

Optimización de la producción de alcaloides en *Zephyranthes carinata* por medio de Organogénesis o Embriogénesis Somática *in vitro*

MARÍA CAMILA TOFIÑO BADIEL

UNIVERSIDAD ICESI

FALCUTAD DE CIENCIAS NATURALES, DEPARTAMENTO DE CIENCIAS  
FARMACÉUTICAS

SANTIAGO DE CALI

2017

Optimización de la producción de alcaloides en *Zephyranthes carinata* por medio de Organogénesis o Embriogénesis Somática *in vitro*

María Camila Tofiño Badiel

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE  
PREGRADO EN QUÍMICA FARMACÉUTICA

Directora: Zaida Lentini Gil, PhD.  
Decana de la Facultad de Ciencias Naturales

Co-Directores: Guillermo León Montoya Peláez, PhD.  
Jefe del Departamento de Ciencias Farmacéuticas

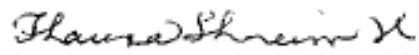
Geraldine Restrepo, Bióloga.  
Joven Investigadora, Laboratorio de Biotecnología Vegetal

SANTIAGO DE CALI

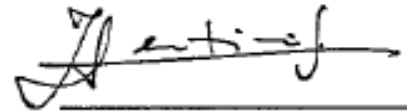
2017



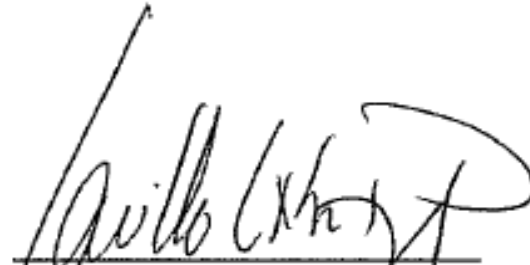
Aprobado por:



**Thaura Ghneim Herrera, PhD.**  
**Evaluadora.**



**Zaida Lentini Gil, PhD.**  
**Directora del Proyecto.**



**Guillermo León Montoya, PhD.**  
**Co-director del Proyecto.**

## **Agradecimientos:**

Le agradezco a la Universidad Icesi y a la Facultad de Ciencias Naturales por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto de grado y por todos los conocimientos inculcados a través de mi carrera universitaria.

A la directora de mi proyecto de grado, la doctora Zaida Lentini Gil, quien acepto guiarme con su conocimiento en este importante proceso de aprendizaje de cómo realizar una investigación científica, para poder culminar mi carrera.

A la bióloga joven investigadora Geraldine Restrepo co-directora de mi proyecto quien me acompañó en el proceso experimental, y encargada del semillero de investigación de Biotecnología Vegetal, donde me guio con su conocimiento por 2 años.

Al doctor Guillermo León Montoya, co-director de este proyecto, quien me guio con su conocimiento en fitoquímica y técnicas analíticas fundamentales para el desarrollo de la investigación.

A Duvan Fernando Castillo, integrante del Laboratorio de Instrumentación Química (LIQ), quien me brindó su gran ayuda en el procesamiento de los resultados de mi proyecto.

A mis compañeras del semillero de investigación de Biotecnología Vegetal, Daniela Alizandre, Isabela Barragán y María Camila Gómez por su apoyo en el desarrollo experimental de mi proyecto.

A Freddy Vanegas, María Eugenia Buitrago y Eddie Tabares por brindarme su conocimiento en cultivo *in vitro*, que fue de gran ayuda para mejorar mi desempeño en este campo.

A mis padres y hermanos quienes siempre me apoyaron incondicionalmente en todos los momentos de mi proyecto y mi carrera. A mis amigos por su constante aliento para finalizar mi proyecto.

## Tabla de Contenido

Tabla de Contenido.....	5
Tabla de contenido de Cuadros .....	6
Resumen .....	9
Abstract.....	10
1    Introducción .....	11
2    Descripción del Trabajo .....	13
2.1    Planteamiento del Problema.....	13
2.2    Marco Teorico y Estado del Arte.....	14
2.2.1    Familia <i>Amaryllidaceae</i> , plantas de interés científico.....	14
2.2.2    Cultivo <i>in vitro</i> .....	15
2.2.3    Medio de cultivo para la inducción de organogénesis y embriogénesis Somática.....	21
2.2.4    Producción de alcaloides en tejidos vegetales.....	22
2.2.5    Métodos analíticos para la identificación de metabolitos secundarios.	24
2.3    Objetivos.....	25
Objetivo General: .....	25
Objetivos específicos: .....	26
2.4    Metodología .....	26
2.4.1    Recolección de material vegetal.....	26
2.4.2    Cultivo <i>in vitro</i> .....	27
2.4.3    Evaluación de la respuesta <i>in vitro</i> y obtención de material para la extracción de alcaloides.....	34
2.4.4    Extracción de alcaloides.....	35
2.4.5    Cuantificación de alcaloides.....	37
2.4.6    Identificación de alcaloides. ....	39
2.4.7    Análisis estadístico.....	40
2.5    Resultados.....	41
2.5.1    Formación de bulbillos <i>in vitro</i> (vía organogénesis) a partir de twin-scales obtenido de bulbos del invernadero.....	41

2.5.2	Formación de callos friables y callos embriogénicos (vía embriogénesis somática) a partir de explantes de bulbos de invernadero y bulbillos sub-cultivados <i>in vitro</i> .	42
2.5.3	Evaluación de alcaloides.	47
2.5.4	Identificación de alcaloides.	50
2.5.5	Cuantificación de alcaloides.	53
2.6	Discusión	56
2.7	Conclusiones	66
2.8	Recomendaciones	68
3	Bibliografía	70

### Tabla de contenido de Cuadros

<b>Cuadro 1.</b>	Experimentos realizados para Organogénesis.	29
<b>Cuadro 2.</b>	Experimentos realizados para la inducción de callos embriogénicos a partir de bulbos de invernadero PA: parte apical de la escama, PB: placa basal de la escama.	31
<b>Cuadro 3.</b>	Experimentos realizados para la inducción de callos embriogénicos a partir de bulbillos sub-cultivados <i>in vitro</i> . PA: parte apical de la escama, PB: placa basal de la escama.	33
<b>Cuadro 4.</b>	Medio de cultivo MS, MS-A1 y MS-ES3.	34
<b>Cuadro 5.</b>	Material vegetal obtenido por Organogénesis	41
<b>Cuadro 6.</b>	Producción de callo friable y embriogénico a partir de escamas bulbos provenientes del invernadero.	46
<b>Cuadro 7.</b>	Producción de callo friable y embriogénico a partir de escamas provenientes de bulbillos sub-cultivados <i>in vitro</i> .	46
<b>Cuadro 8.</b>	Producción total de materia seca (mg) en los diferentes ensayos evaluados.	47
<b>Cuadro 9.</b>	Alcaloides detectados en los diferentes tejidos producidos <i>in vitro</i> y analizados utilizando los cromatogramas y espectros de masas obtenidos por UPLC/MS.	50
<b>Cuadro 10.</b>	Identificación de los alcaloides producidos en los tejidos vegetales obtenidos <i>in vitro</i> utilizando la información generada del análisis con UPLC/MS, y su comparación con los trabajos publicados por Katoch et al., 2012 y Rivera, 2015.	51
<b>Cuadro 11.</b>	Alcaloides encontrados en cada tipo de tejido vegetal analizado. H: hojas; B: bulbillos; CF: callo friable; CE: callo embriogénico.	52
<b>Cuadro 12.</b>	Concentraciones (%p/p) de todos los alcaloides detectados en los diferentes tejidos analizados.	54

## Tabla de contenido de Figuras.

<b>Figura 1.</b> Fotografía de la planta <i>Zephyranthes carinata</i> presente en el invernadero de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi. ....	15
<b>Figura 2.</b> Esquema general de Organogénesis y Embriogénesis Somática. ....	20
<b>Figura 4.</b> Corte de bulbo para obtener twin-scales.....	27
<b>Figura 5.</b> Esquema general del cultivo in vitro, los tratamientos evaluados y análisis realizados.....	28
<b>Figura 6.</b> Esquema general de la inducción de bulbillos con material vegetal del invernadero por medio de Organogénesis.....	30
<b>Figura 7.</b> Obtención de los explantes utilizados en la inducción de embriogénesis somática a partir de bulbos provenientes del invernadero o bulbillos sub-cultivados in vitro. Las escamas internas son seccionadas separando la parte basal de la apical. ....	32
<b>Figura 8.</b> Siembra de los explantes para la inducción de embriogénesis somática a partir de bulbos provenientes del invernadero o bulbillos sub-cultivados in vitro ...	32
<b>Figura 9.</b> Ejemplo de un cromatograma obtenido de la extracción de una muestra vegetal, donde el eje X se corresponde al tiempo de retención de cada compuesto, y el eje Y corresponde al porcentaje de abundancia en el que se encuentra cada compuesto en la muestra. Los recuadros negros indican el área bajo la curva del estándar de boldina; el recuadro azul indica el área bajo la curva del alcaloide en cuestión, en su respectivo tiempo de retención. ....	38
<b>Figura 10.</b> Ejemplo de un espectro de masas para la identificación de alcaloides. Los recuadros azules indican las fragmentaciones más abundantes de la molécula que corresponde a dicho alcaloide en cuestión. ....	39
<b>Figura 11.</b> Formación de callo friable y callo embriogénico a partir de escamas de bulbos de invernadero después de dos meses de cultivo en medio MS-ES3. A) Callo friable (flechas rojas) formado a partir de la parte apical de la escama. B) Callo embriogénico (flechas amarillas) formado a partir de la placa basal de la escama; en la escama también se observa formación de callo friable (flecha roja), y se puede apreciar la placa basal de la escama (color café). La barra representa 1 cm de ancho. ....	43
<b>Figura 12.</b> Formación de callo friable y callo embriogénico a partir de escamas de bulbillos obtenidos in vitro después de dos meses de cultivo en medio MS-ES3. A) Callo friable (flecha roja) generado de la parte apical de la escama. B) Callo embriogénico (flecha amarilla) formado a partir de la placa basal (color café) de la escama. La barra representa 1 cm de ancho. ....	43
<b>Figura 13.</b> Respuesta en formación de callo de todo tipo (barra azul), pre-embriogénico (barra naranja) o embriogénico (barra gris) partir de escamas de bulbos de invernadero (A y B) o de bulbillos inducidos in vitro (C y D). (A y C) escamas apicales; (B y D) placa basal, después de uno o dos meses de cultivo..	45

<b>Figura 14.</b> Respuesta en la formación de callos embriogénicos en el primer mes y segundo de cultivo a partir de la placa basal y parte apical de las escamas, de bulbos del invernadero (A) y de bulbillos inducidos <i>in vitro</i> (B).....	46
<b>Figura 15.</b> Producción de alcaloides (p/p%) en los tejidos vegetales obtenidos a partir de los bulbillos inducidos <i>in vitro</i> a partir de bulbos del invernadero y después de dos meses de cultivo.....	48
<b>Figura 16.</b> Producción de alcaloides en callos friables y callos embriogénicos inducidos a partir de escamas obtenidas de bulbos del invernadero o de bulbillos producidos <i>in vitro</i> .....	49
<b>Figura 17.</b> Producción de alcaloides (p/p%) hojas, bulbillos y callos obtenidos a partir de bulbos del invernadero o bulbillos producidos <i>in vitro</i> .....	50
<b>Figura 18.</b> Comparación de los diferentes alcaloides detectados en los tejidos obtenidos via organogénesis, hojas y bulbillos inducidos <i>in vitro</i> . (A) Alcaloides de mayor concentración, (B) alcaloides de menor concentración.....	55
<b>Figura 19.</b> Concentración del alcaloide Desconocido 3 detectada en los callos friables y embriogénicos inducidos a partir de la parte apical o de la placa basal de escamas de bulbos del invernadero o de bulbillos producidos <i>in vitro</i> .....	56



## Resumen

Las *Amaryllidaceae* son una familia de plantas que se caracterizan por producir alcaloides específicos de esta familia con propiedades farmacológicas importantes. Esta familia también es ampliamente conocida por el valor ornamental de sus flores llamativas. Muchas especies de esta familia, se encuentran amenazadas o en vía de extinción, de otra parte, se ha encontrado una baja producción de estos alcaloides en el material vegetal *in vivo*, por lo cual se ha limitado el estudio de los alcaloides de estas especies. En este contexto el cultivo *in vitro* puede ser una alternativa atractiva, por una parte para multiplicar y conservar diversas plantas sin afectar su disponibilidad en la naturaleza, y adicionalmente una fuente de material vegetal para incrementar la producción de alcaloides que pueden ser utilizados para estudios básicos con diferentes fines, entre los cuales se incluyen aquellos dirigidos a entender las posibles aplicaciones de estos alcaloides para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. En este proyecto se usaron dos rutas de cultivo *in vitro*, la organogénesis y embriogénesis somática, en la especie *Zephyranthes carinata*, nativa de Colombia, México y Centroamérica y, presente en el Valle del Cauca en condiciones naturales y de venta en los viveros como ornamental. El objetivo del trabajo fue encontrar que ruta de cultivo *in vitro*, puede inducir una mayor producción de alcaloides en los tejidos vegetales obtenidos. Para ello se evaluaron dos materiales de partida como fuente de explantes. Escamas de bulbos obtenidos en el invernadero para la obtención de bulbillos *in vitro* por vía organogénesis, y escamas de estos bulbillos formados en cultivo *in vitro*. La embriogénesis somática se indujo a partir tanto de escamas de bulbos del invernadero como de bulbillos *in vitro*. La extracción de alcaloides se realizó a partir de muestras de los diferentes tejidos vegetales obtenidos que variaron entre 100-200mg de material seco. La cuantificación e identificación de alcaloides en los tejidos obtenidos se hizo por UPLC/MS, donde se detectaron con alta probabilidad los alcaloides licorina, licoramina, hemantamina, vitattina, hamayna, ambellina, zaideina, y 9 alcaloides desconocidos. En hojas y bulbillos *in vitro*, se detectaron 14 alcaloides, y en callos embriogénicos y friables 2 alcaloides, para un total de 16 alcaloides hallados. La mayor producción de alcaloides se obtuvo en una concentración de 0,13% p/p (peso/peso) en bulbillos y 0,11% p/p en hojas, es decir que la vía organogénesis generó mayor producción de alcaloides que los callos embriogénicos y friables formados por embriogénesis somática, cuyas concentraciones oscilaron entre 0,002% p/p a 0,006% p/p.

**Palabras clave:** *Amaryllidaceae*, *Zephyranthes carinata*, alcaloides, organogénesis, embriogénesis somática.

## Abstract

*Amaryllidaceae* is a family of plants that are characterized by producing alkaloids specific to this family with important pharmacological properties. This family is also widely known for the ornamental value for its striking flowers. Many species of this family are threatened or extinct, on the other hand, a low production of these alkaloids in the vegetal material *in vivo* has been found, reason why the study of the alkaloids of these species has been limited. In this context the *in vitro* culture can be an attractive alternative, firstly to multiply and keep various plants without affecting their availability in nature, and additionally a source of plant material to increase production of alkaloids which can be used for basic studies. For different purposes, including those aimed at understanding the possible applications of these alkaloids for the treatment of neurodegenerative diseases. In this degree project two *in vitro* culture routes were used, Organogenesis and Somatic Embryogenesis, in the species *Zephyranthes carinata*, native of Colombia, Mexico and Central America, present in Valle del Cauca in natural conditions and sale in the nurseries as ornamental. The objective of the study was to find that *in vitro* culture route, organogenesis or somatic embryogenesis, may induce a greater production of alkaloids in tissues under *in vitro* conditions. For this, two starting materials were evaluated as source of explants. Scales of bulbs obtained in the herbarium to obtain bulbils, and scales of these bulbils formed *in vitro* culture. The bulbils were regenerated via organogenesis from scales obtained from the herbarium bulbs, and somatic embryogenesis was induced from both herbarium bulbs and bulbils *in vitro*. The extraction of alkaloids was done by an acid/basic method on samples that varied between 100-200mg of dry material of the different vegetal tissues obtained. The quantification and identification of alkaloids in the tissues obtained was done by UPLC/MS, where the alkaloids Lycorine, Lycoramine, Haemanthamine, Vitattine, Hamayne, Ambelline, Zaidein, and 9 unknown alkaloids were detected with high probability. *In vitro* leaves and bulbils, 14 alkaloids were detected, in embryogenic and friable calli 2 alkaloids were detected, for a total of 16 alkaloids found. The highest production of alkaloids was obtained in a w/w (weight / weight) concentration of 0.13% w/w in bulbils and 0.11% w/w in leaves, that is, the Organogenesis pathway generated higher alkaloid production than the embryogenic and friable calli formed by Somatic Embryogenesis, whose concentrations ranged from 0.002% w/w to 0.006% w/w. The results obtained suggest that *Zephyranthes carinata* species has a greater diversity and concentration of alkaloids produced *in vitro* than other species of *Amaryllidaceae* studied by other authors.

**Key words:** *Amaryllidaceae*, *Zephyranthes carinata*, alkaloids, organogenesis, somatic embryogenesis.

## 1 Introducción

El uso de las plantas como medicamentos se remonta desde épocas antiguas hasta la actualidad. La gran diversidad de compuestos encontrados en las plantas ha permitido establecer una amplia variedad de desarrollo de fármacos. De las moléculas aprobadas como fármacos, cerca del 35% corresponde a compuestos de origen natural o derivados semi-sintéticos, adicionalmente el 30% son moléculas sintéticas bien sea inspiradas en productos naturales o con un farmacóforo desarrollado a partir de un compuesto natural (Belén Pigni, 2013).

Los alcaloides de la familia *Amaryllidaceas* han sido estudiados por su potencial farmacológico (Ptak et al., 2009). Varias investigaciones indican que los alcaloides producidos por estas especies tienen un gran potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como son el Alzheimer, y diferentes tipos de cáncer, entre otras (Bogdanova et al., 2009). Sin embargo, la baja producción de estos alcaloides *in planta* ha sido una limitante importante para el progreso de las investigaciones y sus posibles usos (Selles, Viladomat, Bastida, & Codina, 1999). Adicionalmente, varias de estas especies están amenazadas o en vías de extinción (Ramos, 2001), por lo que es imperativo evaluar formas alternativas de obtener estos compuestos diferentes a la extracción directa a partir de plantas establecidas en ambientes naturales. Este proyecto de grado forma parte de un estudio que busca desarrollar un protocolo *in vitro* para obtener una mayor producción de estos alcaloides, y se espera a futuro poder generarlos a gran escala en biorreactores.

Aunque exista un gran desarrollo en el campo de la síntesis química de nuevos compuestos para tratar diversas enfermedades, muchos medicamentos se obtienen de fuentes vegetales, motivo por el cual existe la necesidad de generar fuentes renovables para no afectar su existencia en la naturaleza; el cultivo *in vitro* es una de las soluciones (Thieman & Palladino, 2010).

Las condiciones ambientales tales como temperatura, humedad relativa, radiación solar, fotoperiodo, disponibilidad de agua y nutrientes, entre otras, pueden influir sobre el desarrollo de las plantas y así mismo en la producción de sus metabolitos secundarios como los alcaloides, los cuales se generan mayormente en situaciones de estrés (Taiz & Zeiger, 2006). Si bien las condiciones *in vitro* permiten el control de estas variables ambientales y de la nutrición de las plantas, el proceso *in vitro*, es un estrés (El Tahchy et al., 2011) que podría favorecer la producción de alcaloides o facilitar la optimización de las condiciones con este fin.

En este proyecto se evaluaron dos rutas de cultivo *in vitro*, la organogénesis y la embriogénesis somática, para determinar cuál de estas rutas es la más apropiada para optimizar la producción de alcaloides en condiciones *in vitro* a partir de tejidos

de la especie *Zephyranthes carinata*, seleccionada como planta objeto de estudio debido a su amplio uso ornamental y disponibilidad comercial en viveros. Estas dos rutas de cultivo *in vitro* tienen en común que permiten la micropropagación masiva de tejidos vegetales y su escalamiento en producción a partir de pocos individuos. Por otro lado, otros estudios han comprobado que la embriogénesis somática y la organogénesis son métodos de cultivo *in vitro* efectivos para aumentar la producción de alcaloides en otras especies de la familia *Amaryllidaceae* (Selles, Viladomat, Bastida, & Codina, 1999).

En el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi se tiene optimizado un protocolo de micropropagación *in vitro* por vía de organogénesis para la especie *Zephyranthes carinata*(Restrepo, 2014)(Restrepo, 2014)(Restrepo, 2014)(Restrepo, 2014). Este protocolo se utilizó en este proyecto de grado para generar bulbillos y hojas, los cuales fueron evaluados para determinar la producción de alcaloides en estos tipos de tejidos, y compararla con la producción de alcaloides de los tejidos obtenidos por embriogénesis somática. Este proyecto de grado además evalúa por primera vez un protocolo para inducir embriones somáticos *in vitro* en la especie *Zephyranthes carinata*, propuesto en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi, basado en un estudio con otra especie amarillidacea, *Crinum x powellii* (Niño et al., 2010). La ventaja que tienen los embriones somáticos sobre los tejidos de plantas micropropagadas *in vitro*, es que los embriones somáticos se pueden producir en mayor cantidad y subcultivar en forma secuencial sin perder su capacidad de producir y proliferar nuevos embriones en medios líquidos, por lo que son tejidos preferidos para la producción a gran escala en biorreactores (Niño et al., 2010). De otro lado, existen trabajos previos en la especie *Narcissus (Amaryllidaceae)*, que sugieren que es posible extraer alcaloides tales como la galantamina, tazetina, y hemantamina, entre otros, a partir de callos embriogénicos o embriones somáticos sin necesidad de esperar a la formación completa de la planta (Selles et al., 1999).

## 2 Descripción del Trabajo

### 2.1 Planteamiento del Problema.

Existe evidencia de que se ha encontrado una baja producción de alcaloides en los tejidos de diferentes especies de la familia *Amaryllidaceae* en condiciones naturales, cuyos alcaloides han sido estudiados por su gran potencial farmacológico (Liu et al., 2015). La baja producción de estos metabolitos secundarios ha sido una limitante para poder llevar a cabo las investigaciones sobre sus propiedades farmacológicas en enfermedades neoplásicas, virales, neurodegenerativas, entre otras, donde se ha comprobado en estudios anteriores la posibilidad de usar estos alcaloides para dichas enfermedades (Cortes et al., 2015). Además, muchas especies de esta familia se encuentran en vía de extinción. En este trabajo de grado se usa el cultivo *in vitro* como una alternativa para el uso sostenible de estas plantas sin afectar su disponibilidad en la naturaleza. Adicionalmente, se utilizan dos rutas de cultivo *in vitro* como la organogénesis y la embriogénesis somática, con el fin de determinar cuál de estas dos vías genera una mayor producción de alcaloides en *Zephyranthes carinata*, especie que se encuentra cultivada en condiciones de invernadero en la Universidad Icesi y es de uso ornamental en los viveros, por lo que facilita su acceso, a diferencia de otras especies de esta familia las cuales se encuentran amenazadas.

Este proyecto es el primer reporte donde se evalúa la capacidad de inducción de embriogénesis somática en la especie *Zephyranthes carinata*, constituyéndose en los primeros pasos dirigidos a evaluar a la embriogénesis somática como fuente de producción de alcaloides a gran escala y así facilitar la extracción de los mismos sin necesidad de realizar un proceso destructivo de los tejidos vegetales para la obtención de estos metabolitos secundarios. El grado de importancia del proyecto es alto, hay pocos estudios realizados sobre la especie *Zephyranthes carinata*, y con los resultados obtenidos, pueden ser los primeros pasos para establecer en un futuro el escalamiento de la producción de estos alcaloides y así llegar al desarrollo de un nuevo producto biotecnológico o farmacéutico. Esta investigación puede tener una aplicación muy útil, ya que en Colombia y en la región, es muy poco el desarrollo de nuevos fármacos. Por otra parte, aporta información importante sobre la especie *Zephyranthes carinata*, especie nativa de Colombia, que podría ser de gran utilidad para futuros proyectos de bioprospección.

Los resultados sugieren una rápida y alta respuesta en la inducción de callos embriogénicos, los cuales se establecieron en menos de dos meses. La posibilidad de inducir callos embriogénicos, permitirá el establecimiento de una

alta proliferación de embriones somáticos que podrán ser subcultivados en un medio de cultivo líquido, y tratados con agentes químicos inductores que estimulan la liberación de los alcaloides desde el tejido vegetal al medio líquido. De esta forma es posible extraer los alcaloides directamente desde el medio líquido, sin necesidad de sacrificar el material vegetal. Resultados obtenidos en otro proyecto de grado realizado simultáneamente con éste trabajo, confirman que el metil jasmonato y el ácido jasmónico estimulan la liberación de alcaloides desde los tejidos (hojas y bulbillos obtenidos por organogénesis) cultivados *in vitro* de la especie *Zephyranthes carinata*, al medio líquido (Daniela Alizandre, 2016, Evaluación del efecto del metil jasmonato y el ácido jasmónico en la liberación de alcaloides producidos *in vitro* en *Zephyranthes carinata*, Proyecto de Grado, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Icesi). El protocolo de embriogénesis somática establecido en este proyecto de grado permitirá entonces, una constante proliferación de tejidos más aptos para su multiplicación en medios líquidos y escalamiento en biorreactores, siendo ésta una vía más rápida y económica (Anbari, Tohidfar, Hosseini, & Haddad, 2007).

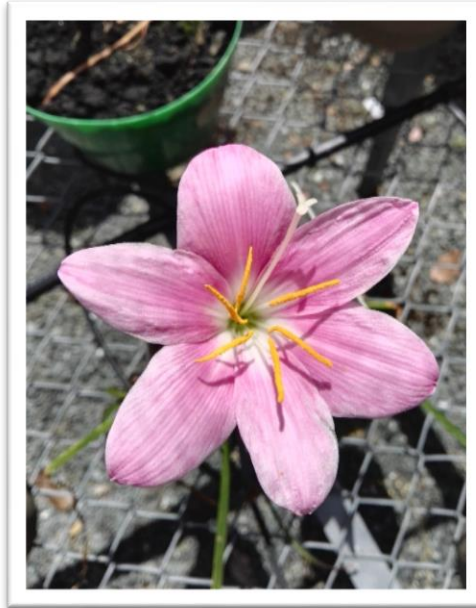
## **2.2 Marco Teorico y Estado del Arte**

### **2.2.1 Familia *Amaryllidaceae*, plantas de interés científico.**

La familia *Amaryllidaceae* incluye diversas especies de plantas que han sido estudiadas por la producción de alcaloides. Estos alcaloides se almacenan en diferentes partes de la planta, como hojas, tallos y bulbos (Bogdanova et al., 2009). La estructura química de estos alcaloides es muy variable, al igual que sus propiedades farmacológicas. A la fecha las investigaciones indican que los alcaloides producidos por las *Amaryllidaceae*, tienen un gran potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como son el Alzheimer, y diferentes tipos de cáncer, entre otras (Gotti et al., 2006) . A su vez, estos alcaloides son metabolitos secundarios exclusivos de la familia *Amaryllidaceae* y no se han encontrado en otra familia de plantas (Bastida et al., 2006), razón por lo cual estas plantas han sido de gran interés.

Las *Amaryllidaceae* son herbáceas perennes y bulbosas que suelen presentar flores llamativas (Figura 1), lo que les confiere además un valor ornamental. Las amarilidáceas comprenden 59 géneros, entre los más estudiados se encuentran los géneros de *Crinum*, *Hippeastrum*, *Zephyranthes*, *Narcissus*, y *Galanthus*, entre otros, y alrededor de 800 especies (Stevens, 2012). Su distribución geográfica es cosmopolita, incluyendo principalmente regiones tropicales y subtropicales, pero también es común encontrar algunos géneros en el área del Mediterráneo y en zonas templadas de Asia (Belén Pigni, 2013). En el Valle del Cauca se encuentra la especie *Eucharis caucana*, la cual es catalogada en vía de extinción por los

científicos, es una de las pocas sobrevivientes del bosque seco tropical del Valle geográfico, y hasta el momento solo se han reportado otras especies del género *Eucharis* en la región amazónica colombiana, en Centroamérica, Ecuador y Venezuela (Ramos, 2001). Otra especie encontrada en la región y ha sido



**Figura 1.** Fotografía de la planta *Zephyranthes carinata* cultivada en el vivero de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi.

declarada como extinta, es la especie *Plagiolirion horsmannii*, cuyo último reporte de sobrevivencia es del siglo XIX. Esta especie fue reportada por primera vez en 1883 en el municipio de Roldanillo, Valle del Cauca (Ramos, 2001). La especie *Zephyranthes carinata* (Figura 1), se encuentra en el Valle del Cauca y es de fácil acceso en viveros por su uso ornamental. Esta especie es multiplicada bajo condiciones de invernadero en la Universidad Icesi, motivo por lo cual esta especie fue seleccionada como objeto de estudio para realizar el presente trabajo de grado.

### **2.2.2 Cultivo *in vitro*.**

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, consiste en incubar una pequeña parte de un tejido, una célula o una planta, en condiciones estériles dentro de un recipiente con un medio nutritivo constituido por azúcares, nutrientes minerales, vitaminas y hormonas vegetales, para obtener finalmente una micropropagación del organismo de interés (Thieman & Palladino, 2010). La producción de plantas mediante micropropagación, tiene un amplio uso comercial debido a que posee varias ventajas; como se realiza en un laboratorio bajo condiciones controladas, no depende de las condiciones climáticas y a su vez se utiliza un espacio reducido

con el potencial de generar cientos de plantas en un corto tiempo. Las características genéticas de las plantas resultantes se mantienen y todas las plantas serán genéticamente iguales y al realizarse en condiciones asépticas, la sanidad (o ausencia de patógenos en los tejidos de la planta) es controlada adecuadamente (Bach & Sochacki, 2012). Además de la micropropagación, las técnicas *in vitro* permiten estudiar una serie de procesos con posibles aplicaciones para la investigación científica, como el mejoramiento genético de plantas. Existe evidencia en otras especies como en *Narcissus confusus* (Selles et al., 1999), que, por medio de del cultivo *in vitro*, es posible detectar un incremento en la concentración de alcaloides en los tejidos obtenidos. Como se mencionó anteriormente, hay algunas especies en vía de extinción, por lo cual el cultivo *in vitro* es una alternativa para el uso sostenible de estas plantas. La organogénesis y la embriogénesis somática son rutas de cultivo *in vitro* ampliamente utilizadas, y son adoptadas para el desarrollo del presente estudio, dado que se ha comprado que estas dos rutas de cultivo *in vitro* favorecen la producción de alcaloides en los tejidos generados por estas rutas (Selles et al., 1999).

#### **2.2.2.1 Organogénesis.**

La organogénesis, en el cultivo *in vitro*, es el conjunto de cambios que permiten la obtención de los diferentes órganos que conforman un organismo sin pasar por el estadio embrionario (Thieman & Palladino, 2010). En otras especies como *Crinum x powellii*, perteneciente a la familia *Amaryllidaceae*, es común usar los bulbos de las plantas para inducir la organogénesis, dado a que se ha evidenciado (Niño et al., 2010) que los explantes provenientes de los cormos internos de la parte basal del bulbo, son las zonas más totipotentes y por consiguiente promueven la inducción de órganos completos y diferenciación de la planta, dado que estas zonas contienen células con una alta capacidad de dividirse y diferenciarse en cualquier tipo de tejidos.

Hay varias técnicas empleadas para la micropropagación por organogénesis, utilizadas para la familia *Amaryllidaceae*, las cuales son: “*scaling*”, “*cross-cuttings*” y “*scooping*”, “*chipping*” y “*twin-scaling*”, y “*cuttings*” (Bach & Sochacki, 2012). La técnica de “*scaling*” se basa en la habilidad que tienen las escamas retiradas del bulbo para producir una nueva planta. Las técnicas de “*cross-cutting*” y “*scooping*” se basan en la destrucción de la dominancia apical del bulbo y la inducción de la formación de bulbillos en la superficie herida de la placa basal. La técnica “*cuttings*” aprovecha la capacidad que tienen algunas plantas geófitas (parte que crece en la tierra) para regenerar plántulas a partir de segmentos de hoja. La técnica de “*chipping*” consiste en el seccionamiento del bulbo mediante cortes verticales, se pueden cortar 4, 8 ó 16 secciones iguales y cada porción debe tener una parte de la placa basal (Bach & Sochacki, 2012). La técnica más usada y adoptada en el grupo de investigación de Biotecnología de la Universidad Icesi es la “*twin-scaling*” (Figura 2). Con esta técnica en Icesi se pueden obtener hasta 5 bulbillos por explante en 1 o dos meses de cultivo *in vitro*, y es posible mantener esta alta producción a partir de los *twin-scaling* obtenidos a partir de los bulbillos



producidos *in vitro* (Zaida Lentini PhD, 2017, Directora del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Icesi, comunicación personal). Los explantes obtenidos mediante estas técnicas requieren de altos niveles de asepsia, haciéndose necesaria la esterilización del material de trabajo y la desinfección de los explantes obtenidos (Bach & Sochacki, 2012). La técnica de *twin-scaling* consiste en seccionar el bulbo de tal forma que se obtengan dos escamas unidas por un tejido que es la placa basal, indispensable para su posterior reproducción (Bach & Sochacki, 2012).

Existen muy pocos estudios de la propagación *in vitro* de la especie *Zephyranthes carinata*, pero si ha sido desarrollada en otras especies de *Amaryllidaceae* (Jin, 2013). Este estudio se apoyó de otros avances previos que se vienen realizando en cuanto a la organogénesis, en el laboratorio de Biotecnología Vegetal en la Universidad Icesi por el grupo de investigación liderado por la Dra. Zaida Lentini y con el apoyo de la bióloga joven investigadora Geraldine Restrepo, donde se ha comprobado que de un solo bulbo proveniente de invernadero, se pueden obtener de a 20-40 bulbillos por vía Organogénesis (Geraldine Restrepo, 2016, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Icesi, comunicación personal). En otros trabajos de grado (Peralta, 2014), (Reyes, 2014) y (Chamorro, 2016), previos al actual, se optimizó la propagación *in vitro* por organogénesis de esta especie, los cuales sirvieron de base para el desarrollo de esta investigación. El estudiante (Peralta, 2014) evaluó un protocolo de desinfección de los explantes provenientes de bulbos de invernadero que optimizara la respuesta de los mismos, para la generación de nuevos bulbillos, y a su vez detectó alcaloides presentes en hojas y bulbillos de *Zephyranthes*. El estudiante (Reyes, 2014) probó diferentes reguladores de crecimiento añadidos al medio basal MS, y seleccionó como óptimo para el cultivo *in vitro* en *Zephyranthes carinata* la adición de 0.5 mg/L de BAP. Sin embargo, revisiones posteriores de este protocolo indicaron que se puede incrementar aún más la respuesta utilizando 0.6 mg/L de BAP, lo cual permite inducir entre 1 a 5 bulbillos por escamas cultivadas (Zaida Lentini, 2017, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Icesi, comunicación personal). El estudiante (Chamorro, 2016) evaluó el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa (desde 0% hasta 15%) en el medio basal MS con el propósito de estudiar su posible efecto en la producción de alcaloides. Sus resultados sugieren que a mayor concentración de sacarosa los bulbillos generados son más grandes y sus hojas más cortas, en comparación con 0 y 3% en concentración de sacarosa, donde sus hojas fueron más largas y los bulbillos más pequeños. Además, evaluó la respuesta de los explantes de bulbos de invernadero en comparación con los explantes de bulbillos *in vitro*, en cuanto a la generación de nuevos bulbillos, y se determinó que los explantes provenientes de bulbillos *in vitro* tienen una mayor respuesta. Lamentablemente, por razones técnicas Chamorro no pudo evaluar el contenido de alcaloides de los tejidos obtenidos, de manera que en este presente proyecto se decidió utilizar 3% de sacarosa, concentración utilizada en forma estándar en los medios para inducir organogénesis.

### **2.2.2.2 Embriogénesis somática.**

Esta ruta de cultivo *in vitro* consiste en la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos. Este fenómeno es conocido en la naturaleza como una forma de apomixis llamada embriónía adventicia (Williams, 1989). Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas normales (Williams, 1989). Los procesos embriogénicos son afectados por una serie de factores que en algunos casos favorecen y en otros dificultan los manejos *in vitro* del material vegetal, como: el genotipo de la planta, las condiciones de cultivo, los reguladores del crecimiento y demás componentes del medio de cultivo, y por el último el tipo y estado fisiológico del explante (Jiménez, 2001). La naturaleza misma de la embriogénesis somática permite su aplicación en sistemas de cultivo líquido (Figura 2), donde los embriones se multiplican rápidamente, en gran cantidad, pudiéndose alcanzar grandes poblaciones en poco tiempo (Jiménez, 2001).

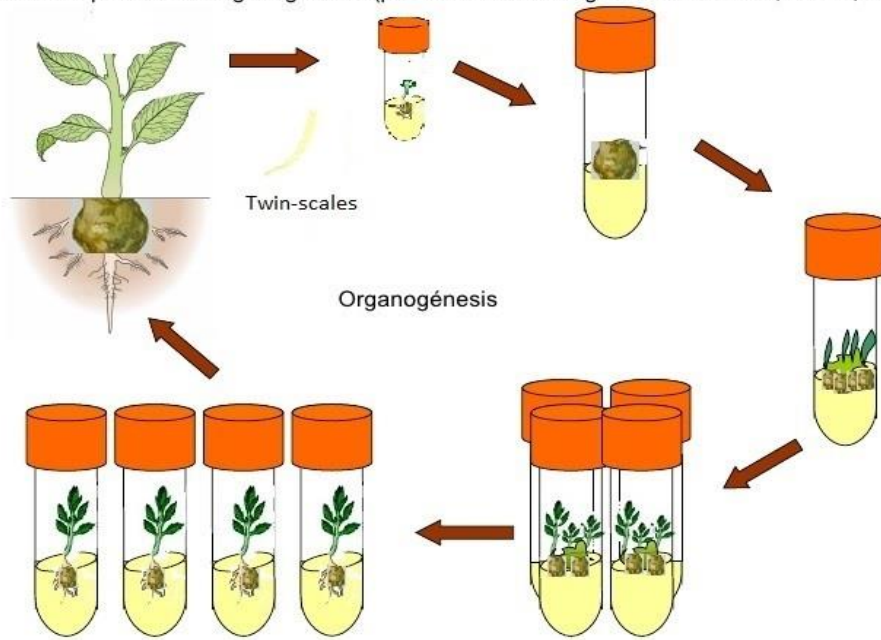
La embriogénesis somática se induce partir de una sección de la planta ya diferenciada (explante), que comúnmente se obtiene de las hojas, tallos, semillas en formación, o bulbos. El explante seleccionado es sometido a un medio de cultivo con las condiciones necesarias para que se genere un embrión o un callo embriogénico directamente del tejido del explante (Figura 2). Para la formación del embrión somático, primero se induce la formación de zonas meristemáticas donde ocurren sucesivas divisiones celulares, posteriormente se inicia el proceso de diferenciación para la formación de embriones somáticos que pasan por los diferentes estadios de desarrollo desde el estado globular hasta llegar a la fase de maduración y germinación que dará lugar a la diferenciación de plantas completas de origen no cigótico (Ammirato, 1983). Estos embriones al no ser producto de procesos de fecundación, tienen la misma información genética del tejido original o planta madre, motivo por el cual se les denomina embriones somáticos. El proceso de embriogénesis puede ser controlado en condiciones *in vitro* mediante estímulos exógenos tales como reguladores de crecimiento, fotoperíodo, regímenes de luz/oscuridad y temperatura, de manera de no inducir la formación de plantas sino una producción constante de embriones somáticos a partir de los inducidos inicialmente. Para lo anteriormente mencionado, se requiere la optimización del sistema de cultivo de tejidos para la proliferación de divisiones celulares, como las condiciones del medio que proveen al embrión todo lo necesario para su formación. Una de las ventajas de la embriogénesis somática como se mencionó anteriormente, es que los embriones somáticos (después de inducirlos), pueden proliferar en medios líquidos, además de su rápida reproducción y su numerosa cantidad, que podría conllevar a una producción de alcaloides por estos embriones, y facilitar su extracción en medios líquidos.

Para la embriogénesis somática, se debe considerar un factor muy importante, si los tejidos y las células que se sometan a la inducción de embriogénesis somática, no son competentes embriogénicamente no darán paso a los embriones

somáticos ni al desarrollo de plántulas, así se les suministren los estímulos adecuados a través de los reguladores de crecimiento, la composición del medio de cultivo y las condiciones externas del cultivo *in vitro* (Jiménez, 2001). Por otro lado puede ocurrir una alteración en el potencial morfogénico del material vegetal mostrando pérdida gradual de la capacidad regenerante a lo largo del cultivo, causado por los reguladores de crecimiento exógenos que afectan el crecimiento de las células en el momento de la división y su capacidad para sintetizar sustancias o metabolitos esenciales para el desarrollo óptimo de los embriones somáticos (Von Arnold, et al., 2002), entre esos metabolitos están los alcaloides, que son los de interés en esta investigación. Por estas razones el método de inducción de embriones somáticos adaptado para la especie *Zephyranthes carinata*, a partir de otras especies de la misma familia, debe ser el adecuado para la generación de los mismos.

La embriogénesis somática ha sido probada en otras especies de la familia *Amaryllidaceae* como *Crinum x powellii* (Niño et al., 2010), *Leucojum aestivum* (Ptak et al., 2013), *Narcissus papyraceus* (Anbari et al., 2007), *Narcissus confusus* (Selles et al., 1999), *Eucharis grandiflora*, *Hippeastrum hybridum*, *Crinum asiaticum* (Mujib et al., 2013), entre otras, pero hasta el momento no se había evaluado en la especie *Zephyranthes carinata*. En estos estudios reportados, utilizaron explantes de semillas, de escamas de bulbos de invernadero, y de hojas, la mejor respuesta en todos estos estudios se obtuvo de los cornos internos de bulbos de invernadero, donde se encuentra la placa basal y parte apical de la escama (Niño et al., 2010), motivo por el cual se usaron estos tipos de explantes en el presente proyecto. Además, se realizaron ensayos previos en el laboratorio de Biotecnología Vegetal, donde se probaron explantes de hojas y partes de la escama de bulbos de invernadero y bulbillos *in vitro*, y se comprobó que la parte apical y placa basal de escamas de bulbos y bulbillos tenían una mejor respuesta en cuanto a la generación de callos (Geraldine Restrepo, 2016, joven investigadora Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Icesi, comunicación personal). Selles et al (1999) evaluaron la inducción de callos a partir de semillas en la especie *Narcissus confusus* y comprobaron que la concentración de alcaloides aumentaba de acuerdo al estadio del callo y grado de diferenciación celular (de callo friable o des diferenciado a callo embriogénico). Después de obtener callos embriogénicos se inició regeneración a partir de estos tejidos obtenidos por vía de embriogénesis somática, donde se generaron brotes de plantas y plántulas. Al determinar los alcaloides en estos tejidos, identificaron una mayor concentración en las plántulas que en los brotes. Este estudio concuerda con lo investigado por (Toivonen et al., 1991), donde afirman que entre más diferenciado se encuentre el tejido vegetal, mas es su capacidad de producir metabolitos secundarios .

Regeneración de plantas vía organogénesis (por formación de órganos como tallos, raíces, hojas)



Regeneración de plantas vía embriogénesis somática (por formación de embriones)

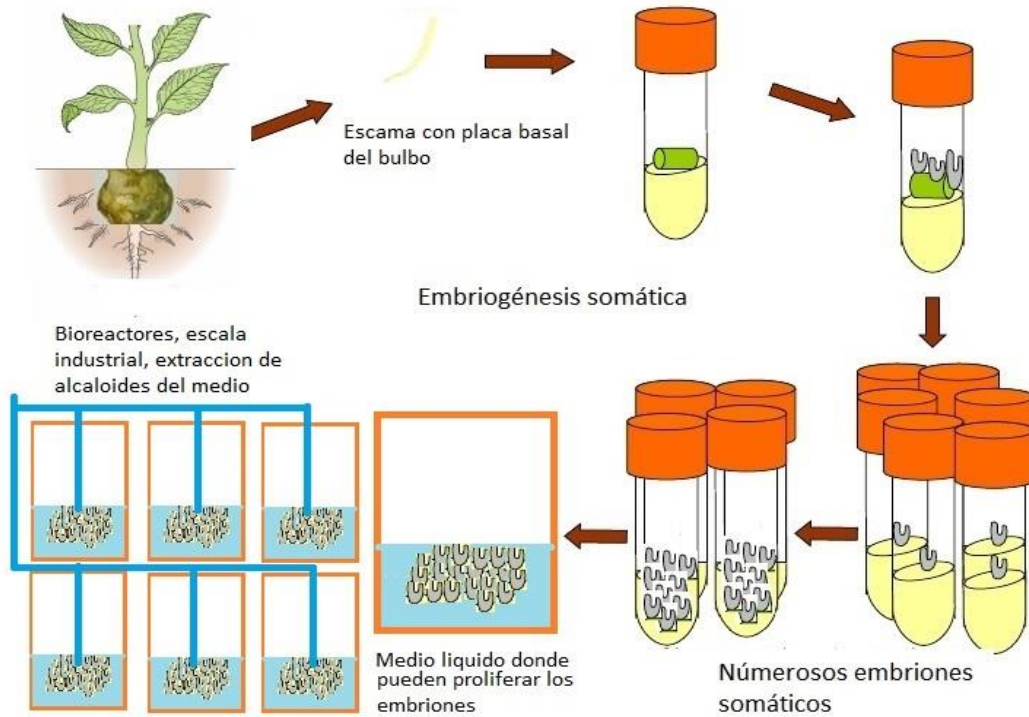


Figura 2. Esquema general de organogénesis y embriogénesis Somática (Rosales, 2006).

### 2.2.3 Medio de cultivo para la inducción de organogénesis y embriogénesis Somática.

Los medios de cultivo usados en micropropagación deben contener todos los nutrientes necesarios para que la planta sobreviva. Generalmente el medio de cultivo está compuesto por sales minerales (macro y micro nutrientes), vitaminas, reguladores de crecimiento, una fuente de carbono, agua y un agente gelificante. La composición de sales minerales básicas que necesitan las plantas fue propuesta por primera vez por Murashige y Skoog en 1962 y es conocida universalmente como el medio "MS". La fuente de carbono habitualmente empleada es la sacarosa, esta regula diferentes procesos en la planta como la tuberización, la regeneración de raíces adventicias y la maduración de embriones somáticos. El estado de solidificación del medio se regula mediante el uso de un agente gelificante, es importante regular este estado porque afecta la intensidad del intercambio gaseoso entre el explante y el medio ambiente, así como la disponibilidad del agua y los iones presentes en el medio, además proporciona el soporte para el posicionamiento del explante. Adicionalmente se debe tener un control sobre el pH, el cual debe ajustarse entre 5.5 y 6.0, pues es el pH óptimo para el crecimiento de la mayoría de las plantas (Bach & Sochacki, 2012).

El medio de cultivo utilizado para la embriogénesis somática estuvo basado en las investigaciones hechas en la especie *Crinum x powellii* (Niño et al., 2010) donde utilizaron medio Murashige y Skoog, suplementado con el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (1 mg/L) y kinetina (1.0 a 1.5 mg/L). La inducción de los embriones somáticos se optimizó al utilizar 0.4 mg/L de 2,4-D(2,4-diclorofenoxiacético) y 0.375 mg/L de kinetina, estos proliferaron en el medio MS libre de hormonas y después de su desecación, se transfirieron al medio MS con ácido giberélico para su maduración. En otras investigaciones realizadas en la especie *Narcissus papyraceus* (Anbari et al., 2007), encontraron que el medio de cultivo más óptimo para la generación de embriones somático fue el medio MS complementado con 0.5 mg/l GA3(ácido giberélico), 1.6 mg/l BAP y 1.6 mg/l 2,4-D. En el estudio de (Jiménez, 2001) se reporta que los reguladores de crecimiento mayormente utilizados en los medios de cultivo para la embriogénesis somática en 29 especies de plantas, son auxinas como 2,4-D (49%) seguido de naftaleno ácido acético (27%), indol- 3-acido acético (IAA) (6%), indol-3-acido butírico (6%), Picloram (5%) y Dicamba (5%). El uso de citoquininas en 25 especies de plantas las más empleadas son -BAP (57%), seguido de kinetina (37%), zeatina (Z) (3%) thidiazurón (3%). En el estudio de (Niño et al., 2005) encontraron que el medio de cultivo donde se presentó mejor crecimiento de callos friables fue el MS suplementado con 4 mg/L de Picloram y los mejores callos nodulares crecieron en los medios MS complementados con 2 y 4 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), en la especie *Crinum x powellii*. En el estudio de la especie *Leucojum aestivum* (Ptak et al., 2013) encontraron que al usar 2,4-D (11mg/L) y BAP (0,1mg/L) en el medio MS estimuló la mayor proliferación de callos y embriones somáticos. En la especie *Narcissus confusus* (Selles et al., 1999) reportaron que

la mayor inducción de callos se obtuvo con 2 o 4 mg/L de 2,4-D, o 4 mg/L de picloram. En un estudio preliminar realizado en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Icesi, se evaluaron algunas combinaciones de reguladores de crecimiento en *Zephyranthes carinata*. La mejor respuesta obtenida hasta ahora se obtuvo con el medio que se denominó MSES3 (Cuadro 4), el cual contiene reguladores de crecimiento como 2.4-D (0,4mg/L) y Kinetina (0,4mg/L). Sin embargo, es importante indicar que este es apenas un inicio del trabajo, se requieren estudios más detallados para determinar la composición óptima del medio de cultivo para inducción de embriogénesis somática en esta especie (Zaida Lentini, 2017, Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Icesi, comunicación personal).

#### **2.2.4 Producción de alcaloides en tejidos vegetales.**

En plantas, los metabolitos secundarios como los alcaloides son aquellos compuestos que no están involucrados directamente en el crecimiento y desarrollo del organismo, estos compuestos difieren de los productos del metabolismo primario, como son aminoácidos, nucleótidos, azúcares o ácidos grasos. Entre las funciones principales de dichos compuestos (metabolitos secundarios) está la protección frente a herbívoros, liberando sus metabolitos secundarios con señales de olor, color y sabor, entre otras funciones (Taiz & Zeiger, 2006). Las condiciones ambientales tales como temperatura, humedad relativa, radiación solar, fotoperiodo, disponibilidad de agua y nutrientes, entre otras, pueden influenciar en el desarrollo de las plantas y así mismo en la producción de sus metabolitos secundarios como los alcaloides, los cuales se generan mayormente en situaciones de estrés (Taiz & Zeiger, 2006). Si bien las condiciones *in vitro* permiten el control de estas variables ambientales y nutrición de las plantas, el proceso *in vitro*, es un estrés en sí mismo que podría favorecer la producción de alcaloides o facilitar la optimización de las condiciones con este fin (El Tahchy et al., 2011).

La estructura de los alcaloides está definida por la presencia del átomo de nitrógeno intracíclico y la presencia de grupos hidroxilo (OH-), los cuales le confieren el carácter básico a los alcaloides. El átomo de nitrógeno se puede encontrar como amina primaria, secundaria, terciaria y sal cuaternaria de amonio. Se pueden encontrar diversas estructuras en cuanto a la composición química de los alcaloides.

Los alcaloides encontrados en la familia *Amaryllidaceae* tienen las siguientes características: 1) Su estructura base es  $C_6-C_1-N-C_2-C_6$ , donde la fracción  $C_6-C_1$  deriva de L-fenilalanina (L-Phe) y la fracción  $N-C_2-C_6$  deriva de L-tirosina (L-Tyr); 2) Son bases débiles con un pKa entre 6 y 9; y 3) Contienen por lo general un solo átomo de nitrógeno, que puede ser secundario, terciario o cuaternario, el número de átomos de carbono oscila entre 16 y 20, dependiendo de los sustituyentes del sistema anillado (Belén Pigni, 2013).

Estudios realizados con bulbos de la especie *Crinum x powellii* recolectados del herbario de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia), encontraron una concentración total de alcaloides de 0,12% p/p (Niño et al., 2007). En las muestras generadas en el proyecto de grado de Chamorro (2016), se encontró que los bulbillos formados en medio MSA1 con 3% de sacarosa y cultivados en el mismo medio por 2 meses, presentaron una concentración de alcaloides de 0,04% p/p en las hojas y 0,08% p/p en los bulbillos *in vitro*. En el estudio de (Ptak et al., 2013) con la especie *Leucojum aestivum*, si bien se indican que determinaron la producción de alcaloides en los callos generados al usar 11mg/L de 2,4-D y 0,1mg/L de BAP en el medio de cultivo por 8 semanas de inducción, y 8 semanas de proliferación de los callos embriogénicos en el mismo medio, no reportaron la concentración de los alcaloides encontrados (Licorina y Galantamina). En la especie *Narcissus confusus* se realizó un estudio de la producción de alcaloides en los diferentes estadios de callos que se obtuvieron a partir de explantes de semillas, desde callos no diferenciados (friables) hasta callos embriogénicos (Selles et al., 1999). En los callos embriogénicos se encontró una concentración total de 0,00053% p/p y en los callos no diferenciados 0,00019% p/p, para los 4 alcaloides encontrados en este estudio, después de 8 semanas de inducción en el medio de cultivo con 2 o 4 mg/L de 2,4-D, o 4 mg/L de picloram. En otro estudio (Niño et al., 2005) con la especie *Crinum x powellii*, encontraron que los callos friables produjeron una concentración de 0,002 a 0,003% p/p del alcaloide Licorina después de 3 meses en el medio de cultivo complementado con 2 o 4 mg/L de 2,4-D.

Hay otros estudios que sugieren que la producción de alcaloides en los tejidos vegetales está influenciada por las concentraciones de sacarosa y reguladores de crecimiento en el medio de cultivo utilizado. El Tahchy et al., 2011 estudiaron la influencia de la concentración de sacarosa (3%, 6%, 9% y 12%), y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento como 6-BA, ANA (ácido naftaleno acético), 2,4-D y picloram, en la organogénesis (desarrollo de bulbos y raíces) y la acumulación de alcaloides en las especies *Narcissus pseudonarcissus*, *Galanthus elwesii*, y *Leucojum aestivum*. La mayor diversidad de alcaloides se obtuvo en la especie *Narcissus pseudonarcissus* en medio MS con 30 g/L de sacarosa. También se halló una alta diversidad de alcaloides (6 alcaloides) en brotes de la especie *G. elwesii* en el medio MS con 2 mg/L de ANA o picloram. En la especie *N. pseudonarcissus* se halló mayor diversidad de alcaloides (5 alcaloides) en brotes obtenidos en medio MS con 2 mg/L de ANA. En la especie *L. aestivum* se halló mayor diversidad de alcaloides (4 alcaloides) en los brotes obtenidos en medio MS con 2 mg/L de 2,4-D. En dicho estudio se reportó la concentración del alcaloide Galantamina encontrado en estas especies, donde se obtuvo la mayor concentración en la especie *N. pseudonarcissus* con 0.1% p/p, seguida de la especie *L. aestivum* con 0.07% p/p y por último la especie *G. elwesii* con 0.02% p/p. Estas 3 especies estudiadas por El Tahchy et al., 2011, fueron comparadas con bulbos *in vivo*, donde la diversidad de alcaloides encontrada fue mínima, en comparación con la diversidad detectadas en los tejidos obtenidos *in vitro*.

#### **2.2.4.1 Extracción de alcaloides.**

La extracción y aislamiento de los alcaloides se realiza sobre material vegetal seco y se utilizan tanto solventes orgánicos como soluciones acuosas (Arango, 2002). La extracción de los alcaloides se divide en dos etapas, una extracción en medio alcalino y otra en medio ácido. En el medio alcalino, se utilizan solventes orgánicos básicos, estos permiten al alcaloide base separarse de las impurezas presentes en el medio, después se trata con ácido diluido para llevar los alcaloides en forma de sales. El medio se alcaliniza nuevamente, y con un compuesto orgánico no miscible se extrae la totalidad de los alcaloides (Arango, 2002).

#### **2.2.5 Métodos analíticos para la identificación de metabolitos secundarios.**

El método analítico que se usa para la cuantificación de los alcaloides depende de la extracción, de la cantidad, y de la pureza de la muestra. La técnica de TLC (cromatografía líquida de capa fina), requiere de mayor cantidad de muestra, y muchas veces no es sensible para lo que se necesita identificar, es una técnica más cualitativa que cuantitativa (Skoog, Holler, & Crouch, 2007). Las técnicas como HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), UPLC/MS (cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a masas) y GC/MS (cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas), son técnicas analíticas sensibles donde su gran ventaja es que requieren menos cantidad de muestra para la detección de un analito (Skoog et al., 2007). En cromatografía de gases los componentes de una muestra vaporizada se separan como consecuencia de que se reparten entre una fase gaseosa y una fase estacionaria contenida en una columna. Al efectuar una separación por cromatografía de gases, la muestra se vaporiza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se lleva a cabo mediante el flujo de una fase móvil de gas inerte (Skoog et al., 2007). A diferencia de la mayoría de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es transportar este último a través de la columna (Skoog et al., 2007). HPLC y UPLC son las técnicas analíticas de separación más ampliamente utilizadas actualmente. Las razones de su popularidad son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para automatizarla, su capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles, pero sobre todo, su amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en la industria, muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general (Skoog et al., 2007). Algunos ejemplos de estos materiales son aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una variedad de sustancias inorgánicas (Skoog et al., 2007). De estas técnicas mencionadas, se seleccionó la técnica de UPLC acoplada a espectrometría de masas, ya que es una de las técnicas más



eficientes por sus características descritas y además se encuentra disponible en la Universidad Icesi.

El acople de la cromatografía de líquidos de ultra-resolución (UPLC) con la espectrometría de masas (MS), es una metodología analítica de elevada selectividad y sensibilidad (Edmonds et al., 1986). Los primeros trabajos que utilizaron métodos como este, emplearon fuentes de ionización por termopulverización (TSP) (Edmonds et al., 1986). Posteriormente y siguiendo la evolución de las técnicas de ionización en espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de líquidos, el TSP fue desplazado por las técnicas de ionización a presión atmosférica (API), que incluyen la electropulverización o electrospray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica (APCI). En la fuente ESI, desarrollada a mediados de los años 80, la muestra líquida se introduce a través de un capilar al que se aplica un elevado potencial ( $\pm 3-5$  kV) (Edmonds et al., 1986), lo que permite producir un spray de microgotas cargadas, las cuales debido a repulsiones electrostáticas se dividen hasta provocar la desolvatación y evaporación de los iones. La fuente ESI trabaja a flujos entre 0,5 y 10  $\mu\text{L min}^{-1}$ , aunque se pueden aumentar hasta 300-400  $\mu\text{L/min}$  utilizando el ionspray (ISP), una variante del electrospray en la cual la formación del aerosol y la desolvatación están facilitadas por una corriente coaxial de gas. La ionización química a presión atmosférica es una técnica de ionización suave, aunque en algunos casos además de los iones correspondientes a la molécula protonada o desprotonada pueden aparecer fragmentos en el espectro (Edmonds et al., 1986). La principal diferencia entre las dos fuentes de ionización se encuentra en el mecanismo de ionización; en ESI, los iones preformados en fase líquida son desolvatados y evaporados, en APCI la ionización se produce en fase gas debido a reacciones ion-molécula entre el plasma generado a partir de la fase móvil y los analitos. Un espectrómetro de masas genera múltiples iones de la muestra, entonces los separa según su proporción específica de masa a carga ( $m/z$ ), y luego graba la abundancia relativa de cada tipo de iones. En un espectro de masas se muestra el resultado en forma de señales que corresponden a la abundancia de los iones y estos iones proporcionan información sobre la naturaleza química y la estructura de su molécula precursora (Rivera, 2015). En la técnica utilizada en este proyecto de grado se usa ESI, y las condiciones del equipo UPLC/MS se encuentran descritas en la sección de metodología.

## 2.3 Objetivos

### **Objetivo General:**

Identificar que ruta de morfogénesis, organogénesis o embriogénesis, induce una mayor producción de alcaloides en *Zephyranthes carinata* en condiciones *in vitro*.

## Objetivos específicos:

- Inducir morfogénesis y diferenciación de plantas de *Zephyranthes carinata* mediante organogénesis.
- Inducir la producción de embriones de *Zephyranthes carinata* mediante embriogénesis somática.
- Comparar la producción de alcaloides en tejidos de *Zephyranthes carinata* obtenidos por organogénesis o embriogénesis somática, por medio de una técnica analítica como la cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC), acoplada a espectrometría de masas (UPLC/MS).

## 2.4 Metodología

### 2.4.1 Recolección de material vegetal.

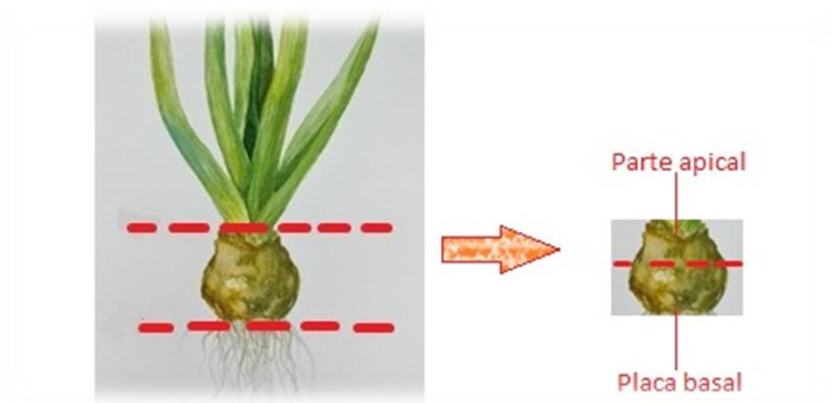
En el invernadero de la Universidad Icesi se mantiene una colección de especies de la familia *Amaryllidaceae*, entre las que se encuentra *Zephyranthes carinata*, la especie de estudio de este proyecto de grado. El invernadero estuvo cubierto por una poli-sombra que disminuyó la intensidad de luz solar para un mejor desarrollo de estas especies de plantas adaptadas a condiciones de sotobosque. Las plantas se sembraron en tierra fertilizada y se regaron con agua dos veces por semana, la temperatura osciló entre 28 y 34°C en los meses de Junio, Julio y Agosto, tiempo en el que se recolectó el material vegetal.

#### 2.4.1.1 Protocolo de desinfección de los bulbos de invernadero:

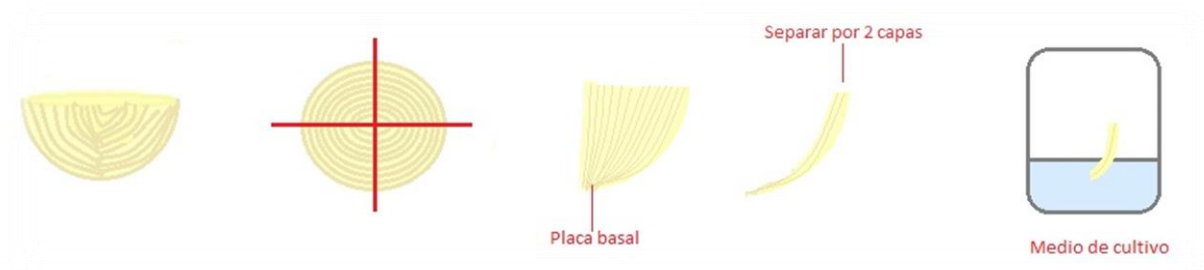
1. Colectar en una bolsa plástica, bulbos de 15 mm a 20 mm de diámetro de plantas sanas, sin flores y cuyos bulbos estén libres de enfermedades.
2. Llevar inmediatamente los bulbos colectados al laboratorio. Lavar los bulbos con abundante agua para retirar la tierra.
3. En el mesón del laboratorio, cortar las raíces, hojas y escamas de los bulbos que se encuentren secas, y cortar el bulbo a la mitad (Figura 3, importante no cortar la placa basal),
4. Retirar la parte apical (donde se encuentran las hojas) y desecharla (Figura 3).
5. Lavar con abundante agua y jabón de nuevo para retirar la tierra restante.
6. En la cabina de flujo laminar, sumergir los bulbos cortados en etanol al 70% por 1 minuto con agitación constante en un frasco mayonesa (esterilizado)

previamente por autoclave), y desechar el etanol (no introducir más de 3 bulbos por frasco mayonesa).

7. Cortar cada bulbo en cuatro partes (Figura 4), sobre una caja Petri estéril, pero sin realizar los cortes de twin-scales (estos cortes solo se realizan al momento de sembrar el explante en el medio de cultivo).
8. Sumergir las 4 secciones de cada bulbo cortado nuevamente en el frasco mayonesa con etanol al 70% por 1 minuto con agitación constante y desechar el etanol.
9. Sumergir nuevamente las 4 secciones de cada bulbo cortado en el frasco mayonesa con NaOCl 1,5% durante 20 minutos en agitación constante (agregar 4 gotas de Tween 20 por cada 100 mL de solución) y desechar la solución.
10. Lavar las secciones de los bulbos cortados en el frasco mayonesa con agua estéril por 3 minutos con agitación constante (desechar el agua), repetir el lavado por 10 minutos (desechar de nuevo el agua), y finalmente por 15 minutos (desechar el agua).



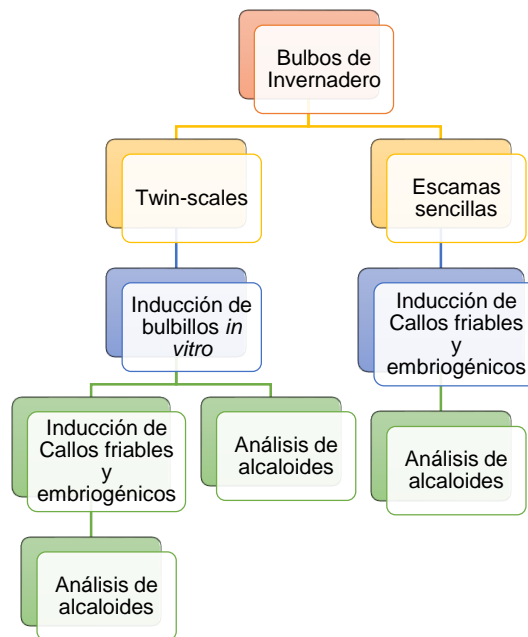
**Figura 3.** Primer corte del bulbo.



**Figura 4.** Corte de bulbo para obtener twin-scales.

## 2.4.2 Cultivo in vitro

Los bulbos colectados en el invernadero fueron utilizados para obtener dos tipos de explantes, twin-scales y escamas sencillas. Los twin-scales fueron utilizados para inducir bulbillos *in vitro*, y las escamas sencillas para inducir la formación de callos y a partir de estos, la formación de callos friables y callos embriogénicos (Figura 5). A su vez, de los bulbillos inducidos *in vitro*, se extrajeron escamas sencillas para inducir callos embriogénicos y callos friables. Posteriormente se realizó el análisis de alcaloides en todos los tejidos obtenidos *in vitro*.



**Figura 5.** Esquema general del cultivo *in vitro*, los tratamientos evaluados y análisis realizados.

### **2.4.2.1 Cultivo *in vitro* para inducir organogénesis.**

#### **2.4.2.1.1 Inducción de bulbillos *in vitro* a partir de bulbos del invernadero**

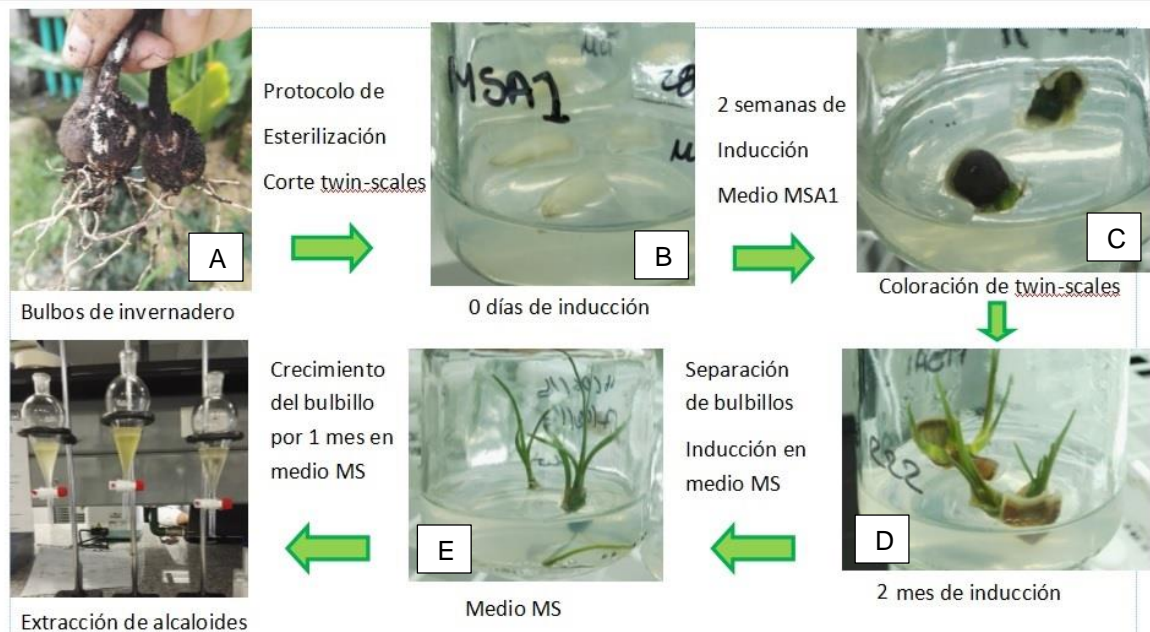
En la familia *Amaryllidaceae*, los explantes cortados por Twin-Scales, forman dos segmentos (capas) unidos por un tejido que es la placa basal, indispensable para su posterior reproducción (Bach & Sochacki, 2012). Para la inducción de bulbillos *in vitro* se utilizó un protocolo estandarizado en el laboratorio de Biotecnología Vegetal, el cual consiste en realizar cortes de Twin-Scales de los bulbos de invernadero previamente desinfectados. Después de realizar el protocolo de desinfección de los bulbos de invernadero (Figura 6A) en la cabina de flujo laminar, se procedió a realizar los cortes de Twin-Scales sobre una caja Petri estéril. Con ayuda de una cuchilla estéril, se separaron las secciones de los bulbos

(4 secciones por bulbo cortadas en el protocolo de desinfección, Figura 3), de a dos capas las cuales estuvieron unidas por la placa basal. De cada sección, se extrajeron entre 3 y 4 explantes (twin-scales, Figura 6B). La placa basal de los explantes mide aproximadamente 5 milímetros, la cual queda cubierta por el medio de cultivo como se ve en la Figura 6B. Los explantes fueron sembrados en orientación adaxial sobre el medio de cultivo, para garantizar la apertura de las escamas (Figura 6D), que da paso a la formación de nuevos bulbillos (Rice, Finnie, & Van Staden, 2011).

La inducción de bulbillos *in vitro* se dividió en dos etapas. En la primera etapa, se introdujeron 2 explantes de twin-scales por cada frasco esterilizado que contenía 25 mL de medio de cultivo MS-A1 (Figura 6B). El colocar un máximo de 2 explantes por frasco, disminuye la contaminación y proporciona los nutrientes necesarios a cada explante. En el Cuadro 1, se puede observar los diferentes experimentos, con su respectivo material de invernadero utilizado, y el número de twin-scales cultivadas. En total se cultivaron 84 twin-scales obtenidas a partir de 8 bulbos provenientes del invernadero (Figura 6A), para un total de 42 frascos sembrados en 4 experimentos. Al cabo de dos meses de cultivo (segunda etapa), los bulbillos inducidos (Figura 6D) se sub-cultivaron de a dos bulbillos por frasco estéril con 25 mL de medio MS para estimular el crecimiento de los bulbillos generados (Figura 6E), esto se hizo con el fin de aumentar el tamaño de los bulbillos y sus hojas para posteriormente tener un mayor peso seco para la extracción de los alcaloides, ya que los bulbillos generados *in vitro* son demasiado pequeños, al igual que sus hojas. Los frascos tanto en la primera como en la segunda etapa estuvieron en un cuarto de cultivo *in vitro* a 26°C de temperatura, 44% de humedad relativa, con un fotoperiodo de 16-h luz/8-h oscuridad.

**Cuadro 1.** Experimentos realizados para organogénesis.

<b>Experimento</b>	<b>Bulbos de invernadero</b>	<b>Número de twin-scales cultivadas</b>	<b>Número de frascos con medio MSA1</b>
<b>1</b>	2	22	11
<b>2</b>	1	14	7
<b>3</b>	3	28	14
<b>4</b>	2	20	10



**Figura 6.** Esquema general de la inducción de bulbillos con material vegetal del invernadero por medio de organogénesis y extracción de alcaloides.

#### 2.4.2.1.1 Medio de cultivo para la obtención de bulbillos *in vitro* (organogénesis):

Se utilizó el medio MS (Murashige & Skoog, 1962) con modificaciones realizadas por el grupo de investigación de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi, el cual consiste en la adición de 0.6 mg/L BAP como regulador de crecimiento, medio que se denomina medio MS-A1 (Cuadro 4). Este medio fue optimizado para la generación de bulbillos de *Zephyranthes carinata* (Geraldine Restrepo, 2016, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Icesi, comunicación personal).

Para preparar 1L de medio MS-A1, se agregaron todos los componentes (Cuadro 4, menos el agar) a 500 mL de agua tipo 2 y se agitó constantemente por 3 minutos. En la cabina de flujo laminar, se filtró el contenido del frasco, por una membrana de 0,22µm (esterilizada por autoclave previamente). En otro frasco con 500 mL de agua tipo 2 se agregó el agar, y se esterilizó por autoclave. Es importante conservar caliente este frasco para evitar la solidificación del agar. Para mezclar el contenido de los 2 frascos, se calentó el frasco con los componentes del medio de cultivo por 2 minutos en un microondas. En la cabina de flujo laminar, se mezcló en otro recipiente previamente esterilizado por autoclave, el agar caliente y el frasco con los componentes del medio. Posteriormente se envasó 25 mL de medio en cada frasco de vidrio (previamente esterilizado por autoclave), estos frascos con el medio de cultivo se dejan enfriar

hasta que se solidifique el medio, y finalmente son sellados para evitar la contaminación hasta su uso (todo esto fue realizado en la cabina de flujo laminar). Después de obtener la primera inducción de los bulbillos en el medio MS-A1, se subcultivaron en medio MS, el cual no contiene fitohormonas a diferencia del medio MS-A1 (Cuadro 4).

#### **2.4.2.2 Cultivo *in vitro* para inducir embriogénesis somática**

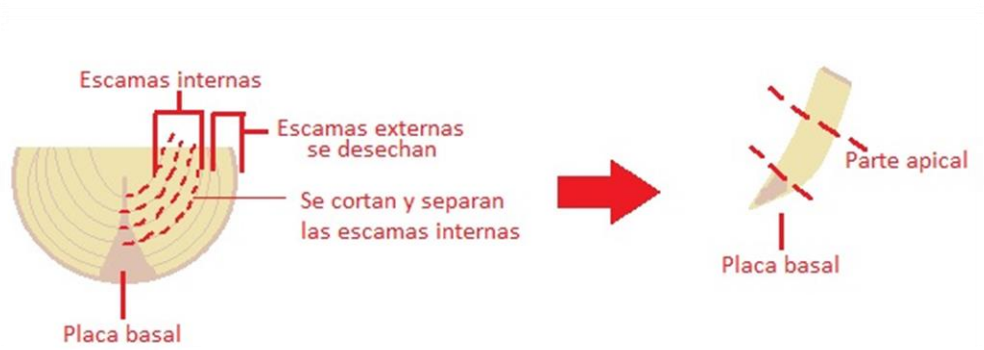
##### **2.4.2.2.1 Inducción de callos embriogénicos a partir de escamas de bulbos del invernadero:**

Después de realizar el proceso de desinfección superficial de los bulbos de invernadero, se extrajeron los explantes, donde se tomaron las escamas intermedias con la placa basal del bulbo, y éstas se subdividieron en dos tipos de explantes, placa basal y parte apical (Figura 7). La placa basal de cada escama se separó de la parte apical. Hay reportes que sugieren una mayor inducción de embriones somáticos a partir de la placa basal (Niño et al., 2010), razón por la cual se decidió evaluar estos tipos de explantes. Los explantes fueron aislados en la cabina de flujo laminar sobre una caja Petri de vidrio previamente esterilizada (Figura 7). Posteriormente, los explantes fueron sembrados con el lado adaxial en contacto con el medio MS-ES3 (Cuadro 4), como se muestra en la Figura 8.

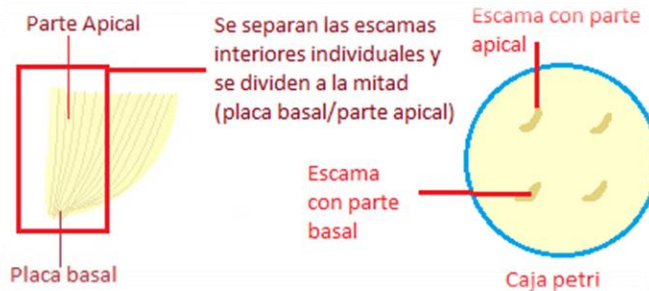
Se sembraron dos explantes con la placa basal y dos con la parte apical de cada escama, en cada caja Petri (4 explantes por caja Petri, Figura 8) con 30 mL de medio MS-ES3, para un total de 184 explantes en 46 cajas Petri, en dos experimentos (Cuadro 2). Al cabo de 4 semanas de inducción, se separaron de las escamas los callos friables (tejido no organizado, de apariencia gelatinosa y traslucida) de los callos pre-embriogénicos (de apariencia nodular y coloración amarilla). Los callos se sub-cultivaron nuevamente en medio MS-ES3 por 4 semanas más para inducir la formación de callos embriogénicos caracterizados por presentar estructuras organizadas de color amarillo. Los cultivos se mantuvieron en un cuarto de cultivo *in vitro* a 26°C, 44% humedad relativa y 24 horas de oscuridad, por 2 meses en total.

**Cuadro 2.** Experimentos realizados para la inducción de callos embriogénicos a partir de bulbos de invernadero PA: parte apical de la escama, PB: placa basal de la escama.

Experimento	Bulbos de invernadero	Número de escamas sencillas extraídas	Parte de la escama cultivada	Número de explantes	Número de cajas Petri con medio MSES3
1	3	70	PA	70	35
			PB	70	
2	1	22	PA	22	11
			PB	22	



**Figura 7.** Obtención de los explantes utilizados en la inducción de embriogénesis somática a partir de bulbos provenientes del invernadero o bulbillos sub-cultivados *in vitro*. Las escamas internas son seccionadas separando la parte basal de la apical.



**Figura 8.** Siembra de los explantes para la inducción de embriogénesis somática a partir de bulbos provenientes del invernadero o bulbillos sub-cultivados *in vitro*

#### **2.4.2.2 Inducción de callos embriogénicos a partir de escamas de bulbillos inducidos y desarrollados *in vitro*.**

Ensayos previos en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Icesi, sugieren que los explantes de bulbillos *in vitro* tienen una mayor respuesta de regeneración de tejidos que los bulbos que provienen del invernadero. Razón por la cual además de evaluar la inducción de callos embriogénicos a partir de escamas de bulbos del invernadero, se evaluó la inducción de embriogénesis somática a partir de escamas de bulbillos obtenidos y desarrollados *in vitro* por organogénesis, procedimiento descrito anteriormente en la sección 2.4.2.1. Los bulbillos fueron utilizados después de 2 meses de inducción en medio MS-A1 y 7 meses de sub-cultivo en medio MS.

A diferencia de los bulbos formados en el invernadero los cuales miden aproximadamente de 15 a 20 mm de diámetro, los bulbillos formados *in vitro* son 2 a 3 veces más pequeños (aproximadamente 10 mm de diámetro), por lo que sus escamas son más pequeñas, más rígidas y gruesas, en comparación con los bulbos de invernadero cuyas escamas son más frágiles y delgadas. En este caso fue necesario utilizar un estereoscopio (Marca Nikon, modelo SMZ 445 C-LEDS),



para facilitar el aislamiento de cada tipo de explante, la placa basal y la parte apical de las escamas. El aislamiento se realizó sobre una caja Petri esterilizada. El procedimiento utilizado para el aislamiento y el cultivo de estos explantes, la selección del tipo de callo inducido y su posterior sub-cultivo, fue similar al utilizado para las escamas provenientes de bulbos del invernadero y descrito en la sección 2.4.2.2.1 (Figuras 7 y 8). Se sembraron dos explantes con la placa basal y dos con la parte apical de cada escama, en cada caja Petri (4 explantes por caja Petri, Figura 8) con 30 mL de medio MS-ES3 para un total de 184 explantes en 46 cajas Petri, en dos experimentos (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Experimentos realizados para la inducción de callos embriogénicos a partir de bulbillos sub-cultivados in vitro. PA: parte apical de la escama, PB: placa basal de la escama.

Experimento	Bulbillos sub-cultivados in vitro	Número de escamas sencillas extraídas	Parte de la escama cultivada	Número de explantes	Número de cajas Petri con medio MSES3
1	3	44	PA	44	22
			PB	44	
2	3	48	PA	48	24
			PB	48	

#### **2.4.2.2.3 Medio de cultivo para la inducción de callos embriogénicos a partir de escamas de bulbos del invernadero o bulbillos in vitro**

El medio MS-ES3, es un medio basal MS (macro, micro y vitaminas) al cual se le adicionó 0.4 mg/L de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) y 0.4 mg/L de kinetina. Este medio para la inducción de callos embriogénicos, es una modificación del medio utilizado para la especie *Crinum x powellii* (Niño *et al.*, 2010) realizada en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi.

Para preparar 1 L de medio MS-ES3, se agregaron todos los componentes (Cuadro 4, menos el agar) a un frasco con 500 mL de agua tipo 2 y se agitó constantemente por 3 minutos. En la cabina de flujo laminar, se filtró el contenido del frasco, por una membrana de 0,22µm (esterilizada por autoclave previamente). En otro frasco con 500 mL de agua tipo 2 se agregó el agar, y se esterilizó por autoclave. Es importante conservar caliente este frasco para evitar la solidificación del agar. Para mezclar el contenido de los 2 frascos, se calentó el frasco con los componentes del medio de cultivo por 2 minutos en un microondas. En la cabina de flujo laminar, se mezcló en otro recipiente previamente esterilizado por autoclave, el agar caliente y el frasco con los componentes del medio. Posteriormente se envazó 30 mL de medio en cada caja Petri (estériles), las cajas Petri se dejan enfriar hasta que se solidifique el medio, y finalmente son selladas para evitar la contaminación hasta su uso.

**Cuadro 4.** Medio de cultivo MS, MS-A1 y MS-ES3.

	MS		MS-A1		MS-ES3	
	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L	mg/L	mmol/L
<b>Macroelementos</b>						
<b>NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub></b>	1650	20,61	1650	20,61	1650	20,61
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1900	18,79	1900	18,79	1900	18,79
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	180,7	1,50	180,7	1,50	180,7	1,50
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	170	1,25	170	1,25	170	1,25
<b>Microelementos</b>						
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	6,2	0,100	6,2	0,100	6,2	0,100
<b>MnSO<sub>4</sub> X H<sub>2</sub>O</b>	16,9	0,10	16,9	0,10	16,9	0,10
<b>ZnSO<sub>4</sub> X 7H<sub>2</sub>O</b>	8,6	0,0299	8,6	0,0299	8,6	0,0299
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> X 2 H<sub>2</sub>O</b>	0,25	0,0010	0,25	0,0010	0,25	0,0010
<b>CuSO<sub>4</sub> X 5H<sub>2</sub>O</b>	0,025	0,00010	0,025	0,00010	0,025	0,00010
<b>CoCl<sub>2</sub> X 6H<sub>2</sub>O</b>	0,025	0,0001	0,025	0,0001	0,025	0,0001
<b>KI</b>	0,83	0,0050	0,83	0,0050	0,83	0,0050
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	332,2	2,99	332,2	2,99	332,2	2,99
<b>Na<sub>2</sub>EDTA X 2H<sub>2</sub>O</b>	37,26	0,1052	37,26	0,1052	37,26	0,1052
<b>FeSO<sub>4</sub> X 7H<sub>2</sub>O</b>	27,80	0,1000	27,80	0,1000	27,80	0,1000
<b>Vitaminas</b>						
<b>Acido nicotínico</b>	0,50	0,0041	0,50	0,0041	0,50	0,0041
<b>Piridoxina. HCL</b>	0,50	0,0024	0,50	0,0024	0,50	0,0024
<b>Tiamina X HCL</b>	0,1	0,0003	0,1	0,0003	0,1	0,0003
<b>Glicina</b>	2	0,0266	2	0,0266	2	0,0266
<b>Inositol miocardio</b>	100	0,5551	100	0,5551	100	0,5551
<b>Regulador de crecimiento</b>						
<b>BAP</b>	0	0	0,6	0,0027	0	0
<b>2,4-D</b>	0	0	0	0	0,4	0,0018
<b>Kinetina</b>	0	0	0	0	0,4	0,0019
<b>Fuente de carbono</b>						
<b>Sacarosa</b>	30000	87,64	30000	87,64	30000	87,64
<b>Agentes gelificantes</b>						
<b>Goma gellan</b>	3000		3000		3000	
<b>pH</b>	5,8		5,8		5,8	

### 2.4.3 Evaluación de la respuesta *in vitro* y obtención de material para la extracción de alcaloides

#### 2.4.3.1 Organogénesis.

Después de 8 semanas de cultivo *in vitro* de los 84 twin-scales en el medio MS-A1 distribuidos en 4 experimentos, se cuantificaron el número de bulbillos inducidos

por organogénesis y se sub-cultivaron en medio MS sin hormonas por otras 4 semanas (Figura 6). Al término de las 4 semanas, los bulbillos fueron separados de sus hojas, y se obtuvieron un total de 6 muestras procesadas de hojas y 12 de bulbillos, para determinar la producción de alcaloides en estas muestras a partir de los 130 bulbillos producidos en los 4 experimentos.

#### **2.4.3.2 Embriogénesis somática.**

Después de un mes de cultivo de los 92 explantes de la parte basal y 92 de la parte apical de las escamas, obtenidas a partir de bulbos de invernadero o de bulbillos producidos *in vitro*, se cuantificó el número de escamas que presentaban inducción de callo friable (tejido no organizado, de apariencia gelatinosa y traslúcida) o pre-embriogénico (de apariencia nodular y coloración amarilla). Estos callos fueron sub-cultivados en medio fresco y al cabo de cuatro semanas más, se determinó el número de callos que no mostraron cambios o produjeron callos embriogénicos, es decir, presentaban estructuras organizadas de color amarillo.

#### **2.4.4 Extracción de alcaloides.**

Para la extracción de alcaloides es necesario primero secar el material vegetal. Se procedió de la siguiente manera. Para el material vegetal inducido por organogénesis, se separaron las hojas de los bulbillos producidos *in vitro* y se procesaron estos materiales por separado por cada tratamiento y experimento. En el caso del material obtenido de los experimentos de inducción de embriogénesis somática, se separaron los diferentes tipos de callos (friables, pre-embriogénicos y embriogénicos), y se procesaron por separado por cada tratamiento y experimento. En todos los casos se procesaron por separado los materiales obtenidos a partir de explantes de bulbos del invernadero del de los obtenidos a partir de bulbillos inducidos *in vitro*.

Los materiales seleccionados fueron pesados antes (peso fresco) y después del secado (peso seco). Se determinó el porcentaje de peso seco obtenido de cada experimento (Fórmula 1). Para eliminar el agua del material vegetal, las muestras se colocaron en un horno por 72 horas a 47°C. Luego de ser pesadas, las muestras fueron clasificadas según su peso en cantidades que oscilaron entre 100 y 200 mg de peso seco.

$$\text{Porcentaje de peso seco}(\%) = \frac{\text{peso seco neto} \times 100}{\text{peso fresco}}$$

**Fórmula 1.**

Para la extracción de alcaloides se utilizó el siguiente protocolo, estandarizado por el profesor Guillermo Montoya PhD, Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Icesi. Este protocolo se basa en una extracción líquida ácido-base característica para alcaloides básicos:

1. Depositar en morteros el material vegetal seco (hojas, bulbillos y callos por separado) y macerar hasta pulverizar el tejido.
2. Pesar muestras entre 100 y 200mg de material vegetal macerado.
3. Introducir las muestras en tubos Falcón por separado.
4. Agregar 5 mL de metanol HPLC a cada tubo Falcón y agitar constantemente por 5 minutos para romper las paredes celulares del material vegetal.
5. Introducir en la centrifuga todas las muestras por 5 minutos a 5000 rpm a 21°C.
6. Separar el sobrenadante del pellet de cada muestra y recuperar el sobrenadante en beakers individuales.
7. Repetir el numeral 4, 5 y 6 con el pellet de cada tubo Falcón, y depositar los sobrenadantes en los mismos beakers individuales utilizados en el numeral 6.
8. Acidificar el pellet de cada tubo Falcón con ácido clorhídrico 0,1 N (5mL), y verificar el pH ácido con papel tornasol.
9. Agitar por 5 minutos constantemente y repetir numeral 5.
10. Recuperar el sobrenadante ácido en los mismos beakers respectivos donde se recolectaron los sobrenadantes anteriores de metanol.
11. Desechar los tubos Falcón con los pellets.
12. Adicionar 10 mL de cloroformo a cada beaker para separar todas las impurezas (fase orgánica).
13. Depositar el contenido de los beakers en diferentes embudos de separación.
14. Desechar la fase orgánica y recolectar de nuevo en los beakers la fase acuosa.
15. Adicionar hidróxido de amonio concentrado 30% (1 gota y media) en cada beaker para aumentar el pH a 9-10 (importante no sobrepasar de pH 10, medir con papel tornasol).
16. Adicionar 10 mL de cloroformo en cada beaker y depositar el contenido en cada embudo de separación.
17. Recolectar esta vez la fase orgánica (cloroformo, los alcaloides son solubles en fase orgánica ya que están en pH 9-10), en un tubo de ensayo de vidrio.
18. Desechar la fase acuosa.
19. Introducir los tubos de ensayo en el Rapid Vap para secar la muestra en condiciones de 40°C, 300 bares de presión, agitación 40 rpm, por 90 min aproximadamente, hasta que se evapore casi todo el cloroformo.
20. Terminar de evaporar la muestra reprogramando el Rapid Vap a 0 bares de presión por 20 minutos.

21. Reconstituir el pellet de los tubos de ensayo con 1 mL de metanol preparado con estándar de Boldina a 50 PPM (mg/L).
22. Filtrar la reconstitución de metanol con una jeringa tipo insulina y un filtro de nylon de 0,22  $\mu\text{m}$ .
23. Envasar la muestra filtrada en viales para lectura por UPLC/MS.

#### 2.4.5 Cuantificación de alcaloides.

##### 2.4.5.1 Condiciones de equipo UPLC/MS:

La cuantificación de los alcaloides se realizó por medio de un equipo UPLC/MS. El equipo utilizado fue de UPLC acoplado a masas de marca Waters® (SQD2), el programa utilizado para el procesamiento de datos fue MassLynx. Se utilizó una columna ACQUITY CSH™ C18 1,7  $\mu\text{m}$  UPLC de 2,1x100mm; esta columna corresponde a la fase estacionaria. La fase móvil está constituida por: A) Agua + 0,05% de ácido fórmico y B) Acetonitrilo.

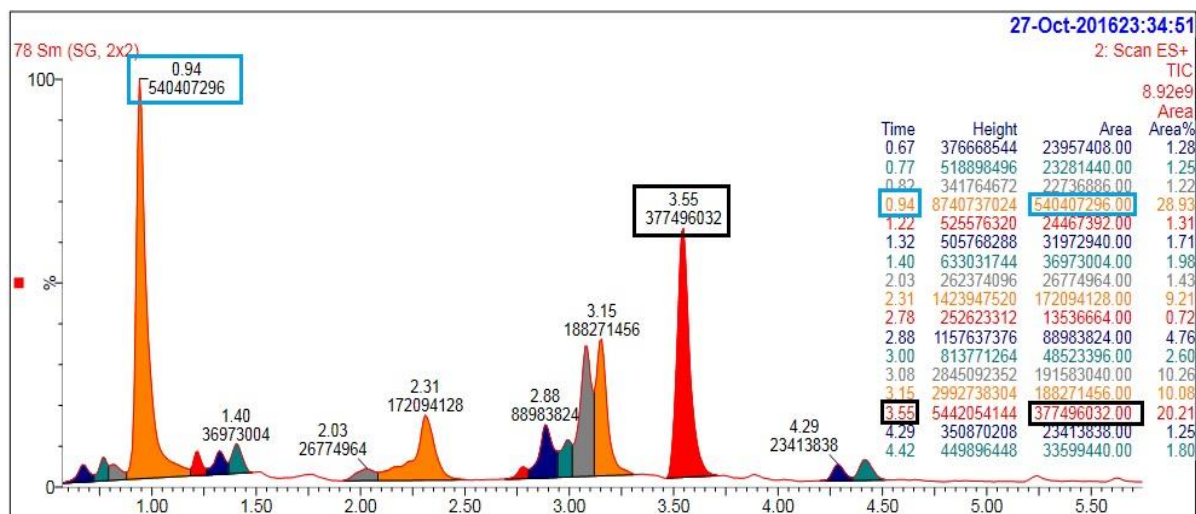
10 minutos, tiempo de corrido/ Flujo 0,3 mL/min												
A (%)	95	95	87	87	84	84	77	77	70	70	95	95
B (%)	5	5	13	13	16	16	23	23	30	30	5	5

- Temperatura de columna: 25°C
- Temperatura de muestra: 10°C
- Voltaje del capilar: 3,3 kV
- Voltaje de cono: 70 V
- Temperatura de saturación: 350°C
- Flujo de gas: 650L/h de nitrógeno.
- Masas: 10-600 M/Z
- Sir: 265,3 M/Z y 328,3 M/Z correspondiente al estándar de Boldina para la identificación de alcaloides.
- ES+: ionización positiva.

##### 2.4.5.2 Cálculos de la concentración de alcaloides.

Después de analizar las muestras por UPLC/MS, se obtuvo un cromatograma para cada muestra. En el cromatograma de cada muestra se encuentra el área bajo la

curva de cada pico detectado en su respectivo tiempo de retención que corresponde a un alcaloide (ver columnas a la derecha de la Figura 9). En todas las muestras se encuentra un estándar de boldina, que se encuentra marcada con un recuadro negro en la Figura 9, con una concentración conocida de 50ppm, dicha boldina tiene un área bajo la curva específica reportada en el cromatograma (marcada en el recuadro negro).



**Figura 9.** Ejemplo de un cromatograma obtenido de la extracción de una muestra vegetal, donde el eje X se corresponde al tiempo de retención de cada compuesto, y el eje Y corresponde al porcentaje de abundancia en el que se encuentra cada compuesto en la muestra. Los recuadros negros indican el área bajo la curva del estándar de boldina; el recuadro azul indica el área bajo la curva del alcaloide en cuestión, en su respectivo tiempo de retención.

Este procedimiento se realizó con todos los compuestos detectados (picos coloreados en la Figura 9) en cada tiempo de retención de los diferentes cromatogramas obtenidos para cada muestra. Con esta información, fue posible calcular la concentración de cada alcaloide retenido en los cromatogramas obtenidos por el UPLC/MS, de la siguiente forma:

$$\left[ \text{Alcaloide} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) \right] = \frac{\text{Area de alcaloide} \times 50 \text{ ppm (concentraci3n conocida de la boldina)}}{\text{Area de la boldina}}$$

**F3rmula 2.**

$$\text{Peso neto alcaloide (mg)} = \frac{[\text{mg}]}{\text{L}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mL metanol HPLC}}{\text{reconstituci3n alcaloides}}$$

**F3rmula 3.**

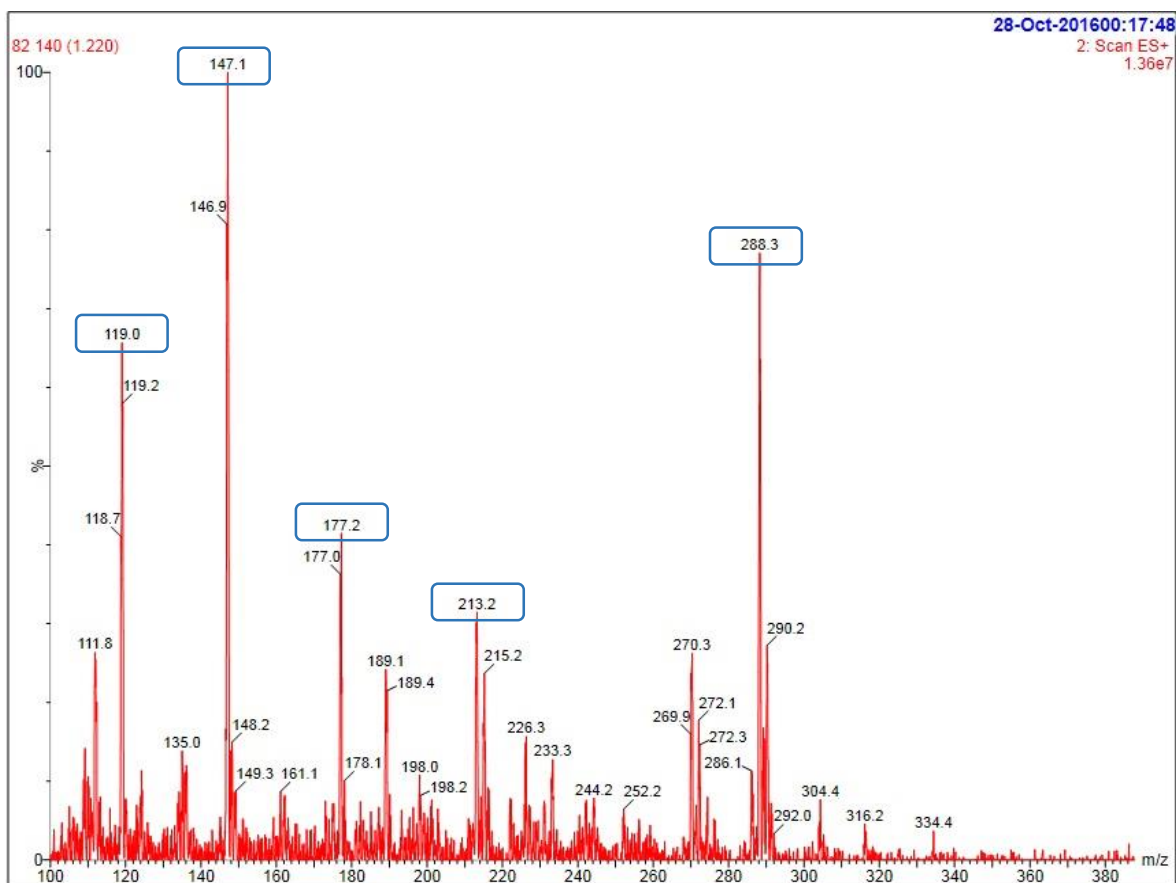
$$\text{Porcentaje (\%)} \frac{\text{peso}}{\text{peso}} = \frac{\text{peso neto alcaloide (mg)}}{\text{peso muestra vegetal seca}} \times 100$$

#### Fórmula 4.

Las Formulas 2, 3 y 4 se aplicaron en todas las muestras analizadas con las áreas reportadas de cada alcaloide detectado en los cromatogramas.

#### 2.4.6 Identificación de alcaloides.

Para la identificación de los alcaloides, se analizaron todos los espectros de masas obtenidos a partir de cada pico detectado en los cromatogramas en su respectivo tiempo de retención. En la punta de cada pico de retención (Figura 9) se dio doble click y el software MassLynx arroja inmediatamente el espectro de masas que corresponde al pico seleccionado. En la Figura 10 se puede ver un ejemplo de un espectro de masas, que proviene de un pico de retención de un cromatograma obtenido por el *UPLC/MS Waters® (SQD2)*. Siguiendo este procedimiento, en dicho espectro de masas se observaron las fragmentaciones más abundantes con su respectiva relación masa/carga.



**Figura 10.** Ejemplo de un espectro de masas para la identificación de alcaloides. Los recuadros azules indican las fragmentaciones más abundantes de la molécula que corresponde a dicho alcaloide en cuestión.

Después de analizar todas las fragmentaciones más abundantes y características en cada espectro de masas obtenido, se compararon con las fragmentaciones

reportadas por el estudio de (Katoch et al., 2012) para cada alcaloide identificado en la especie *Zephyranthes glandiflora*. Igualmente se compararon con el proyecto de grado de (Rivera, 2015) realizado en la Universidad Icesi donde se trabajó con la especie *Zephyranthes glandiflora*, y con el proyecto de grado de Daniela Alizandre titulado “Evaluación del efecto inductor del Metil Jasmonato y el Ácido Jasmonico en la liberación de alcaloides producidos in vitro en la especie *Zephyranthes carinata*”. Los alcaloides que no pudieron ser identificados se nombraron como desconocidos.

#### 2.4.7 Análisis estadístico.

Al obtener la concentración en porcentaje peso a peso de todos los alcaloides identificados (Fórmula 4), se realizaron los siguientes cálculos utilizando los cálculos Fórmulas de la 5 a la 8 para determinar el promedio, promedio ponderado, la desviación estándar y el error estándar, respectivos de las concentraciones de alcaloides halladas para cada tipo de material vegetal y tratamiento (hojas, bulbillos, callos friables y callos embriogénicos):

$$\text{Promedio de las muestras} = \frac{\text{sumatoria de todos los } \% \frac{\text{peso}}{\text{peso}} \text{ de alcaloides}}{\text{numero de muestras}}$$

**Fórmula 5.**

$$\text{Promedio ponderado} = \frac{\text{sumatoria de todos los promedios de las muestras}}{\text{número de experimentos}}$$

**Fórmula 6.**

Donde S: es la desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{\sum_i (X_i - \bar{X})^2}{n}}$$

$X_i$ : promedio de las muestras.  
 $\bar{X}$ : promedio ponderado  
 $n$ : número de experimentos (repeticiones).

**Fórmula 7.**

$$\text{Error estandar (S error)} = \frac{\text{Desviación estándar}}{\sqrt{\text{número de experimentos}}}$$

**Fórmula 8.**



Este análisis estadístico se realizó para medir la variabilidad de las muestras, la precisión de los datos, y la reproducibilidad del método utilizado en esta investigación.

## 2.5 Resultados

### 2.5.1 Formación de bulbillos *in vitro* (vía organogénesis) a partir de twin-scales obtenido de bulbos del invernadero

Al cabo de dos semanas de inducción de las twin-scales en medio MSA1 se observó una coloración verde en las escamas (Figura 6C). En la cuarta semana de inducción hubo apertura de las escamas la cual da paso a la formación de bulbillos (Figura 6D). Después de 8 semanas de cultivo *in vitro*, se indujeron un total de 130 bulbillos (Cuadro 5) a partir de las 84 twin-scales cultivadas, con un promedio de porcentaje de respuesta del 152,8%. Es decir, que se formaron entre uno y dos bulbillos por cada twin-scale cultivada. Estos 130 bulbillos se sub-cultivaron en medio MS por 4 semanas adicionales, para finalmente determinar su peso fresco y peso seco (Figura 6E, Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Material vegetal obtenido por organogénesis

Experimento	No de twin-scales	Bulbillos inducidos	% de respuesta		Hojas			Bulbillos		
					Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)	PS/ H	Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)	PS/B
1	22	33	150		1999,9	207,7	6,2	3341,1	510,7	15,5
2	14	20	143		1374,4	128,0	6,3	2028,7	327,0	16,4
3	28	47	168		2775,6	263,2	5,6	4279,5	776,7	16,5
4	20	30	150		1117,1	113,3	3,7	3183,0	476,9	15,9
Total	84	130	$\bar{X}$	152,8	$\bar{X}$		5,5	$\bar{X}$		16,1
			SD	10,7	S		1,2	SD		0,5
			S error	5,3	S error		0,6	S error		0,2

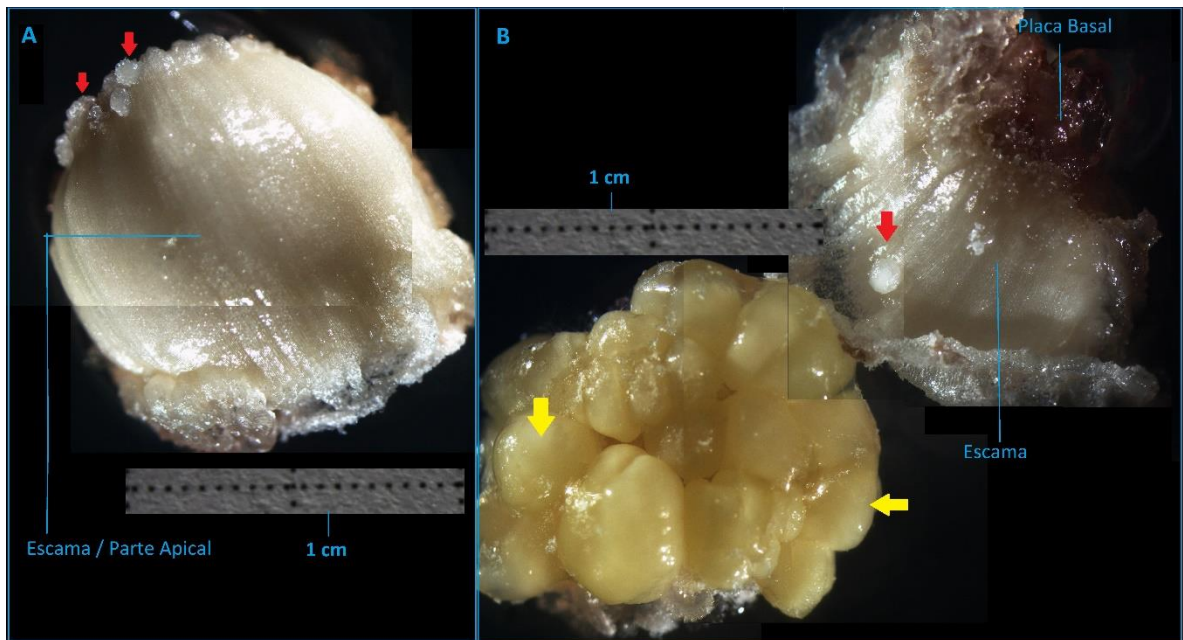
H: hojas, B: bulbillos, PS: peso seco.

El peso seco total de las hojas producidas a partir de los 130 bulbillos inducidos *in vitro* fue de un total de 712,2 mg (5,5 mg / bulbilllo), y el de bulbillos fue de un total de 2.091,3 mg (16,1 mg/ bulbilllo), es decir, que en promedio los bulbillos producen casi tres veces más materia seca que las hojas. Como se observa el Cuadro 5, el peso seco en las hojas tiene mayor variación de un experimento a otro, esto se atribuye a que por cada bulbilllo pueden salir de 2 a 3 hojas, el número de hojas por bulbilllo no siempre es el mismo. El material seco obtenido fue procesado para la extracción de alcaloides, subdividiéndolo en muestras de 100 a 200 mg, de

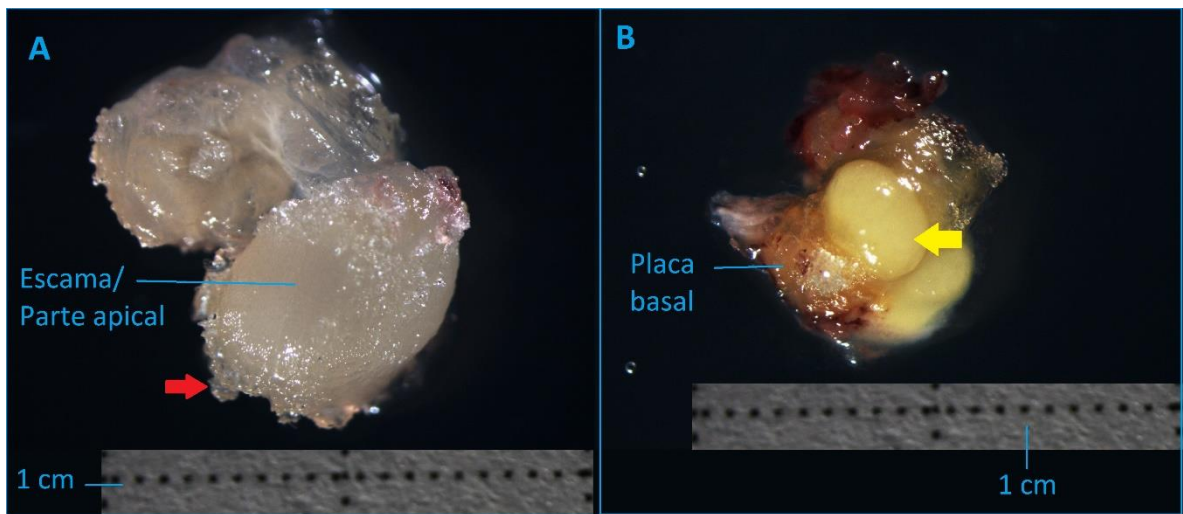
acuerdo a la disponibilidad del material, hasta procesar todo el material generado. (Cuadro 5).

### **2.5.2 Formación de callos friables y callos embriogénicos (vía embriogénesis somática) a partir de explantes de bulbos de invernadero y bulbillos sub-cultivados *in vitro*.**

El protocolo utilizado en este proyecto de grado, fue una modificación del reportado para *Crinum x powellii* (*Amaryllidaceae*) (Niño et al., 2010). En este caso, se utilizaron los bulbos de las plantas de invernadero para inducir la embriogénesis somática, dado que los explantes provenientes de los cormos internos de la parte basal del bulbo, son las zonas más totipotentes y por consiguiente promueven la inducción de callos, y embriones somáticos. Solo se indujeron callos embriogénicos en numerosas cantidades y se subcultivaron para fomentar el crecimiento y proliferación de los callos embriogénicos. En este proyecto de grado se evaluó la respuesta de escamas provenientes de bulbos del invernadero como de bulbillos inducidos *in vitro*, adicionalmente se evaluaron diferentes tipos de explantes, esto es, secciones de las escamas del bulbo que incluía o no la placa basal y un medio de composición diferente al reportado por (Niño et al., 2010). A las dos semanas de inducción de callos, se observó la formación de callos friables en todos los dos tipos de explantes, en la parte apical y la placa basal de las escamas, a partir de explantes obtenidos a partir de bulbos del invernadero o bulbillos inducidos *in vitro*. Pasado el primer mes de inducción, se observó que los explantes de la parte apical de la escama de bulbos de invernadero y bulbillos sub-cultivados *in vitro*, seguían formando callos friables, pero en la placa basal adicionalmente se comenzaron a observar la formación de callos pre-embriogénicos, y callos embriogénicos (Figuras 11 y 12). Al segundo mes de inducción se observó un aumento en el número de callos embriogénicos.



**Figura 11.** Formación de callo friable y callo embriogénico a partir de escamas de bulbos de invernadero después de dos meses de cultivo en medio MS-ES3. A) Callo friable (flechas rojas) formado a partir de la parte apical de la escama. B) Callo embriogénico (flechas amarillas) formado a partir de la placa basal de la escama; en la escama también se observa formación de callo friable (flecha roja), y se puede apreciar la placa basal de la escama (color café). La barra representa 1 cm de ancho.



**Figura 12.** Formación de callo friable y callo embriogénico a partir de escamas de bulbillos obtenidos in vitro después de dos meses de cultivo en medio MS-ES3. A) Callo friable (flecha roja) generado de la parte apical de la escama. B) Callo embriogénico (flecha amarilla) formado a partir de la placa basal (color café) de la escama. La barra representa 1 cm de ancho.

Las fotografías que se muestran en la Figura 11 y Figura 12, fueron tomadas al segundo mes de inducción. Los callos friables se caracterizaron por una

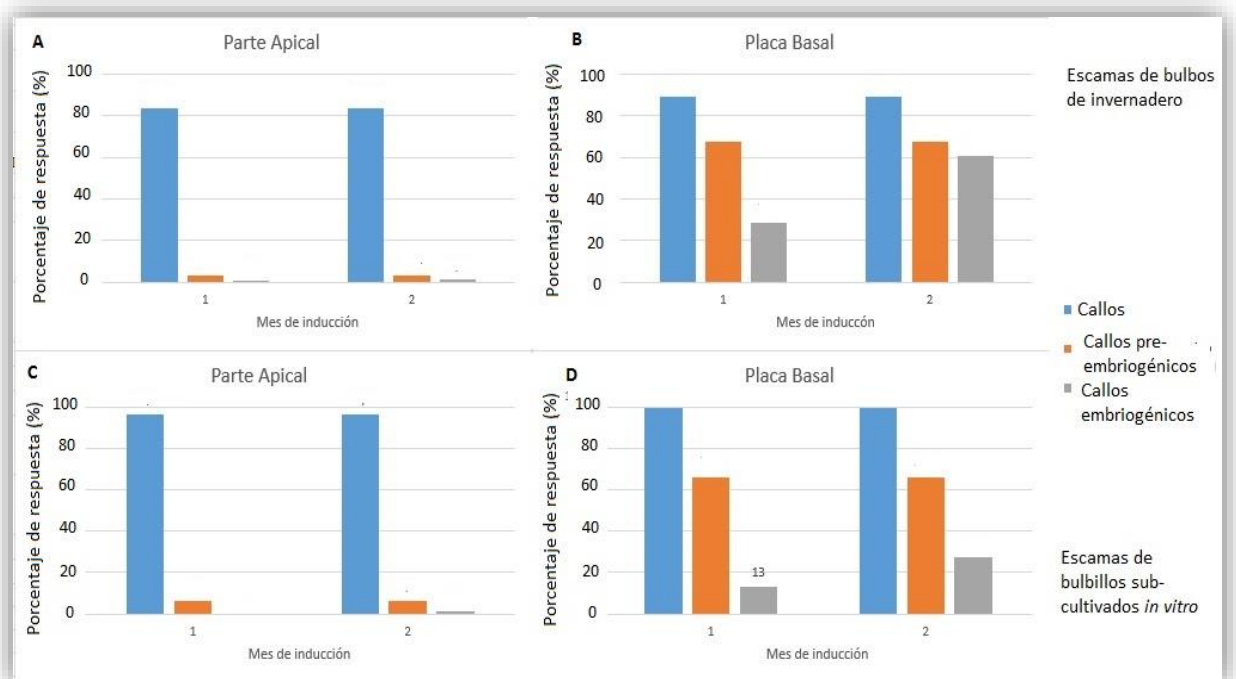
aparición traslúcida y alto contenido de agua (Figuras 11A y 12A, flechas rojas). Los callos pre-embriogénicos, son de color amarillo, su apariencia es gelatinosa y no poseen estructuras organizadas (no se muestran en las Figuras 11 y 12), mientras que los callos embriogénicos se caracterizan por su coloración amarilla, formación de estructuras organizadas y compactas con menos contenido de agua (ver Figura 11B y 12B, flechas amarillas). Para inducir la formación del callo embriogénico, se removió del explante los callos pre-embriogénicos y embriogénicos formados el primer mes, y se colocaron nuevamente en medio MSES3, de forma que tuvieran contacto directo con el medio (por otro mes más). Razón por la cual la Figura 11B, se ven dos tejidos diferentes, ya que se removió el callo pre-embriogénico del explante (placa basal), y este dio paso al callo embriogénico que se observa en la Figura 11B.

Los callos se midieron con una barra de 1cm (Figuras 11 y 12). En general el tamaño de los callos embriogénicos es mayor que el de los callos friables. Al comparar el tamaño de los callos friables obtenidos, se puede observar que los callos friables de explantes de bulbos de invernadero son mucho más grandes que los callos friables obtenidos de explantes de bulbillos *in vitro* (Figuras 11A y 12A). Al comparar el tamaño de los callos embriogénicos obtenidos, también se puede observar que los callos embriogénicos de explantes de bulbos de invernadero son mucho más grandes que los callos embriogénicos obtenidos de explantes de bulbillos *in vitro* (Figuras 11B y 12B). Por ejemplo, el callo embriogénico que se muestra en la Figura 11B mide más de 1 cm en diámetro, mientras que el callo embriogénico de la figura 12B mide menos de 0,5 cm en diámetro aproximadamente.

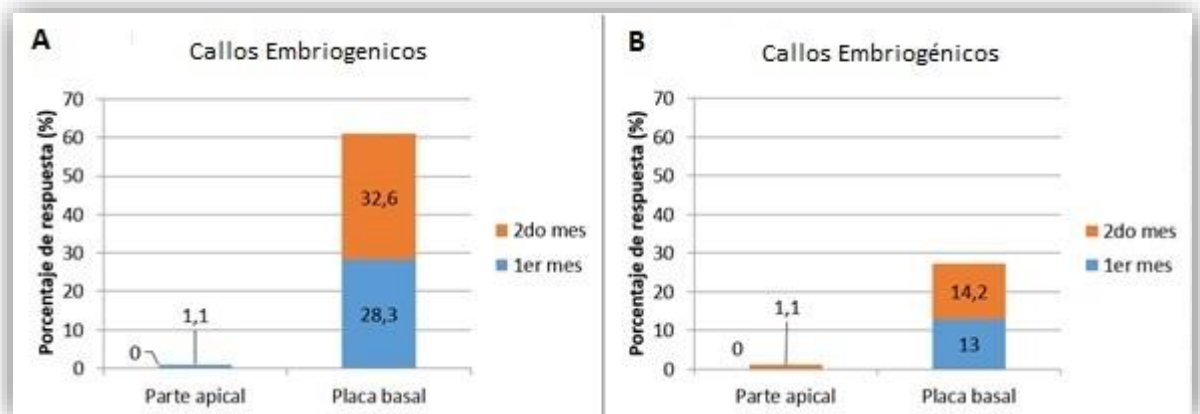
Se hicieron dos revisiones para determinar la evolución de la respuesta con el tiempo de cultivo. En la primera revisión (primer mes de inducción) y en la segunda revisión (segundo mes de inducción), se hizo el conteo total de callos discriminando los callos friables, los callos pre-embriogénicos y los callos embriogénicos, respectivamente. La respuesta observada se resume en la Figura 13, donde 13A y 13B corresponden a los tipos de callos generados a partir de escamas de bulbos del invernadero, y las Figuras 13C y 13D corresponden a los callos generados a partir de explantes de escamas de bulbillos *in vitro*. Las barras azules denotan el total de tipos de callos formados (friables, pre-embriogénicos y embriogénicos), las barras naranjas a los callos pre-embriogénicos, y las barras grises a los callos embriogénicos (Figura 13).

Los explantes de la placa basal (13B y 13D) de las escamas dieron una mayor respuesta tanto en porcentaje de inducción como en la diversidad de tipos de callos inducidos, en comparación con los explantes de la parte apical de las escamas (13A y 13C). Cabe resaltar, que el 100% de los explantes de la placa basal de escamas de bulbillos *in vitro* mostraron formación de callos (Figura 13D).

No se observaron cambios en respuesta del primer mes al segundo mes en cuanto a la formación de callos totales y callos pre-embriogénicos en los diferentes explantes evaluados (barras azules y naranjas en la Figura 13). En contraste, hubo incremento significativo (2 veces) en la formación de callos embriogénicos en el segundo mes respecto al primer mes, en las placas basales tanto de las escamas provenientes de bulbos del invernadero como de los bulbillos *in vitro* (Figura 13B y 13D). Sin embargo, los explantes de la placa basal de bulbos del invernadero mostraron desde el primer mes el doble de inducción de callos embriogénicos (Figura 13B y 14A) respecto a la placa basal de bulbillos *in vitro* (Figura 13D y 14B). La placa basal de bulbos del invernadero mostraron una respuesta en formación de callos embriogénicos del 28,3% y del 60,9% en el primer y segundo mes de inducción respectivamente (Figura 13B y 14A), mientras que la placa basal de los explantes provenientes de bulbillos *in vitro* tuvieron una respuesta de 14,2% y 27,2% en formación de callo embriogénico en el primer y segundo mes de inducción respectivamente (Figura 13D y 14B).



**Figura 13.** Respuesta en formación de callos totales (barra azul), pre-embriogénico (barra naranja) o embriogénico (barra gris) partir de escamas de bulbos de invernadero (A y B) o de bulbillos inducidos *in vitro* (C y D). (A y C) escamas apicales; (B y D) placa basal, después de uno o dos meses de cultivo.



**Figura 14.** Respuesta en la formación de callos embriogénicos en el primer y segundo mes de cultivo a partir de la placa basal y parte apical de las escamas, de bulbos del invernadero (A) y de bulbillos inducidos *in vitro* (B).

Después de evaluar la respuesta de los explantes inducidos en cuanto a la formación de callos friables y embriogénicos a partir de escamas de bulbos de invernadero y bulbillos *in vitro*, se aislaron los callos obtenidos de las cajas Petri y se pesaron por separado (peso fresco, Cuadros 6 y 7). El material vegetal se secó en un horno a 47°C por 72 horas y se volvió a pesar cada tipo de callo (peso seco, Cuadros 6 y 7). A continuación se registran los pesos frescos y pesos secos obtenidos para cada tipo de explantes.

**Cuadro 6.** Producción de callo friable y embriogénico a partir de escamas bulbos provenientes del invernadero.

Experimento	Explantes inducidos	Callo embriogénico (placa basal)		Peso seco/ Explante (mg)	Explantes inducidos	Callo friable (parte apical)		Peso seco/ Explante (mg)
		Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)			Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)	
1	70	9330,0	972,8	19,3	70	4011,3	577,0	12,9
2	22	7882,7	806,1		22	4026,0	616,6	
<b>TOTAL</b>	92		1778,9		92		1193,6	

**Cuadro 7.** Producción de callo friable y embriogénico a partir de escamas provenientes de bulbillos sub-cultivados *in vitro*.

Experimento	Explantes inducidos	Callo embriogénico (placa basal)		Peso seco/ Explante (mg)	Explantes inducidos	Callo friable (parte apical)		Peso seco/ Explante (mg)
		Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)			Peso fresco (mg)	Peso seco (mg)	

1	44	1925,3	161,5		44	1360,8	141,4	
2	48	3470,2	271,3		48	3382,4	369,9	
<b>TOTAL</b>	92		432,8	4,7	92		511,3	5,6

Los callos embriogénicos generados por explantes de bulbos de invernadero generan 4 veces más la cantidad de peso seco que los callos embriogénicos formados a partir de explantes de bulbillos *in vitro* (Cuadro 6 y 7). Igualmente sucede para los callos friables generados por explantes de bulbos de invernadero los cuales generan 2 veces más la cantidad de peso seco que los callos friables formados a partir de explantes de bulbillos *in vitro* (Cuadro 6 y 7). En general se obtuvo una producción de materia seca de 19.3 mg/explante en callo embriogénico, y 12.9 mg/explante en callo friable después de dos meses de cultivo a partir de las escamas del invernadero; y 4.7 mg/explante en callo embriogénico y 5.6 mg/explante en callo friable a partir de escamas de bulbillos *in vitro*.

Posteriormente, se separó el material seco en muestras que oscilaron entre 100-200 mg por tratamiento y experimento, para realizar las respectivas extracciones de alcaloides a partir de los callos friables y embriogénicos y su posterior análisis.

### 2.5.3 Evaluación de alcaloides.

En ensayos previos se estableció la cantidad mínima de material vegetal seco necesaria para poder identificar los alcaloides por UPLC/MS. Se determinó que la cantidad óptima para detectar, identificar y cuantificar los alcaloides en este estudio es de 100 a 200 mg de peso seco por muestra (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Producción total de materia seca (mg) en los diferentes ensayos evaluados.

	A partir de escamas de bulbos del invernadero				A partir de escamas de bulbillos <i>in vitro</i>	
	H	B	CE	CF	CE	CF
Peso seco total (mg)	712,2	2.091,3	1.778,9	1.193,6	432,8	511,3
No de muestras	6	12	10	6	3	3

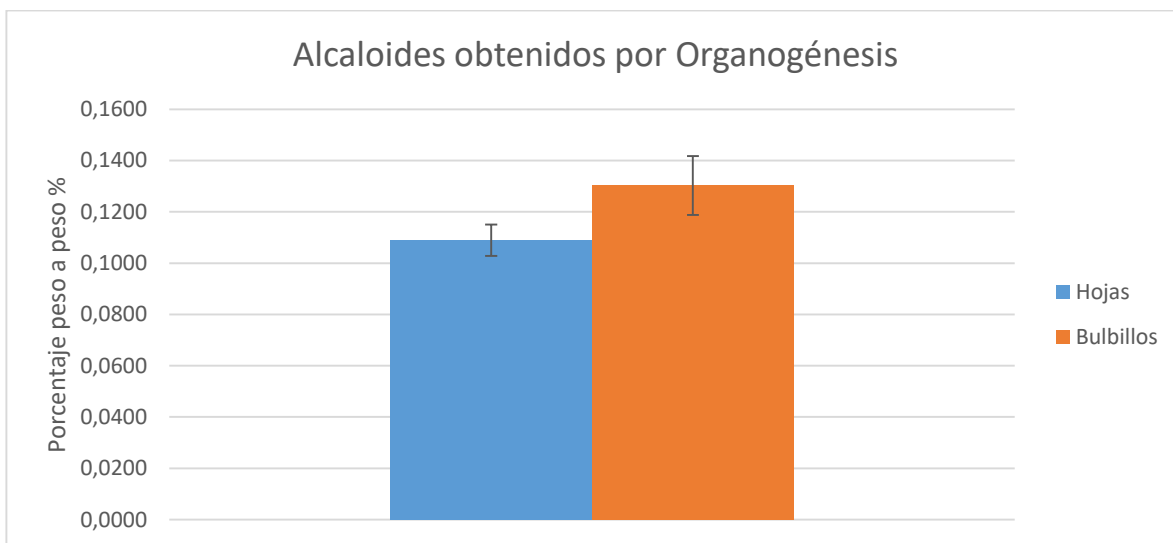
H: hojas, B: bulbillos, CE: callos embriogénicos, CF: callos friables

La producción de alcaloides en los tejidos obtenidos por vía organogénesis fue 1,2 veces mayor en los bulbillos que en las hojas (Figura 15). En los bulbillos se encontró un contenido total de alcaloides de 0,1303% p/p (peso a peso) con un error estándar de 0,0115; mientras que las hojas presentaron una concentración de 0,1089 % p/p de alcaloides totales con un error estándar de 0,0061 (Figura 15).

El error estándar estima la variabilidad entre las medias de las muestras que se obtienen si se toman múltiples muestras de la misma población, y sirve para determinar el grado de precisión con el que el promedio de la muestra estima el



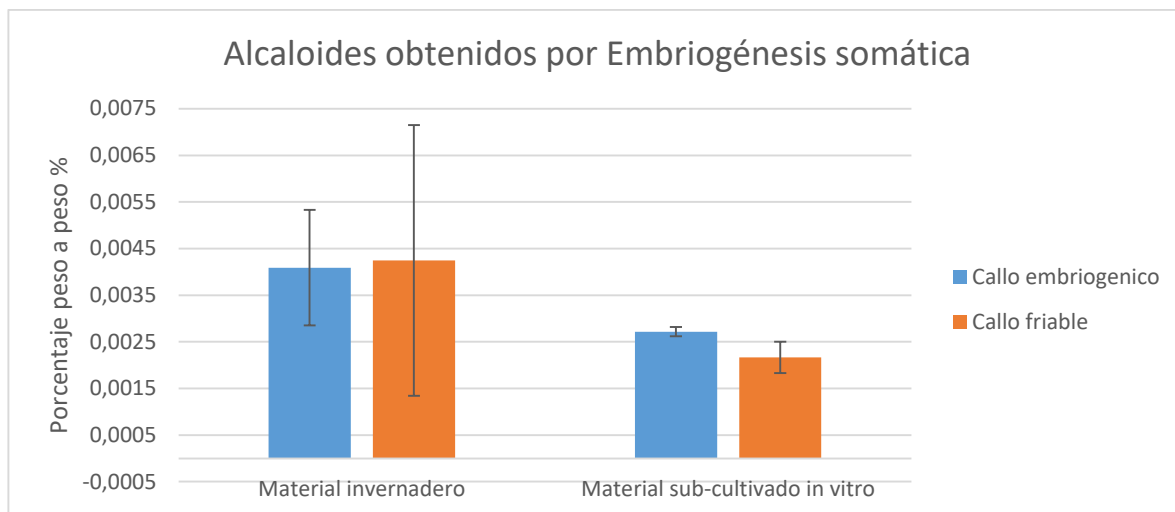
promedio de la población. También permite establecer un rango de intervalos en donde se encuentra el promedio; entre más bajo sea el error estándar, mayor precisión del promedio ponderado calculado para la concentración total de los alcaloides en porcentaje peso a peso. En este caso para hojas y bulbillos se manejaron 4 experimentos diferentes y en cada experimento hubo distintas muestras con pesos secos entre 100 y 200 mg. El error estándar para el promedio ponderado de la concentración de alcaloides en hojas y bulbillos es bajo, por lo cual hay poca variabilidad en las muestras y en los diferentes experimentos, esto quiere decir que la estimación de la concentración total de alcaloides en estos materiales es representativa y precisa para los tratamientos realizados, y a su vez el método utilizado es reproducible (Figura 15).



**Figura 15.** Producción de alcaloides (p/p%) en los tejidos vegetales obtenidos a partir de los bulbillos inducidos *in vitro* a partir de bulbos del invernadero y después de dos meses de cultivo.

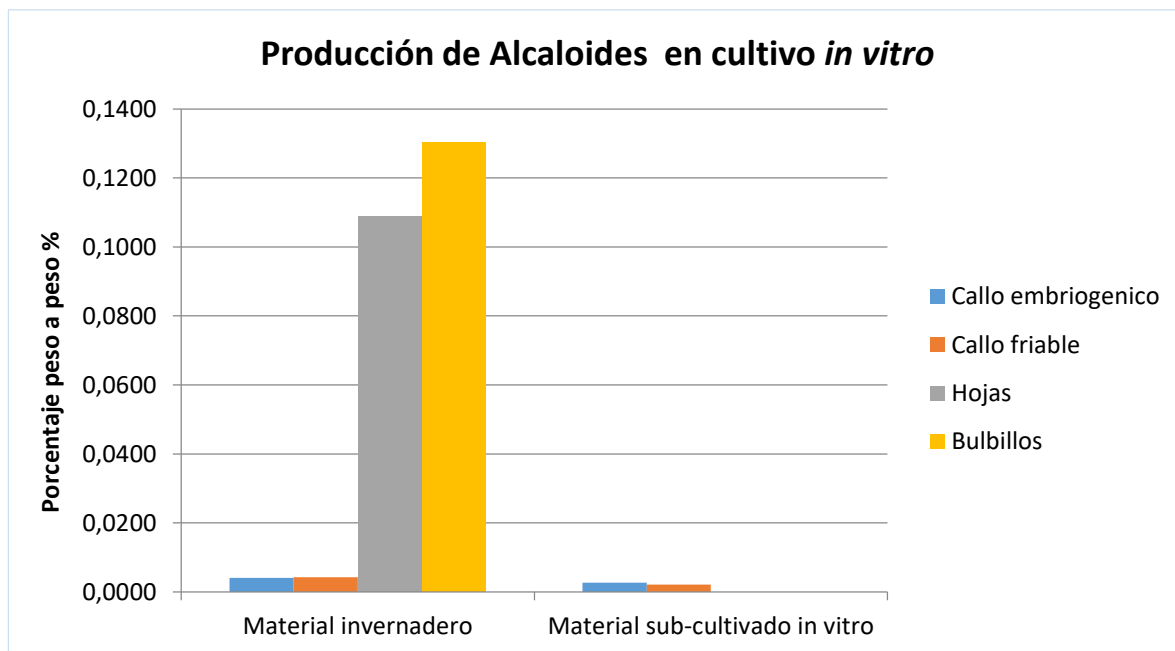
La evaluación de la producción de alcaloides en tejidos obtenidos por vía embriogénesis mostró que no hay diferencias significativas entre la producción obtenida en callos embriogénicos y friables (Figura 16), pero que en general, la producción de alcaloides fue aproximadamente el doble en los tejidos obtenidos a partir de explantes de bulbos del invernadero, en comparación con los tejidos obtenidos de bulbillos *in vitro* (Figura 16).





**Figura 16.** Promedio de la producción de alcaloides en callos friables y callos embriogénicos inducidos a partir de escamas obtenidas de bulbos del invernadero o de bulbillos producidos *in vitro*.

Los callos friables y embriogénicos provenientes de bulbos del invernadero presentaron una concentración de alcaloides de 0,0042% p/p y 0,0041% p/p respectivamente, mientras que los generados a partir de bulbillos *in vitro* mostraron una concentración de 0,0027% y 0,0022% de alcaloides respectivamente (Figura 16). Sin embargo, la variación entre experimentos con el material del invernadero es significativamente mayor, y en particular a partir de callo friable, como lo sugiere el mayor valor de error estándar obtenidos en estos casos (Figura 16). Adicionalmente, es importante destacar, que la producción total de alcaloides obtenida en tejidos producidos vía organogénesis fue aproximadamente 29 veces mayor respecto a la producción en callos embriogénicos o friables, indistintamente del origen del explante, a partir de escamas de bulbos del invernadero o de bulbillos *in vitro* (Figura 17).



**Figura 17.** Producción de alcaloides (p/p%) hojas, bulbillos y callos obtenidos a partir de bulbos del invernadero o bulbillos producidos *in vitro*.

#### 2.5.4 Identificación de alcaloides.

Para la identificación de los alcaloides presentes en las hojas, bulbillos, callos embriogénicos y callos friables, se analizaron los cromatogramas individuales para cada muestra vegetal y los espectros de masas de cada tiempo de retención registrado en los cromatogramas (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Alcaloides detectados en los diferentes tejidos producidos *in vitro* y analizados utilizando los cromatogramas y espectros de masas obtenidos por UPLC/MS.

Origen del explante	Tipo de tejido formado <i>in vitro</i>	No de cromatogramas obtenidos por UPLC/ MS	Espectros de masas	Alcaloides encontrados
Escamas de bulbos del invernadero	Hojas de bulbillos	6	84	14
	Bulbillos	12	168	14
	Callos Embriogénicos	10	11	2
	Callos Friables	6	9	2
Escamas de bulbillos inducidos <i>in vitro</i>	Callos Embriogénicos	3	3	1
	Callos friables	3	3	1
<b>TOTAL</b>		<b>40</b>	<b>278</b>	<b>16</b>

Después, de analizar 40 cromatogramas obtenidos por UPLC/MS y los respectivos espectros de masas (278) de cada pico detectado en los tiempos de retención, se identificaron 16 alcaloides presentes en *Zephyranthes carinata*. Esta identificación se basó comparando las fragmentaciones más abundantes presentes en los espectros de masas obtenidos en este proyecto con las reportadas en los estudios de Katoch et al., 2012 y Rivera, 2015.

**Cuadro 10.** Identificación de los alcaloides producidos en los tejidos vegetales obtenidos *in vitro* utilizando la información generada del análisis con UPLC/MS, y su comparación con los trabajos publicados por Katoch et al., 2012 y Rivera, 2015.

Alcaloide	Tiempo de retención (min)	Espectro de masas/ fragmentaciones M/Z	Tiempo de retención (min) de otros estudios	Espectro de masas/ fragmentaciones M/Z de otros estudios
Desconocido 1	0,76-0,84	290-272-179-147-119	nd	nd
Desconocido 2	0,81-0,84	290-219-199-175-147-120-103	nd	nd
Desconocido 3	0,94-1,00	318-288-272-270-233-215-189-147-136	nd	nd
Licorina	1,20-1,35	288-270-252-213-189-147-119	1,91 (Katoch,2012)	288, 270, 252, 147, 119
Licoramina	1,32-1,42	290-233-215-189	2,11 (Katoch,2012)	290, 233, 215, 189
			2,09 (Rivera,2015)	290, 288, 233, 215, 189
Desconocido 4	1,42-1,52	288-268-233-215-189-136-119	nd	nd
Desconocido 7	2,02-2,05	318-288-227-199-119-103	nd	nd
Hamayna	2,30-2,42	288-270-244-226-196-181-153	2,74 (Katoch,2012)	288, 270, 226, 196, 181, 153
Zaideina	2,86-2,94	318-287-268-227-199-167-141	3,52 (Katoch,2012)	318, 287, 268, 258, 239, 199, 167
Ambellina	3,02-3,06	332-300-264-239-225-195-167	3,74 (Katoch,2012)	332, 300, 282, 264, 225, 195, 167
Hemantamina	3,08-3,10	302-270-252-226-211-196-181-153	3,95 (Katoch,2012)	302, 270, 226, 211, 181, 153
			3,31 (Rivera,2015)	302, 270, 252, 226, 211, 196, 181
Vitattina	3,15-3,18	272-254-226-196-149-118	4,12 (Katoch,2012)	272, 254, 226, 196, 149, 118
			3,30 (Rivera,2015)	272, 254, 226, 196, 155
Desconocido 8	3,27-3,28	298-136-118-109	nd	nd
Desconocido 5	4,30-4,32	336-290-261-257-233-225-167	nd	nd
Desconocido 6	4,44-4,48	320-292-260-245	4,80 (Rivera,2015)	320, 292, 260

Desconocido 9	5,3-5,5	374-313-270-253- 195-177-149-134- 117	nd	nd
---------------	---------	---	----	----

Los resultados sugieren la producción de licorina, licoramina, hamayna, zaideina, ambellina, hemantamina y vitattina en los tejidos analizados, y de nueve alcaloides desconocidos, los cuales no se pudieron identificar dado que no han sido reportados previamente en otros estudios (Cuadro 10, Desconocido 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9).

Los tejidos obtenidos por vía organogénesis presentaron el mayor número y diversidad de alcaloides, catorce en total, mientras que los callos mostraron un máximo de dos alcaloides indistintamente del origen del explante, a partir de bulbos del invernadero o de bulbillos *in vitro* (Cuadro 11). Las hojas y bulbillos presentan el mismo patrón de producción de alcaloides, excepto en dos alcaloides que es producido en un tipo de tejido y no en el otro, y viceversa, estos son los alcaloides Desconocido 7 y Desconocido 9 (Cuadro 11). Es importante resaltar que el alcaloide Desconocido 3 fue el único que se presentó en todos los tejidos, y que el alcaloide Desconocido 8 solo se produjo en los callos embriogénicos a partir de explantes del invernadero (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Alcaloides encontrados en cada tipo de tejido vegetal analizado. H: hojas; B: bulbillos; CF: callo friable; CE: callo embriogénico.

Alcaloide	Explantos de bulbos de invernadero				Explantos de bulbillos <i>in vitro</i>		Propiedades farmacológicas reportadas (Kornienko et al., 2008) (Cahlikova et al., 2011)
	H	B	CF	CE	CF	CE	
Desconocido 1							nd
Desconocido 2							nd
Desconocido 3							nd
Desconocido 4							nd
Desconocido 5							nd
Desconocido 6							nd
Desconocido 7							nd
Desconocido 8							nd
Desconocido 9							nd
Licorina							Antineoplásica, antiviral, antimalárica, antibacteriana, antiinflamatoria, inhibición de enzimas y supresión de la biosíntesis del ácido ascórbico.

Licoramina							Antineoplásicas, antivirales, antimaláricas, antibacterianas, antiinflamatorias, e inhibición de la acetilcolinesterasa
Hamayna							Antineoplásicas, antivirales, antimaláricas, antibacterianas, antiinflamatorias, e inhibición de la acetilcolinesterasa
Zaideina							No reportada
Ambellina							No reportada
Hemantamina							Antineoplásicas, antivirales, antimaláricas, antibacterianas, antiinflamatorias, e inhibición de la acetilcolinesterasa
Vitattina							Antineoplásicas, antivirales, antimaláricas, antibacterianas, antiinflamatorias, e inhibición de la acetilcolinesterasa

### 2.5.5 Cuantificación de alcaloides.

La producción de alcaloides totales en los tejidos obtenidos por vía organogénesis indicó que ésta fue 1,2 veces mayor en los bulbillos que en las hojas. En los bulbillos se encontró una concentración total de alcaloides de 0,13% p/p con un error estándar de 0,012%; mientras que las hojas presentaron una concentración de 0,11 % p/p de alcaloides totales con un error estándar de 0,006, esto quiere decir que la estimación de la concentración total de alcaloides en estos materiales es representativa y precisa para los tratamientos realizados, y a su vez el método utilizado es reproducible (Cuadro 12).

La evaluación de la producción de alcaloides totales en tejidos obtenidos por vía embriogénesis sugirió que no hay diferencias significativas entre la producción obtenida en callos embriogénicos y friables (Cuadro 12), pero que en general, la producción de alcaloides fue aproximadamente tres veces o el doble en los tejidos obtenidos a partir de explantes de bulbos del invernadero, en comparación con los tejidos obtenidos de bulbillos *in vitro*. Los callos friables y embriogénicos provenientes de bulbos del invernadero presentaron una concentración de alcaloides totales de 0,0059% p/p y 0,0047% p/p respectivamente, mientras que los generados a partir de bulbillos *in vitro* mostraron una concentración de 0,0022% y 0,0027% y de alcaloides respectivamente (Cuadro 12). Adicionalmente, es importante destacar, que la producción total de alcaloides obtenida en tejidos producidos vía organogénesis fue aproximadamente 30 veces mayor respecto a la producción en callos embriogénicos o friables, indistintamente del origen del explante, a partir de escamas de bulbos del invernadero o de bulbillos *in vitro*. La menor concentración de alcaloides totales detectada en todos estos experimentos fue 0.0007% p/p correspondiente al alcaloide Desconocido 8, el cual fue producido

solamente en los callos embriogénicos a partir de escamas de bulbos del invernadero (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Concentraciones (%p/p) de todos los alcaloides detectados en los diferentes tejidos analizados

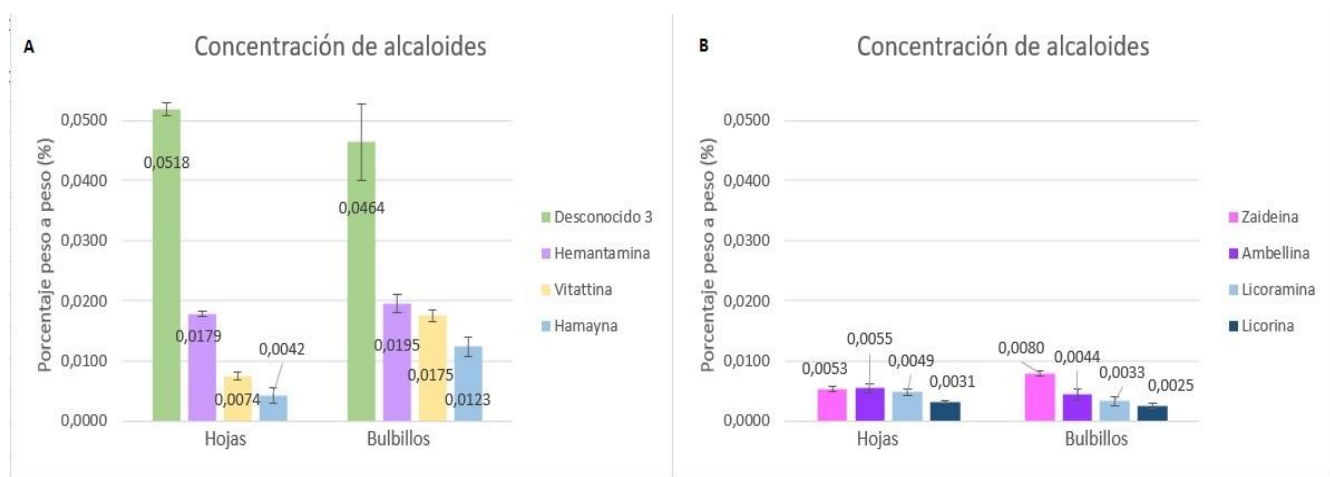
Alcaloide	Explantos de bulbos de invernadero						Explantos de bulbillos <i>in vitro</i>	
	H	% del Total	B	% del Total	CF	CE	CF	CE
<b>Desconocido 3</b>	0,0518	44,6	0,0464	33,9	0,0034	0,0040	0,0022	0,0027
<b>Hemantamina</b>	0,0179	15,4	0,0195	14,3				
<b>Vitattina</b>	0,0074	6,4	0,0175	12,8				
<b>Hamayna</b>	0,0042	3,6	0,0123	9,0				
<b>Zaideina</b>	0,0053	4,6	0,0080	5,9				
<b>Ambellina</b>	0,0055	4,7	0,0044	3,2				
<b>Licoramina</b>	0,0049	4,2	0,0033	2,4				
<b>Licorina</b>	0,0031	2,7	0,0025	1,8				
<b>Desconocido 1</b>	0,0025	2,1	0,0035	2,6				
<b>Desconocido 2</b>	0,0056	4,8	0,0019	1,4				
<b>Desconocido 4</b>	0,0037	3,2	0,0046	3,4				
<b>Desconocido 5</b>	0,0016	1,4	0,0049	3,6				
<b>Desconocido 6</b>	0,0014	1,2	0,0052	3,8				
<b>Desconocido 7</b>			0,0025	1,8				
<b>Desconocido 8</b>						0,0007		
<b>Desconocido 9</b>	0,0012	1,0			0,0025			
<b>Total</b>	0,11	100,0	0,13	100,0	0,0059	0,0047	0,0022	0,0027

**H:** hojas, **B:** bulbillos, **CF:** callo friable, **CE:** callo embriogénico.

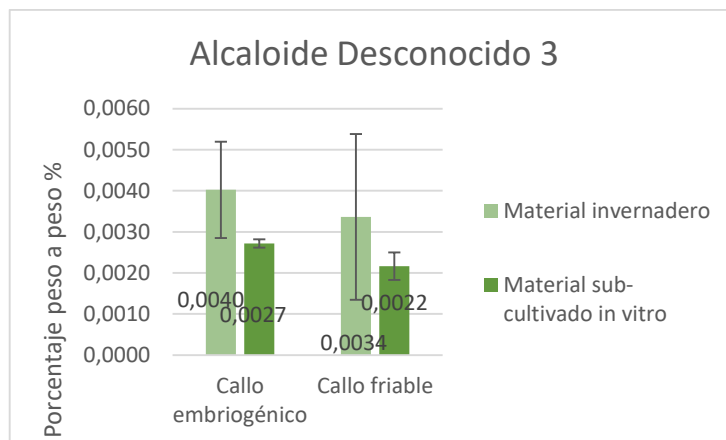
Después de realizar la respectiva identificación de los 16 alcaloides detectados en los tejidos analizados, se procedió a comparar la producción de los 8 alcaloides más representativos, es decir, los alcaloides identificados con base a otros estudios en amarilidáceas y el Desconocido 3, alcaloides presentes en todas las muestras analizadas (Figuras 18 y 19). En la Figura 18 se muestran los alcaloides de mayor concentración (A) y los de menor concentración (B), presentes en los tejidos obtenidos por organogénesis (Cuadro 11). No se observan grandes diferencias en el perfil y concentraciones de alcaloides producidos en las hojas y bulbillos, y con excepción del Desconocido 3 en los bulbillos, los otros alcaloides

muestran poca variación entre los diferentes experimentos analizados indicado por el bajo error estándar obtenido en cada caso (Figura 18). En general, más del 70% de la producción de alcaloides obtenidos por organogénesis son a partir de 4 alcaloides, que ordenados en orden de mayor a menor concentración son los siguientes: Desconocido 3, Hemantamina, Vatina, y Hamayna (Figura 18 y Cuadro 11). El Desconocido 3 es el de mayor concentración para ambos tipos de tejidos, hojas y bulbillos (Figura 18). Este alcaloide representa el 47.6% de la producción de alcaloides en hojas y el 35.6% de alcaloides en bulbillos (Cuadro 11).

El alcaloide Desconocido 3 fue también el alcaloide más representativo, obtenido por embriogénesis somática (callos embriogénicos y callos friables) (Figura 19). Las concentraciones obtenidas del alcaloide Desconocido 3 fueron 1.5 veces mayor en los callos embriogénicos y friables provenientes a partir de explantes de bulbos del invernadero respecto a los obtenidos a partir de los bulbillos *in vitro* (Cuadro 11). Sin embargo, estos tejidos presentaron una gran variación entre experimentos (ver barras de error), mientras que las concentraciones halladas para los callos embriogénicos y friables a partir de bulbillos *in vitro* fueron menos variables (Figura 19). La menor concentración detectada en todos estos experimentos fue 0.0007% p/p correspondiente al alcaloide Desconocido 8, el cual fue producido solamente en los callos embriogénicos a partir de escamas de bulbos del invernadero (Cuadro 11).



**Figura 18.** Comparación de los diferentes alcaloides detectados en los tejidos obtenidos vía organogénesis, hojas y bulbillos inducidos *in vitro*. (A) Alcaloides de mayor concentración, (B) alcaloides de menor concentración.



**Figura 19.** Concentración del alcaloide Desconocido 3 detectada en los callos friables y embriogénicos inducidos a partir de la parte apical o de la placa basal de escamas de bulbos del invernadero o de bulbillos producidos *in vitro*.

## 2.6 Discusión

En este trabajo de grado, se describen los procedimientos y metodologías aptas para inducir callos embriogénicos, e identificar y cuantificar la producción de alcaloides en la especie *Zephyranthes carinata* a partir de tejidos obtenidos por vía organogénesis y embriogénesis *in vitro*. Este trabajo constituye el primer estudio en estos temas para esta especie.

Para el cultivo *in vitro* vía organogénesis, se indujeron 130 bulbillos en medio MSA1 a partir de 84 twin-scales de bulbos de invernadero de la especie *Zephyranthes carinata*. El porcentaje promedio de respuesta de los 4 experimentos fue de 152,8%, es decir que cada twin-scale generó 1,5 bulbillos por explante. Estos resultados son similares a los reportados en otros estudios de amarilidáceas. En el estudio con la especie *Brunsvigia undulata* perteneciente a las Amaryllidaceae (Rice et al., 2011), reportaron que por cada explante de twin-scale se generaban 1,7 bulbillos. En el proyecto de grado de Daniel Chamorro, realizado en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Icesi con la especie *Zephyranthes carinata*, se encontró que cada explante de twin-scale inducido en medio MSA1, generó 1,2 bulbillos (Chamorro, 2016). En el laboratorio de Biotecnología Vegetal, se ha evidenciado que se pueden producir de 1 hasta 4 bulbillos por twin-scale *in vitro*. Esta variación se cree que puede ser producto de las condiciones ambientales variables del invernadero, y en particular dependientes de la época del año en el que se recolectan los bulbos, las cuales pueden afectar la capacidad de respuesta a la micro propagación del material y su capacidad de proliferar nuevos bulbillos (Zaida Lentini PhD, 2017, Directora del



Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Icesi, comunicación personal). En general el peso seco total de las hojas producidas a partir de los 130 bulbillos inducidos *in vitro* fue de 712,2 mg, y el de bulbillos fue de 2.091,3 mg, es decir, que en promedio los bulbillos producen 2.94 veces más material vegetal que las hojas. Las hojas tienen un alto contenido de agua en comparación con los bulbillos, razón por la cual el de peso seco es menor en hojas que en los bulbillos; los bulbillos son más compactos. En el trabajo de grado de (Chamorro, 2016) se reportó que las hojas y bulbillos inducidos *in vitro* tienen un mayor peso seco a medida que aumenta el tiempo de sub-cultivo (2, 3 a 4 meses). Es decir, que el incremento en peso seco es producto del crecimiento de los tejidos en medio MS, a través del tiempo. También se reportó que el peso seco de los bulbillos fue aumentando a medida que se incrementaba la concentración de sacarosa (0, 3, 6, 9, 15%), en contraste con las hojas, cuyos pesos fueron disminuyendo a medida que aumentó el porcentaje de sacarosa en el medio de cultivo, ya que el crecimiento de las hojas disminuyó en forma significativa. Estas diferencias son de esperar, dado que los bulbos son órganos de reservas en las plantas.

La embriogénesis somática se ha estudiado en diferentes especies de la familia *Amaryllidaceae* como en *Crinum x powellii* (Niño et al., 2010), *Leucojum aestivum* (Ptak et al., 2013), *Narcissus papyraceus* (Anbari et al., 2007), *Narcissus confusus* (Selles et al., 1999), *Eucharis grandiflora*, *Hippeastrum hybridum*, *Crinum asiaticum* (Mujib et al., 2013), entre otras, pero hasta el momento no se había evaluado esta respuesta en la especie *Zephyranthes carinata*. Gracias al semillero de investigación de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi, se evaluaron previamente a la ejecución de este proyecto de grado, varios de los diferentes medios reportados en esas investigaciones mencionadas anteriormente, y a partir de éstas, se modificó un medio de cultivo, denominado medio MSES3, para inducir la formación de callos embriogénicos en la especie *Zephyranthes carinata*, (Geraldine Restrepo, 2016, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Icesi, comunicación personal). El medio de cultivo MSES3 usado en el presente trabajo de grado, es un medio basal MS (Murasghige y Skoog, 1962), complementado con los reguladores de crecimiento kinetina (0,4mg/L), y (2,4 dicloro-fenoxiacético (0,4mg/L). Este medio de cultivo es resultado de los primeros experimentos en embriogénesis somática con esta especie en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi. Al comparar este medio con los otros reportados en otras especies de amarilidáceas, se observa que el MSES3 tiene niveles más bajos de reguladores de crecimiento. Entre los primeros estudios publicados en embriogénesis somática en amarilidáceas se encuentran los del grupo de Selles (Selles et al., 1999), el cual reportó que, en la especie *Narcissus confusus*, la mayor inducción de callos se obtuvo con 2 o 4 mg/L de 2,4-D, o 4 mg/L de picloram. Niño y colaboradores en la Universidad Tecnológica de Pereira reportó que, en la especie *Crinum x powellii*, el medio de cultivo MS suplementado con 4 mg/L de picloram induce la mayor proliferación de callos friables, y los mejores callos nodulares crecieron en los medios MS complementados con 2 y 4 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Niño et al., 2005). Posteriormente

este grupo de investigación optimizó la inducción de callo friable para esta misma especie *Crinum x powellii* (Niño et al., 2010), en medio MS suplementado con el ácido 1 mg/L 2,4-D y de 1.0 a 1.5 mg/L de kinetina, callos friables que luego fueron subcultivados para la inducción de los embriones somáticos, optimizada al utilizar 0.4 mg/L de 2,4-D y 0.4 mg/L de kinetina, los embriones somáticos inducidos se proliferaron en medio MS libre de hormonas y después de su desecación, se transfirieron al medio MS con ácido giberélico para su maduración y conversión a plantas. En otras investigaciones realizadas en la especie *Narcissus papyraceus* (Anbari et al., 2007), encontraron que el medio de cultivo más óptimo para la generación de embriones somáticos fue el medio MS complementado con 0.5 mg/l GA<sub>3</sub> (ácido giberélico), 1.6 mg/l BAP y 1.6 mg/l 2.4-D. En el estudio de la especie *Leucojum aestivum* (Ptak et al., 2013) encontraron que la mayor proliferación de callos y embriones somáticos se obtuvo al usar 11 mg/L 2,4-D y 0,1mg/L de BAP en el medio MS. Al hacer la comparación de los diferentes reguladores de crecimiento usados en los otros estudios descritos anteriormente, con el medio MSES3 utilizado en el presente estudio, se concluye que es importante evaluar otras combinaciones de reguladores de crecimiento y concentraciones superiores a las utilizadas en el medio MSES3, con el objetivo de optimizar la inducción de embriogénesis somática en *Zephyranthes carinata*.

A las 4 semanas de la inducción de embriogénesis somática, entre 84% y 100% de los explantes mostraron formación de callos de todo tipo, se observó que los explantes de la parte apical de la escama de bulbos de invernadero y bulbillos sub-cultivados *in vitro*, seguían formando callos friables, mientras que los de la placa basal adicionalmente comenzaron a inducir la formación de callos pre-embriogénicos y callos embriogénicos. La mayor inducción de callos embriogénicos (61%), se registró durante el segundo mes de cultivo, es decir después de 4 a 8 semanas a partir de explantes de la placa basal obtenidos de bulbos del invernadero. En los estudios mencionados de las otras especies, fue común encontrar que la inducción de callos se generaba entre 3 y 8 semanas, la obtención de callos embriogénicos entre 6 y 16 semanas, y el desarrollo de embriones somáticos entre 12 y 22 semanas, dependiendo de la especie y del medio de cultivo probado en cada estudio. En este proyecto de grado a las dos semanas de cultivo, se observó la formación de callos friables en todos los dos tipos de explantes, tanto en la parte apical como en la placa basal de las escamas obtenidas a partir de bulbos del invernadero o bulbillos inducidos *in vitro*. En el caso de *Crinum x powellii* (Niño et al., 2010), se reportó que en el primer mes obtuvo un 34% de formación de callos friables, y a los 41 días hubo un 80% de formación de callos embriogénicos. En el estudio con la especie *Leucojum aestivum* (Ptak et al., 2013) se reportó que a las 6 semanas se observó formación de callos, y a las 8 semanas formación de callos embriogénicos. Los registros fotográficos publicados para las otras especies, que documentan la apariencia de los diferentes tipos de callos y estadios de desarrollo, coinciden con los en este proyecto. Los callos friables se caracterizan por tener una apariencia traslúcida y con alto contenido de agua, mientras que los callos embriogénicos muestran en la

mayoría de los casos una apariencia compacta nodular de color amarillo. Al comparar los resultados del presente estudio con los reportados por otros autores, se puede decir que la especie *Zephyranthes carinata* muestra una respuesta mucho más rápida en la formación de callos friables, del 90% al 100% en las primeras 4 semanas de cultivo, que las otras especies de amarilidáceas. Sin embargo, el mayor nivel registrado de inducción de embriogénesis fue del 61% a las 8 semanas. Estos resultados sugieren que hay un gran potencial para optimizar a futuro el nivel de embriogénesis en *Zephyranthes*.

En general el tamaño de los callos embriogénicos fue mayor que el de los callos friables, y el de los callos inducidos a partir de bulbos del invernadero fueron de mayor tamaño que los obtenidos a partir de bulbillos *in vitro*. Las placas basales de las escamas mostraron una mayor respuesta en comparación con la parte apical de las escamas. Las placas basales de escamas obtenidas a partir de bulbos del invernadero mostraron el doble de inducción de callos embriogénicos desde el primer mes de cultivo respecto a la placa basal de bulbillos *in vitro*, y esta diferencia se duplicó al segundo mes de cultivo. De los reportes encontrados, este trabajo es pionero en la evaluación de la respuesta a partir de escamas de bulbillos inducidos *in vitro*. Este tratamiento se eligió debido a que en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi y en el proyecto de grado de (Chamorro, 2016) se evidenció que los explantes de bulbillos inducidos *in vitro* usados para la formación de nuevos bulbillos, tiene una respuesta mucho más rápida que los explantes de bulbos de invernadero. En nuestro estudio, aunque el porcentaje de respuesta para la formación de cualquier tipo de callo fue más alto en las escamas obtenidas a partir de bulbillos inducidos *in vitro*, solo el 27,2% generó callo embriogénico, en comparación con los callos embriogénicos generados de explantes de bulbos de invernadero, cuyo porcentaje fue de 60,9%. Una razón para explicar la respuesta más baja en cuanto a la formación de callos embriogénicos de los explantes de bulbillos sub-cultivados *in vitro*, es que los bulbillos utilizados tenían aproximadamente 7 meses de edad; en el trabajo de grado de (Chamorro, 2016) se evidenció que los explantes de bulbillos sub-cultivados *in vitro* con 2 meses de edad tenían una respuesta mucho más elevada que los bulbillos que tenían más edad. A futuro se podría evaluar la respuesta de embriogénesis somática utilizando bulbillos *in vitro* más jóvenes, dado que Chamorro (2016) encontró que la inducción de bulbillos a partir de escamas de material inducido *in vitro* es mayor que a partir de explantes de bulbos del invernadero. Una posible explicación del por qué los explantes de la placa basal mostraron la mayor respuesta, es porque en general la placa basal es rica en células totipotentes.

Las diferencias observadas en cuanto al nivel de respuesta vía organogénesis o embriogénesis, también se reflejaron en la producción de materia seca. El peso seco total de las hojas producidas a partir de los 130 bulbillos inducidos *in vitro* fue de un total de 712,2 mg (5,5 mg / bulbillos), y el de bulbillos fue de un total de 2.091,3 mg (16 mg/ bulbilllo), es decir, que en promedio los bulbillos producen casi

tres veces más materia seca que las hojas. Los callos embriogénicos generados por explantes de bulbos de invernadero generan 4 veces más cantidad de peso seco (19.3 mg/explante) que los callos embriogénicos formados a partir de explantes de bulbillos *in vitro* (4.7 mg/explante). Esta misma tendencia se vio para los callos friables generados por explantes de bulbos de invernadero (12.9 mg/explante), los cuales generan 2 veces más la cantidad de peso seco que los callos friables formados a partir de explantes de bulbillos *in vitro* (5.6 mg/explante). Es interesante resaltar, que cuando se compara la producción de materia seca por explante, la mayor eficiencia de producción se obtuvo en los callos embriogénicos (19 mg de peso seco /explante) seguido por el de bulbillos (16 mg peso seco/ bulbillito), el de callo friable (12.9 mg/explante), y el de hojas (5,5 mg / bulbillos), todos generados a partir de escamas de bulbos del invernadero, y finalmente el de callos friables (5.6 mg/explante) o embriogénicos (4.7 mg/ explante) formados ambos a partir de escamas de bulbillos *in vitro*. Los resultados obtenidos en este proyecto son similares aunque ligeramente mayores (1,3 veces) a los reportados por (Chamorro, 2016), donde el promedio de peso seco de los bulbillos fue de 12,8 mg7bulbillo y el de las hojas de 3,3 mg/bulbillo. Las condiciones ambientales de los bulbos de invernadero, afectan la respuesta de los explantes, razón por la cual puede que haya diferencia en los pesos secos de bulbillos obtenidos en el presente proyecto y en el de (Chamorro, 2016), ya que el material de invernadero se recolectó en junio, julio y agosto para el presente trabajo y el de (Chamorro, 2016) se recolectó en diciembre y enero.

La producción de alcaloides en los tejidos obtenidos por vía organogénesis indicó que ésta fue 1,2 veces mayor en los bulbillos que en las hojas. En los bulbillos se encontró una concentración total de alcaloides de 0,13% p/p (peso a peso) con un error estándar de 0,01%; mientras que las hojas presentaron una concentración de 0,11 % p/p de alcaloides totales con un error estándar de 0,006%, esto quiere decir que la estimación de la concentración total de alcaloides en estos materiales es representativa y precisa para los tratamientos realizados, y a su vez el método utilizado es reproducible. Estos valores son similares a los reportados por Niño et al., 2007, donde encontraron una concentración de 0,12% p/p para 3 alcaloides en bulbos de la especie *Crinum x powellii* recolectados del herbario de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia) (Niño et al., 2007). En el estudio de (El Tahchy et al., 2011) infieren que la producción de alcaloides en los tejidos vegetales está influenciada por las concentraciones de sacarosa y reguladores de crecimiento en el medio de cultivo utilizado. En dicho estudio probaron la influencia de la sacarosa en diferentes concentraciones (3, 6, 9 y 12%), y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento como 6-BA, ANA, 2,4-D y picloramo, los cuales afectaron el nivel de organogénesis (desarrollo de bulbos y raíces) y la acumulación de alcaloides en las especies evaluadas (*Narcissus pseudonarcissus*, *Galanthus elwesii*, y *Leucojum aestivum*). En ese estudio la mayor concentración de alcaloides fue de galantamina de 0.02% a 0.1% p/p dependiendo de la especie y el tratamiento (El Tahchy et al., 2011). Por otra parte, en ensayos preliminares desarrollados en el semillero de investigación de Biotecnología Vegetal de la

Universidad Icesi, se encontró que en las hojas de la especie *Zephyranthes carinata* cultivada en el invernadero presenta una concentración de 0,01% p/p de alcaloides totales (Geraldine Restrepo, 2016, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Icesi, comunicación personal). Es decir, que la concentración del material *in vitro* obtenido por organogénesis en este proyecto de grado produce 10 veces más alcaloides que su contraparte del invernadero. En el proyecto de grado de Daniel Chamorro (Chamorro, 2016), se recolectaron muestras secas de hojas y bulbillos de la especie *Zephyranthes carinata* obtenidos por organogénesis en medio MSA1 con diferentes concentraciones de sacarosa. Estas muestras fueron analizadas posteriormente por el semillero de investigación de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi, utilizando las mismas condiciones para la determinación de alcaloides descritas para UPLC/MS en la metodología de la presente investigación. En las muestras analizadas del proyecto de Chamorro (2016), se encontró que los bulbillos formados en medio MSA1 con un 3% de sacarosa y cultivados en el mismo medio por 2 meses, presentan una concentración de alcaloides de 0,04% p/p en la hojas y 0,08% p/p en los bulbillos. En el presente proyecto de grado se usó igualmente el medio MSA1 con 3% de sacarosa pero solo por un mes, en lugar de dos meses como en el caso de Chamorro (2016), y como se mencionó anteriormente la concentración de alcaloides fue de 0,11% p/p para hojas y 0,13% p/p para bulbillos, es decir, en este trabajo se obtiene aproximadamente el doble del contenido de alcaloides respecto a las muestras de Chamorro (2016). Esto concuerda con lo encontrado por el semillero de Biotecnología Vegetal de la Universidad Icesi, ya que en el proyecto de grado de (Chamorro, 2016) también se evaluó el efecto del tiempo del subcultivo en medio MS (por 2, 3 y 4 meses) de los bulbillos una vez generados en medio MSA1 en la producción de alcaloides, este análisis concluyó que a mayor el tiempo de subcultivo en el medio MS de los bulbillos inducidos en MSA1, menor es la concentración de alcaloides presentes en hojas y bulbillos (Geraldine Restrepo, 2016, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Icesi, comunicación personal) donde se encontró que a los 3 meses de inducción en medio MS, se generó 0,04% p/p de alcaloides totales en bulbillos y 0,03% p/p en hojas, y en 4 meses se obtuvo 0,02% p/p en bulbillos y 0,02% en hojas. Algo interesante que se observó en las muestras secas de (Chamorro, 2016), fue que a medida que aumentó la concentración de sacarosa en medio MS (2 meses), se produjo 0,19% p/p de alcaloides en hojas mientras que en los bulbillos fue de 0,01% p/p de alcaloides totales (15% de sacarosa), es decir que aumentó la producción de alcaloides totales en las hojas mientras que disminuyó en bulbillos. También se observó que al inducir los bulbillos en medio MS con 9% de sacarosa, se obtuvo una concentración de 0,004% en bulbillos y 0,089% en hojas, dato interesante dado que con 12% de sacarosa la concentración en hojas disminuyó a 0,048% y en bulbillos aumento a 0,017% (Geraldine Restrepo, 2016, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Icesi, comunicación personal). Por todo lo anterior es preciso indicar que aparentemente el tiempo óptimo para la extracción de alcaloides es después de 1 mes de crecimiento y desarrollo de los bulbillos en medio MS, como se hizo en el presente proyecto de grado, pero la concentración

de sacarosa puede influir positivamente en la producción de alcaloides en hojas (Geraldine Restrepo, 2016, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Icesi, comunicación personal). Según lo reportado en este trabajo, por la vía de organogénesis se puede aumentar de diez a trece veces la producción de alcaloides en *Zephyranthes carinata* respecto a las plantas del invernadero de la Universidad Icesi; las cuales producen alrededor de 0,01% p/p de alcaloides totales en hojas de invernadero en contraste a 0,11% p/p de alcaloides totales en hojas o 0.13% p/p en bulbillos obtenidos *in vitro*.

La evaluación de la producción de alcaloides en tejidos obtenidos por vía embriogénesis sugirió que no hay diferencias significativas entre la producción obtenida en callos embriogénicos y friables, pero que en general, la producción de alcaloides fue aproximadamente el doble en los tejidos obtenidos a partir de explantes de bulbos del invernadero, en comparación con los tejidos obtenidos de bulbillos *in vitro*. Los callos friables y embriogénicos provenientes de bulbos del invernadero presentaron una concentración de alcaloides de 0,0042% p/p y 0,0041% p/p respectivamente, mientras que los generados a partir de bulbillos *in vitro* mostraron una concentración de 0,0027% p/p y 0,0022% p/p de alcaloides en callos friables y embriogénicos, respectivamente. Sin embargo, la variación entre experimentos con el material del invernadero es significativamente mayor, y en particular a partir de callo friable, como lo sugiere el mayor valor de error estándar obtenido en estos casos. Adicionalmente, es importante destacar, que la producción total de alcaloides obtenida en tejidos producidos vía organogénesis fue aproximadamente 30 veces mayor respecto a la producción en callos embriogénicos o friables, indistintamente del origen del explante, a partir de escamas de bulbos del invernadero o de bulbillos *in vitro*. Otro factor importante a discutir, es que los explantes de invernadero tuvieron una mayor variación en la producción de alcaloides, en comparación con la variación de los explantes *in vitro* que fue mínima. Una razón para esta variación se debe a que los bulbos de invernadero se encuentran en condiciones ambientales más variables en cuanto a temperatura, humedad, lluvia, y exposición al sol, en comparación con las condiciones *in vitro* las cuales son totalmente controladas y los bulbillos ya se han adaptado totalmente a estas condiciones, mientras que los bulbos de invernadero se encuentran en constante cambio ambiental. Se ha encontrado que las condiciones ambientales tales como temperatura, humedad relativa, radiación solar, fotoperiodo, disponibilidad de agua y nutrientes, entre otras, pueden influenciar en el desarrollo de las plantas y así mismo en la producción de sus metabolitos secundarios como los alcaloides, los cuales se generan mayormente en situaciones de estrés (Taiz & Zeiger, 2006). Las condiciones *in vitro* permiten el control de estas variables ambientales y nutrición de las plantas, el proceso *in vitro*, es de hecho un estrés (El Tahchy et al., 2011) que podría favorecer la producción de alcaloides o facilitar la optimización de las condiciones con este fin, razón por la cual el material *in vitro* producido por organogénesis y embriogénesis somática en este proyecto, incrementó la producción de alcaloides en comparación con material vegetal de invernadero.

En el estudio de (Ptak et al., 2013) donde trabajaron con la especie *Leucojum aestivum* encontraron producción de alcaloides en los callos generados al usar 5 mg/L y 11 mg/L de 2,4-D y 0.1 mg/L de BAP en el medio de cultivo por 8 semanas de inducción, y 8 semanas de proliferación de los callos embriogénicos en el mismo medio pero no reportan la concentración de alcaloides encontrados (Licorina y Galantamina), solo reportan la presencia de los mismos. En la especie *Narcissus confusus* se realizó un estudio (Selles et al., 1999) de la producción de alcaloides en los diferentes estadios callos, callos no diferenciados y callos embriogénicos que se obtuvieron de explantes de semillas. Para los callos embriogénicos se realizó la evaluación de alcaloides después de 8 semanas de inducción en el medio utilizado (2 a 4 mg/L de 2,4-D, o 4 mg/L de picloramo) y hallaron una concentración de 0,53 µg/g de peso seco de alcaloides, es decir 0,00053% peso a peso que corresponden a 4 alcaloides evaluados en ese estudio. En otro estudio (Niño et al., 2005) donde la especie analizada fue *Crinum x powellii*, encontraron que los callos friables generados por 3 meses en el medio de cultivo que usaron también complementado con 2,4-D y picloramo a concentraciones de 1 y 4 mg/L respectivamente, produjeron una concentración de alcaloides de 0,002 a 0,003% del alcaloide Licorina en porcentaje peso a peso. Todo lo anteriormente reportado, concuerda con lo que se afirma en el estudio de (Toivonen et al., 1991), que la producción de los metabolitos secundarios, por lo general es baja e inestable en callos y suspensiones celulares, comparado con las hojas, bulbos, y raíces que son capaces de acumular una cantidad considerable de ellos, lo cual se refleja por su alta capacidad biosintética y destaca el hecho de que la producción de fitocompuestos está relacionada con el grado de organización de los tejidos vegetales. Por esto, ha sido evidente en este estudio, que los bulbillos y las hojas producen mayor concentración de alcaloides que los callos embriogénicos y friables. Aun así, la especie *Zephyranthes carinata*, tiene mayor producción de alcaloides en sus tejidos obtenidos por embriogénesis en comparación a los reportado en otras especies.

Después de realizar la cuantificación total de alcaloides presentes en los tejidos obtenidos de *Zephyranthes carinata*, se identificaron 16 alcaloides. Los resultados sugieren la producción de licorina, licoramina, hamayna, zaideina, ambellina, hemantamina y vitattina en los tejidos analizados, y de nueve alcaloides desconocidos, los cuales no se pudieron identificar dado que no han sido reportados previamente en otros estudios. Los tiempos de retención y las fragmentaciones m/z de las moléculas alcaloidales del presente estudio son muy similares a las de otras investigaciones utilizadas como referencia en este trabajo (Katoch et al., 2012)(Rivera, 2015). Hay cierta variación en los tiempos de retención, pero esto se le atribuye a las condiciones en las que se trabajó el UPLC/MS en cada estudio, las cuales fueron muy parecidas entre sí, mas no idénticas; por ejemplo los porcentajes de la fase móvil en el equipo, detalles que tienen efecto en el tiempo de retención. Sin embargo, las fragmentaciones en relación masa/carga (m/z) reportadas en los espectros de masas son idénticas, lo que da alta confiabilidad a la identificación de los alcaloides. Los alcaloides

nombrados como Desconocido 1, 2, 3, 4, 5, y 6, también fueron encontrados en el proyecto de grado de Daniela Alizandre titulado “*Evaluación del efecto inductor del Metil Jasmonato y el Ácido Jasmonico en la liberación de alcaloides producidos in vitro en la especie Zephyranthes carinata*” el cual fue realizado en tiempo paralelo al presente proyecto. El alcaloide desconocido 6, Licoramina, Hemantamina y Vitattina, fueron reportados por (Rivera, 2015) en su proyecto de grado basado en la especie *Zephyranthes glandiflora*. Estos proyectos de grado se realizaron en la Universidad Icesi. En hojas se encontraron 14 alcaloides, al igual que en los bulbillos, en callos embriogénicos y friables de explantes de bulbos de invernadero 2 alcaloides, y en los callos embriogénicos y friables de explantes de bulbillos *in vitro*, 1 alcaloide. Hubo mayor diversidad de alcaloides en los tejidos formados por organogénesis, en comparación con los tejidos formados por embriogénesis somática. Las hojas y bulbillos presentan el mismo patrón de producción de alcaloides, excepto en dos alcaloides que es producido en un tipo de tejido y no en el otro, y viceversa, estos son los alcaloides Desconocido 7 y Desconocido 9. Es importante resaltar que el alcaloide Desconocido 3 fue el único que se presentó en todos los tejidos, y que el alcaloide Desconocido 8 solo se produjo en los callos embriogénicos a partir de explantes del invernadero.

No se observan grandes diferencias en el perfil y concentraciones de alcaloides producidos en las hojas y bulbillos, y con excepción del Desconocido 3 en los bulbillos, los otros alcaloides muestran poca variación entre los diferentes experimentos analizados indicado por el bajo error estándar obtenido en cada caso. En general, más del 70% de la producción de alcaloides obtenidos por organogénesis son a partir de 4 alcaloides, que ordenados en orden de mayor a menor concentración son los siguientes: Desconocido 3, Hemantamina, Vitattina, y Hamayna. El Desconocido 3 es el de mayor concentración para ambos tipos de tejidos, hojas y bulbillos. Este alcaloide representa el 44.6% de la producción de alcaloides en hojas y el 33.9% de alcaloides en bulbillos. El alcaloide Desconocido 3 fue también el alcaloide más representativo, obtenido por embriogénesis somática (callos embriogénicos y callos friables). Las concentraciones obtenidas del alcaloide Desconocido 3 fueron 1.5 veces mayor en los callos embriogénicos y friables provenientes a partir de explantes de bulbos del invernadero respecto a los obtenidos a partir de los bulbillos *in vitro*. Sin embargo, estos tejidos presentaron una gran variación entre experimentos (ver barras de error), mientras que las concentraciones halladas para los callos embriogénicos y friables a partir de bulbillos *in vitro* fueron menos variables. La menor concentración detectada en todos estos experimentos fue 0.0007% p/p correspondiente al alcaloide Desconocido 8, el cual fue producido solamente en los callos embriogénicos a partir de escamas de bulbos del invernadero, dato interesante que puede ser investigado a mayor profundidad en futuros estudios en embriogénesis somática en *Zephyranthes carinata*.

De los alcaloides identificados, uno de los más importantes es la licorina, dado que cuenta con actividad farmacológica antineoplásica, antiviral, antimalárica,



antibacteriana, antiinflamatoria, inhibición de enzimas y supresión de la biosíntesis del ácido ascórbico (Cao et al., 2013). En el presente estudio, en muestras de hojas se encontró 0,0031% de licorina y en bulbillos 0,0025%. En el estudio de (Bogdanova et al., 2009) donde trabajaron con la especie *Pancratium maritimum*, detectaron una concentración de 0,0029% de Licorina en la planta *in vitro* completa (bulbillos y hojas ). En otro estudio de (Ptak et al., 2009), encontró presencia de licorina en callos de la especie *Leucojum aestivum* en un 0,001% y en bulbos de invernadero 0,01%. En el estudio de (Niño et al., 2007) donde utilizaron bulbos de invernadero de la especie *Crinum x powellii*, encontraron una concentración de licorina de 0,1%. Al comparar los estudios mencionados con este estudio, en cuanto a la producción del alcaloide licorina, se puede decir que tanto en hojas y bulbillos *in vitro* se produjo una alta concentración de este alcaloide, en comparación con otros tejidos *in vitro* donde usaron la planta de *Pancratium maritimum* en su totalidad para poder obtener 0,0029% de licorina, en contraste con *Zephyranthes carinata* donde se encontró 0,006% (sumando la concentración de licorina en bulbos y hojas *in vitro*). Se puede decir que *Zephyranthes carinata* produce el doble de concentración de licorina en sus tejidos, en comparación con *Pancratium maritimum*, y hasta 6 veces más comparándola con callos de la especie *Leucojum aestivum*.

Otros alcaloides detectados en este estudio, fueron la vitattina y la hemantamina, los cuales se caracterizan por tener actividad antiinflamatoria, antimalárica y antibacterial. La hemantamina se detectó tanto en hojas y bulbillos *in vitro*; la concentración encontrada fue de 0,0179% y 0,0195% respectivamente. En el estudio de (Gotti et al., 2006) utilizaron bulbos de invernadero de la especie *Narcissus pseudonarcissus*, hallaron 0,00031% de hemantamina. Al hacer la comparación de la concentración de este alcaloide hallada en bulbillos *in vitro* de *Zephyranthes carinata*, dicha concentración fue 62 veces mayor que en bulbos de invernadero de la especie *Narcissus pseudonarcissus*. Esto es un buen indicio de que el cultivo *in vitro* si aumenta la producción de alcaloides en los tejidos de la familia *Amaryllidaceae*. En un estudio donde se trabajó con semillas de *Narcissus confusus* (Selles et al., 1999), para la inducción de callos embriogénicos, se encontró una concentración de hemantamina de 0,0001% en dicho tejido, en ese mismo estudio, se encontró una cantidad total de concentración en 4 alcaloides de 0,0005%.

Los callos embriogénicos de *Zephyranthes carinata* generados en el presente estudio produjeron de 5 a 8 veces más contenido de alcaloides totales respecto a los callos friables, aunque no se lograron identificar los alcaloides y se nombraron como Desconocido 3, 8 y 9. Otros alcaloides identificados como la hamayna y licoramina también poseen actividades farmacológicas antineoplásicas, antivirales, antimaláricas, antibacterianas, antiinflamatorias, e inhibición de la acetilcolinesterasa (Katoch et al., 2012). También se encontraron la ambellina y la zaideina. El alcaloide Desconocido 3 se presentó en todos los tejidos analizados y obtenidos por Organogénesis y Embriogénesis Somática. Fue el alcaloide más

abundante en cuanto a la concentración, en comparación con los otros alcaloides identificados, donde su mayor contenido se halló en 0,0518% en hojas, seguido de 0,0464% en bulbillos, y de 0,0022% a 0,0040% en callos friables y embriogénicos provenientes de material de invernadero e *in vitro*.

En el artículo de (Katoch et al., 2012), identificaron 20 alcaloides en bulbos de *Zephyranthes glandiflora* presentes en un herbario en la India, donde 3 fueron desconocidos, 17 identificados con nombre propio, los cuales 7 de ellos se encontraron en el presente estudio en *Zephyranthes carinata* y nueve resultaron desconocidos. Puede ser posible que el género *Zephyranthes* tenga mayor variedad de alcaloides en comparación con otros géneros, donde la variedad de alcaloides encontrados ha sido menor, como se mencionó en los anteriores estudios reportados por otros autores. Otro factor interesante encontrado en el artículo de (Katoch et al., 2012), es que recolectaron los bulbos en las 4 diferentes estaciones del año, y comprobaron que la producción de alcaloides varía en los bulbos dependiendo de la época del año; en el mes de agosto donde el clima estuvo lluvioso y altas temperaturas de verano, hubo la mayor producción de alcaloides.

Finalmente, con base a los resultados obtenidos se puede indicar que la organogénesis es por ahora la mejor vía de cultivo *in vitro* para la producción de alcaloides en *Zephyranthes carinata*, cuyos alcaloides se encuentran mayormente en bulbillos. Existe producción de alcaloides en tejidos de *Zephyranthes carinata* obtenidos por embriogénesis somática, como callos embriogénicos y callos friables, aunque es significativamente menor respecto a organogénesis. Estos resultados promisorios son interesantes, es una buena señal para seguir optimizando la embriogénesis somática en esta especie, que pueda dar paso a un escalamiento de producción de alcaloides en medios líquidos, condiciones ideales para la extracción de los mismos. El alcaloide Desconocido 3, se presentó en todas las muestras analizadas, sería interesante lograr realizar una identificación de dicho alcaloide por medio de otras técnicas analíticas utilizadas para la elucidación de estructuras químicas como IR, RMNC, RMNH, entre otras, al igual que la identificación del alcaloide Desconocido 8, el cual solo se presentó en los callos embriogénicos provenientes de explantes de bulbos de invernadero. La especie *Zephyranthes carinata*, nativa de México, Colombia y Centro América, y objeto de este estudio, tiene una mayor diversidad de alcaloides en sus tejidos en comparación con otros estudios de *Amaryllidaceae* nativas de otros continentes.

## 2.7 Conclusiones

1. En Organogénesis, se obtuvo una respuesta de de 1 a 2 bulbillos de *Zephyranthes carinata* por explante de twin-scales inducido. Los bulbillos

tuvieron una mayor producción de materia seca (% de peso seco) en comparación con sus hojas.

2. Los bulbillos contienen 1.2 veces más concentración de alcaloides totales en sus tejidos (0,1303% p/p), en comparación con las hojas (0,1089% p/p).
3. Se observó la formación de callos friables, pre-embriogénicos y embriogénicos a partir de las escamas cultivadas *in vitro*. Los callos friables se caracterizaron por su apariencia traslucida y alto contenido de agua. Los callos pre-embriogénicos, fueron de color amarillo y con apariencia gelatinosa, mientras que los callos embriogénicos se caracterizaron por su coloración amarilla, formación de estructuras organizadas y compactas con menos contenido de agua.
4. La mayor formación de callos embriogénicos (Embriogénesis Somática) se obtuvo a partir de la parte basal de las escamas de bulbos del invernadero (61%) respecto a la placa basal de bulbillos *in vitro* (27%) en segundo mes de cultivo, es decir después de 4 a 8 semanas.
5. La mayor eficiencia de producción en materia seca se obtuvo en los callos embriogénicos (19 mg de peso seco /explante) seguido por el de bulbillos (16 mg peso seco/ bulbillo), el de callo friable (12.9 mg/explante), y el de hojas (5,5 mg / bulbillos), todos generados a partir de explantes de bulbos del invernadero, y finalmente el de callos friable (5.6 mg/explante) o embriogénicos (4.7 mg/ explante) formados ambos a partir de escamas de bulbillos *in vitro*.
6. La técnica analítica UPLC/MS permitió la lectura de todas las muestras obtenidas por las dos rutas de cultivo *in vitro* empleadas, esto permitió la cuantificación e identificación de los alcaloides detectados. La concentración más baja detectada fue en el alcaloide Desconocido 8 con un valor de 0.0007 % p/p en callos embriogénicos obtenidos a partir de explantes del invernadero.
7. Se identificaron 16 alcaloides presentes en *Zephyranthes carinata*. Los resultados sugieren la producción de licorina, licoramina, hamayna, zaideina, ambellina, hemantamina y vitattina en los tejidos analizados, y de nueve alcaloides desconocidos, los cuales no se pudieron identificar dado que no han sido reportados previamente en otros estudios.
8. Los tejidos obtenidos por vía organogénesis presentaron el mayor número y diversidad de alcaloides, catorce en total, mientras que los callos mostraron un máximo de dos alcaloides indistintamente del origen del explante, a partir de bulbos del invernadero o de bulbillos *in vitro*.

9. La vía organogénesis genero aproximadamente 30 veces más contenido de alcaloides en sus tejidos (0.11% a 0.13% p/p), que los tejidos formados por embriogénesis (0.002% a 0.006% p/p).
10. En general, más del 70% de la producción de alcaloides obtenidos por organogénesis son a partir de 4 alcaloides, que ordenados en orden de mayor a menor concentración son los siguientes: Desconocido 3, hemantamina, vitattina, y hamayna.
11. El Desconocido 3 es el de mayor concentración para ambos tipos de tejidos, hojas y bulbillos. Este alcaloide representa el 47.6% de la producción de alcaloides en hojas y el 35.6% de alcaloides en bulbillos. El alcaloide Desconocido 3 fue también el alcaloide más representativo, obtenido por embriogénesis somática (callos embriogénicos y callos friables).
12. La menor concentración detectada en todos estos experimentos fue 0.0007% p/p correspondiente al alcaloide Desconocido 8, el cual fue producido específicamente en los callos embriogénicos a partir de escamas de bulbos del invernadero.
13. La especie *Zephyranthes carinata* tiene una mayor diversidad en la producción de alcaloides en sus tejidos en comparación con otras especies estudiadas por otros autores.
14. Los métodos utilizados en este proyecto de grado son reproducibles, ya que hubo poca variación en los experimentos probados, las muestras fueron representativas, y los resultados obtenidos tienen un error estándar muy bajo, lo que aumenta la precisión de los datos hallados.

## 2.8 Recomendaciones

Para la evaluación de la producción de alcaloides en tejidos obtenidos por organogénesis, se recomienda tomar muestras de bulbillos formados de explantes inducidos por 2 meses en medio MSA1, sin sub-cultivarlos en medio MS, para hacer la comparación de la producción de alcaloides en estos bulbillos, con los que se se subcultivan en medio MS, y establecer cuál de los dos tratamientos da una mayor producción de alcaloides.

Para la extracción de alcaloides de callos friables y embriogénicos, probar una mayor cantidad de material seco de los mismos, para determinar si se encuentran más alcaloides que no pudieron ser detectados por UPLC/MS. En este proyecto,

se empleó de 100 a 200 mg de peso seco de los callos. Es posible que la cantidad de 100 a 200mg sea óptima para la cuantificación de alcaloides en bulbillos y hojas, pero no sea la adecuada para los callos embriogénicos y friables.

Para la inducción de callos embriogénicos a partir de explantes de bulbillos subcultivados *in vitro*, se sugiere extraer los explantes de bulbillos de menor edad (2 meses), ya que a medida que pasa el tiempo, los bulbillos pierden su capacidad totipotente, y por esta razón puede que la respuesta en formación de callos embriogénicos a partir de explantes de bulbillos *in vitro* usados en el presente proyecto, haya sido menor, dado que los bulbillos tenían 7 meses de edad aproximadamente.

Para la inducción de embriones somáticos a partir de los callos embriogénicos, se recomienda sub-cultivar los callos friables y embriogénicos en medio MSES3 fresco, cada mes, por 3 meses, en cuyo tiempo es posible que se observen formación de embriones, los cuales tienen capacidad de proliferar masivamente.

En este proyecto solo se hizo la inducción por 2 meses, por lo cual no se llegó a embriones somáticos. Una vez obtenidos los embriones somáticos, someterlos a medio de cultivo líquido, con los inductores químicos (metil jasmonato y ácido jasmónico) que uso la estudiante Daniela Alizandre en su proyecto de grado, el cual evaluó la capacidad de estos inductores en fomentar la liberación de alcaloides de los tejidos vegetales al medio de cultivo líquido, ya que la respuesta fue positiva. Esto permitiría la simulación de un biorreactor, el cual es ideal para la producción a gran de escala de alcaloides, sin necesidad de extraer los alcaloides del material vegetal seco, si no del medio de cultivo líquido.

Evaluar diferentes reguladores de crecimiento y otras condiciones ambientales, para la proliferación de callos embriogénicos que puedan ser sub-cultivados en medios líquidos, y para incrementar la producción de alcaloides en callos embriogénicos inducidos a partir de escamas de bulbos del invernadero.

### 3 Bibliografía

- Ammirato, P. V. (1983). The Regulation of Somatic Embryo Development in Plant Cell Cultures: Suspension Culture Techniques and Hormone Requirements. *Bio/Technology*, 1(1), 68–73.
- Anbari, S., Tohidfar, M., Hosseini, R., & Haddad, R. (2007). Somatic embryogenesis Induction in *Narcissus papyraceus* cv. Shirazi. *Plant Tissue Cult. & Biotech*, 17(1), 37–46.
- Arango, G. (2002). *Alcaloides y Compuestos Nitrogenados*. Medellín.
- Bach, A., & Sochacki, D. (2012). Propagation of Ornamental Geophytes, Physiology and Management Systems. In R. Kamenetsky & H. Okubo (Eds.), *Ornamental Geophytes: From Basic Science to Sustainable Production* (pp. 261–278).
- Bastida, J., Lavilla, R., & Viladomat, F. (2006). Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. *Elsevier Inc*, 87–179.
- Belén Pigni, N. (2013). *Biodiversidad y Conservación de Recursos Fitogenéticos. Las Amarillidáceas como Fuente de Productos Bioactivos*. Universidad de Barcelona.
- Bogdanova, Y., Pandova, B., Yanev, S., & Stanilova, M. (2009). Biosynthesis of Lycorine by in Vitro Cultures of *Pancreaticum Maritimum* L. (Amaryllidaceae). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(sup1), 919–922.
- Cahlikova, L., Valterova, I., Macakova, K., & Opletal, L. (2011). Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Bras. Farmacogn*, 21, 575–580.
- Cao, Z., Yang, P., & Zhou, Q. (2013). Multiple biological functions and pharmacological effects of lycorine. *Science China-Chemistry*, 10(56), 1382–1391.
- Chamorro, D. (2016). *Optimización de la condiciones in vitro para la producción de alcaloides a partir de plántulas de Zephyranthes carinata (Amaryllidaceae)*. Icesi.
- Cortes, N., Posada-Duque, R. A., Alvarez, R., Alzate, F., Berkov, S., Cardona-Gómez, G. P., & Osorio, E. (2015). Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: a comparative study. *Life Sciences*, 122, 42–50.
- Edmonds, C., Sethi, S., Yamaizumi, Z., Kasai, H., Nishimura, S., & McCloskey, J. (1986). Analysis of mutagens from cooked foods by directly combined liquid chromatography-mass spectrometry. *Environ Health Perspect*, 67, 35–40.
- El Tahchy, A., Bordage, S., Ptak, A., Dupire, F., Barre, E., Guillou, C., ... Laurain-Mattar, D. (2011). Effects of sucrose and plant growth regulators on acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids accumulated in shoot cultures of Amaryllidaceae. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(3), 381–390.
- Gotti, R., Fiori, J., Bartolini, M., & Cavrini, V. (2006). Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus* by GC-MS and capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42(1), 17–24.

- Jiménez, V. M. (2001). Regulation of in vitro somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13(2), 196–223.
- Jin, Z. (2013). Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural Product Reports*, 24(6).
- Katoch, D., Kumar, S., Kumar, N., & Singh, B. (2012). Simultaneous quantification of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by UPLC-DAD/ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 71, 187–192.
- Kornienko, A., & Evidente, A. (2008). Chemistry, biology and medicinal potential of Narciclasine and its congener. *Chem*, 108, 1982–2014.
- Liu, Z.-M., Huang, X.-Y., Cui, M.-R., Zhang, X.-D., Chen, Z., Yang, B.-S., & Zhao, X.-K. (2015). Amaryllidaceae alkaloids from the bulbs of *Lycoris radiata* with cytotoxic and anti-inflammatory activities. *Fitoterapia*, 101, 188–93.
- Mujib, A., Banerjee, S., Maqsood, M., & Ghosh, P. (2013). Somatic Embryogenesis of Some Member Ornamental Genera of Amaryllidaceae and Allied Families: the Similarities and Differences. *The Open Horticulture Journal*, 6, 9–18.
- Niño, J., Correa, Y., Mosquera, O., & Ramirez, L. (2005). CUANTIFICACION DE LICORINA EN CALLOS Y RAICES CULTIVADOS IN-VITRO DE *Crinum x powellii* "album" ( Amaryllidaceae ) POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA ( HPLC ). *Scientia et Technica*, (29), 83–88.
- Niño, J., Hincapié, G. M., Correa, Y. M., & Mosquera, O. M. (2007). Alkaloids of *Crinum x powellii* "Album" (Amaryllidaceae) and their topoisomerase inhibitory activity. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 62(3-4), 223–226.
- Niño, J., Rios, A., Bedoya, C., & Mosquera, O. (2010). INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DE BULBOS DE *Crinum x powellii* " ALBUM " ( AMARYLLIDACEAE ). *Scientia et Technica*, (46), 6.
- Peralta, L. (2014). *CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS VEGETALES DE PLANTAS DEL GÉNERO ZEPHYRANTHES Y EVALUACIÓN DE SU PRODUCCIÓN DE ALCALOIDES*. Universidad Icesi.
- Ptak, A., El Tahchy, A., Dupire, F., Boisbrun, M., Henry, M., Chapleur, Y., ... Laurain-Mattar, D. (2009). LCMS and GCMS for the screening of alkaloids in natural and in vitro extracts of *Leucojum aestivum*. *Journal of Natural Products*, 72(1), 142–147.
- Ptak, A., Tahchy, A., Skrzypek, E., Wójtowicz, T., & Laurain-Mattar, D. (2013). Influence of auxins on somatic embryogenesis and alkaloid accumulation in *Leucojum aestivum* callus. *Central European Journal of Biology*, 8(6), 591–599.
- Ramos, J. (2001). *AUPEC: agencia universitaria de periodismo científico. Bosques que Luchan por Sobrevivir*. Cali.
- Restrepo, G. (2014). *Semillero de Investigación de Biotecnología Vegetal*. Santiago de Cali.
- Reyes, J. (2014). *CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS VEGETALES DE PLANTAS DE LA FAMILIA AMARYLLIDACEAE*. Universidad Icesi.

- Rice, L. J., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2011). In vitro bulblet production of *Brunsvigia undulata* from twin-scales. *South African Journal of Botany*, 77(2), 305–312.
- Rivera, C. M. (2015). *Creación de una Biblioteca Espectral de Alcaloides de Amaryllidaceae*. Icesi.
- Rosales, S. (2006). *Conservación de especies vegetales mexicanas por cultivo de tejidos*. Mexico.
- Selles, M., Viladomat, F., Bastida, J., & Codina, C. (1999). Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confusus*: Correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids. *Plant Cell Reports*, 18(7-8), 646–651.
- Skoog, D., Holler, J., & Crouch, S. (2007). Cromatografía de Líquidos. In *Principios de Análisis Instrumental* (6th ed., pp. 816–817).
- Stevens, P. (2012). Angiosperm Phylogeny Website.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology* (4th ed.). Sinauer Associates.
- Thieman, W., & Palladino, M. (2010). Introducción a La Biotecnología. In *Introducción a la Biotecnología* (2nd ed., pp. 156–158).
- Toivonen, L., Ojala, M., & Kuppinen, V. (1991). Studies on the optimization of growth and indole alkaloids production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol Bioeng*, 37, 673–680.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3).
- Williams, E. (1989). Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group. *Annals of Botany*, 57, 443–462.