

Desinfestación *in vitro* de Explantes de *Kalanchoë pinnata* para la obtención de células desdiferenciadas

CHIQUETE-CARRILLO, Jesús†*, ROMO-MARTÍNEZ, Enrique, GARCÍA-MAGALLANES, Noemí y BENÍTEZ-GARCÍA, Israel

Universidad Politécnica de Sinaloa, Mazatlán, Sinaloa, México

Recibido Febrero 20, 2016; Aceptado Agosto 25, 2016

Resumen

El género *Kalanchoë* es una fuente importante de compuestos bioactivos, entre los que destacan los bufadienólidos, los cuales presentan actividad citotóxica en diferentes líneas celulares cancerígenas. El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo de desinfestación de explantes de *Kalanchoë pinnata* para la obtención de células indiferenciadas con propiedades terapéuticas. El experimento de desinfestación se llevó a cabo mediante el software Design Expert®, el protocolo consistió un Diseño Central Compuesto (DCC), usando dos agentes desinfectantes, etanol (0, 48,96 % v/v) e hipoclorito de sodio (Cloralex®) (0.10 y 20% v/v). Las concentraciones óptimas se obtuvieron con ANOVA y un análisis de superficie de respuesta, las concentraciones óptimas fueron Etanol al 38.9% e Hipoclorito de Sodio al 11.78%, generando un porcentaje de desinfestación y un porcentaje de tejido viable del 70.11% y 90.03% respectivamente. Con el presente proyecto se logró establecer un protocolo de desinfestación de explantes de la planta *K. pinnata*, los cuales servirán de material de inicio para la obtención de células indiferenciadas para la obtención de metabolitos secundarios con propiedades terapéuticas.

Etnobotánica, Cultivo *in vitro*, desinfestación, Kalanchoë, bufadienólidos**Abstract**

Kalanchoë is a source of bioactive compounds, among them, we can emphasize bufadienolides, these compounds present cytotoxic activity against cancer cell lines. The aim of this work was establish a disinfection protocol of *Kalanchoë pinnata* explants for obtaining undifferentiated cells with therapeutic properties. The disinfection experiment designed using the software Design Expert® the protocol consisted in a Central Composite Design (CCD), using two disinfectant agents, ethanol (0, 48 and 96% v/v) and sodium hypochlorite (Cloralex®) (0.10 and 20% v/v). The optimal concentrations obtained by ANOVA and analysis of response surface, the optimal concentration were ethanol at 38.9% and sodium hypochlorite at 11.78%, with disinfection percentage and viable tissue percentage of 70.11% and 90.03% respectively. This protocol allowed establishing a disinfection of *K. pinnata* explants, this disinfested explants will be the initial material for the obtaining of undifferentiated cells for the production of secondary metabolites with therapeutic properties.

Ethnobotanics, *in vitro* culture, disinfection, Kalanchoë, bufadienolides

Citación: CHIQUETE-CARRILLO, Jesús, ROMO-MARTÍNEZ, Enrique, GARCÍA-MAGALLANES, Noemí y BENÍTEZ-GARCÍA, Israel. Desinfestación *in vitro* de Explantes de *Kalanchoë pinnata* para la obtención de células desdiferenciadas. Revista de Ciencias de la Salud. 2016. 3-8: 11-18.

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: 2013030436@upsin.edu.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

El uso de las plantas con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad; en los últimos años ha incrementado el interés de los consumidores por usar productos de origen natural y en específico los compuestos bioactivos de las plantas.

En nuestro país la etnobotánica es un recurso ampliamente utilizado en regiones tanto rurales como suburbanas; con tendencias al uso medicinal, descubrimiento y desarrollo de fármacos como por ejemplo el QG5®, Taxol®, y Lemblastine®.

En la actualidad el uso de plantas del género *Kalanchoe* ha destacado por ser uno de los más usados en la etnobotánica; este género constituye una fuente importante de grupos de compuestos bioactivos, como: flavonoides, esteroides y terpenos, de este último destacan los bufadienólidos, los cuales presentan actividad citotóxica en diferentes líneas celulares cancerígenas.

Es por esto que en este trabajo se realizó un protocolo de desinfección de explantes de *Kalanchoe* con el objetivo de emplear estos explantes como material inicial para la obtención de células indiferenciadas *in vitro* que serán la base de estudios para la obtención de metabolitos secundarios con propiedades terapéuticas (López-Díaz, 2015).

Para llevar a cabo la producción de metabolitos secundarios mediante células indiferenciadas, es necesario llevar a cabo un proceso de establecimiento de cultivo *in vitro*. El cultivo de células y tejidos vegetales hace referencia a las técnicas empleadas para el crecimiento de células, tejidos y órganos vegetales en condiciones *in vitro*, bajo condiciones de asepsia, controladas y libres de contaminación microbiana (Street, 1977; Calva y Ríos, 1999).

El principio de totipotencia permite llevar a cabo el cultivo *in vitro*; ya que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta, independientemente del tejido o especialización del mismo, por lo tanto, este presenta la capacidad de regenerar una planta completa (Ferl y Paul, 2000).

El cultivo de células vegetales representa una alternativa para la obtención de metabolitos de interés, representando una gran ventaja cuando las plantas son silvestres, además de requerir largos periodos de cultivo, aunado a esto, presentan rendimientos de metabolitos secundarios bajos o no se han desarrollado procesos para su síntesis química. La ventaja que representa un sistema de cultivo *in vitro*, es que el sistema es independiente de factores externos (disponibilidad de nutrientes, condiciones climáticas); además es posible controlar las condiciones de cultivo, lo que se traduce en un mayor rendimiento y calidad de los metabolitos (Sajc *et al*, 2000).

La primera etapa para el establecimiento del cultivo *in vitro* es eliminar la elevada contaminación por microorganismos, principalmente bacterias y hongos que conviven con las plantas. Para ello debe realizarse la evaluación de productos desinfectantes y formas de aplicación, así como la parte de la planta (explante) más adecuado que permitan un buen desarrollo de los mismos en el medio de cultivo nutritivo (Hernán-González, 2007). Durante los procesos de desinfección previos al establecimiento *in vitro* se ha reportado que el uso de agentes desinfectantes pueden ser tóxicos y causar daño al explante impidiendo su desdiferenciación y generación de células desdiferenciadas, por lo que es importante evaluar el tiempo de exposición del explante con el agente desinfectante así como la concentración, y posterior al tratamiento evaluar la viabilidad del tejido para responder al medio de cultivo (Badoni y Chauhan, 2010).

Materiales y Métodos

Diseño de Experimento

Se llevó a cabo un diseño de experimento para el establecimiento del protocolo de desinfección mediante el software Design Expert®, el protocolo consistió un diseño central compuesto con dos factores, tomando 0 y 96% como valores bajos y altos, y para el hipoclorito de sodio (Cloralex®) 0 y 20%, se tomó como variable de respuesta el porcentaje de desinfección y el tejido desdiferenciado en medio MS.

Preparación del Medio de Cultivo

Para la preparación del medio de cultivo, se empleó medio MS (Murashige y Skoog, 1962) liofilizado (Sigma ®) a una concentración de 3 g l⁻¹, se adicionó con 30 g l⁻¹ como fuente de carbono y se empleó agar a una concentración de 15 g l⁻¹ como agente gelificante, al medio se le adicionaron concentraciones de fitohormonas desde 0,1,2,5 mg l⁻¹ de 6- Bencil Amino Purina (BAP) y Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), el pH se ajustó a 5.7 y se añadieron 25 ml de medio de cultivo en cada caja Petri.

Pretratamiento de los Explantes

Se obtuvieron explantes de brotes vegetativos y de hojas jóvenes de *K. pinnata* de un jardín de la Universidad Politécnica de Sinaloa, los brotes vegetativos fueron retirados de las hojas y las hojas jóvenes se cortaron con ayuda de un bisturí; posteriormente se realizó un lavado con agua corriente para retirar restos de tierra; una vez limpios, los explantes se colocaron en agua con detergente (Foca®) en agitación a 60 rpm por 5 minutos; posteriormente se retiró el detergente mediante tres lavados con agua corriente, todo lo anterior se realizó en condiciones *ex vitro*.

Protocolo de Desinfección

Después de retirar el detergente se procedió a trabajar bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar; los explantes fueron colocados en un vaso de precipitado para posteriormente ser lavados en tres ocasiones con agua destilada estéril, una vez realizados los lavados se prosiguió a separar los explantes en 13 frascos limpios y estériles, cada frasco representaba una corrida del diseño del experimento, a cada frasco se le realizó un tratamiento diferente, en los cuales se empleaban soluciones de etanol e hipoclorito de sodio (Cloralex®) a diferentes concentraciones, realizándose primero una inmersión en la solución de etanol correspondiente por un minuto, posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril, seguidos por una inmersión en la solución de hipoclorito de sodio correspondiente, con un tiempo de inmersión de un minuto para finalmente realizarse de nueva cuenta tres lavados con agua destilada estéril. Una vez realizada la desinfección de los explantes de *Kalanchoe* se prosiguió a realizar el corte de los explantes, posteriormente se colocaron 10 explantes por caja Petri, las cuales contenían el medio de cultivo MS, se realizaron 6 réplicas por cada uno de los tratamientos de desinfección.

Las cajas Petri se dejaron en un cuarto de cultivo a 26°C por 6 días, para permitir el monitoreo de la presencia de contaminación fúngica o bacteriana.

Resultados y Discusiones

La respuesta que se obtuvo en función a las concentraciones de agentes desinfectantes empleadas en el protocolo de desinfección se muestra en la Tabla 1.

Corrida	Etanol (%)	Hipoclorito de Sodio (%)	Desinfestación (%)	Desdiferenciación (%)
1	48	10	83.33%	100.00%
2	48	10	100.00%	83.33%
3	96	10	83.33%	33.33%
4	0	20	100.00%	50.00%
5	0	10	66.67%	66.67%
6	96	20	50.00%	83.33%
7	96	0	33.33%	66.67%
8	0	0	0.00%	100.00%
9	48	10	66.67%	100.00%
10	48	20	16.67%	83.33%
11	48	10	50.00%	100.00%
12	48	10	50.00%	100.00%
13	48	0	16.67%	83.33%

Tabla 1 Resultados del protocolo de desinfestación de los explantes de *Kalanchoe pinnata*

La variabilidad en la respuesta para cada uno de los efectos mediante la comparación del cuadrado de la media y el error estándar estimado se obtuvo a través del análisis de varianza, los resultados del ANOVA (Tabla 2) mostraron que existe un efecto con p-valor menor a 0.05, lo cual indica que dichas variables y sus interacciones tienen una significativa influencia sobre la respuesta (95%) en el caso del porcentaje de desinfestación; de manera similar, los resultados del ANOVA (Tabla 3) mostraron que existe un efecto con p-valor menor a 0.05, lo cual indica, de igual manera que las variables y sus interacciones tienen una influencia significativa sobre la respuesta (95%), en este caso sobre el porcentaje de tejido desdiferenciado.

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-Value Prob>F
Model	8801.62	5	1760.32	3.39	0.0712 no significant
A-Etanol %	2.667E-008	1	2.667E-008	5.136E-011	1.0000
B-Hipoclorito %	2268.52	1	2268.52	4.37	0.0749
AB	1736.11	1	1736.11	3.34	0.1102
A ²	767.19	1	767.19	1.48	0.2635
B ²	4794.95	1	4794.95	9.24	0.0189
Residual	3634.26	7	519.18		
Lack of Fit	1745.37	3	581.79	1.23	0.4077 not significant
Pure Error	1888.89	4	472.22		
Cor Total	12436.87	12			

Tabla 2 Análisis de Varianza para la evaluación del efecto de agentes desinfectantes sobre el porcentaje de desinfestación

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-Value Prob>F
Model	3771.49	5	754.30	3.11	0.0857 no significant
A-Etanol %	185.19	1	185.19	0.76	0.4113
B-Hipoclorito %	185.19	1	185.19	0.76	0.4113
AB	1111.11	1	1111.11	4.85	0.0697
A ²	2190.29	1	2190.29	9.03	0.0198
B ²	73.89	1	73.89	0.30	0.5982
Residual	1698.60	7	242.66		
Lack of Fit	1476.38	3	492.13	8.86	0.0307 significant
Pure Error	222.22	4	55.56		
Cor Total	5470.09	12			

Tabla 3 Análisis de Varianza para la evaluación del efecto de agentes desinfectantes sobre el porcentaje de tejido desdiferenciado

Las condiciones óptimas para lograr la respuesta máxima, derivadas de la relación entre los efectos de las concentraciones de agentes desinfectantes fueron las siguientes: Etanol al 38.9 % (v/v) e Hipoclorito de Sodio 11.78% (v/v), obteniendo porcentajes de desinfestación y tejido desdiferenciado de 70.11% y 90.03% respectivamente (Figura 1). Dichas condiciones se representan mediante superficies de respuesta generada por el DCC, el cual permite visualizar las regiones óptimas y determinar la influencia de los factores sobre la relación porcentaje de desinfestación (Gráfico 1) y de tejido desdiferenciado (Gráfico 2).

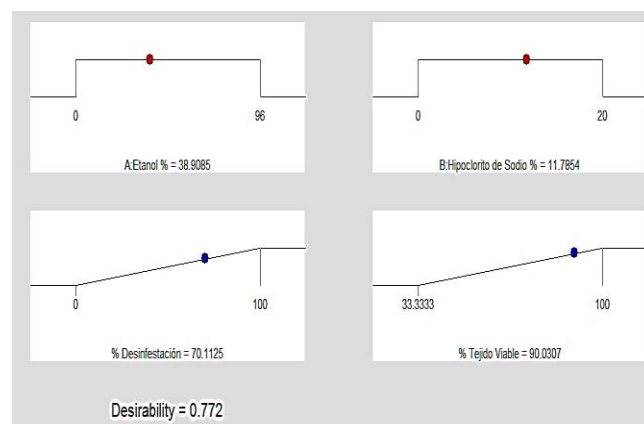


Figura 1 Optimización de la respuesta en función de los niveles máximos y mínimos de los factores experimentales

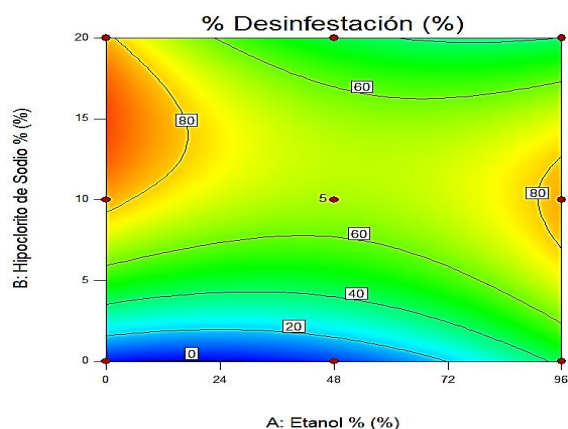


Gráfico 1 Superficie de respuesta evaluando el efecto de los agentes desinfectantes sobre el porcentaje de desinfección

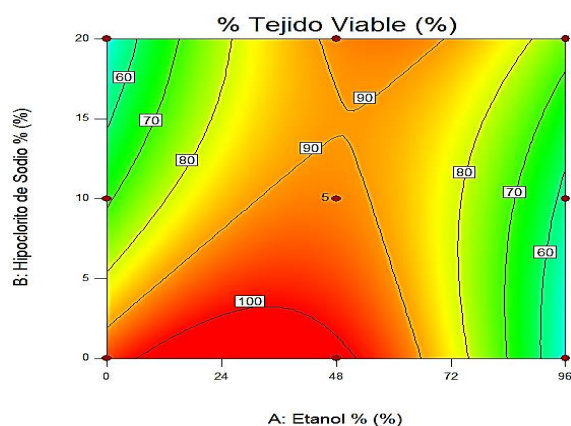


Gráfico 2 Superficie de respuesta evaluando el efecto de los agentes desinfectantes sobre el porcentaje de tejido desdiferenciado

Por otro lado, se observó clerosis (Figura 2) en los explantes en los tratamientos 1 (Et: 96% e Hip: 10%), 2 (Hip: 10%) y 3 (Et: 96% e Hip: 10%). La posible causa de la clerosis podría deberse al tipo de explante (hojas jóvenes como de brotes vegetativos).

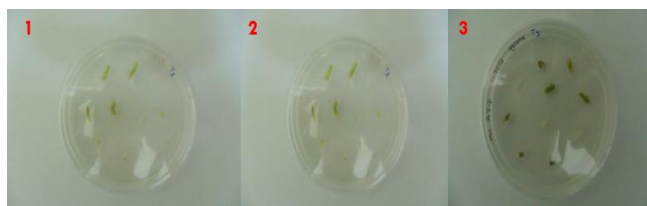


Figura 2 Caja Petri con tejido que presenta diferentes grados de clerosis

Sin embargo, a concentraciones de NaClO menores a 2% y tiempos de exposición menores a 5 minutos, los explantes sufren un menor daño fitotóxico en sus tejidos, evitando así su oxidación y facilitándose una regeneración *in vitro* más rápida y eficiente, esto de acuerdo a los resultados encontrados por Marulanda y colaboradores (2005). Se presentó tejido en proceso de organogénesis (Figura 3) a concentraciones de hormona de 1 mg l⁻¹ y 2 mg l⁻¹ de BAP, debido a que el explante utilizado corresponde a un brote vegetativo, el cual que es una forma de reproducción asexual de la planta, además de que el medio de cultivo contenía la fitohormona BAP, la cual es una citocinina y produce organogénesis como respuesta morfológica (Cob *et al*, 2010).



Figura 3 Vista al microscopio de tejido desinfectado y viable con presencia de organogénesis

Además, se presentó desdiferenciación del tejido (formación de callo) a concentraciones de hormonas de 1 mg l⁻¹ de BAP- 2 mg l⁻¹ de 2,4-D (Figuras 4 y 5) y de 2 mg l⁻¹ de BAP- 2 mg l⁻¹ de 2,4-D (Figuras 6 y 7), esto se produjo debido a que ambas hormonas se encuentran presentes en el medio de cultivo en concentraciones similares, teniendo como respuesta morfológica la formación de callo (Espinosa *et al*, 2012).



Figura 4 Caja Petri con tejido desinfectado y viable que presenta inicio de desdiferenciación. (Etanol 48% e Hipoclorito de Sodio 10%) (1 mg l⁻¹ de BAP- 2 mg l⁻¹ de 2, 4-D)

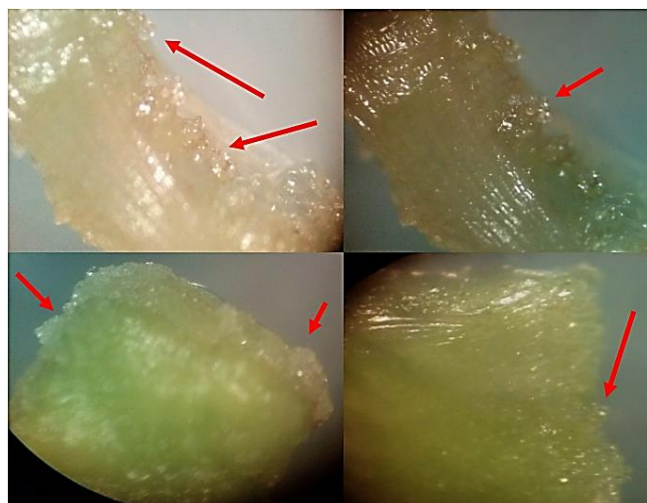


Figura 5 Tejido desinfectado y viable que presenta inicio de desdiferenciación, las flechas indican la formación de estructura globulares, posibles células proembrionarias (Etanol 96% e Hipoclorito de Sodio 10%) (1 mg l⁻¹ de BAP y 2 mg l⁻¹ de 2, 4-D)

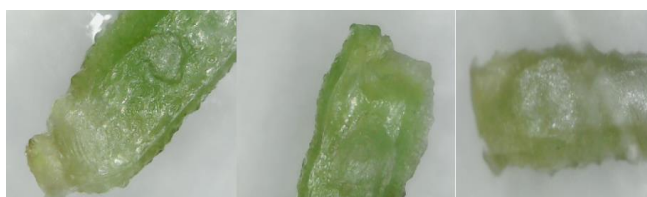


Figura 6 Tejido desinfectado y viable que presenta inicio de desdiferenciación (1 y 2: Etanol 96% e Hipoclorito de Sodio 10%; 3: Hipoclorito de Sodio 10%). (2 mg ml⁻¹ de BAP y 2 mg ml⁻¹ de 2, 4-D)

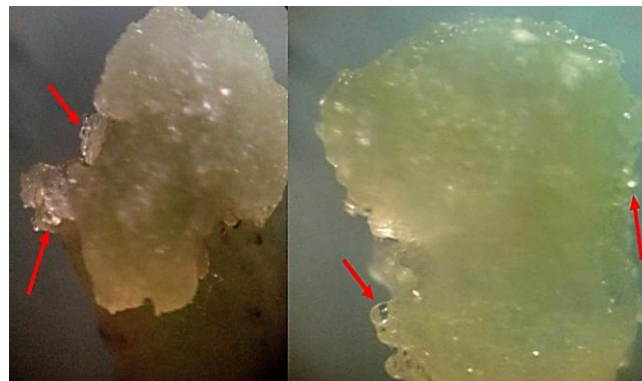


Figura 7 Tejido desinfectado y viable que presenta inicio de desdiferenciación (Etanol 48% e Hipoclorito de Sodio 10%) (2 mg l⁻¹ de BAP y 2 mg l⁻¹ de 2, 4-D)

De forma general, el tratamiento de desinfección encontrado difiere con protocolos realizados previamente para una especie diferente del género *Kalanchoë*, encontrándose en este un tratamiento con un porcentaje de desinfección del 98%, empleando como agentes desinfectantes etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 0.5% (López-Díaz, 2015), lo que indica que el efecto producido por los agentes desinfectantes varía de acuerdo al tipo de tejido tomado como explante y a la especie de la planta.

Mientras que de acuerdo a lo reportado por Lopez-Díaz (2015), una concentración de 0.5 mg l⁻¹ de 2,4-D, en medio MS basal al 100% de nutrientes, permite la desdiferenciación celular de los explantes de *Kalanchoë*, en este caso de la especie *K.daigremontiana*.

Conclusiones

Se encontraron las concentraciones óptimas de agentes desinfectantes mediante un ANOVA y el análisis de una superficie de respuesta, las concentraciones encontradas fueron Etanol al 38.9% e Hipoclorito de Sodio al 11.78%, generando un porcentaje de desinfección y un porcentaje de tejido desdiferenciado del 70.11% y 90.03% respectivamente.

Cabe destacar que las concentraciones óptimas serán evaluadas con el propósito de verificar los resultados obtenidos mediante la optimización.

Perspectivas

Llevar a cabo el protocolo de desinfestación con las concentraciones obtenidas en el presente trabajo y evaluar la respuesta obtenida.

Obtener las concentraciones óptimas de fitohormonas (BAP y 2,4-D para la obtención de callo y la posterior obtención de metabolitos secundarios con propiedades terapéuticas.

Referencias

Badoni, A. Chauhan, J. S. (2010) *In vitro sterilization protocol for micropropagation of Solanum tuberosum cv. "Kufri Himalini"*. *Academia Arena*, 2 (4), 24-27.

Blanes, P. S., Garro, O. A., Giménez, M. C., Hunzicker, G. A. *Aplicación de un diseño central compuesto para la determinación de especies orgánicas e inorgánicas de arsénico en agua por HPLC-HG-AAS*. Cátedra de Química Analítica I. Cátedra de Microbiología en Alimentos. Facultad de Agroindustrias .Universidad Nacional del Nordeste. Chaco, Argentina.

Cob, J., Sabja, A. M., Ríos, D., Lara, A., Donoso, P. J., Arias, L., Escobar, B. (2010). *Potencial de la organogénesis como estrategia para la masificación in vitro de Persea lingue en la zona centro-sur de Chile. Bosque (Valdivia)*, 31(3), 202-208.

Das, M., Pal, A. (2005). *In vitro regeneration of Bambusa balcooa Roxb.: Factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. Plant cell, tissue and organ culture*, 81(1), 109-112.

Espinosa, A., Silva, J., Sariago, S., Cholo Masapanta, L., Delgado, H. (2012). *Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2, 4-diclorofenoxiacético en la formación de callos en Morus alba L. Pastos y Forrajes*, 35(4), 407-416.

Ferl R, Paul A.L. (2000) *Genome organization an expression*. En: Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (Eds.). (2015). *Biochemistry and molecular biology of plants*. John Wiley & Sons. USA: American Society of Plants Physiologist, pp. 312-357.

Folgueras, M. (2006). *La contaminación microbiana en la micropropagación in vitro de las raíces y tubérculos tropicales* (No. 1165). Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, Villa Clara (Cuba).

Gutiérrez L, Marulanda M, López R. (2004). *Multiplicación de brotes de Guadua angustifolia Kunth, mediante el sistema de inmersión temporal. (SIT)*. Grupo de Biodiversidad y Biotecnología. Facultad de Ciencias Ambientales. Universidad Tecnológica de Pereira. Simposio Internacional de Guadua. 7 p.

Hernán-González. (2007). *Evaluación de métodos de desinfección y tipos de explante de la especie vegetal Piper oradendron Trel. & Standl., para el establecimiento de su cultivo in Vitro*. (Tesis de Maestría). Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Escuela de Estudios de Postgrados. Guatemala, Guatemala.

López-Díaz, D. E. (2011). *Análisis del RNAm del Gen que Codifica para la Enzima Escualeno Sintasa (sqs) en Cultivo de Células de Kalanchoe Daigremontiana*. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Yucatepec, Morelos, México.

Murashige T, Skoog F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

Rodríguez, M., Matehus, J., Gerstl, A., Santana, M. (2008). *Identificación del agente causal de una bacteriosis en ñame (Dioscorea alata L.)*. *Interciencia*, 33(7), 1-11.

Sajc, L., Grubisic, D., Vunjak-Novakovic, G. (2000). *Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research*. *Biochemical Engineering Journal*, 4(2), 89-99.

Sánchez M, Marmolejo F, Bravo N. 2002. *Microbiología y aspectos fundamentales*. Universidad Nacional. Sede Palmira. Cali, Colombia. 142 – 159 p.

Street, H. E. (1968). *The induction of cell division in plant suspension cultures*. *Les Cultures de tissus de plantes*, 177-193.