesor: Dra. Isabel Guerrero Legarreta (UAM-I) 

Asesor: Dra. Edith Ponce Alquicira (UAM-I) 

Jurado:

Presidente: Dra. Dra. Isabel Guerrero Legarreta (UAM-I) 

Secretario: Dra. Edith Ponce Alquicira (UAM-I) 

Vocal: Dra. Florina Ramírez Vives (UAM-I) 

Vocal: Leovigildo Quijano (UNAM) 

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluida en el Padrón de Posgrado de excelencia del CONACYT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el número de registro 0471-O

Iztapalapa, D. F. a 3 de Septiembre del 2004

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad
Iztapalapa aprobó la tesis:

Formación de callo e inducción de un cultivo de células en suspensión en
Lophophora williamsii

que presentó:

Radaid Saúl Esparza Isunza

Comité Tutorial:

Director: Dr. Francisco Cruz Sosa (UAM-I) _____

Asesor: Dra. Isabel Guerrero Legarreta (UAM-I) _____

Asesor: Dra. Edith Ponce Alquicira (UAM-I) _____

Jurado:

Presidente: Dra. Dra. Isabel Guerrero Legarreta (UAM-I) _____

Secretario: Dra. Edith Ponce Alquicira (UAM-I) _____

Vocal: Dra. Florina Ramírez Vives (UAM-I) _____

Vocal: Leovigildo Quijano (UNAM) _____

DEDICATORIA

A mi madre, María Concepción Isunza Ortiz por ser ejemplo de integridad, tolerancia y lucha.

A mis hermanos Felipe, Nahyeli y Tristán, por su continuo apoyo y confianza sin los que esta maestría no se hubiera realizado.

A mi compañera Mariana, mis hijos Rebeca y Emmanuel y mi nieto Alexei (el tremendo “salsitas”), por ser fuente de motivación para seguir adelante.

A mi compañera Blanca, por su constante aliento, ternura, paciencia y fortaleza.

Ya no me quejo, no, como solía
de mi dolor callado e infecundo:
cumpro con el deber de cada día
y miro herir y mejorarse el mundo.

Ya no me aflijo, no, ni me desolo
de verme aislado en mi difícil lucha,
va con la eternidad el que va solo,
que todos oyen cuando nadie escucha.

Que fue, no sé: pero yo he dado un beso
a una gigante y bondadosa mano
y desde entonces, por donde hablo, impreso
queda en los hombres el amor humano.

Ya no me importa que la frase ardiente
muera en silencio, o ande en casa oscura,
amo y trabajo: así calladamente
nutre el río a la selva en la espesura.

Y sigo a mi labor, como el creyente
a quien unge en la sien el sacerdote:
comulgo en el divino altar de la Naturaleza
y es mi hostia el alma humana.

José Martí

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Francisco Cruz Sosa, por su paciencia y excelente disposición para la elaboración del trabajo experimental y de esta tesis.

A mis asesoras, las doctoras Edith Ponce Alquicira e Isabel Guerrero Legarreta por sus finasj atenciones y el préstamo oportuno del equipo y material necesario.

Al maestro José Angel Lechuga Corchado, por sus indicaciones durante el desarrollo y planteamiento general de este trabajo.

A mi compañero Juan Orozco, por sus valiosos señalamientos técnicos y analíticos.

A mi compañera Leticia Buendía, también por su paciencia y los conocimientos aportados en el cultivo de callo de peyote, sin los que este trabajo no hubiera sido posible.

A la doctora Alejandra Quintanar, por sus agudas observaciones en lo que respecta al material microscópico fotográfico.

A mi amiga Mar Aguilar, por su valiosa ayuda en la traducción al inglés.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico prestado para la consecución de esta tesis.

RESUMEN

Lophophora williamsii, planta suculenta de la familia **Cactaceae** y comúnmente llamada “peyote”, tiene importancia antropológica (etnohistórica) como recurso botánico fundamental de cohesión, de distintos y numerosos grupos indígenas de México y los Estados Unidos de América. Dentro de la práctica experimental y clínica de la siquiatria, el uso de la mescalina (principal sicotrópico del peyote) a sido importante en el estudio general de las sicosis, y en el tratamiento particular de la esquizofrenia. El empleo de cultivos *in vitro* para la propagación de plantas, y la posible producción de metabolitos secundarios en esta especie, se constituyen en la alternativa experimental de este trabajo, cuyo objetivo fundamental es el estudio del establecimiento del cultivo de células en suspensión de la especie.

De cultivos de callo preexistentes, inducidos de botones o coronas de peyote, y mantenidos en medio MS con 5 mg/ L del fitorregulador 2-ip que induce la producción de brotes, se indujeron y mantuvieron temporalmente suspensiones celulares de la especie. La escasa friabilidad y gran resistencia del material calloso, motivó la decisión de implementar y desarrollar técnicas de fragmentación del material vegetal, cuya aplicación provocó inicialmente serios problemas de oxidación y turbidez; estos se resolvieron de manera eventual, con la duplicación de la concentración del recurso carbono y de antioxidantes (60 g / L de sacarosa + 200 y 100 mg/ L de ácido cítrico y ascórbico, respectivamente), y posteriormente de forma definitiva, con el uso del tratamiento enzimático (celulasa + macerozima) con filtrado de malla y la utilización del homogenizador.

Estas técnicas lograron uniformizar el tamaño del agregado celular, estabilizando adecuadamente la suspensión y además, reduciendo la concentración de sacarosa en 40% y la de antioxidantes a su valor base. En conclusión, se lograron en lo general condiciones estables, que permiten el establecimiento permanente de la suspensión, gracias a una progresiva eficiencia en las técnicas de fragmentado del material calloso.

Por lo que respecta al comportamiento de la cinética de crecimiento de la suspensión, inicialmente el cultivo se mantuvo con el medio y el fitorregulador idénticos al del crecimiento del callo (medio MS Sigma 5519 + 2-ip como RCV); el promedio de las mediciones de peso fresco y seco se mantuvieron relativamente constantes con el transcurso del tiempo, evidenciando un crecimiento de biomasa muy lento. Con el propósito de inducir un crecimiento conspicuo del material vegetal, se agregó la auxina 2,4-D en una relación auxina /citosina de 2.5; sin embargo, la medida no prosperó, pues el índice de crecimiento para esta suspensión que es inicialmente de 9 % se reduce después al 5%, situando sus parámetros cinéticos todavía muy lejos de un crecimiento abundante y sostenido, tal como lo revela su baja tasa de división celular, caracterizada con una velocidad específica de crecimiento muy lenta ($\mu = 5.4 \times 10^{-3} \text{ días}^{-1}$) y, por lo tanto, de un tiempo de duplicación muy grande ($t_d = 124.8 \text{ días}$). Resumiendo, la cinética de crecimiento de la suspensión muestra que bajo estos parámetros experimentales su crecimiento no es permanente.

ABSTRACT

Lophophora williamsii, succulent plant from the Cactaceae family, commonly called “peyote”. It has antropological (ethnohistoric) importance as fundamental botanical resource for the cohesion of diverse and numerous indigenous groups in Mexico and the United States of America. Within the experimental and clinical practice of Psychiatry, the use of mescaline (main psychotropic found in the “peyote”) has been important in general research on psychosis, as well as in the particular treatment of Schizophrenia. The use of *in vitro* culture for the propagation of plants, and the possible production of secondary metabolites in the peyote, constitute the experimental alternative of this study, which fundamental objective is to make research on the establishment of cell cultivation in suspension of this type of plant.

From preexistent dedifferentiated tissue made from peyote buds or peyote crowns, and kept in MS medium with 5mg/L of the kinetin 2-ip, which induces the production of buds, cell suspensions of the species were induced and maintained temporally. The poor friability and great resistance of callous material, motivated the decision of implement and development fragmentation techniques of the vegetable material. Initially, their application of these techniques caused serious oxidation and disturbed problems; these problems were eventually solved, through the duplication of the concentration of the carbon resource and antioxidants (60 g/L of sucrose + 200 and 100 mg/L of citric and ascorbic acids, respectively), and later on were definitely resolved through the use of enzymatic treatment (cellulose + macerozim) with a sieve and the use of the homogenizator.

These techniques were able to uniform the size of the cell aggregate, stabilizing appropriately the suspension and almost eliminating, in an evident way, the problems mentioned above. In addition to this, the sucrose concentration was reduced in 40% and the antioxidants concentration was reduced to base value. To conclude, in general, it was possible to get stable physicochemical conditions that allow the permanent establishment of the suspension, thanks to a progressive efficiency in fragmentation techniques applied to peyote's callous material.

Regarding the behavior of growth kinetics of the suspension, initially the culture was kept with the MS medium and the kinetin identical to use for callous growth (MS Sigma 5519 medium + 2-ip as VGR); the average of the fresh and dry weight measurements were relatively constant in time. What became evident was the fact that there was a very slow biomass growth. Trying to induce a conspicuous growth of plant material, 2,4-D auxin was added in a 2.5 auxin/cytosinin ratio; however, this treatment did not produce positive results, because the growth rate for this suspension was initially 10%, but later on this level was reduced to 5%, and these kinetic parameters are still positioned very far away from what it is considered a sustained and abundant growth. This can be observed due to the poor rate of cell division, characterized by a specific speed of growth that comes out to be very slow ($\mu = 5.4 \times 10^{-3} \text{ days}^{-1}$), and therefore, it has a long time of duplication ($td = 124.8 \text{ days}$). In summary, the kinetic of growth of the suspension shows that under these experimental parameters its growth is not permanent.

G L O S A R I O

Adrenérgico o simpatimimético.- Sustancias que simulan las acciones de la noradrenalina (norepinefrina) y adrenalina (epinefrina), sobre el sistema nervioso simpático.

AIA.- Ácido indolacético

ANA.- Ácido naftalenacético

AMP .- Adenosinmonofosfato

CAM .- Metabolismo ácido crasuláceo

2 ip.- N – isopentilaminopurina

2, 4-D.- Ácido 2, 4 – Diclorofenoxiacético

Enteógeno.- Principio activo natural, sintético o semisintético, cuya aplicación provoca estados alterados de conciencia, relacionados con el misticismo y/o la divinidad.

Esquizofrenia.- Sicosis caracterizada por la ruptura de la relación con el mundo exterior y por una marcada regresión, con una pérdida de la capacidad de distinguir entre estímulos internos y externos.

Friabilidad.- Propiedad de algunas estructuras que las hace fácilmente disgregables.

IBA.- Ácido indolbutírico

Kin.- Cinetina

Medio MS.- Medio de cultivo Murashige & Skoog (1962)

Micrófilo.- De hoja pequeña

Midriasis.- Dilatación de las pupilas

μ .- Velocidad específica de crecimiento

R_{C/N}.- Relación carbono/nitrógeno

RCV.- Reguladores de crecimiento vegetal o fitorreguladores

Rosetófilo.- De hojas acomodadas en forma de roseta

Sicosis.- Perturbación síquica que se caracteriza por la percepción distorsionada de la realidad y por la carencia de conciencia de estar enfermo

Sicosis tóxica.- Estado de sicosis originado por la aplicación de un principio activo natural, sintético o semisintético

Sicotrópico.- Sustancia que actúa a nivel de la región de la corteza cerebral en la que se encuentran las funciones de la sique

td.- Tiempo de duplicación

C O N T E N I D O

RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
GLOSARIO	x
C O N T E N I D O	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE TABLAS	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1
1. 1. Género <i>Lophophora</i>	2
1. 2. Esbozo monográfico de <i>Lophophora williamsii</i> (LEMAIRE) COULT. (Cactaceae)	5
1. 3. Biosíntesis de aminoácidos aromáticos y catecolaminas	11
1. 4. Acumulación de metabolitos secundarios en plantas y cultivos <i>in vitro</i>	17
1. 5. Crecimiento celular y producción de metabolitos secundarios	18
2. ANTECEDENTES	20
2. 1. Cultivo de células vegetales y RCV	21
2. 2. Establecimiento de callo	22
2. 3. Suspensiones celulares	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
3. 1. Etnohistórica	26
3. 2. Clínica	26
3. 3. Conservacionista	29

4. OBJETIVOS	30
4. 1. Objetivo general	31
4. 2. Objetivos particulares	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5. 1. El material vegetal y su procedencia	33
5. 1. 1. Desinfestación de explantes	33
5. 1. 2. Formulación de medios de cultivo y fitorreguladores para la inducción y mantenimiento del callo	35
5. 2. Inducción y mantenimiento de suspensiones	36
5. 2. 1. Selección de callo	36
5. 2. 2. Medio de cultivo y RCV para la inducción	37
5. 2. 3. Condiciones del cultivo de inducción	37
5. 2. 4. Estimación de tamaño del inóculo	37
5. 2. 5. Fragmentación de callo	38
5. 2. 6. Selección de medios de cultivo y fitorreguladores para el mantenimiento de la suspensión	39
5. 2. 7. Condiciones del cultivo de mantenimiento y resiembras	39
5. 2. 8. Microscopía de agregados celulares en suspensión	42
5. 3. Crecimiento de suspensiones celulares	42
5. 3. 1. Índice de crecimiento	42
5. 3. 2. Parámetros cinéticos	43
5. 3. 3. Medición de azúcares totales	43

5. 4. Alcaloides libres	
5. 4. 1. Alcalodes libres en cultivo de callo	44
5. 4. 2. Alcaloides libres en cultivo de células en suspensión	46
5. 4. 3. Cromatografía en capa fina de alcaloides libres	46
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
6. 1. Fragmentación del material calloso y oxidación en suspensiones iniciales	48
6. 2. Tamaño del inóculo	50
6. 3. Micrografías de agregados celulares en suspensión	52
6. 4. Peso fresco, peso seco y crecimiento de biomasa	55
6. 5. Índice porcentual de variación de biomasa de la suspensión de mantenimiento	59
6. 6. Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación	60
6. 7. Curva de azúcares totales	61
6. 8. Alcaloides libres en cultivos	63
7. CONCLUSIONES	65
8. BIBLIOGRAFÍA	68
9. ANEXOS	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las dos especies representativas del género <i>Lophophora</i> .	3
Figura 2. Zona mexicana geográfica de distribución de <i>L. williamsii</i> (en gris), y de <i>L. difusa</i> (en negro).	4
Figura 3. Vistas del bioma desértico de temperaturas cálidas en donde habita el peyote (<i>L. williamsii</i>). Real de Catorce, San Luis Potosí.	6
Figura 4. Modelo de la fijación de CO ₂ en plantas CAM.	8
Figura 5. Fórmulas estructurales de alcaloides presentes en el peyote.	10
Figura 6. Semejanza entre anillos heterocíclicos que funcionan como base estructural de alcaloides en algunas plantas.	11
Figura 7. Semejanza entre la feniletilamina y la tirosina. La primera es base estructural de la actividad adrenérgica; la segunda es precursor de catecolaminas con el mismo tipo de actividad.	12
Figura 8. Catecolaminas con actividad adrenérgica. Como se observa, su estructura base es el catecol.	13
Figura 9. Vía metabólica de síntesis de aminoácidos aromáticos	15
Figura 10. Síntesis de catecolaminas a partir de tirosina.	16
Figura 11. Biosíntesis de derivados de dopamina, entre ellos la mescalina.	17
Figura 12. Colecta de ejemplares de peyote por los huicholes en San Luis Potosí	27
Figura 13. Shaman huichol cantando durante una actividad ceremonial	28
Figura 14. Dibujo de ejemplar de peyote, mostrando el botón o corona después del corte. Este fragmento o explante constituye la región clorofílica del cacto	33

Figura 15. Técnica de desinfestación del material vegetal	34
Figura 16. Técnica inicial de fragmentación de callo	41
Figura 17. Técnica definitiva de fragmentación de callo	41
Figura 18. Procedimiento de extracción de los alcaloides libres de los cultivos de callo y células en suspensión de <i>L. williamsii</i>	45
Figura 19. Comparación entre suspensiones de inducción. El matraz C1 ^a muestra claros signos de necrosis y oxidación	48
Figura 20. Selección del nivel de inóculo (1 ^a corrida). Nótese como el punto de 4.5 g, rompe la tendencia de los tres anteriores	51
Figura 21. Selección del nivel de inóculo (2 ^a corrida). Nótese que los niveles del 10 y 15% (3 y 4.5 g) son muy cercanos	51
Figura 22. Vistas microscópicas de los agregados celulares de las suspensiones de mantenimiento (A, B y C). Descripción en el texto	54
Figura 23. Comparación entre el material vegetal contenido en las suspensiones de mantenimiento A y B	55
Figura 24. Curva de crecimiento de <i>L. williamsii</i> en la suspensión A de mantenimiento	56
Figura 25. Curva de crecimiento de <i>L. williamsii</i> en la suspensión B de mantenimiento	57
Figura 26. Variación de biomasa en la suspensión A de mantenimiento	57
Figura 27. Variación de biomasa en la suspensión B de mantenimiento.	58
Figura 28. Índice porcentual de variación de biomasa de la suspensión B de mantenimiento	
Figura 29. Curva de crecimiento de <i>L. williamsii</i> en la suspensión D de mantenimiento	60

Figura 30. Curva de consumo de azúcares totales de *L. williamsii* en la suspensión D
de mantenimiento

62

Figura 31. Placas cromatográficas de la fracción de alcaloides libres de callos de *L. williamsii*.

La placa de la izquierda muestra la mancha del extracto sin purificar y la placa

de la derecha la mancha ($R_f = 0.9$) de los alcaloides libres purificados en placa

preparativa

63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relaciones entre precursores y aminas fisiológicamente activas	13
Tabla 2. Efectos fisiológicos y sobre el comportamiento de la mescalina	28
Tabla 3. Efecto de fitorreguladores en la producción y desarrollo de callo de peyote (Buendía,2000)	35
Tabla 4. Medios de cultivo utilizados	36
Tabla 5. Tabla comparativa de medios, condiciones de cultivo y combinación de fitorreguladores, para el establecimiento de suspensiones	38
Tabla 6. Resiembras por tipo de suspensión	42
Tabla 7. Fórmula de macronutrientes y sacarosa	76
Tabla 8. Fórmula de micronutrientes	76
Tabla 9. Fórmula vitamínica y de antioxidantes	77
Tabla 10. Datos de la curva de calibración de absorbancia vs concentración	79
Tabla 11. Comparación por corrida de los medios de inducción	86
Tabla 12. Comparación por corrida de los medios de mantenimiento	87

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. Género *Lophophora*

El género *Lophophora*, con las especies *L. williamsii* y *L. diffusa* (figura 1) se caracteriza morfológicamente por plantas pequeñas, sin espinas, verde-grisáceas o verde-azulosas y con apariencia de cabeza; la parte superior o corona es suculenta y clorofílica, midiendo poco más de 8 cm de diámetro y dividida radialmente por 13 a 15 costillas redondeadas. Cada tubérculo tiene una pequeña areola plana, de cuya punta surge un mechón de pelo de 2 cm de largo; específicamente *L. williamsii* es de color azul-verdoso con 4 a 14 costillas y surcos bien definidos; sus areolas están distantes entre sí de 0.9 a 1.5 cm, circulares y de 2 a 4 mm de diámetro; las flores acampanuladas varían de 1 a 2.5 cm de longitud y de 1 a 2.2 cm de anchura, casi siempre de color rosa con tinte amarillento (Bravo, 1978).

La zona geográfica de distribución del género va desde los 20° 54' hasta los 29° 47' de latitud norte. Dentro de los Estados Unidos de América, *L. williamsii* se encuentra en la región de Río Grande, Texas, al este de la ciudad de Laredo. En México se extiende entre la Sierra Madre Occidental y la Oriental, hasta la población de Saltillo, Coahuila. Justo al sur de esta ciudad el rango de esta especie se estrecha y posteriormente se interrumpe, expandiéndose nuevamente al este dentro de las estribaciones de la Sierra Madre Oriental y al oeste del estado de Zacatecas, extendiéndose al sur del estado de San Luis Potosí donde su distribución termina. La especie *L. diffusa* esta restringida a la gran región desértica del estado de Querétaro, en un área de cerca de 775 km totalmente aislada de la población de *L. williamsii* por altas y escarpadas montañas (Anderson, 1980) (figura 2).

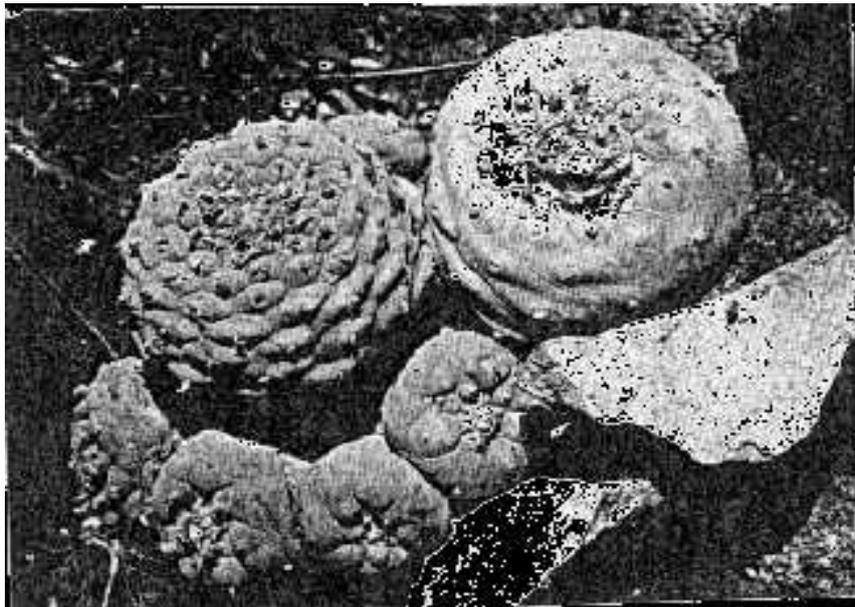


Figura 1. Las dos especies representativas del género *Lophophora*: arriba, *L. williamsii*; abajo, *L. diffusa*.

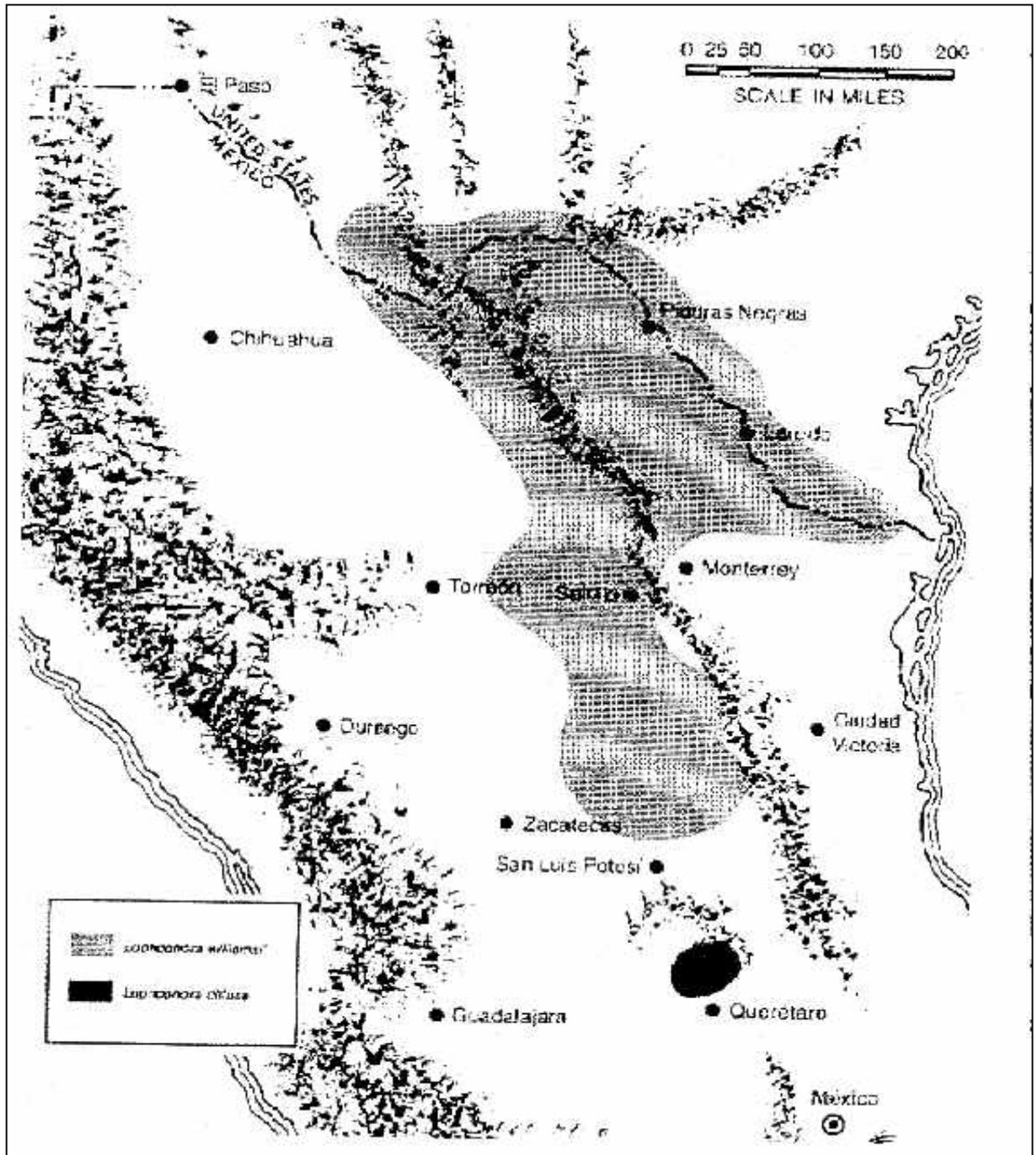


Figura 2. Zona mexicana geográfica de distribución de *L. williamsii* (en gris), y de *L. diffusa* (en negro). (Anderson, 1980)

1. 2. Esbozo monográfico de *L. williamsii* (LEMAIRE) Coult (Cactaceae)

Esta especie botánica, nombrada comúnmente como peyote, es conocida con cerca de 20 nombres comunes distintos, por aproximadamente el mismo número de etnias diferentes tanto de México como de los Estados Unidos de América (Evans, 1982); además, este nombre común es aplicado a 13 miembros de esta familia (Cactáceas), principalmente del género *Ariocarpus*, y aún a ejemplares de familias distintas tales como las Compuestas, Crasuláceas, Leguminosas y Solanaceas. En la actualidad, Anderson indica que gracias a los trabajos de Jan G. Bruhn y Bo Holmsted, se conoce y acepta que el peyote es una cactácea clasificada dentro del género *Lophophora*, junto con otro cacto (*L. diffusa*) semejante a él, y cuyas diferencias definitivas se encuentran en el contenido y tipo de alcaloides que poseen (Anderson, 1980).

Con respecto a su ecología, el peyote se encuentra en el bioma desértico de temperaturas cálidas de Chihuahua. Dicha región se clasifica, según Rzedowski, en dos subdivisiones (Rzedowski, 1978) (figura 3):

- Desierto de matorral micrófilo.- Con matorrales que han perdido las hojas o que poseen hojas muy pequeñas, por ejemplo: *Larrea tridentata* (arbusto de creosota), *Prosopis laevigata* (mezquite) y *Flourensia cernua* (arbusto de alquitrán).
- Desierto de matorral rosetófilo.- Con plantas cuyas hojas se orientan en forma de roseta, como *Agave lechuguilla* y *Yucca filifera*.

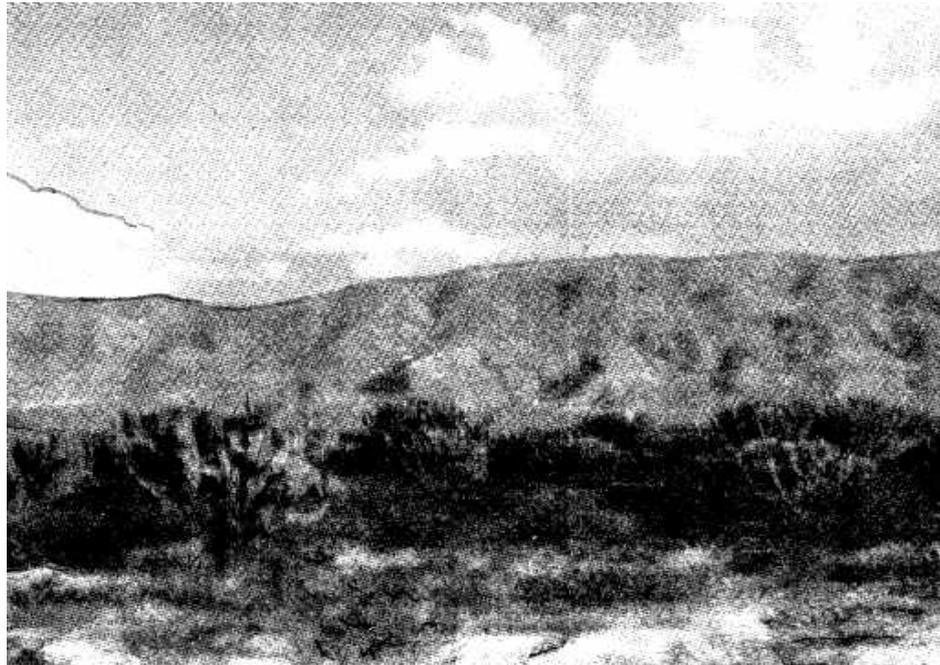
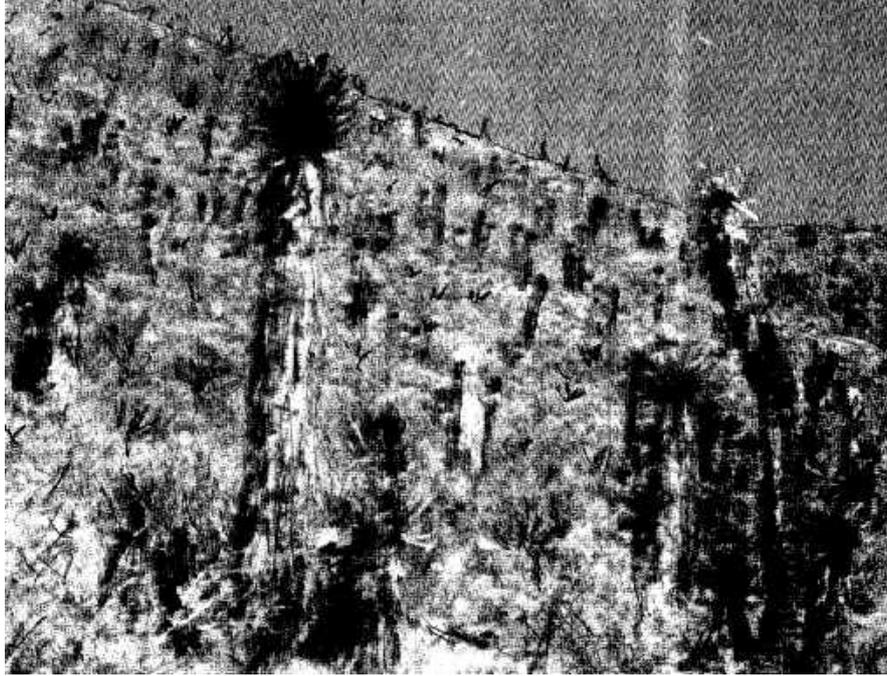


Figura 3. Vistas del bioma desértico de temperaturas cálidas en donde habita el peyote (*L. williamsii*). Real de Catorce, San Luis Potosí.

Otra clasificación de la región la ofrece Cornelius H. Muller, que la denomina como Desierto Chihuahuense de Matorral (Anderson, 1980). Los suelos de este lugar son originalmente de piedra o roca de limo con un pH básico (de 7.9 a 8.3); se caracterizan por tener más de 150 ppm de calcio, cerca de 6 ppm de magnesio, estar fuertemente carbonatados y presentar algunas trazas de amoníaco. El análisis de este suelo resulta negativo para el hierro, cloruros, sulfatos, manganeso y aluminio. El contenido de fósforo y el potasio se presenta en un rango muy amplio, pero en algunas localidades están en trazas mientras que en otras no se hallan para nada (Anderson, 1980). En resumen, puede concluirse que ambas especies de *Lophophora* habitan las zonas secas y pedregosas, generalmente sobre suelos calcáreos, de las regiones desérticas de Chihuahua, Coahuila, Zacatecas, San Luis Potosí y Querétaro

En todas las localidades anteriores, el peyote se encuentra comúnmente asociado a ciertas especies de plantas en un porcentaje específico, por ejemplo en un 75% de los sitios visitados se encontraba con *L. tridentata*, con *Opuntia leptocaulis* y *P. laevigata* en un 70%, con *A. lechuguilla* y *F. cernua* en 50%, y con *Y. filifera* y *Hematocactus spp* en un 40%. (Anderson, 1980).

El peyote es tolerante a un amplio espectro de condiciones climáticas, así por ejemplo el rango de precipitación en el que se le encuentra va de 175.5 mm a poco más de 556.9 mm por año; las temperaturas máximas que soporta varían de 29 a 40 °C, mientras que las mínimas se hallan entre los 1.9 a 10.2 °C. Además, usando el llamado índice de aridez modificado (Soto y Jauregui, 1978), que relaciona entre sí a la precipitación con la temperatura, *Lophophora* exhibe un amplio rango de aridez que va de las 64 hasta las 394 unidades.

En cuanto a su fisiología y bioquímica, el peyote es una planta xerófila suculenta almacenadora de agua, por lo que resulta sensible a potenciales hídricos negativos y por lo tanto, un organismo que evita o resiste la sequía pero no la tolera. Esta capacidad de mantener un potencial hídrico positivo, se debe en primer lugar a su metabolismo ácido crasuláceo (CAM) (Nobel y col., 2002) (Salisbury y Ross, 1991). El CAM, que es una variante del ciclo C₄ que impide la pérdida de H₂O y CO₂ por fotorrespiración, separa la incorporación de este gas y del ciclo de Calvin en el tiempo. Así de este modo realiza la fotosíntesis con una pérdida mínima de agua (Voet y Voet, 1992) (figura 4).

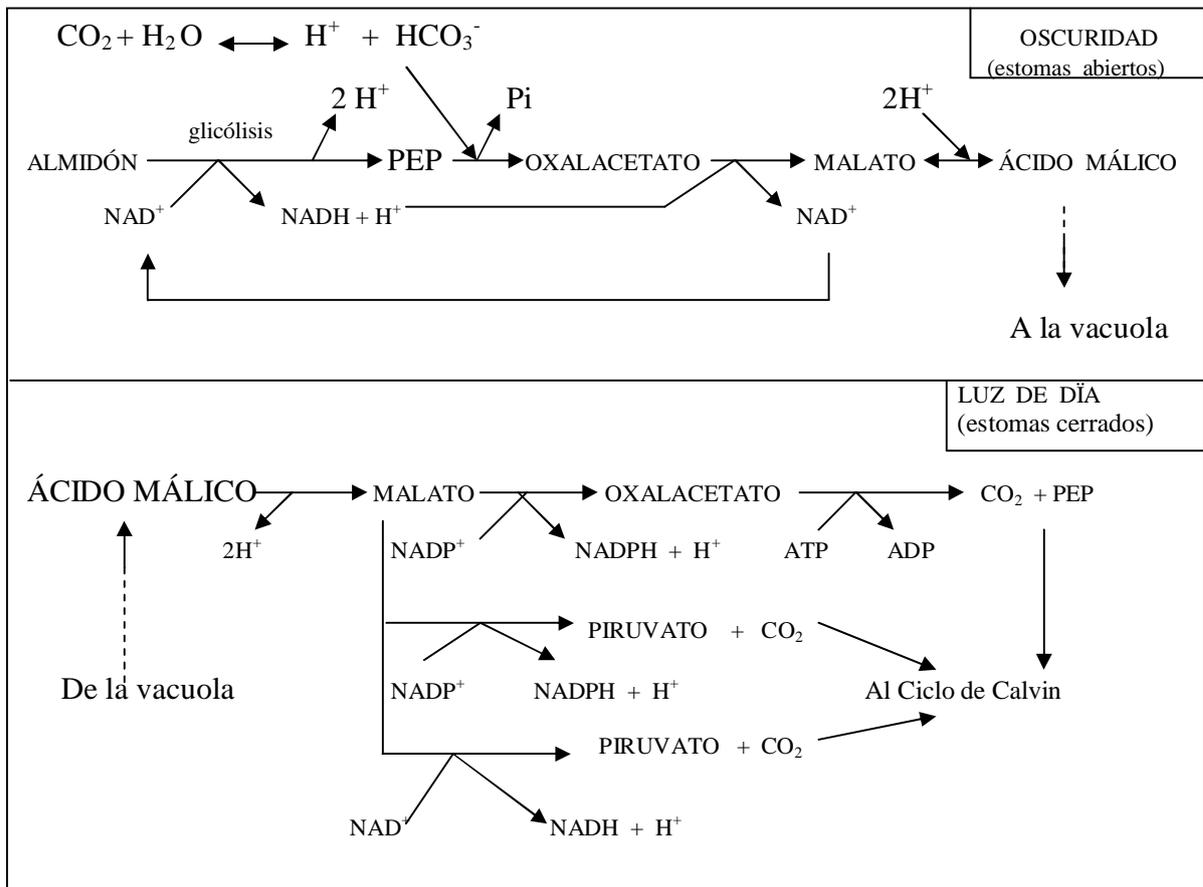


Figura 4. Modelo de la fijación de CO₂ en plantas CAM.

Gracias también a su cutícula excepcionalmente gruesa y al cierre de estomas durante el día, las suculentas, y en especial las cactáceas, tienen una tasa de pérdida de agua muy baja, por lo que pueden existir por largos periodos sin recibir agua. Otra adaptación de este tipo de organismos, es la acumulación de ciertos compuestos orgánicos tales como disacáridos y aminoácidos, con el propósito de reducir el potencial osmótico de las células. Dicho fenómeno se conoce como ajuste osmótico u osmoregulación (Madusudhan,1995). Otra adaptación común de las plantas del desierto es la producción de alelopáticos, es decir, sustancias que restringen la germinación o el crecimiento de otras plantas que compiten por el agua (Salisbury y Ross, 1991). En este sentido, la elaboración de alcaloides (entre ellos la mescalina) con función neurotransmisora en *L. williamsii*, posiblemente sea una medida de defensa contra mamíferos depredadores, causando en estos desorientación y descoordinación motora, haciéndoles vulnerables a otros enemigos naturales (Winck, 1987). Estos metabolitos secundarios producidos por el peyote se clasifican en dos grupos:

- Grupo A.- Alcaloides solubles en éter (anhalonina, peyotina y lophophorina), representando un 2 % del producto.
- Grupo B.- Alcaloides poco solubles en éter y fácilmente solubles en cloroformo, como la mescalina que se presenta en una proporción de noventa por mil; la anholinidina y la anhalamina, cada una con veinte por mil del producto (Evans, 1982) (figura 5).

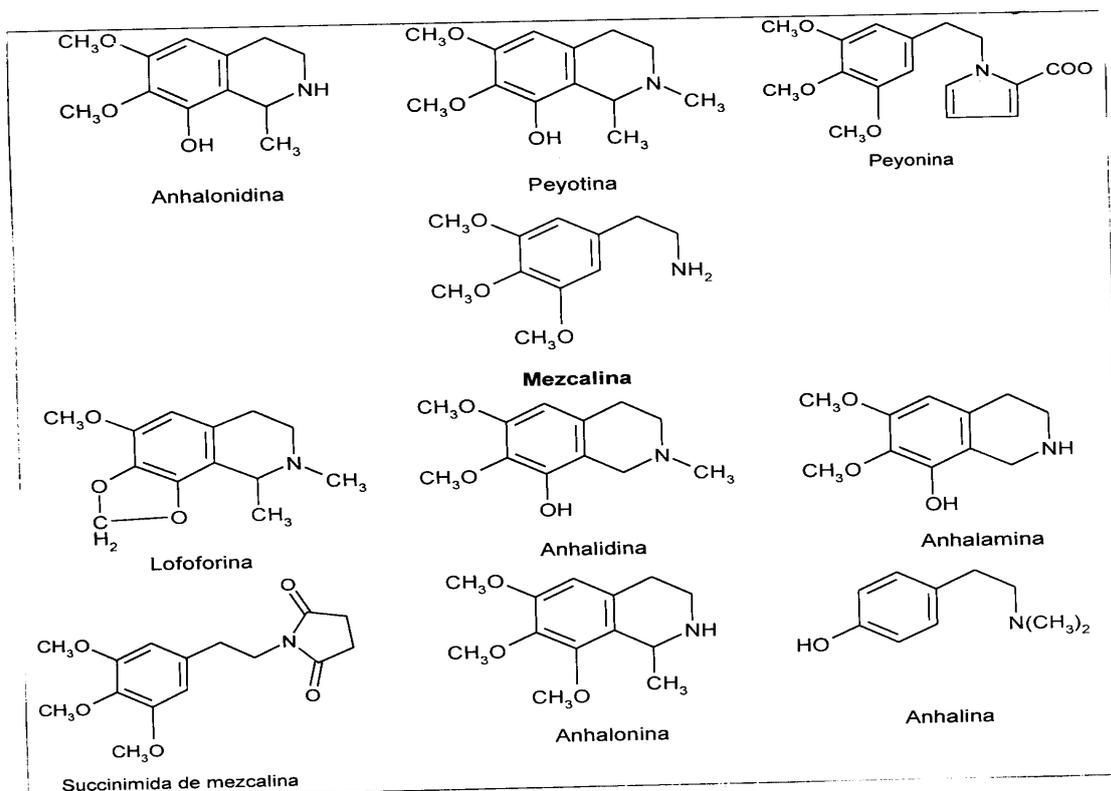


Figura 5. Fórmulas estructurales de alcaloides presentes en el peyote.

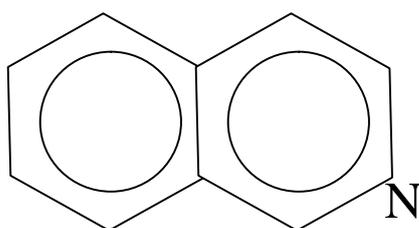
En cuanto a su cultivo, el peyote es fácilmente cultivable como planta de ornato, aunque obtener una planta adulta a partir de su semilla exige mucha paciencia, ya que para desarrollar un ejemplar cuyo diámetro alcance 1.5 cm, pueden pasar más de 5 años. No obstante, mediante la técnica de injertos de plántulas sobre raíces de rápido crecimiento, el índice de crecimiento usualmente se triplica o cuadruplica. Las condiciones edafológicas para el cultivo no son difíciles de conseguir, ya que hay que asegurar una adecuada cantidad de calcio, un suelo ligeramente básico y proveer un buen drenaje; el riego puede ser frecuente (una vez cada cuatro o siete días) durante el verano, pero muy poco o nada en el invierno (Anderson, 1980).

Otra forma de cultivo, mediante propagación de callos provenientes de plantas silvestres, será expuesta en la sección de metodología.

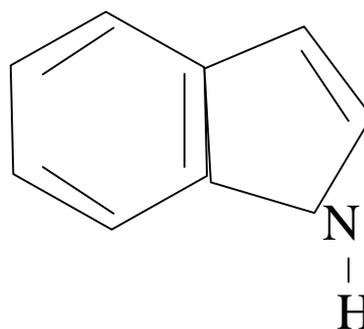
1. 3. Biosíntesis de aminoácidos aromáticos y catecolaminas

El botánico norteamericano R. Evans Schultez menciona que en el peyote, más de 30 principios activos han sido encontrados en sus tejidos, refiriendo que estos son alcaloides de dos tipos: las isoquinolinas y las feniletilaminas (Evans, 1982).

Las primeras sustancias se caracterizan por poseer un anillo bencénico fusionado a otro pirídico, y a semejanza de otros alcaloides aromáticos alucinógenos, pero de núcleo indólico, son también compuestos heterocíclicos (Morrison y Boyd, 1992) (figura 6).



ISOQUINOLINA



INDOL

Figura 6. Semejanza entre anillos heterocíclicos que funcionan como base estructural de alcaloides en algunas plantas.

Con respecto al segundo tipo de sustancias, y desde el punto de vista farmacológico, la feniletilamina es considerada como la estructura base de la actividad adrenérgica o simpatomimética (Trendelemburg, 1993) (figura 7), presente también en algunas aminas fisiológicamente activas (catecolaminas)

tales como la L-Dopa, la dopamina, la norepinefrina y la epinefrina (Wurtman, 1995), todos ellos con la estructura común del fenol dihidroxilado llamado catecol (figura 8), y cuyo precursor original, al igual que el de la mescalina, es el aminoácido aromático tirosina, mediante su transformación en L-Dopa y posteriormente en dopamina.

La biosíntesis de tirosina, que como otros aminoácidos dietéticos son precursores de aminas con actividad neurofisiológica (Underfrien, 1960) (Tabla 1), se representa en la figura 9.

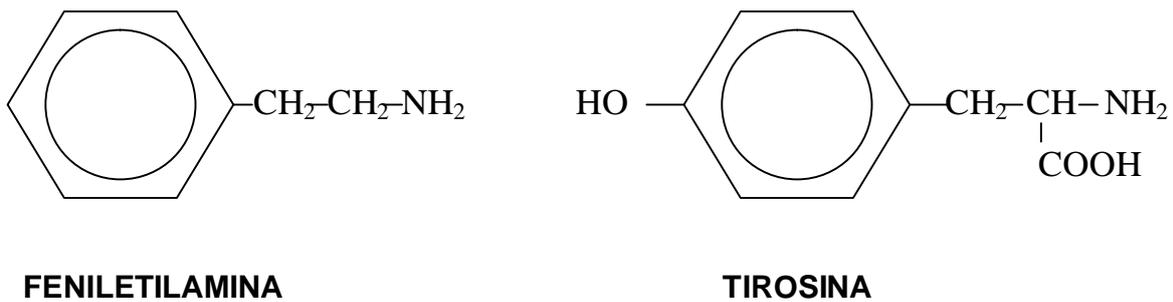


Figura 7. Semejanza entre la feniletilamina y la tirosina. La primera es base estructural de la actividad adrenérgica; la segunda es precursor de catecolaminas con el mismo tipo de actividad (Trendelemburg, 1993).

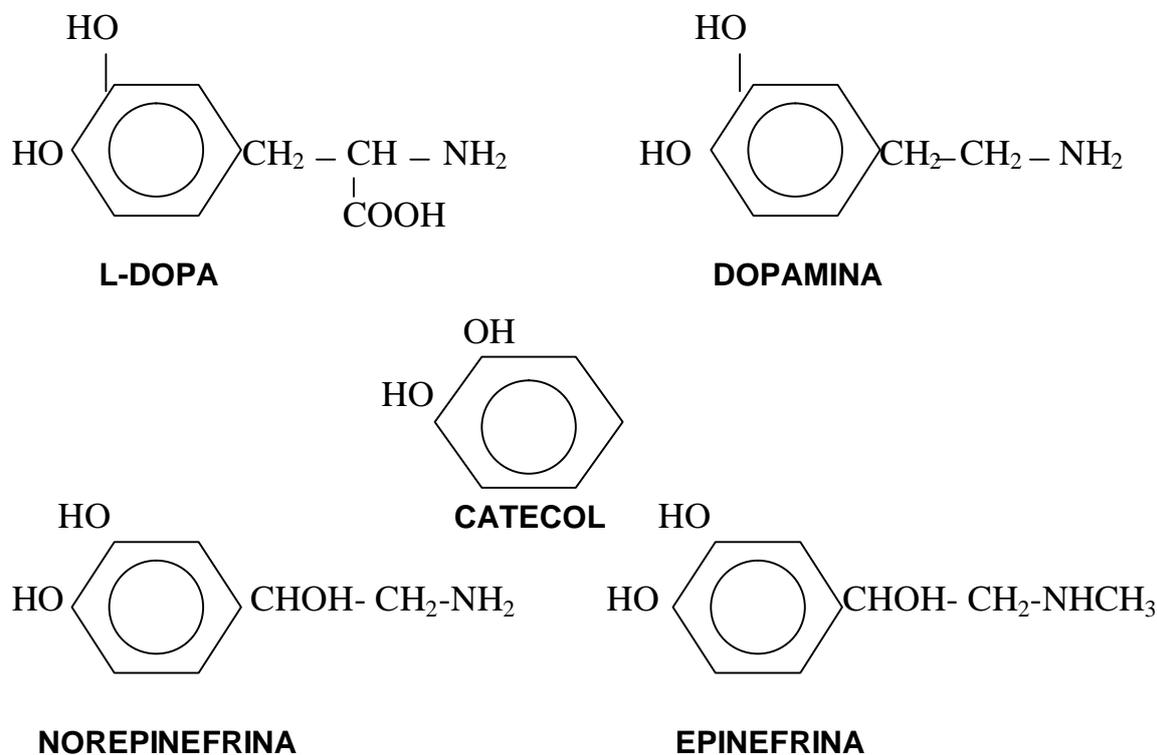


Figura 8. Catecolaminas con actividad adrenérgica. Como se observa, su estructura base es el catecol.

Tabla 1. Relaciones entre precursores y aminas fisiológicamente activas.

Aminoácido dietético (Precursor)	Amina
Tirosina	L-Dopa, Dopamina, Norepinefrina y Epinefrina
Triptofano	Serotonina y Triptamina
Histidina	Histamina
Acido Glutámico	Acido gamma aminobutírico (GABA)

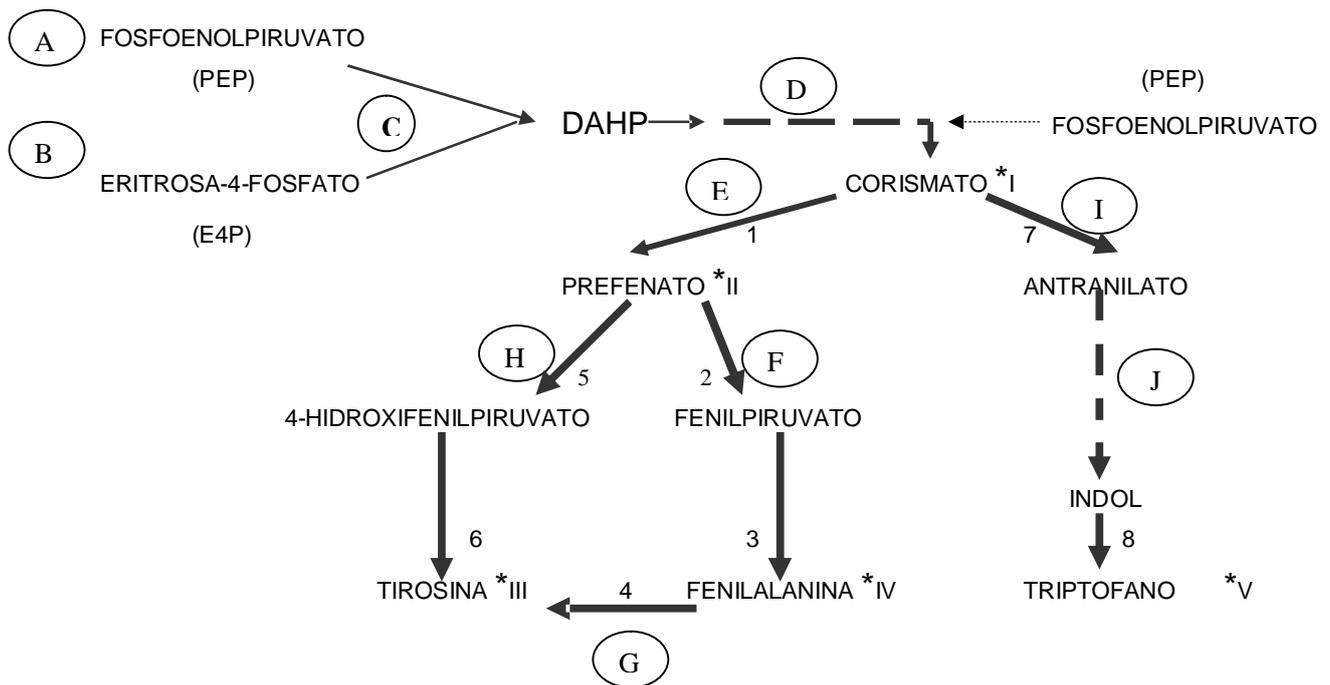
Tomado de Goth, A. Farmacología Médica. Ed. Interamericana. 5ª Edición. México, 1971.

Los precursores iniciales de la síntesis de los aminoácidos aromáticos son dos: el fosfoenolpiruvato (PEP), triosa proveniente de la glucólisis, y la eritrosa-4-fosfato (E4P) tetrosa intermediaria de la ruta de las pentosas fosfato. Inicialmente ambos monosacáridos se condensan en una heptulosa cuyo largo nombre se abrevia como DAHP, el cual se integra en un anillo glucosídico para eventualmente transformarse en corismato, punto de

ramificación para la síntesis, por un lado y a través del antranilato y el indol entre otros intermediarios, del aminoácido triptófano; y por el otro y a través del pefenato, de la tirosina y la fenilalanina (Umbarger, 1978) (Kishore y Shah, 1988).

Debe agregarse que el fosfoenolpiruvato (PEP), no es necesario exclusivamente al inicio de toda la biosíntesis, sino que también se adiciona en forma de un radical enolpiruvil (serie D en la figura 9), para formar el intermediario inmediato del corismato (Tyler, 1978).

La tirosina sintetizada puede sufrir descomposición a fumarato y acetoacetato, o bien, mediante una hidroxilación produce la primera catecolamina de la serie, es decir L-Dopa, importante compuesto que en subsiguientes reacciones origina a la dopamina, norepinefrina y epinefrina. La síntesis de L-Dopa es regulada por la tirosina hidroxilasa, enzima limitante de su producción (Cooper y Bloom, 1982; Pasantes y col.,1991) (figura 10).



*I = Corismato, punto de ramificación en la síntesis del triptófano

*II = Prefenato, punto de ramificación en la síntesis de tirosina

1 = Corismato mutasa

2 = Prefenato deshidratasa

3 = Aminotransferasa

4 = Fenilalanina hidroxilasa

5 = Prefenato deshidrogenasa

6 = Aminotransferasa

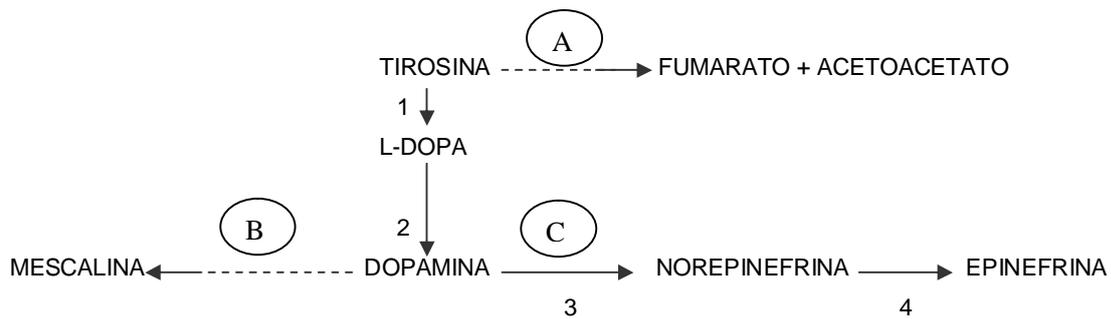
7 = Antranilato sintasa

8 = Triptófano sintasa

* III; * IV y * V = Aminoácidos aromáticos

Figura 9. Vía metabólica de síntesis de aminoácidos aromáticos. Adaptado de (Voet y

Voet, 1992).



(A) = Degradación de tirosina

(B) = Síntesis de mescalina

(C) = Síntesis de catecolaminas

1 = Tirosina hidroxilasa

2 = Aminoácido aromático hidroxilasa

3 = Dopamina β -hidroxilasa

4 = Feniletanolamina N-Metiltransferasa

Figura 10. Síntesis de catecolaminas a partir de tirosina.

De la serie B en la figura 10, la dopamina se transforma en mescalina (3, 4, 5, trimetoxifeniletamina) a través de la hidroxilación y metilación de tres intermediarios (figura 11) (Luckner, 1990), pero también es viable como predecesora de la síntesis de las dos últimas catecolaminas de la serie C.

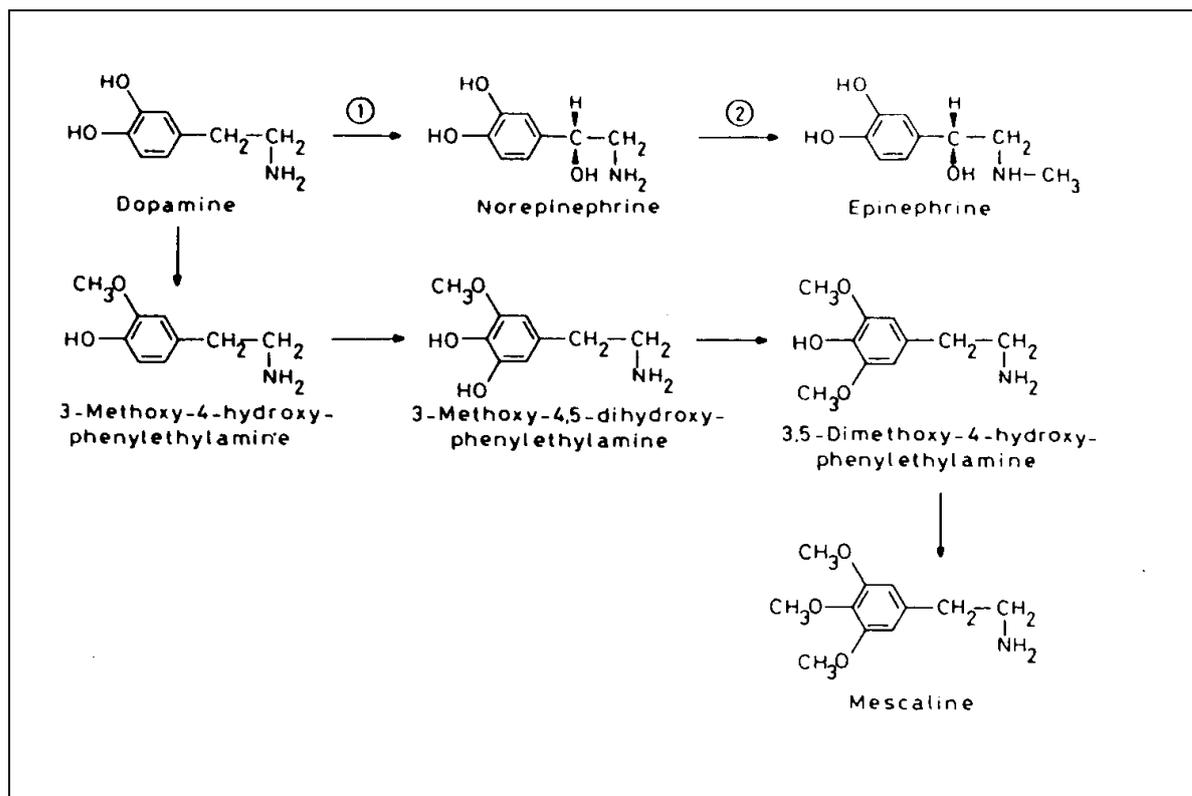


Figura 11. Biosíntesis de derivados de la Dopamina, entre ellos la mescalina.

1. 4. Acumulación de metabolitos secundarios en plantas y cultivos *in vitro*

Para el biotecnólogo, el cultivo de células vegetales es de gran interés, como una alternativa para la obtención de compuestos químicos a partir de ejemplares vegetales, reduciendo su tiempo de cultivo. Para cumplir con este objetivo se han empleado diferentes estrategias, tales como la optimización del medio de cultivo (Schmidt y col., 1988), la manipulación genética (Bell, 1994), selección de líneas celulares altamente productoras, presencia ó ausencia de factores ambientales (Albrecht y Sandmann, 1994) y aspectos químicos ó biológicos (Ramos-Valdivia y col., 1997). Los metabolitos secundarios son extraídos de diferentes tejidos de protección de las plantas, los cuales poseen estructuras complejas.

En estos casos es necesario el fraccionamiento de los fitoquímicos, involucrando un gran número de etapas que son modificadas, dependiendo de la especie en cuestión y del tipo de compuestos por separar. Cada etapa presenta características particulares debido a compuestos de interferencia durante la extracción. En el cultivo de células vegetales, los procesos de fraccionamiento son modificados y adaptados, para que los compuestos de interés estén adecuadamente disponibles para su extracción. En el caso de la obtención de alcaloides, se han empleado combinaciones de solventes polares y no polares para el fraccionamiento de los extractos. Posteriormente, se utilizan técnicas de cromatografía en columna y/o capa fina para su detección, y de cromatografía en líquidos ó gases para su eventual cuantificación; por ejemplo, la separación de compuestos de *U. tomentosa* se ha realizado a partir de su corteza, empleando técnicas de fraccionamiento para la obtención de alcaloides y triterpenos glicosidados (Aquino y col., 1989). Pretendiendo aún más precisión, la identificación de los fitoquímicos se ha efectuado también por resonancia magnética nuclear (Matos y col., 1986; Xu y col., 1988).

1. 5. Crecimiento celular y producción de metabolitos secundarios

Diversas son las variables y sus efectos a considerar durante el crecimiento celular y la elaboración de metabolitos secundarios: concentración de nutrientes y fitorreguladores, iluminación, temperatura y agitación, son de las más relevantes. Dos son los elementos químicos más importantes como nutrientes para los cultivos:

- El nitrógeno.- Este elemento es utilizado por la planta en altas concentraciones. Durante el cultivo es añadido al medio en forma de sales de nitrato ó amonio, pero su asimilación es principalmente como ión nitrato en concentraciones aproximadas de 1 a 5 μM por célula, ingresando a esta por mecanismos de bombas

de protones (Na^+ , H^+ ó K^+). Dentro de la célula, los nitratos sufren reducción a nitritos incorporándose como glutamina, siempre y cuando se encuentre disponible glutamato como el esqueleto carbonado. La asimilación del nitrato esta regulada por factores diversos tales como la iluminación, concentración de CO_2 , citocinina presente, tipo de fuente de carbono, presencia de compuestos oxidantes y de compuestos nitrogenados como el amonio (Crawford, 1995).

- El carbono.- Si bien es cierto que existen cultivos celulares que se mantienen de manera autotrófica, el uso de una fuente externa del elemento facilita el crecimiento celular y la producción de metabolitos de interés. En este sentido, son la glucosa y la sacarosa los más ampliamente usados por su capacidad de asimilación, aunque en concentraciones que exceden el 5% de estos carbohidratos, puede presentarse represión catabólica e inducir la producción de polisacáridos, por ejemplo almidón, incrementando el peso de la biomasa (Fowler, 1982).
- Los fitorreguladores.- También conocidos como reguladores de crecimiento vegetal (RCV), la modificación del medio de cultivo en su concentración y tipo, a permitido en una gran diversidad de especies un significativo incremento, tanto en la producción de biomasa como en la acumulación de metabolitos secundarios (Dörmenburg y Knorr, 1995). En general, la actividad biológica de los fitoquímicos es comprobada en base a el efecto benéfico o perjudicial proporcionado a la célula (Aquino y col., 1991).

2. ANTECEDENTES

2. 1. Cultivo de células vegetales y RCV

Gracias al descubrimiento, producción y utilización de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), el método de micropropagación vegetal a través del cultivo de células en medio sólido o líquido, es una realidad. Estos fitorreguladores empleados en concentraciones adecuadas, permiten la viabilidad del desarrollo y proliferación de las células presentes en el tejido meristemático (Street, 1977). De estas sustancias, las más utilizadas para este tipo de cultivos son las auxinas y las citocininas.

Las primeras son compuestos de origen natural o artificial, que provocan en estructuras diferenciadas de las plantas tales como tallos jóvenes, coleóptidos, raíces y hojas, una elongación relacionada con el fenómeno de fototropismo; además, pueden inhibir el crecimiento de las ramas laterales en el individuo. A nivel celular y por sus mecanismos de acción, incrementan la flexibilidad de la pared vegetal, facilitando el acceso de nutrientes al interior de la célula y aceleran la síntesis proteica, promoviendo el crecimiento. Las auxinas se almacenan en bajas concentraciones asociadas a glicósidos, de los que se liberan y activan por medio de mecanismos de control celular para estimular el crecimiento (Taiz y Zeiger, 1990).

Con respecto a las citocininas, estos compuestos aceleran la división celular induciendo la morfogénesis de brotes y raíces; estimulan la ramificación y la maduración de cloroplastos; tienen control sobre la senescencia y además, producen aumento de la resistencia al estrés por humedad, altas temperaturas y salinidad. De manera general, estas sustancias son derivados del AMP y se encuentran involucradas en el desarrollo y crecimiento de la planta, siendo la cinetina un típico representante del grupo (Kaminek, 1992).

2. 2. Establecimiento de callo

Un callo es el crecimiento *in vitro* de una estructura vegetal amorfa, por lo general clorofílica, que se forma a partir de un fragmento de tejido, colocado sobre un soporte sólido con un medio de cultivo adecuado, y en cuyo desarrollo pueden observarse distintas etapas o fases:

- La inducción constituye la activación del metabolismo, caracterizándose por un tamaño constante de célula. La duración de esta fase varía con el estado fisiológico de las células del explante, la presencia de fitorreguladores, y con las condiciones físicas y ambientales empleadas en el cultivo .
- La dediferenciación y la división celular se definen por los cambios en el tamaño, estructura y metabolismo de las células, siendo su propósito la formación de la estructura vegetal amorfa, es decir, el callo mismo. El callo presenta un crecimiento exponencial de naturaleza radial, con una duración aproximada de 3 a 4 semanas antes de alcanzar la fase estacionaria. Por otro lado, en el transcurso del proceso de dediferenciación, las células vegetales conservan la capacidad de mantener activas todas sus funciones metabólicas, de manera indistinta al tejido de su procedencia, llamándose totipotencia a esta condición (Steward y col., 1964).
- Otras características importantes, aunque no sean fases o etapas del cultivo *in vitro*, tienen que ver con procesos de naturaleza selectiva, tal como la presencia de grupos celulares que manifiestan variaciones genotípicas y/o fenotípicas, fenómeno conocido como variación somaclonal. Otro asunto relevante que altera las condiciones del cultivo, son la muerte y oxidación de regiones de la estructura callosa , así como la contaminación por el crecimiento y desarrollo de microorganismos

(hongos y bacterias, principalmente). Por último, es preciso mencionar que la inducción originada a partir de los diferentes tejidos vegetales del explante, permite seleccionar al eventual cultivo celular que exprese *in vitro*, las características deseadas que deberán permanecer estables bajo condiciones nutricionales y ambientales dadas (Murashige, 1974).

2. 3. Suspensiones celulares

Una suspensión celular puede definirse, como un conjunto de células individuales y/o agregados celulares de tamaño variable (1 a 2 mm, por lo general), que crecen y se desarrollan en un medio líquido dentro del cual se hallan dispersas, y que se encuentran incubadas a temperatura y agitación constantes. En su elaboración se emplean inicialmente callos fácilmente disgregables ó friables (Constantin y col., 1982).

Durante su desarrollo, las células presentan las mismas fases de crecimiento obtenidas en el cultivo de callos (adaptación ó fase lag, crecimiento exponencial y fase estacionaria), pero en un tiempo presuntamente más corto, ya que los fenómenos de transferencia de masa facilitados por una adecuada aireación y agitación, posibilitan una mayor velocidad de crecimiento, al incrementarse la disponibilidad de gases y nutrientes (Lane, 1982). Posteriormente, los cultivos en suspensión son mantenidos bajo un régimen de subcultivos, preferentemente durante la etapa de crecimiento exponencial; empleando medios y condiciones adecuadas, es posible el establecimiento y desarrollo de nuevas líneas celulares, procesos que la técnica de crioconservación de este tipo de material, por sí misma, no puede ofrecer. Por lo tanto, para los estudios de investigación deben tenerse en cuenta el número de resiembras, ya que al paso del tiempo las células tienden a envejecer y disminuir vitalidad metabólica (Street, 1977).

Una condición que resulta importante mantener, como en el caso de cultivo de callos, es el control y, si es posible, la eliminación definitiva de la contaminación por microorganismos. Por último, para considerar establecida una suspensión celular, deben especificarse por lo menos los siguientes parámetros: medio de cultivo, condiciones ambientales, el tamaño del inóculo y la velocidad específica de crecimiento (μ) (Quintero, 1981).

3. JUSTIFICACIÓN

Existen al menos tres consideraciones de peso, que sustentan la importancia del desarrollo de investigación biotecnológica, dirigida al recurso *L. williamsii* o peyote. La naturaleza etnohistórica, clínica y conservacionista de aquellas, queda de manifiesto en la siguiente reseña:

3. 1. Etnohistórica.- Son numerosos y distintos los grupos indígenas, que utilizan el peyote en sus ceremonias y fiestas. Entre ellos se encuentran los coras, tepehuanos, mexicanos y huicholes; incluyendo también a los yaquis, mayos, tepecanos y nahuatlacas, todos ellos pertenecientes a la familia lingüística yutoazteca (Palafox, 1978).

Por ejemplo, los huicholes celebran ciertas ceremonias de iniciación infantil, que persiguen la culturización del niño con respecto a la tradición del peyote, además de una representación subjetiva de la geografía de lo sagrado, a través del viaje al legendario país del Divino Venado-Peyote ó Wirikúta, ubicado geográficamente en el alto desierto norte-central de San Luis Potosí (Anguiano y Furst, 1987), y en el que se recolectan grandes cantidades del cacto (figura 12). Estas tradiciones rituales, dan cohesión e identidad al grupo huichol, basándose en los mitos originarios del peyote, que se encuentran en el centro mismo de la cultura intelectual de este pueblo, proporcionándole así un plano cognocitivo y espacial transmitido de una generación a otra (Myerhoff, 1974), a través de los cantos shamánicos (figura 13).

3. 2. Clínica.- Los principios activos del peyote, principalmente la mescalina, son de naturaleza sicotrópica, es decir, que actúan a nivel del sistema nervioso central, específicamente sobre regiones determinadas de la corteza cerebral. Estos compuestos pueden producir sicosis tóxicas que sugieren una base química de las enfermedades mentales y, por tanto, el tratamiento quimioterapéutico de estas (Kely, 1969). La mescalina,

como ya se mencionó, tiene una estructura similar a las aminas simpatomiméticas (Cohen, 1967) y su uso terapéutico, clínico y experimental, se realiza para el tratamiento de la esquizofrenia (Friend, 1965); (Rinkel y Denber, 1958). Algunos de los efectos fisiológicos y sobre el comportamiento que provoca este alcaloide, se presentan en la tabla 2:



Figura 12. Colecta de ejemplares de peyote por los huicholes en San Luis Potosí (Anguiano y Furst, 1987).



Figura 13. Shaman huichol cantando durante una actividad ceremonial (Anguiano y Furst, 1987).

Tabla 2. Efectos fisiológicos y sobre el comportamiento de la mescalina

Región	Efectos de la Mescalina
<u>Comportamiento:</u>	Incremento de la iniciativa y la respuesta emocional; incremento de la reactividad a estímulos sensoriales, excitación y alerta.
<u>Músculo esquelético:</u>	Incremento del tono muscular y la actividad locomotora. Excitación motora.
<u>Respiración:</u>	Activación
<u>Sistema autónomo:</u>	Midriasis; elevación de la presión sanguínea y taquicardia; retracción de la membrana nictante e hipertermia.

Adaptado de Rinkel, M. Y Denber, C. B. H. Chemical Concepts of Psychosis. Mc Dowell/ Obolensky/ New York . USA, 1958.

3. 3. Conservacionista.- El peyote es un recurso que, desde el punto de vista ecológico y de su distribución biogeográfica, presenta un envidiable rango de adaptabilidad a condiciones climáticas diversas, que le han permitido lograr un aparente éxito evolutivo. No obstante, debido a sus propiedades alucinógenas y como enteógeno altamente valorado, el ser humano lo ha sometido a una intensa y extensa acción depredadora, que ha provocado una drástica reducción y perturbación en las poblaciones de la especie, a tal grado que en la actualidad se encuentra bajo protección especial por una norma oficial ecológica (NOM-059-Ecol-1994; Diario Oficial de la Federación, 1994).

4. OBJETIVOS

4. 1. Objetivo general

Establecer cultivos de células en suspensión de *L. williamsii*, a partir del callo cultivado de la especie.

4. 2. Objetivos particulares

- Determinar las condiciones adecuadas de crecimiento de las células en suspensión, considerando la medición de variables utilizadas (producción de biomasa, R_{CN} , fragmentación, etc.) en un régimen de cultivos celulares de *L. williamsii*.
- Caracterización cinética del cultivo de células en suspensión. Cálculo de parámetros cinéticos (velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación) para la suspensión, en estas condiciones.

5. MATERIALES Y METODOS

5. 1. El material vegetal y su procedencia

Los ejemplares de peyote usados para el desarrollo de callos, fueron colectados en la región de Río Verde, San Luis Potosí. Estas plantas se cortaron de la parte superior del cacto (zona parenquimatosa) y con bisturí a la flama, según se muestra en la figura 14. Los botones o coronas obtenidos, constituyen los explantes cuyo tratamiento se reseña en los puntos siguientes.

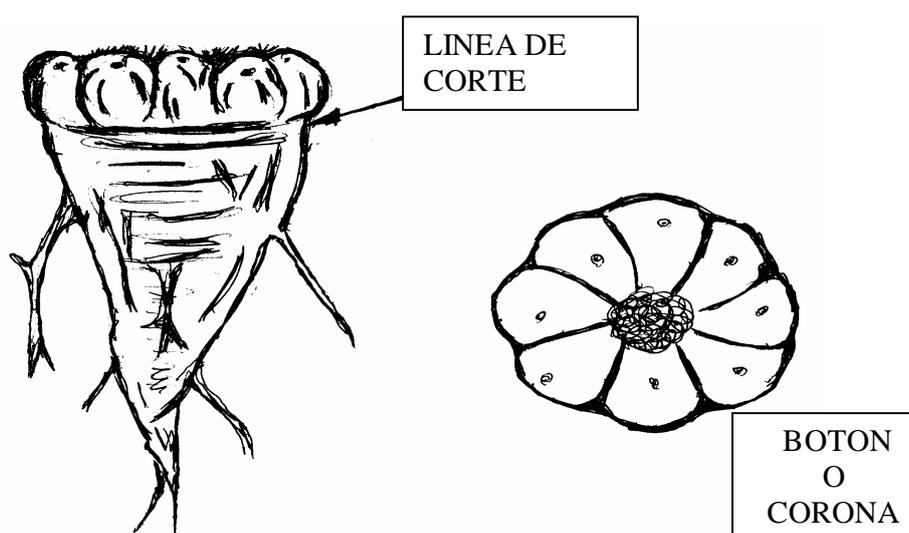


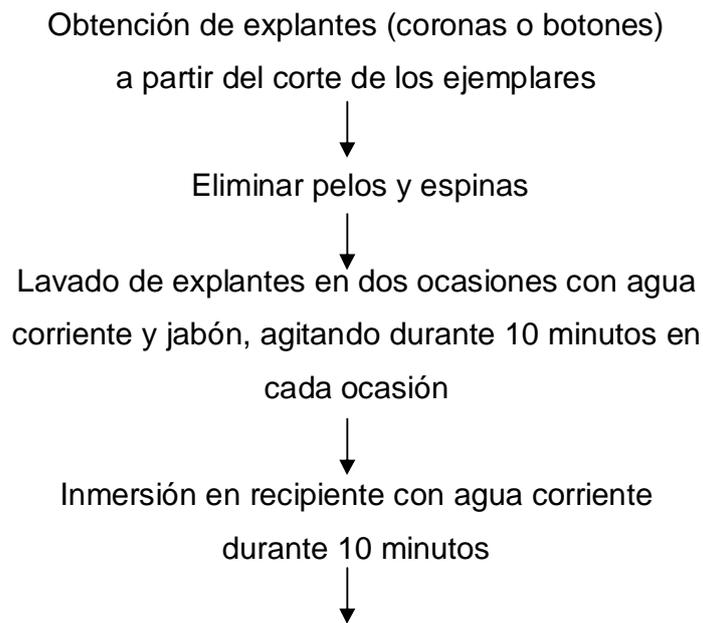
Figura 14. Dibujo de ejemplar de peyote, mostrando el boton o corona después del corte. Este fragmento o explante constituye la región clorofílica del cacto.

5. 1. 1. Desinfestación de explantes

La inducción de callo y el mantenimiento del mismo se llevó a cabo según la metodología reportada por Buendía (2000). En general, esta técnica inicia con la desinfestación, que consiste en someter al material a un tratamiento de inmersión en alcohol, hipoclorito de sodio y detergente, cuyo objeto es la absoluta limpieza superficial del explante evitando así su contaminación, preparándolo para el corte de

segmentos del tamaño necesario, que más tarde se siembran e incuban en medio de cultivo sólido. La figura 15 esquematiza la técnica mencionada:

Fuera de la campana de flujo laminar:



Dentro de la campana:

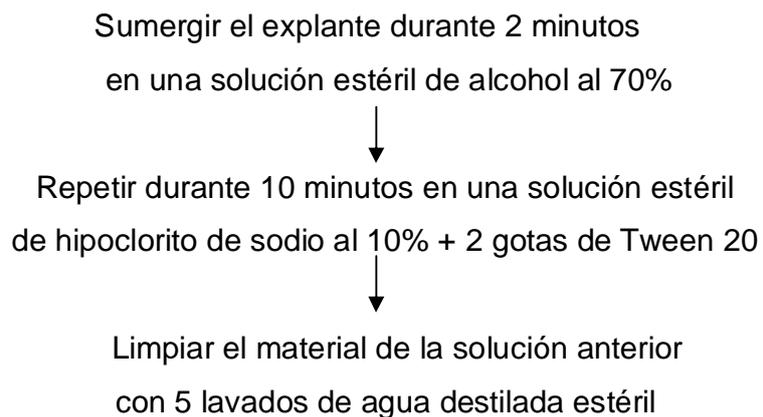


Figura 15. Técnica de desinfección del material vegetal

5. 1. 2. Formulación del medio de cultivo y fitorreguladores para la inducción y mantenimiento del callo.

El sembrado se continúa dentro de la campana por medio de las siguientes acciones:

- Después de eliminar por decantación el agua destilada estéril, se corta el explante con bisturí a la flama, obteniendo segmentos de costilla de aproximadamente 1 cm³.
- Cada segmento o implante se siembra en medio de cultivo sólido, colocado en frascos de vidrio estériles.

El medio de cultivo base utilizado es el de Murashige & Skoog (MS, Sigma 5519), (tablas 7, 8 y 9 de anexo 1). El anterior, adicionado con sacarosa al 3%, 8 g/L de Agar (Sigma) como gelificante y carbono activado como antioxidante, constituyen el medio (MSc) para el cultivo de callo (tabla 4). La tabla 3 muestra la combinación de fitorreguladores y sus efectos sobre el callo de peyote.

Tabla 3. Efecto de fitorreguladores en la producción y desarrollo de callo de peyote. (Buendía, 2000).

Citocinina (mg/L)	Auxina (mg/L)	Observaciones
2iP (5)	-----	Callo (+); Brotes (++)
BAP (1.0)	ANA (1.0)	Callo (-); Brotes (-)
Kin (4.0)	AIA (2.0)	Callo (++); Brotes (-)

(-) = Falta de respuesta; (+) = Respuesta escasa; (++) = Respuesta abundante.

Como se aprecia en la tabla anterior, la combinación de fitorreguladores que logra la mejor inducción de callo, es la que corresponde a kinetina y AIA, constituyendo el medio con 2-ip el más adecuado para su mantenimiento.

Tabla 4. Medios de cultivo utilizados

-
- a) Para cultivo de callo de peyote (MSc): Medio base + 8 g de agar + 250 mg de carbón activado + 5 mg de 2-ip-NaOH.
- b) Para inducción de suspensión (MSs⁰): Medio base + 5 mg de 2-ip-NaOH.
- c) Para mantenimiento de suspensión (MSs¹): Medio base + 5 mg de 2-ip-NaOH, para la 1^a corrida + 2 mg de 2-4D-HCl, para la 2^a corrida.
-

5. 2. Inducción y mantenimiento de suspensiones

En la estimación del tamaño de inóculo se usó un diseño unifactorial de efectos fijos, para las estimaciones de crecimiento, variación de biomasa y azúcares totales, se utilizó el unifactorial con efectos aleatorios (Montgomery, 1991) realizando 1 réplica por cada tipo de suspensión (A y B). Por último, se hicieron dos réplicas para la cuntificación de azúcares totales. Los datos estadísticos y los análisis de varianza se reseñan en los Anexos. Es importante mencionar que, debido a la escasez del material vegetal, no fué posible una metodología de replicación adecuada para todas las estimaciones.

5. 2. 1. Selección de callo

Son tres los criterios para determinar la calidad del callo de resiembra:

a) Grado de friabilidad.- En esta característica se observaron tres niveles:

- Callo duro, no se fragmenta al contacto del bisturí
- Callo que se fragmenta al contacto del bisturí
- Callo que se fragmenta por sí mismo

b) Grado de oxidación.- Aquí también se trata de tres niveles:

- Callo translúcido, presentando coloración blanca, verdosa ó ambas
- Callo opaco, con coloración amarillenta o arenosa
- Callo opaco, con coloración marrón o negra

c) Ausencia de brotes.- En lo posible, se busca y usa material sin brotes.

5. 2. 2. Medio de cultivo y combinación de RCV para la inducción

En las dos corridas experimentales para lograr la inducción, se usó el medio MSs⁰ derivado del diseñado por Murashige y Skoog (1962) (Gamborg y Phillips, 1995) para mantenimiento de callo de peyote (tabla 4), pero sin agar ni carbono activado, ya que se trata de un medio líquido. En la primera corrida, la concentración de sacarosa fué de 3% (30g/L) una relación carbono/nitrógeno ($R_{C/N}$) = 15. En la segunda, se agregó una concentración doble del recurso carbón (6 % o 60 g de sacarosa/L), duplicando también la de antioxidantes (ácidos ascórbico y cítrico) y la $R_{C/N}$ = 30. En ambas corridas de inducción se utilizó la citocinina 2-ip como fitorregulador (tabla11, anexo 5).

5. 2. 3. Condiciones del cultivo de inducción

Para determinar las condiciones ambientales del cultivo, se consideraron como criterio de selección los datos de su micropropagación por callo, así como los de la literatura (Tabla 5), seleccionando: temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; 16 h. de luz por 8 de oscuridad; pH de 5.8 y agitación de 100 rpm. Para fijar el parámetro de aireación, se ajustó el volumen del medio en 30 mL, es decir, entre el 20 y 25% con respecto al volumen total del recipiente (Pérez y Ramírez, 1999), (tabla 11, anexo 5).

5. 2. 4. Estimación del tamaño de inóculo

En la inducción se consideró un tamaño de inóculo por relación en porcentaje de peso/volumen (p/v); dicha relación se hizo oscilar entre el 5 y 20% (Pérez y Ramírez, 1999; Zhong y Yoshida, 1995; Gómez y Goma, 1986). En las corridas de inducción, se probaron las proporciones de inóculo de 2.5, 5, 10 y 15% p/v, (tabla 11, anexo 5).

En ambas se graficó tamaño de inóculo vs densidad óptica a 660 nm; dicho método se eligió debido al lento crecimiento de la especie, y como medición indirecta de biomasa a partir del material suspendido; las lecturas fueron tomadas a los 15 días de transcurrido el inicio de cada corrida, y en cada una de ellas se sembraron siete matraces de 125 mL por cada proporción de inóculo, es decir, de 0.75, 1.5, 3 y 4.5 g respectivamente.

Tabla 5. Tabla comparativa de medios, condiciones de cultivo y combinación de fitoreguladores, para el establecimiento de suspensiones celulares.

Medio	Concentración Sacarosa (g/L)	Relación C/N	Agitación (rpm)	Temp. (°C)	pH	RCV	Referencia
T ₁	30	14.45	100	25 ± 2	5.8*	2,4-D + K	Rojas y col., 1999
	40	19.27	"	"			
	60	28.91	"	"			
NN	20	28.57	110	25 ± 2	5.8*	2,4-D + K	Rojas y col., 1999
MSA ₁	20	19.23	100	25	5.8	2,4-D + K	Chatuverdi y Srivstava, 1976
MS	30	31.85	90	25	5.8	2,4-D + K 2,4-D + AIA	Madhusudhan 1995
LS	30	14.45	75	25	5.8	2,4-D + 6-BA	Zhong y Yoshida, 1995

*pH ajustado después de la esterilización del medio

5. 2. 5. Fragmentación de callo

Dada la naturaleza rígida y poco friable del callo, así como a la presencia relativamente abundante de brotes, inicialmente se realizaron cortes con bisturí del número 22. Después, la fragmentación se realizó por macerado y tratamiento enzimático del material calloso, con el propósito que hiciera viable la elaboración de agregados multicelulares de tamaño uniforme, con el objeto de estabilizar fisicoquímicamente a la suspensión. Este método se resume en la figura 16. Finalmente, y para lograr en definitiva a la suspensión, el callo se fragmentó por medio de un homogenizador electromecánico Biospec modelo 133/1281-0, (figura 17).

5. 2. 6. Selección de medios de cultivo y combinación de fitorreguladores para el mantenimiento de la suspensión.

Se llevaron a cabo también dos corridas, usándose el medio de cultivo MSs¹ (tabla 4). Para la primera corrida, el medio para el mantenimiento es adicionado con 2-ip y ajustada la $R_{C/N} = 20$, ya que se redujo la concentración de sacarosa 39.90 g/L; de esta manera se prepararon tres suspensiones (A, B, y C) (tabla 12, anexo 5), siguiendo las técnicas de fragmentado de la figura 16. La segunda corrida se elaboró según la técnica de fragmentado expuesta en la figura 17, adicionando además de la citocinina citada, la auxina 2,4-D. Se ajusta la $R_{C/N}$ a 17.62, pues la concentración de sacarosa disminuyó hasta 35g/L, reduciéndose también la de antioxidantes a su valor base (tabla 9). Con ello se elaboró la suspensión D, de la que se obtienen los parámetros cinéticos de crecimiento (tabla 12, anexo 5)

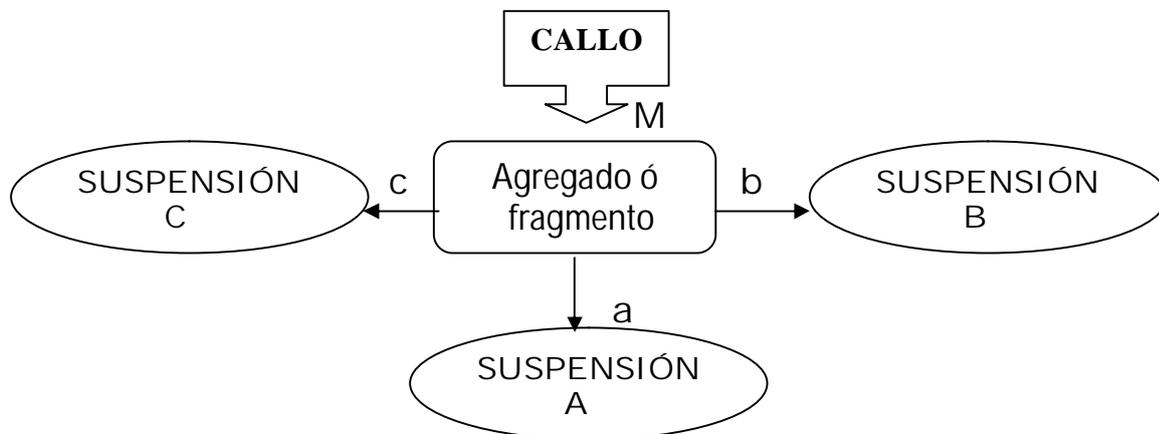
5. 2. 7. Condiciones del cultivo de mantenimiento y resiembras

Para la primera corrida de mantenimiento, fueron las mismas que para la inducción: inóculo del 12% en relación p/v (3.7g de callo en 30 mL de medio); pH de 5.8; 16 horas de luz por 8 de oscuridad; 100 rpm de agitación y 25 ± 2 °C de temperatura. Las resiembras se efectuaron sólo en la primera corrida y para las tres suspensiones (A, B y C), de acuerdo a la tabla 6. Todas ellas se efectuaron en matraces de 125 mL (7 matraces para cada una de las 4 lecturas de cada suspensión), pero la última se hizo exclusivamente para las suspensiones A y B, utilizando para esta ocasión y solo para la suspensión B, un tamiz de acero inoxidable marca Mont-Inox del No. 18, hecho en México, y con 10^3 μm de abertura de malla. Para estas suspensiones se midieron los pesos fresco y seco, representando gráficamente su variación con respecto al tiempo.

El peso seco se obtuvo del filtrado obtenido dentro de la campana de esterilización, el cual se introdujo en cajas de Petri estériles para deshidratarlo en un horno a 35°C y durante 96 horas. La biomasa total se graficó contra el tiempo, restando al valor del peso seco el del papel filtro previamente tarado.

En la segunda corrida no hubo resiembras, midiéndose el peso seco y realizando la gráfica de cinética correspondiente. Para este caso, se usaron 28 matraces de 125 mL con 12% de inóculo en relación p/v, es decir, 4 matraces para cada una de las siete lecturas (0, 8, 16, 24, 32, 40 y 45 días). En total fueron 28 matraces con 30 mL y 3.75 g de callo cada uno de ellos.

Por último, en la preparación de todos los medios, se emplearon soluciones stock concentradas 10x para los macronutrientes y 100x para los micronutrientes y vitaminas del MS, todas ellas conservadas en refrigeración a 4°C; además, el agua desionizada empleada en la preparación de soluciones y medios de cultivo, fué tratada en un purificador Barnstead Easy Pure L F, fabricado por Barnstead Thermolyne en Dubuque, Iowa, E U A.



M = Corte y compresión mecánica (maceración).

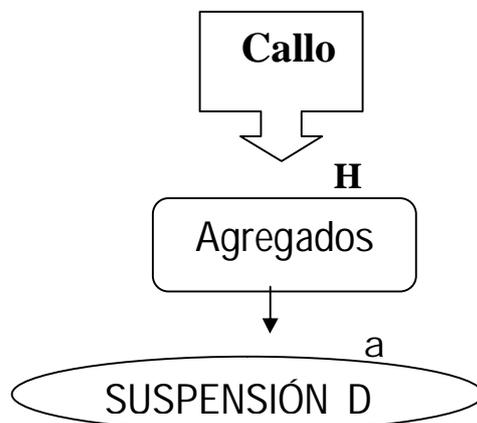
a = Con decantación pero sin tamizado. Tratamiento con celulasa + macerozima al 0.1 y 0.5%, respectivamente* (Hurtado y Merino, 2000).

b = Con decantación y tamizado. Se integra la misma solución enzimática anterior.

c = Sin decantación ni tamizado. Se integra la misma solución enzimática anterior.

* La solución enzimática se integra a las tres suspensiones, mediante filtro Millipore y membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm .

Figura 16. Técnica inicial de fragmentación de callo.



H = Homogeneizado de callo con homogenizador Biospec

a = Tratamiento con celulasa + macerozima al 0.1 y 0.5% respectivamente, solución incorporada usando un filtro Millipore y membrana de 0.22 μm

Figura 17. Técnica de fragmentación de callo.

Tabla 6. Resiembras por tipo de suspensión

Suspensión	Resiembras	Periodo (Días)	Edad * (Días)
A	3	5, 7, 10	43
B	1	8	35
C	1	10	50

* A partir de la última resiembra

5. 2. 8. Microscopía de agregados celulares en suspensión

Se efectuaron observaciones microscópicas, de los agregados de dos tipos de suspensiones (A y B), de la primera corrida de mantenimiento. Para ello, se usó un microscopio óptico de contraste de fases marca Olympus CH30 R F-100, fabricado en Japón por Olympus Optical CO., LTD, y película Kodak de 35 mm en ASA 200 y 400.

5. 3. Crecimiento de suspensiones celulares

5. 3. 1. Índice de crecimiento

Se determinó usando la ecuación siguiente (San Miguel y col., 2003):

$$\text{I.C. \%} = [(P_{s_f} - P_{s_i}) / P_{s_i}] \times 100$$

Donde:

I.C. % = Índice de crecimiento porcentual

P_{s_f} = Peso seco final

P_{s_i} = Peso seco inicial

Sólo se calculó para la suspensión B de la 1^a corrida de mantenimiento. Para la obtención del peso seco inicial, se filtró el material de 7 matraces de 125 mL preparados para este fin. El filtrado se realizó al inicio de la última resiembra, deshidratándose a 35°C por 96 h.

5. 3. 2. Parámetros cinéticos

La velocidad específica de crecimiento puede expresarse como: $\mu = (t^{-1}) [\ln (X_n / X_{n-1})]$, expresada en días⁻¹. Donde X es el peso seco de callos o suspensiones. Tomando la ecuación y graficando $\ln (X_n / X_{n-1})$ contra tiempo, se obtendrá una línea recta ($\mu > 0$) durante la etapa de crecimiento exponencial. La pendiente de la recta se usó para obtener la velocidad específica de crecimiento (μ).

El tiempo de duplicación fue calculado con base a la μ obtenida en la cinética de crecimiento celular, empleando la fórmula $td = \ln 2/\mu$ y expresándose en días. Ecuaciones equivalentes para caracterizar cinética de crecimiento son utilizadas por autores como Bailey y Ollis (1986) y Quintero Ramirez (1981). Estos parámetros fueron calculados para la suspensión D de mantenimiento.

5. 3. 3. Determinación de azúcares totales

Se llevó a cabo empleando el método del Fenol-Sulfúrico según Timell y col. (1956): a 1 mL de muestra previamente diluida, se le adicionan 1mL de fenol al 5% + 5 mL de H₂SO₄ concentrado, colocándolo cuidadosamente por las paredes y con agitación. Después de 20 min de reacción la absorbancia es leída a 480 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Beckman, Fullerton, E U A). La curva de calibración se realizó a partir de soluciones de sacarosa de distintas concentraciones (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 mg/mL). La ecuación de la curva de calibración fue $c = 0.016 b + 0.009$, donde **c** es la absorbancia leída a 480 nm, y **b** la concentración de sacarosa en mg/mL (Anexo 3).

5. 4. Alcaloides libres

5. 4. 1. Alcaloides libres en cultivos de callo

El cultivo de callo para el aislamiento de alcaloides libres fue iniciado a partir de segmentos de costilla, que fueron desinfectados en cloro comercial (Cloralex) al 10%, lavados en agua esterilizada y cultivados en medio MS adicionado con sacarosa (3.0%), AIA (2.0 mg/L), Kin (4.0 mg/L) y agar (0.8%). La incubación se llevo a cabo a 25°C con un fotoperiodo de 16 h de iluminación y 8 de oscuridad. Después de tres subcultivos se procedió a la extracción de alcaloides a partir de 13.9 g de callo liofilizado (Liofilizadora Labconco, EUA), que fue sometido a una extracción con metanol en Soxhlet por 48 – 72 h, el disolvente se evaporo a sequedad en rotovapor. El extracto se disolvió en una solución de ácido sulfúrico al 2% y después se realizaron lavados consecutivos con hexano (3 x 100); se basificó con NaHCO₃ hasta alcanzar un pH entre 8 y 9, seguida de una extracción con diclorometano (3 x 100) y se secó con Na₂SO₄ para evaporar el disolvente libre de humedad, obteniéndose 54.6 mg de un residuo conteniendo los alcaloides libres que se disolvió en acetona y se aplicó en una placa preparativa de 20 x 20 cm de 2.0 mm de espesor. Esta se colocó en una cámara cromatográfica con un sistema de elusión de diclorometano – etanol 9: 1; la placa se reveló con luz ultravioleta y se extrajo la banda con Rf de 0.9 (Figura 18) (Lechuga y col., 2000).

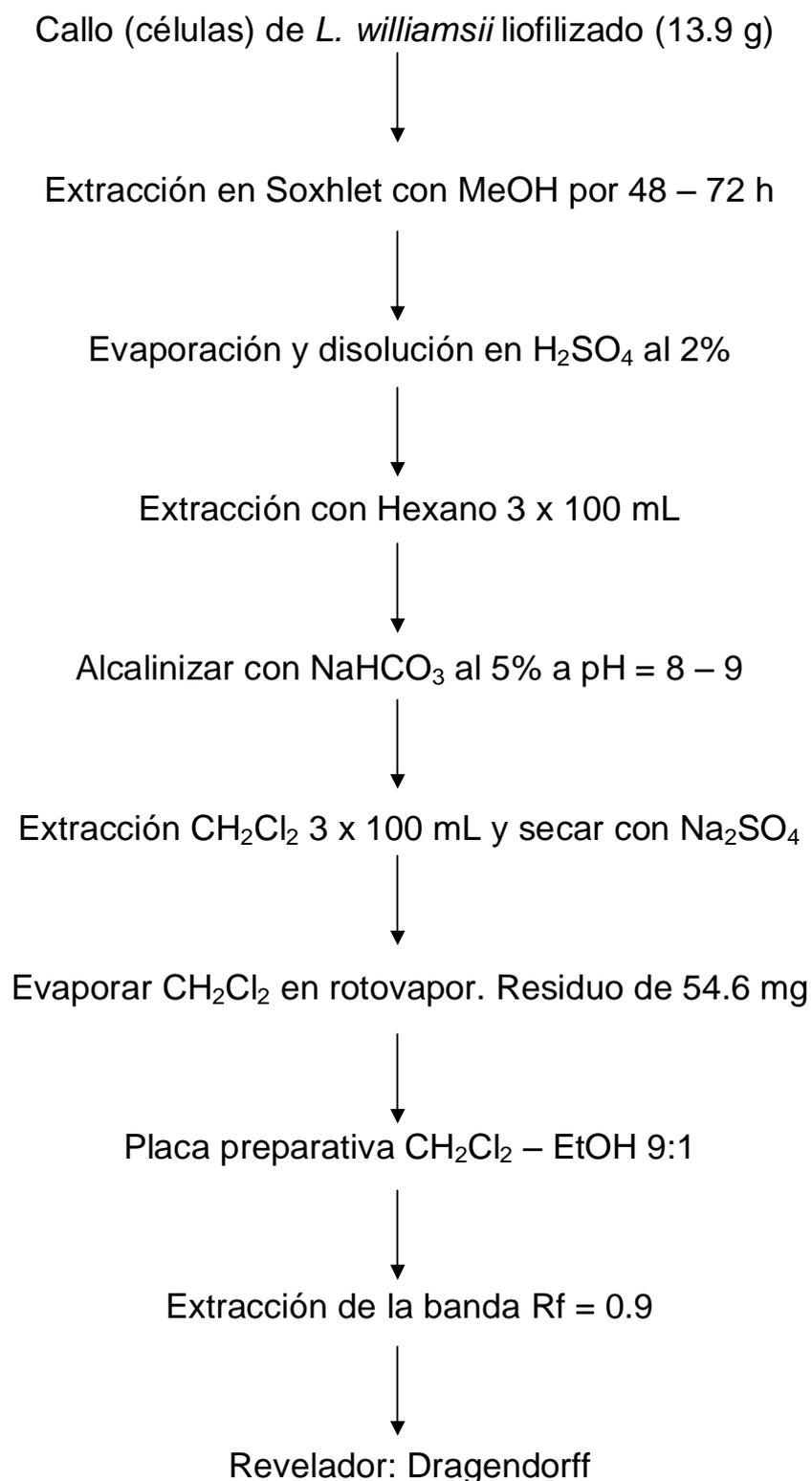


Figura 18. Procedimiento de extracción de los alcaloides libres de los cultivos de callo y de células en suspensión de *L. williamsii* (Lechuga y col., 2000)

5. 4. 2. Alkaloides libres en cultivo de células en suspensión

Se utilizó la biomasa en peso seco (5 g) aislada del cultivo de la suspensión D, para la determinación de los alcaloides libres, siguiendo la misma metodología que para el cultivo de callo, obteniéndose 12. 5 mg de residuo.

5. 4. 3. Cromatografía en capa fina de los alcaloides libres

Fueron empleados cromatofolios Al de silicagel 60 F₂₅₄ para cromatografía en capa fina con un espesor se capa de 0.2 mm (Art. 5554 Merck). La purificación del extracto se llevó a cabo con placas de silicagel 60 F₂₅₄ para cromatografía preparativa de 20 x 20 cm con un espesor de capa de 2.0 mm (Art. 5717 Merck). Se usó como eluyente una mezcla de diclorometano – etanol (9:1) y como revelador el reactivo de Dragendorff.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. 1. Fragmentación de material calloso y oxidación en suspensiones iniciales.

El material calloso para inducir las suspensiones celulares, como se muestra en la tabla 3, se mantenía con una formulación de fitorreguladores de 2-ip exclusivamente, circunstancia que favorece la aparición de brotes con su consecuente diferenciación y organogénesis. Establecida esta condición general del material, se decidió proceder a la fragmentación mecánica del mismo, proceso que originó severos problemas de turbidez y oxidación, en las suspensiones iniciales de inducción. En la figura 19 se muestran dos matraces correspondientes al inóculo del 15% (4.5 g). Como puede observarse, existe una marcada diferencia en las condiciones de ambas suspensiones, pues el matraz C1^a presenta claros signos de material necrosado, con una coloración parda-rojiza y/o negra, que también es notable como coloración de la turbidez presente en esta suspensión.

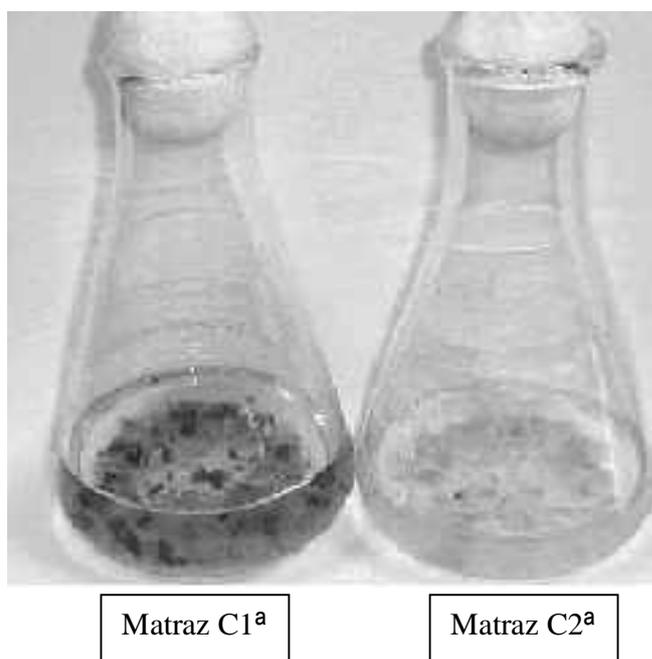


Figura 19. Comparación entre suspensiones de inducción. El matraz C1^a muestra claros signos de necrosis y oxidación.

El matraz C2^a, como se ve en la figura citada, tiene una suspensión casi sin turbidez, muy transparente, y con solo algunos fragmentos que muestran relativamente escasa necrosis, resultando condiciones fisicoquímicas más favorables o adecuadas para el cultivo celular. Esto se logró por la duplicación de la concentración del recurso carbono (30 a 60 g de sacarosa /L) y la de antioxidantes (de 100 a 200 mg de ácido cítrico /L y de 50 a 100 mg de ácido ascórbico /L) en el medio de cultivo, selección motivada por ser ácidos debiles y buenos antioxidantes. El aumento en la concentración de estas sustancias, redujo la actividad de agua y la concentración de oxígeno disponible, reduciendo temporalmente con ello, la producción y oxidación de metabolito, aunque para una estimación más fina del fenómeno de oxidación, sería útil la aplicación de la técnica de cuantificación de fenólicos totales, desarrollada por Swain y Hillis (1959).

La comparación entre ambos tipos de suspensiones, hizo evidente la necesidad de lograr mayor eficiencia en la fragmentación del callo, con el fin de producir agregados celulares finos, acordes a las necesidades de intercambio de agua, gases y nutrientes entre el material vegetal y su medio. Fué de esta manera que se desarrollaron las técnicas de fragmentación, con tratamiento enzimático y filtración, reseñada en la figura 16, y la del uso del homogenizador presentada en la figura 17.

El empleo inicial del tamiz y, posteriormente del homogenizador, permitieron la producción de agregados celulares finos o pequeños (aproximadamente de 1mm³), eliminando los problemas de turbidez y oxidación por un lado, y reduciendo las concentraciones del recurso carbono en casi 40% (de 60 a 35 g de sacarosa /L) y la de antioxidantes a su concentración base (ver tabla 9, Anexo 1).

Sin embargo, la fragmentación del callo originó ciertos inconvenientes, pues la agresividad de las técnicas empleadas sobre el material, dió como resultado una suspensión altamente estresada con agregados celulares mixtos, es decir, con células completas y de protoplastos sin pared vegetal, condición que favoreció la contaminación de los cultivos (aproximadamente del 38%).

6. 2. Tamaño del inóculo

Como se puede apreciar en la gráfica de la figura 20, correspondiente a la determinación del nivel de inóculo, el más adecuado para la inducción del cultivo es el de 15% (4.5 g de callo). Sin embargo, para este punto en especial y para esta suspensión existen problemas de turbidez y oxidación, como se vera más adelante. Los resultados de la gráfica en la figura 21, corresponden a la 2^a corrida de inducción, y muestran también que el nivel de inóculo más adecuado es el del 15%, aunque en este caso los de 10 y 12.5%, se aproximaron a aquel en su valor promedio. En este sentido, Gomez y Goma (1986) exponen que, en general, a valores iniciales más altos de inóculo se presenta un crecimiento y consumo de recursos más rápido, aunque estos resultados corresponden al proceso de fermentación acidogénica, realizada por el inóculo de una población heterogénea y mixta de microorganismos.

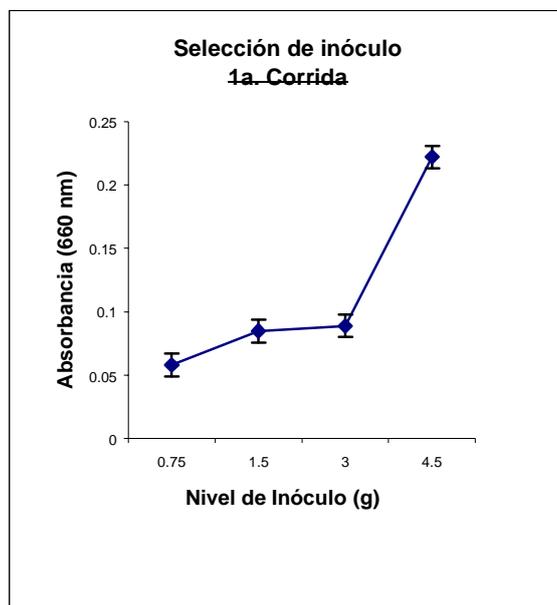


Figura 20. Gráfica que muestra la selección del nivel de inóculo (1ª corrida).

Nótese como el punto de 4.5 g, rompe la tendencia de los tres anteriores.

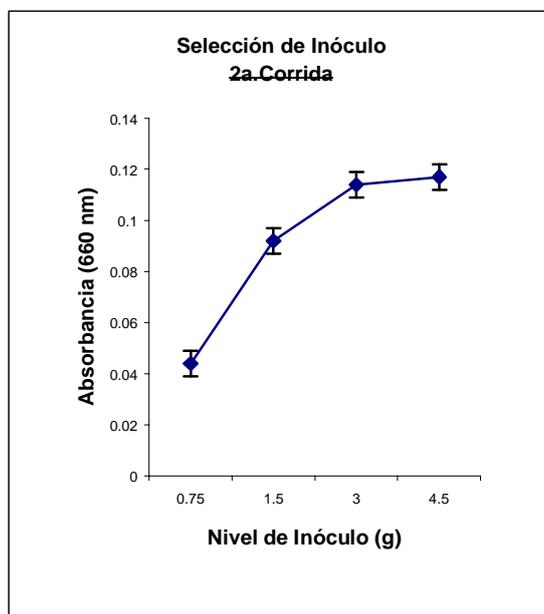


Figura 21. Gráfica que muestra la selección del nivel de inóculo (2ª corrida).

Nótese que los niveles del 10 y 15 % (3 y 4.5 g) son muy cercanos.

Comparando las gráficas de ambas corridas, es evidente que en la 1ª (figura 20), el intervalo de valores de la absorbancia es mucho más amplio que el de la figura 21 (de 0.058 a 0.222 y de 0.042 a 0.117, respectivamente). Esta discrepancia, considerando la tendencia de los tres primeros puntos en ambas corridas, se debe al punto atípico correspondiente al nivel de inóculo del 15 % (15%) de la 1ª corrida, cuya diferencia con respecto al punto precedente es de hasta 13 décimas. Este valor tan alto de absorbancia se debe a la turbidez y oxidación tan intensas de los fragmentos de callo en ésta .

6. 3. Micrografías de agregados celulares en suspensión

El empleo del microscopio revela algunas de las características de los fragmentos contenidos en las suspensiones A, B y C. En la figura 22, cada fotografía esta identificada con un número (del 1 al 6) y con una letra (**A**, **B** o **C**), además de exponer entre paréntesis el aumento de cada imagen; el número corresponde al de cada fotografía y la letra al tipo de suspensión En estas pueden observarse estructuras tales como:

Las fotografías 1 **A** y 5 **C** muestran los agregados altamente fibrosos obtenidos del material calloso, revelando a nivel microscópico la escasa o nula friabilidad de dicho material.

Las imágenes numeradas como 2 y 3 **C**, permiten observar algunas de estas fibras extendidas, así como estructuras globosas al parecer provenientes de un parénquima ya diferenciado. La foto 4 **B** expone la vista de algunos agregados celulares, mientras que la 6 **B** ofrece la imagen de estructuras de crecimiento secundario de tejido de conducción (posiblemente floema).

La diferenciación de estructuras expuesta en las imágenes, revela que el material calloso empleado tal vez no era el más adecuado para los propósitos del cultivo de la suspensión, y que posiblemente aquel cultivado con la combinación de fitorreguladores Kin y AIA si lo sería, pues presentaría menos brotes que el que contenía 2ip (tabla 3) (Buendía, 2000).

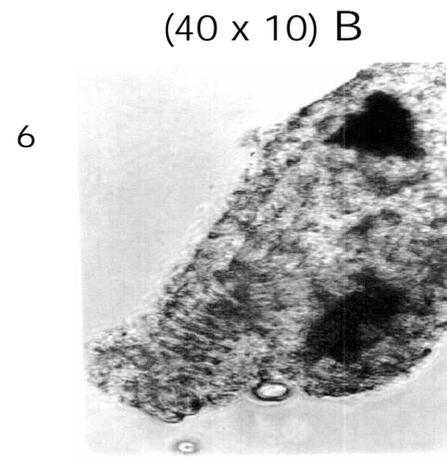
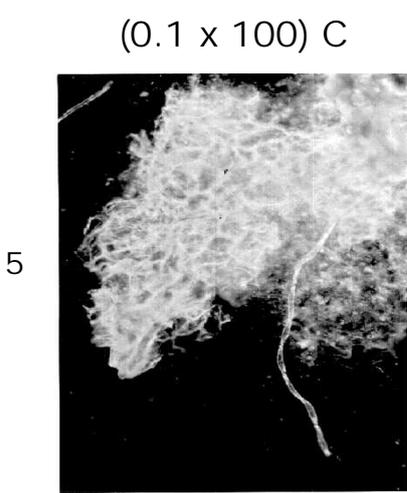
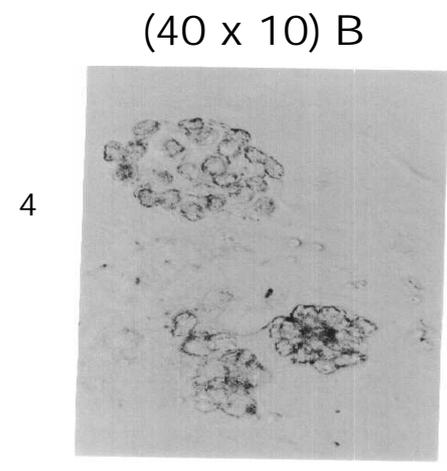
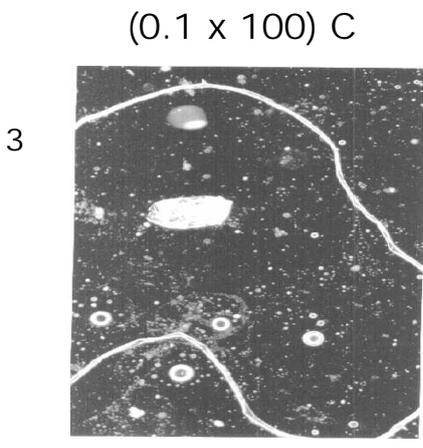
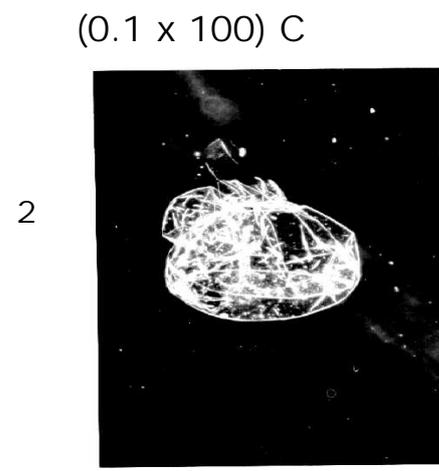
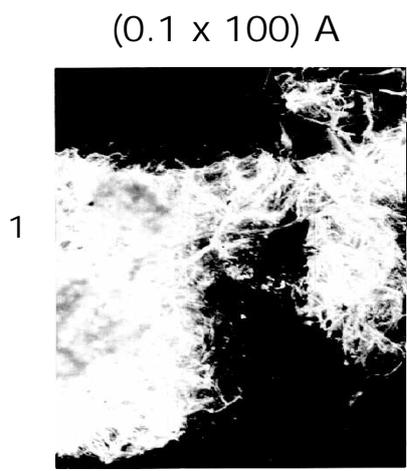


Figura 22. Vistas microscópicas de los agregados celulares de las suspensiones de mantenimiento (A, B y C). Descripción en el texto.

6. 4. Peso fresco, peso seco y crecimiento de biomasa.

Con respecto a la 1^a corrida de mantenimiento (suspensiones A, B y C), esta última suspensión, por su tratamiento de fragmentación equivalente al usado para la inducción, presenta como resultado los mismos inconvenientes ya señalados (necrosis de material vegetal y oxidación de metabolitos). Sin embargo, fue útil como testigo en su comparación con las suspensiones A y B, que se elaboraron con las técnicas de fragmentación expuestas en la figura 16. Como se observa en la figura 23, la suspensión A (decantada pero no tamizada) aún tiene algunos fragmentos necrosados, mientras que la B (decantada y tamizada) se encuentra limpia de oxidación y turbidez.

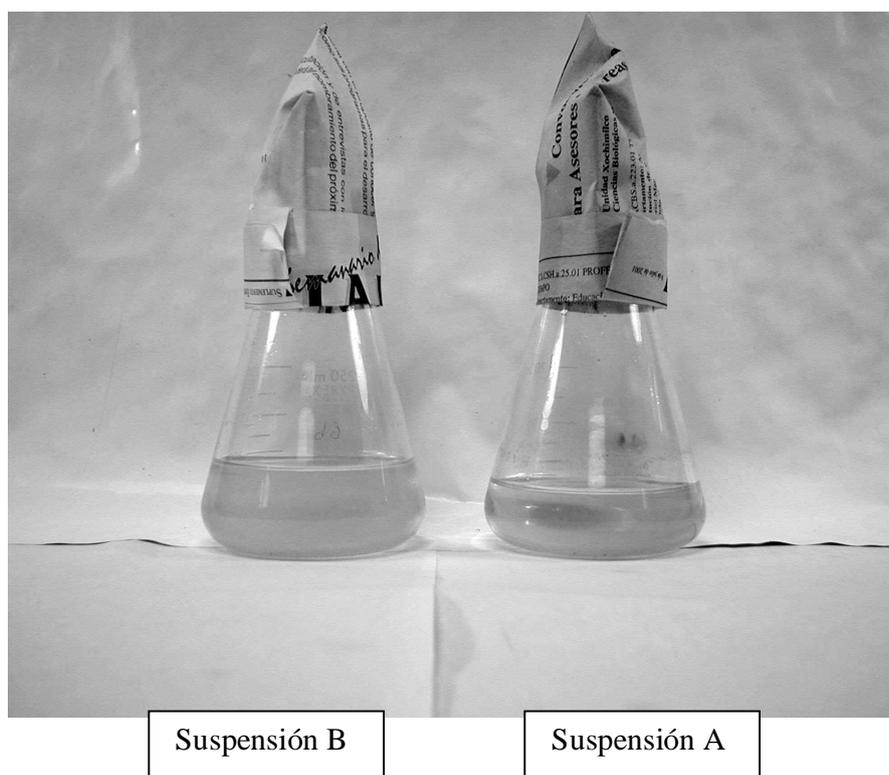


Figura 23. Comparación entre el material vegetal contenido en las suspensiones de mantenimiento A y B.

Tal parece que el empleo del tamiz, con el propósito de uniformizar el tamaño de los fragmentos o agregados a 1mm^3 , resuelve en gran medida las condiciones adecuadas para el cultivo. Ya que la suspensión C no resultó viable, se realizaron estimaciones de peso fresco y peso seco de las suspensiones A y B (figuras 24 y 25), y de cantidad total de biomasa en las mismas, obteniendo las gráficas de las figuras 26 y 27, las que muestran que el peso seco del filtrado en las suspensiones A y B, permanece relativamente constante con el transcurso del tiempo, pues se observa que la biomasa fluctúa en un rango muy pequeño (de 10 a 20 mg) con el transcurso del tiempo.

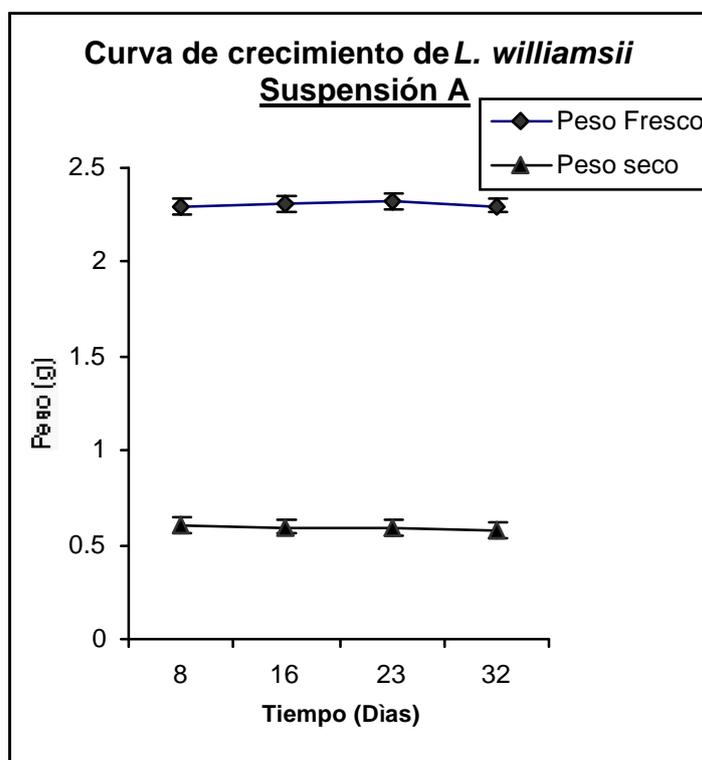


Figura 24. Curva de crecimiento de *L. williamsii* en la suspensión A de mantenimiento. Como se observa, no existe un incremento significativo de biomasa, ya que el peso (fresco y seco) permanece constante con el transcurso del tiempo.

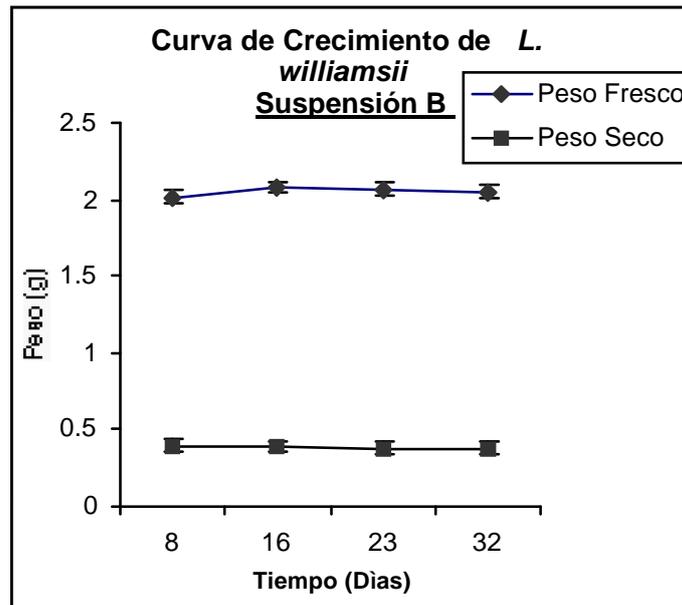


Figura 25. Curva de crecimiento de *L. williamsii* en la suspensión B de mantenimiento. Lo mismo que la anterior: no se aprecia un incremento significativo en el peso fresco y seco de la suspensión al paso del tiempo.

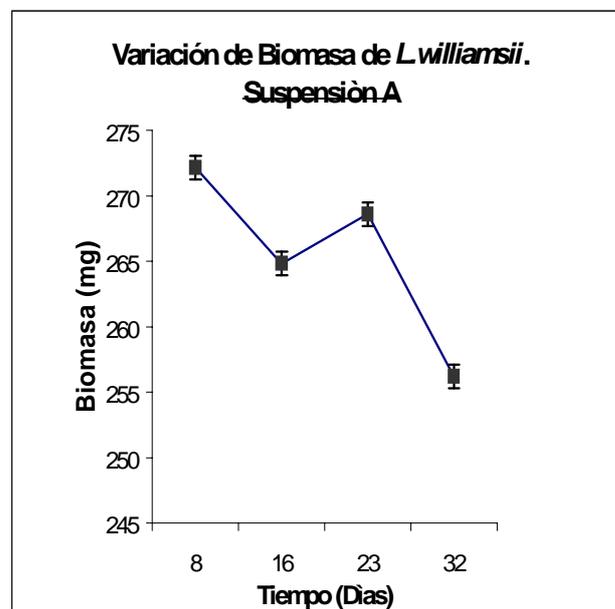


Figura 26. Variación de biomasa en la suspensión A de mantenimiento. La fluctuación de biomasa se realiza en un rango muy estrecho.

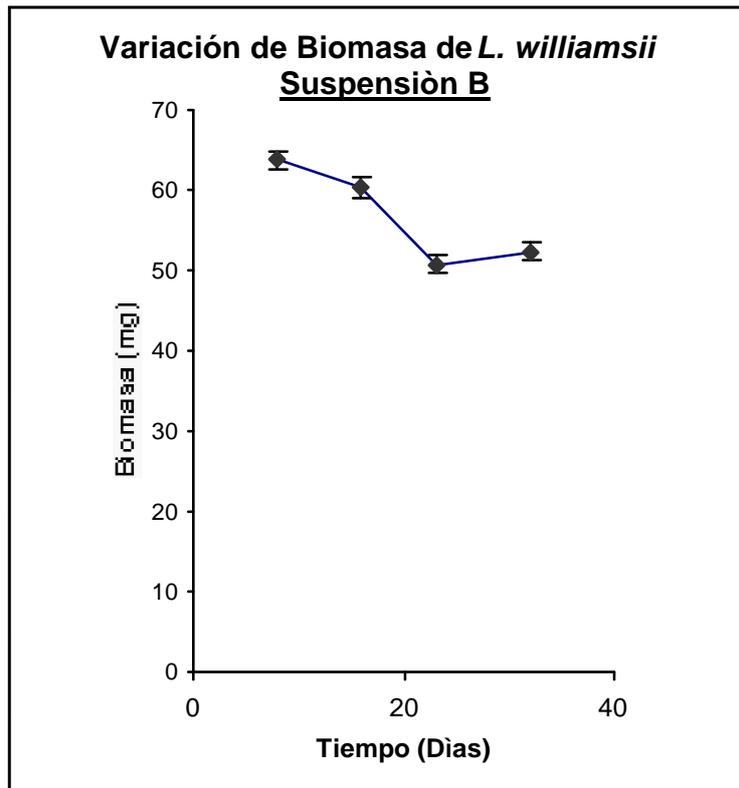


Figura 27. Variación de biomasa en la suspensión B de mantenimiento. Al igual que la anterior, la fluctuación de biomasa se realiza en un rango pequeño.

Los resultados mostrados en estas gráficas, sugieren que el crecimiento del material vegetal de las suspensiones es muy lento, lo que conduce a pensar que el decantado y/o tamizado del material vegetal, reduce el nivel de inóculo necesario, influyendo en la velocidad de la cinética de crecimiento o, considerando otra alternativa, posiblemente es necesaria la adición de un nuevo RCV tal como una auxina que, en combinación con la citosina ya presente, modifique e incremente el crecimiento de los agregados en suspensión.

6. 5. Índice porcentual de variación de biomasa de la suspensión de mantenimiento

Este parámetro se calculó para el peso seco de la suspensión B de mantenimiento, resultando la gráfica de la figura 28 la que, en congruencia con los datos y tendencias expuestas en las gráficas anteriores, también muestra un índice de crecimiento porcentual muy pequeño, no superior al 9 %, y el cual decrece con el tiempo hasta el 5%.

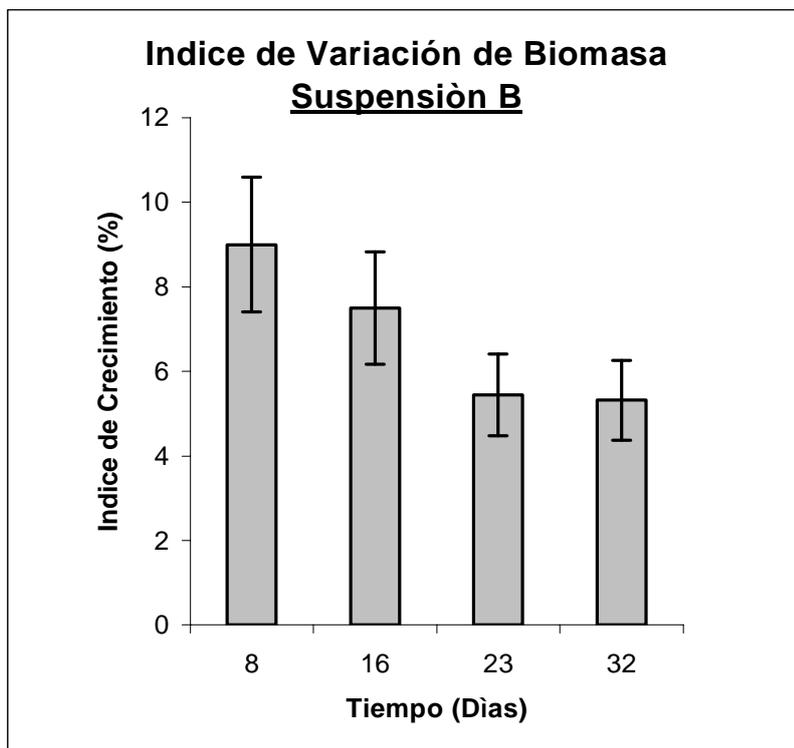


Figura 28. Índice porcentual de variación de biomasa de la suspensión B de mantenimiento.

Ya que el índice porcentual de crecimiento decrece, confirmando la tendencia ya descrita, se decidió agregar el RCV 2, 4-D a la segunda corrida de mantenimiento, elaborándose la suspensión D.

6. 6. Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación.

Estos parámetros se midieron para la suspensión D de mantenimiento, con una relación auxina/citocinina de 1 a 2.5. Aunque bien es cierto que la actividad auxínica del 2, 4-D inhibe la producción de alcaloides, y que además es la auxina sintética con mayor tiempo de permanencia en la célula antes de su degradación con riesgo de provocar intoxicación, se eligió porque su mayor permanencia podía asegurar, en interacción con la citocinina correspondiente (en este caso el 2-ip), una firme y continua división celular. La gráfica de la figura 29 presenta la curva de crecimiento del peso seco de la suspensión D. Es de importancia mencionar que durante el tiempo de crecimiento en esta suspensión, los agregados celulares mantuvieron un tamaño relativamente uniforme, de acuerdo al obtenido por la técnica de homogenización.

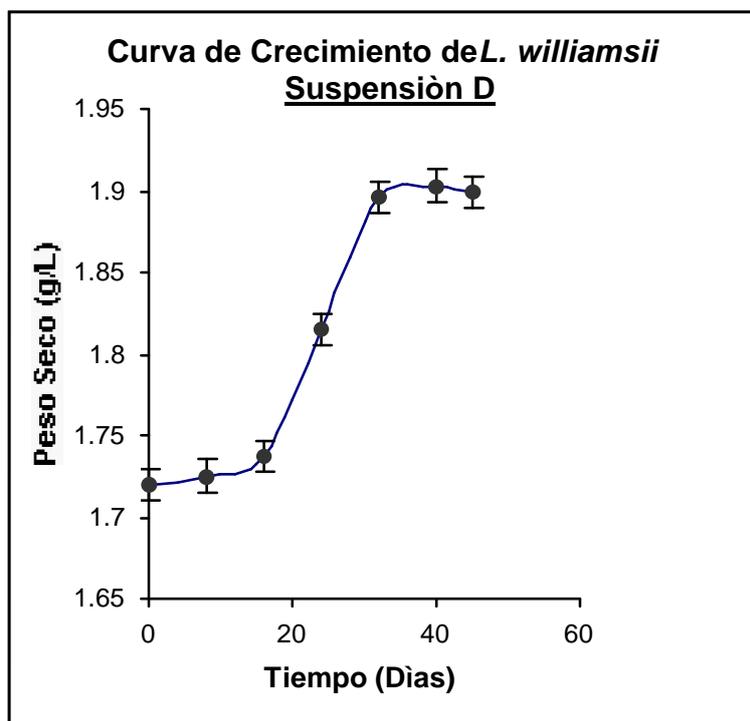


Figura 29. Curva de crecimiento de *L. williamsii* en la suspensión D.

Analizando la gráfica anterior, de la curva puede señalarse lo siguiente: la fase lag o de adaptación dura aproximadamente 8 días, la exponencial va de los 8 a 16, la logarítmica desde los 16 hasta los 32 días, y la estacionaria transcurre de los 32 a los 40 días. Los parámetros cinéticos que se calcularon para la curva de esta suspensión (D), son: velocidad específica de crecimiento (μ) = 5.4×10^{-3} días⁻¹; tiempo de duplicación (td) = 126.8 días.

Como se observa, aún cuando las condiciones fisicoquímicas de la suspensión (homogenización del tamaño de agregado y ausencia de material necrosado y oxidado) sean adecuadas para el mantenimiento de la misma, la cinética de crecimiento todavía no logra establecerse con parámetros adecuados, ya que la velocidad específica aún es muy reducida mientras que el tiempo de duplicación es muy grande. Esta aparente falta de respuesta al crecimiento, del material vegetal en suspensión, puede deberse a factores o consideraciones diversas y complejas, tales como la relación auxina/citocinina, la relación C/N, el tipo y concentración de fitorreguladores así como la adición de sales y nutrientes no considerados (proporción Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ y glucosa, por ejemplo).

6.7. Consumo de azúcares totales

Como se aprecia en la figura 30, la concentración de azúcares totales disminuye con el transcurso del tiempo, indicando un consumo del recurso carbono por el material vegetal de la suspensión. Aparentemente, al inicio de la cinética hay un aumento en la concentración de azúcares totales, dato que no es congruente si se espera un consumo del recurso carbono por parte de los agregados celulares suspendidos. Sin embargo, si se recuerda que aquel recurso está constituido exclusivamente por sacarosa, entonces existe una gran posibilidad de que el punto en cuestión, esté informando acerca de la hidrólisis de este disacárido en glucosa y fructosa, aumentando así la concentración de azúcares totales reducidos.

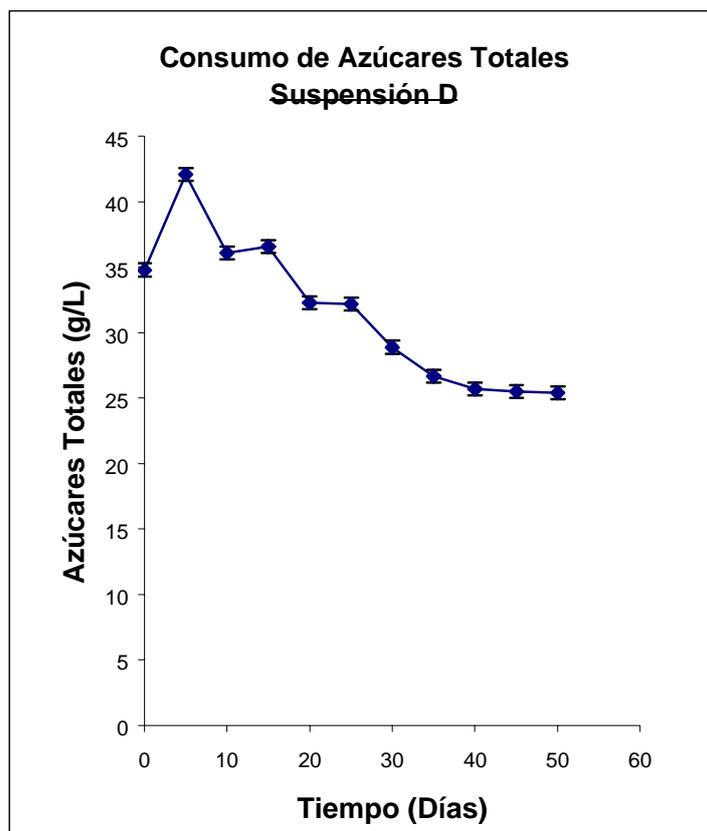


Figura 30. Consumo de azúcares totales por *L. williamsii*

De esta curva es importante también mencionar, que el consumo del recurso es continuo hasta aproximadamente los 40 días, tiempo que, según la duración de la cinética de crecimiento considerada, correspondería al inicio de la fase estacionaria y al posterior establecimiento de la fase de desaceleración, cuyos tiempos concuerdan en esta gráfica (figura 30) con una disminución casi total del consumo de azúcar. Madhusudan (1995) encuentra resultados similares en cultivos de *Capsicum frutescens* y *Daucus carota*.

6. 8. Alcaloides libres en los cultivos

A partir de 13.9 g de callo fresco liofilizado, seguido de un proceso de extracción en medio ácido y con disolventes, se obtuvo una fracción de alcaloides libres (54.6 mg). Esta se sometió a una cromatografía preparativa en capa fina encontrándose una banda con Rf de 0.9 al ser eluida la placa con mezcla de diclorometano – etanol 9:1, la que mostró resultado positivo a alcaloides al ser expuesta al reactivo de Dragendorff. La identidad química de los compuestos detectados se desconoce debido a que no fue posible importar los estándares para su comparación, aunque probablemente una de las manchas se trate de mezcalina, el alcaloide mayoritario en *L. williamsii*, o sus análogos. El hecho de que la banda con Rf de 0.9 revelara con el reactivo de Dragendorff muestra evidencia de que el callo obtenido después de tres subcultivos retiene la capacidad de acumular alcaloides tal como lo hace la planta silvestre (Figura 31).

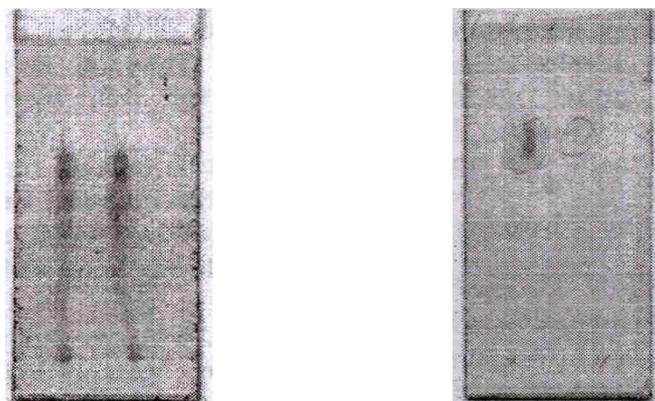


Figura 31. Placas cromatográficas de la fracción de alcaloides libres de callos de *L. williamsii*. La placa de la izquierda muestra la mancha del extracto sin purificar y la placa de la derecha la mancha ($R_f = 0.9$) de los alcaloides libres purificados en placa preparativa.

La cromatografía en capa fina de la fracción de alcaloides libres obtenida de las células de la suspensión celular D liofilizadas (12.5 mg) fue negativa al ser expuesta al reactivo de Dragendorff ya que no se revelaron manchas, lo que puede indicar que el cultivo de células no retenga la capacidad de acumular alcaloides o que la concentración de los alcaloides en la muestra no sea detectable con esta técnica. Aunque no se ha reportado un efecto negativo en la producción de los alcaloides derivados del aminoácido tirosina como la mezcalina, cuando se utiliza en el medio de cultivo a la auxina 2,4-D; sí se ha reportado que la auxina 2,4-D inhibe a la enzima descarboxilasa del triptofano, por ello los alcaloides del tipo indólico no se pueden producir en especies que producen este tipo de alcaloides cuando se establecen cultivos *in vitro* suplementada con 2, 4-D.

7. CONCLUSIONES

Si se considera que para establecer un cultivo de células en suspensión, es necesario lograr como mínimo los requisitos a continuación enlistados:

- Cultivo *in vitro* de células aisladas o en pequeños agregados
- Distribución de aquellos en un medio nutritivo líquido y en constante movimiento
- Homogeneidad relativamente alta
- Alta tasa de división celular

Entonces, del trabajo experimental desarrollado, pueden desprenderse las siguientes conclusiones:

1. El tipo de material calloso empleado, debido a su relativa alta presencia de brotes y escasa friabilidad, no resultó el más adecuado para la inducción y establecimiento de la suspensión. Por tal motivo se recomienda probar el uso de callos establecidos y desarrollados con otros fitorreguladores, tal como Kin (cinetina) y AIA (ácido indolacético), que podrían favorecer la friabilidad del material calloso lo que, posiblemente, permita evitar la fragmentación del material, con la consecuente reducción del riesgo de estrés y contaminación del mismo.

2. Dado el material calloso utilizado, el desarrollo en la eficiencia de la técnica de fragmentación, favorece la inducción y establecimiento de suspensiones que muestran condiciones de cultivo estables, logrando por una parte, la reducción de las altas concentraciones iniciales del recurso carbono y de antioxidantes, y por la otra, la obtención de agregados celulares pequeños de tamaño más uniforme u homogéneo. No obstante, la agresividad de la técnica de fragmentación origina un alto riesgo de contaminación, elevando relativamente sus niveles (30 a 35%).

3. La baja velocidad específica de crecimiento (μ) así como el largo periodo de tiempo de duplicación (td), revelan una baja tasa de división celular, condición que no permite un establecimiento permanente, del cultivo de agregados celulares en suspensión de *L. williamsii*.

Ahora bien, ya que se trata de una especie de cactácea cuyo crecimiento también es muy lento en condiciones naturales, y contemplando el seguimiento experimental del proyecto, se recomiendan las siguientes actividades:

- Cultivar callo de peyote con un mínimo desarrollo de brotes, buscando el propósito de reducir o eliminar el maltrato del material vegetal.
- Probar otras concentraciones de la relación auxina / citosina empleada en este trabajo, y por lo tanto, de más tratamientos de estos fitorreguladores.
- La relación carbono/nitrógeno ($R_{C/N}$) y la de los iones calcio/magnesio (Ca/Mg) puede resultar interesante, pues dado que en condiciones naturales esta relación iónica es de 25, quizá su ajuste durante la formulación del medio aunado a un aumento en la concentración de nitrógeno y fosfatos, estimule el crecimiento de los agregados celulares. Estas acciones, más algunas encaminadas hacia la medición del pH y de viabilidad celular, serían adecuadas para resolver definitivamente, el establecimiento de la suspensión celular.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht, M., y Sandmann, G. Ligth-stimulated carotenoid biosynthesis during transformation of mize etioplast is regulated by increased activity of isopentenyl pyrophosphate isomerase. *Plant Phisyol.* **105**: 529-539, (1994).
- Anderson F. E. Botany of Peyote. *The University Arizona Press.* 31-105 USA, (1980).
- Anguiano, M., Furst, T. P. La endoculturación entre los huicholes. *Instituto Nacional Indigenista (INI).* 6-8 México, (1987).
- Aquino, R., De Feo, V., De Simone, F. Plant metabolites: New compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. *J. Nat. Prod.* **54**: 453-459, (1991).
- Aquino, R., De Simone, F., Pizza, C. Plant metabolites: Structure and *in vitro* antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. *J. Nat. Prod.* **52** (4): 679-685, (1989).
- Bailey, James E., Ollis, David F. Biochemical Engineering Fundamentals. *Mac Graw – Hill Book Company.* 82-83 2ª Edición. Singapur, (1986)
- Bell, A. A., Stipanovic, R. D., Mace, M. E. Genetic manipulation of terpenoid phytoalexins in *Gossypium*: effects on disease resistance. In: Ellis, B. E. Genetic engineering of plant secondary metabolism. *Plenum Press.* New York. (1994).
- Bravo, H.H. Las Cactáceas de México. Vol. 1. *UNAM.* México, (1978).
- Buendía, L.; Lechuga, J. A., García-Suárez Ma. D. y F. Cruz. Reporte preliminar sobre la micropropagación del peyote (*L. Williamsii*). *VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.* P. VI. 7. (2000)
- Constantin, M. J. , R. P. Hencke, K. W. Hughes, y B. V. Conger, eds. Propagation of higher plants through tissue culture. *Env. and Exp. Bot.* **21**: 421-452, (1982).
- Cohen, S. Sychotomimetics agents. *Annu. Rev. Pharmacol.*, **7**: 301, (1967).

- Cooper, J. R.; Bloom, F. E. y Ruth, R. H. The Biochemical Basis of Neuropharmacology . 4ª Edición. *Oxford University Press*. USA, (1982).
- Crawford, N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell*. **7**: 859-868, (1995).
- Chatuverdi, H. C. y Srivastava, S. N. Diosgenin biosynthesis by tuber-callus tissue cultures of *Dioscorea destoidea*. *Lloydia*. **39**: 82-83, (1976).
- Diario Oficial de la Federación. 16 de Mayo de 1994.
- De la Fuente, Muñoz Ramón. Sicología Médica. Editorial Fondo de Cultura Económica. 1ª Edición , XVI Reimpresión. México, (1976).
- Dörnenburg, H. y Knorr D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 674-684, (1995).
- Evans, S.R. Plantas Alucinógenas. Ediciones Científicas Mexicanas. México, (1982).
- Friend, D. Antidrepressant drug therapy. *Clin. Pharmacol. & Therap.*, **6**: 805. (1965).
- Fowler, M. W. Substrate utilization by plant cell cultures. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **32**: 338-345, (1982).
- Gamborg, O. L. y Phillips, G. C. Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods. *Springer Laboratory Manuals*. Alemania, (1995).
- Gomez, J. y Goma, G. Efect of different inoculum levels of heterogeneous mixed culture in acidogenic fermentation. *Biotechnology Letters*, V.8, No. **11**: 833-836. Octubre, (1986).
- Goth, A. Farmacología Médica. Ed. Interamericana. 5ª Edición. México, (1971).
- Hurtado M, V. D. y Merino M. M. A. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas, S. A. México, (2000).
- Kaminek, M. Progress in cytokinin research. *Tiebttech.* **10**: 159-164, (1992).
- Kely, S. S. Biochemical theories of esquizofrenia. *Science*, **129**: 1528-1590. (1969).

- Kishore, G. M. y Shah, D. M. Aminoacid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 627-663, (1988).
- Lane, W. D. Plant manipulation in vitro with hormones. *Proc. Inter. Plant Prop. Soc.* **31**: 101-108, (1982).
- J. A. Lechuga, L. Buendía, J. Orozco, F. Cruz y M. Soto. Detección de metabolitos secundarios en cultivos de callo de *Lophophora williamsii* (Lemaire) Coult. *Simposium Internacional de Biotecnología* Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional (UPIBI-IPN). México, 25-29 Septiembre del 2000. pp **118**
- Luckner, Martin. Secondary Metabolism in microorganism, plants and animals. *Springer-Verlag*. Berlin, (1990).
- Madhusudhan, R. Osmolarity as a measure of growth of plant cells in suspension cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. **17**: 989-991. (1995).
- Matos, M. E. O., Sousa, M. P., Machado, M. I. L. Quinovic acid glycosides from *Guettarda angelica*. *Phytochem.* **25** (6): 1419-1422, (1986).
- Montgomery, Douglas C. Diseño y Análisis de Experimentos. *Grupo Editorial Iberoamérica S. A. de C. V.* México (1991).
- Morrison, R. T. y Boyd, R. N. Química Orgánica. *Addison-Wesley Iberoamericana S. A. U. S. A.* (1987).
- Murashige, T. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Phys.* **25**: 135-166, (1974).
- Murashige, T. y Skoog, F. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497, (1962).
- Myerhoff, B. G. Peyote Hunt. *Ithaca: Cornell University Press*. (1974).

- Nobel, P.S.; Pimienta-Barrios, E. y Hernandez, J. Z. Historical aspects and net CO₂ uptake for cultivated Crassulacean acid metabolism plant in México. *Annals Applied Biology*. **10**: 133-142, (2002).
- Palafox, V. M. La llave del huichol. *Secretaría de Educación Pública (SEP) e Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH)*, pp.12 México, (1978).
- Pasantes, H. ; J. Sanchez y Tapia R. Neurobiología Celular. *Fondo de Cultura Económica (FCE)*. México, (1991).
- Pérez M. B. y Ramirez, M. R. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. *Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA)*. México, (1999).
- Quintero, Rodolfo R. Ingeniería Bioquímica: Teoría y aplicaciones. *Editorial Alhambra*. México, (1981).
- Ramos-Valdivia, A. C., Van der Heijden, R. y Verporte, R. Eliciter-mediated induction of anthraquinone biosynthesis and regulation of isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase activities in cell suspension cultures of Cinchona robusta. *Plant* **203**: 155-161, (1997).
- Rojas, R., Alba, J., Magaña-Plaza I, Cruz, F., y Ramos-Valdivia, A. C. Stimulated production of diosgenin in *Discorea galeottiana* cell suspension cultures by abiotic and biotic factors. *Biotechnology Letters*. **21**: 907-911, (1999).
- Rinkel, M. y Denber, C. B. H. Chemical Concepts of Psychosis. *Mc Dowell/ Obolensky/New York*. USA, (1958).
- Rzedowski, J. *Vegetación de México.* *Editorial Limusa*. México, (1978).

- San Miguel, Ch. R., Soto, H. M., y Ramos-Valdivia, A. C. Production of alkaloids by *in vitro* culture of *Erythrina americana* Miller. *Biotechnology Letters*. **25** (13): 1055-1059. (Julio, 2003).
- Salisbury B.F. y W. C. Ross. Plant Physiology. *Wadsworth Publishing Company*. E. U. (1991).
- Schmidth, A. J., Lee, J. M. y An, G. Media and environmental effects on phenolics production from tobacco cell cultures. *Biotech. Bioeng.* **33**: 1437-1444, (1988).
- Steward, F. C.; M. O. Mapes, A. E. Kent, y R. D. Holstein. Growth and development of cultured plants cells. *Science*. **143**: 20-27, (1964).
- Street, H. E. Plant tissue and cell culture. *Blackwell Scientific Publications*. Oxford, London, (1977).
- Soto, M. C. y Ernesto O. Jauregui. Isotermas extremas e índice de aridez en la República Mexicana. *UNAM*. México, (1978).
- Swain T., y Hillis W. E. The Phenolic Constituents of *Prunus domestica* I. The Quantitative Analysis Constituents. *Journal Scient. Food Agric.* **10**: 63 – 68. (1959).
- Taiz, L., Zeiger, E. Plant Physiology. *The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.* London, (1990).
- Timell, T. E. , Glaudemans, C. P. J., Currie, A. L. Spectrophotometric method for determination of sugars. *Anal. Chem.* **28** (12): 1916-1920, (1956).
- Trendelemburg, U. Supersensitivity and subsensitivity to simpatomimetic amines. *Pharmacol. Rev.* **15**: 225, (1993).
- Tyler, B. Regulation of assimilation of nitrogen compounds. *Annu. Rev. Biochem.* **47**: 1127-1162, (1978).

Umbarger, H. E. Aminoacid biosynthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **47**: 553-606, (1978).

Udenfrien, S. Transactions of the fifth conference. Neuropharmacology. U. S. A. (1960).

Voet, D. y J. G. Voet. Bioquímica. *Ediciones Omega S. A.* Barcelona, (1992).

Winck, M. Plant Biochemistry. *Academic Press*. Londres, (1987).

Wurtman, R. J. Catecholamines. *New England J. Med.* **273**: 637-693, (1995).

Xu, S., Norton, R. A., Crumley, F. G., et al. Comparation of the chromatographic propierties of sterols, select additional steroids and triterpenoids: gravity-flow column liquid chromatography, thin-layer chromatography, gas-liquid chromatography and high-performance liquid chormatography. *J. Chromatgr.* **452**: 377-398. (1988).

Zhong, J. J., y Yoshida T. High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspension for anthocianin production: Effects of sucrose concentration and inoculum size. *Enzime and Microbial Technology.* **17**; 1073-1079, (1995).

9. ANEXOS

ANEXO 1. Medio de cultivo base (MS) (Sigma 5519)

a) Tabla 7. Fórmula de macronutrientes y sacarosa

Compuesto	Concentración (mg/L)
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Sacarosa	30000

b) Tabla 8. Fórmula de micronutrientes

Compuesto	Concentración (mg/L)
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.3
H ₃ BO ₃	6.2

c) Tabla 9. Fórmula vitamínica y de antioxidantes

Compuesto	Concentración (mg/L)
Myo-inositol	10.0
Tiamina-HCl	0.5
Piridoxina-HCl	1.0
Ac. Nicotínico	0.5
Ac. Cítrico	100
Ac. Ascórbico	50

ANEXO 2. Relación Carbono / Nitrógeno ($R_{C/N}$)

De acuerdo a las concentraciones por litro de sacarosa y de macronutrientes nitrogenados, la $R_{C/N}$ de 15.03 (1ª corrida) y 30.07 (2ª corrida) para la inducción de la suspensión, se obtuvieron de la siguiente manera:

a) 1ª corrida:

$$\text{Sacarosa (sac.)} = 30 \text{ g} \quad \text{KNO}_3 = 1.9 \text{ g} \quad \text{NH}_4\text{NO}_3 = 1.65 \text{ g}$$

$$\text{g C} = 30 \text{ g sac.} (144 \text{ g C} / 342 \text{ g sac.}) = \underline{12.63 \text{ g C}}$$

$$\text{g N} = 1.9 \text{ g KNO}_3 (14 \text{ g N} / 101 \text{ g KNO}_3) = 0.263 \text{ g N}$$

$$\text{g N} = 1.65 \text{ g NH}_4\text{NO}_3 (28 \text{ g N} / 80 \text{ g NH}_4\text{NO}_3) = 0.577 \text{ g N}$$

$$\text{g N}_{\text{TOTAL}} = (0.263 + 0.577) = \underline{0.840 \text{ g N}}$$

$$R_{C/N} = 12.63 \text{ g C} / 0.840 \text{ g N} = 15.03$$

b) 2ª corrida:

Dado que la concentración de sacarosa es del doble pero la de nitratos permanece constante, entonces:

$$\text{g C} = 25.26 \text{ g} \quad \text{g N} = 0.840$$

$$R_{C/N} = 25.26 \text{ g C} / 0.840 \text{ g N} = 30.07$$

ANEXO 3. Determinación de la concentración de azúcares totales reducidos.

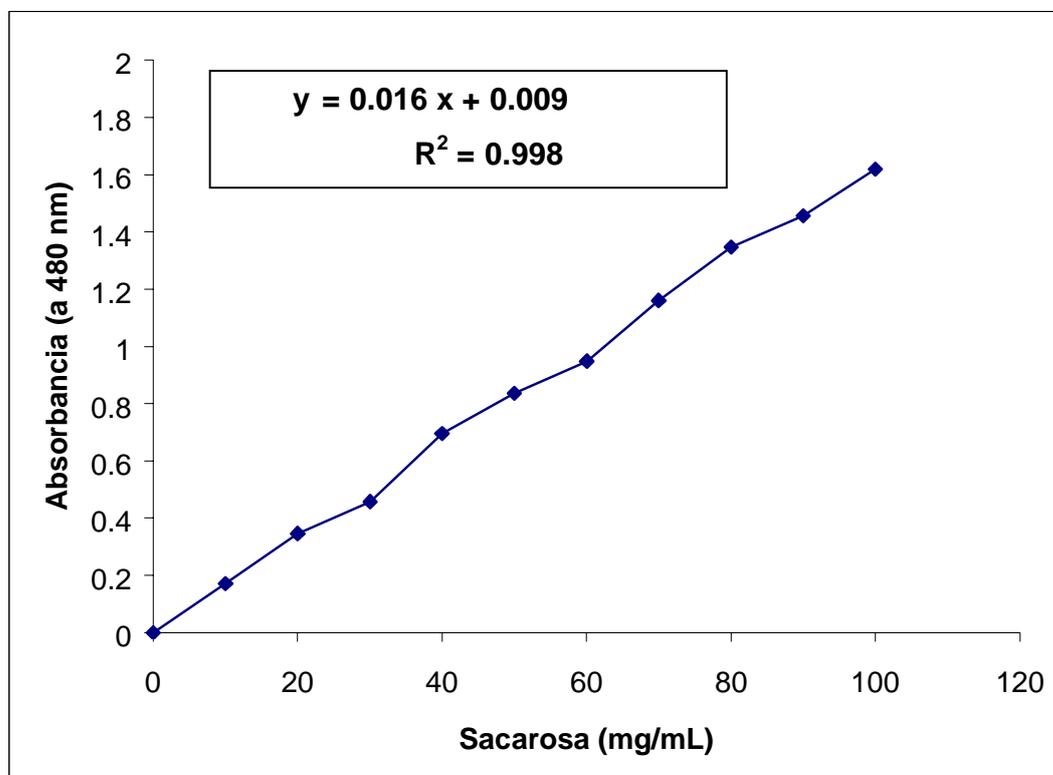
1) Procedimiento:

A 2 ml de la muestra o el estandar se adicionó 1 mL de solución de fenol al 5 % , se mezcló muy bien y agregó rápidamente por la pared del tubo 5 mL de ácido sulfúrico concentrado; se mezcló una vez más y se dejaron en reposo las muestras durante 10 min. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en baño María a 30 °C durante 20 min. y después se leyeron en el espectrofotómetro a 480 nm. De la misma manera que con las muestras se elaboró un blanco con agua destilada. Se realizó una curva estandar por triplicado con sacarosa (Sigma S-5390), en las concentraciones de 0 a 100 mg /mL. Por último, se obtuvo la gráfica de una curva de calibración de absorbancia vs concentración, cuya ecuación se muestra más adelante.

2) Tabla 10. Datos de la curva de calibración de absorbancia vs concentración:

Concentración	Absorbancia
(mg / mL)	(a 480 nm)
0	0.0002
10	0.1713
20	0.3461
30	0.4575
40	0.6951
50	0.8358
60	0.9482
70	1.1597
80	1.3472
90	1.4566
100	1.6187

3) Gráfica de la curva de calibración.



ANEXO 4. Desarrollo Estadístico (Análisis de varianza, Medias y Desviación Estándar).

Programa usado: NCSS 2001 and PASS Trial

I.- ANOVA:

Leyenda:

F. V. = Fuente de variación

G. L. = Grados de libertad

C. M. = Cuadrado Medio

P> = Probabilidad

Significancia de Alfa = 0.05

F. V.	G. L.	C. M.	P>
a) Nivel de inóculo			
a. 1. 1ª Corrida	27	7.40×10^{-4}	0.0001
a. 2. 2ª Corrida	27	6.46×10^{-4}	0.00064
b) Peso fresco			
b. 1. Suspensión A	21	9.28×10^{-5}	0.00026
b. 2. Suspensión B	23	9.99×10^{-5}	0.0001
c) Peso seco			
c. 1. Suspensión A	21	5.43×10^{-5}	0.0037
c. 2. Suspensión B	23	3.56×10^{-5}	0.0004
d) Crecimiento de biomasa			
d. 1. Suspensión A	21	54.20	0.0146
d. 2. Suspensión B	23	35.64	0.0028

F. V.	G. L.	C. M.	P>
e) Índice de crecimiento			
Suspensión B	23	2.03	0.0004
f) Curva de crecimiento			
Suspensión D	27	7.04×10^{-5}	0.0001
g) Azúcares totales			
Suspensión D	65	5.37×10^{-2}	0.0001

II.- Medias y Desviación Estándar:

Leyenda: M = Media D. E. = Desviación Estándar

a) Nivel de inóculo	0.75	1.5	3.75	4.5
a. 1. 1ª Corrida				
Media	5.84×10^{-2}	8.58×10^{-2}	8.91×10^{-2}	2.22×10^{-1}
D. E.	1.50×10^{-2}	2.11×10^{-2}	1.59×10^{-2}	4.50×10^{-2}
a. 2. 2ª Corrida				
Media	4.27×10^{-2}	9.14×10^{-2}	1.02×10^{-1}	1.19×10^{-1}
D. E.	7.49×10^{-3}	3.90×10^{-2}	2.60×10^{-2}	1.79×10^{-2}

b) Peso fresco

b. 1. Suspensión A

Tiempo	8	16	23	32
Media	2.29	2.30	2.32	2.30
D. E.	4.50×10^{-3}	1.38×10^{-2}	6.20×10^{-3}	1.06×10^{-2}

b .2. Suspensión B

Tiempo	8	16	23	32
Media	2.01	2.07	2.06	2.05
D. E.	3.19×10^{-3}	1.59×10^{-2}	5.93×10^{-3}	1.03×10^{-2}

c) Peso seco

c .1. Suspensión A

Tiempo	8	16	23	32
Media	0.60	0.59	0.58	0.58
D. E	7.42×10^{-3}	6.67×10^{-3}	8.17×10^{-3}	7.30×10^{-3}

c.2 . Suspensión B

Tiempo	8	16	23	32
Media	0.39	0.38	0.38	0.38
D. E	5.46×10^{-3}	6.74×10^{-3}	5.44×10^{-3}	6.12×10^{-3}

d) Crecimiento de biomasa

d. 1. Suspensión A

Tiempo	8	16	23	32
Media	272.16	264.83	268.60	256.25
D. E	7.52	6.67	8.17	7.12

d. 2. Suspensión B

Tiempo	8	16	23	32
Media	63.71	60.33	50.50	52.25
D. E	5.46	6.74	5.44	6.12

e) Índice de crecimiento

Suspensión B

Tiempo	8	16	23	32
Media	9.01	7.50	5.49	5.32
D. E	1.23	1.62	1.35	1.49

f) Curva de crecimiento

Suspensión D

Tiempo (días)	0	8	16	24	32	40	45
Media	1.72	1.72	1.73	1.81	1.89	1.90	1.89
D. E	1.04×10^{-2}	6.37×10^{-3}	7.50×10^{-3}	6.55×10^{-3}	1.02×10^{-3}	6.71×10^{-3}	9.88×10^{-3}

g) Azúcares totales

Suspensión D

Tiempo (días)	Media	D. E.
0	29.42	18.40×10^{-2}
5	36.73	39.89×10^{-2}
10	30.76	19.36×10^{-2}
15	31.27	15.69×10^{-2}
20	26.99	25.15×10^{-2}
25	26.80	20.46×10^{-2}
30	23.58	19.65×10^{-2}
35	21.33	14.83×10^{-2}
40	19.82	27.35 x
45	20.14	10.01×10^{-2}
50	19.66	29.24×10^{-2}

ANEXO 5. Tablas de medios de cultivo de inducción y mantenimiento

a) Tabla 11. Comparación por corrida de los medios de inducción

Corrida	Medio	Concentración Sacarosa (g/L)	Relación C/N	Agitación (rpm)	Temp. (°C)	pH	RCV	Referencia
1 ^a	MSs ⁰	30	15	100	25 ± 2	5.8	2- ip	Murashige y Skoog, 1962 Gamborg y Phillips, 1995
2 ^{a*}	MSs ⁰	60	30	100	25 ± 2	5.8	2- ip	Murashige y Skoog, 1962 Gamborg y Phillips, 1995

* Se duplica también la concentración de antioxidantes

d) Para ambas corridas: Fotoperiodo de 16 h de luz por 8 h de oscuridad

e) Parámetro de aireación ajustado entre el 20 y 25% con respecto al volumen total del recipiente (Perez y Ramirez, 1999)

f) Para ambas corridas se estimó el tamaño de inóculo en relación % de peso/volumen, oscilando dentro del intervalo de 2.5 a 20% (Perez y Ramirez, 1999; Zhong y Yoshida, 1995; Gomez y Goma, 1986). Se graficó tamaño de inóculo vs densidad óptica a 660 nm; las lecturas se tomaron a los 15 días de inicio de cada corrida, para las proporciones de 0.75 g, (2.5%); 1.5 g, (5%); 3.0 g, (10%) y 4.5 g, (15%).

b) Tabla 12. Comparación por corrida de los medios de mantenimiento

Corrida	Medio	Concentración Sacarosa (g/L)	Relación C/N	Agitación (rpm)	Temp. (°C)	pH	RCV	Suspensión
1 ^a	MSs ¹	39.90	20	100	25 ± 2	5.8	2- ip	A, B, C
2 ^{a*}	MSs ¹	35	17.62	100	25 ± 2	5.8	2- ip + 2, 4-D	D

* Se reduce la concentración de antioxidantes a su valor base

1. Para ambas corridas: Fotoperiodo de 16 h de luz por 8 h de oscuridad

g) Parámetro de aireación ajustado entre el 20 y 25% con respecto al volumen total del recipiente (Perez y Ramirez, 1999)

h) Inóculo del 12 % en relación p/v

