

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES  
CELULARES DE *Chenopodium ambrosioides* PARA  
UNA FUTURA OBTENCIÓN DE METABOLITOS  
SECUNDARIOS, EMPLEANDO LA CITOQUININA  
THIDIAZURON (TDZ)**

PREVIA A LA OBTENCIÓN DE GRADO ACADÉMICO O TÍTULO DE:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

ELABORADO POR:

**PAULINA ANDREA FREIRE VÁSCONEZ**

**SANGOLQUÍ, ENERO DE 2013**

# **LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

---

Paulina Andrea Freire Vásquez

**COORDINADORA DE LA CARRERA**

---

M.C. Tatiana Páez

**Sangolquí, 23 de enero de 2013**

## CERTIFICACIÓN

M.Sc. Mónica Jadán

Ing. Pedro Romero

### **Certifica:**

Que el trabajo titulado “Establecimiento de suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* para una futura obtención de metabolitos secundarios, empleando la citoquinina thidiazurón (TDZ)”, realizado por Paulina Andrea Freire Vásquez ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a su relevancia científica, expuesta en el presente trabajo, se recomienda su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Paulina Andrea Freire Vásquez que lo entregue a la Ing. Tatiana Páez, en calidad de Coordinadora de la Carrera.

Sangolquí, 23 de enero 2013

---

**M. Sc. Mónica Jadán**

DIRECTOR

---

**Ing. Pedro Romero**

CODIRECTOR

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Paulina Andrea Friere Vásquez

### **Declaro que:**

El proyecto de grado denominado “Establecimiento de suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* para una futura obtención de metabolitos secundarios, empleando la citoquinina thidiazuron (TDZ)”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 23 de enero de 2013

---

**Paulina Andrea Friere Vásquez**

## AUTORIZACIÓN

Yo, Paulina Andrea Friere Vásquez

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército, la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “Establecimiento de suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* para una futura obtención de metabolitos secundarios, empleando la citoquinina thidiazuron (TDZ)”, cuyo contenido y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 23 de enero de 2013

---

**Paulina Andrea Freire Vásquez**

## DEDICATORIA

- A ti, por siempre darme razones para amarme y por ser  
ese empuje que cada día me sorprende más.

## AGRADECIMIENTO

Agradezco a cada ser que me ha acompañado en mi camino.

A mis maestros que han sido una guía enriquecedora.

A mis padres que han sido una fuente de enseñanza constante.

A mi familia y nueva familia que son un círculo de amor.

A mis amigos y compañeros que estuvieron en todo este proceso, gracias por estar ahí.

A Heyllette por dame una nueva perspectiva del mundo gracias de todo corazón.

A Diego por compartir su a yo conmigo.

*Gracias*

## RESUMEN

Las suspensiones celulares vegetales ofrecen un gran potencial para la producción de metabolitos secundarios, con una importante aplicación en la industria química, farmacéutica y alimenticia por lo que generan gran interés científico y comercial. Este sistema permite controlar de mejor manera la producción a diferencia de los métodos tradicionales los cuales presentan variaciones en la calidad y cantidad del producto debido a cambios climatológicos o estacionales o calidad del suelo. En Ecuador *Chenopodium ambrosioides* es una planta aromática utilizada ancestralmente como alimento o medicina, cuyos metabolitos secundarios han probado tener actividad nematocida, antifúngica y alelopática por lo que esta investigación tiene como objetivo desarrollar un protocolo de establecimiento de suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* para una futura obtención de metabolitos secundarios. Como primer paso se estableció un protocolo de desinfección utilizando NaClO al 1.5 % con un tiempo de inmersión de 10 minutos cuya efectividad fue del 90 % en viabilidad y 10 % en contaminación. La formación de callo fue significativa en el medio de cultivo Gamborg B5 (1968) suplementado con 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de TDZ. A partir de estos callos, se establecieron exitosamente las suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* con 1 g de callo en 20 ml de medio líquido en un Elenmeyer de 100ml. Finalmente, se identificó la curva representativa de la cinética celular de *Chenopodium ambrosioides* de la cual se pudo determinar que el día 15 es el óptimo para mantener la suspensión en multiplicación celular constante. Las suspensiones de *Chenopodium ambrosioides* ofrecen una herramienta importante para la producción de metabolitos secundarios así como para estudios de biorreactores y la propagación de esta especie vía embrogénesis somática.



## ABSTRACT

Plant cell culture offers a great potential for secondary metabolites production, with important applications in chemical, pharmacist or nutrition industry. Is that why it generated large scientific and commercial interest. This system allows a better production control, contrary to traditional plantation methods which present variations in the quality and quantity of product due to weather or season changes or holding of lands. In Ecuador *Chenopodium ambrosioides* is an aromatic herb used since ancient times as food or medicine. Its secondary metabolites have shown nematicide activity, antifungal activity and allelopathic effects, therefore, this research aimed to develop an protocol for establishment of *Chenopodium ambrosioide* cell suspension in order to obtain secondary metabolites in the future. Firstable, a disinfection protocol was implanted using 1.5% NaClO with an immersion time of 10 minutes as a result we obtain 90% of viability and 10% of contamination. The callus formation was significant on Gamborg B5 (1968) medium supplemented with 0.5 mg.L<sup>-1</sup> of TDZ. Using this callus cell suspensions were successfully establish with 1 g of callus in 20 ml of liquid medium in a 100 ml Elenmeyer flask. Finally, we get a representative growth curve from *Chenopodium ambrosioide* cell suspension and we determinate the 15th day like the best to subculture in order to maintain a constant cell division. *Chenopodium ambrosioides* cell suspension offer an important tool for the production of secondary metabolites, as well as bioreactors study and the propagation of this specie by somatic embryogenesis.

# Índice general

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Formulación del problema . . . . .	1
1.2. Justificación del problema . . . . .	2
1.3. Objetivos de la investigación . . . . .	3
1.3.1. Objetivo general . . . . .	3
1.3.2. Objetivos específicos . . . . .	3
1.4. Marco teórico . . . . .	4
1.4.1. Características generales de la especie . . . . .	4
1.4.1.1. Taxonomía . . . . .	4
1.4.1.2. Descripción botánica . . . . .	4
1.4.1.3. Distribución geográfica de la especie . . . . .	6
1.4.1.4. Usos . . . . .	6
1.4.1.5. Propiedades . . . . .	7
1.4.2. Cultivo <i>in vitro</i> . . . . .	8
1.4.2.1. Introducción . . . . .	8
1.4.2.2. Medio de cultivo . . . . .	8
1.4.2.3. Auxinas . . . . .	10
1.4.2.4. Citoquininas . . . . .	11
1.4.2.5. Selección del material vegetal . . . . .	13
1.4.2.6. Etapa de desinfección . . . . .	14

## *Índice general*

1.4.2.7.	Etapa de establecimiento . . . . .	15
1.4.2.8.	Etapa de inducción a callo . . . . .	15
1.4.2.9.	Mantenimiento del callo . . . . .	16
1.4.2.10.	Suspensiones celulares . . . . .	17
1.4.2.11.	Cinética de crecimiento celular . . . . .	19
1.4.2.12.	Mantenimiento de las suspensiones celulares . . . . .	22
1.4.2.13.	Métodos para medir el crecimiento celular . . . . .	23
1.4.2.14.	Metabolitos secundarios . . . . .	26
1.5.	Hipótesis . . . . .	28
<b>2.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
2.1.	Localización de la investigación . . . . .	29
2.2.	Material vegetal: selección, colección y tratamiento . . . . .	29
2.3.	Desinfección del material vegetal . . . . .	31
2.3.1.	Medio de cultivo . . . . .	33
2.3.2.	Condiciones físicas del cultivo . . . . .	34
2.3.3.	Evaluación . . . . .	35
2.3.3.1.	Contaminación . . . . .	35
2.3.3.2.	Clorosis . . . . .	35
2.4.	Inducción a callo . . . . .	36
2.4.1.	Medio de cultivo . . . . .	36
2.4.2.	Formación a callo . . . . .	38
2.5.	Suspensiones celulares . . . . .	39
2.5.1.	Establecimiento de las suspensiones celulares . . . . .	39
2.5.2.	Recuento celular . . . . .	41
2.5.3.	Determinación de la cinética celular . . . . .	44
2.5.4.	Mantenimiento de la suspensión celular . . . . .	44
2.6.	Análisis estadístico . . . . .	44

## *Índice general*

<b>3. RESULTADOS</b>	<b>46</b>
3.1. Etapa de desinfección . . . . .	46
3.1.1. Contaminación . . . . .	47
3.1.1.1. Análisis exploratorio de datos . . . . .	47
3.1.1.2. Análisis inferencial . . . . .	50
3.1.2. Clorosis . . . . .	53
3.1.2.1. Análisis exploratorio de datos . . . . .	53
3.1.2.2. Análisis inferencial . . . . .	57
3.2. Inducción de callo . . . . .	62
3.2.1. Análisis exploratorio . . . . .	62
3.2.2. Análisis inferencial . . . . .	63
3.3. Suspensiones celulares . . . . .	65
3.3.1. Establecimiento de las suspensiones celulares . . . . .	65
3.3.2. Cinética celular . . . . .	66
3.3.3. Biomasa . . . . .	76
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>79</b>
4.1. Desinfección del material vegetal . . . . .	79
4.2. Formación a callo . . . . .	82
4.3. Suspensiones celulares . . . . .	84
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>89</b>
<b>6. RECOMENDACIONES</b>	<b>91</b>

# Índice de cuadros

1.1. Clasificación taxonómica de <i>Chenopodium ambrosioides</i> [27]. . . . .	4
1.2. Valores nutricionales del paico . . . . .	7
1.3. Agentes esterilizantes comúnmente utilizado (tabla traducida de Sathyanarayana, 2007, p.59) . . . . .	14
2.1. Tratamientos para desinfección de entrenudos de plantas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> . . . . .	32
2.2. Componentes y concentraciones de medio Murashige y Skoog[43] . . . . .	34
2.3. Concentración de las vitaminas del medio de Murashige y Skoog [43] . . . . .	34
2.4. Componentes y concentraciones de medio medio B5 determinado por Gamborg <i>et al.</i> [43] . . . . .	37
2.5. Tratamientos para la inducción de callo de <i>Chenopodium ambrosioides</i> . . . . .	37
2.6. Niveles que determinan la formación de callo de plantas de <i>Chenopodium ambrosioides</i> . . . . .	38
3.1. Análisis de varianza para la variable contaminación . . . . .	51
3.2. Prueba de Tukey para la variable contaminación . . . . .	51
3.3. Regresión logística para la variable contaminación . . . . .	52
3.4. Análisis de varianza para la variable clorosis . . . . .	58
3.5. Prueba de Tukey para la variable clorosis . . . . .	58
3.6. Regresión logística para la variable clorosis . . . . .	59

*Índice de cuadros*

3.7. Prueba de Kruskal Wallis . . . . .	61
3.8. Análisis de varianza para la variable inducción de callo . . . . .	64
3.9. Prueba de Tukey para la variable inducción de callo . . . . .	64
3.10. Prueba de Kruskal-Wallis para la variable inducción de callo . . . . .	65
3.11. Ecuaciones matemáticas por etapas de análisis . . . . .	75
4.1. Valores de la tasa específica de crecimiento para diferentes especies de células vegetales cultivadas en suspensión. . . . .	87

# Índice de figuras

1.1. Estructura morfológica de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (a) hojas, (b) flores, (c) fruto, (d) semilla. . . . .	5
1.2. Estructuras químicas de citoquininas derivadas de fenilureas (TDZ, CPPU), de adenina (zeatina, kinetina, BA) y de auxina (IAA) [70] . . . . .	13
1.3. Curva de crecimiento celular típica (Roca y Mroginski, 1993) . . . . .	20
1.4. Diagrama de la cámara de Neubauer [44, 82] . . . . .	24
2.1. Selección de plantas (a) planta no apta, (b) planta sana . . . . .	30
2.2. Recolección de <i>Chenopodium ambrosioides</i> . . . . .	30
2.3. Proceso de desinfección (a) Explantes seleccionados de invernadero, (b) Eliminación de hojas, (c) Entrenudos previa a su introducción, (d) Lavado con agua corriente, (e) Inmersión en detergente, (f) Inmersión con fungicida, (g) Inmersión con alcohol 70 %, (h) Inmersión en cloro, (i) Lavado con agua estéril, (j) Lavado con antibiótico. . . . .	33
2.4. Contaminación de explantes: (a) por bacteria, (b) por hongo . . . . .	35
2.5. Clorosis: (a) explante viable, (b) explante afectado por clorosis . . . . .	36
2.6. Formación de callo: (a) Nivel 1: Ausencia de callo, (b) Nivel 2: Poca formación de callo, (c) Nivel 3: Mediana formación de callo, (d) Nivel 4: Abundante formación de callo . . . . .	39

*Índice de figuras*

2.7. Establecimiento de la suspensión celular de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (a) introducción de callo a medio líquido (b) agitación (c) resultado después de la agitación. . . . .	40
2.8. Inicio de la suspensión celular de <i>Chenopodium ambrosioides</i> .(a) y (b) tamizado de la suspensión celular (c) resultado después del tamizado. . .	41
2.9. Proceso para la contabilización celular de la suspensión de <i>Chenopodium ambrosioides</i> (a) eliminación de medio antiguo (b) reposición con medio nuevo (c) toma de muestra (d) contabilización en cámara Neubauer. . . .	42
2.10. Cuadros en la cámara Neubauer para conteo de células . . . . .	43
3.1. Porcentaje de explantes no contaminados versus la concentración de NaClO	48
3.2. Porcentaje de explantes no contaminados versus el tiempo de inmersión .	49
3.3. Porcentaje de explantes no contaminados de cada tratamiento aplicado . .	50
3.4. Análisis de correspondencia entre la concentración de NaClO y la contaminación . . . . .	53
3.5. Porcentaje de explantes viables versus la concentración de NaClO . . . . .	55
3.6. Porcentaje de explantes no contaminados versus el tiempo de inmersión .	56
3.7. Porcentaje de explantes viables de cada tratamiento aplicado . . . . .	57
3.8. Análisis de correspondencia entre la concentración de NaClO y la clorosis	60
3.9. Porcentaje de explantes viables y no contaminados de cada tratamiento aplicado . . . . .	61
3.10. Porcentaje nivel de callo con respecto a la cantidad de TDZ . . . . .	62
3.11. Media aritmética del nivel de callo versus la concentración de TDZ . . . .	63
3.12. Curva de la cinética celular para la suspensión uno . . . . .	67
3.13. Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para la suspensión uno . . .	68
3.14. Curva de la cinética celular para la suspensión dos . . . . .	69
3.15. Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para la suspensión dos . . .	70
3.16. Curva de la cinética celular para la suspensión tres . . . . .	71



Índice de figuras

3.17. Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para la suspensión tres . . .	72
3.18. Curva representativa de la cinética celular de <i>Chenopodium ambrosioides</i> en suspensión. . . . .	73
3.19. Etapas de la cinética celular de <i>Chenopodium ambrosioides</i> . . . . .	74
3.20. Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para <i>Chenopodium ambro- sioides</i> . . . . .	76
3.21. Visualización de las etapas de la cinética celular de <i>Chenopodium ambro- sioides</i> . . . . .	77
3.22. Tamaño celular de <i>Chenopodium ambrosioides</i> en suspensión celular . . .	78

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1. Formulación del problema

Actualmente las plantas son vistas como fuente de una amplia variedad de compuestos químicos naturales, conocidos como metabolitos secundarios, que son utilizados como fármacos, nutraceuticos<sup>1</sup>, antioxidantes, pesticidas, colorantes, saborizantes, fragancias y moléculas nuevas. La extracción de estos compuestos se lo obtiene normalmente de plantas silvestres o cultivadas; sin embargo, el medio ambiente donde se desarrollan está siendo afectado de tal forma que algunas plantas están en proceso de desaparición [76].

Según Trejo y Rodríguez (2007), la planta en campo produce los metabolitos secundarios en ciertas fases de su ciclo de vida, con condiciones climáticas determinadas o de estrés en células, órganos y tejidos específicos de la planta. En tal sentido, la producción de metabolitos secundarios en forma natural es compleja y no uniforme, incluso en una misma población donde existe adicionalmente variabilidad genética.

Debido a lo expuesto anteriormente durante los últimos 50 años se ha incrementado en forma considerable la investigación en identificación de bioactividad, técnicas para la obtención de valiosos productos vegetales, inducción de metabolitos secundarios, extracción y formas de mejorar su eficiencia [45].

---

<sup>1</sup>Término acuñado desde “nutrición” y “farmacéutico”, se define como un alimento que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluyendo la prevención y/o tratamiento de enfermedades.

## 1 INTRODUCCIÓN

*Chenopodium ambrosioides*, cuyo nombre vulgar es paico, es una planta utilizada ancestralmente que corre el riesgo de tener una población cada vez menor ya que se ha dejado de cultivar y su utilización ha quedado relegada a las pocas familias que de alguna manera conocen sus beneficios.

En esta investigación se desarrolla un protocolo para el establecimiento de suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides*, a fin de potenciarla, mantener la especie viva, generar interés científico y efectuar futuras extracciones de sus metabolitos secundarios.

### 1.2. Justificación del problema

*Chenopodium ambrosioides* ha sido ampliamente empleada en alimentos, medicina y otros, por nuestros ancestros. La valiosa composición química del paico según Blair & Madrigal (2005) puede ser utilizada en la industria gracias a que contiene saponinas, geraniol, alcanfor, cimeno, limoneno, terpineno, mirceno, ácido butírico, spinasterol, metil salicilato, sulfatos y fosfatos de magnesio, sapogenina de quenopodio y ureasa. El aceite esencial contiene ascaridol, p-cimeno, alfa limoneno y d-alcanfor.

Algunos de sus beneficios han sido estudiados y comprobados como por ejemplo su potencial anti-fúngico, nematocida y alelopática que presenta sus metabolitos secundarios. Adicionalmente se debe destacar el valor nutricional del paico, ya que según investigaciones ha sido posible determinar que por cada 100 g de paico, se obtiene 342 mg de calcio, 8.6 mg de hierro, 3.5 mg de caroteno, 0.3 mg de riboflavina, y 99 mg de ácido ascórbico [57].

La producción de metabolitos secundarios a través de la técnica de suspensiones celulares ha sido de interés industrial y biotecnológico pues permite la generación de estos productos en gran escala y sin necesidad de la planta completa [51].

## 1 INTRODUCCIÓN

Finalmente la utilización de la técnica de suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* es la más acertada para producir, posteriormente, metabolitos secundarios sin necesidad de la planta completa ya que, según Calva y Pérez (2005), la mayor cantidad de metabolitos incrementan su rendimiento cuando la planta crece de tejidos específicos que cuando se obtiene naturalmente.

### 1.3. Objetivos de la investigación

#### 1.3.1. Objetivo general

Establecer suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* para una futura obtención de metabolitos secundarios, empleando la citoquinina thidiazuron (TDZ).

#### 1.3.2. Objetivos específicos

- Establecer un método de desinfección para entrenudos de *Chenopodium ambrosioides* con el fin de obtener bajos porcentajes de contaminación.
- Evaluar diferentes medios de cultivo para la formación de callo en *Chenopodium ambrosioides*, empleando la citoquinina thidiazuron (TDZ).
- Obtener suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides*.
- Establecer una curva de crecimiento de células en suspensión.
- Determinar el tiempo en el cual el crecimiento celular alcanza la fase estacionaria.

## 1.4. Marco teórico

### 1.4.1. Características generales de la especie

#### 1.4.1.1. Taxonomía

El nombre *Chenopodium* se deriva de los vocablos griegos *chenos* que significa ganso y *podos* que significa pie; así, el significado etimológico es “pie de ganso” debido a que las hojas tienen esta forma característica [37]. *Chenopodium ambrosioides* corresponde con la siguiente clasificación taxonómica:

Cuadro 1.1: Clasificación taxonómica de *Chenopodium ambrosioides* [27].

Categoría	Taxón
Reino	Plantae
Subreino	Tracheophyta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Magnoliidae
Orden	Caryophyllales
Familia	Amaranthaceae
Género	<i>Chenopodium</i>
Especie	<i>ambrosioides</i>

#### 1.4.1.2. Descripción botánica

El paico es una planta anual, erecta, ascendente y aromática con un olor característico a alcanfor. Su *tallo* es simple o ramificado y mide desde 0.25 m hasta 1 m de alto. Por su parte, las *hojas* tienen pecíolo de 0.3 cm a 2 cm y en el limbo son obtusas, atenuadas en el ápice, oblongas y ovaladas, cuneadas en la base, enteras a sinuadas o dentadas, son puberulentas o venosas y cuneadas en la base, normalmente tiene un largo desde 1.7 cm

## 1 INTRODUCCIÓN

hasta 7 cm y un ancho desde 0.5 cm hasta 2.5 cm. Sus *inflorescencias* son pequeñas de menos de 1mm, color amarillento o verdoso, crecen en forma de espigas terminales axilares densas o discontinuas frondosas, con glomérulos espiciformes, son actinomorfas, las terminales hermafroditas y las laterales femeninas, con cinco piezas sepaloideas; posee *estambres* con tres a cinco filamentos; tiene de cuatro a cinco estigmas las cuales son filiformes patentes. *C. ambrosioides* tiene un *utrículo* completamente envuelto por cáliz, pericarpio libre, no adherido a la semilla. La *semilla* es pequeña, lisa, brillante, de color marrón rojizo. Esta mide de largo hasta 0.9 mm y su ancho es de hasta 0.8 mm y el *fruto* es aqueniforme [57].



Figura 1.1: Estructura morfológica de *Chenopodium ambrosioides* (a) hojas, (b) flores, (c) fruto, (d) semilla.

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.4.1.3. Distribución geográfica de la especie

El paico pertenece a la familia *Amaranthaceae* y comprende cerca de 70 géneros con aproximadamente 900 especies siendo diversa en las regiones tropicales y subtropicales pero también se extiende a las regiones templadas. El género *Chenopodium* originario de América del Sur, es de amplia distribución en el mundo con 150 especies y curiosamente, 45 de estas han sido identificadas en un solo lugar, la India [33, 77].

*C. ambrosioides* es nativa del oeste de la India y América del Sur pero actualmente se ha diseminado en la mayoría de los países del mundo. Esta especie posiblemente llega al Ecuador antes de la llegada de los Españoles en el siglo XVI. Se distribuye como maleza de vegetación secundaria, la cual, crece en laderas, chacra y en los bordes del camino. Se la encuentra a una altura desde los 0 msnm hasta los 4000 msnm [81, 20, 37].

### 1.4.1.4. Usos

*Chenopodium ambrosioides*, ha sido ampliamente empleada por varias etnias en alimentos, medicina y otros. Por su fuerte olor aromático que despiden esta especie se utiliza como un ingrediente en sopas y locros, el tallo picado se lo consume con huevo y las hojas, frutos y flores se pone como condimento en ensaladas; con el fruto se realizan bebidas refrescantes. Ancestralmente, se ha utilizado en la alimentación de los niños para ayudar al cerebro en su desarrollo y para mejorar la memoria. En la medicina tradicional es utilizado como antiespasmódico, estimulante cardíaco, para tratar la diarrea, la influenza, tos, fiebre, el dolor de cabeza y estómago. Es útil también, para regular el flujo menstrual, aliviar los cólicos posparto, cicatrizar heridas, afecciones pulmonares, combatir la anemia y la diabetes. Las hojas, tallos y raíces se utilizan para eliminar lombrices, amebas, áscaris y otros parásitos intestinales [14].

## 1 INTRODUCCIÓN

Además, el paico se ha usado como lavativa, cicatrizante y en forma de perfume para repeler los insectos. El baño externo de bovinos y aves ayuda a desinfectar y cerrar heridas, así como los emplastos se aplican como anti-inflamatorio en equinos y humanos [81].

En el Ecuador, el paico es utilizado por una extensa variedad de etnias como el Chachi, Kichwa de la Sierra, Cofán, Secoya, Kichwa del Oriente y Mestiza, los cuales han aportado en sus diferentes usos.

### 1.4.1.5. Propiedades

El género *Chenopodium* es conocido por sus valores nutricionales, específicamente, el paico se destaca por poseer calcio y hierro. Por cada 100 g de paico se obtiene:

Cuadro 1.2: Valores nutricionales del paico

Compuesto	Peso [mg]
Calcio	342
Hierro	8,6
Caroteno	3,5
Riboflavina	0,3
Ácido ascórbico	99

Posee una valiosa composición química la cual, según Blair & Madrigal (2005), puede ser utilizada en la industria gracias a que contiene saponinas, geraniol, alcanfor, cimenol, limoneno, terpineno, mirceno, ácido butírico, spinasterol, metil salicilato, sulfatos y fosfatos de magnesio, sapogenina de quenopodio y ureasa. El aceite esencial contiene ascaridol, p-cimenol, alfa limoneno y d-alcanfor.



### 1.4.2. Cultivo *in vitro*

#### 1.4.2.1. Introducción

El cultivo *in vitro* es un grupo de técnicas, para crecer, multiplicar y mantener células, tejidos u órganos de una planta en un ambiente estéril, con todos los requerimientos que ésta necesite, con un medio artificial de crecimiento adecuado que disponga de los suplementos químicos - hormonales y se encuentre en un ambiente externo controlado (luz, temperatura, humedad, etc.) [48].

Según Taji, Kumar & Lakshmanan (2002) el cultivo de tejidos vegetales está basado en tres facultades de la planta: la totipotencia, la dediferenciación y la competencia. La totipotencia es la capacidad que tienen las células vegetales para desarrollar plantas completas. La dediferenciación, se define como la habilidad de que las células vegetales maduras diferenciadas regresen al estado meristemático y sea como un nuevo punto de crecimiento. Finalmente, las células vegetales son competentes ya que cada una puede desarrollarse de alguna manera particular.

El cultivo *in vitro* está siendo utilizado por la comunidad científica e industrial para obtener plantas con cualidades uniformes y de alta calidad, para propagación masiva de plantas en un corto periodo de tiempo y espacio reducido, producción de plantas libres de patógenos y enfermedades específicas, mejoramiento genético, conservación de germoplasma y para la producción de metabolitos secundarios [8].

#### 1.4.2.2. Medio de cultivo

La formulación del medio de cultivo depende de la especie a sembrar, de la técnica de cultivo que se emplee, de la edad y del tipo de explante, ya que la composición del medio influye en el crecimiento y morfogénesis de los tejidos de la planta. Pero en general, éste

## 1 INTRODUCCIÓN

debe aportar con suplementos inorgánicos y orgánicos esenciales para el crecimiento y desarrollo deseado de la planta. Además, el medio debe proveer una fuente de carbono y agua [62, 48].

Los suplementos inorgánicos esenciales para el desarrollo vegetal son minerales en forma de macronutrientes y micronutrientes.

Los macronutrientes se requieren en grandes cantidades en el medio de cultivo, mayores a una concentración de  $0.5 \text{ mmol L}^{-1}$ ; comprenden elementos como el nitrógeno, potasio, fósforo, magnesio, calcio y azufre presentes como sales en el medio de cultivo y son esenciales para el desarrollo de la planta. Los medios de cultivo deben contener suficiente nitrógeno orgánico para un adecuado crecimiento de la célula vegetal; el nitrógeno es un elemento esencial ya que forma parte de las moléculas de ácidos nucleicos, proteínas, clorofila, aminoácidos, alcaloides y algunas hormonas. Un medio de cultivo debe contener al menos  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  entre nitratos y potasios. Por su parte, el potasio es primordial ya que es necesario para la división normal de una célula y promueve el crecimiento del meristema; además, ayuda a sintetizar carbohidratos y proteínas. El fósforo se requiere en la fotosíntesis y respiración pues forma parte de las moléculas de ADN y ATP. El magnesio es el elemento central de la clorofila. El calcio es un componente de la pared celular y ayuda a la formación de pectina y finalmente el azufre es un componente importante de algunas proteínas [5].

Los micronutrientes son parte del medio de cultivo requeridos por la planta en pequeñas cantidades, con concentraciones menores a  $0.05 \text{ mmol L}^{-1}$ . Su insuficiencia da lugar a una carencia y su exceso a una toxicidad. Dentro de los micronutrientes mencionaremos al manganeso, yodo, cobre, cobalto, boro, molibdeno, hierro, cloro y zinc; en ciertas fórmulas también están elementos como el níquel y el aluminio [56].

Un compuesto primordial que se encuentra en gran cantidad es el carbono; este es la fuente principal de energía y se lo adhiere al medio en forma de azúcares tales como la

## 1 INTRODUCCIÓN

sucrosa, sacarosa, glucosa, maltosa, galactosa y sorbitol [69].

Los suplementos orgánicos tienen como función mejorar el crecimiento celular. Uno de estos suplementos son las vitaminas, las cuales forman parte de enzimas o cofactores que catalizan varios procesos metabólicos. Estas se usan en el medio de cultivo para lograr el mejor crecimiento del tejido vegetal. Las vitaminas más usadas son la tiamina (vitamina B1), el myo-inositol (considerado un miembro de la vitamina B), piridoxina y ácido nicótico. La tiamina es indispensable para los cultivos celulares, ya que es básicamente requerida por las células vegetales. El myo-inositol es comúnmente incluido en el medio ya que ha demostrado estimular el crecimiento celular en muchas especies. Otro suplemento orgánico son los aminoácidos los cuales se usan en el medio de cultivo para estimular el crecimiento celular y establecer líneas celulares [62, 40, 5].

Un factor físico importante del medio del cultivo es el potencial de hidrógeno (pH), el cual generalmente se ajusta de 5.3 a 5.8 y puede ser líquido o sólido. Para que éste sea sólido se usa agentes gelificantes como el agar o el phytigel [48, 66].

Otro componente importante del medio de cultivo son los reguladores de crecimiento que determinan el comportamiento de las células vegetales. Existen cinco clases: las auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido abscísico [36].

### 1.4.2.3. Auxinas

Las auxinas son un grupo de fitohormonas que funcionan como reguladores del crecimiento vegetal; fueron las primeras fitohormonas descritas. Tienen una estructura derivado del fenol o el indol y tienen dos anillos aromáticos con dobles enlaces conjugados. Todas las auxinas son ácidos. Los efectos generales que producen son agrandamiento y alargamiento celular. Es así que su nombre significa en griego “crecer”. Además, se ha visto que puede promover la división celular y la formación de callo en el cultivo de tejidos.

## 1 INTRODUCCIÓN

Las auxinas se encuentran en toda la planta; sin embargo, estas se fabrican principalmente en los meristemas apicales de los brotes y de allí se mueven a otras partes de la planta. Este flujo de auxinas reprime el desarrollo de brotes axilares laterales a lo largo del tallo, manteniendo de esta forma la dominancia apical [62, 19].

Existen varios tipos de auxinas algunas son naturales y otras sintéticas. El ácido indolacético (AIA) es conocida como una hormona natural y se añade a los medios nutritivos en concentraciones de  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Las auxinas sintéticas y relativamente más activas son el ácido indolbutírico (AIB), el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D). Estas se utilizan en concentraciones de  $0.001 \text{ mg L}^{-1}$  a  $10 \text{ mg L}^{-1}$  [23].

Según Roca y Mroginski (1993) las auxinas más utilizadas son 2,4-D, ANA, AIA, AIB.

En el medio de cultivo la baja concentración de auxinas induce la formación de raíces adventicias mientras que con altas concentraciones de auxinas tiende a formar callo. Sin embargo, la cantidad precisa dependerá del tipo de explante y de la especie vegetal [23].

### 1.4.2.4. Citoquininas

Las citoquininas son un grupo de hormonas vegetales que participan en la división celular, la diferenciación en tejidos vegetales, control del desarrollo y la senescencia<sup>2</sup>. Estos se encuentran en todas las plantas, particularmente en tejidos que se dividen en forma activa como meristemas, en la punta de las raíces, semillas en germinación, frutos en maduración y raíces en desarrollo. Estas son transportadas desde el ápice de la raíz hasta el tallo o brote a través de la savia en los vasos correspondientes al xilema [72].

Las citoquininas se pueden derivar de dos bases diferentes. La primera con base de adeninas como la kinetina (natural), benciladenina BAP (sintética) y la zeatina ZEA (natural)

---

<sup>2</sup>Se refiere a muerte celular programada, siendo las citoquininas inhibidores de la misma.

## 1 INTRODUCCIÓN

de la cual se derivan muchas otras citoquininas activas como la ribofuranosilzeatina, la glucopiranosida de zeatina y la segunda con base de fenilureas como forclorfenurón (CP-PU) y tidiazurón (TDZ) [68].

Según Roca y Mroginski (1993) las citoquininas más usadas son KIN, BAP, ZEA.

**Thidiazuron (TDZ)** El Thidiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-yl urea) se deriva de una fenilurea y es un producto químico con actividad citoquinética desarrollado originalmente para su utilización como defoliante en algodón; no obstante en los últimos años ha sido muy empleado para la inducción de procesos morfogénicos [71].

Investigaciones *in vitro* demuestran que bajas concentraciones como 10 pM de TDZ generan un alto nivel de actividad en el explante y exponer un tejido vegetal por poco tiempo al TDZ es suficiente para estimular la regeneración [70]. Esta característica es la que distingue al TDZ de otras fitohormonas ya sean naturales o sintéticas. Además, estructuralmente, el TDZ es diferente a las auxinas o citoquininas pues como se muestra en la figura 1.2 este tiene dos grupos funcionales: El grupo fenil y el grupo thidiazol, lo que le hace relativamente estable.

El mecanismo de acción del TDZ es aún desconocido; sin embargo, hay dos hipótesis: La una dice que el TDZ promueve directamente el crecimiento debido a su propia actividad biológica y la otra que puede inducir la síntesis y acumulación de citoquininas endógenas [71].

El Thidiazurón es un compuesto de color amarillo pálido, de olor tenue, cristalino, poco soluble en agua y altamente soluble en etanol u otros compuestos orgánicos como acetona, benceno o DMSO (dimetil sulfóxido) [70].

Se ha demostrado que el TDZ induce a la formación de callos en algunas plantas como la uva o cultivos de callo dependientes de citoquininas como en poroto de soya y tabaco

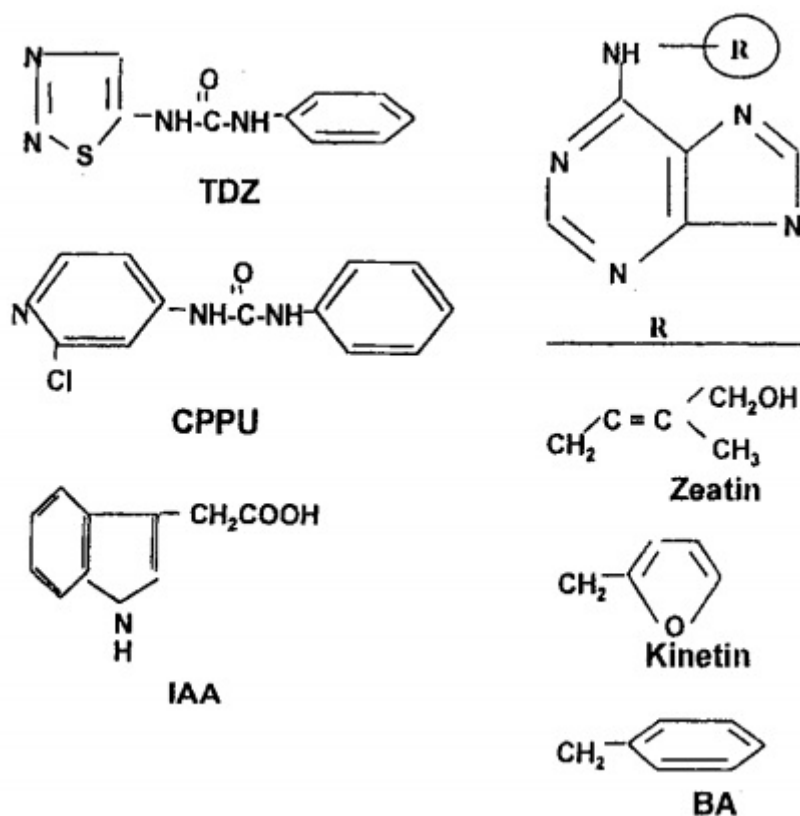


Figura 1.2: Estructuras químicas de citoquininas derivadas de fenilureas (TDZ, CPPU), de adenina (zeatina, kinetina, BA) y de auxina (IAA) [70]

con una proliferación celular mucho mayor que con otras hormonas [39].

#### 1.4.2.5. Selección del material vegetal

Cuando no se realiza el estudio con todo el ser vivo sino solamente una parte del mismo, se utiliza el término **explante** para indicar la parte del órgano o tejido vegetal que se cultiva *in vitro*. Para obtener una mejor respuesta a los tratamientos el explante debe provenir de una planta donadora sin enfermedad y libre de insectos. Es conveniente que la planta goce de un ambiente controlado con condiciones mínimas de humedad y preferentemente con un pre-tratamiento de fungicidas y pesticidas, para obtener el menor porcentaje de contaminación en la introducción al cultivo *in vitro* [69].

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.4.2.6. Etapa de desinfección

La desinfección del explante es un paso primordial ya que el medio de cultivo y las condiciones físicas en donde se siembra la planta son favorables para que los microorganismos como bacterias y hongos proliferen [62].

Sobre la superficie de la planta existen una amplia variedad de hongos y bacterias que deben ser removidos para evitar contaminación del medio. Existen varios agentes desinfectantes comúnmente utilizados como soluciones de hipoclorito de sodio o calcio, alcohol, fungicidas, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata, yodo y antibióticos. La concentración y el tiempo de exposición del explante a un determinado producto esterilizante deben ser ajustados para que el tejido vegetal tenga el menor daño posible y sea eficiente en su desinfección [5].

Cuadro 1.3: Agentes esterilizantes comúnmente utilizado (tabla traducida de Sathyarayana, 2007, p.59)

Agente esterilizante	Concentración %	Tiempo de esterilización (min)
Cloruro de mercurio	0,01 - 0,1	0,5 - 10
Hipoclorito de calcio	9 - 10	5 - 30
Hipoclorito de sodio	2	5 - 30
Peróxido de hidrógeno	10 - 12	5 - 15
Bromine water	1 - 2	2 - 10
Nitrato de plata	1	5 - 30
Cloruro de plata	0,1 - 1	2 - 30
Cloruro de benzalconico	0,01 - 0,1	5 - 20

Otro producto muy empleado son los tensoactivos, los cuales reducen la tensión superficial ayudando a que los agentes desinfectantes puedan actuar de mejor manera sobre el explante. Por ejemplo el Tween-20 utilizado en una concentración entre el 0.01 % y el 0.1 % [62].

### 1.4.2.7. Etapa de establecimiento

En este proceso el explante debe superar el estado de estrés para adaptarse al medio artificial estéril e iniciar el cultivo *in vitro*. Esta etapa se la puede considerar como crítica debido a que se requiere un explante estéril introducido en un medio estéril en condiciones asépticas. Muchas veces los explantes mueren no por la falta de efectividad del medio de cultivo sino por la proliferación de microorganismos (hongos y bacterias) [69].

### 1.4.2.8. Etapa de inducción a callo

Una vez superada la etapa de establecimiento se requiere un medio apropiado con nutrientes y reguladores de crecimiento para que las células vegetales vuelvan a un estado meristemático<sup>3</sup> y formen un callo. Los callos se pueden definir como una masa amorfa de células poco diferenciadas que surgen del crecimiento desorganizado de explantes adultos o jóvenes, sobre un medio de cultivo específico en condiciones asépticas. Si el explante contiene tejido meristemático entonces se puede dividir en forma inmediata y sin necesidad de que se produzca una dediferenciación. El proceso de dediferenciación que un tejido adulto ejecuta para formar un callo hace que sus células pasen, temporalmente, a una forma juvenil, haciendo que se dividan intensamente; además, estas células presentan un mayor crecimiento, son capaces de generar órganos a embriones y generan tejidos viables *in vitro* [11].

En un callo se puede encontrar tejidos diferenciados y no diferenciados. Este puede surgir sobre heridas de órganos y tejidos diferenciados. Se ha visto que solo un pequeño porcentaje de células, en un explante cualquiera, contribuye a la formación del callo y su sitio de iniciación es generalmente en las superficies periféricas del explante [59].

---

<sup>3</sup>Cuando las células son morfológicamente indiferenciadas y están especializadas en dividirse.



## 1 INTRODUCCIÓN

La formación del callo dependerá, también, del genotipo del explante, de factores físicos de crecimiento (luz, temperatura y pH) y del material inicial (adulto o joven). Se debe también tener en cuenta la posición del explante sobre la planta a usar debido a que este refleja el nivel de hormonas endógenas y pueden tener una gran influencia en procesos como división celular. Se puede utilizar cualquier tipo de órgano vegetal (raíz, tallo hoja, flor, cotiledones, etc.) o tejido para iniciar la formación a callo [40, 23].

Los callos pueden ser diferentes uno de otros dependiendo de la especie vegetal; por ejemplo, hay blancos, coloreados, blandos, duros, con crecimiento acelerado o lentos y fáciles o difíciles para dividirse en células o agregados<sup>4</sup> [23].

### 1.4.2.9. Mantenimiento del callo

Una vez formado el callo se recomienda un cambio periódico a medio fresco ya que la permanencia del callo por un prologado tiempo conducirá al agotamiento de nutrientes esenciales y a un desecamiento gradual del agente gelificante<sup>5</sup> usado. Además, la acumulación de los metabolitos secundarios producidos por el callo puede llegar a niveles tóxicos causando la muerte o decrecimiento del mismo [56].

Cada transferencia del callo a medio fresco se llama subcultivo. En cada transferencia hay que asegurarse tener un fragmento de callo de un tamaño suficiente para que asegurarse su regeneración. El tamaño recomendado es de 5 mm a 10 mm de diámetro con un peso entre 20 mg a 100 mg este ciclo de cambio de medio debe ser sucesivo cada 4 a 6 semanas [56].

---

<sup>4</sup>son conjuntos de células

<sup>5</sup>Compuesto utilizado para solidificar el medio de cultivo.

## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.4.2.10. Suspensiones celulares

Uno de los usos principales del cultivo de callos es el establecimiento de las suspensiones celulares, las cuales, son células libres y agregados celulares en constante crecimiento dispersos en un medio líquido en movimiento [62].

Este sistema es un poderoso implemento para llevar a cabo estudios de inducción de embriogénesis somática, crecimiento, diferenciación, organogénesis, ciclo celular, establecimiento de líneas celulares, aislamiento de mutantes, bioquímica, metabolismo y obtención de metabolitos secundarios [44, 45].

Las suspensiones celulares se obtienen transfiriendo segmentos de callo, generalmente friables<sup>6</sup>, a un medio líquido con agitación mecánica para liberar las células del inóculo inicial. Comúnmente, se utilizan frascos de Erlenmeyer con medio que llene una capacidad del un quinto del frasco. Según Abdelnour y Escalant (1994), el cultivo de células en suspensión requiere una cantidad inicial de callo representativa: el cual, se puede establecer aproximadamente entre uno a veinte gramos de callo por cada 50 cm<sup>3</sup> luego de 10 a 14 días se generará la suspensión celular. La agitación tiene el propósito de romper los agregados celulares, mantener una distribución uniforme de las células y ayudar al intercambio gaseoso para suministrar oxígeno a las células que se encuentran en el medio líquido. La velocidad de agitación más adecuada varía en un rango entre 60 r.p.m. a 150 r.p.m. con un radio de dos a cuatro centímetros. La elección correcta de la agitación dependerá del cultivo celular, del medio de cultivo, del tipo de recipiente a usar y el volumen. Otro método para disgregar el callo es la utilización de enzimas pectinasas, las cuales pueden romper las paredes exteriores de las células vegetales. Las pectinasas, a bajas concentraciones, logran romper los agregados puesto que la pectina intracelular se disuelve [56, 11].

---

<sup>6</sup>Un callo es friable cuando este puede ser reducido en trozos más pequeños con poco esfuerzo, las células de esta clase de callo permiten la regeneración de tejido viable.

## 1 INTRODUCCIÓN

La suspensión se compone de células libres, agregados celulares de varios tamaños, parte del inoculo inicial y células muertas. Los agregados celulares pueden medir varios centímetros de diámetro, son esféricos, de superficie lisa, cohesivos y tienen cierto grado de diferenciación celular o tisular [44].

Cuando la suspensión celular ha alcanzado una densidad adecuada, se remueve parte del callo que no se ha disgregado por medio de una filtración, o trasvasando solo la suspensión de un recipiente a otro. En esta nueva suspensión se observa varios tipos de células:

- Células diferenciadas.- Estas no tienen capacidad para dividirse, son alargadas, poseen una gran vacuola, un citoplasma y núcleo reducido.
- Células meristemáticas.- Son pequeñas, tiene un citoplasma denso y alta capacidad de división.
- Las células embriogénicas.- Su citoplasma se observa lleno de reservas como almidón, proteínas y lípidos.

El medio de cultivo ideal para la suspensión celular debe ser el mismo en el que mejor se mantiene el callo. Se usan medios base como MS, B5, LS (Linsmaier and Sookg, 1965 y Blaydes, 1966) con adición de reguladores hormonales, vitaminas, inositol y azúcar. La tasa de multiplicación celular dependerá del explante utilizado. Todo el proceso desde la introducción del explante hasta el establecimiento de la suspensión celular puede tener un periodo de duración de seis a nueve meses. Es importante tener en cuenta que las células en suspensión tienen que estabilizarse en el medio antes de estudiar la producción de los compuestos deseados [79, 11].

Una suspensión celular ideal está caracterizada por una homogeneidad morfológica y bioquímica. El tamaño promedio de las células en suspensión oscila entre 25  $\mu m$  y 475  $\mu m$  dependiendo de su morfología; sin embargo, un mantenimiento largo de la suspensión

## 1 INTRODUCCIÓN

celular muestra una diversidad genética en las poblaciones celulares que usualmente es resultado de cambio en el número o la morfología de los cromosomas [52, 67].

Las suspensiones celulares generalmente forman agregados o grumos y se puede requerir un cierto grado de esta agregación para el crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios; sin embargo, una suspensión homogénea provee un alta reproductividad en los experimentos [79].

### 1.4.2.11. Cinética de crecimiento celular

La cinética de crecimiento celular es una curva que se obtiene haciendo un recuento del número de células en suspensión con respecto al tiempo. Es importante conocer esta curva para establecer los momentos apropiados en que es necesario un cambio de medio o un subcultivo para que las células continúen con sus procesos fisiológicos normales.

Un cultivo de células tiene cinco fases de crecimiento, las cuales se muestran en la figura 1.3. y son: fase de retraso, fase exponencial, fase lineal, fase de desaceleración progresiva y fase estacionaria.

## 1 INTRODUCCIÓN

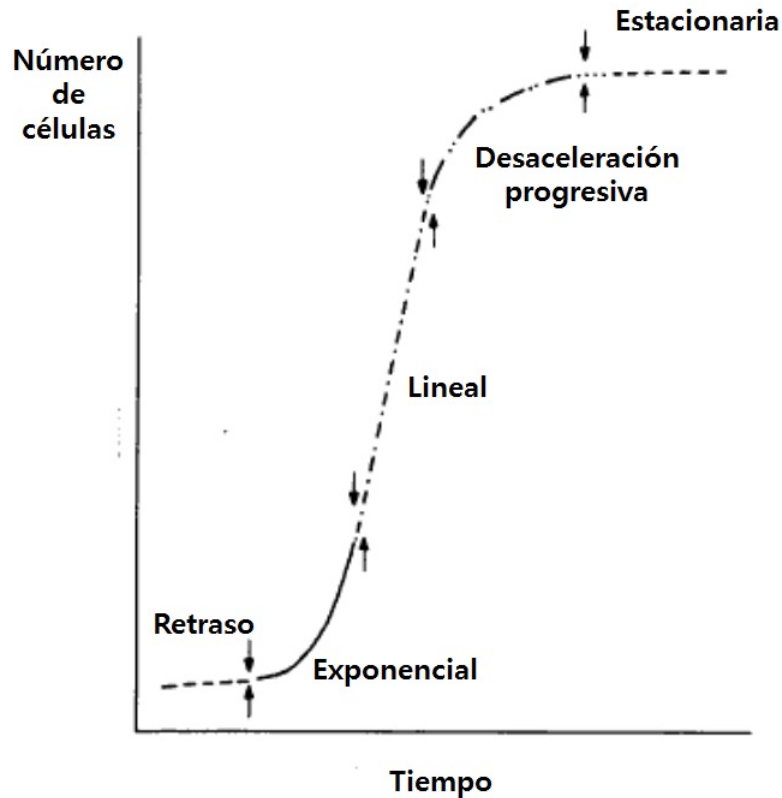


Figura 1.3: Curva de crecimiento celular típica (Roca y Mroginski, 1993)

La fase de retraso también es comúnmente conocida como una fase de latencia en donde al iniciar la suspensión las células tienen un periodo en el cual no hay señal de división. En este periodo las células se estabilizan al nuevo medio con sus nutrientes y sintetizan todo lo necesario para la división [44].

Posteriormente, viene una etapa de crecimiento exponencial o fase logarítmica durante la cual el volumen celular aumenta debido a que las células se dividen rápidamente. En esta etapa el aumento de la biomasa es medible y se lo llama tasa específica de crecimiento,  $\mu$ , la cual, se expresa matemáticamente así:

## 1 INTRODUCCIÓN

$$\mu = \frac{\ln 2}{t_d} \quad (1.1)$$

donde  $\mu$  es la tasa específica de crecimiento de la suspensión y  $t_d$  es el tiempo de duplicación de la densidad celular.

Para aumentar en el tiempo la fase exponencial se puede empezar el cultivo con una densidad pequeña o elevar las concentraciones de los nutrientes; también, se puede mantener un cultivo celular de forma permanente en fase exponencial siempre y cuando se realicen subcultivos frecuentes, es decir, cada dos a tres días [62].

Seguidamente luego de la fase exponencial se observa un incremento lineal el cual nos muestra que la curva de crecimiento celular aumenta uniformemente. Después de tres a cuatro generaciones de crecimiento continuo, el cultivo celular se ubica en una fase estacionaria ya que la tasa de división celular decae y el número de células se mantiene. Si el cultivo permanece por mucho tiempo sin ser transferido a otro medio entonces las células mueren [47].

Cuando el crecimiento está en fase exponencial o fase lineal y a fin de mantener la viabilidad del cultivo, se debe renovar de nutrientes y hormonas. Es importante que en el nuevo medio se coloque solo una pequeña cantidad de células; en términos prácticos generalmente se usa entre 20 ml a 25 ml de suspensión celular por 100 ml de medio nuevo. Dependiendo de la especie, el tiempo de subcultivo varía; por ejemplo, algunos clones en suspensión alcanzan su máxima densidad celular desde los 18 días a los 25 días pero en la mayoría de cultivos celulares vegetales el rango normal está entre el día 21 al 25 o, en su defecto, las células con una rápida división celular tienen un tiempo de subcultivo de entre seis y nueve días [13].

### 1.4.2.12. Mantenimiento de las suspensiones celulares

Para mantener las suspensiones celulares es necesario subcultivarlas, es decir, adicionarles medio de cultivo debido a que el crecimiento y el metabolismo de las células en suspensiones agotan al menos uno de los componentes del medio. Roca y Mroginski (1993) sugieren que para los primeros subcultivos se debe utilizar una tasa de dilución baja: Desde una parte de suspensión celular por cada parte de medio fresco 1:1 hasta 1:4. El incremento de células es equivalente a que todas las células del inóculo se dividan en cuatro o seis veces, por lo que el tiempo de incubación del subcultivo puede ser entre 21 a 28 días. El uso de bajas densidades celulares prolonga el tiempo de la fase de retraso y el exponencial [13].

El recambio de medio se puede efectuar a través de tres tipos de sistemas: el cerrado, continuo cerrado o continuo abierto, tal como se detalla a continuación:

**Sistema cerrado para recambio de medio:** Cuando la suspensión ha alcanzado la fase estacionaria se toma una fracción de la suspensión y se la subcultiva en medio fresco de forma manual. El volumen removido y el volumen del medio nuevo deben ser iguales y el tiempo de incubación requerido varía dependiendo de la cinética de la suspensión celular. Este sistema es el más utilizado a nivel de laboratorio de investigación [62].

**Sistema continuo cerrado para recambio de medio:** Se retira medio y se suministra más medio de forma continua teniendo en cuenta que las células se retienen mecánicamente, acumulándose en la suspensión. De esta manera, la biomasa aumenta a medida que el crecimiento celular continúa. Este proceso es útil para estudios de cito diferenciación en donde es necesario que las células en crecimiento estén en condiciones reguladas para luego mantenerlas por un periodo considerable en un estado indivisible bajo viabilidad [11].

## 1 INTRODUCCIÓN

**Sistema continuo abierto para recambio de medio:** Existe un fluido de medio fresco o suministro de nutrientes cuyo volumen del ingreso a la suspensión es el mismo que el volumen de medio antiguo eliminado, el cual tiene células y productos tóxicos de desecho. Con este método se mantiene un estado estacionario ya que la velocidad de recambio es igual a la tasa de formación de células nuevas, las cuales se encuentran en fase exponencial, lo que implica una tasa de crecimiento alta [32].

### 1.4.2.13. Métodos para medir el crecimiento celular

Existen varios métodos para seguir el crecimiento celular:

- **Conteo de células**

Es un parámetro de crecimiento en el cual se toma una pequeña muestra de la suspensión celular y se la transfiere a una cámara de Neubauer o hematocitómetro (figura 1.4.) que es un dispositivo con señales que determinan un volumen conocido (microlitros); luego de realizar el recuento bajo el microscopio y determinar el número de células presentes en el volumen dado se calcula la densidad de células en la suspensión de origen [3].



## 1 INTRODUCCIÓN

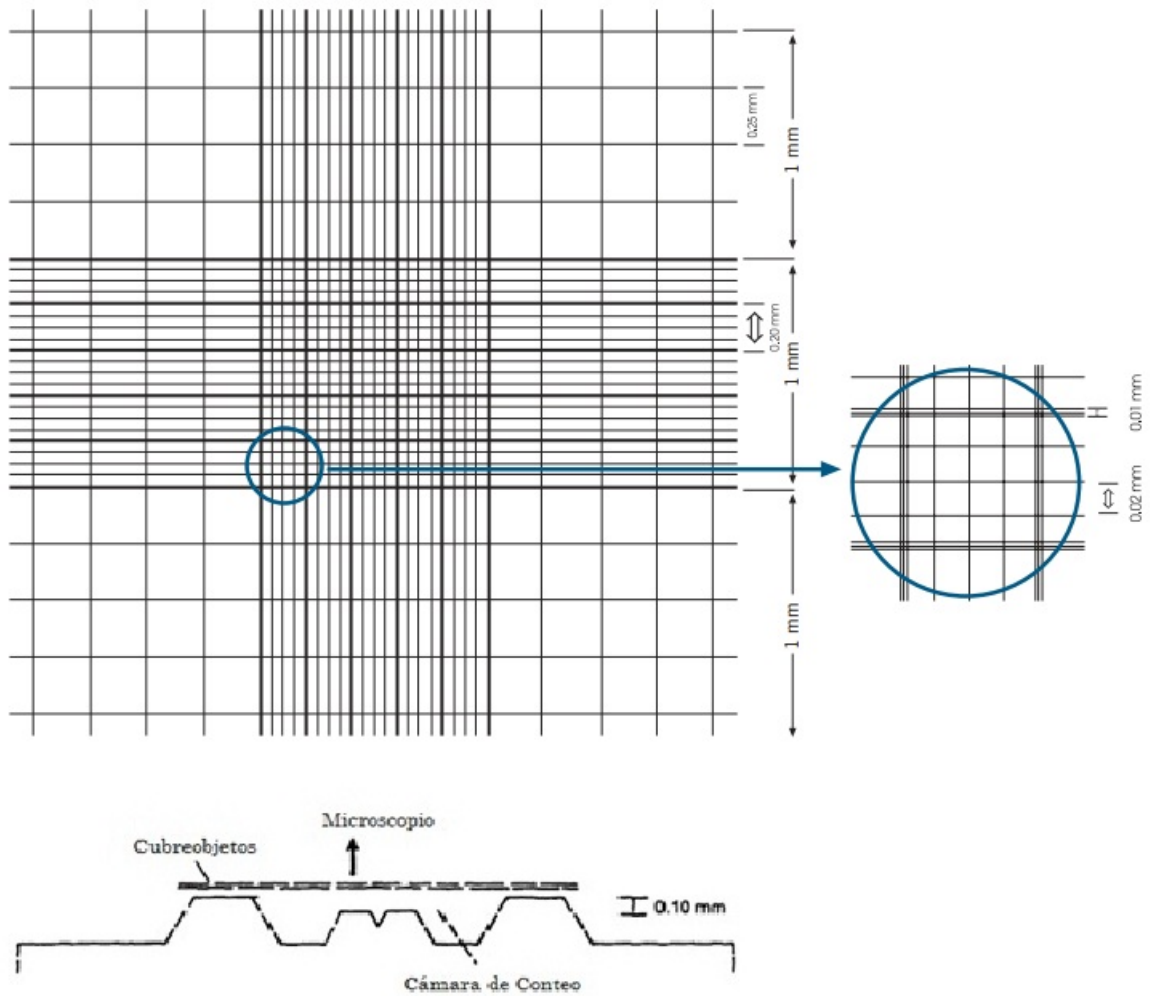


Figura 1.4: Diagrama de la cámara de Neubauer [44, 82]

Para esta técnica es imprescindible que no existan agregados celulares; sin embargo, de existir es necesario separar estas células tratándolas previamente con trióxido de cromo acuoso al 8% por dos a cinco minutos a 70 °C ó en su defecto con pectinasa al 0.1% por 16 horas a 25 °C [12].

## 1 INTRODUCCIÓN

### ■ Volumen celular

En esta técnica se coloca un volumen conocido de suspensión en un tubo cónico graduado y se centrifuga durante tres minutos a 200 rpm. El material sedimentado son células y la concentración resultante (crecimiento celular) se expresa en mililitros de células por mililitro del medio [40].

### ■ Peso fresco

Se pasa un volumen conocido de suspensión celular por un filtro previamente pesado. Este es lavado con agua destilada estéril, se filtra al vacío y se pesa. En esta técnica el crecimiento celular se expresa en gramos de peso fresco por mililitro de medio [44].

### ■ Peso seco

Es lo mismo que lo anterior pero después de pasar por el filtro la suspensión se seca a 60 °C durante 24 horas y se pesa; este método no se utiliza para cantidades pequeñas de suspensión celular [12].

### ■ Turbidez

En esta técnica se mide la turbidez con ayuda de un espectrofotómetro con filtro y longitud de onda de 400 nm a 465 nm; el crecimiento celular se expresa en gramos por mililitro [12].

### ■ Índice mitótico

Se busca calcular el número de células en estado mitótico<sup>7</sup>. El crecimiento celular se expresa en porcentaje de células y es un valor adimensional [12].

$$IM = \frac{\text{células en mitosis}}{\text{total de células}} 100 \% \quad (1.2)$$

---

<sup>7</sup>Estado de división celular.

### 1.4.2.14. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos sintetizados por las células vegetales pero no son esenciales para la misma; generalmente tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales y sirven de defensa frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales. Los metabolitos pueden llegar a ser de gran utilidad para el ser humano al usarlos como: fármacos, pesticidas, colorantes, saborizantes, agroindustria y fragancias [28].

Comúnmente, estos compuestos se extraen de plantas silvestres o plantaciones, lo que implica ciertas desventajas. Una de ellas es la baja y lenta acumulación de los metabolitos; además, cada planta presenta variaciones en la calidad y cantidad del producto debido a cambios climatológicos, estacionales, condiciones geopolíticas<sup>8</sup> o tenencia del suelo. En el caso de plantas silvestres, su explotación comercial está basada en la recolección del material en su hábitat natural, lo que ha provocado que muchas especies se vean amenazadas; por lo que se ha visto como tendencia y alternativa biotecnológica el cultivo masivo de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios [67].

Los cultivos de células vegetales ofrecen un gran potencial para la obtención de metabolitos ya que permiten controlar mejor la producción, manejar un ambiente controlado, su producción es independiente de las condiciones climáticas o condiciones del suelo, posibilitan seleccionar plantas élites con alta producción de moléculas de interés y se puede automatizar el crecimiento celular a largo plazo abaratando el costo de producción [76].

**Metabolitos secundarios en el *Chenopodium ambrosioides*** Se ha reportado que las plantas pertenecientes al género *Chenopodium* poseen aceites esenciales, alcaloides, terpenos, esteroides y flavonoides [49, 57]. Históricamente se han podido evidenciar estudios científicos del paico donde se demuestra su utilidad así como la efectividad de algunos

---

<sup>8</sup>Es la interacción de condiciones geográficas, la sociedad humana y el empleo de poder en un Estado.

## 1 INTRODUCCIÓN

de sus componentes constitutivos, como es el caso del estudio publicado por Wabo *et al.* (2011) en su artículo The *in vitro* effects of *Chenopodium ambrosioides* (Chenopodiaceae) extracts on the parasitic nematode *Heligmosomoides bakeri* (Nematoda, Heligmosomatidae), en el que nos habla de la eficacia de los extractos de paico a base de etanol o hexano para detener el desarrollo embriogénico y la eclosión de huevos de *H. bakeri*; por lo que concluye que es justificable el uso del paico para combatir los parásitos intestinales.

Hay otras investigaciones que muestran el efecto alelopático que tiene el paico en la germinación y crecimiento de otras plantas junto con un análisis de alelo químicos principales que posee la planta, como lo señala Hegazy y Farrag (2007) en su artículo: Allelopathic potential of *Chenopodium ambrosioides* on germination and seedling growth of some cultivated and weed plants.

Además, trabajos como Composition and Antifungal Activity of the Essential Oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. [42] resaltan la efectividad del aceite esencial, obtenido de las hojas de paico, contra los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium semitectum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum musae* y *Fusarium oxysporum*, obteniendo una inhibición del 100 % con 0.3 % de concentración de aceite esencial.

Similarmente el artículo Antifungal Terpenoids from *Chenopodium ambrosioides* [58] menciona que los compuestos menos polares poseen mayor actividad anti-fúngica y pueden proveer de material químico para el control de hongos en plantas.

Según Cavalli *et al.* (2004), el componente que se encuentra en cantidad significativa en el aceite de *Chenopodium ambrosioides* es el ascaridol, el cual es un monoterpeno insaturado poco polar conocido por su potente actividad antihelmíntica<sup>9</sup>; sin embargo, existe un compuesto polar aun no identificado claramente que aparentemente tiene mayor actividad nematicida [73].

---

<sup>9</sup>Cualquier sustancia utilizada para el tratamiento de infestaciones de lombrices parásitas del cuerpo de manera rápida y completa.

## 1 INTRODUCCIÓN

En consecuencia se puede afirmar que el *Chenopodium ambrosioides* dispone de una serie de compuestos químicos que son sintetizados por sus células y si bien es cierto no son esenciales, para la misma son de gran utilidad para el ser humano en las diferentes formas de uso ya descritas.

### 1.5. Hipótesis

La aplicación de la citoquinina thidiazuron (TDZ) tiene un efecto estadístico significativo en la formación de callo y en el establecimiento de las suspensiones celulares.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Localización de la investigación

El presente proyecto fue desarrollado en la Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida - Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, el cual se encuentra ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui, parroquia Sangolquí a 0° 18,81 S; 78° 26,64 O; altitud: 2516 msnm.

### 2.2. Material vegetal: selección, colección y tratamiento

La recolección de plantas de *Chenopodium ambrosioides* se efectuó en la provincia de Tungurahua, ciudad de Ambato, parroquia Terremoto, ubicada a 01° 14,384 S; 078° 37,112 O; altitud: 2550 msnm.

El muestreo se realizó en laderas, chacras, adheridas a cultivos, pastos y bordes de camino. Se seleccionaron plantas jóvenes, completamente sanas y que no presenten lesiones de patógenos externos (figura 2.1).

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS



Figura 2.1: Selección de plantas (a) planta no apta, (b) planta sana

Una vez seleccionada se extrajo la planta con raíz y se colocó en recipientes con 50 % de tierra propia del lugar y 50 % con PRO-MIX autoclavado para darle a la planta un nivel adecuado de nutrientes asegurando así la supervivencia y adaptación de las mismas (figura 2.2)



Figura 2.2: Recolección de *Chenopodium ambrosioides*

El material vegetal se trasladó hacia los invernaderos ubicados en las afueras del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales en la Escuela Politécnica del Ejército, donde se sometió a un proceso fitosanitario para evitar la proliferación de hongos, con un produc-

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

to sistémico y de contacto como es el Amistar top al 0.5 %. Se realizó una aspersión del producto sobre las partes aéreas de la planta por un periodo de dos veces por semana en el transcurso de un mes, asegurando plantas sanas y viables para la toma de muestra vegetal.

### 2.3. Desinfección del material vegetal

A las plantas mantenidas en invernadero se seccionó entre 15 cm a 20 cm de largo de la parte superior aérea, luego en el laboratorio se retiró todas las hojas junto con las yemas brotadas y se procedió con un nuevo corte entre 8 cm a 10 cm. A continuación, los explantes fueron lavados con agua corriente por un tiempo de 5 min, para eliminar la mayor cantidad de impurezas y se sumergió en una solución de detergente 1 % por 15 min en agitación. Se realizó tres lavados con agua destilada autoclavada y se introdujo los explantes en un fungicida (phyton 0.5 %) con dos gotas de tween-20 por cada 100 ml de solución durante 30 min; después se procedió con un lavado en alcohol al 70 % por un minuto en agitación y se sumergió los explantes en una solución de hipoclorito de sodio con dos gotas de Tween-20 por cada 100 ml de solución. Se probó con dos concentraciones de hipoclorito de sodio y tres tiempos de inmersión diferentes como se detalla en el cuadro 2.1.



## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

Cuadro 2.1: Tratamientos para desinfección de entrenudos de plantas de *Chenopodium ambrosioides*

Tratamiento	Concentración cloro (%)	Tiempo (min)
T1	1.0	10
T2	1.0	15
T3	1.0	20
T4	1.5	10
T5	1.5	15
T6	1.5	20

Acto seguido se lavó los explantes con agua destilada estéril, por tres ocasiones dentro de la cámara de flujo laminar, la cual estuvo previamente esterilizada con alcohol al 90% y radiación ultravioleta durante 15 min seguido de un flujo de aire filtrado por 10 min. Todo el material utilizado dentro de la cámara estuvo totalmente esterilizado en autoclave por 15 min a una temperatura de 121 °C con una presión de 15 psi y el proceso de manipulación se realizó con pinzas estériles para evitar cualquier fuente de contaminación.

Finalmente, cada explante fue seccionado en segmentos de dos centímetros cada uno y a estos se los hizo un lavado con penicilina 1 000 000 UI diluida en 100 ml (figura 2.3.).

Se realizó 10 repeticiones por cada tratamiento, según lo indicado en el cuadro 2.1, teniendo como unidad experimental un explante en un frasco con medio de cultivo.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

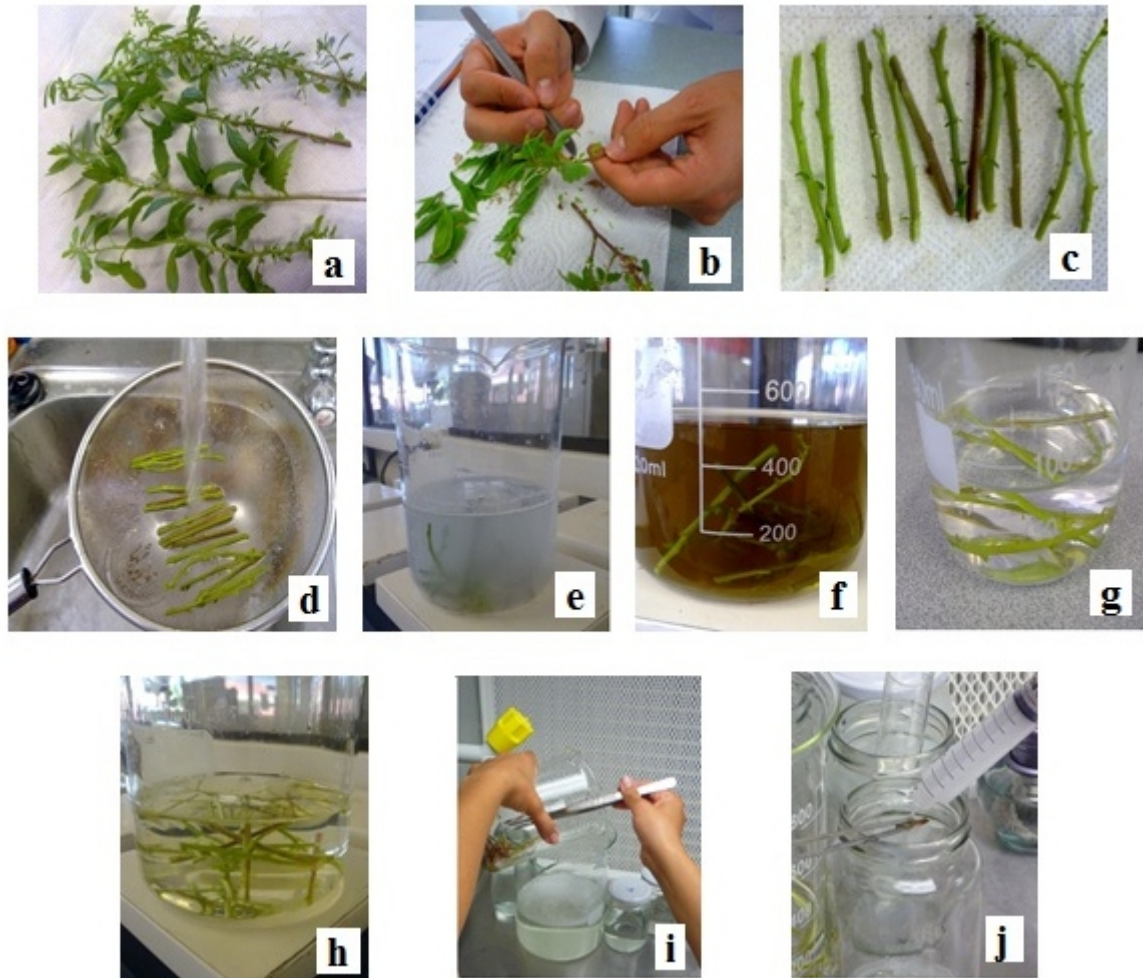


Figura 2.3: Proceso de desinfección (a) Explantes seleccionados de invernadero, (b) Eliminación de hojas, (c) Entrenudos previa a su introducción, (d) Lavado con agua corriente, (e) Inmersión en detergente, (f) Inmersión con fungicida, (g) Inmersión con alcohol 70 %, (h) Inmersión en cloro, (i) Lavado con agua estéril, (j) Lavado con antibiótico.

### 2.3.1. Medio de cultivo

Los explantes desinfectados previamente fueron sembraron en un medio de Murashige y Skoog (MS) (1962) con todas sus nutrientes y vitaminas detallados en los cuadros 2.2 y 2.3, suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de azúcar, 5.5 g L<sup>-1</sup> de agar, con un pH entre 5.7 a 5.8.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

Cuadro 2.2: Componentes y concentraciones de medio Murashige y Skoog[43]

Sales	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )
KNO <sub>3</sub>	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
Na <sub>2</sub> EDTA	37.24
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27.84
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	16.90
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8.60
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.25
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.025

Cuadro 2.3: Concentración de las vitaminas del medio de Murashige y Skoog [43]

Vitaminas	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )
Inositol	100
Tiamina	0.10
Ácido nicotínico	0.50
Piridoxina	0.50

### 2.3.2. Condiciones físicas del cultivo

Los explantes sembrados se colocaron bajo condiciones físicas controladas de humedad relativa del 50 % al 60 % a una temperatura de 25 °C ± 2 °C bajo un nivel de iluminación de 2000 luxes a 2500 luxes y con un foto período de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.3.3. Evaluación

Se evaluó el proceso de desinfección a través de las variables contaminación fúngica o bacteriana y clorosis a los 15 días de haber sembrado los explantes.

#### 2.3.3.1. Contaminación

Visualmente se determinó si los entrenudos mostraban o no contaminación microbiana con hongos o bacterias y se valorizó cada explante con el valor de “1” a los no contaminados y el valor de “0” a los contaminados (figura 2.4).

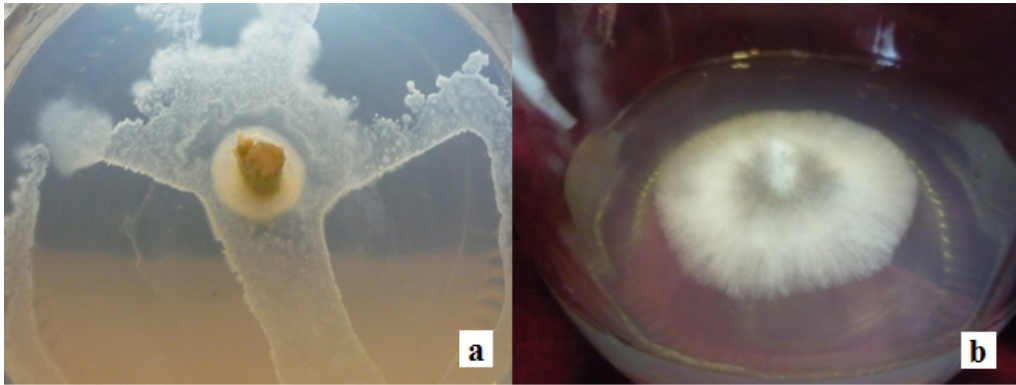


Figura 2.4: Contaminación de explantes: (a) por bacteria, (b) por hongo

#### 2.3.3.2. Clorosis

Mediante la observación se determinó si un explante presentaba o no daño del tejido basado en su color. Un color verde representa tejido vivo y viable mientras que un color amarillo blanquecino nos indica daño del tejido. Se valorizó con “1” a los explantes de color verde y con “0” a aquellos de color amarillo (figura 2.5).

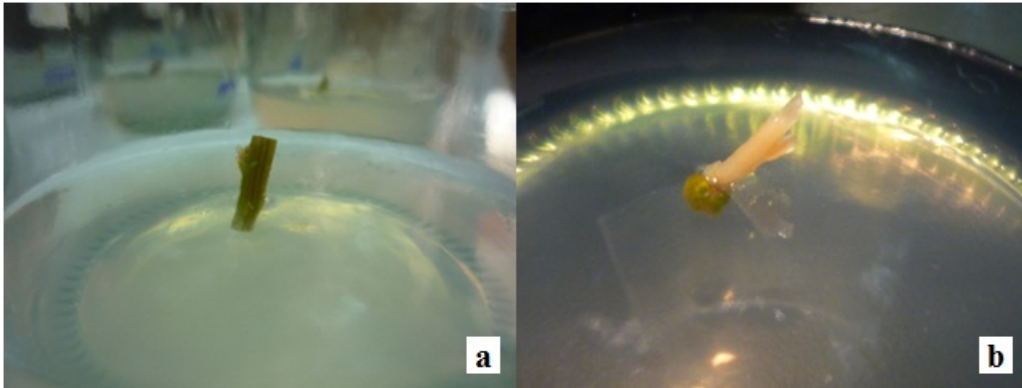


Figura 2.5: Clorosis: (a) explante viable, (b) explante afectado por clorosis

## 2.4. Inducción a callo

Una vez estandarizado el protocolo de desinfección con las concentraciones de cloro y tiempo de inmersión adecuados continuamos con el siguiente paso para la inducción a callo. En esta etapa se realizó una nueva introducción de entrenudos los cuales se sembraron en seis medios con diferentes concentraciones de citoquinina TDZ, bajo las mismas condiciones físicas anotadas en el numeral 2.3.2.

### 2.4.1. Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo B5 determinado por Gamborg *et al.* (1968) con todos sus nutrientes y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) detallado en los cuadros 2.4 y 2.3 respectivamente, enriquecido con  $20 \text{ g L}^{-1}$  de azúcar,  $5.5 \text{ g L}^{-1}$  de agar con una regulación de pH 5.7 - 5.8 y suplementado con thidiazurón (TDZ) en diferentes concentraciones como se indica en el cuadro 2.5.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

Cuadro 2.4: Componentes y concentraciones de medio medio B5 determinado por Gamburg *et al.* [43]

Sales	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )
KNO <sub>3</sub>	2500
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	150
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	250
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	150
Na <sub>2</sub> EDTA	37,24
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27,84
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	13,2
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3
KI	0,75
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,25
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,025

Cuadro 2.5: Tratamientos para la inducción de callo de *Chenopodium ambrosioides*

Tratamiento	TDZ (mg L <sup>-1</sup> )
E0	0
E1	0.5
E2	1
E3	1.5
E4	2
E5	2.5

Se realizaron 10 repeticiones para cada tratamiento, considerando un explante como unidad experimental e incubado en las mismas condiciones físicas de la etapa de desinfección y se evaluó la formación a callo después de un mes de introducido los entrenudos en el medio de inducción.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.4.2. Formación a callo

Se estableció la evaluación de la formación a callo mediante cuatro niveles de valoración, especificando el valor de 1 para la ausencia y 4 abundancia como se detalla en el cuadro 2.6.

Cuadro 2.6: Niveles que determinan la formación de callo de plantas de *Chenopodium ambrosioides*.

Niveles	Formación de callo
1	Ausencia de callo
2	Poca formación de callo
3	Mediana formación de callo
4	Abundante formación de callo

En las fotografías mostradas en la figura 2.6 se puede identificar los diferentes niveles de valoración con su asignación correspondiente en base al criterio de evaluación establecido en el cuadro 2.6.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

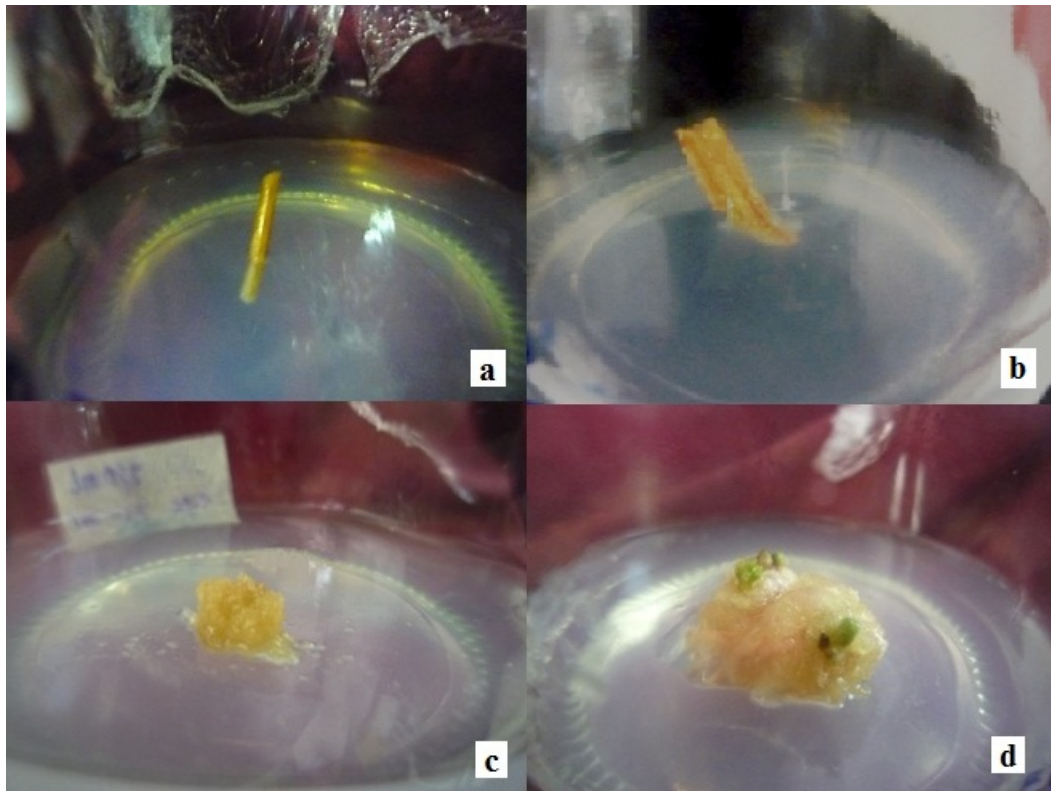


Figura 2.6: Formación de callo: (a) Nivel 1: Ausencia de callo, (b) Nivel 2: Poca formación de callo, (c) Nivel 3: Mediana formación de callo, (d) Nivel 4: Abundante formación de callo

## 2.5. Suspensiones celulares

### 2.5.1. Establecimiento de las suspensiones celulares

Una vez determinado el medio de cultivo idóneo para una adecuada producción de callo, se procedió a utilizar el mismo omitiendo el agar.

Para el establecimiento de las suspensiones celulares se transfirió aproximadamente 1 g en peso de callo a un Erlenmeyer estéril de 100 ml con 20 ml de medio de cultivo idóneo compuesto por líquido B5 mas vitaminas, suplementado con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ, en



## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

agitación orbital permanente a 110 rpm incubado a una temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  con una intensidad de luz entre 1500 luxes a 2000 luxes, hasta obtener una densidad celular entre 80 000 a 100 000 células por mililitro. Si la suspensión no alcanza esta densidad celular se elimina el callo por decantación se repone el medio evaporado con medio fresco y se lo mantiene en las mismas condiciones antes mencionadas.

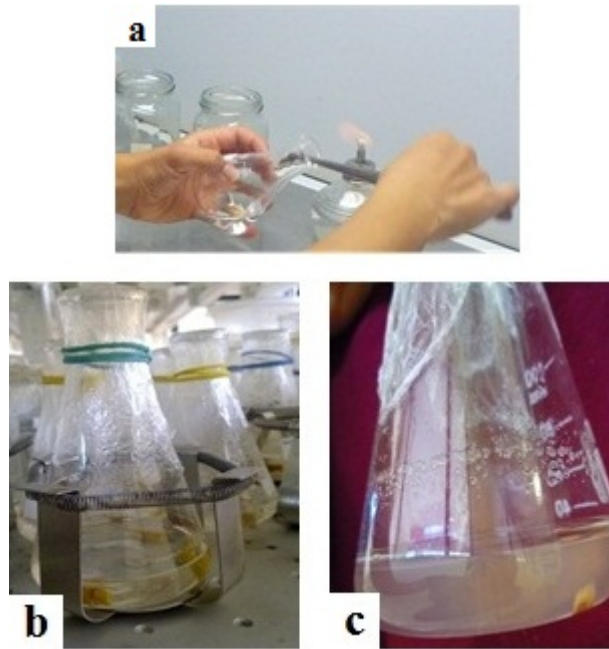


Figura 2.7: Establecimiento de la suspensión celular de *Chenopodium ambrosioides* (a) introducción de callo a medio líquido (b) agitación (c) resultado después de la agitación.

Regularmente se realizó una inspección visual para determinar posibles contaminaciones. Una vez obtenida la densidad requerida en la suspensión celular se hizo un tamizado con una malla mesh N° 50 para eliminar los residuos de callos, agregados grandes de células y tener una suspensión homogénea.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

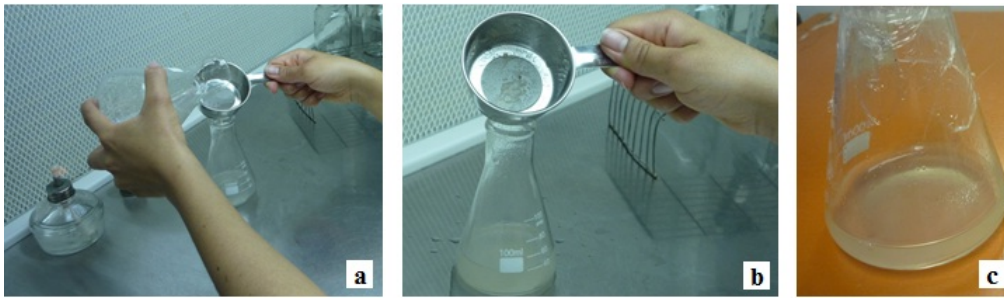


Figura 2.8: Inicio de la suspensión celular de *Chenopodium ambrosioides*.(a) y (b) tamizado de la suspensión celular (c) resultado después del tamizado.

### 2.5.2. Recuento celular

Una vez establecida la suspensión celular homogénea se reemplazó el 50% de medio antiguo por medio fresco y se calculó la densidad celular (número de células por mililitro) mediante el conteo directo de células en la cámara Neubauer empleando el método de Lugo (2004), con un microscopio óptico marca Olympus modelo BX-48. Se tomó 15  $\mu$ l de suspensión celular cuya muestra se la colocó en el centro del dispositivo y sobre este un cubre objetos, procurando una distribución homogénea de las células y evitando la formación de burbujas (figura 2.9).

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

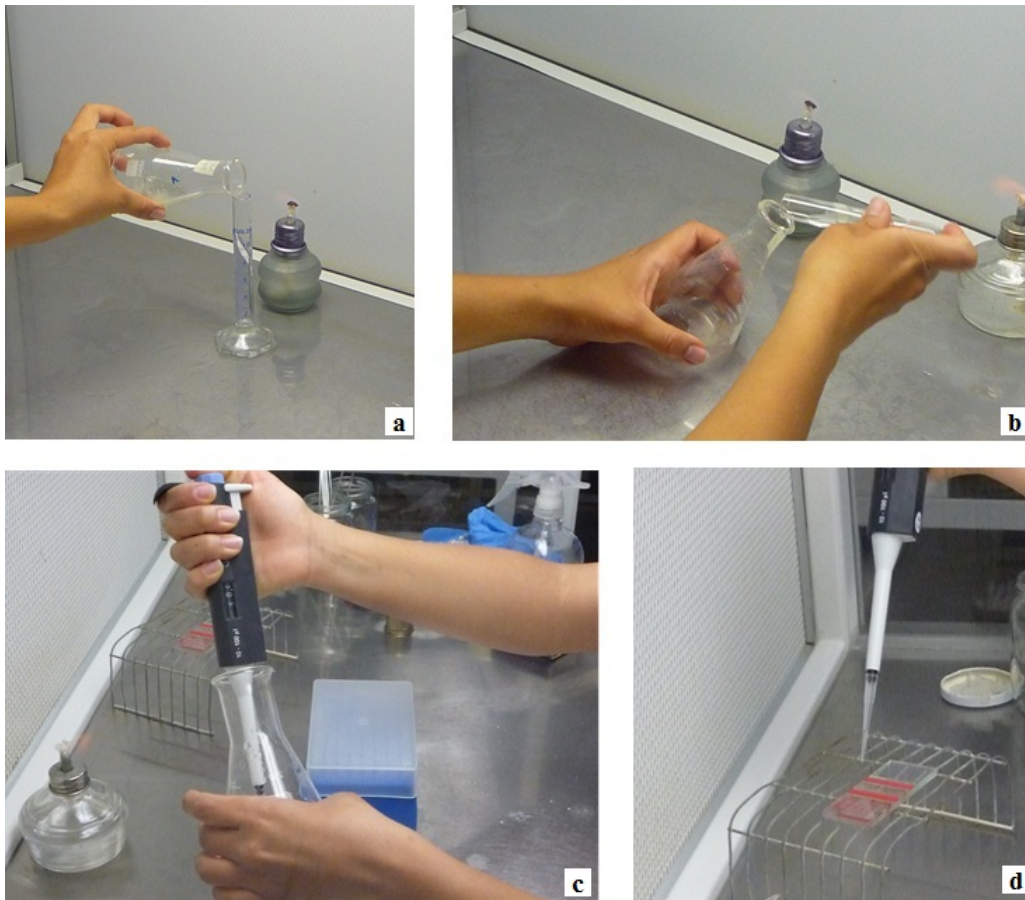


Figura 2.9: Proceso para la contabilización celular de la suspensión de *Chenopodium ambrosioides* (a) eliminación de medio antiguo (b) reposición con medio nuevo (c) toma de muestra (d) contabilización en cámara Neubauer.

Se tomó lecturas de cinco cuadros grandes de la cámara Neubauer, cuatro esquineros y uno central como se muestra en la figura 2.10 resaltados de color celeste y señalados con la letra “L”. El número de células por volumen se calculó utilizando la fórmula siguiente:

$$\frac{cell}{ml} = \frac{\overline{X_c}}{V} \quad (2.1)$$

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

donde:

$$\overline{X}_c = \text{promedio de células contadas}$$

$$V = 10^{-4}ml$$

El volumen ( $V$ ) se obtiene de multiplicar el área del cuadro grande ( $L$ )  $1mm^2$  por la profundidad de la cámara  $0.1mm$ .

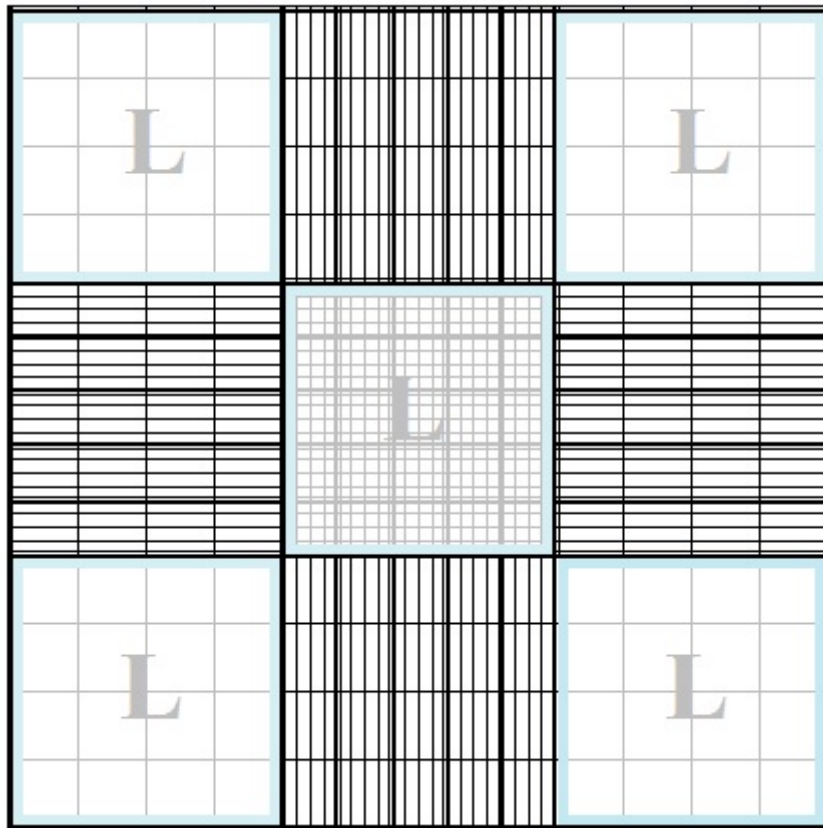


Figura 2.10: Cuadros en la cámara Neubauer para conteo de células

### 2.5.3. Determinación de la cinética celular

El conteo celular se lo realizó pasando un día durante 30 días consecutivos. Los datos obtenidos se ajustaron a  $10^5$  células por mililitro y se dibujó la curva de crecimiento celular en suspensión de *Chenopodium ambrosioides*, en donde el eje x corresponde al tiempo en días y el eje y a la densidad celular expresada en número de células por mililitro. Se utilizó este procedimiento de conteo con tres suspensiones celulares a la vez, con densidad inicial entre  $4 \cdot 10^4$  a  $5 \cdot 10^4$ , cuyos valores se promediaron y mediante la aplicación de métodos de interpolación se obtuvo la curva de crecimiento celular junto con su ecuación representativa.

### 2.5.4. Mantenimiento de la suspensión celular

Una vez determinado el punto óptimo celular deseado en la curva de crecimiento celular es necesario realizar un subcultivo, para lo cual se reemplazó 50 % de la suspensión antigua con medio fresco bajo las mismas condiciones físicas que la suspensión original. Este procedimiento se realizó en condiciones asépticas dentro de una cámara de flujo laminar con todo el material a utilizar esterilizado en autoclave.

## 2.6. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico InfoStat<sup>1</sup> versión 2012 para el análisis de los datos obtenidos durante la investigación y como herramienta adicional la hoja electrónica Microsoft Excel.

---

<sup>1</sup>Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

En este proceso se realizó un análisis exploratorio de datos utilizando tablas de contingencia y gráficas de proporción. Posteriormente para registrar y analizar la relación entre las variables estudiadas se hizo un análisis inferencial de datos utilizando análisis de varianza para probar la existencia de una diferencia estadística entre los diferentes tratamientos realizados, una prueba de Tukey para determinar los grupos estadísticos, seguido de un análisis de regresión logística para entender el nivel de relación, complementado con un análisis de correspondencia para determinar gráficamente la asociación para dichas variables que presentaron relación. Finalmente se hizo una prueba de Kruskal Wallis para determinar el mejor tratamiento.

Cada análisis inferencial incluye una prueba de Shapiro Wilks junto con una gráfica de cuartiles para determinar la normalidad. Cabe recalcar que en todas las pruebas estadísticas se consideró un índice de significancia del 5%.

Para determinar la curva y las ecuaciones representativa de la cinética de crecimiento celular, se aplicó varios métodos matemáticos con la ayuda del Excel 2010 y para los análisis de regresión se utilizó el programa CurveExpert 1.4 <sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup>CurveExpert Versión 1.40, 32-bit package, Copyright 1995-2009 by Daniel Hyams.

## 3 RESULTADOS

El estudio investigativo para el “Establecimiento de suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* para una futura obtención de metabolitos secundarios, empleando la citoquinina thidiazuron (TDZ)” se realizó en cuatro etapas sucesivas. Primero la estandarización del protocolo de desinfección de los explantes, luego el medio de cultivo más apropiado para la inducción de callo seguido por el establecimiento de las suspensiones celulares y finalmente la determinación de la cinética celular.

### 3.1. Etapa de desinfección

Durante esta etapa se probó seis tratamientos de desinfección cuya variación entre ellos es la concentración de cloro y tiempo de inmersión los cuales están descritos en el cuadro 2.1. La evaluación de esta etapa se realizó a través de las variables de contaminación y clorosis de cada uno de los explantes de *Chenopodium ambrosioides* introducidos en frascos individuales. Estas variables fueron analizadas mediante tablas de contingencia, gráficos de proporciones, análisis de varianza, prueba de Tukey, análisis de normalidad, prueba de regresión logística y análisis de correspondencia.

### 3.1.1. Contaminación

#### 3.1.1.1. Análisis exploratorio de datos

Para la variable contaminación se efectuó inicialmente un análisis exploratorio de los datos obtenidos con la finalidad de tener un entendimiento básico y general de la respuesta que estos están generando antes de aplicar cualquier técnica estadística. Los datos se organizaron en una tabla de frecuencias absolutas y una tabla de contingencia que se muestra en el cuadro A.1 y cuadro A.2, respectivamente en el anexo A. El primer cuadro muestra la cantidad de unidades experimentales contaminadas y no contaminadas para cada una de las concentraciones de NaClO probadas con un total de 60 muestras. Este cuadro muestra que de los 11 explantes contaminados, 10 se obtuvo con 1 % de NaClO y cabe recalcar que para los tratamientos que se utilizó 1.5 % de NaClO se obtuvo 29 explantes no contaminados de un total de 30 unidades, dándonos a notar que puede existir una alta efectividad con este porcentaje de NaClO. En el segundo cuadro se muestra el porcentaje de explantes no contaminados en relación al porcentaje de NaClO utilizado y los diferentes tiempos de inmersión. Este cuadro muestra claramente una efectividad relativa del 100 % a los 15 min y 20 min de inmersión con 1.5 % de NaClO. Sin embargo el 90 % y 80 % de explantes no contaminados tampoco es despreciable para los tratamientos de 1.5 % en 10 min y 1 % en 20 min, respectivamente. Aparentemente el menor porcentaje de eficacia se presenta con un 50 % de no contaminados para el tratamiento con 1 % de NaClO y 10 min de inmersión.

El cuadro A.2 está representado gráficamente en la figura 3.1 en el que se observa tres líneas, cada una representa a un tiempo de inmersión utilizado, sus tendencias dan a notar que a medida que aumenta el porcentaje de NaClO aumenta el porcentaje de explantes no contaminados.



### 3 RESULTADOS

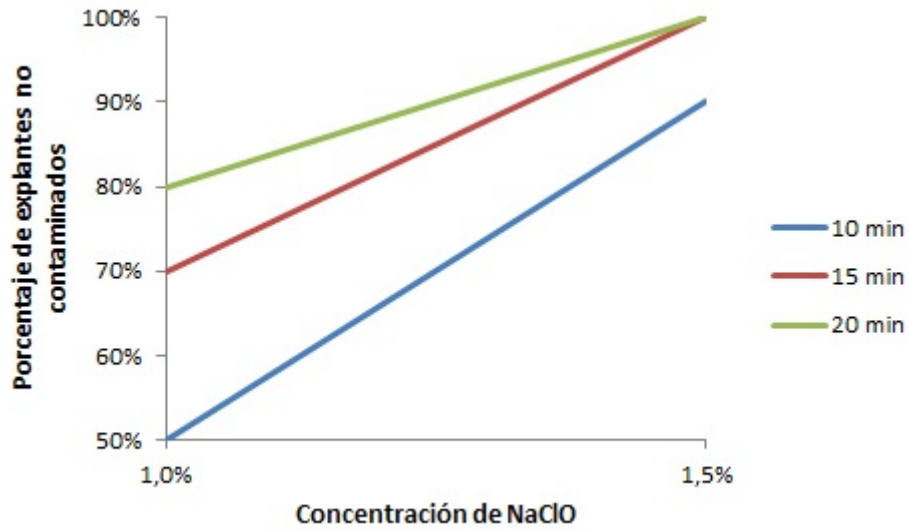


Figura 3.1: Porcentaje de explantes no contaminados versus la concentración de NaClO

Adicionalmente la figura 3.2. presenta el porcentaje de explantes no contaminados en relación al tiempo de inmersión. En este se observa dos líneas cada una representa a las dos concentraciones de NaClO probadas; se ve claramente que la línea roja genera los mayores porcentaje de explantes no contaminados y se puede presumir que la efectividad del tratamiento al 1.5 % con el tiempo de inmersión de 15 min o de 20 min es la misma. Además aparentemente muestra que la desinfección con tiempos de inmersión en NaClO entre 10 min y 15 min son mucho más efectivos. La tendencia de las dos líneas al parecer muestran que a mayor tiempo de inmersión en NaClO genera mayor porcentaje de explantes no contaminados.

### 3 RESULTADOS

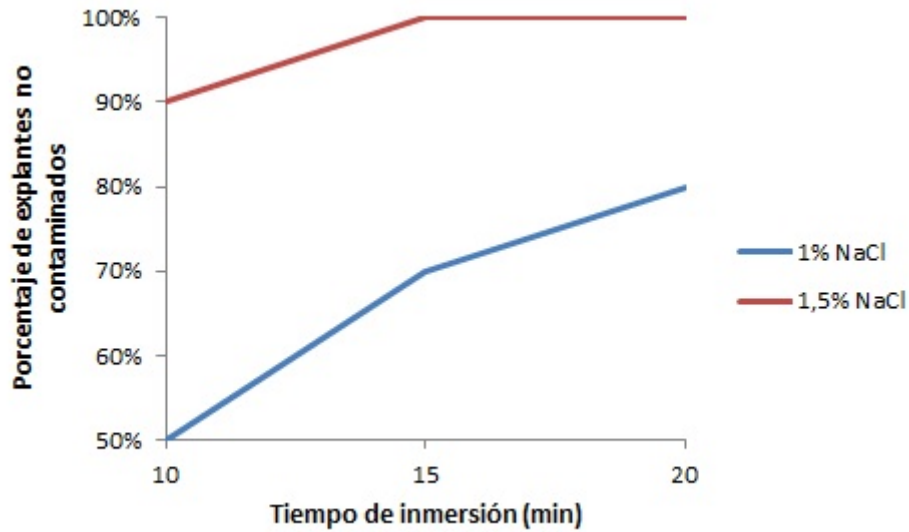


Figura 3.2: Porcentaje de explantes no contaminados versus el tiempo de inmersión

Adicionalmente se muestra la figura 3.3 que representa la distribución de frecuencias de los factores aplicados (concentración de NaClO y tiempo de inmersión), evidenciando que la concentración al 1.5 % de NaClO puede lograr ser eficiente para el proceso de desinfección ya que generan los porcentajes más altos de explantes no contaminados. Además hay una tendencia general que a mayor concentración y mayor tiempo de inmersión hay mayor porcentaje de no contaminados.

### 3 RESULTADOS

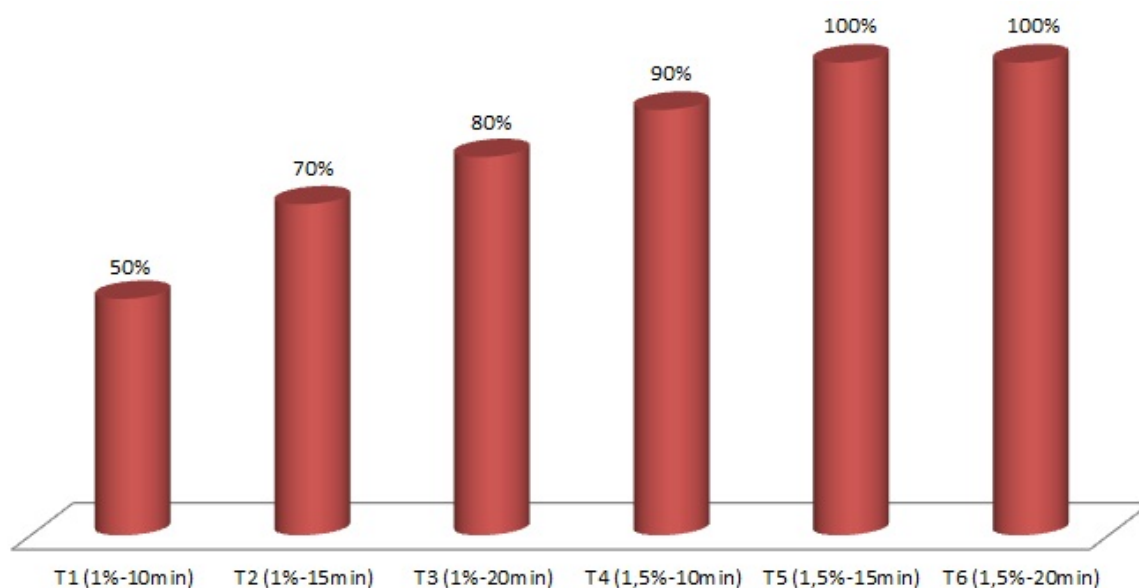


Figura 3.3: Porcentaje de explantes no contaminados de cada tratamiento aplicado

#### 3.1.1.2. Análisis inferencial

En esta etapa se utilizó varias pruebas de la estadísticas inferencial para deducir propiedades de la población estadística a partir de la muestras tomadas. Primeramente se hizo un análisis de varianza para verificar si hay relación estadísticamente significativa entre la variable dependiente de contaminación y las variables independientes de cloro y tiempo, empleando un nivel de significancia de  $\alpha=5\%$ . En el caso de la variable cloro se obtiene un valor p del 0.19% por lo que se rechaza la hipótesis nula, es decir, la concentración de NaClO influye significativamente en el nivel de contaminación obtenido. Sin embargo para la variable tiempo se obtiene un valor p del 18.33% aceptando la hipótesis nula y mostrando que la contaminación de los explantes no dependen del tiempo de inmersión utilizado.

### 3 RESULTADOS

Cuadro 3.1: Análisis de varianza para la variable contaminación

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,88	5	0,38	2,86	0,0229
Cloro	1,35	1	1,35	10,27	0,0023
Tiempo	0,43	2	0,22	1,65	0,2020
Cloro*Tiempo	0,10	2	0,05	0,38	0,6855
Error	7,10	54	0,13		
Total	8,98	59			

Seguidamente se hizo una prueba de Tukey para identificar las diferencias entre medias de cada tratamiento ejecutado. En el cuadro 3.2 se observa los resultados mostrando dos grupos estadísticamente diferentes. En el grupo A se encuentra el tratamiento T1 al 1% de NaClO y 10 min de inmersión. Los tratamientos T2, T3 y T4 comparten sus medias entre el grupo A y el grupo B, mientras que los tratamientos T5 y T6 sus medias se encuentran en el grupo B. Las mejor media es uno que lo tienen el tratamiento T5 al 1.5% NaClO con 15 min de inmersión y el tratamiento T6 al 1.5% NaClO con 20 min de inmersión.

Cuadro 3.2: Prueba de Tukey para la variable contaminación

Error: 0,1315 gl: 54					
Cloro	Tiempo	Medias	n	E.E.	
1,0	10	0,50	10	0,11	A
1,0	15	0,70	10	0,11	A B
1,0	20	0,80	10	0,11	A B
1,5	10	0,90	10	0,11	A B
1,5	20	1,00	10	0,11	B
1,5	15	1,00	10	0,11	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Las deducciones estadísticas anteriores se ven afectadas ya que al realizar pruebas de normalidad con una gráfica de cuartiles (figura A.1) se obtiene una figura donde los residuos no van a ser homocedásticos <sup>1</sup>, lo que nos lleva a la afirmación de que la técnica

<sup>1</sup>Se refiere a que los errores de todas las observaciones muestrales tienen varianzas iguales.

### 3 RESULTADOS

de estimación por mínimos cuadrados dejará de ser un método óptimo de estimación. Además la prueba de Shapiro Wilks, mostrado en el anexo A cuadro A.7 , muestra un valor p del 0.01 % rechazando la hipótesis nula de normalidad y concluyendo que no hay una distribución normal de los datos. Consecuentemente se realiza un análisis no paramétrico utilizando un modelo regresión logística mostrado en el cuadro 3.3 que nos ayuda a identificar si hay relación y el nivel de relación que tienen las variables. En el caso de la variable cloro se obtiene un valor p del 1.08 % por lo que se rechaza la hipótesis nula, es decir, existe suficiente evidencia para afirmar que la concentración de NaClO influye significativamente en el nivel de contaminación obtenido. Esta prueba asimismo revela un OR (odds ratio) cuyo valor cuantifica la asociación entre las dos variables, para la variable cloro este es bastante mayor a uno, es decir, que un incremento del 0.5 % más en la concentración de NaClO mostrará aproximadamente 147 explantes no contaminados por cada explante contaminado. Sin embargo, para la variable tiempo se obtiene un valor p del 6.99 % aceptando la hipótesis nula y mostrando que la contaminación de los explantes no dependen del tiempo de inmersión utilizado. Adicionalmente, posee un OR que vale aproximadamente uno, mostrando que cada minuto de inmersión que pase se obtiene un explante contaminado por un explante no contaminado.

Cuadro 3.3: Regresión logística para la variable contaminación

Parámetros	Est.	E.E.	O.R.	Wald LI(95%)	Wald LS(95%)	Wald Chi <sup>2</sup>	p-valor
Constante	-7,55	2,92	5,3E-04	1,7E-06	0,16	6,68	0,0097
Cloro	5,68	2,23	293,75	3,72	23168,27	6,50	0,0108
Tiempo	0,17	0,10	1,19	0,99	1,44	3,28	0,0699

A fin de mostrar gráficamente la relación de dependencia existente de la variable cloro y la variable contaminación se realizó un análisis de correspondencia mostrado en la figura 3.4, el cual presenta un diagrama cartesiano junto con puntos que representan las variables respectivas, de forma que la proximidad entre puntos representados está

### 3 RESULTADOS

relacionado con el nivel de asociación entre dichas modalidades. En este caso, se observa que el cloro al 1% representado por el número 1 en azul está un poco más cerca de la contaminación representado por el valor de 0 en rojo, en su defecto la segunda concentración de 1.5% representado por el número 2 en azul tiene una relación más estrecha con la no contaminación de los explantes representado por el número 1 en rojo.

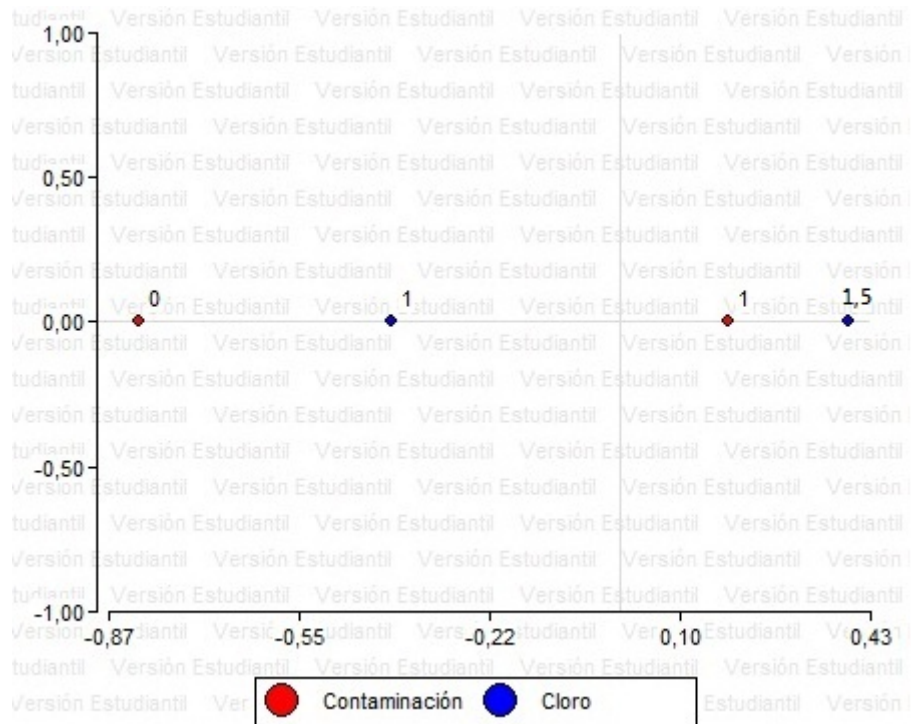


Figura 3.4: Análisis de correspondencia entre la concentración de NaClO y la contaminación

#### 3.1.2. Clorosis

##### 3.1.2.1. Análisis exploratorio de datos

Para los datos obtenidos en la variable clorosis se organizaron dentro de una tabla de frecuencias absolutas expuesto en el anexo A cuatro A.9, dividido en explantes viables, es decir sin clorosis, y no viables, es decir explantes afectados por el cloro, con respecto

### 3 RESULTADOS

a la concentración de NaClO con un total de 60 unidades experimentales de estas 30 muestras representan a los ensayos realizados al 1 % de NaClO y las otras 30 son al 1.5 % de NaClO. Este cuadro muestra que la mayor cantidad de explantes viables los aporta la concentración al 1 % de NaClO, con 22 explantes. La mayor cantidad de explantes afectados se posiciona en la concentración al 1.5 % de NaClO con 16 explantes de un total de 24 no viables.

En el cuadro A.9 anexo A se muestra una tabla de contingencia en porcentajes para los explantes sin clorosis, los cuales se convierten en explantes viables. Los mayores porcentajes de viabilidad se dan con 10min de inmersión al 1 % y 1.5 % de NaClO con 100 % y 90 % de explantes sin clorosis respectivamente, seguido de un 70 % de viabilidad con 15 min de inmersión en una concentración al 1 % de NaClO. El menor porcentaje de viabilidad fue del 10 % alcanzado en el tratamiento T6 con 20 min de inmersión en NaClO al 1,5 %. Esta tabla se observa gráficamente en figura 3.5 cuyo eje x representa a la concentración de NaClO y el eje y al porcentaje de explantes viables, de este se puede percibir por la tendencia lineal que mientras va aumentando la concentración de NaClO hay mayor número de explantes afectados con clorosis. Sin embargo esta figura muestra que al aumentar la concentración de NaClO con un tiempo de inmersión de 10 min la viabilidad no se ve muy afectada ya que su pendiente aparentemente es reducida.

### 3 RESULTADOS

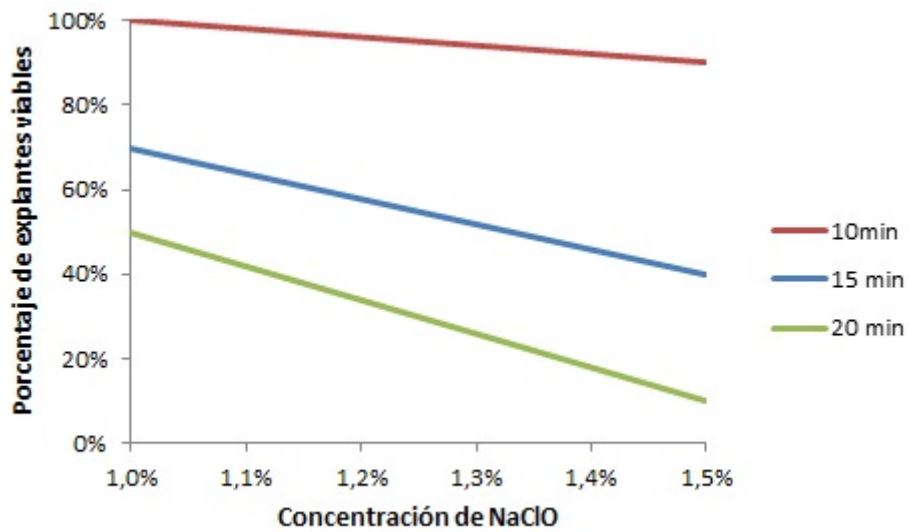


Figura 3.5: Porcentaje de explantes viables versus la concentración de NaClO

En la figura 3.6 se muestra el porcentaje de explantes viable, sin clorosis, mientras va variando el tiempo de inmersión, la tendencia lineal muestra que ha mayor tiempo de inmersión va disminuyendo la viabilidad. La tendencia lineal que generan los tratamientos con 1.5 % de cloro es drásticamente descendiente en el tiempo por lo que se presume que por cada minuto de inmersión la cantidad de explantes afectados con clorosis mayor.



### 3 RESULTADOS

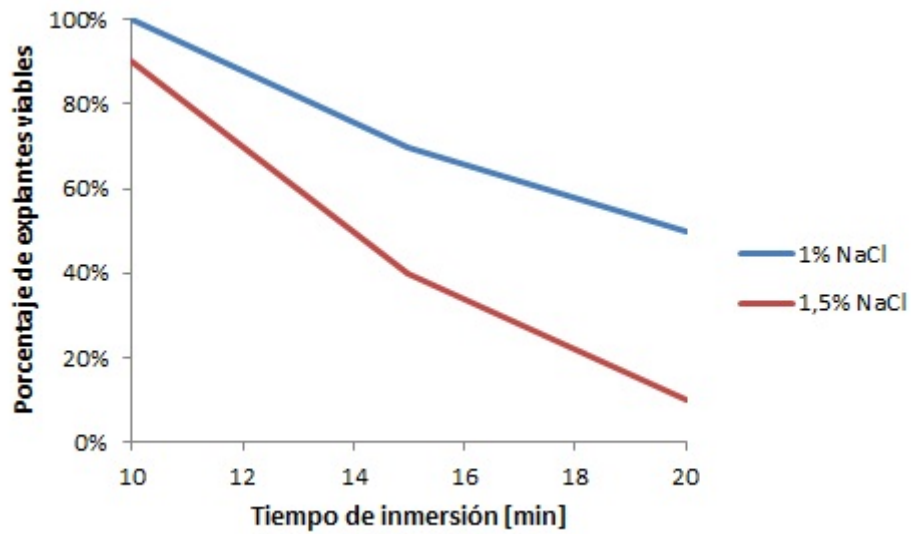


Figura 3.6: Porcentaje de explantes no contaminados versus el tiempo de inmersión

Adicionalmente la figura 3.7 presenta una distribución de frecuencias de los tratamientos aplicados en el estudio (concentración de NaClO y tiempo de inmersión), evidenciando los más altos porcentajes de viabilidad en los tratamientos T1 al 1% de NaClO con 10 min de inmersión y el tratamiento T5 al 1.5% de NaClO con 15 min de inmersión. El menor porcentaje fue del 10% que lo presenta el tratamiento T6 al 1.5% con 20 min de inmersión.

### 3 RESULTADOS

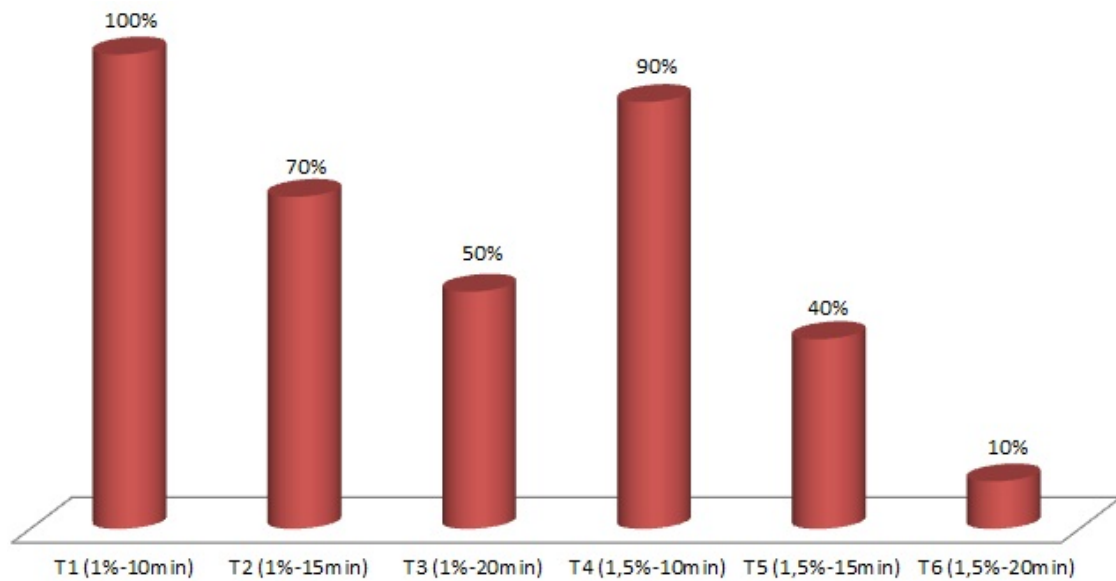


Figura 3.7: Porcentaje de explantes viables de cada tratamiento aplicado

#### 3.1.2.2. Análisis inferencial

En este análisis se utilizó estadística inferencial para deducir propiedades de la población estadística a partir de las muestras tomadas. Inicialmente se presenta un análisis de varianza en el cuadro 3.4 para verificar si hay relación estadísticamente significativa entre la variable dependiente clorosis y las variables independientes de concentración de cloro y tiempo de inmersión, empleando un nivel de significancia  $\alpha=5\%$ . Con la variable cloro se obtuvo un valor p del 0.91% por lo que se sugiere el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias y existe evidencia muestral para decir que la concentración de NaClO influye significativamente en el daño por clorosis de los explantes. En el caso de la variable tiempo de inmersión se encuentra un valor p menor 0.01%, cuyo valor es menor al nivel de significancia, sugiriendo el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias de tratamientos y afirmando que hay un efecto estadísticamente significativo del tiempo de inmersión sobre el número de explantes con clorosis.

### 3 RESULTADOS

Cuadro 3.4: Análisis de varianza para la variable clorosis

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,92	5	1,18	7,53	<0,0001
Cloro	1,15	1	1,15	7,33	0,0091
Tiempo	4,63	2	2,32	14,75	<0,0001
Cloro*Tiempo	0,24	2	0,12	0,75	0,4763
Error	8,48	54	0,16		
Total	14,40	59			

Se utilizó una prueba de Tukey para identificar grupos estadísticos según las diferencias entre medias de cada tratamiento ejecutado, en el cuadro 3.5 se observa los resultados mostrando tres grupos distintos. En el grupo A se encuentra el tratamiento T6 al 1.5 % de NaClO con un tiempo de inmersión de 20 min, el tratamiento T5 al 1.5 % de NaClO con un tiempo de inmersión de 15 min forma parte del grupo A y B, el tratamiento T6 al 1 % de NaClO con 20 min de inmersión comparte sus media con los tres grupos mientras que los tratamientos T2 y T4 al 1 % de NaClO con 15 min y 1.5 % de NaClO con 10 min, respectivamente, comparten el grupo B y el grupo C. Por su parte el tratamiento T1 genera la mejor media de uno correspondiente al 1 % de NaClO con 10 min de inmersión y se encuentra en el grupo C.

Cuadro 3.5: Prueba de Tukey para la variable clorosis

Error: 0,1630 gl: 54					
Cloro	Tiempo	Medias	n	E.E.	
1,5	20	0,10	10	0,13	A
1,5	15	0,40	10	0,13	A B
1,0	20	0,50	10	0,13	A B C
1,0	15	0,70	10	0,13	B C
1,5	10	0,90	10	0,13	B C
1,0	10	1,00	10	0,13	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Con el objetivo de corroborar los datos obtenidos se realiza una una gráfica de normalidad

### 3 RESULTADOS

(figura A.2) que permite una visualización previa de los residuos observando para los datos obtenidos en la variable clorosis son normales. Con la prueba de Shapiro Wiliks (cuadro A.15) se obtiene un valor p del 7.30 % donde la hipótesis nula no se rechazar porque el valor calculado es mayor al 5%, por lo tanto se afirma la normalidad de los datos dando fiabilidad a las presunciones arrojados por las anteriores pruebas. Para analizar el nivel de relación de variable dicotómica de respuesta clorosis frente a las variables regresoras: concentración de cloro y el tiempo de inmersión se hizo una regresión logística, ver cuadro 3.6. Así se obtiene para el cloro un valor p del 1.23 %, siendo este menor al  $\alpha$ , se rechaza la hipótesis de que no hay ningún efecto significativo. Además, se obtiene un OR diferente de la unidad que nos lleva a aseverar que la concentración de cloro influye significativamente sobre la viabilidad de los explantes, matemáticamente, si hay un aumento del 0.5 % en la concentración de cloro se calcula que por cada explante sin clorosis se obtendrá 100 con clorosis. Con respecto al tiempo se obtiene un valor p del 0,0001 mucho menor al  $\alpha=0.05$  existiendo evidencia estadística que sugiere el rechazo de que el tiempo no influye en la clorosis de los explantes. Con el fin de analizar el nivel de relación se observa que el OR=0.66, muestra que por cada 0.5 % de aumento en la concentración de cloro se obtendrá aproximadamente 1 explantes sin clorosis por cada 3 explantes afectados por el cloro.

Cuadro 3.6: Regresión logística para la variable clorosis

Parámetros	Est.	E.E.	O.R.	Wald	LI (95%)	Wald	LS (95%)	Wald	Chi <sup>2</sup>	p-valor
Constante	11,95	3,26	155351,22	258,72		93282196,06		13,41	0,0003	
Cloro	-3,94	1,57	0,02	9,0E-04		0,43		6,27	0,0123	
Tiempo	-0,42	0,11	0,66	0,53		0,82		14,51	0,0001	

Con un análisis de correspondencia se puede mostrar gráficamente el nivel de relación, para los no contaminados que están en valor 1 en rojo está mucho más cerca de la menor concentración de cloro y muy alejado de la concentración de 1.5 % de NaClO.

### 3 RESULTADOS

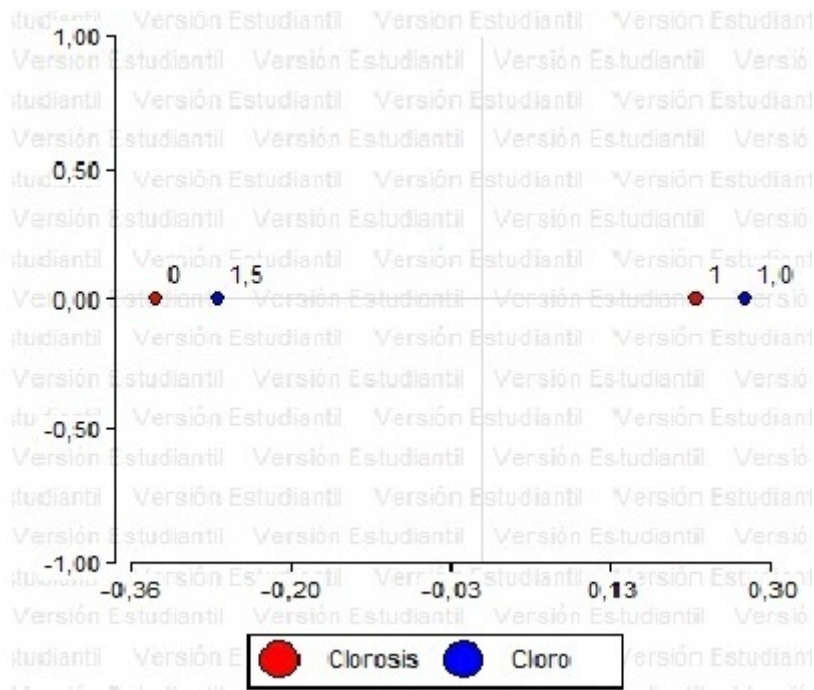


Figura 3.8: Análisis de correspondencia entre la concentración de NaClO y la clorosis

Finalmente para determinar el mejor tratamiento según las dos variables de evaluación, contaminación y clorosis, se muestra la figura 3.9 donde se presentan los el porcentaje de explantes vs los tratamientos aplicados, evidenciando como al tratamiento 4 con el mayor porcentaje de viabilidad y de no contaminados.

### 3 RESULTADOS

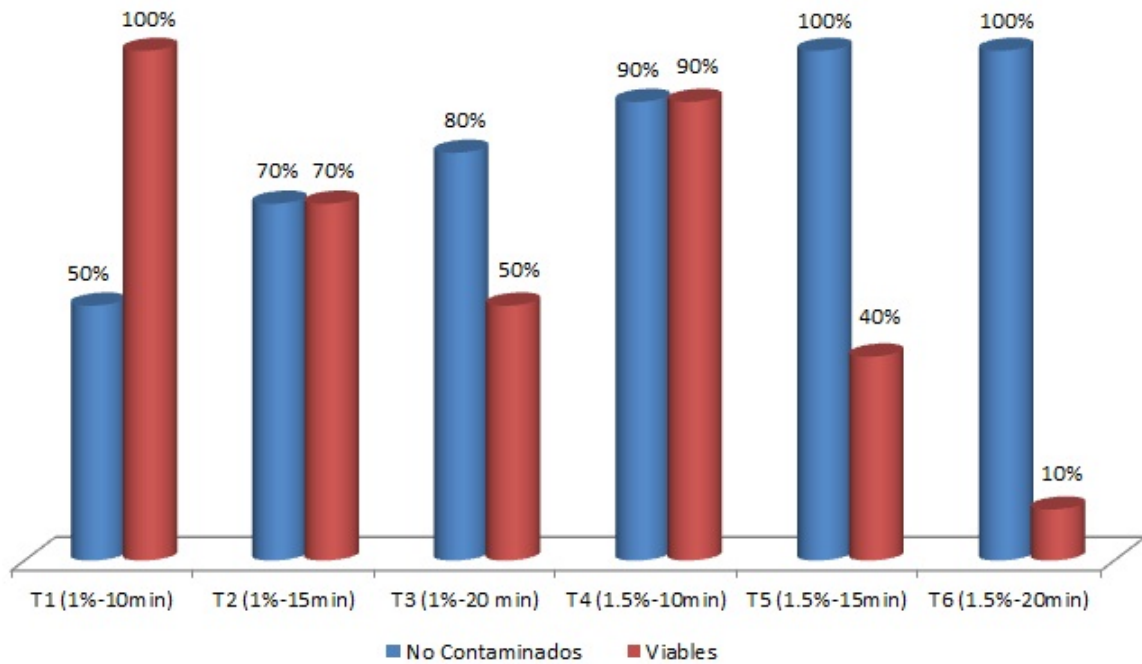


Figura 3.9: Porcentaje de explantes viables y no contaminados de cada tratamiento aplicado

Debido a que los datos son dicotómicos se utiliza la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis mostrado en el cuadro 3.7, el cual con su media más alta de 1.80, indica al tratamiento 4 como el mejor tratamiento para la fase de desinfección con 1.5% de concentración en cloro y 10 min de tiempo de inmersión.

Cuadro 3.7: Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Cloro	Tiempo	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Éxito	1,0	10	10	1,50	0,53	1,50	7,92	0,0543
Éxito	1,0	15	10	1,40	0,52	1,00		
Éxito	1,0	20	10	1,30	0,48	1,00		
Éxito	1,5	10	10	1,80	0,42	2,00		
Éxito	1,5	15	10	1,40	0,52	1,00		
Éxito	1,5	20	10	1,10	0,32	1,00		

### 3 RESULTADOS

## 3.2. Inducción de callo

En esta etapa se observó la formación de callos con una coloración beige - amarillento y algunos presentaron matices de color rojizo.

### 3.2.1. Análisis exploratorio

Inicialmente en esta etapa se presenta un gráfico de porcentajes individuales, ver figura 3.10 para cada nivel de callo establecido en el cuadro 2.6 junto con cada tratamiento determinado en el cuadro 2.5. Se observa que en el tratamiento control denominado E 0 (TDZ 0 mg L<sup>-1</sup>) ningún explante muestra reacción alguna. Los tratamientos E 2 con TDZ 1 mg L<sup>-1</sup> y E 4 con TDZ 2 mg L<sup>-1</sup> arrojan los mismos resultados de producción de callo que son 60 % para poca formación de callo y 40 % formación media. El tratamiento E 5 produce el mayor porcentaje de callo nivel 2 y los tratamientos E 2, E 3 y E 4 producen un 40 % de callo nivel 3, es decir callo con mediana formación. El único tratamiento que se observa callo nivel 4 es el E 1 con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de TDZ en un 20 % y a su vez es el que genera el mayor porcentaje de callo nivel 3 con un 80 % de explantes en este estado.

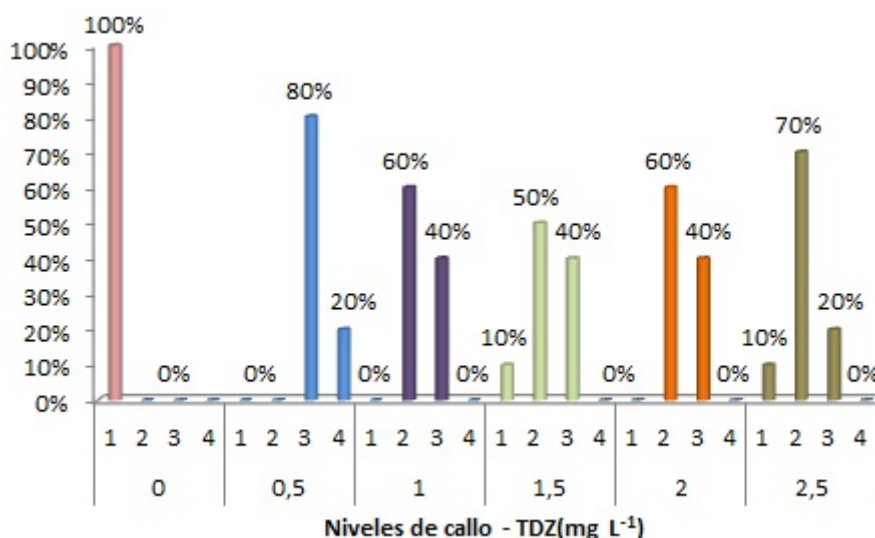


Figura 3.10: Porcentaje nivel de callo con respecto a la cantidad de TDZ

### 3 RESULTADOS

También se obtuvo la figura 3.11 que representa las medias obtenidas con cada concentración de TDZ, en este se observa que los tratamientos con una concentración entre  $1 \text{ mg L}^{-1}$  y  $2 \text{ mg L}^{-1}$  no hay mayor diferencia, con una concentración de  $2.5 \text{ mg L}^{-1}$  decae la producción de callo. La concentración de  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ es el mayor pico por lo que es el que produce la mayor cantidad de callo. Hay que recalcar que todos los tratamientos con la hormona TDZ generan callo lo que el tratamiento control no lo hace.

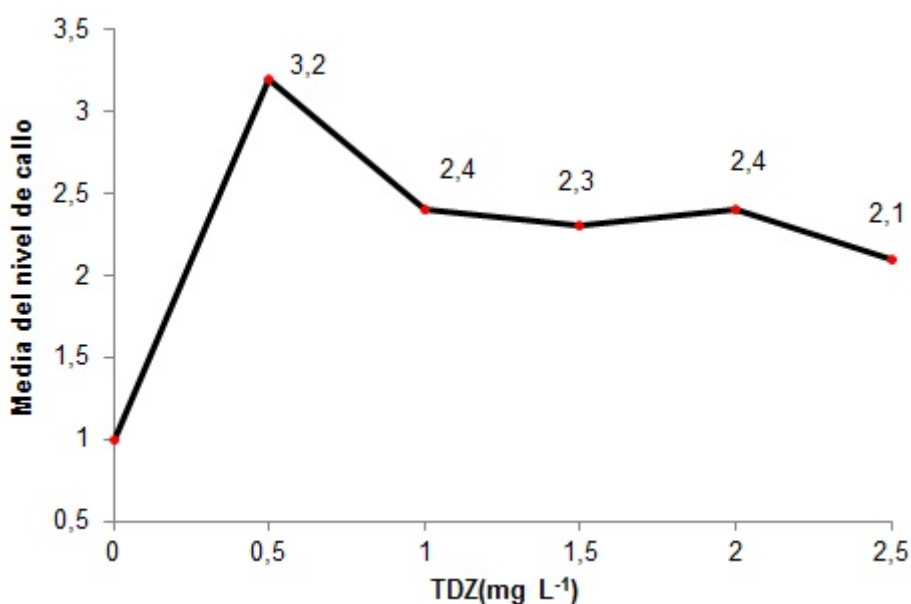


Figura 3.11: Media aritmética del nivel de callo versus la concentración de TDZ

#### 3.2.2. Análisis inferencial

Se usa este para deducir cual de todos los tratamientos utilizados es el mejor. De acuerdo al análisis de varianza realizado, se encontró un valor bajo de significancia ( $p < 0.01\%$ ) ver cuadro 3.8, evidenciando al existencia de una diferencia estadística entre al menos uno de los tratamientos evaluados.



### 3 RESULTADOS

Cuadro 3.8: Análisis de varianza para la variable inducción de callo

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	25,33	5	5,07	20,42	<0,0001
Tratamiento	25,33	5	5,07	20,42	<0,0001
Error	13,40	54	0,25		
Total	38,73	59			

Posteriormente se hizo una prueba de Tukey (cuadro 3.9) donde se encontró 3 grupos estadísticos. El grupo A con el tratamiento E 0 el cual es el tratamiento control, el grupo B con los tratamientos desde E2 hasta E5 sin ninguna diferencia significativa y el grupo C con el tratamiento E1 correspondiente a la media más alta y en su defecto representando el mejor tratamiento.

Cuadro 3.9: Prueba de Tukey para la variable inducción de callo

Error: 0,2481 gl: 54				
TDZ [mg/L]	Medias	n	E.E.	
0,0	1,00	10	0,16	A
2,5	2,10	10	0,16	B
1,5	2,30	10	0,16	B
2,0	2,40	10	0,16	B
1,0	2,40	10	0,16	B
0,5	3,20	10	0,16	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

Para determinar la normalidad de los datos se realizó un gráfico cuartil - cuartil (figura A.3, anexo A) donde se observa que las mayoría de datos están alejados de la línea de tendencia, dándonos una pauta de que los datos no siguen una normal. Posteriormente se hizo una prueba de Shapiro Wilks que exhibe un valor p menor a 0.01 % (cuadro A.16, anexo A) rechazando la hipótesis nula y enfatizando que los datos nos se ajustan a una normal.

Por lo tanto se hizo uso de la prueba no paramétrica Kruskal - Wallis que exhibe un

### 3 RESULTADOS

valor p menor a 0.01 % (cuadro 3.10) rechazando la hipótesis nula y determinando que los datos no han sido obtenidas de la misma población. Además, esta prueba sin asumir normalidad muestra tres grupos significativamente diferentes. El grupo A corresponde al tratamiento E 0 que representa al blanco. El grupo B corresponde a los tratamientos desde E 2, E 3, E 4 y E 5 los cuales son estadísticamente iguales y el grupo C representado con el tratamiento E 1. Finalmente, la prueba de Kruskal - Wallis es concluyente para estos datos mostrando al mejor tratamiento con la media más alta que corresponde el grupo C.

Cuadro 3.10: Prueba de Kruskal-Wallis para la variable inducción de callo

Variable	TDZ [mg/L]	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Nivel callo	0,0	10	1,00	0,00	1,00	32,30	<0,0001
Nivel callo	0,5	10	3,20	0,42	3,00		
Nivel callo	1,0	10	2,40	0,52	2,00		
Nivel callo	1,5	10	2,30	0,67	2,00		
Nivel callo	2,0	10	2,40	0,52	2,00		
Nivel callo	2,5	10	2,10	0,57	2,00		

Trat.	Ranks	
0,0	6,50	A
2,5	27,30	B
1,5	31,90	B
2,0	33,70	B
1,0	33,70	B
0,5	49,90	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ )

### 3.3. Suspensiones celulares

#### 3.3.1. Establecimiento de las suspensiones celulares

Una vez transferido el callo a medio líquido se buscó el establecimiento de las suspensiones celulares, tiempo en el cual las células se adaptan a las nuevas condiciones, es decir a un

### 3 RESULTADOS

medio líquido y agitación constante. Este proceso se realizó con un gramo callo en 20ml de medio B5 más vitaminas suplementado con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ y  $30 \text{ g L}^{-1}$  de azúcar en agitación permanente a 110 rpm. Durante el tiempo de adaptación de las células y cada tres semanas, se hizo una reposición de medio evaporado, obteniendo como resultado una suspensión de color blanquecino y translúcido, doce semanas después de iniciado el proceso. Al realizar el tamizado se obtuvo una suspensión homogénea sin agregados celulares como se aprecia en la figura 2.8 gráfico (c).

#### 3.3.2. Cinética celular

Una vez establecida la suspensión celular es indispensable determinar la cinética celular para identificar cual es el momento donde las células han agotado uno o todos los componentes del medio necesitando por tanto de medio de cultivo fresco para continuar sus procesos fisiológicos normales; para ello se realizó un recuento celular como se lo describió en el numeral 2.5.2 y como se muestra en figura 2.9.

En las figuras 3.12, 3.14 y 3.16 se representa gráficamente la cinética celular para las suspensiones uno, dos y tres respectivamente, cuyo datos se presenta en el anexo C.

Como apreciamos en la figura 3.12 la curva cinética de la suspensión celular uno muestra un retraso en su etapa inicial hasta el día cuatro con un aumento mínimo de la población, posteriormente se observa un aumento celular considerable hasta el día 16, luego el crecimiento es menor hasta el día 26 y a partir del día 27 se nota que empieza a bajar su densidad.

### 3 RESULTADOS

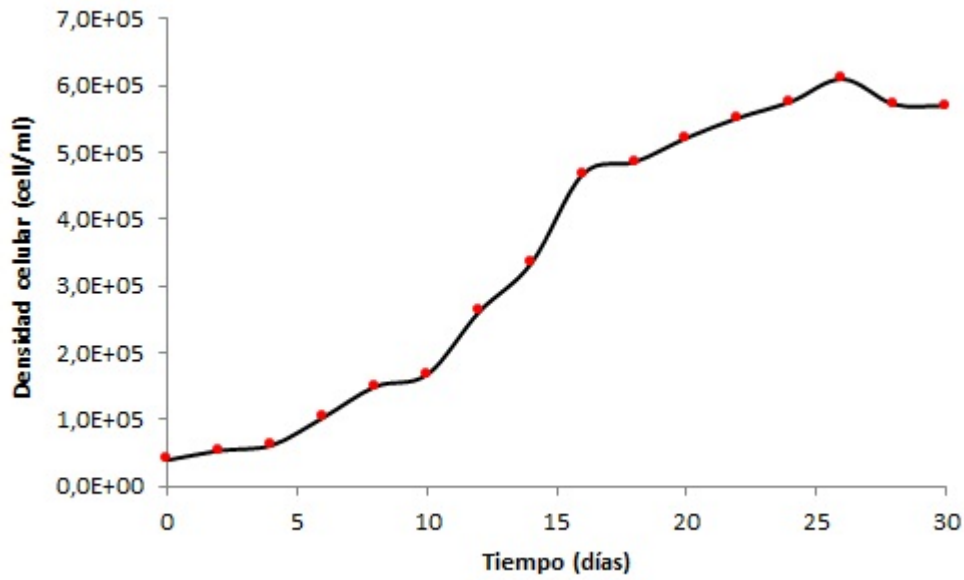


Figura 3.12: Curva de la cinética celular para la suspensión uno

Fruto del análisis de regresión con ayuda del programa CurveExpert 1.4 se obtiene la ecuación interpolante de la suspensión uno que se muestra a continuación y su figura 3.13 cuyo resultado fue una curva sigmoide con un coeficiente de correlación de 0.998.

$$y = \frac{5,8x10^5}{1+1,08x10^2e^{-0,347x}}$$

### 3 RESULTADOS

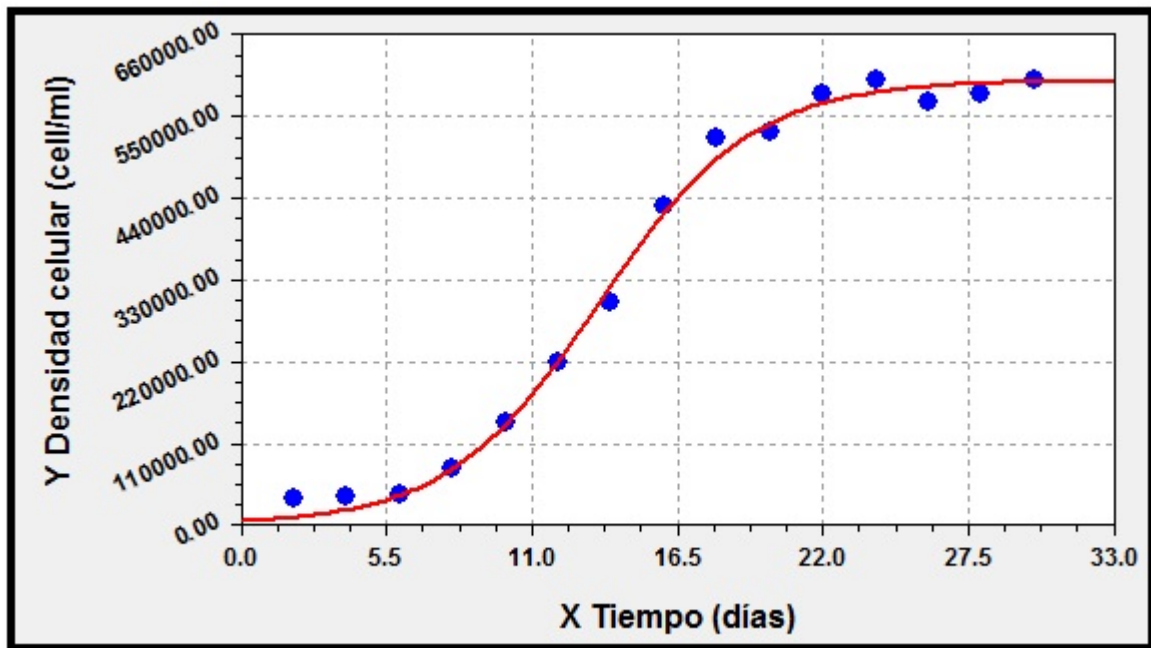


Figura 3.13: Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para la suspensión uno

En la figura 3.14 que representa la suspensión dos se observa que hay un aumento del número de células desde el primer día con una curva creciente moderada hasta el día quinto, luego hay un incremento acelerado de células hasta el día 16. A partir del día 17 hasta el 28 empieza a desacelerarse el incremento del número de células y para el día 30 se observa una una pequeña disminución en la densidad celular.

### 3 RESULTADOS

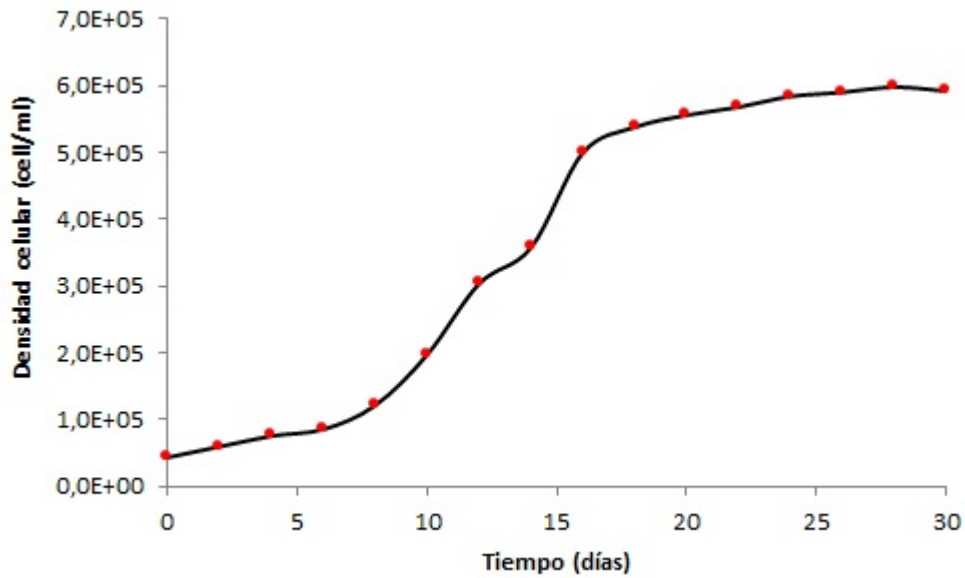


Figura 3.14: Curva de la cinética celular para la suspensión dos

Fruto del análisis de regresión con ayuda del programa CurveExpert 1.4 se obtiene la ecuación interpolante de la suspensión, la cual es polinomial de tercer grado con un coeficiente de correlación de 0.992. y su representación gráfica mostrada en la figura 3.15.

$$y = 2,48x10^4 - 9,66x10^2X + 2,85x10^3X^2 - 74X^3$$

### 3 RESULTADOS

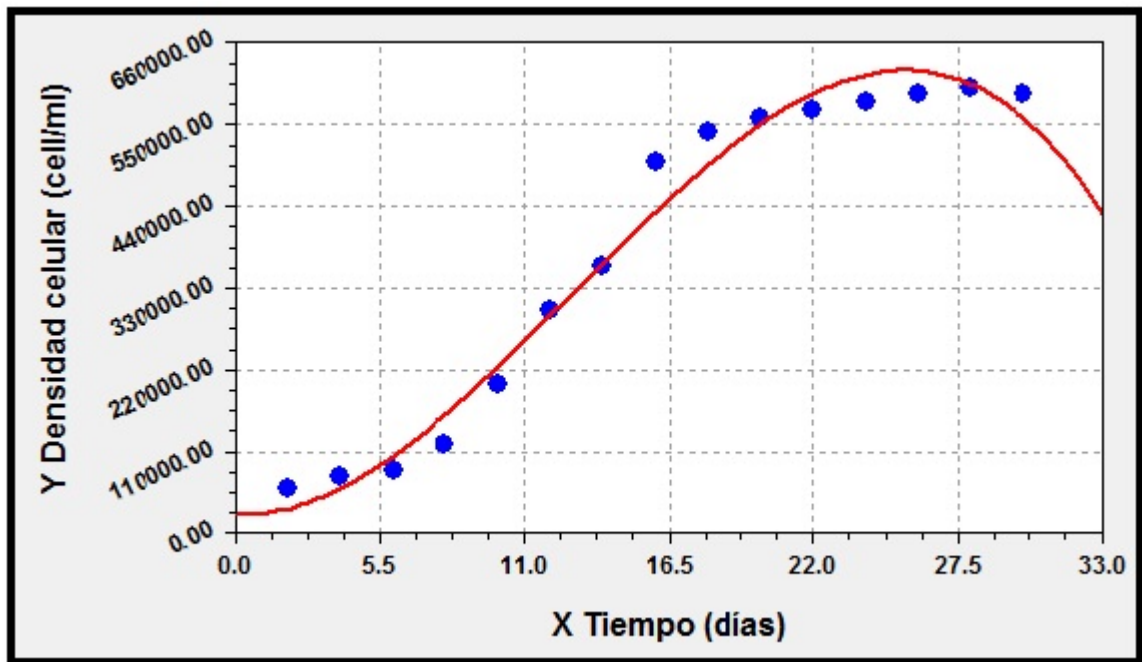


Figura 3.15: Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para la suspensión dos

El crecimiento celular en la suspensión número tres representada en la figura 3.16 se observa un pequeño crecimiento desde el día cero hasta el día cuatro, a continuación el crecimiento se incrementa un poco más hasta el día diez pero el mayor crecimiento se observa entre los días 11 al 16, luego se nota una desaceleración en el crecimiento hasta el día 26 y hasta el día 30 se ve una pequeña estabilización en la densidad celular.

### 3 RESULTADOS

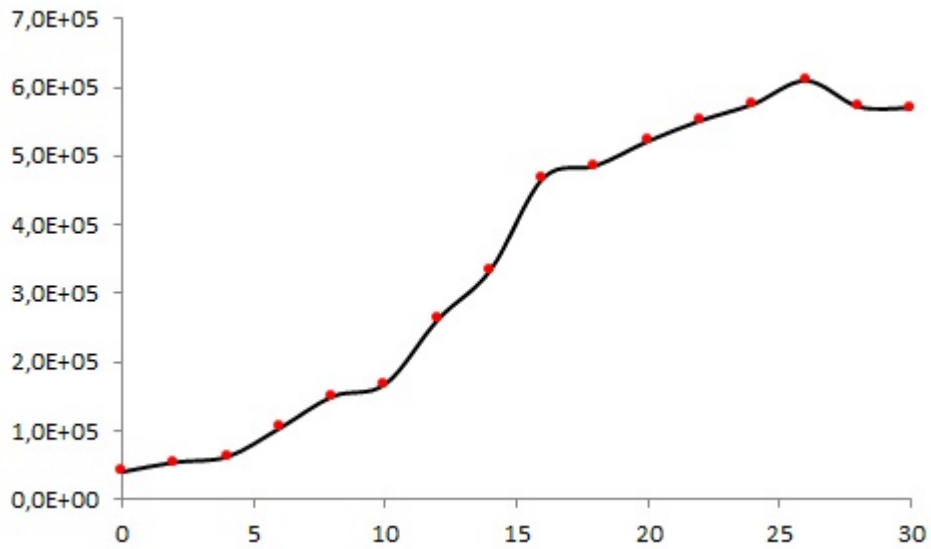


Figura 3.16: Curva de la cinética celular para la suspensión tres

El análisis de regresión realizado con el programa CurveExpert 1.4 genera una ecuación interpolante de la suspensión tres que se muestra a continuación y su figura 3.17 cuyos valores se ajustaron mejor a una curva polinomial de tercer grado con un coeficiente de correlación de 0.995.

$$y = 2,67x10^4 - 2,42x10^3 X + 2,77x10^3 X^2 - 70,1X^3$$



### 3 RESULTADOS

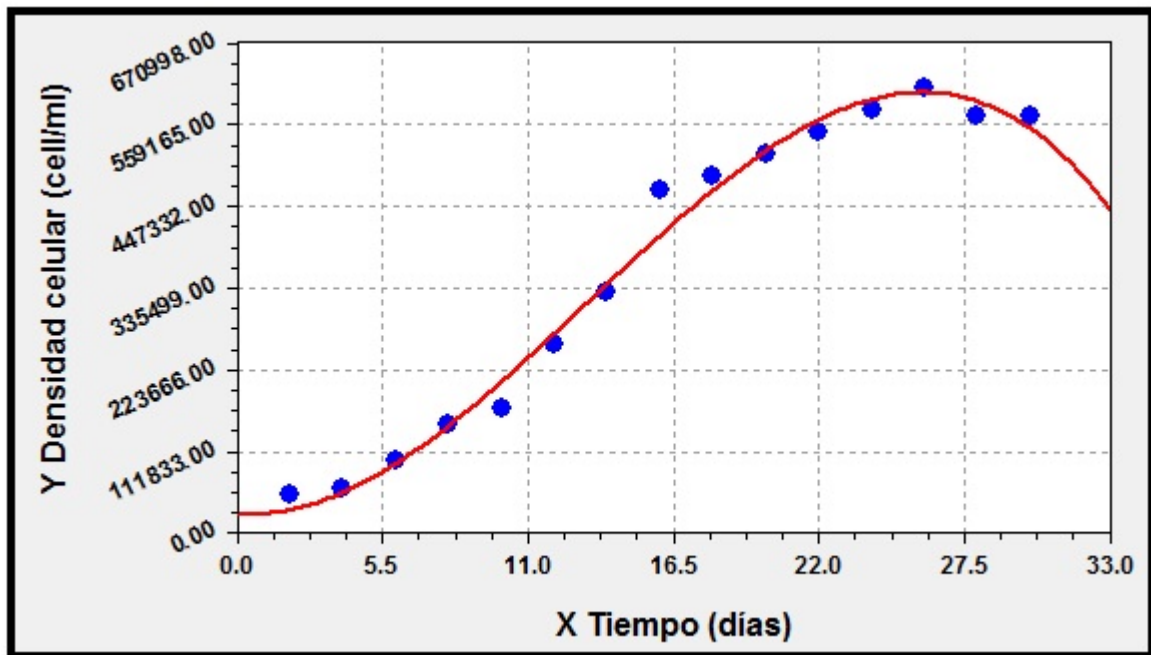


Figura 3.17: Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para la suspensión tres

Con los datos de crecimiento celular obtenidos de las tres suspensiones celulares se aplicó el método de estadística diferencial para obtener la curva representativa de la cinética celular de *Chenopodium ambrosioides*. Esta curva nos permitirá a futuro predecir el comportamiento de la cinética de la población celular de *Chenopodium ambrosioides*. La curva encontrada se muestra en la figura 3.18.

### 3 RESULTADOS

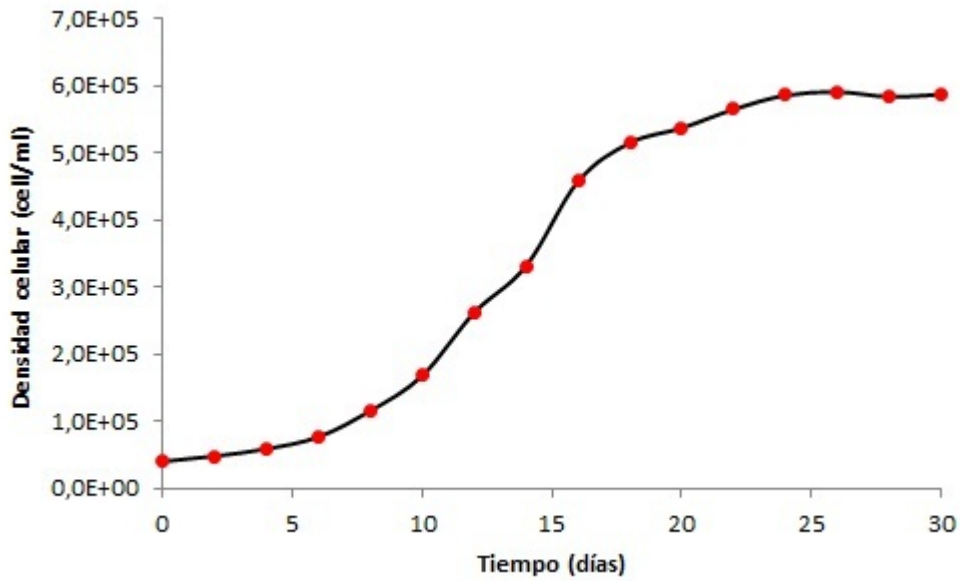


Figura 3.18: Curva representativa de la cinética celular de *Chenopodium ambrosioides* en suspensión.

La curva representada en la figura 3.18 tiene las características que sigue:

1. Es continua en su dominio para todo  $(x)$  mayor a cero.
2. No es periódica ya que no se repite en períodos de tiempo  $k$  días.
3. No es simétrica a ningún eje.
4. Asíntotas:
  - Horizontales  $y = 4 \cdot 10^4$ ,  $y = 60 \cdot 10^4$
5. Su monotonía es creciente entre  $x=0$  a  $x=24$
6. Su curvatura es:
  - Convexa entre  $x=0$  a  $x=15$

### 3 RESULTADOS

- Cóncava entre  $x=15$  a  $x=30$

En la curva representativa de la cinética celular de *Chenopodium ambrosioides* podemos identificar para su análisis cuatro etapas como se muestra en la figura 3.19.

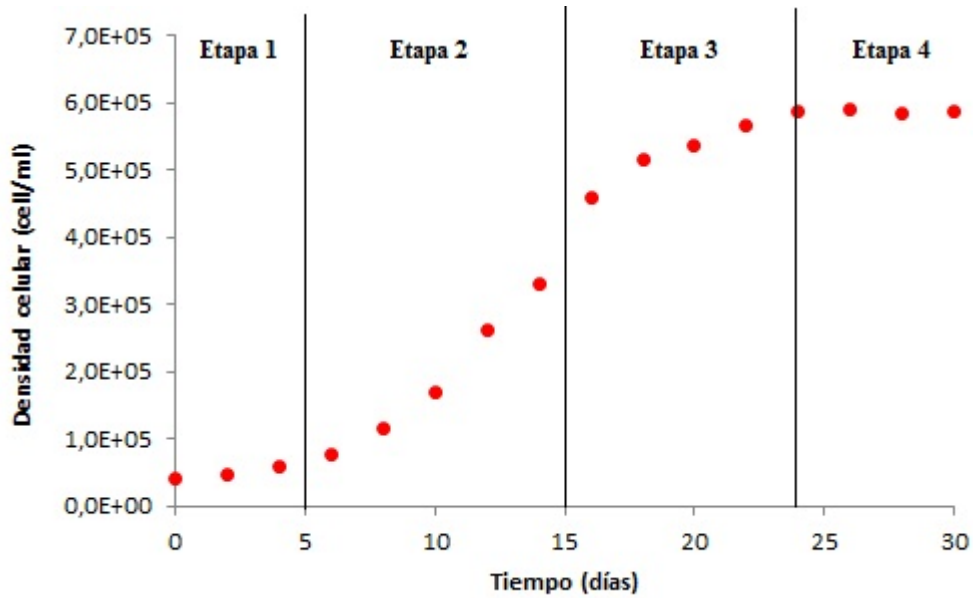


Figura 3.19: Etapas de la cinética celular de *Chenopodium ambrosioides*

Fruto del análisis matemático de cada una de estas etapas se obtuvo las ecuaciones que se muestra en el cuadro 3.11.

### 3 RESULTADOS

Cuadro 3.11: Ecuaciones matemáticas por etapas de análisis

	<b>Alternativa A</b>	<b>Alternativa B</b>
<b>Etapa 1</b>	$y = 40541e^{0,0944x}$ $R^2 = 0,9992$	$y = 40541e^{0,0944x}$ $R^2 = 0,9992$
<b>Etapa 2</b>	$y = 1833,3x^2 - 3866,7x + 32000$ $R^2 = 0,9938$	$y = 25932e^{0,1866x}$ $R^2 = 0,9925$
<b>Etapa 3</b>	$y = -1202,4x^2 + 63395x - 244933$ $R^2 = 0,9877$	$y = 304877\ln(x) - 377829$ $R^2 = 0,9732$
<b>Etapa 4</b>	$y = -166,67x + 591667$ $R^2 = 0,0193$	$y = -166,67x + 591667$ $R^2 = 0,0193$

La obtención de las ecuaciones representativas de cada una de las etapas identificadas consideran los dos valores de R que más se acercan a 1 y que hemos identificado como alternativa A y B.

En la etapa uno la ecuación que mejor se ajusta es exponencial, mientras que para la etapa dos la ecuación es polinómica para la alternativa A, sin embargo si agrupamos los valores de las etapas uno y dos conseguimos una ecuación representativa del tipo exponencial hasta el punto de inflexión  $x=15$  como lo especificamos en la alternativa B. Para la etapa tres la mejor curva que se ajusta es una polinómica como se muestra en la alternativa A, sin embargo tiene tendencia a formar una curva logarítmica para un R menor que el de la alternativa A como se muestra en la alternativa B. Finalmente para la etapa 4 la curva que mejor se ajusta es lineal con una pendiente negativa aunque con un R muy distante de 1.

Para mantener las células en suspensión en fase de multiplicación continua se debe realizar un subcultivo el cual se establece en el punto de inflexión  $x=15$  días.

### 3 RESULTADOS

Finalmente, resultado del análisis de regresión generados por el programa CurveExpert 1.4 muestra un ajuste a una curva sigmoide cuyo coeficiente de relación es del 0.99, está representada en la figura 3.20 y su ecuación interpolante es la siguiente.

$$y = \frac{(4,29x10^4)(9,91x10^4) + (6,15x10^5)X^{4,45}}{9,91x10^4 + X^{4,45}}$$

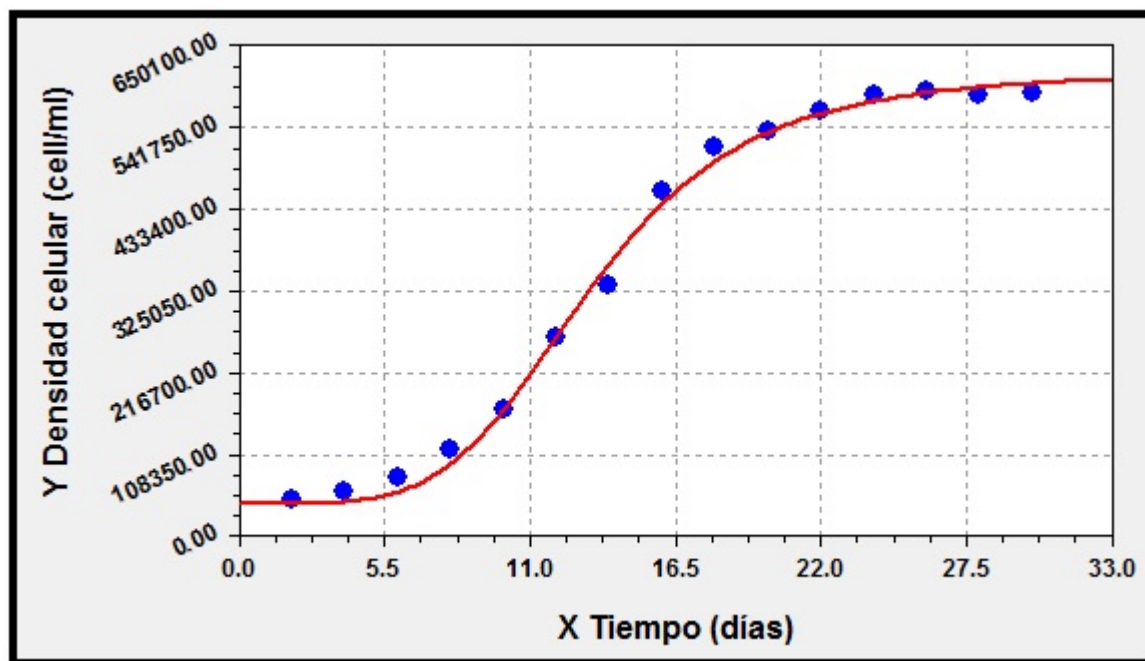


Figura 3.20: Ajuste del crecimiento del crecimiento celular para *Chenopodium ambrosioides*

#### 3.3.3. Biomasa

Visualmente las diferentes etapas identificadas en la curva representativa de la cinética celular de *Chenopodium ambrosioides* se muestra en la figura 3.21, donde apreciamos con claridad el proceso de evolución de la biomasa en la suspensión celular.

### 3 RESULTADOS

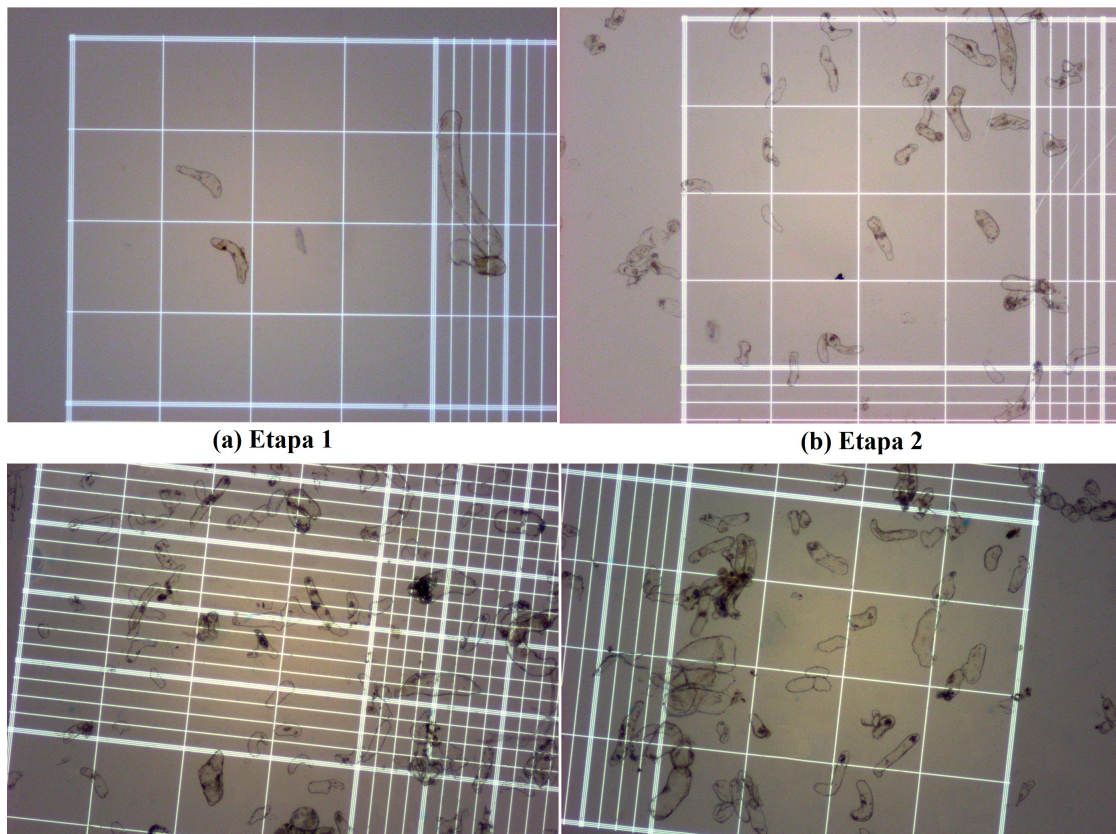


Figura 3.21: Visualización de las etapas de la cinética celular de *Chenopodium ambrosioides*

El aumento de la biomasa se calcula matemáticamente mediante la tasa específica de crecimiento  $\mu$  expresada en la ecuación (1).

Para el cálculo del tiempo de duplicación de la densidad celular se utiliza la ecuación de la alternativa B que como indicamos anteriormente agrupa las etapas uno y dos.

$$y = 34770e^{0,1587x}$$

donde  $y=2 (4.1 \cdot 10^4)$

$$8,2 * 10^4 = 34770e^{0,1587x}$$

### 3 RESULTADOS

$$x = 5,41 \text{ días}$$

por lo tanto:

$$\mu = \frac{\ln 2}{5,41}$$

$$\mu = 0,13d^{-1}$$

Es necesario señalar que las células de *Chenopodium ambrosioides* vistas al microscopio presentan una variedad en su tamaño como lo se lo muestra en la figura 3.22.



Figura 3.22: Tamaño celular de *Chenopodium ambrosioides* en suspensión celular

## 4 DISCUSIÓN

Mediante el presente trabajo investigativo se consiguió obtener suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides*, siguiendo un proceso metódico que involucra la estandarización del protocolo de desinfección de los explantes, la selección del medio de cultivo apropiado para la inducción de callo, el establecimiento mismo de las suspensiones celulares y la determinación de la curva que representa su cinética molecular.

### 4.1. Desinfección del material vegetal

La fase de desinfección conlleva un conjunto de pasos que se realizan para el establecimiento adecuado de un determinado cultivo. El proceso de desinfección de explantes de *Chenopodium ambrosioides* empieza con la selección de plantas sanas y vigorosas que según Alonso (2002) se debe observar la ausencia de daños causados por plagas o enfermedades a través de su coloración. El acertado muestreo de la planta madre es uno de los componentes más importantes para el éxito en la introducción *in vitro* [40]. Para evitar riesgos bióticos y abióticos las plantas fueron mantenidas bajo condiciones controladas según Pierik (1990) con esta práctica existe menos posibilidades de que se produzca alguna infección y es más fácil controlar su crecimiento y desarrollo.

Las plantas obtenidas de campo sin proceso fitosanitario previo a su introducción presentaron 100 % de contaminación con hongos, siendo esta evidencia normal ya que Roca



#### 4 DISCUSIÓN

(1993) señala que plantas de campo presentan altos rangos de contaminación, por lo que para controlar cualquier microorganismo se realizó un proceso fitosanitario por un periodo de mes con Amistar Top 0.5 %, porque es un fungicida sistémico y de contacto que contiene Azoxistrobina 20 % p/v, componente de acción inhibitoria de la respiración mitocondrial en los hongos y Difenconazol 12.5 % p/v el mismo que inhibe la biosíntesis de la membrana celular de ergosterol, deteniendo el desarrollo del hongo [26].

Según Roca y Mroginski (1993) los tejidos de plantas sanas son asépticos internamente por lo que la desinfección del material vegetal tiene como objetivo eliminar toda clase de microorganismos que se encuentren en la superficie del explante con ayuda de una amplia variedad de compuestos químicos. Inicialmente se hizo uso de agua ya que Pierik (1990) expone que ayuda a reducir las impurezas y la contaminación externa que en explantes de *Chenopodium ambrosioides* es evidente por los tricomas que poseen. Asimismo se usó detergente porque Vera (2004) señala que el agua jabonosa arrastra a los microorganismos ayudando a la eliminación de los mismo. Fue indispensable la utilización de un fungicida debido a que resultó eficiente el proceso de desinfección con este producto cuyo ingrediente activo es el sulfato de cobre ampliamente utilizado para contrarrestar cualquier hongo, bacteria u espora [30]. Durante la introducción de los explantes se obtenía una persistencia de bacterias por lo que se añadió al protocolo alcohol al 70 % ya que Rodríguez (2004) advierte que esta concentración posee actividad bactericida. Además, el uso de antibiótico disminuyó eficazmente la contaminación bacteriana de los explantes.

Adicionalmente se hizo uso de NaClO cuyo tiempo de inmersión y concentración se tuvo que ajustar para los entrenudos de *Chenopodium ambrosioides* teniendo en cuenta que debe causar la muerte de los microorganismos contaminantes y a su vez causar el menor daño posible al explante como lo señala Chawla (2002).

En este trabajo se observó que cuando se aumentaba la concentración de NaClO aumentaba el porcentaje de explantes no contaminados, lo que concuerda con lo expuesto por

#### 4 DISCUSIÓN

Abdelnour y Escalant (1994) quienes afirmaron que mientras más alta la concentración de cloro más efectivo es la desinfección del material vegetal. Hay que recalcar que la concentración NaClO influyen en el nivel de contaminación mas no el tiempo de inmersión, por lo que un aumento del 0.5 % en la concentración de NaClO mostrará un explante contaminado frente a 147 no contaminados. Al evaluar la variable contaminación los tratamientos T2 (1 % NaClO, 15 min), T3 (1 % NaClO, 20 min) y T4 (1.5 % NaClO, 15 min) no muestran diferencia por lo que si se desea bajar el costo o la cantidad de utilización del producto se puede utilizar una concentración de 1 % NaClO con 15 min o 20 min, por lo contrario si se desea agilizar el proceso se puede utilizar 1.5 % de NaClO con 10 min de inmersión. Además, los datos revelan que la concentración de 1.5 % generan mayor número de explantes no contaminados por lo que se toma como mejor concentración para eliminación de contaminantes.

Al analizar la variable clorosis los resultados revelan que mientras va aumentando la concentración de NaClO hay mayor número de explantes afectados, esto se debe a que el NaClO puede causar estrés fisiológico por ser un compuesto altamente oxidante para las plantas [9]. Además se muestra que si hay un aumento del 0.5 % en NaClO por cada explante sin clorosis se obtendrá 100 explantes afectados y por cada 30 segundos más de inmersión se obtendrá 3 explantes afectados por cada explante no afectado. Al evaluar la variable clorosis los tratamientos T2 (1 % NaClO, 15 min), T3 (1 % NaClO, 20 min) y T4 (1.5 % NaClO, 15 min) no muestra diferencia significativa por lo que se puede utilizar cualquiera de estos tratamientos según sea la conveniencia.

Para fines prácticos el análisis estadístico revela como mejor tratamiento de desinfección el T4 con una concentración de NaClO de 1.5 % y un tiempo de inmersión de 10 minutos, en el cual se obtuvo el mayor número de explantes no contaminados junto con el mayor número de explantes viables. Este protocolo de desinfección es efectivo porque cumple con una contaminación del 10 % que según Cruzat (2010) debe ser menor al 16.6 % y porque se considera que un 90 % de explantes viables es alto al compararlo con

## 4 DISCUSIÓN

los demás tratamientos. Además, Roca y Mroginski (1993) señalan que tener cultivos completamente estériles y viables es difícil de lograr pero que es importante obtener un equilibrio entre la contaminación, oxidación y clorosis versus la supervivencia, capacidad de generación de estructuras y viabilidad. Este resultado es de gran relevancia debido a que a mi entender es la primera evidencia de la introducción *in vitro* de entrenudos de *Chenopodium ambrosioides*.

### 4.2. Formación a callo

La importancia de la formación de callos en plantas nutracéutica como el paico radica en que estos resultados pueden ser empleados para realizar estudios fisiológicos, bioquímicos y determinar la producción de metabolitos secundarios en una suspensión establecida o en las estructuras formadas. Aunque esta parece ser la primer evidencia de inducción callo de *Chenopodium ambrosioides* con TDZ, Pérez *et al.* 2004 señala que generalmente esta hormona induce la formación de callos y Murthy *et al.* (1998) reporta que el TDZ induce la formación a callo en algunas plantas con mayor efectividad que otros reguladores de crecimiento. En este trabajo se observó que la aplicación de la hormona TDZ en concentración de  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  genera la mayor cantidad de callo respecto a las otras concentraciones estudiadas, lo que concuerda con Gringa (1998) el cual señala que concentraciones mayores a  $1 \mu\text{M}$  de TDZ son utilizadas para la formación de callo.

El TDZ ha sido catalogado como una citoquinina por su actividad, no obstante se distingue de otras fitohormonas ya sean naturales o sintéticas y su mecanismo de acción es aún desconocido [23], sin embargo, esta investigación evidencia que fruto de la formación de callo se debe directamente al TDZ ya que el tratamiento E0 sin hormona no genera reacción alguna sobre el explante. Además los resultados aclaran que con concentraciones mayores a  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de TDZ la formación de callo es ineficiente y no hay diferencia significativa.

#### 4 DISCUSIÓN

Estudios de Eisa *et al.* (2005) y Milivojevic *et al.* (2005) refieren la formación de callo con la auxina 2,4-D en plantas del mismo género que *Chenopodium ambrosioides* con muy buenos resultados sin embargo estudios previos a este trabajo mostró que esta auxina generaba una respuesta desfavorable por lo que se vio la necesidad de incursionar en otra hormona como el TDZ. Según Pierik (1990) la inclusión de citoquininas en el medio de cultivo también permite formar callos en varias especies vegetales.

Hay relativamente poca información disponible sobre el tipo de callo inducido por TDZ [70], en este estudio se generó un callo amarillento con algunos matices de color rojizo el cual se cree que son metabolitos secundarios.

En esta etapa fue útil utilizar el medio B5 determinado por Gamborg (1968) ya que generaba un callo más vigoroso que en el medio de Murashige y Skoog (1962) esto pudiera ser consecuencia de la menor concentración de nitrato y las distintas fuentes en el medio de cultivo B5, especialmente la ausencia de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y la presencia de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Además, según Pérez *et al.* (2010) y Blanco (2001) el medio B5 ha sido ampliamente utilizado en el cultivo de células y en la fase de inducción de callo.

Se añadió vitaminas en el medio de cultivo para lograr el mejor crecimiento del tejido vegetal ya que según Narayanaswamy (2008) un medio enriquecido con vitaminas genera cultivos sanos y tienen el papel de catalizadores metabólicos celulares. Una de las vitaminas utilizadas fue la tiamina (vitamina B1) debido a que Roca y Mrogiski (1993) manifiesta que es indispensable para los cultivos celulares porque básicamente participan en la nutrición y la asimilación de compuestos esenciales requeridos por todas las células vegetales. También se utilizó el inositol porque Risser y White (1963) demostraron que esta vitamina está involucrada en rutas biosintéticas y suelen ser un factor importante de crecimiento de callos ya que impulsa la división celular. Finalmente, para generar un crecimiento óptimo del cultivo se adicionó ácido nicotínico y piridoxina [11].

### 4.3. Suspensiones celulares

El establecimiento de una suspensión celular se logra optimizando diferentes factores que influyen en dicho establecimiento [17]. Para *Chenopodium ambrosioides* las suspensiones se establecieron con 1 g de callo en 20 ml de medio fresco en un Elenmeyer de 100 ml y una velocidad de agitación 110 rpm.

Pérez (2010) indica que la cantidad de callo a utilizar puede ser desde 1 g a 20 g en 50 ml de medio de cultivo, recalcando que mientras mayor cantidad de inoculo inicial se utilice más rápidamente se podrá establecer el cultivo en suspensión.

La utilización de Elenmeyers de 100 ml con 20 ml de medio de cultivo fresco para las suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* generó buenos resultados corroborando lo indicado por Roca y Mroginski (1993) se debe utilizar el 1/5 de volumen del frasco con medio fresco para que el resto de volumen sirva para el intercambio gaseoso de las células.

Adicionalmente se corroboró lo señalado por González y Gómez que las suspensiones celulares se los puede mantener a revoluciones de 60 rpm a 150 rpm.

Durante la multiplicación celular de las suspensiones de *Chenopodium ambrosioides*, se identificó claramente cuatro etapas o fases de crecimiento celular como se muestra en la figura 3.19. Si bien Roca y Mroginski (1993) indican que en un cultivo de células típicamente hay cinco fases de crecimiento, en la curva de crecimiento celular para *Chenopodium ambrosioides* no se identifica claramente la fase lineal (fase 3,), la cual se encuentra entre la fase de crecimiento celular en forma exponencial (fase 2) y la etapa de desaceleración progresiva (fase 4).

En la suspensión celular de *Chenopodium ambrosioides*, la primera etapa (fase 1, Roca y Mroginski, 1993) que abarca los primeros días después del subcultivo se caracterizó

#### 4 DISCUSIÓN

por un período de crecimiento moderado. Esta etapa se la puede catalogar como una fase de retraso o latencia ya que a pesar de que existe una división celular esta es baja. Sin embargo, tener una evidencia de división celular inmediata da indicios de que el establecimiento de la suspensión celular es exitoso y que las células han superado la fase de adaptación de células agrupadas en forma de callo y ahora en células libres en forma de suspensión. Según Chawla (2002) en esta fase la multiplicación celular es casi nula porque las células se están preparando para dividirse.

Seguidamente, se observa una segunda etapa (fase 2, Roca y Mroginski, 1993) que se caracteriza por un crecimiento exponencial, donde la tasa de división es la mayor en todo el proceso y se extiende hasta el día 15. Según Dodds y Lorin (1995) en esta etapa se incrementa la velocidad de división celular donde las células son jóvenes y biológicamente activas.

Posteriormente, se identifica una tercera etapa (fase 4, Roca y Mroginski, 1993) la cual se caracteriza por un crecimiento logarítmico que representa una desaceleración progresiva del crecimiento celular hasta el día 24. A esta fase Gómez (1998) lo define como fase de disminución progresiva señalando que el número de células van agotando uno o varios nutrientes del medio, se pueden generar residuos que sean tóxicos para las células y que las células se obstaculicen mutuamente. Vasili, (1982) reporta que existen variaciones en el pH afectando la estabilidad celular.

Finalmente, se visualiza una cuarta etapa (fase 5, Roca y Mroginski, 1993) donde aparentemente las células empiezan una fase estacionaria, la cual según Pérez (1998) y Pérez (2010) aparece en el momento que los nutrientes del medio se han agotado y señalando que la suspensión ha alcanzado su máxima densidad celular, estabilizando el número de células y por tanto la concentración celular permanece constante.

La densidad celular inicial utilizada como límite inferior de  $0.4 - 0.5 \times 10^5 \text{ cell.ml}^{-1}$  para el presente estudio fue la adecuada ya que se pudo evidenciar rápidamente la fase exponen-

#### 4 DISCUSIÓN

cial bien definida, corroborando lo indicado por Barranco *et al.* (2009) cuando no hay una buena densidad celular inicial la multiplicación suele ser pobre y no se puede mantener un crecimiento celular constante y Torres (1989) que por su parte señala que el establecimiento se puede hacer con una densidad inicial de  $0.5 - 2.5 \times 10^5 \text{ cell}\cdot\text{ml}^{-1}$ , mientras que Navila (2003) considera que la utilización de densidades iniciales de  $9 - 10 \times 10^3 \text{ cell}\cdot\text{ml}^{-1}$  se las puede catalogar como densidades bajas o críticas.

De la curva de cinética celular de *Chenopodium ambrosioides* se determinó que el día 15 es el óptimo para el subcultivo, ya que la curva presenta una inflexión, señalando el fin de la última fase de crecimiento exponencial del cultivo celular. Según Barranco *et al.* (2009) este punto es el adecuado para mantener una multiplicación celular continua, de lo contrario las células alcanzan su máxima densidad y permanecerán viables pero sin división para más tarde morir. Gonzáles y Gómez (1998) por su parte señalan que si se realiza un subcultivo en este punto la cinética celular continúa a velocidades logarítmicas sin pasar la fase estacionaria o de disminución progresiva.

El cambio de subcultivo al día 15 también concuerda con el método utilizado por Roitsh y Tanner (1993) con la planta *Chenopodium rubrum* perteneciente al mismo género que *Chenopodium ambrosioides*.

La tasa específica de crecimiento encontrada fue de  $\mu=0.13$  cuyo valor calculado en este estudio para el crecimiento de células en suspensión de *Chenopodium ambrosioides* es similar comparado con algunos valores reportados por Pérez (2010) y que se los muestra en el cuadro 4.1.

#### 4 DISCUSIÓN

Cuadro 4.1: Valores de la tasa específica de crecimiento para diferentes especies de células vegetales cultivadas en suspensión.

<b>Especie</b>	<b><math>\mu</math> (d<sup>-1</sup>)</b>
<i>Panax ginseng</i>	0.17
<i>Taxus chinensis</i>	0.12
<i>Coffea arabica</i>	0.06
<i>Datura stramonium</i>	0.17
<i>Cantharantus roseus</i>	0.45
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	0.12
<i>Lavandula vera</i>	0.17
<i>Rollinia mucosa</i>	0.10
<i>Thevetia peruviana</i>	0.17
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	0.13

Ganzales y Gómez (1998) señalan que los cultivos de células en suspensión generalmente son heterogéneos, con células aisladas y pequeños agregados celulares. Este trabajo muestra la suspensión celular de *Chenopodium ambrosioides* con tamaño de células largas entre 100  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$  y para células ovales van desde 50  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ . Según Torres (1989) el tamaño de las células va a depender de la especie vegetal, la edad del tejido del cultivo, la composición del medio y las condiciones ambientales. Como evidencia se tiene el estudio de Reyes (2009) en suspensiones celulares de banano híbrido cuyas células tienen un tamaño que varió entre 80  $\mu\text{m}$  a 300  $\mu\text{m}$ . En su defecto Pérez (2010) propone como medida promedio para células alargadas entre 200  $\mu\text{m}$  a 475  $\mu\text{m}$  y para células ovales entre 120  $\mu\text{m}$  a 175  $\mu\text{m}$ .

El presente estudio de investigación consiguió el establecimiento de suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* siguiendo los procesos establecidos; protocolo estandarizado de desinfección de los explantes, inducción de callo en el medio de cultivo apropiado y finalmente el establecimiento de las suspensiones celulares. Adicionalmente se determinó al día 15 como el óptimo para el subcultivo y consecuente mantenimiento de la suspensión listo para la futura obtención de metabolitos secundarios.



#### 4 DISCUSIÓN

Estos resultados servirán de base para futuros estudios *in vitro* de *Chenopodium ambrosioides* y serán utilizados para ensayos posteriores, especialmente para medir producción *in vitro* de metabolitos secundarios como el ascaridol.

## 5 CONCLUSIONES

1. La investigación realizada en el presente trabajo ha permitido establecer un protocolo de desinfección exitoso para la introducción *in vitro* de entrenudos de *Chenopodium ambrosioides*, utilizando una concentración de NaClO al 1.5 % con un tiempo de inmersión de 10 minutos.
2. La implementación de un proceso fitosanitario a la planta por un mes antes de su introducción con Amistar Top 0.5 % permitió que el protocolo de desinfección tenga éxito.
3. El protocolo de desinfección es efectivo porque cumple con las dos condiciones imprescindibles para el establecimiento *in vitro* de *Chenopodium ambrosioides* que son porcentaje bajo de contaminación del 0 % a 11.4 % (intervalo de confianza) y alta viabilidad del 88.6 % al 100 % (intervalo de confianza).
4. El medio de cultivo que presentó los mejores niveles de formación de callo fue el B5 suplementado con vitaminas, 20 mg L<sup>-1</sup> de azúcar, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de TDZ y agar 5.5 g L<sup>-1</sup>.
5. El establecimiento de las suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* con 1 g de callo en 20 ml de medio fue exitosa debido a que se logró llegar a la densidad deseada entre 80 000 a 100 000 células por mililitro .

## 5 CONCLUSIONES

6. La multiplicación de células en las suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides* fue exitoso en el medio nutritivo líquido B5 suplementado con vitaminas, 30 mg L<sup>-1</sup> de azúcar y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de TDZ.
7. Se obtuvo con éxito la curva de cinética celular de *Chenopodium ambrosioides* identificándose claramente cuatro fases: retraso o latencia, exponencial, disminución progresiva y estacionaria.
8. Se determinó el día 15 como óptimo para subcultivar las células en suspensión ya que se mantendrá una multiplicación celular constante.
9. Se identificó que a partir del día 24 empieza la fase estacionaria ya que la curva interpolada llega a su máximo en este punto.
10. Las suspensiones celulares establecidas pueden ser utilizadas para una futura producción de metabolitos secundarios.
11. Se acepta la hipótesis planteada al inicio de este trabajo, la misma que afirma que la aplicación de la citoquinina thidiazuron (TDZ) tiene un efecto estadístico significativo en la formación de callo y en el establecimiento de las suspensiones celulares.

## 6 RECOMENDACIONES

1. Continuar la presente investigación con el estudio de elicitores para la producción de metabolitos secundarios.
2. Realizar un estudio comparativo de la concentración de metabolitos en suspensión frente a los metabolitos generados por la planta.
3. Probar menores concentraciones de TDZ para observar resultados y combinar el TDZ con otras auxinas y citoquininas para analizar su efecto.
4. Ampliar el estudio que identifique las necesidades nutricionales de la planta con requerimientos específicos de hormonas, vitaminas y suplementos orgánicos para un mejor conocimiento del *Chenopodium ambrosioides*.
5. Probar otros medios de cultivo para la suspensiones celulares de *Chenopodium ambrosioides*.
6. Realizar un estudio de identificación de los metabolitos que se encuentren en suspensión.
7. Mantener las suspensiones celulares bajo condiciones ambientales los más uniformemente posibles y en agitación constante dado que éstas influyen sobre el comportamiento celular.

## 6 RECOMENDACIONES

8. Probar procesos de escalamiento a las suspensiones celulares para una producción masiva.

## Bibliografía

- [1] Blanco A. Preparación de medios de cultivo, enero 2011.
- [2] Castillo A. Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo, 2004.
- [3] Lugo A. Cámara thoma y neubauer. GabLaboratory, 2004.
- [4] Alberts B. *Introducción a la Biología*. Panamericana, 2004.
- [5] Sathyanarayana B. *Plant Tissue Culture: Practice and New Experimental Protocols*. International Publishing House, 2007.
- [6] Pérez J. García L. Gómez R. Bermúdez. Formación de callos en phaseolus vulgaris l cv. turrialba- 4 con thidiazuron y ácido 2,4-diclorofenoxiacético. *Biotecnología Vegetal*, 4:233 – 236, 2004.
- [7] Foro Argentino de Biotecnología. *Plantas Medicinales en Atención Primaria de Salud, Agroindustria, Fotoquímica y ecoturismo: Perspectivas de Desarrollo en la Región los Libertadores Wari*. IICA, 1999.
- [8] Calva G. Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro, 2005.
- [9] Vera G. *Introducción a la Microbiología*. EUNED, 2004.

## Bibliografía

- [10] Albarracín H. Métodos biotecnológicos, Agosto 2009.
- [11] Chawla H. *Induction to Plant Biotechnology*. Science Publishers, 2002.
- [12] Pérez J. Evaluación de la producción de fitoquímicos a partir de cultivo de células en la suspensión de nerium oleander, 2010.
- [13] Torres K. *Tissue Culture Techniques Horticultural Crops*. AVI book, 1989.
- [14] De la Torre L. Navarrete H. Muriel P. Macía M. y Balsiev H. *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador*. Pontífice Universidad Católica del Ecuador, 2008.
- [15] Alonso M. Biotecnología aplicada a mejora de pelargonium, 2002.
- [16] Daniel M. *Medicinal Plants: chemistry and properties*. Science Publishers, 2006.
- [17] Razdan M. *Plant Tissue Culture*. Science Publishers, 2003.
- [18] Rodriguez M. *Personal de Limpieza de Centros Sanitarios*. Mad S.L., 2004.
- [19] Campbell N. *Biología*. Person, 2001.
- [20] Singh N. *Medicinal and Aromatic Plants of Himachal Pradesh*. Indus, 1999.
- [21] Narayanaswamy. *Plant Cell and Tissue Culture*. Tata McGraw-Hill, 2008.
- [22] Cruzat R. Resultados y lecciones en propagación in vitro en especies ornamentales, junio 2010.
- [23] Pierik R. *Cultivo In Vitro de las Plantas Superiores*. Mundi-Prensa, 1990.
- [24] Weaver R. Botany section. *Trio-logy*, 43:1–13, 2004.
- [25] Kumar S. *Plant Tissue Culture*. APH, 2009.

## Bibliografía

- [26] Syngenta. Amistar top ficha técnica, junio 2011.
- [27] Tropico. Chenopodium ambrosioides, Octubre 2012.
- [28] Ávalos A. y Pérez E. Metabolismo secundario de plantas, 2009.
- [29] Morgan W. Cultivo de tejido vegetal. international plant laboratories., 2000.
- [30] Cara M. Santos M. Carreto F. y Alcázar M. Efecto fungicida del sulfato de cobre, Septiembre 2012.
- [31] Davey M. y Anthony P. *Plant Cell Culture Essential Methods*. wiley-blackwell, 2010.
- [32] Orozco F. Hoyos R y Arias M. Cultivo de células vegetales en biorreactores: Un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios. *Agricultura de Medellín*, 55:73 – 95, 2002.
- [33] Cavalli J. Tomi F. Bernardini A. y Casanova J. Combined analysis of the essential oil of chenopodium ambrosioides by gc, gc-ms and c-nmr spectroscopy: Quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. *Wiley InterScience*, 15:275 – 279, 2004.
- [34] Johnson M. y Croteau R. Biosynthesis of ascaridole: Iodide peroxidase-catalyzed synthesis of a monoterpene endoperoxide in soluble extracts of chenopodium ambrosioides fruit. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1:54 – 66, 1984.
- [35] Milivojevic S. Mitrovic A. y Culafic L. Somatic embryogenesis in chenopodium rubrum and chenopodium murale in vitro. *Springer*, 49:35 – 39, 2005.
- [36] George E. Hall M. y De klerk G. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, 2008.



## Bibliografía

- [37] Corio M. Chapuis L. y Delbecque J. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 41 Medicinal and Aromatic plants*. Springer, 1998.
- [38] Jaramillo B. Duarte E. y Delgado W. Bioactividad del aceite esencial de chenopodium ambrosioides colombiano. *Plantas Medicinales*, 17:54 – 64, 2011.
- [39] Soza J. Solar C. y Depallens D. Efecto del cppu y thidiazuron sobre la calidad y condición en cosecha y poscosecha.
- [40] Abdelnour A. y Escalant J. *Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales*. Orton, 1994.
- [41] Hegazy A. y Farrag H. Allelopathic potential of chenopodium ambrosioides on germination and seedling growth of some cultivated and weed plants.
- [42] Jardim C. Jham G. Dhingra D. y Freire M. Composition and antifungal activity of the essential oil of the brazilian chenopodium ambrosioides l. *Springer*, 44:378 – 379, 2008.
- [43] George E. Puttock D. y George H. *Plant Culture Media*, volume 1. Exegetics, 1987.
- [44] Baran T. y Ghosh B. *Plant Tissue Culture: Basic and Applied*. Orion, 2005.
- [45] González J. y Gómez R. *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología*, volume 1. Instituto de Biotecnología de las Plantas, 1998.
- [46] Hurtado J. y Gómez R. Diseño experimental, septiembre 2011.
- [47] Dixon R. y González R. *Plant Cell Culture*. University Press, 1994.
- [48] Trigiano y Gray. *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. CCR press, 2005.

## Bibliografía

- [49] Nabila A. Tasneem M. y Hassan A. Secondary metabolites of chenopodium species. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 4:70–82, 1992.
- [50] Barranco L. Gómez R. Reyes M. Pérez L. Freire M. y Herrera I. Efecto de la densidad de inóculo en la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas en el cultivar híbrido de banano fhia-18 (musa spp. aab). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2:40 – 47, 2009.
- [51] Gupta D. y Ibaraki. *Plant Tissue Culture Engineering*. Springer, 2006.
- [52] Neumann K. y Imani A. *Plant Cell and Tissue Culture a Tool in Biotechnology*. Springer, 2009.
- [53] Eisa S. Koyro H. Kogel K. y Imani J. Induction of somatic embryogenesis in cultured cells of chenopodium quinoa, 2005.
- [54] Huang N. Cornejo M. Bush S. y Jones L. Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. *Protoplasma - Springer*, 135:80–87, 1986.
- [55] Taji A. Kumar P. y Lakshmanan P. *In Vitro Plant Breeding*. Food Products Press, 2002.
- [56] Dodds J. y Lorin R. *Experiments in Plants Tissue Culture*. Cambridge University Press, 1995.
- [57] Blair S. y Madrigal B. *Plantas Antimaláricas de Tumaco: Costa Pacífica Colombiana*. Universidad de Antioquia, 2005.
- [58] Pari W. Jaroslav Z. Vera F. y Melo I. Antifungal terpenoids from chenopodium ambrosioides, 1993.
- [59] Saito K. y Mizukami H. *Plant-Biotechnology and Transgenic Plants*. Marcel Dekker, 2005.

## Bibliografía

- [60] Pérez J. Albany N. Vilchez J. Sierralta L. y Molina M. Efecto del medio de cultivo en la multiplicación in vitro de aloe barbadensis mill. *Agronomía*, 27:447 – 459, 2010.
- [61] Wabo P. Yondo J. Fossi O. Komtangi M. Bilong B. y Mpoame M. The in vitro effects of chenopodium ambrosioides (chenopodiaceae) extracts on the parasitic nematode heligmosomoides bakeri (nematoda, heligmosomatidae). *Pharmacognosy and Phytotherapy*, 3:56–62, 2008.
- [62] Roca W. y Mroginski L. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1993.
- [63] Hahlbrock K. Ebel J. y Oaks A. Determination of specific growth stages of plant cell suspension cultures by monitoring conductivity changes in the medium. *Springer*, 18:75 – 84, 1974.
- [64] Gamborg O. Miller R. y Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells, 1968.
- [65] Burnouf M. y Paupardin C. Vegetative propagation of chenopodium quinoa by shoot tip culture, 1985.
- [66] Bhojwani S. y Razdan M. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier, 1996.
- [67] Trejo G. y Rodríguez M. La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro, 2007.
- [68] Rojas S. García J. y Rojas M. Propagación asexual de plantas, marzo 2004.
- [69] Ahloowalia B. Prakash J. y Savangikar V. Low cost options for tissue culture technology in developing countries: Plant tissue culture, Agosto 2004.

## Bibliografía

- [70] Murthy B. Murch J. y Saxena P. Thidiazuron: a potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In Vitro Cell*, 34:267 – 275, 1998.
- [71] Visser C. Qureshi J. Gill R. y Saxena P. Morphoregulatory role of thidiazuron. *Plant Physiology*, 99:1704 – 1707, 1992.
- [72] García F. Caselles J. y Siurana M. *Introducción al funcionamiento de las plantas*. Reproval, 2006.
- [73] MacDonald D. Van C. Harrison P. Rangachari P. Rosenfeld J. Warren C y Sorger G. Ascaridole-less infusions of chenopodium ambrosioides contain a nematocide(s) that is(are) not toxic to mammalian smooth muscle. *Journal of Ethnopharmacology*, 92:215 – 222, 2004.
- [74] Roitsch T. y Tanner W. Expression of a sugar-transporter gene family in a photoautotrophic suspension culture of chenopodium rubrum l. *Planta - Springer*, 193:365–371, 1994.
- [75] Vasil I. y Thorpe T. *Plant Cell and Tissue Culture*. Kluwer Academic, 1998.
- [76] Mulabagal V. y Tsay H. Plant cell culture an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2:29 – 48, 2003.
- [77] Stevens W. y Ulloa C. *Flora de Nicaragua Introducción*. Missouri Botanical Garden Press, 2001.
- [78] López R. Murcia C. López P. y Valencia J. Estandarización del protocolo de desinfección de discos de hojas en la inducción de calogénesis de cordia alliodora en condiciones in vitro. *Revista de Investigaciones de la Universidad del Quindío*, 22:120 – 125, 2010.

## Bibliografía

- [79] Mustafa N. Winter W. Iren F. y Verpoorte R. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature America*, 6:715 – 742, 2011.
- [80] Guo B. Abbasi B. Zeb A. Xu L. y Wei Y. Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*, 10:84 – 99, 2011.
- [81] Moller P. y Yáñez S. *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*. Missouri Botanical Garden Press, 1999.
- [82] Zuzi. Catálogo de la cámaras de recuento, octubre 2012.