

1.- Justificación

El cultivo de callos y el cultivo de células en suspensión representan los sistemas *in vitro* más comúnmente empleados. Los callos son el inicio de los cultivos de células vegetales en gran parte de los casos, éstos son masas de células no diferenciadas. Aunque éstos no representan un sistema ideal para trabajar, debido a su baja velocidad de crecimiento y alta variabilidad bioquímica, son en muchos casos un paso obligado para iniciar un cultivo *in vitro* (Godoy-Hernández and Vázquez-Flota, 2006).

Ya que los callos presentan una alta variabilidad es necesario monitorear el crecimiento y morfología de los mismos para evitar o disminuir problemas como la fenolización, que es la oxidación de compuestos fenólicos exudados por los tejidos dañados de la planta y que podría poner en peligro la viabilidad de las células. Por ello muchas veces es necesario realizar resiembras en medio de cultivo nuevo, aun así existe un límite de resiembras determinado por el tipo de célula y la especie de la que proviene. Se hace necesario conocer el límite de resiembras, ya que el rendimiento de un callo disminuye con el tiempo. Por otro lado, conocer el crecimiento celular es esencial para el diseño de procesos bioingenieriles con miras a una mayor escala de producción.

Existen muchos métodos para evaluar el crecimiento en los cultivos de células vegetales, entre ellos se encuentran: peso fresco celular, peso seco celular, volumen celular dividido, volumen celular empacado, conteo celular, densidad óptica del cultivo, conductividad eléctrica residual y medición del pH, entre otros.

Hyptis suaveolens es utilizado por la población tradicional en varias partes del mundo para tratar inflamación, úlcera gástrica e infección (Jesús *et al.*, 2013). La actividad antibiótica de esta planta se ha demostrado frente a diversas especies de bacterias, levaduras y hongos, especialmente con el aceite esencial obtenido de las partes aéreas de la misma. Así, se ha obtenido actividad antibacteriana frente a más de 13 especies diferentes de bacterias, la levadura *Cándida albicans* y el hongo *Aspergillus Níger*. Se observó actividad hipoglicemiante con extractos etanólico- acuoso (1:1) obtenidos de las partes aéreas de la planta, y evaluados en ratas por vía intragástrica a la dosis de 25mg/kg de peso. Con este mismo extracto se reportó la presencia de una actividad antitumoral en ratones, administrado por vía intraperitoneal a la dosis de 15mg/kg. Sin embargo, al evaluarse *in vitro* la actividad citotóxica de este extracto en un cultivo de células CA-9KB, a la dosis de 25mcg/ml, la respuesta fue negativa (Aswal B. y cols. 1984; Feng C y cols. 1962- Saluya A. y Santini D. 1981) (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

El presente trabajo busca identificar los cambios morfológicos que presenta un cultivo de callos de *Hyptis suaveolens* durante su crecimiento *in vitro*, durante la siembra y resiembra de los mismos.

2.- Objetivos

Objetivo General:

- ✚ Caracterizar morfológicamente el desarrollo de los callos de *Hyptis Suaveolens* obtenidos con anterioridad después de cada resiembra.

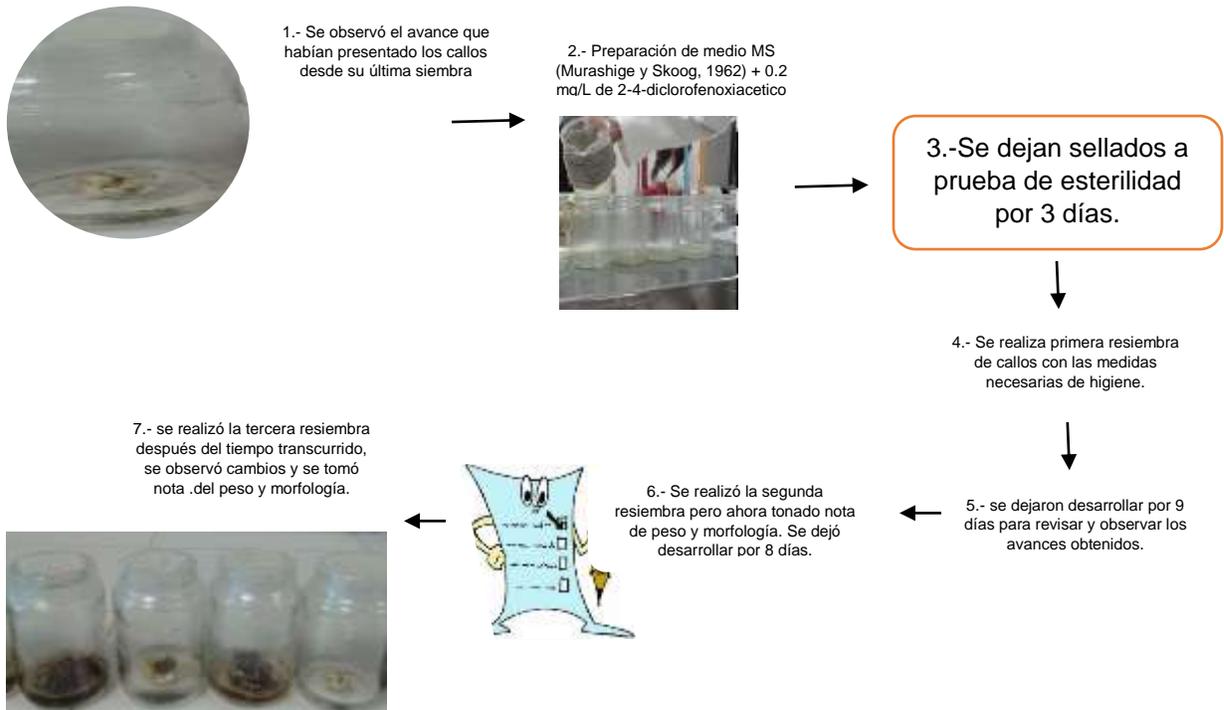
Objetivos específicos:

- ✚ Determinar el peso de los callos trascurrido el tiempo de investigación.
- ✚ Caracterizar morfológicamente cada uno de los frascos con contenido de callos de *Hyptis Suaveolens*.

3.- Problemas a resolver

- ✓ Caracterización morfológica de los callos obtenidos de *Hyptis suaveolens*
 - ✓ Crecimiento de biomasa de los callos en peso exacto

4.- Procedimiento y descripción de las actividades realizadas



Descripción

1.- Los callos presentaban coloración café mal formados, otros presentaban coloración blanca con medio de cultivo fenolizado, era ya de importancia su resiembra.

2.- Se preparó $\frac{1}{2}$ litro de medio MS (Murashige y Skoog, 1962), 15 gramos de sacarosa y Phytigel utilizando las concentraciones utilizadas adicionando 0.2mg/L de 2-4-diclorofenoxiacético que es la concentración adecuada para el desarrollo de callos, más 6.0 mg/l de BAP.

| Medio MS | Cantidad |
|------------------|------------|
| Sales MS | 2.5g |
| Sacarosa | 15g |
| Minositol | 50mg/L |
| Fosfato de sodio | 25mg/L |
| Vitaminas | 5 ml/L |
| pH | 5.7 +- 0.1 |
| Phytigel | 1.25g/L |
| 2-4-d | 2 mg/L |
| BAP | 3 mg/L |

Se vertió el medio en frascos con 25 ml cada uno aproximadamente, se llevo a autoclave por 15 minutos a 121°C, posterior a eso se sellaron con papel climpak y pusieron a prueba de esterilidad.

Tabla1. Medio MS (Murashige y Skoog, 1962),

3.- El medio vertido en los frascos y sellados se dejaron a prueba de esterilidad por 3 días esto es colocar los frascos en un lugar libre de residuos de algún tipo y observar si existe crecimiento bacteriano u hongos, si esto sucede entonces el medio debe ser desechado y preparar nuevo medio para evitar contaminación, en este momento los frascos con pesados antes de resembrar (tabla 2).

4.- Después de haber pasado los días de la prueba de esterilidad los frascos con medio y con el contenido de callos son llevados a campana de flujo laminar para ser resembrados, esto se realizó desinfectando las paredes y el área de trabajo con benzal para instrumentos y posteriormente se enciende luz UV por 20 minutos para desinfección correcta, cabe resaltar que los medios y los frascos que contienen los callos no se colocaron dentro de la campana ya que son fotosensibles y desnaturizaríamos el contenido nutrimental en ambos casos. Se tomó frasco a frasco y los callos fueron colocados en una base de cristal estéril, con el bisturí se fue cortando con mucho cuidado en trozos relativamente de 4 a 8mm y fueron colocados en el nuevo medio procurando no tocar los frascos, al término fueron sellados nuevamente y se colocaron en el área de cultivos.

5.- Se dejaron por 9 días antes de ver su avance, en esto se notó que los callos presentaron cambios ante esto fue coloración clara a blanco y crema, con crecimiento algo rugoso con algo de fenolización, el crecimiento fue de un 30% aproximadamente y se realizó la preparación de medio MS para la segunda resiembra y se dejó a prueba de esterilidad.

6.- En este momento ya se presentaban regiones embriogénicas proliferas que podrían formar brotes de nuevas plantas, se tomó el peso de cada uno se los frascos con sin callos (Tabla 3) para hacer una comparación de crecimiento ante la segunda resiembra, se realizó la resiembra usando en mismo método del punto 5, se guardó y observo.



Región
embriogénica

| Callos primera resiembra grs. | Fascos sin callos, grs. |
|----------------------------------|----------------------------|
| 132.232 | 121.050 |
| 144.345 | 158.300 |
| 132.254 | 113.180 |
| 148.112 | 115.700 |
| 130.111 | 107.950 |
| 132.580 | 106.300 |
| 140.703 | 108.300 |
| 148.433 | 158.400 |
| 132.334 | 110.800 |
| 132.255 | 108.300 |
| 130.154 | 106.453 |
| 128.234 | 118.987 |
| 122.750 | 112.343 |
| 120.668 | 114.240 |
| 132.334 | 110.810 |
| 136.243 | 108.900 |
| 121.432 | 111.490 |
| 132.453 | 138.494 |
| 114.523 | 122.354 |
| 120.232 | 160.307 |

Tabla 3. Peso de medio en fascos sin callos.

Tabla 2. Peso de callos con medio obtenidos de la primera resiembra.

7.- En este punto ya se había resembrado por segunda vez y se habían notado cambios significativos, para la tercera resiembra, esta se realizó pero antes de eso se pesó ahora los fascos para ver la biomasa acumulada en 9 días (tabla 4), se tomó ahora otros para metros como son, fenolización, oxidación, total de embriones y numero de raíces crecidas.

| Peso segunda resiembra grs |
|-------------------------------|
| 157.315 |
| 160.634 |
| 153.612 |
| 161.244 |
| 152.277 |
| 153.803 |
| 162.714 |
| 162.341 |
| 151.441 |
| 153.450 |
| 156.324 |
| 152.721 |
| 149.998 |
| 144.891 |
| 157.534 |
| 154.321 |
| 149.680 |
| 151.650 |
| 158.443 |
| 161.421 |

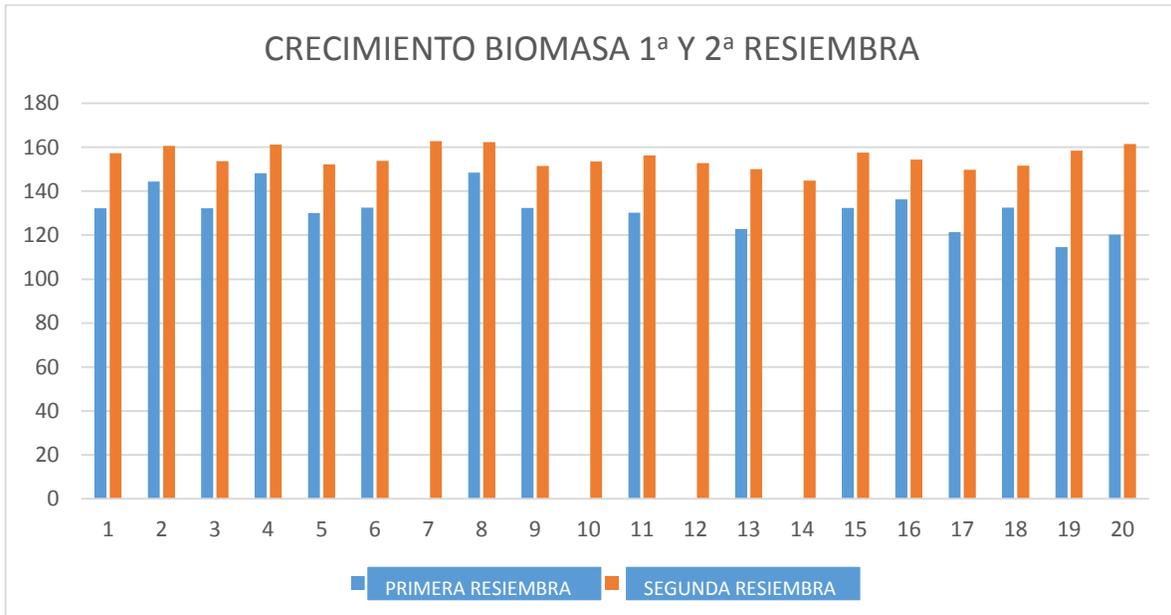
Tabla 4. Peso después de la segunda

Se observó el cambio en ellos tomando en cuenta fenolización, cambio de color y crecimiento de raíces, en los cuales 5 frascos presentaron porcentaje de fenolización mayor al 70%, en porcentaje de oxidación mayor a 70% fueron 5 frascos, en las raíces que se formaron dando una cantidad de raíces de 3 a 9 fueron 7 frascos, también se observó y alguno de ellos llegaron a el nivel de formación de embriones en los cuales solamente un frasco presento dicha actividad (tabla 5).

| Frascos | Fenolización % | Oxidación % | Raíces # | Embriones # |
|---------|----------------|-------------|----------|-------------|
| 1 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 3 | 0 | 15 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| 5 | 3 | 3 | 0 | 1 |
| 6 | 3 | 60 | 0 | 0 |
| 7 | 15 | 20 | 0 | 0 |
| 8 | 20 | 50 | 4 | 0 |
| 9 | 0 | 60 | 0 | 0 |
| 10 | 70 | 80 | 3 | 0 |
| 11 | 10 | 10 | 4 | 0 |
| 12 | 90 | 95 | 0 | 0 |
| 13 | 30 | 55 | 7 | 0 |
| 14 | 50 | 60 | 0 | 0 |
| 15 | 80 | 80 | 3 | 0 |
| 16 | 15 | 60 | 6 | 0 |
| 17 | 15 | 60 | 9 | 0 |
| 18 | 70 | 100 | 0 | 0 |
| 19 | 70 | 80 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 20 | 0 | 0 |

Tabla 5. Características resaltadas en la producción de biomasa en callos.

5.- Resultados



Grafica3.- Comparación 1ra y 2da resiembra

Según la comparación del peso de los frascos más medio y los callos después de su periodo de espera, se nota una diferencia significativa ante su crecimiento, sin contar los cambios morfológicos que sufrió cada frasco en relación a los callos.

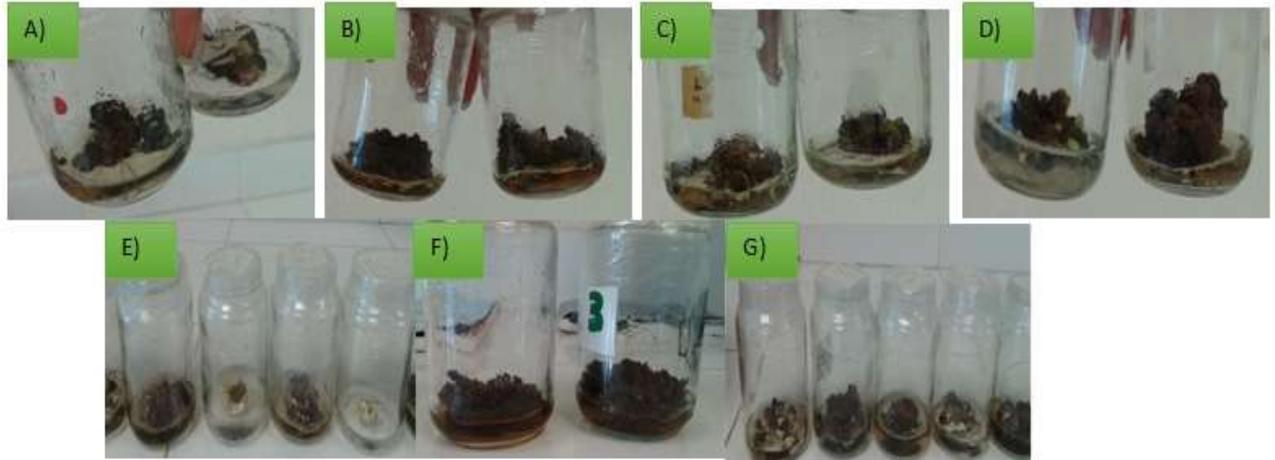
Peso de callos propagados

| Peso en gramos obtenido de primera resiembra. | Peso en gramos obtenido de segunda resiembra. |
|---|---|
| 11.182 | 36.265 |
| 0 | 2.334 |
| 19.074 | 40.432 |
| 32.412 | 45.544 |
| 22.161 | 44.327 |
| 26.28 | 47.503 |
| 32.403 | 54.414 |
| 0 | 3.941 |
| 21.534 | 40.641 |
| 23.955 | 45.15 |
| 23.701 | 49.871 |
| 9.247 | 33.734 |
| 10.407 | 37.655 |
| 6.428 | 30.651 |
| 21.524 | 46.724 |
| 27.343 | 45.421 |
| 9.942 | 38.19 |
| 0 | 13.156 |
| 0 | 36.089 |
| 0 | 1.114 |

Tabla6.- Peso de callos en cada una de las resiembras

Se observa de manera notable que el peso en gramos de los callos propagados creció de manera notable y se obtuvo biomasa.

Crecimiento en callos.



- A) Se puede observar callos malformados con coloración café oscura.
- B) Coloración café claro, sin formación de embriones ni producción de raíces.
- C) En este caso se puede observar que la biomasa es mayor en proporción al primer frasco, se nota aquí la existencia de 3 raíces en forma de tiras sin hasta este momento presencia de embriones.
- D) Concentración de biomasa, con coloración oscura sin brote de raíces ni embriones.
- E) Formación de callos en buena cantidad con nivel de oxidación considerable, fenolización en nivel bajo, sin brotes de raíces ni embriones.
- F) Se nota en un frasco el brote de embrión, coloración blanca con el centro verdusco, sin presencia de fenolización ni oxidación.
- G) En este caso los callos sufrieron fenolización severa y fueron desechados ya que no se podían recuperar.
- H) Se observan 3 frascos con brote de embriones y 2 de ellos con brote de raíces sin formar embriones, con niveles de oxidación considerables y de fenolización bajos.

6.- Conclusiones y Recomendaciones

- El estudio de los datos obtenidos durante el experimento del proyecto arrojó como resultado que los callos tuvieron crecimiento significativo ya que el peso de los callos aumento en manera beneficiosa en cada uno de los frascos.
- Por lo tanto es favorable la implementación del uso de resiembras utilizando fitohormonas para apoyar la propagación de callos de *Hyptis Suaveolens*.
- El proyecto demuestra que es viable la implantación de los métodos que fueron utilizados a lo largo de este proyecto, ya que fue cubierto el objetivo con puntos positivos al resultado final.

7.- Competencias desarrolladas y/o aplicadas

- ❖ Procedimiento para la preparación de medio MS (Murashige y Skoog, 1962).
 - ❖ Uso de la campana de flujo laminar.
 - ❖ Empleo de autoclave.
 - ❖ Uso de reactivos en el laboratorio.

8.- Referencias bibliográficas y virtuales

Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Chan o chía *Hyptis suaveolens* (L.) Poit Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. UNAM. México. 2009.

Godoy-Hernandez G. and Vázquez-Flota F. A. Chapter 4 Growth Measurements: Estimation of Cell Division and Cell Expansion. Methods in Molecular Biology, vol. 318: Plant Cell Culture Protocols, Second Edition. Edited by: V. M. Loyola-Vargas and F Vázquez-Flota Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2006. Pp 51-58.

Jesus, N.Z.T.; Falcao,H.S.; Lima,G.R.M.; Caldas Filho, M.R.D.; Sales,I.R.P.; Gomes, I.F.; Santos,S.G.; Tavares,J.F.; Barbosa-Filho, J.M.; Batista L.M. *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae), a medicinal plant protects the stomach against several gastric ulcer models. Journal of Ethno pharmacology, Volume 150, Issue 3, 12 December 2013, Pages 982-988.

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Hyptis%20suaveolens&id=7152>