



INDUCCIÓN DE CALLO Y CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSIÓN DE *Eysenhardtia polystachya* PARA LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANTIURULITIASICOS.

Antonio Bernabé-Antonio¹, F. Antonio López-Dellamary Toral¹, Eduardo Salcedo-Pérez¹, Fernando Santacruz-Ruvalcaba², Amalia Maldonado-Magaña³, Francisco Cruz-Sosa⁴

¹ Departamento de Madera Celulosa y Papel, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, ² Departamento de Producción Agrícola, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara Km 15.5 Carr. Guadalajara-Nogales C.P. 45100, Zapopan, Jalisco, México. ³ Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Universidad 1001, Col. Chamilpa, C.P. ⁴ Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina C.P. 09340, México D.F. 62209, Cuernavaca, Morelos, México. E-mail: antonio.bernabe@red.cucei.udg.mx

Palabras clave: Cultivo in vitro, Compuestos fenólicos, Antiurólitiasis

Introducción. La urolitiasis o litiasis renal es uno de los padecimientos más importantes debido a su alta morbilidad. Pocas especies como *Plectranthus mollis*, *Larrea tridentata* y *Eysenhardtia polystachya* (Fig. 1a) han sido estudiadas por tener gran actividad antiurólitiasica (1,2). *E. polystachya* se distribuye ampliamente en México, pero su diversidad de uso ha provocado disminución de las poblaciones silvestres, por lo que no es factible obtener fitoquímicos anti-urólitiasicos (flavonoides) directamente de ellas (3). El cultivo in vitro de tejidos y/o células en suspensión (CCS) es una alternativa viable para la producción estos compuestos.

El objetivo fue evaluar diferentes reguladores de crecimiento vegetal (RCV) en *E. polystachya* para inducir callo, establecer un CCS y determinar fenoles y flavonoides totales.

Metodología. Plantas de 6 meses de edad (Fig. 1a) se obtuvieron del Vivero Forestal de Ameca, Jalisco. Segmentos de hojas (Fig. 1b) desinfectadas se sembraron en medio de cultivo MS. Para inducir callo KIN o BA se combinaron con ANA, AIA, AIB, 2,4-D, o PIC, todas en 0, 0.1, 1 y 2 mg/L. Los cultivos se incubaron a 26±2 °C y 16 horas luz. Para establecer los CCS, matraces de 125 mL con 25 mL de MS líquido se inocularon con 1.5 g callo y se realizó la cinética de crecimiento por 18 días. Los extractos metanólicos de planta y células obtenidos por sonicación se usaron para determinar los fenoles totales (PT) por el método de Folin-Ciocalteu y flavonoides totales (FT) por el método AICl₃.

Resultados. Los reguladores AIA, 2,4-D o AIB combinados con KIN o BA indujeron callo en menos del 25% de explantes. ANA (2 mg/L) + KIN (0.1 mg/L) y PIC (1 mg/L) + KIN (0.1 mg/L) fueron capaces de inducir callo friable (Fig. 1c) en 100 y 98.4% de los explantes a los 10 días de cultivo, respectivamente (Tabla 1).



Fig. 1. Planta de *E. polystachya* de 6 meses de edad (a); explante de hoja (b); callo (c); CCS (d); y biomasa de CCS (e).

Ambos callos se usaron para iniciar los CCS pero sólo con PIC (1 mg/L) + KIN (0.1 mg/L) se logró establecer los CCS (Fig. d). El crecimiento del cultivo fue llevado hasta los 18 días. La fase de adaptación duro 2 días, y la fase exponencial 10 días mostrando la máxima acumulación de biomasa seca (14.0 g/L).

Tabla 1. Inducción de callo combinando diferentes RCV en explantes de hoja de *E. polystachya*.

RCV (mg/L)*		Inducción de callo (%)	RCV (mg/L)*		Inducción de callo (%)
PIC	KIN		ANA	KIN	
1.0	0.0	92.2±6.6 ^e	1.0	0.0	79.7±2.2 ^{bcd}
2.0	0.0	82.8±2.2 ^{abcde}	2.0	0.0	90.6±4.4 ^{abc}
1.0	0.1	98.4±2.2 ^a	1.0	0.1	95.3±2.2 ^{ab}
2.0	0.1	93.8±0.0 ^{ab}	2.0	0.1	100.0±0.0 ^a
1.0	1.0	89.1±2.2 ^{abcd}	1.0	1.0	81.3±4.4 ^{abcd}
2.0	1.0	84.4±4.4 ^{abcde}	2.0	1.0	68.8±3.3 ^{de}
1.0	2.0	78.1±4.4 ^{abcde}	1.0	2.0	76.6±6.6 ^{bcde}
2.0	2.0	73.4±2.2 ^{bcde}	2.0	2.0	75.0±4.4 ^{cde}

*Solo se muestran RCV que indujeron callo en más del 60%. Medias ± DS seguidas de la misma letra en columna son estadísticamente iguales (Tukey P≤0.05).

En la determinación preliminar de PT las plantas produjeron 1551.7 mg ácido gálico (AG)/Kg biomasa, mientras que las células secas tuvieron 739.8 mg AG/kg biomasa. En la planta también se encontró alta cantidad de FT, 1242.9 mg catequina (Cat)/kg biomasa, y en las células 162.9 mg Cat/kg biomasa.

Conclusiones. Bajas concentraciones de PIC y KIN permitieron inducir rápidamente callo friable y establecer los CCS en *E. polystachya*. Es el primer trabajo reportando PT y FT en cultivos celulares de *E. polystachya*. Cromatografía en columna, HPLC-MS, y elicitación de cultivos se realizarán más adelante para determinar e incrementar los compuestos fenólicos antiurólitiasicos.

Agradecimiento. CONACYT, proyecto 236699-2015.

Bibliografía.

- Baheti DG, Kadam SS (2013). *Int J Pharmaceu Chem Biol Sci.* 3(4):1276-1285.
- Portilla-de Buen E, Ramos L, Aguilar A, Ramos A, et al. (2008). *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 46(5):519-522.
- Pérez GRM, Vargas R, García LM, Dávila L (2002). *Biol Coleg Mex Urol.* 17(3):135-139.