



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS *IN VITRO* DE ALBAHACA  
(*OCIMUM BASILICUM*) PARA LA PRODUCCIÓN DE ACEITE  
ESENCIAL”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO  
DE QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**JUAN RANGEL OSORIO**

**ASESOR ACADÉMICO  
DR. JUAN OROZCO VILLAFUERTE**

**ASESOR ADJUNTO  
Dr. JULIÁN CRUZ OLIVARES**

**ASESOR EXTERNO  
Dra. LETICIA BUENDÍA GONZÁLEZ**

**MARZO 2014**





Toluca, México, 17 de enero de 2014

**P. Q. en A. JUAN RANGEL OSORIO**  
FACULTAD DE QUÍMICA, UAEM  
P R E S E N T E

La Dirección de la Facultad de Química de la UAEM, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación Profesional, en la modalidad **TESIS**, estará formado por:

QUÍM. JESÚS CASTILLÓN JARDÓN  
**PRESIDENTE**

M. en C. FELIPE CUENCA MENDOZA  
**VOCAL**

Dr. JUAN OROZCO VILLAFUERTE  
**SECRETARIO**

Dr. JULIÁN CRUZ OLIVARES  
**SUPLENTE**

Sin más por el momento le envío un respetuoso saludo.

ATENTAMENTE  
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO  
"2014, 70 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM"

M. en A. P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARÍA GONZÁLEZ  
DIRECTORA



C.c.p. Archivo

Índice	
Índice de Tablas .....	5
Índice de Figuras .....	6
Resumen .....	7
Introducción .....	8
Antecedentes .....	11
1. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales .....	11
1.1 <i>Organización del laboratorio</i> .....	11
2 Control preventivo de la contaminación microbiana .....	14
2.1 <i>Desinfección</i> .....	15
2.2 <i>Preparación del explante</i> .....	15
2.3. <i>Procedimiento de esterilización</i> .....	16
2.4. <i>Limpieza de los recipientes de vidrio</i> .....	17
3. Medios de cultivo .....	17
3.1. <i>Elementos nutritivos esenciales para el crecimiento vegetal</i> .....	18
3.2. <i>Auxinas, citocininas y otros reguladores de crecimiento</i> .....	20
3.3. <i>Auxinas</i> .....	20
3.4. <i>Citocininas y sustancias similares</i> .....	21
3.5. <i>Gliberelinas</i> .....	22
3.6 <i>Inhibidores</i> .....	22
3.7 <i>El pH y otras condiciones de cultivo</i> .....	23
4. Cultivo de tejidos vegetales .....	23
4.1. <i>Micropropagación</i> .....	24
4. 2. <i>Pasos en la Micropropagación</i> .....	25
4. 2. 3. <i>Enraizamiento de los brotes y preparación para trasplante</i> .....	29
4. 3. Factores que influyen en la micropropagación.....	29
4. 4. Micropropagación de especies herbáceas .....	31
4. 5. <i>Obtención de aceites esenciales de cultivos in vitro</i> .....	33
5. Extracción .....	35
5. 1. <i>Secado</i> .....	35
5. 2. <i>Extracción con Soxhlet</i> .....	38
5. 3. <i>Extracción con FSC</i> .....	39
6. La Albahaca .....	40
Justificación.....	45
Hipótesis.....	47
Objetivo General .....	47
Objetivos particulares.....	47
7. Metodología .....	48

7. 1. Establecimiento de cultivos asépticos de semillas de albahaca ( <i>Ocimum basilicum</i> ).....	49
7. 1. 2. Desinfestación de tejidos.....	49
7. 1. 3. Preparación del medio de cultivo.....	50
7. 1. 4. Establecimiento del cultivo.....	51
7. 2. Micropropagación de explantes de Albahaca ( <i>Ocimum basilicum</i> ).....	52
7. 2. 1. Organogénesis directa.....	53
7. 3. Extracción.....	54
7. 3. 1. Secado.....	54
7. 3. 2. Determinación de extracto etéreo libre o materia grasa. Método de Soxhlet.....	55
8. Resultados y Discusiones.....	57
8.1. Establecimiento del cultivo.....	57
8. 1. 1. Brotes adventicios.....	60
8. 1. 2. Crecimiento de Callo.....	64
8. 1. 3. Rizogénesis.....	68
8. 1. 4. Crecimiento del tallo.....	72
8. 1. 5. Oxidación.....	74
8. 2. Organogénesis directa.....	78
8. 3. Extracción.....	79
8. 3. 1. Secado.....	79
8. 3. 2. Determinación del extracto etéreo de albahaca por el método de Soxhlet.....	81
Conclusiones.....	85
Sugerencias.....	86
Referencias Bibliográficas.....	88
Anexo 1. Preparación de soluciones Stock.....	92
Anexo 2. Análisis de Variancia aplicado durante el desarrollo del experimento.....	94

## Índice de Tablas

Tabla 1. Elementos Nutritivos Ordenados de acuerdo con sus características químicas.....	19
La tabla 2 muestra algunos ejemplos de aceites esenciales producido a través del cultivo de tejidos vegetales.....	34
Tabla 3. Concentración de reguladores de crecimiento utilizados para la micropropagación de <i>Ocimum basilicum</i> .....	53
Tabla 4. Desarrollo de brotes adventicios durante la micropropagación de Albahaca Grande Verde.....	62
Tabla 5. Desarrollo de brotes adventicios durante la micropropagación de Albahaca Fina Verde.....	63
Tabla 6. Crecimiento de Callo durante la micropropagación de Albahaca Grande Verde.....	66
Tabla 7. Crecimiento de Callo durante la micropropagación de Albahaca Fina Verde.....	67
Tabla 8. Producción de explantes de callo obtenidos de los tratamientos aplicados durante la micropropagación de la albahaca.....	68
Tabla 9. Rizogénesis durante la micropropagación de Albahaca Grande Verde. .	70
Tabla 10. Rizogénesis durante la micropropagación de Albahaca Fina Verde. ....	71
Tabla 11. Crecimiento del tallo durante la micropropagación de Albahaca Grande Verde.....	73
Tabla 12. Crecimiento del tallo durante la micropropagación de Albahaca Fina Verde.....	74
Tabla 13. Oxidación de explantes de Albahaca Grande Verde subcultivados In vitro. ....	76
Tabla 14. Oxidación de explantes de Albahaca Fina Verde subcultivados In vitro. ....	77
Tabla 15. Porcentaje de humedad en plantas y callos de albahaca propagada in vitro. ....	79
Tabla 16. Porcentaje de extracto etéreo contenido en Plantas y Callos de Albahaca ( <i>Ocimum basilicum</i> ).....	83
Tabla 17. Composición de la solución de macronutrientes MSx10. ....	92
Tabla 18. Composición de la solución de micronutrientes MSx100. ....	93
Tabla 19. Composición de la solución de vitaminas y myo-inositol MSx200.....	94

## Índice de Figuras

Figura 1 Estructura molecular de las principales auxinas (Reinert, 1982).....	21
Figura 2. Estructura molecular de las principales citocininas (Reinert, 1982). .....	22
Figura 3 Esquema representativo de la Micropropagación. ....	25
Figura 4. Curva de secado. (Ibarz y Barbosa, 2005).....	36
Figura 5 Plantas de <i>Ocimum basilicum</i> (albahaca). ....	41
Figura 6. Componentes mayoritarios presentes el aceite esencial de albahaca. ...	42
Figura 7. Compuestos fenólicos y flavonoides de la albahaca. ....	42
Figura 8. Procedimiento general para el proceso de obtención de aceite esencial de Albahaca micropropagada in vitro. ....	48
Figura 9. Sobres de semillas de Albahaca Grande Verde.....	49
Figura 10. Sobres de semillas de Albahaca Fina Verde.....	49
Figura 11. Purifier class II biosafety cabinet.....	51
Figura 12. Incubación de cultivos in vitro. ....	58
Figura 13. Callogénesis de explantes de Albahaca Grande Verde .....	65
Figura 14. Callogénesis en explante de Albahaca Fina Verde.....	65
Figura 15 Rizogénesis en explantes de Albahaca Grande Verde. ....	69
Figura 16. Rizogénesis en explantes de Albahaca Verde Fina. ....	69
Figura 17. Crecimiento del tallo en cultivos in vitro de Albahaca Grande Verde. .	72
Figura 18. Crecimiento del tallo en cultivos in vitro de Albahaca Fina Verde. ....	72
Figura 19. Formación de Brotes Adventicios en explantes de Albahaca Grande Verde.....	61
Figura 20. Formación de Brotes Adventicios en explantes de Albahaca Fina Verde. ....	61
Figura 21. Oxidación de explantes de Albahaca. ....	75
Figura 22. Curva de Secado de plantas Albahaca Grande Verde.....	80
Figura 23. Curva de secado de callos de Albahaca Grande verde. ....	80
Figura 24. Curva de secado de plantas de Albahaca Fina Verde. ....	80
Figura 25. Curva de Secado de callos de Albahaca Fina Verde. ....	81
Figura 26. Extracción de compuestos solubles en éter por el método de Soxhlet. 82	

## Resumen

El presente trabajo tuvo como uno de sus objetivos el producir aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum*) a partir de cultivos *in vitro* de dicha especie.

Se germinaron semillas de albahaca en medio de cultivo semisólido MS, los cultivos se incubaron a 25° C con iluminación fluorescente bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Una vez desarrolladas las plantas se seleccionaron aquellas que mostraron mejor crecimiento. Los cultivos seleccionados fueron utilizados como fuente de explantes nodales con fines de micropropagación. Se probaron dos diferentes reguladores del crecimiento vegetal para este fin, ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP), en concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L, completando al final 24 tratamientos diferentes.

Los resultados obtenidos indican que el medio de cultivo suplementado con 1.0 mg/L de ANA y 0.5 mg/L de BAP favorecen de una manera significativamente importante el fenómeno de organogénesis en los explantes nodales de albahaca.

Las plantas de albahaca micropropagadas se retiraron del medio de cultivo y se sometieron a un proceso de secado en estufa a 35°C hasta eliminar la humedad contenida en las mismas, posteriormente la biomasa seca se molió en un mortero, inmediatamente después se realizó una extracción para obtener el aceite esencial contenida en la biomasa, esto por el método soxhlet. Lográndose obtener un extracto etéreo tanto de tejidos desdiferenciados de callo como en las plantas micropropagadas.

## Introducción

La biotecnología se define en términos generales como el uso de seres vivos, sus procesos o sus partes para la obtención de bienes y/o servicios, y ofrece soluciones reales a los grandes retos a los que nos enfrentamos en la actualidad, tanto en el sector salud como en el agropecuario (Castillo, 2004).

Por medio de la biotecnología agrícola se están desarrollando nuevos productos para obtener alimentos que otorguen un beneficio directo al consumidor: alimentos con más vitaminas y minerales, que resistan mejor al transporte y almacenamiento, estos productos ofrecen a los agricultores mayor rentabilidad al producir más alimentos en menor superficie, al mismo tiempo que protegen los recursos naturales como la tierra, el agua y los bosques. También, ha permitido obtener plantas tolerantes a herbicidas, resistentes a insectos y enfermedades, así como plantas que pueden sobrevivir mejor a suelos secos o salinos (García y Munguía, 2004).

La micropropagación constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura, ya que se usa en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales (Mangold, 1987).

La propagación de plantas *in vitro* es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica. Permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, embriones y obtener individuos selectos en forma rápida. Los cultivos son realizados por en medios específicos y condiciones ambientales controladas (temperatura, humedad y luz). Una vez ajustados los parámetros para la especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso de modo de llevarlo a mayor escala de producción (García y Munguía, 2004).

Entre las ventajas de la micropropagación se pueden mencionar:

- Posibilita incrementar rápidamente nuevos materiales.

- Permite controlar las condiciones ambientales, debido a su independencia de los mismos (luz, temperatura y humedad controlada).
- Permite estudiar diversos procesos fisiológicos.
- Evita el riesgo de contaminación con patógenos, ya que se realiza en medios esterilizados.
- Se pueden obtener gran cantidad de individuos en espacios reducidos.
- Permite la obtención de individuos uniformes.
- Facilita el transporte del material.

Uno de los aspectos más importantes en la producción de plantas medicinales es alcanzar altos rendimientos de material vegetal y elevados contenidos de principios activos, lo que depende de factores internos de la planta, así como son aquellos relacionados con el adecuado crecimiento de la especie y con el clima que las rodea (Evans, Sharp, Ammirato y Yamada, 1983).

La albahaca (*Ocimum basilicum* L.) es una planta originaria de Asia Meridional, que pertenece a la familia de las Lamiaceae y tiene amplios y variados usos debido a sus múltiples propiedades. Es de las especies de plantas medicinales aromáticas que tiene un alto contenido de aceites esenciales, sobre todo de eugenol, de amplio uso en la medicina (Sacchetti, 2004).

En la edad media se encontraba la albahaca entre las plantas medicinales mágicas, ya que por su contenido en aceites esenciales, taninos, glucósidos y saponinas la hacían muy efectiva en el tratamiento de los trastornos gástricos, respiratorios y urinarios. Además, posee propiedades anti-inflamatorias y antisépticas, por lo que se emplea en la cura de diferentes enfermedades; también en la industria alimenticia se usa como añadido aromático y condimento, además en perfumería y cosmetología (Lachowicz, 1997).

La albahaca contiene compuestos fenólicos y flavonoides por ejemplo: el ácido cinámico, el ácido cafeico, ácido sinapico y ácido ferulico. Estos compuestos son antioxidantes potentes, limpiadores de radicales libres, y agentes quelantes (Sacchetti, 2004)

Mediante la aplicación de la biotecnología vegetal se pretende establecer cultivos in vitro de plantas de albahaca de las variedades hoja ancha y hoja fina, seleccionar de estas plantas las que presenten mejor desarrollo para extraer explantes con las mismas características genéticas y viabilidad para producir nuevos brotes adventicios continuar con su multiplicación masiva.

El objetivo de esta investigación consiste en demostrar la capacidad de las plantas de *Ocimum basilicum* propagadas in vitro, para sintetizar el aceite esencial y otros metabolitos secundarios de interés, así como determinar los requerimientos nutricionales y hormonales necesarios para regenerar plantas enteras a partir de explantes.

## **Antecedentes**

### 1. Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos, como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido. Es necesario además adoptar procedimientos de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana (Castillo, 2004).

Por otra parte, la investigación en cultivo de tejidos puede cubrir un amplio rango de actividades: por ejemplo, desde los procesos bioquímicos y morfológicos de la diferenciación celular, hasta la que realizan aquellos laboratorios que se dedican a la investigación aplicada y al desarrollo de tecnologías para utilizar esta investigación en la propagación clonal, o en el mejoramiento genético de plantas (Thorpe, 1981).

El laboratorio de cultivo de tejidos debe disponer de un área destinada al establecimiento, crecimiento y multiplicación de las plantas producidas; Finalmente, la decisión de establecer un laboratorio de cultivo de tejidos requiere de un estudio y análisis crítico acerca de la necesidad de hacerlo, dentro de un contexto integral del desarrollo de la investigación y la producción agrícola o forestal de una región o país (Marassi, 1991).

Teniendo en cuenta estos conceptos y la relatividad de cualquier diseño o recomendación para el establecimiento de un laboratorio de cultivo de tejidos, a continuación se presenta una descripción general de lo que puede ser dicho laboratorio y de las necesidades de equipos y otros suministros de carácter estándar; por último, se presenta una breve discusión sobre diferentes métodos para prevenir la contaminación microbiana de los cultivos.

#### 1.1 Organización del laboratorio

Un laboratorio de cultivo de tejidos se puede dividir esquemáticamente en áreas separadas para las diferentes funciones. Las áreas principales son:

Área de preparación. Se utiliza principalmente para preparar los medios de cultivo, debe proveer también espacio para almacenar los materiales de vidrio y de plástico, y los reactivos químicos. Este ambiente debe contar con mesas de trabajo para la preparación de los medios y para colocar las balanzas, el medidor de pH, las placas de calentamiento con agitación, y otros elementos; también debe incluir vitrinas, estanterías y espacio para el equipo de refrigeración, y para la incubadora o la cámara de crecimiento (Roca et. al. 1991).

Área de lavado y de esterilización: El área de esterilización debe tener espacio para la autoclave, estufas, secadores y lavaderos. Esta área debe disponer de un espacio para almacenar agua destilada en botellas de plástico; también debe proveer basureros adecuados para el material vegetal, inorgánico y de vidrio que se desecha (Bonga, 1982).

Área de cultivo de tejidos. En esta área del laboratorio se realiza el trabajo de escisión, inoculación y de transferencia de los explantes a los medios de cultivo. Dado que este trabajo demanda los más altos niveles de limpieza ambiental, se recomienda la instalación de gabinetes de flujo laminar de aire filtrado bajo presión. Deben ubicarse en un lugar alejado de las puertas y con un mínimo de corriente de aire, con el fin de prolongar la vida útil de los filtros (Roca et al. 1991).

Área de incubación. El área de incubación o crecimiento in vitro debe proporcionar un buen control de la temperatura (21 a 23 °C), de la iluminación (1000 a 5000 lux) y de una humedad relativa de entre el 70% y 80% (Castillo, 2004).

En el cuarto de incubación se instalarán estanterías metálicas o de madera para colocar los cultivos. Estas estanterías pueden tener dimensiones variables. Esta área debe incluir un espacio para cultivos en agitación y para cultivos estáticos en oscuridad. Es necesario propiciar una buena distribución del aire en este cuarto para evitar zonas de recalentamiento por efecto de las luces. Cuando se utilizan tubos fluorescentes, es conveniente sacar los balastos fuera de este cuarto.

Área de observación y examen. Generalmente los microscopios se localizan tanto en el área de incubación como en la de transferencia, pero opcionalmente pueden estar en un área separada. El objetivo de esta área es realizar observaciones periódicas de los cultivos, tanto en los medios semisólidos como en líquidos (Mergara, 1988).

Las áreas arriba descritas se pueden considerar como el núcleo del laboratorio de cultivo de tejidos. Los laboratorios de investigación y los de producción deben contar, además, con las siguientes instalaciones:

Área de crecimiento. Las plantas que se regeneran en el área de incubación se pueden acondicionar o aclimatar y luego trasplantar en macetas, bandejas o cajas apropiadas. Las plantas enraizadas, deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz. Estas plantas se plantarán en contenedores (almacigueras) cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada (Castillo, 2004).

Área de cuarentena y de control fitosanitario. Se hace necesario contar con un área para la recepción de las muestras o plantas destinadas a la limpieza, generalmente protegida contra insectos. Esta área de cuarentena debe estar separada del resto del laboratorio pero cercana al área de control fitosanitario (Evans, 1983).

En el área de control fitosanitario se realizan las pruebas necesarias para comprobar la sanidad del material vegetal, especialmente de enfermedades causadas por virus, bacterias y hongos. La mayor o menor complejidad del equipo usado para realizar estas pruebas depende del grado de conocimiento de la patología de la especie y del grado de garantía fitosanitaria que se demanda o de desea ofrecer con el material vegetal (Evans, 1983).

La seguridad física del personal del laboratorio es importante; por esta razón se deben tomar precauciones para ubicar estratégicamente en el laboratorio equipos de primeros auxilios, extintores de incendios y frazadas contra fuego, así como

duchas para baños de cuerpo entero y de los ojos. Lo más indicado es prevenir los accidentes con medidas de seguridad como el uso de compartimientos especiales para almacenar reactivos peligrosos ubicados en el área general de preparación y en otras áreas del laboratorio; la capacitación del personal en las técnicas de manipulación y uso apropiado del equipo, material de vidrio, reactivos y otros elementos es la mejor forma de prevenir accidentes en el laboratorio (Roca et al, 1991).

## 2 Control preventivo de la contaminación microbiana

Uno de los requisitos básicos para el éxito de la técnica de cultivo de tejidos es mantener los cultivos libres de microorganismos. Las siguientes son fuentes de contaminación microbiana y cada uno requiere diversas medidas de prevención:

Los tejidos: Pueden llevar contaminantes en su superficie o en su interior, o en ambas partes. Los que lleva el explante en su superficie se pueden eliminar mediante la desinfección, pero los que se encuentran dentro de los tejidos son difíciles de eliminar. En este último caso puede ser útil la inclusión de fungistáticos en el medio de cultivo; el sulfato de gentamicina, la penicilina y el sulfato de estreptomicina (10 a 50 mg/litro), son algunos de los productos de amplio espectro que pueden usar (Marassi, 1991).

El área de trabajo. Los contaminantes más comunes son aquí las bacterias y las esporas de hongos que habitan en el ambiente. La utilización de cabinas con un sistema de flujo laminar de aire, el cual penetra a través de filtros a prueba de microbios, permite mantener la asepsia durante el trabajo (Castillo, 2004).

Los instrumentos. Los instrumentos de trabajo se deben esterilizar antes de usarlos. Se debe tener en cuenta que los instrumentos inicialmente estériles pueden contaminarse con microbios del aire, de superficies vegetales más desinfectadas, de las manos o de la exhalación del investigador. Lo más aconsejable es trabajar con varios juegos de las mismas herramientas y mantener la asepsia de las que se han usado, colocando los instrumentos en alcohol etílico

al 70% de 2 a 3 minutos, y flameándolos. La exposición excesiva a la llama hace que el material pierda el temple y se oxide (Marassi, 1991).

El exterior de los recipientes de cultivo. Existe la posibilidad de que durante el tiempo transcurrido entre la esterilización de los recipientes con los medios de cultivo y el momento de usarlos, se localicen en su exterior de los tubos; por lo tanto, se debe flamear obligatoriamente la boca de cada tubo antes y después de sembrar el explante (Roca et al, 1991).

El investigador. El investigador es una fuente primaria de contaminadores. El uso de batas de laboratorio, guates limpios y la protección del cabello, la boca y la nariz reducen la contaminación. Es esencial que el investigador se limpie bien las manos y los brazos (lavándolos con agua y jabón y enjuagándolos con alcohol al 70%) antes de iniciar una sesión de trabajo (Castillo, 2004).

### 2.1 Desinfestación **aquí que onda juan, no entiendo este titulo**

La desinfestación es el proceso mediante el cual cualquier material, sitio o superficie se libera completamente de cualquier microorganismo vivo o espora. En terminología médica se utiliza generalmente la palabra asepsia para designar la condición en la que están ausentes los microorganismos patógenos; quienes trabajan en el cultivo de tejidos de plantas utilizan la palabra aséptico como sinónimo de estéril (Thorpe, 1981).

La desinfección se limita al proceso de destrucción de los microorganismos mediante métodos químicos; la esterilización se refiere a menudo al método físico para la destrucción de los microorganismos.

### 2.2 Preparación del explante

Generalmente se considera que los tejidos de las plantas intactas y sanas son asépticos internamente y que la principal tarea de limpieza del material para explantes está limitada a la desinfestación superficial (Reinert, 1982).

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener

estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo, 2004).

La solución de hipoclorito de sodio (NaOCl), en concentraciones de 1% a 3%, es una de las preparaciones más útiles como germinicida y agente oxidante. Sirve para la esterilización de materiales de todo tipo, siempre y cuando no se produzcan lesiones debido a su acción blanqueadora (Thorpe, 1981).

### 2.3. Procedimiento de esterilización

El calor es uno de los agentes que se utiliza con más frecuencia en la esterilización. Se puede usar en forma de llama directa, de calor húmedo (vapor) o calor seco (aire caliente). El vapor bajo presión es muy eficiente para destruir todas las formas de bacterias y hongos y sus esporas, y es el método más utilizado para esterilizar diferentes materiales incluyendo los medios de cultivo siempre y cuando no contengan componentes termolábiles (Roca et al, 1991).

La autoclave más utilizada actualmente en el laboratorio, al utilizarlo, es necesario extraer todo el aire antes de empezar el procedimiento de esterilización ya que, a presiones iguales, la temperatura de una mezcla de aire y vapor no es tan alta como la de vapor puro. La temperatura dentro de la autoclave se regula mediante la presión y es directamente proporcional a ésta; la presión se lee en un manómetro que forma parte de la autoclave.

La siguiente es una guía de presiones variables:

10 lb de presión (115.5 °C) durante 30 minutos

15 lb de presión (121.5 °C) durante 20 minutos

20 lb de presión (126.5 °C) durante 15 minutos

En términos generales, los medios para el cultivo de tejidos de plantas son bastante ricos en componentes que pueden servir de sustento a los microorganismos y existe la posibilidad de que los contaminantes aparezcan durante los intervalos sucesivos (Roca et al, 1991).

#### 2.4. Limpieza de los recipientes de vidrio

La limpieza de los recipientes de vidrio y otros utensilios es de importancia vital en el trabajo de cultivo de tejidos vegetales. Nunca se debe utilizar jabón; cuando sea posible, se deben adoptar detergentes que se laven y enjuaguen fácilmente. Se debe utilizar agua caliente con el detergente, enjuagar luego con agua caliente sola y finalmente con agua destilada (Roca et al, 1991).

### 3. Medios de cultivo

Para crecer, las células requieren una variedad de nutrimentos orgánicos e inorgánicos; estos requerimientos se demuestran fácilmente en órganos y tejidos extirpados de plantas superiores. Los nutrimentos orgánicos, al igual que los inorgánicos, se requieren en dos niveles; uno macro y otro micro. Generalmente, las células en crecimiento tienden a fabricar sus proteínas a partir de fuentes adecuadas de nitrógeno y carbohidratos suministradas en el medio de cultivo; sin embargo, existe además una cantidad de sustancias orgánicas adicionales que se requieren en cantidades mínimas y que son muy activas en el crecimiento (Scott, 1984).

A menudo, la necesidad de los factores orgánicos de crecimiento se hace evidente sólo cuando se considera un crecimiento largo y continuado o potencialmente indefinido. Aunque una planta verde intacta es autótrofa, las células de sus regiones de crecimiento pueden ser acentuadamente heterotróficas y requerir la aplicación de un número de estimulantes orgánicos complejos que, en el caso de la planta intacta, generalmente se derivan de las células verdes (Roca et al, 1991).

La mayor parte de tales tejidos se pueden cultivar exitosamente en un medio que contenga cualquiera de varias mezclas de sales minerales diseñadas para

mantener el crecimiento de tejidos y órganos. Generalmente se utiliza sacarosa como una fuente de energía (Castillo, 2004).

Algunos tejidos se pueden cultivar exitosamente en un medio completamente definido, mientras muchos otros no presentan crecimiento en soluciones salinas relativamente simples, a menos que se complementen con ciertos microelementos, vitaminas y otras sustancias promotoras del crecimiento de naturaleza completamente indefinida, tales como el agua de coco (AC), la caseína hidrolizada (CH), los extractos de levadura, de malta y otros (Reinert et al., 1982).

### 3.1. Elementos nutritivos esenciales para el crecimiento vegetal

El crecimiento y diferenciación de una planta requiere un suministro continuo de minerales que cumplen muy diversas funciones en el metabolismo vegetal, desde la estructuración de proteínas (N y S), la formación de paredes celulares (Ca), hasta cofactores enzimáticos (Mg, Mn, Ca, Mo). La cantidad de los elementos que se requiere para el crecimiento normal y las proporciones relativas dependen de la especie, de la edad de la planta y de las condiciones de crecimiento (Scott, 1984).

El primer objetivo en la preparación de un medio de cultivo es suministrar los nutrimentos vegetales en concentraciones adecuadas. Como nutrimentos vegetales se definen aquellos elementos que son necesarios para un desarrollo normal de la planta y que no pueden ser sustituidos en su función por ningún otro elemento químico. Se ha establecido que los nutrimentos vegetales son los que aparecen en la siguiente tabla (Hill, 1984).

Tabla 1. Elementos Nutritivos Ordenados de acuerdo con sus características químicas.

<b>No Metales</b>	<b>Metales Alcalinos y Alcaliniterreos</b>	<b>Metales Pesados</b>	<b>Halógenos</b>
C	K	Fe	Cl
O	Na	Mn	
H	Ca	Zn	
N	Mg	Cu	
S		Mo	
P			
B			
Si			

Aunque una planta verde intacta es autótrofa, las células de sus regiones de crecimiento pueden ser acentuadamente heterotróficas y requerir la aplicación de un número de estimulantes orgánicos complejos que, en el caso de la planta intacta, generalmente se derivan de las células verdes.

La mayor parte de tales tejidos se pueden cultivar exitosamente en un medio que contenga cualquiera de varias mezclas de sales minerales diseñadas para mantener el crecimiento de tejidos y órganos. A menudo se utiliza sacarosa como una fuente de energía. Algunos tejidos se pueden cultivar exitosamente en un medio completamente definido, mientras muchos otros no presentan crecimiento en soluciones salinas relativamente simples, a menos que se complementen con ciertos microelementos, vitaminas y otras sustancias promotoras del crecimiento de naturaleza completamente indefinida, tales como el agua de coco (AC), la caseína hidrolizada (CH), los extractos de levadura y de malta y otros (Mergara. 1998).

### 3.2. Auxinas, citocininas y otros reguladores de crecimiento

Una hormona reguladora del crecimiento vegetal es una sustancia que es sintetizada en el interior de una planta y que, a bajas concentraciones puede activar, inhibir o modificar cualitativamente el crecimiento, ejerciendo normalmente esta acción en un lugar distinto al de su origen. Su efecto no es debido ni a su valor calórico ni a su contenido en elementos esenciales. Se dividen en cinco tipos de hormonas (Scott, 1984).

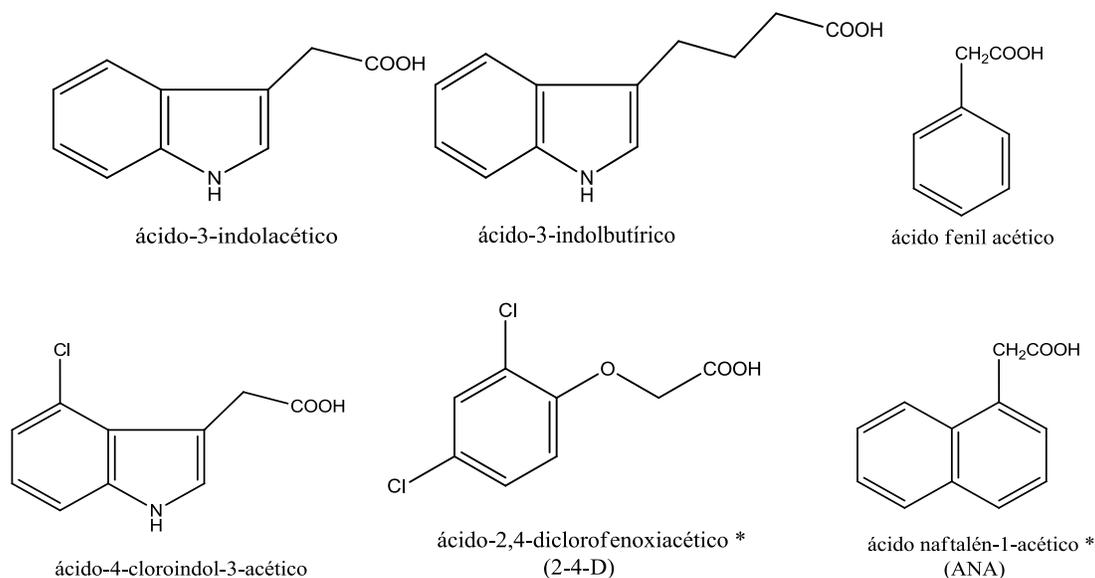
### 3.3. Auxinas

Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos. (Hill, 1984)

Existen varias auxinas naturales como el AIA, así como hay sustancias que provocan un efecto similar y que se han producido sintéticamente; son las llamadas “auxinas sintéticas”, entre las cuales el 2,4-D, el ANA y el AIB se encuentran ampliamente disponibles y se utilizan comúnmente. También existen muchos compuestos que son derivados de los ácidos fenilacético o fenoxiacético (Scott, 1984).

En la práctica el uso de las auxinas es un arte. No es posible establecer una concentración particular de la auxina que se debe utilizar en un solo caso. Sin embargo, en general se utiliza el AIA en concentraciones que varían de 0.001 a 10 mg/litro, con un punto óptimo alrededor de 0.1 a 1 mg/litro; el 2,4-D se utiliza en concentraciones que varían de 0.1 a 10 mg/litro, con un punto óptimo que se encuentra alrededor de 1 a 5 mg/litro; el ANA generalmente se utiliza en concentraciones levemente mayores (1 a 10 mg/litro), con un punto óptimo cerca de 2 mg/litro (Reinert, 1982).

En la figura 1 se puede observar la estructura química de las principales auxinas utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales.



\*Auxinas sintéticas.

Figura 1 Estructura molecular de las principales auxinas (Reinert, 1982).

### 3.4. Citocininas y sustancias similares

En un inicio se propuso el término cinina (Murashige & Skoog, 1962) como un nombre genérico para sustancias que presentaban los mismos tipos de actividad biológica que la cinetina (KIN, 6-furfuril-aminopurina). Con el fin de evitar confusión, un poco más tarde se adoptó la palabra citoquinina para designar las sustancias de división celular (Scott, 1984).

La KIN ha recibido mucha atención como una sustancia estimuladora de la división celular; no se ha demostrado que esté presente como un compuesto natural. Otra citoquinina sintética, el bencil-aminopurina (BAP), se utiliza tal vez más que la KIN o la ZEA. Es un compuesto muy activo y se encuentra disponible fácilmente, a un costo más o menos razonable (Reinert, 1982).

En la figura 2 se puede apreciar la estructura química de las principales cotocininas utilizadas en el cultivo de tejidos vegetales.

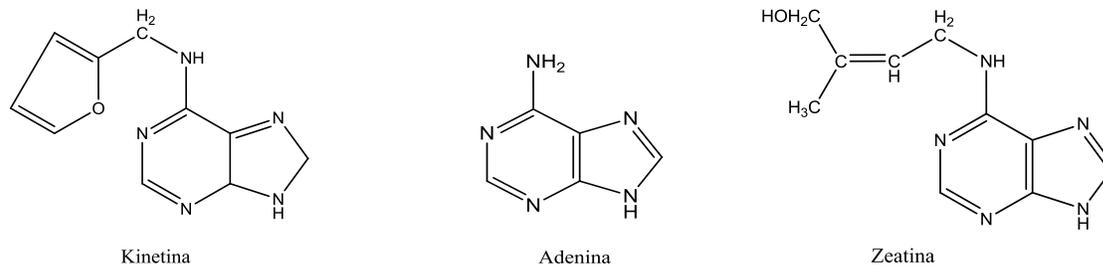


Figura 2. Estructura molecular de las principales citocininas (Reinert, 1982).

### 3.5. Gliberelinas

Luego de su aislamiento a partir del hongo *Giberella fujikoi*, el ácido gliberelico (AG) se convirtió en un tema de investigación, aunque la adición de este compuesto a los medios de cultivo de tejidos ha sido ocasional a pesar de sus efectos fisiológicos tan amplios. Se sabe que hay varias gliberelinas, relacionadas con el AG, que son productos complejos del metabolismo del hongo o de plantas superiores, y que son capaces de intervenir en el crecimiento de muchas plantas ocasionando especialmente un alargamiento celular, que de otra forma no ocurriría. Generalmente se aplica AG a plantas genéticamente enanas, en este aspecto las gliberelinas difieren de las auxinas (García et al, 2004).

En la mayoría de los cultivos, los niveles de AG superiores a 1.0 mg/litro son tóxicos, las gliberelinas deben utilizarse en bajos niveles y con cautela; son termolábiles y deberían esterilizarse con filtros.

### 3.6 Inhibidores

Existen muchas sustancias que se encuentran en las células vegetales y que pueden inhibir algunos procesos. El ácido abscísico (AAB) se caracteriza por su capacidad para inhibir muchos fenómenos de crecimiento en las plantas (Hill, 1984).

### 3.6.1 Etileno

Parece estar relacionado con muchas respuestas de crecimiento provocadas por las auxinas y también influye en la senescencia y abscisión de las hojas y en la maduración de algunos frutos (García et al, 1984).

### 3.7 El pH y otras condiciones de cultivo

Aunque generalmente se supone que los cultivos de tejidos de plantas pueden sobrevivir en un amplio rango de pH, los pH iniciales de la mayoría de los medios son generalmente de 4.0 a 5.5, en ausencia de varios suplementos de crecimiento. En la mayoría de los casos se requerirá ajustar el pH, aumentándolo con una solución 0.01 ó 0.1 N de hidróxido de potasio o de sodio; normalmente, el ajuste de pH se hace a 5.5, 5.8 o 6.3. Las orquídeas se desempeñan mejor en un medio levemente más ácidos (Scott, 1984).

## 4. Cultivo de tejidos vegetales

El concepto original de cultivo tejidos de vegetales se ha extendido modernamente para abarcar tanto el cultivo de células y órganos, dentro de un grupo de técnicas que se fundamenta en varios principios, los más importantes sin duda son la totipotencialidad celular propuesta por Haberlandt (1902) y la hipótesis del balance hormonal sugerida por Skoog et al.(1962). Estos tienen su fundamentación en la mayoría de modelos biológicos empleados en el estudio de la morfogénesis in vitro.

La definición de cultivos de tejidos y los numerosos objetivos que éstos persiguen constituyen un grupo heterogéneo de técnicas mediante las cuales un explante se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas (Castillo, 2004).

Las técnicas de cultivos asépticos han contribuido no sólo a un mejor entendimiento de los eventos de la diferenciación celular, sino a un mejor aprovechamiento de tales eventos en la explotación más eficiente de las plantas. En este último aspecto vale la pena mencionar los siguientes usos de las técnicas del cultivo in vitro:

- Mejoramiento genético.
- Obtención de plantas libres de virus y otros patógenos.
- Conservación del germoplasma.
- Micropropagación (Roca et al, 1991).

#### 4.1. Micropropagación

Cuando un inoculo con potencialidad de diferenciación se incuba en condiciones favorables (balance hormonal apropiado) regenera un nuevo individuo. (Mergara, 1988).

Si el cultivo de tejidos consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de un tejido u órgano que se extrae de la planta, la micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva in vitro.

Actualmente el código oficial de la nomenclatura de las plantas cultivadas define la palabra clon como un conjunto genéticamente uniforme de individuos originalmente derivados de un solo individuo mediante propagación asexual (Segretin, 2007).

A partir de una planta madre se obtienen numerosos explantes que, sujetos a condiciones y medios de cultivo adecuados, darán lugar a nuevas plantas iguales a la planta original, permitiendo su multiplicación.

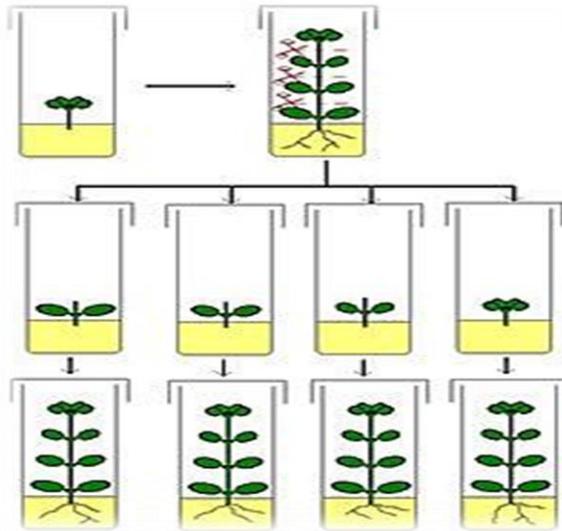


Figura 3 Esquema representativo de la Micropropagación. (Segretin, 2007).

Las ventajas más importantes de la micropropagación en comparación con los sistemas convencionales de propagación son:

- Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- Reducción del tiempo de multiplicación.
- Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente costeados.
- Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- Facilidad para transportar el material in vitro de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos (Evans, 1983).

#### 4. 2. Pasos en la Micropropagación

Murashige (1962) propuso tres pasos fundamentales para la micropropagación eficiente de una especie.

- El establecimiento aséptico del cultivo.

- Su multiplicación.
- El enraizamiento y preparación del inoculo para su trasplante al suelo.

#### 4.2.1. Establecimiento del cultivo aséptico

Una vez seleccionado el mejor explante se requiere desinfectarlo superficialmente, ya que en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente hongos y bacterias, que competirán ventajosamente con el explante. Para esta desinfección se han empleado diferentes compuestos, siendo los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloro comercial, el alcohol a diferentes porcentajes, y otros. La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan por las características del explante (Evans et al., 1983).

Es difícil lograr cultivos completamente estériles en el estricto sentido de la palabra; por ejemplo, es probable que los virus presentes en el explante persistan en los cultivos. Hecha esta salvedad, para establecer cultivos asépticos es conveniente o necesario:

- Trabajar en ambientes adecuados.
- Esterilizar los medios de cultivo.
- Desinfectar superficialmente los explantes, liberándolos de bacterias y hongos exógenos.
- Realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia. (Echenique et al, 2010).

Hay una vasta gama de compuestos químicos que pueden utilizar como desinfectantes para los explantes, pero en la actualidad es casi generalizado el empleo de etanol (70% v/v) y de hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1% al 3% contenido en productos de uso doméstico. Con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio [Ca(OCl)<sub>2</sub>, 6% a 12%] y el cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>. 0.1% a 1.5%), aunque hay que recalcar que este compuesto es altamente toxico y que no es fácilmente removible del explante (Segretin, 2007).

En algunos casos resulta útil el agregar algún agente tensoactivo (tween-20, del 0.01% a 0.1%), pero puede ser innecesario en los procedimientos de desinfección que incluyan un primer paso con etanol 70%. Así mismo, es conveniente agitar el explante conjuntamente con la solución desinfectante (Roca et al, 1991).

Después de tratar el explante con las soluciones desinfectantes es necesario remover los restos de producto, mediante varios lavados con agua destilada estéril y operando en la cámara de transferencia. Es aconsejable lavar los explantes con un volumen por lo menos 10 a 20 veces mayor de agua estéril, haciendo un mínimo de tres enjuagues sucesivos (Echenique et al., 2010).

Los antibióticos aplicados al medio de cultivo pueden ser de utilidad para la desinfección de los explantes. Sin embargo, su empleo solamente se justifica en casos de excepción y en cultivos de corta duración, ya que la alta especificidad de los antibióticos implica que no previenen la proliferación de todos los microorganismos; además, tales productos modifican la composición de los medios de cultivo y pueden ser metabolizados por los explantes (Reinert, 1982).

El proceso para la desinfección superficial de los explantes debe permitir eliminar los microorganismos con el menor daño posible para los explantes. No es factible recomendar un procedimiento general para este propósito, y se deben considerar de manera especial las especies vegetales y el tipo de explante.

Los explantes provenientes de vegetales que crecen en invernaderos o en cuartos aclimatados son relativamente más fáciles de desinfectar que los provenientes de plantas que crecen en el campo; también es más fácil la desinfección de explantes de órganos jóvenes que la de explantes provenientes de materiales adultos. Las aplicaciones de fungicidas o bactericidas, aplicadas previamente a las plantas, pueden ser de utilidad (Thorpe, 1981).

Por asepsia en el establecimiento y ulterior manipulación de los cultivos es preciso adoptar algunas precauciones durante las tareas que se llevan a cabo en la cámara de flujo laminar, tales como:

Antes de comenzar a trabajar, desinfectar la mesa y las paredes de la cámara con etanol al 70%. Igualmente es conveniente desinfectar la parte externa de los recipientes que contienen los medios de cultivo o el agua estéril, antes de introducirlos en la cámara.

Es necesario que las manos y los antebrazos del cultivador sean desinfectados con etanol 70%. El uso cofia y cubre bocas no es imprescindible, pero reduce la contaminación si se opera en flujos laminares de aire estéril.

Los instrumentos metálicos empleados se deben flamear previamente con etanol 95%. El material de vidrio utilizado como soporte para las disecciones (generalmente cajas petri) debe estar esterilizado al igual que las pipetas que comúnmente se usan en trabajos con suspensiones celulares y protoplastos (Scott, 1984).

Realizar las operaciones de transferencia y disección lo más cerca posible de la flama del mechero. Evitar exposiciones prolongadas de los explantes o de los medios de cultivo en recipientes abiertos.

#### 4.2.2. Crecimiento del inoculo

En estado de crecimiento, el explante se multiplica con la formación de callos o sin ella, según las condiciones de cultivo. La fase intermedia de formación de callos se evita cuando se tienen fines de micropropagación debido al hecho de que las plantas provenientes de callos presentan diferentes grados de variación; ésta puede ser de tipo epigenético o corresponder a mutaciones verdaderas (Roca, 1991).

Es importante considerar también que la fase de crecimiento puede deberse a la división de las células, al aumento de su tamaño o a ambas cosas. A este respecto, la diferenciación de novo está asociada con la producción de nuevas células cuya organización está de acuerdo con un programa influido por las condiciones in vitro y la ganancia de peso seco (Mergara, 1988).

#### 4. 2. 3. Enraizamiento de los brotes y preparación para trasplante

El proceso de enraizamiento en los brotes propagados in vitro requiere generalmente del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. Asimismo, se requiere cambiar el balance hormonal, esto es, disminuir las citocininas y aumentar las auxinas exógenas para estimular para la diferenciación del sistema radical (Roca, 1991).

En la micropropagación a gran escala de especies ornamentales se ha observado que la diferenciación del sistema radical bajo condiciones in vitro no es económicamente costeable, por lo que en algunas empresas se ha sustituido esta fase del proceso por el enraizamiento de brotes en cámaras de humidificación.

Si el sistema radical fue diferenciado in vitro, las plantas no se pueden trasplantar directamente a las condiciones del invernadero sin una paulatina adaptación a las condiciones del suelo. A este período de adaptación se le ha denominado período de endurecimiento (Castillo, 2007).

Las plantas obtenidas in vitro se deben lavar cuidadosamente para eliminar todos los residuos de agar, que pueden ser una fuente de contaminación. Posteriormente, se trasplantan a recipientes con suelo estéril y se cubren con bolsas de polietileno, que se van perforando gradualmente hasta que se queden eliminadas completamente en un período de 15 a 20 días; esto se hace con el objeto de adaptar paulatinamente las plantas a las condiciones del invernadero. Durante esta fase de endurecimiento, las plantas se riegan preferentemente con medio de cultivo diluido al 50% y posteriormente se sustituye esta fórmula de riego por soluciones nutritivas menos complejas (Roca et al, 1991).

#### 4. 3. Factores que influyen en la micropropagación

Existen diferentes factores que determinan el éxito en los sistemas de micropropagación. A continuación se mencionan los más importantes.

El estado fisiológico de la planta madre influye significativamente en su capacidad morfogenética. Se ha encontrado que los requerimientos nutricionales y

hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas en diferentes edades fisiológicas (Mangold et al., 1987).

Así mismo, se ha observado que la edad fisiológica del explante tiene gran influencia en la morfogénesis. Se sabe que mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la respuesta in vitro. A este respecto, los meristemas apicales y axilares han sido empleados con éxito en una amplia gama de especies (Roca et al, 1991).

#### 4. 3. 1. El explante

El explante es una parte de tejido o de órgano que se aísla de la planta con fines de cultivo. La selección del explante puede hacerse teniendo en cuenta el sistema de propagación de la planta.

Si las plantas que se van a micropropagar tienen reproducción por semilla, las partes embrionarias o de la plántula son las fuentes más comunes de explantes; las semillas pueden ser desinfectadas superficialmente y germinar en condiciones de asepsia. En el caso de especies propagadas vegetativamente, los brotes jóvenes han sido generalmente la fuente del explante (Roca et al, 1991).

El tamaño del explante no tiene aparentemente mayor influencia. Solamente en el caso de que se pretenda obtener plantas libres de virus, los meristemas (sin promodios foliares) tienen una alta posibilidad de diferenciar plantas libres de estos patógenos; sin embargo, es más difícil regenerar de ellos plantas completas.

El explante debe responder eficientemente bajo las condiciones in vitro. Es importante considerar el hecho de que el aislamiento de un tejido u órgano del resto de la planta provoca un estado de estrés que altera su metabolismo celular y su balance hormonal. Un buen explante es aquel cuyas células sobreviven a la descomposición y responde eficientemente a las condiciones in vitro (Marassi, 1991).

#### 4.3.2. Factores físicos

Es conveniente que los cultivos sean incubados en ambientes controlados, por lo menos en lo que se refiere a la luz y a la temperatura. Para propósitos generales se sugiere utilizar una fuente luminosa compuesta de lámparas fluorescentes (del tipo "luz de día") y lámparas incandescentes que brinden entre 1000 y 4000 lux de iluminación. Comúnmente se utiliza un ciclo de fotoperiodo de 16/8 y temperaturas entre 21 a 25 °C para el establecimiento de cultivos.

Aun cuando muchos factores pueden influir en la micropropagación, los factores físicos juegan un papel determinante; la luz y la temperatura han sido los factores físicos más extensamente estudiados (Castillo, 2004).

#### 4. 3. 3 Medio de cultivo

El éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física.

En relación con la especie vegetal utilizada, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada con el genotipo de las plantas. Es muy frecuente que, en idénticas condiciones de medio y ambiente, las respuestas in vitro del cultivo de un determinado explante de una especie difieran con el cultivar empleado (Roca et al, 1991).

Ligeros cambios en la composición de los medios de cultivo, especialmente en lo que se refiere a los reguladores de crecimiento, pueden ser de utilidad para abiar este efecto del genotipo del material vegetal.

En general, el cultivo de explantes muy pequeños requiere el empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados, otra alternativa es el cultivo de varios explantes en un mismo recipiente, en lugar de su incubación en forma individual (Evans et al., 1983).

#### 4. 4. Micropropagación de especies herbáceas

Los métodos usados para la micropropagación de especies herbáceas se basan en cualquiera de los siguientes procesos morfogénéticos:

- Estimulo de las yemas axilares.
- Diferenciación de brotes adventicios.
- Embriogénesis somática.
- Estimulo de yemas axilares.

En este caso, las condiciones in vitro estimulan el desarrollo de las yemas axilares permitiendo la formación de una planta por cada yema. La eficiencia de este sistema estriba en que el número de plantas obtenidas está determinado por el número de yemas axilares preexistentes en el inoculo; por otro lado, el sistema presenta la ventaja de que los individuos regenerados muestran una gran estabilidad genética (Mangold, 1987).

#### 4. 4. 1 Diferenciación de brotes adventicios

La diferenciación de brotes adventicios permite la formación de novo de estructuras unipolares; este sistema permite la regeneración de una mayor cantidad de brotes que el sistema de yemas axilares.

Los brotes adventicios tienen su origen en la formación de tejido meristemático y la posterior diferenciación de ápices, ya sea directamente o a partir de callos originados también del explante; esto último puede traer como consecuencia la variabilidad fenotípica en los clones diferenciados (Evans et al., 1983).

#### 4. 4. 2. Embriogénesis somática

Los factores químicos más importantes para la embriogénesis somática son las auxinas exógenas, la concentración del nitrógeno y algunas otras sustancias como la sacarosa. Desde el punto de vista de la propagación, la embriogénesis somática es el sistema más eficiente, si se considera la eficiencia como el número de plantas regeneradas por unidad de tiempo (Roca et al., 1991).

Empleando este sistema se pueden obtener cantidades ilimitadas de plantas, ya que todo hace suponer que por cada célula suspendida en el medio de cultivo se está diferenciando una planta. Debe considerarse, sin embargo, que en un cultivo

de células en suspensión la mayoría de los embriones somáticos tienen su origen a partir de callos, implicando alguna forma de variación epigenética.

En los últimos años, el cultivo de tejidos vegetales ha cobrado mayor interés debido a las expectativas que se tienen en cuanto a la biotecnología. Es de considerar la creciente importancia que el cultivo de tejidos está adquiriendo en la agricultura; se tienen pretensiones de que las técnicas in vitro serán una importante herramienta en la agricultura (Castillo, 2004).

Con respecto a la micropropagación, constantemente se incrementa la lista de especies que se pueden multiplicar eficientemente empleando los métodos de aquélla. Sin embargo, tales técnicas no se han podido aplicar con los mismos resultados a las especies leñosas, esto ha estimulado a muchos investigadores a realizar esfuerzos para resolver el problema (García et al., 2004).

#### 4. 5. Obtención de aceites esenciales de cultivos in vitro

Los aceites se caracterizan por su olor, apariencia aceitosa y habilidad para volatilizarse a temperatura ambiente. Los terpenos son productos naturales derivados de isopreno y constituyen los compuestos principales de los aceites esenciales (Lachowicz et al, 1997).

El papel funcional de especias y sus componentes es un tema de gran interés en la ciencia de los alimentos relacionados con la investigación de plantas. Las especias no son sólo evaluadas por sus propiedades de condimento, sino también son apreciadas por su eficacia bioactiva como bacteriostáticos, fungicidas, antioxidantes y nutrientes. (García et al., 2004).

La tabla 2 muestra algunos ejemplos de aceites esenciales producido a través del cultivo de tejidos vegetales.

<b>Tipo de Producto</b>	<b>Especie de planta</b>	<b>Referencia</b>
Aceite de Menta	<i>Mentha piperata</i>	Chung et. al. (1994)
Aceite de Manzanilla	<i>Ma. Chamomilla</i>	Kireeva et al. (1978)
Aceite de Jazmín	<i>Jasmine officinale</i>	Banthorpe (1994)
Aceite de Anís	<i>Pim. Anisum</i>	Ernest (1989)

Compuestos aromáticos sintéticos como el BHA, el hidroxitolueno (BHT) y tert-butilhidroquinona (TBHQ), son ampliamente utilizados como antioxidantes en lípidos de alimentos. Sin embargo, como resultado de una gran preocupación sobre posibles efectos tóxicos y genotóxicas secundarios, la Food and Drug Administration (FDA), en los Estados Unidos y las comisiones de Comunidad Europea planea retirar BHA y BHT de la lista de seguridad GRAS. Además, TBHQ no ha sido aprobado para uso en alimentos en Europa, Japón y Canadá. Por lo tanto, antioxidantes naturales han ganado popularidad en los últimos años, y está extendiendo su uso y una imagen positiva entre los consumidores (Barlow, 1990).

La familia Labiatae es uno de los más empleados como una fuente mundial de especias y también como una fuente consolidada de extractos con propiedades antibacteriales y antioxidante fuertes. Dentro de esta familia, el género *Ocimum* proporciona varias especies y sus aceites esenciales poseen una amplia gama de aplicaciones como ingredientes en los alimentos y aditivos en productos cosméticos y artículos de tocador, sabores y fragancias. Además de su composición aromática, muchas especies de *Ocimum* de todo el mundo han sido evaluadas por sus propiedades biológicas relacionadas con los alimentos, y para muchos de ellos, se han sugerido múltiples usos funcionales (Sacchetti et al, 2004).

Se ha experimentado el uso de CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas para la extracción del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) con la finalidad de establecer las condiciones de extracción. Los resultados mostraron dos extractos: aceite y cera. Los rendimientos del aceite se ubican entre 0,450 y 1,848 por ciento. Los rendimientos de ceras están entre 0,228 y 1,438 por ciento. Mediante la cromatografía de gases se identificaron y cuantificaron los componentes principales del aceite, tales como: eugenol, linalool, benzaldehido, zingibirene y -terpineno (Romero et al, 2004).

## 5. Extracción

Las plantas poseen una variedad de mezclas de compuestos bioactivos tales como lípidos, grasas, fotoquímicos, fragancias, pigmentos y sabores que son ampliamente utilizados en la industria alimentaria, en la industria farmacéutica y en la industria cosmética. Para separar estos compuestos (solutos) de la fase sólida, ésta se pone en contacto con una fase líquida, ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto se difunde desde el sólido a la fase líquida, lo que permite una separación de los componentes de su estructura natural original. Este proceso se conoce como lixiviación y para realizarlo existen varios métodos. Un proceso importante es la extracción de aceites vegetales, en los cuales se emplean disolventes orgánicos como hexano, acetona y éter, para extraer aceites de maní, soja, semillas de lino, ricino, girasol o algodón (Geankoplis, 1999).

### 5. 1. Secado

Previo al proceso de extracción se somete a un proceso de secado para retirar la humedad contenida.

Debido a la gran variedad de materiales que se secan y a los muchos tipos de equipo que se utilizan, no existe una sola teoría de secado que comprenda todos los materiales y tipos de secadores. Las variaciones posibles en forma y tamaño de los materiales, de la humedad de equilibrio, de los mecanismos del flujo de humedad a través del sólido, así como en el mecanismo de transmisión de calor

que se requiere para la vaporización, impiden que se pueda hacer un tratamiento unificado. Son conocidos, sin embargo, los fundamentos generales, que se utilizan en forma semicuantitativa (Sharma et al, 2003).

Cuando un sólido húmedo se pone en contacto con aire de una humedad inferior a la correspondiente al contenido de humedad del sólido, dada por la curva de humedad de equilibrio, el sólido tiende a perder humedad y secarse hasta alcanzar el equilibrio con el aire. Cuando el aire es más húmedo que el sólido en equilibrio con él, el sólido absorbe humedad del aire hasta que se alcanza el equilibrio (Mc Cabe et al, 2001).

El secado es uno de los métodos de conservación de alimentos más empleados. Durante el secado se elimina el agua del alimento, disminuyendo su disponibilidad para participar en aquellos procesos de deterioro en los que interviene (reacciones enzimáticas, desarrollo microbiano).

Si se conoce la humedad inicial, se puede determinar cómo disminuye la humedad del producto con el tiempo de secado. Representando gráficamente esos datos, humedad (kg agua/kg sólido seco) frente al tiempo (h), obtendremos la curva de secado (Ibarz et al, 2005).

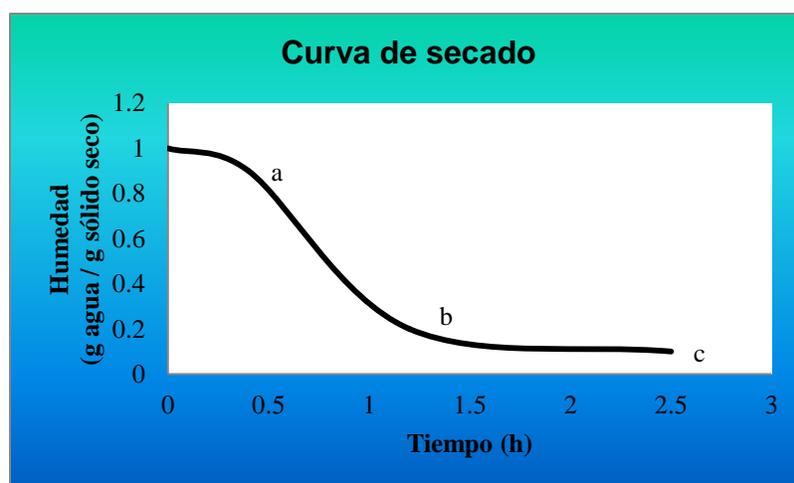


Figura 4. Curva de Secado (Ibarz et al, 2005)

En esta figura se ven claramente tres zonas, cada una de ellas caracterizada por diferentes variaciones de la velocidad de secado:

- a) Periodo de velocidad de secado creciente: Se produce un calentamiento del producto, adaptándose el material a las condiciones de secado. Dado que su duración es muy corta, no suele tenerse en cuenta a la hora del cálculo y diseño de secadores industriales.
  
- b) Periodo de velocidad de secado constante: Durante este periodo la velocidad con que se elimina agua de la superficie del producto es igual a la velocidad con que se llega desde el interior del mismo, de esta manera la superficie del material se mantiene constantemente mojada, y se comporta como una masa de líquido. La velocidad de secado permanecerá constante mientras exista agua libre en la totalidad de la superficie del alimento. A medida que transcurre el tiempo y el producto se va secando llega un momento en que la velocidad con que llega el agua a la superficie es menor que la velocidad de evaporación. En ese momento el contenido del producto se conoce como humedad crítica.
  
- c) Periodo de velocidad de secado decreciente: Durante este período la velocidad de secado depende con la humedad del producto, la humedad final mínima posible es la humedad de equilibrio del producto para las condiciones de aire de secado.

Durante extracción del aroma las dificultades derivadas de las variadas características moleculares de los compuestos que lo definen. Se trata de moléculas que con frecuencia son muy reactivas o termolábiles, que se les encuentra ligadas a matrices complejas (lípidos, proteínas, fibra o agua). Entre los métodos tradicionales empleados para la extracción selectiva de estos compuestos está la separación con disolventes polares y la destilación. Recientemente se han empleado otras técnicas como la extracción supercrítica con dióxido de carbono (Ibarz et. al, 2005).

La deshidratación o secado de los alimentos es un fenómeno que implica procesos de transferencia de cantidad de movimiento, calor y masa. Todas las operaciones de secado dependen de la aplicación de calor para vaporizar el agua o los constituyentes volátiles. Todos los materiales sólidos presentan cierto contenido de humedad en equilibrio cuando se ponen en contacto con el aire a una temperatura y una humedad particulares. En consecuencia, los materiales tienden a perder o ganar humedad del aire que cambia, entonces se pierde o gana humedad hasta que se alcanza un nuevo valor de equilibrio.

La humedad de un alimento sólido es retenida en dos formas, a saber, la llamada agua ligada y agua libre. El agua ligada ejerce una mayor presión de vapor de equilibrio menor que la del agua libre a la misma temperatura. La humedad en forma de agua ligada es retenida en capilares finos o adsorbidos sobre la superficie o dentro de células o paredes fibrosas o en combinación fisicoquímica con el sólido. La humedad en forma de agua libre podría estar retenida en los espacios vacíos de los alimentos sólidos (Sharma et al, 2003).

## 5. 2. Extracción con Soxhlet

Para la extracción con soxhlet se deben tener en cuenta: la selección del solvente, la matriz sólida y las condiciones de operación.

### 5. 2. 1. Selección del solvente

Debe seleccionarse un solvente conveniente de tal forma que ofrezca el mejor balance de varias características deseables: alto límite de saturación y selectividad respecto al soluto por extraer, capacidad para producir el material extraído con una calidad no alterada por el disolvente, estabilidad química en las condiciones del proceso, baja viscosidad, baja presión de vapor, baja toxicidad e inflamabilidad, baja densidad, baja tensión superficial, facilidad y economía de recuperación de la corriente de extracto y bajo costo (Dahlstrom et al., 1999).

Cada solvente diferente produce extractos y composiciones específicos. El solvente más ampliamente utilizado para extraer aceites comestibles de las plantas es el hexano. El hexano tiene un rango en el punto de ebullición bastante

estrecho, de aproximadamente 63 - 69 °C y es un excelente solvente de los aceites en lo que se refiere a su solubilidad y facilidad de recuperación. Sin embargo, el n-hexano, el elemento principal del hexano comercial, está ubicado como el número uno en la lista de los 189 contaminantes del aire más riesgosos por la Agencia Americana de Protección del ambiente (Mamidipally et al, 2004).

El uso de solventes alternativos tales como: isopropanol, etanol, hidrocarburos, e incluso el agua, se ha incrementado debido a daños causados al medioambiente, la salud, y a preocupaciones de seguridad.

#### 5. 2. 2. Características de la matriz

La extracción con Soxhlet depende fuertemente de las características de la matriz y de las dimensiones de las partículas puesto que la difusión interna puede ser el paso limitante durante la extracción. Para la extracción total de las grasas de las semillas oleaginosas, se realizó una extracción de 2-h obteniendo un rendimiento del 99% cuando la dimensión de las partículas era 0.4 mm, mientras que fue necesaria una extracción de 12-h para obtener una eficacia similar si la dimensión de las partículas era 2.0 mm (Luque-García et al, 2004).

*Condiciones de operación:* Durante la extracción con Soxhlet, el solvente se recupera normalmente por evaporación. Las temperaturas de extracción y evaporación tienen un efecto significativo en la calidad final de los productos (Mamidipally et al, 2004).

Algunos solventes usados con el Soxhlet convencional se han cuestionado recientemente debido a su toxicidad (n-hexano). El uso de solventes no tóxicos como el CO<sub>2</sub> supercrítico y el agua están en el orden del día.

#### 5. 3. Extracción con FSC

Un fluido supercrítico es cualquier substancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico. Tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido.

Adicionalmente, puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción.

Los fluidos supercríticos (FSC) tienen la capacidad de extraer ciertos compuestos químicos con el uso de determinados solventes específicos bajo la combinación de temperatura y presión. El CO<sub>2</sub> es el fluido supercrítico más utilizado debido a que es no tóxico, no inflamable, no corrosivo, incoloro, no es costoso, se elimina fácilmente, no deja residuos, sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar y se consigue con diferentes grados de pureza, se puede trabajar a baja temperatura y por tanto, se pueden separar compuestos termolábiles, se puede obtener a partir de procesos de fermentación alcohólica y ayuda a prevenir la degradación térmica de ciertos componentes químicos del alimento cuando son extraídos (Brunner, 2005).

## 6. La Albahaca

La albahaca es una de las plantas aromáticas más preciosas en cocina, tiene un gusto dulce, es fragante y parece que es más fuerte cuando, en verano, el sol aumenta su intensidad. Las hojas más perfumadas son aquellas que se recogen poco antes de la floración, ya que contienen una mayor cantidad de sustancias oleosas que determinan su aroma; sus hojas más viejas tienden a tener un sabor más picante. Se trata de una planta herbácea, de la familia de las Labiate; tiene un tronco erecto, alcanza una altura de 30-60 cm. Con hojas opuestas, de color verde intenso en el lado superior y verde-gris en el inferior. Las flores son pequeñas, de color blanco (Lachowicz et al, 1997).

Existen más o menos 40 tipos de albahaca. Los más usados son dos: la "albahaca genovesa", de un perfume agudo y la "napolitano" con la hoja en forma de lechuga, más delicada y con leve aroma a menta. Otras variedades: "fina verde compacta", de tamaño reducido, la "mammouth" tiene hojas larguísimas y es el tipo más adaptado para ser secado. Existen variedades con hojas coloreadas: la

albahaca de hojas rojas dentelladas y la albahaca ópalo oscura cultivada principalmente con una finalidad decorativa.



Figura 5 Plantas de *Ocimum basilicum* (albahaca).

La albahaca es una fuente mundial de extractos con propiedades antibacteriales y antioxidantes. Dentro de esta familia, el género *Ocimum* proporciona varias especies y sus aceites esenciales poseen una amplia gama de aplicaciones como ingredientes en los alimentos y aditivos en productos cosméticos y artículos de tocador, sabores y fragancias. Además de su composición aromática, muchas especies de *Ocimum* de todo el mundo han sido evaluados por sus propiedades biológicas relacionadas con los alimentos, y para muchos de ellos, se han sugerido múltiples usos funcionales (Sacchetti, et al. 2004).

Una gran variedad de aceites de albahaca ha encontrado su camino en el mercado mundial en los últimos años. Se destilan en Francia, Italia, Bulgaria, Egipto, Hungría, Sudáfrica y en ocasiones de Estados Unidos, es un aceite que contiene los compuestos mostrados en la figura 6, metilcavicol, linalol y eugenolde amplio uso en la medicina.

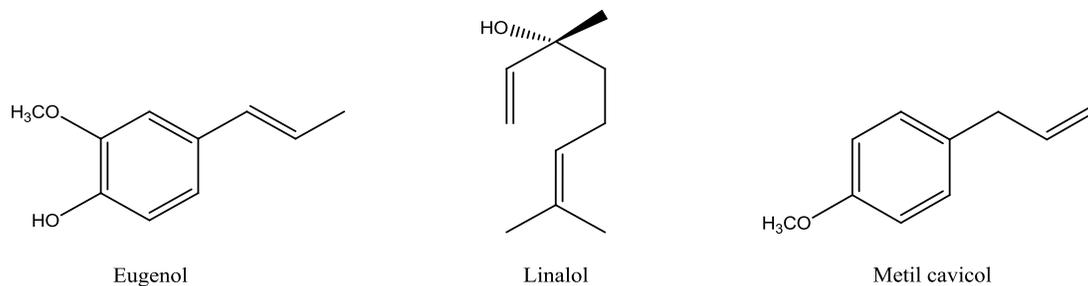


Figura 6. Componentes mayoritarios presentes el aceite esencial de albahaca.

En la edad media se encontraba la albahaca entre las plantas medicinales mágicas, ya que por su contenido en aceites esenciales, taninos, glucósidos y saponinas la hacían muy efectiva en el tratamiento de los trastornos gástricos, respiratorios y urinarios. Además, posee propiedades anti-inflamatorias y antisépticas, por lo que se emplea en la cura de diferentes enfermedades; también en la industria alimenticia se usa como añadido aromático y condimento, además en perfumería y cosmetología.

La albahaca contiene compuestos fenólicos y flavonoides por ejemplo: el ácido cinámico, el ácido cafeico y ácido ferulico (Figura 7). Estos compuestos son antioxidantes potentes, limpiadores de radicales libres y agentes quelantes (Sacchetti, et al. 2004).

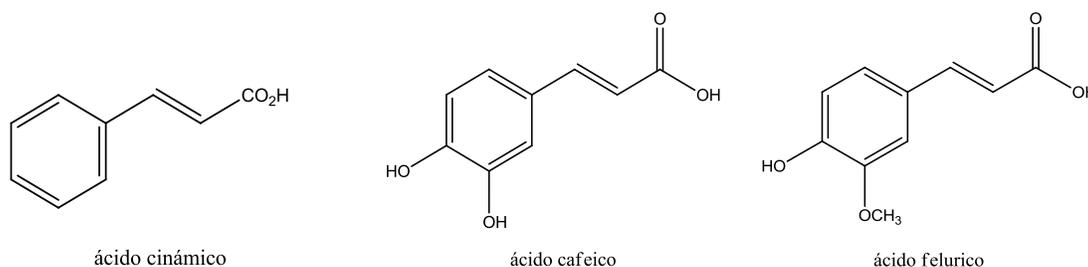


Figura 7. Compuestos fenólicos y flavonoides de la albahaca.

La utilización de la albahaca tiene una larga historia entre las hierbas medicinales. Muchas especies se utilizan por su actividad antioxidante y neuroprotector en varias partes del mundo. *Ocimum basilicum* se ha utilizado tradicionalmente para

el tratamiento de la ansiedad, la diabetes, enfermedades cardiovasculares, dolores de cabeza, dolor en los nervios, como anticonvulsivante y anti-inflamatoria, y se utiliza en un variedad de trastornos neurodegenerativos.

En Pakistán realizaron un estudio con el objetivo de evaluar la actividad de los componentes puros de *O. basilicum*, una planta utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades respiratorias, incluyendo los síntomas de la tuberculosis causada por *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Bina, et al. 2012).

La inhibición de la tuberculosis por los compuestos puros de *O. basilicum* apoyan el uso de esta planta para el tratamiento de los síntomas de la tuberculosis. Los resultados también sugieren que la actividad de la planta puede ser debido a un efecto sinérgico de sus compuestos activos.

En la india se evaluó la actividad larvicida del aceite esencial de *Ocimum basilicum* contra las especies de mosquitos *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* y *Anopheles subpictus*, vectores de transmisión de enfermedades como el dengue y la fiebre amarilla (Govindarajan, et al. 2013).

La composición química del aceite esencial se analizó mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). GC-MS reveló que el aceite esencial de *O. basilicum* contenía 20 compuestos. Los componentes químicos mayoritarios fueron linalol (52,42%), metil eugenol (18,74%) y 1, 8-cineol (5,61%).

El aceite esencial tiene un efecto tóxico significativo contra las larvas de mosquito de tercer estadio tardío de las especies de mosquito *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* y *Anopheles subpictus*, con unos valores de DL50 de 14.01, 11.97 y 9.75 ppm y unos valores de LC90 de 23.44, 21.17 y 18.56 ppm, respectivamente.

Los resultados podrían ser útiles en la búsqueda de larvicidas, agentes naturales más nuevos más seguros y más eficaces contra *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* y *Anopheles subpictus*.

Otro grupo de científicos de misma nacionalidad diseñaron un estudio para investigar el efecto del extracto de albahaca en el tratamiento de la isquemia y daño cerebral inducido en las disfunciones motoras en ratones (Kundan, et al. 2011).

Evaluaron la memoria a corto plazo utilizando laberinto elevado en cruz empleando un balancín inclinado para evaluar la coordinación motora. La oclusión bilateral de la arteria carótida produjo un aumento significativo en el tamaño del infarto cerebral y la peroxidación lipídica, además de reducir el contenido de glutatión, la memoria motora a corto plazo y la coordinación.

Los ratones sometidos a un pretratamiento con extracto de albahaca (100 y 200 mg / kg) redujo notablemente el tamaño del infarto cerebral y la peroxidación lipídica, restaurado contenido de glutatión, y atenuada deterioro de la memoria a corto plazo y la coordinación motora.

Los resultados del estudio sugieren que *Ocimum basilicum* podría ser útil clínicamente en el prevención del ictus.

En Marruecos se estudiaron las actividades hipocolesterolémicos e hipotriglicéridémicos de los extractos de *Ocimum basilicum* utilizando ratones con hiperlipidemia (exceso de grasa en la sangre) inducida (Hicham, et al. 2007).

La hiperlipidemia se desarrolló mediante inyección intraperitoneal de Triton (200 mg / kg de peso corporal). Después de 7 horas y 24 h de tratamiento, la administración intragástrica de los extractos causó una disminución significativa del colesterol total en plasma.

Los niveles de triglicéridos se redujeron también significativamente. Este hallazgo indica que *O. basilicum* puede contener productos polares capaces de reducir las concentraciones plasmáticas de lípidos y podría ser beneficioso en el tratamiento de la hiperlipidemia y la aterosclerosis.

## Justificación

Los antioxidantes han sido ampliamente utilizados como aditivos alimenticios para evitar la degradación de los alimentos. También tienen un papel importante en la prevención de una variedad de enfermedades relacionadas con el estilo de vida y el envejecimiento. Sin embargo, han surgido preocupaciones respecto a los antioxidantes sintéticos tales como BHA y BHT debido a su posible actividad como promotores de la carcinogénesis. Por lo tanto existe un gran interés en la actividad antioxidante de las sustancias naturales.

Las hierbas de la familia Lamiaceae se valoran por sus características farmacéuticas; por ejemplo, los aceites aromáticos producidos en sus hojas se utilizan como antioxidantes.

*Ocimum basilicum* contiene compuestos fenólicos y flavonoides por ejemplo: el ácido cinámico, el ácido cafeico, ácido sinápico y ácido ferulico. Estos compuestos son antioxidantes potentes, limpiadores de radicales libres, y agentes quelantes.

El aceite esencial de *Ocimum basilicum* posee propiedades antifúngicas, insecticidas y cierta actividad tóxica. Los extractos crudos de frutas, hierbas, cereales, y de otros materiales de planta ricos en compuestos fenólicos son cada vez más de interés en el sector alimenticio porque retardan la degradación oxidativa de los lípidos de tal modo mejoran la calidad y el valor nutrimental de los alimentos. Un gran número de compuestos fenólicos con actividad antioxidante se han identificado en los extractos de *Ocimum basilicum*.

La biotecnología vegetal es un campo del saber que se encuentra en un crecimiento muy dinámico, donde los científicos buscan entender mejor y poder manejar tanto los aspectos benéficos como los perjudiciales que afectan la vida de las plantas y su aplicación hacia los procesos productivos de bienes y servicios. Un pilar muy importante para la biotecnología vegetal moderna está representado por el cultivo de células y tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales se define como un conjunto de técnicas con las cuales se puede ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos bajo estudio. Dentro de las líneas de trabajo relacionadas al cultivo de tejidos vegetales se encuentra la producción de metabolitos secundarios vía callos o suspensiones celulares.

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es una técnica de reproducción en condiciones 100% asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre, cuando a este tejido le es aplicado un estímulo por medio de variables físicas y químicas controladas en un medio de cultivo.

## **Hipótesis**

Las plantas de *Ocimum basilicum* son capaces de sintetizar igual o mayor cantidad de aceite esencial cuando estas son propagadas *in Vitro*.

## **Objetivo General**

Micropropagar plantas de *Ocimum basilicum*, potencialmente productoras de aceite esencial.

## **Objetivos particulares**

- Obtener plantas madre cuyas características sean las más favorables para la clonación.
- Establecer cultivos asépticos de albahaca.
- Micropropagar albahaca.
- Obtener aceite esencial a partir de cultivos *in vitro* de *Ocimum basilicum*.
- Contribuir a la generación y utilización de ingredientes alimenticios de origen natural.

## 7. Metodología

La metodología consta de diferentes etapas. Se da inicio con el establecimiento de un cultivo de semillas de Albahaca in vitro con la finalidad de desarrollar plantas madre que aporten explantes para la micropropagación.

Los explantes de albahaca pueden ser usados para la extracción de aceite esencia o bien, ser micropropagados nuevamente y multiplicar la cantidad de material vegetal disponible para el proceso.

El proceso se puede dividir en dos etapas:

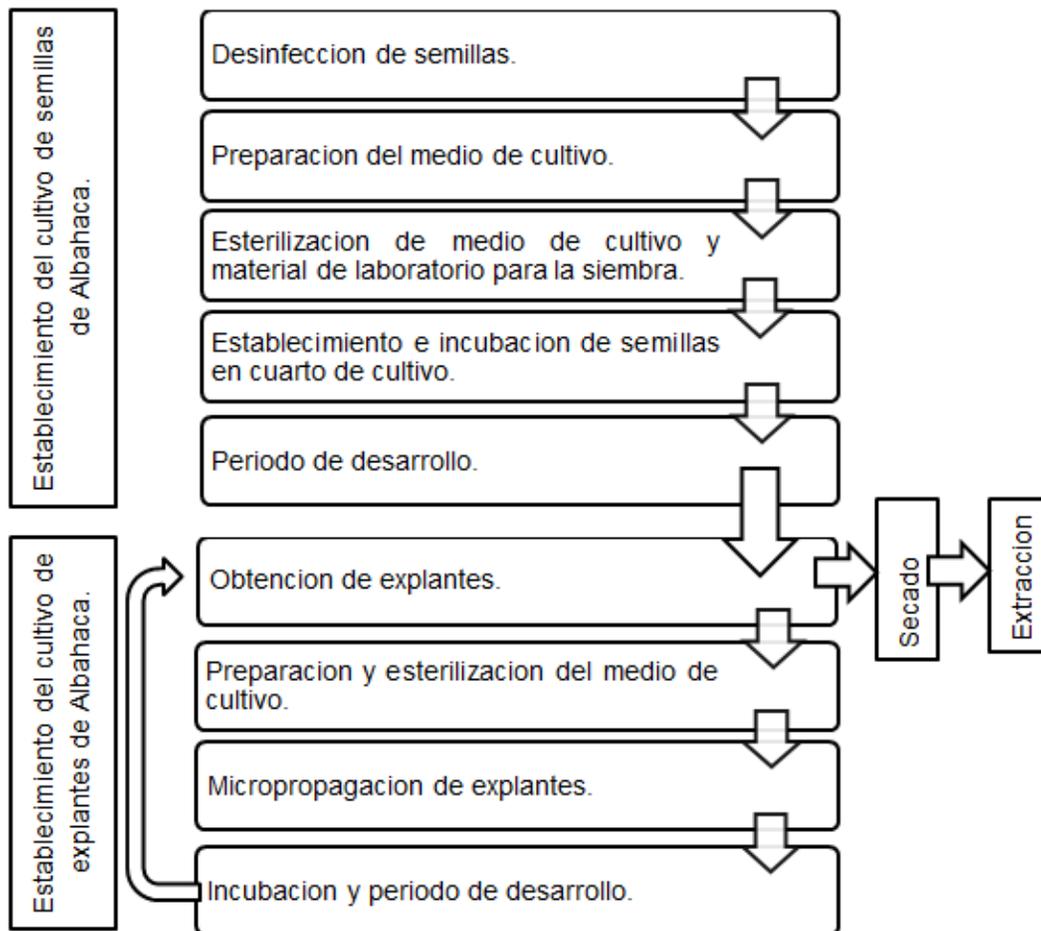


Figura 8. Procedimiento general para el proceso de obtención de aceite esencial de Albahaca micropropagada in vitro.

## 7. 1. Establecimiento de cultivos asépticos de semillas de albahaca (*Ocimum basilicum*)

En el presente trabajo se realiza un estudio acerca del desarrollo de la albahaca (*Ocimum basilicum*) germinada in vitro, así como la determinación de las necesidades nutricionales y hormonales que favorecen la proliferación de brotes adventicios que permitan la micropropagación de estos cultivos.

### 7. 1. 1. Material vegetal

Se utilizaron dos variedades de semillas de *Ocimum basilicum*: Albahaca Grande Verde y Albahaca Fina Verde; adquiridas del proveedor Hortaflores.

	
<p>Figura 9. Sobres de semillas de Albahaca Grande Verde</p>	<p>Figura 10. Sobres de semillas de Albahaca Fina Verde.</p>

### 7. 1. 2. Desinfección de tejidos

Las semillas de *Ocimum basilicum*, al ser adquiridas se contenían en sobres sellados; sin embargo, recibieron un tratamiento de desinfección para asegurar la asepsia del cultivo in vitro. Para el procedimiento de desinfección se siguió el siguiente procedimiento:

Se colocaron las semillas de *Ocimum basilicum* dentro de un sobre hecho de papel filtro y se lavó con una solución jabonosa y abundante agua corriente. El procedimiento de desinfección consistió en sumergir completamente el sobre de

semillas en una solución de alcohol 70% durante 3 minutos y realizando tres enjuagues con agua destilada. Finalmente se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio 10% durante 10 minutos y se aplicaron tres enjuagues con agua destilada esterilizada.

Los últimos enjuagues se realizaron en el cuarto de siembra con la vestimenta adecuada (bata, cofia y cubre bocas) y haciendo uso de la cámara de flujo laminar, así como, cajas Petri, pinzas y bisturí estériles. El investigador, antes de iniciar el cultivo, debe limpiar las manos, las superficies de la cámara y el material de trabajo con alcohol etílico al 95%.

#### 7. 1. 3. Preparación del medio de cultivo.

Para preparar un litro de medio de cultivo MS se vertieron aprox. 500 ml de agua destilada en un matraz erlen meyer de 2 litros y utilizando la agitación magnética se adicionan:

- 100 ml de solución de Macronutrientes.
- 10 ml de solución de Micronutrientes.
- 5 ml de solución de Vitaminas.
- 5 ml de solución de Hierro.
- 30 g de Sacarosa
- Solución de ANA y BAP.

Disolver por completo, aforar a 1 litro y verter nuevamente en el matraz de 2 lt. El pH se debe ajustar entre 5.7 y 5.8 para estimular la absorción de nutrientes en las plantas. Posteriormente y con agitación se adicionaron 2.2 g de fitagel y se aumentó la temperatura a ebullición por 3 minutos. Seguido se repartió el medio en frascos de cultivo y se esterilizo en autoclave.

El anexo 1 muestra la preparación de las soluciones de macro y micronutrientes, vitaminas y hierro.

#### 7. 1. 4. Establecimiento del cultivo

Una vez desinfectadas las semillas, en el cuarto de siembra, se preparan frascos con medio de cultivo, pinzas, bisturí y caja Petri estériles así como lámpara de alcohol y un matraz con alcohol para flamear.

Se debe de tener un ambiente aséptico y esto se logró realizando una limpieza previa a la siembra, con alcohol etílico al 96% en la superficie interior de la cámara de flujo laminar como la que se muestra en la figura 11.



FIGURA 11. PURIFIER CLASS II BIOSAFETY CABINET.

Es necesario que todo el material que se utilice para la siembra este previamente esterilizado y en el caso de las pinzas, permanecer en alcohol durante toda la siembra. Es necesario flamear las pinzas antes de tener contacto con cualquier material vegetal. Es indispensable que tanto los frascos de cultivo como las manos del sembrador sean roseados con alcohol etílico antes de ingresar a la cámara y durante el proceso de siembra.

Se colocaron dentro de la cámara los sobres de semillas en la caja Petri, se abrió el sobre con el bisturí y separaron las semillas eliminando el exceso de papel filtro

residual. Posteriormente, se retiró la tapa de aluminio de los frascos y se flameo la boca de los mismos. Finalmente, se colocaron 3 semillas en cada frasco con las pinzas, se flamearon y se colocó la tapa de parafilm seguida de una tapa de aluminio para disminuir el riesgo de contaminación una vez iniciada la etapa de incubación. En la siguiente figura se observa el modelo de cámara de flujo laminar utilizado para preservar la esterilidad del material vegetal.

#### 7. 1. 5. Incubación y desarrollo de plantas madre.

Se mantuvieron los cultivos en incubación en estantes con acondicionados con iluminación fluorescente del tipo luz de día, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. También se colocaron paredes de reflejantes para aumentar la cantidad de luz utilizada por las plantas para realizar la fotosíntesis. La temperatura de incubación ideal oscila entre los 25° C.

#### 7. 2. Micropropagación de explantes de Albahaca (*Ocimum basilicum*).

En una primera etapa, se tomaron explantes de plantas madre de *Ocimum basilicum* germinadas in vitro e incubadas en condiciones de asepsia. Usando el medio de cultivo MS como control y adicionando reguladores de crecimiento, se utilizaron 24 combinaciones de auxinas (ANA 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L) y citoquininas (BAP 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L), con la finalidad de generar tejidos diferenciados capaces de sintetizar el aceite esencial.

El siguiente cuadro es un listado de los tratamientos realizados. Se realizó por triplicado la siembra de 5 explantes por tratamiento y se registran los cambios observados en el explante; callogénesis, rizogénesis, crecimiento de tallo, brotes adventicios y oxidación.

Tabla 3. Concentración de reguladores de crecimiento utilizados para la micropropagación de *Ocimum basilicum*.

Control	0.5 mg/L ANA	1.0 mg/L ANA	1.5 mg/L ANA	2.0 mg/L ANA
0.5 mg/L BAP	0.5 mg/ L ANA + 0.5 mg/L BAP	1.0 mg/ L ANA + 0.5 mg/L BAP	1.5 mg/ L ANA + 0.5 mg/L BAP	2.0 mg/ L ANA + 0.5 mg/L BAP
1.0 mg/L BAP	0.5 mg/ L ANA + 1.0 mg/L BAP	1.0 mg/ L ANA + 1.0 mg/L BAP	1.5 mg/ L ANA + 1.0 mg/L BAP	2.0 mg/ L ANA + 1.0 mg/L BAP
1.5 mg/L BAP	0.5 mg/ L ANA + 1.5 mg/L BAP	1.0 mg/ L ANA + 1.5 mg/L BAP	1.5 mg/ L ANA + 1.5 mg/L BAP	2.0 mg/ L ANA + 1.5 mg/L BAP
2.0 mg/L BAP	0.5 mg/ L ANA + 2.0 mg/L BAP	1.0 mg/ L ANA + 2.0 mg/L BAP	1.5 mg/ L ANA + 2.0 mg/L BAP	2.0 mg/ L ANA + 2.0 mg/L BAP

#### 7. 2. 1. Organogénesis directa

A continuación, los explantes que en presencia de reguladores de crecimiento respondan dando como resultado la formación de brotes adventicios fueron subcultivados para su multiplicación masiva.

En condiciones de asepsia, una vez que los explantes subcultivados se han desarrollado y agotado los nutrientes del medio se realizó el siguiente procedimiento:

- Se extrajo de los frascos los tejidos de las plantas desarrolladas in vitro.
- Con ayuda de pinzas estériles, se colocaron los tejidos en caja Petri estéril.
- Se tomaron explantes mayores de 2.5 cm haciendo con bisturí un corte de 45° en la base del tallo.

- Se sumergieron cada uno de explantes en agua destilada estéril.
- Se subcultivaron explantes en los medios de cultivo que mostraron el desarrollo de tejidos diferenciados (Brotos).
- Se tomaron con las pinzas estériles cada explante y se sembró uno por frasco con medio de cultivo.
- Se incubaron los explantes recién sembrados.

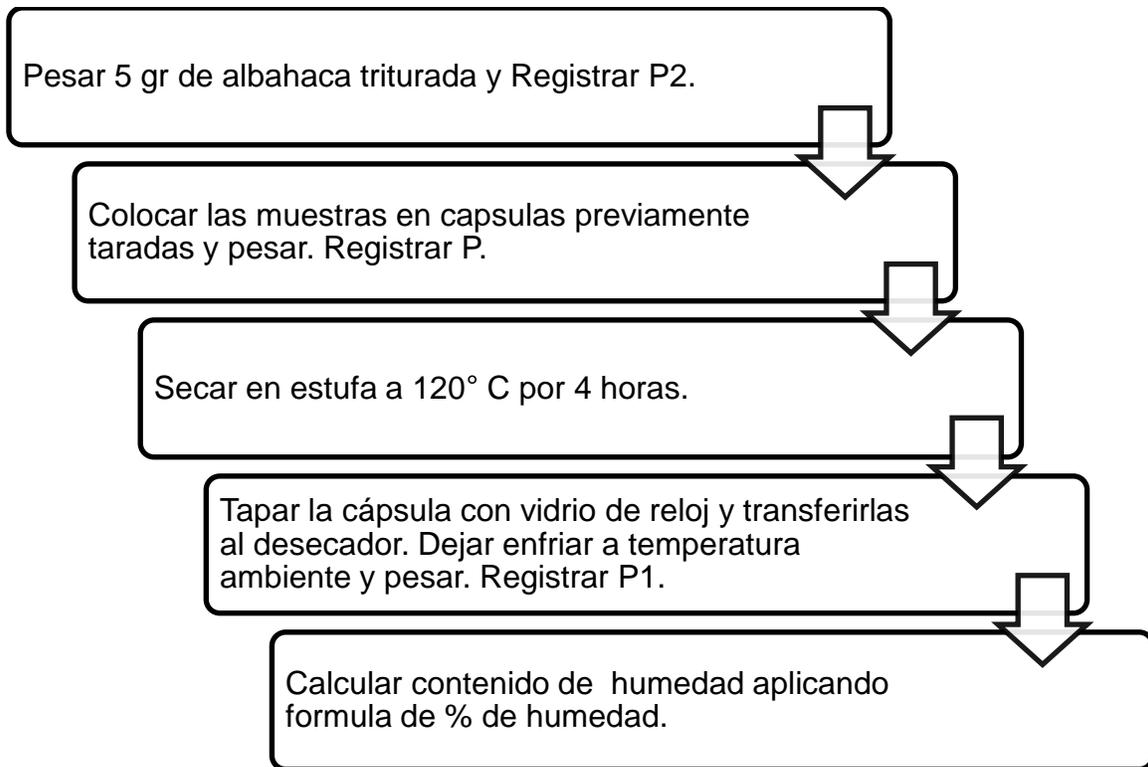
Este proceso puede realizarse cuantas veces sea necesario para obtener biomasa suficiente que será útil para la extracción de los compuestos de interés.

### 7. 3. Extracción

#### 7. 3. 1. Secado

La velocidad con que se seca el producto depende de la rapidez con que se desarrolla la transmisión de calor y la transferencia de materia.

Se entiende por humedad, la pérdida en peso que sufre un alimento al someterlo a las condiciones de tiempo y temperatura prescritos. Para tal determinación, se calculó de manera analítica la humedad de las muestras de albahaca cultivadas in vitro. La siguiente figura describe el proceso:



**Figura 12. Procedimiento de Secado para determinación de % de Humedad.**

$$\% \text{ humedad} = 100 - \left[ \frac{(P - P_1)}{P_2} \times 100 \right]$$

En donde:

P = Peso del recipiente con la muestra húmeda, en gramos.

P<sub>1</sub> = Peso del recipiente con la muestra seca.

P<sub>2</sub> = Peso de la muestra en gramos.

### 7. 3. 2. Determinación de extracto etéreo libre o materia grasa. Método de Soxhlet.

Una cantidad previamente homogeneizada, seca y molida de callos y follaje de *Ocimum basilicum* se sometió a una extracción con éter de petróleo. Posteriormente, se realizó la extracción total de la materia grasa libre por soxhlet siguiendo la metodología que se muestra a continuación.

- Se homogeneizo la muestra seca.
- Se molió en mortero.
- Se pesaron por duplicado de 4 gramos de muestra preparada en el dedal de extracción previamente pesado y tapado con algodón desgrasado. Se registró m.
- Se secó el matraz de extracción por 30 min a  $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- Se pesó el matraz de extracción a peso constante, se registró m1.
- Se colocó el matraz de extracción en el sistema soxhlet, el dedal en el tubo de extracción y se adiciono el solvente al matraz.
- Se extrajo la muestra con el solvente por 6 horas a una velocidad de condensación de 3 gotas/seg.
- Una vez terminada la extracción se separó el solvente por evaporación en rotavapor hasta que no se detectó olor a éter.
- Se secó el matraz con la grasa en estufa a  $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 10 min, se dejó enfriar en desecador y se pesó, se registró m2.

Cálculo y expresión de resultados

$$\% \text{ grasa cruda} = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100$$

Dónde:

m peso de la muestra

m1 tara del matraz solo

m2 peso matraz con grasa

Respetabilidad: La diferencia de los 2 resultados no debe ser superior al 2 % del promedio.

## **8. Resultados y Discusiones**

### 8.1. Establecimiento del cultivo

El cultivo de tejidos, como técnica, consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y proporcionarle artificialmente las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial. Se basa en el concepto de "totipotencialidad" de las células vegetales, que dice: "una célula vegetal o grupo de células colocadas en condiciones adecuadas es capaz de regenerar un individuo completo e idéntico al que le dio origen".

En el presente estudio se realizó una germinación de semillas de albahaca (*Ocimum basilicum*) in vitro de las cuales desarrollaron plantas madres donadoras de explantes. Se utilizaron dos variedades de semilla: Albahaca Verde Grande y Albahaca Verde Fina. Estas semillas recibieron un tratamiento de desinfección y fueron sembradas asépticamente en medio de cultivo MS, sin la adición de reguladores de crecimiento.

La incubación se realizó en estantes metálicos protegidos con paredes de unicel recubiertas de aluminio que ayudan a estabilizar la temperatura y aumentan el aprovechamiento de la luz. Se estableció el cultivo de tejidos vegetales con un fotoperiodo de 18 horas de iluminación y 6 horas de oscuridad. Se mantuvieron durante 3 meses para la Albahaca Verde Grande y 5 meses para la Albahaca Fina Verde a una temperatura de  $22.5 \pm 5$  °C.



Figura 13. Incubación de cultivos in vitro.

La luz es de vital importancia para el desarrollo de la plantas, en sus tejidos contienen el pigmento clorofila que es el responsable de la fotosíntesis, por medio de la cual las plantas fijan el  $\text{CO}_2$  atmosférico mediante la activación de la clorofila por la luz. La finalidad de este proceso es la producción de azúcares para las plantas, que a su vez produce oxígeno como desecho. En los cultivos in vitro se adicionaron 30 g / L de sacarosa a como fuente de carbono.

Cuando aumenta la intensidad de la iluminación, también aumenta la absorción de macronutrientes y micronutrientes. La temperatura es un parámetro que se debe observar a diario en el cuarto de cultivo. Para controlarla, se planeó encender la iluminación al anochecer hasta completar un periodo de 16 horas.

Por encima de los  $25^\circ\text{C}$  se observa una disminución en la fotosíntesis de la planta, ya que disminuye su capacidad de respiración, a esta temperatura la planta consume sus sustancias de reserva. Por debajo de los  $15^\circ\text{C}$  se observa una ralentización en el crecimiento de la planta, a  $0^\circ\text{C}$ , la planta puede helarse y morir.

El nivel de humedad más recomendable oscila entre 60 y 70%. La humedad elevada se produce dentro de los frascos de cultivo y no es necesario un control extraordinario de la misma.

Durante el periodo de incubación se aprecian diferencias en el desarrollo de cada planta, aun cuando estas se encuentran sometidas a las mismas condiciones medioambientales y nutrimentales, existen diferencias durante su crecimiento debido a las características genéticas propias de cada semilla.

El genotipo es el conjunto de los genes que posee la planta, los genes determinan las características que se heredan, de ellos dependen la calidad, la producción, la resistencia a las plagas el olor, el sabor y el color que van a tener cada una de las plantas. Para que las plantas logren expresar toda su carga genética es imprescindible que las condiciones de cultivo sean optimas, hablamos entonces del fenotipo o expresión de genes en un determinado ambiente.

Las plantas de Albahaca Grande Verde se desarrollan con mayor rapidez, al cabo de 90 días de incubación, las plantas mejor adaptadas han generado una gran cantidad de raíces primarias y secundarias, que abarcan casi la totalidad del medio de cultivo, también se pudo observar la aparición de raíces aéreas a lo largo del tallo. Las plantas con hojas ovaladas y dentadas de color verde intenso en la parte superior y un verde blanquecino en la contratara de las hojas, alcanzaron un tamaño hasta de un 13 mm de largo y 7 mm de ancho.

Las plantas de albahaca fina verde han generado callos en vez de raíces, así que su crecimiento es un tanto retardado, después de 70 días de incubación las plantas apenas inician a generar meristemos axilares y algunas raíces, posee hojas ovaladas de un verde intenso que no miden más de 7mm de largo y 3mm de ancho. Son necesarios 140 días de incubación para que las plantas desarrollen los suficientes brotes adventicios para realizar una micropropagación eficiente. Las plantas más grandes y con mayor cantidad de meristemos axilares y adventicios son seleccionadas para la obtención de explantes.

Posteriormente, se micropropagaron explantes de las plantas madre de ambas variedades de albahaca germinadas in vitro y establecidas en condiciones de asepsia. Usando el medio de cultivo MS como control y adicionando reguladores de crecimiento se prepararon las siguientes combinaciones de Auxina ANA en

concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L en combinación con la citoquinina BAP a 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/L, con la finalidad de generar tejidos diferenciados capaces de sintetizar el aceite esencial.

En los siguientes cuadros se puede observar el desarrollo de los explantes subcultivados en cada uno de los medios de cultivo. Se sembraron por triplicado 10 explantes en cada medio de cultivo y se promedió el número de ellos que mostró un cambio en presencia de las auxinas y citoquininas a distintas concentraciones.

#### 8. 1. 1. Brotes adventicios

EL objetivo de la micropropagación realizada es, precisamente la obtención de brotes adventicios viables para multiplicar de manera exponencial los explantes de ambas variedades de albahaca.

Es fácil distinguir entre las variedades de albahaca utilizadas para el experimento. En primer lugar, la albahaca hoja ancha posee tallos y hojas de mayores dimensiones, el tallo crece tan alto como el frasco lo permita, sus hojas dentadas del borde son de color verde por la parte superior y en la cara inferior de un verde blanquecino y produce brotes adventicios a lo largo del tallo. En segundo lugar, en la albahaca hoja fina crecen numerosos tallos que nacen desde la base del explante y alcanzan una altura de hasta 8 cm y conforme crece el tallo produce pequeñas hojas ovaladas.

Las figuras 14 y 15 muestran ejemplos de brotes adventicios obtenidos a partir de explantes de albahaca establecidos in vitro.



Figura 14. Formación de Brotes Adventicios en explantes de Albahaca Grande Verde.

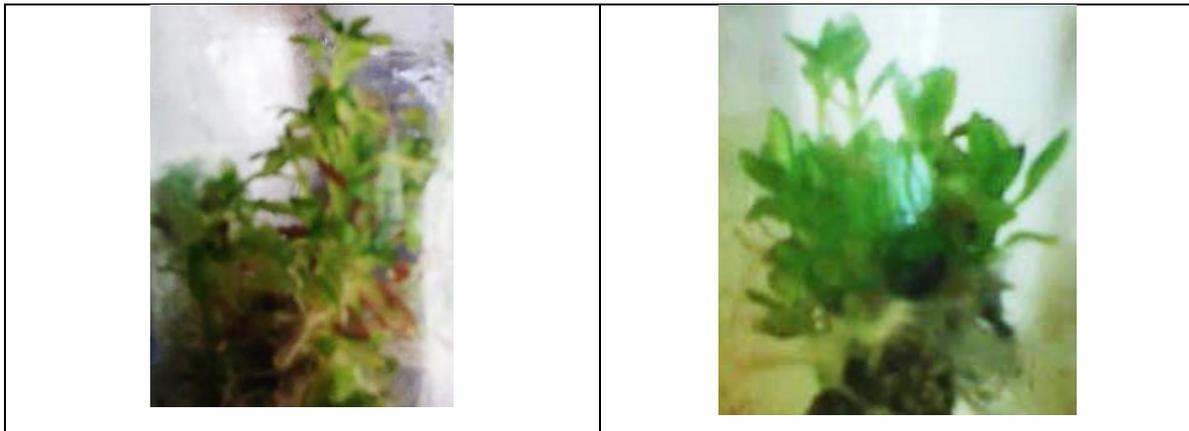


Figura 15. Formación de Brotes Adventicios en explantes de Albahaca Fina Verde.

Se comprobó experimentalmente que durante el subcultivo, el tamaño del explante influye significativamente en el crecimiento de brotes adventicios, los explantes menores a 1 cm tienden a formar callos sin la aparición de brotes adventicios. Para tal caso se han utilizado aquellos tallos mayores de 3 cm desprovisto de la mayor cantidad de hojas posible y sin dañar los meristemas apicales y axilares. Los tejidos juveniles presentan frecuentemente una mayor aptitud para la organogénesis, que los tejidos que provienen de órganos adultos o senescentes. A continuación se muestra el porcentaje de explantes que produjeron brotes adventicios con diferentes tratamientos.

Tabla 4. Desarrollo de brotes adventicios durante la micropropagación de Albahaca Grande Verde.

Porcentaje de Desarrollo de Brotes Adventicios en Cultivo in vitro de la Albahaca Grande Verde					
	Control	0.5 mg/L ANA	1.0 mg/L ANA	1.5 mg/L ANA	2.0 mg/L ANA
Control	0 %	13 %	36 %	26 %	30 %
0.5 mg/L BAP	0 %	0 %	53 %	26 %	36 %
1.0 mg/L BAP	3 %	16 %	26 %	0 %	13 %
1.5 mg/L BAP	16 %	0 %	0 %	0 %	0 %
2.0 mg/L BAP	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó un promedio general del 11.76% de desarrollo de brotes adventicios en los explantes de albahaca verde grande. El tratamiento de 1.0 mg/ L ANA + 0.5 mg/L BAP favoreció la aparición de brotes adventicios en el 53% de las repeticiones. Para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de varianza (anexo 2) en el cual se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados.

La tabla 5 muestra la producción de brotes adventicios en explantes de albahaca fina verde en diferentes tratamientos.

Tabla 5. Desarrollo de brotes adventicios durante la micropropagación de Albahaca Fina Verde.

Porcentaje de Desarrollo de Brotes Adventicios en Cultivo in vitro de la Albahaca Fina Verde					
	Control	0.5 mg/L ANA	1.0 mg/L ANA	1.5 mg/L ANA	2.0 mg/L ANA
Control	0 %	13 %	0 %	3 %	0 %
0.5 mg/L BAP	40 %	16 %	56 %	10 %	0 %
1.0 mg/L BAP	13 %	0 %	6 %	0 %	6 %
1.5 mg/L BAP	3 %	13 %	0 %	33 %	0 %
2.0 mg/L BAP	0 %	6 %	0 %	3 %	26 %

El promedio general es de 9.88% de explantes que desarrollaron brotes adventicios, esta variedad se caracterizó por desarrollar numerosos brotes a partir de un solo explante, esta planta tiene hojas y tallos pequeños a comparación de la variedad verde grande. El tratamiento que contenía 1.0 mg/L de ANA y 0.5 mg/L BAP ha producido brotes adventicios con mayor frecuencia.

Para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de varianza (anexo 2) en el cual se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados.

A medida que crecen, los explantes de albahaca hoja fina producen un callo en la base del tallo el cual produce brotes adventicios. Cada explante es capaz de producir alrededor de 40 brotes transcurridos 250 días de incubación. En este

periodo se comienza a agotar el medio de cultivo y es el momento adecuado de realizar un nuevo subcultivo.

#### 8. 1. 2. Crecimiento de Callo

Una vez colocados los explantes en el medio de cultivo, la desdiferenciación celular es causa de formación de callos. Durante la incubación se puede observar el crecimiento amorfo de los explantes, iniciando por el tallo que está en contacto con el medio, seguido del resto del explante. Los callos de Albahaca se caracterizan por tener un aspecto granular, de color verde, amarillento y marrón en las zonas oxidadas.

Usando técnicas de cultivo de tejidos vegetales la formación de callos puede ser inducida en numerosos explantes de albahaca. Un callo es una masa amorfa surgida de la proliferación de células del parénquima. Frecuentemente es el resultado de una herida, un callo se forma en el corte de un tallo o raíz. Los callos no tienen patrones predecibles de organización.

La característica general del crecimiento de callos, abarca una compleja relación entre el material usado para iniciar los callos, la composición del medio, y las condiciones durante el período de incubación. Algunos desarrollos de callos son de textura dura, los que no se pueden separar fácilmente en pequeños fragmentos. Existen también los callos frágiles que se separan fácilmente. Su anatomía, es de variación considerable a lo largo de la diferenciación celular.

Después que el callo ha crecido se vuelve necesario pasarlo a un medio fresco. El crecimiento en un mismo medio por un período extenso, provocará el agotamiento de nutrientes y una desecación gradual del medio de cultivo por la pérdida del agua. Los metabolitos secretados por los callos, se pueden acumular en niveles tóxicos en el medio. La transferencia del fragmento del callo debe ser suficiente para asegurar el nuevo crecimiento en el medio fresco. Si el inóculo transferido es muy pequeño, va a exhibir una tasa de crecimiento muy baja, o no va a crecer. Se observó buen desarrollo en explantes de entre 0.5 y 1 cm.

Un callo puede ser subdividido con pinzas o con un bisturí, y transferido directamente a la superficie del nuevo medio. Los callos duros deben ser transferidos a la superficie de una caja de Petri, esterilizada, y fragmentado con un bisturí. Solamente se debe transferir tejido sano, el tejido marrón, necrótico debe ser eliminado. Las figuras 16 y 17 muestran ejemplos de callos obtenidos durante la experimentación.

	
Figura 16. Crecimiento de Callo de explante de Albahaca Grande Verde.	Figura 17. Crecimiento de Callo en explante de Albahaca Fina Verde.

En la siguiente tabla se muestran el porcentaje de desarrollo de callo, se subcultivaron 3 lotes de 10 repeticiones para cada tratamiento. Se realizaron observaciones periódicas para apreciar el desarrollo de los tejidos de albahaca.

La tabla 6 muestra el porcentaje de explantes que presentaron formación de callo a partir de explantes de albahaca grande verde.

Tabla 6. Crecimiento de Callo durante la micropropagación de Albahaca Grande Verde.

Porcentaje de Crecimiento de Callo en Cultivo in vitro de la Albahaca Grande Verde					
	Control	0.5 mg/L ANA	1.0 mg/L ANA	1.5 mg/L ANA	2.0 mg/L ANA
Control	<b>33%</b>	<b>76 %</b>	<b>53 %</b>	<b>73 %</b>	<b>83%</b>
0.5 mg/L BAP	<b>53%</b>	<b>83 %</b>	<b>43 %</b>	<b>43 %</b>	<b>46 %</b>
1.0 mg/L BAP	<b>33%</b>	<b>70 %</b>	<b>83 %</b>	<b>90 %</b>	<b>63 %</b>
1.5 mg/L BAP	<b>43 %</b>	<b>83 %</b>	<b>83 %</b>	<b>63 %</b>	<b>63 %</b>
2.0 mg/L BAP	<b>73 %</b>	<b>73 %</b>	<b>93 %</b>	<b>73 %</b>	<b>73 %</b>

El 65.8% de los tratamientos presentaron formación de callo. Incluso en el medio de cultivo desprovisto de reguladores de crecimiento se observa la formación de callos. Para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de varianza (anexo 2) en el cual se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados.

A continuación se muestra la producción de callo durante la micropropagación de Albahaca Fina Verde. Los explantes subcultivados desarrollaron callos a partir del tallo en contacto con el medio de cultivo, el callo incrementa de tamaño rápidamente a diferencia del tejido diferenciado.

Tabla 7. Crecimiento de Callo durante la micropropagación de Albahaca Fina Verde.

Porcentaje de Crecimiento de Callo en Cultivo in vitro de la Albahaca Fina Verde					
	Control	0.5 mg/L ANA	1.0 mg/L ANA	1.5 mg/L ANA	2.0 mg/L ANA
Control	<b>46 %</b>	<b>66 %</b>	<b>53%</b>	<b>36 %</b>	<b>43%</b>
0.5 mg/L BAP	<b>66 %</b>	<b>53%</b>	<b>36 %</b>	<b>46%</b>	<b>56 %</b>
1.0 mg/L BAP	<b>63%</b>	<b>46 %</b>	<b>53%</b>	<b>80 %</b>	<b>66%</b>
1.5 mg/L BAP	<b>53 %</b>	<b>70 %</b>	<b>73%</b>	<b>73%</b>	<b>66%</b>
2.0 mg/L BAP	<b>43 %</b>	<b>73%</b>	<b>66%</b>	<b>86 %</b>	<b>70%</b>

El 59.28% de los explantes subcultivados presento formación de callo. Este tipo de crecimiento es favorable en condiciones in vitro para la planta de estudio. Para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de varianza (anexo 2) en el cual se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados.

Al resembrar callos se obtienen grandes cantidades de explantes. Estos callos con aspecto granular son de textura suave y se fraccionan con facilidad. Para minimizar el estrés causado a los explantes de callos de albahaca se tomaron fracciones del callo con pinzas estériles y se subcultivaron inmediatamente en un frasco con medio de cultivo, hasta repartir todo el tejido en diferentes frascos.

Los callos de albahaca grande verde producen más explantes y se mantienen en crecimiento aun cuando su apariencia es de oxidación, después de 120 días de

incubación se subcultivaron los callos y los tratamientos que generaron mayor cantidad de explantes se muestran en la tabla 8:

Tabla 8. Producción de explantes de callo obtenidos de los tratamientos aplicados durante la micropropagación de la albahaca.

<b>Albahaca hoja ancha</b>	<b>N° de explantes promedio</b>	<b>Albahaca fina verde</b>	<b>N° de explantes promedio</b>
BAP 2.0	21	ANA 1.5 / BAP 1.0	13
ANA 1.5 / BAP 2.0	18	ANA 1.5 / BAP 2.0	9
ANA 1.0 / BAP 2.0	17	ANA 0.5 / BAP 1.0	7
ANA 2.0 / BAP 2.0	15	ANA 0.5 / BAP 2.0	6
ANA 1.0 / BAP 1.5	13	ANA 0.5 / BAP 1.5	6
ANA 1.0 / BAP 2.0	10		
ANA 2.0	8		

La estimulación del desarrollo de callos en cultivo in vitro resulta del empleo de citoquinas y auxinas; sin embargo, también se observó este fenómeno en los medios de cultivo desprovisto de los reguladores de crecimiento. Los explantes se adaptan al medio de cultivo y tienden a formar callos a partir de tallo. A su vez, los callos son fuente de numerosos explantes. Es recomendable su utilización para la recolección de grandes cantidades de tejido vegetal.

### 8. 1. 3. Rizogénesis

La rizogénesis es el fenómeno de organogénesis más generalmente implicado en la multiplicación vegetativa, el material utilizado debe ser siempre apto para la neoformación de raíces. La falta de formación de raíces es un factor limitante en la micropropagación.



Figura 18 Rizogénesis en explantes de  
Albahaca Grande Verde.



Figura 19. Rizogénesis en explantes de  
Albahaca Verde Fina.

El estudio de la rizogénesis pretende cada vez más tener en cuenta las interacciones complejas de factores, pero queda dominado por el problema de la regulación hormonal y en particular por el papel de las auxinas en la organogénesis. Se ha observado que la presencia de la auxina ANA favorece la rizogénesis en los cultivos in vitro de albahaca.

La formación de raíces en los explantes de albahaca es de gran importancia para la micropropagación de esta especie, el aporte de nutrientes al explante y desarrollo de brotes adventicios se ven incrementados cuando las raíces se extienden por el medio de cultivo.

Es un proceso prologado, al cabo de 50 a 60 días de incubación se pueden observar la aparición de meristemos de raíces aéreas que a medida que crecen, se acercan a medio de cultivo hasta introducirse en él. Los tratamientos que favorecieron la rizogénesis se enlistan en las tablas 9 y 10.

Tabla 9. Rizogénesis durante la micropropagación de Albahaca Grande Verde.

Porcentaje de Rizogénesis en Cultivo in vitro de la Albahaca Grande Verde					
	Control	0.5 mg/L ANA	0.5 mg/L ANA	0.5 mg/L ANA	0.5 mg/L ANA
Control	<b>23 %</b>	<b>40 %</b>	<b>66%</b>	<b>70 %</b>	<b>56%</b>
0.5 mg/L BAP	<b>13 %</b>	<b>23 %</b>	<b>83 %</b>	<b>56 %</b>	<b>73 %</b>
1.0 mg/L BAP	<b>0 %</b>	<b>13 %</b>	<b>80 %</b>	<b>63 %</b>	<b>60 %</b>
1.5 mg/L BAP	<b>13 %</b>	<b>46 %</b>	<b>56 %</b>	<b>46 %</b>	<b>76 %</b>
2.0 mg/L BAP	<b>3 %</b>	<b>53 %</b>	<b>43 %</b>	<b>76 %</b>	<b>40%</b>

Se observó el fenómeno de rizogénesis en el 46.84% de los explantes subcultivados, la presencia de la auxina ANA favoreció la aparición de raíces en el explante. También se observó la rizogénesis en el medio desprovisto de reguladores, esto indica la presencia de auxinas endógenas en la planta de estudio.

Para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de varianza (anexo 2) en el cual se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados.

Tabla 10. Rizogénesis durante la micropropagación de Albahaca Fina Verde.

Porcentaje de Rizogénesis en Cultivo in vitro de la Albahaca Fina Verde					
	Control	0.5 mg/L ANA	1.0 mg/L ANA	1.5 mg/L ANA	2.0 mg/L ANA
Control	<b>13 %</b>	<b>43 %</b>	<b>30%</b>	<b>46 %</b>	<b>23 %</b>
0.5 mg/L BAP	<b>70 %</b>	<b>66 %</b>	<b>76 %</b>	<b>56 %</b>	<b>63 %</b>
1.0 mg/L BAP	<b>56 %</b>	<b>63 %</b>	<b>63 %</b>	<b>86 %</b>	<b>63 %</b>
1.5 mg/L BAP	<b>43 %</b>	<b>16 %</b>	<b>80 %</b>	<b>83 %</b>	<b>40 %</b>
2.0 mg/L BAP	<b>50 %</b>	<b>26 %</b>	<b>83 %</b>	<b>76 %</b>	<b>73 %</b>

En la albahaca fina verde la rizogénesis se presentó en el 55.48% del cultivo, sus raíces filamentosas crecen y se extienden en la superficie del medio cultivo. También fue posible observar la rizogénesis sobre los callos de albahaca, es decir un desarrollo de raíces aéreas, están son de color marfil y de textura algodonosa.

Para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de varianza (anexo 2) en el cual se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados.

La formación de raíces depende también de factores ligados al origen del explante es decir:

- Factores genéticos de una misma especie, algunos explantes enraízan con facilidad, mientras que otros no.
- Las reservas aportadas por el explante, en particular glúcidos, que favorecen la rizogénesis.

- La edad de la planta madre: los explantes obtenidos de vegetales jóvenes tienen generalmente mejor aptitud para la formación de raíces que las provenientes de plantas más viejas.

#### 8. 1. 4. Crecimiento del tallo

El crecimiento del tallo no significa siempre un desarrollo favorable. En ocasiones este se extiende sin que se desarrollen nuevos brotes adventicios; sin embargo es importante analizar la influencia de los reguladores de crecimiento durante el cultivo in vitro.

	
<p>Figura 20. Crecimiento del tallo en cultivos in vitro de Albahaca Grande Verde.</p>	<p>Figura 21. Crecimiento del tallo en cultivos in vitro de Albahaca Fina Verde.</p>

Las tablas 11 y 12 muestran el porcentaje de explantes que presentaron desarrollo de tallo con los diferentes tratamientos aplicados.

Tabla 11. Crecimiento del tallo durante la micropropagación de Albahaca Grande Verde.

Porcentaje de Crecimiento de Tallo en Cultivo in vitro de la Albahaca Grande Verde					
	Control	0.5 mg/L ANA	1.0 mg/L ANA	1.5 mg/L ANA	2.0 mg/L ANA
Control	23 %	13 %	43 %	23 %	13 %
0.5 mg/L BAP	0 %	13 %	66 %	23 %	33 %
1.0 mg/L BAP	0 %	13 %	23 %	0 %	0 %
1.5 mg/L BAP	13 %	0 %	0 %	0 %	0 %
2.0 mg/L BAP	0 %	13 %	0 %	13 %	0 %

Se pudo observar un 13% de crecimiento de tallo en el cultivo de albahaca grande verde, en esta variedad de albahaca la altura de la planta es considerable, dentro del frasco de cultivo es un factor limitante para el desarrollo in vitro.

Para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de varianza (anexo 2) en el cual se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados.

Tabla 12. Crecimiento del tallo durante la micropropagación de Albahaca Fina Verde.

Porcentaje de Crecimiento de Tallo en Cultivo in vitro de la Albahaca Fina Verde					
	Control	0.5 mg/L ANA	1.0 mg/L ANA	1.5 mg/L ANA	2.0 mg/L ANA
Control	<b>0 %</b>	<b>13 %</b>	<b>3 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>
0.5 mg/L BAP	<b>46 %</b>	<b>36 %</b>	<b>66 %</b>	<b>13 %</b>	<b>33 %</b>
1.0 mg/L BAP	<b>26 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>
1.5 mg/L BAP	<b>33 %</b>	<b>3 %</b>	<b>0 %</b>	<b>33 %</b>	<b>0 %</b>
2.0 mg/L BAP	<b>20 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>	<b>13 %</b>	<b>0 %</b>

Se observó el desarrollo del callo en 12.96% del cultivo, esta variedad de albahaca es de una altura inferior a la variedad verde grande, las características de los explantes son adecuadas para el cultivo in vitro.

Para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de varianza (anexo 2) en el cual se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados.

Los tallos de albahaca hoja ancha son de mayores dimensiones, desarrolla entre 12 y 15 brotes adventicios por planta, el tallo de la albahaca hoja fina es de menor tamaño pero mayor produce gran cantidad de hojas y explantes.

#### 8. 1. 5. Oxidación

La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados in vitro, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como,

la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular.

La excreción de compuestos fenólicos ocasiona un oscurecimiento del medio e incluso, del mismo explante con una eventual inhibición del crecimiento. En la etapa de establecimiento in vitro, luego de ser cortados, muchos de los explantes empiezan a perder el color verde e inician un oscurecimiento, liberando frecuentemente exudados oscuros al medio de cultivo, cuya naturaleza no es precisa, pero se conoce que son una mezcla compleja de sustancias fenólicas.

Los resultados obtenidos muestran el porcentaje de explantes que se ha oxidado durante la incubación, en la mayoría de los casos la división celular y el crecimiento es apreciable incluso cuando el explante está totalmente oxidado, sobre todo en callos de la albahaca grande verde.

La oxidación también es producida cuando las condiciones de cultivo (Aporte de Nutrientes, Temperatura, Humedad e Iluminación) no son adecuadas para el desarrollo del explante.



Figura 22. Oxidación de explantes de Albahaca.

Es posible regenerar callos oxidados al resembrarlos e incubarlos bajo las condiciones adecuadas. Las tablas 13 y 14 muestran los porcentajes de oxidación de los explantes cultivados bajo condiciones in vitro.

Tabla 13. Oxidación de explantes de Albahaca Grande Verde subcultivados In vitro.

Porcentaje de Oxidación en Cultivo in vitro de la Albahaca Grande Verde					
	Control	0.5 mg/L ANA	1.0 mg/L ANA	1.5 mg/L ANA	2.0 mg/L ANA
Control	<b>66 %</b>	<b>63 %</b>	<b>66 %</b>	<b>70 %</b>	<b>83 %</b>
0.5 mg/L BAP	<b>53 %</b>	<b>46 %</b>	<b>43 %</b>	<b>66 %</b>	<b>53 %</b>
1.0 mg/L BAP	<b>56 %</b>	<b>26 %</b>	<b>43 %</b>	<b>23 %</b>	<b>70 %</b>
1.5 mg/L BAP	<b>43 %</b>	<b>33 %</b>	<b>33 %</b>	<b>66 %</b>	<b>56 %</b>
2.0 mg/L BAP	<b>26 %</b>	<b>46 %</b>	<b>36 %</b>	<b>43 %</b>	<b>83 %</b>

La oxidación se presentó en el 51.68% del cultivo in vitro. Esta es la principal causa de muerte del explantes subcultivados.

Para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de varianza (anexo 2) en el cual se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados.

Tabla 14. Oxidación de explantes de Albahaca Fina Verde subcultivados In vitro.

Porcentaje de Oxidación en Cultivo in vitro de la Albahaca Fina Verde					
	Control	0.5 mg/L ANA	1.0 mg/L ANA	1.5 mg/L ANA	2.0 mg/L ANA
Control	56 %	46 %	43 %	26 %	43 %
0.5 mg/L ANA	23 %	26 %	36 %	46 %	53 %
1.0 mg/L ANA	56 %	53 %	16 %	20 %	73 %
1.5 mg/L ANA	36 %	30 %	13 %	23 %	60 %
2.0 mg/L ANA	33 %	50 %	36 %	63 %	46 %

En el cultivo de la variedad verde fina, se presentó el 40.24% de oxidación de los explantes subcultivados. Para el análisis estadístico de los datos se realizó un análisis de varianza (anexo 2) en el cual se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados

No todos los exudados liberados al medio de cultivo son inhibitorios o tóxicos, pero en la mayoría de los casos el crecimiento del explante es inhibido, perdiendo gradualmente su capacidad de proliferar y, si no se remedia la situación, puede morir.

La toxicidad de los exudados esta en relación con el incremento en la producción de compuestos fenólicos ya que estos son oxidados para formar quinonas, debido a la actividad de enzimas oxidativas, y posteriormente polimerizados.

## 8. 2. Organogénesis directa

Ha sido posible la obtención de raíces, brotes adventicios y la regeneración de plantas enteras a partir de los explantes de albahaca. Para la micropropagación de las dos variedades de albahaca se propone el siguiente procedimiento:

- a) Preparar medio de cultivo MS y germinar in vitro las semillas de albahaca, incubar a 25°C, con una elevada humedad ambiental y un fotoperiodo programado a 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad. Para la albahaca hoja ancha se considera adecuado un periodo de incubación de 90 días y 130 días en el caso de la albahaca hoja fina.
- b) Tomar explantes a modo de esquejes de las plantas germinadas in vitro, realizar la selección de aquellas plantas cuyas características de desarrollo y adaptación a las condiciones in vitro sean visiblemente superiores; subcultivar en medio de cultivo MS enriquecido con 1.0 mg/L de ANA y 0.5 mg/L BAP e incubar nuevamente en las condiciones antes mencionadas. Para la albahaca hoja ancha se considera adecuado un periodo de incubación de 120 días y 210 días en el caso de la albahaca hoja fina.
- c) Finalmente se realiza un nuevo subcultivo en medio de cultivo MS enriquecido con 1.0 mg/L de ANA y 0.5 mg/L BAP. Incubar y repetir este último paso.

La observación periódica del cultivo es necesaria para detectar problemas de oxidación o contaminación microbiológica, así como para corregir variaciones en la temperatura del cuarto de cultivo.

Para la albahaca grande verde ha sido posible obtener hasta 12 explantes de cada planta madre, durante la incubación desarrolla nuevos brotes que se convertirá en explantes, la supervivencia del subcultivo es de 57%. En el caso de la albahaca hoja fina se han obtenido hasta 46 brotes adventicios de un solo explante, además, con este tratamiento se tiene una supervivencia del 64%.

### 8. 3. Extracción

#### 8. 3. 1. Secado

En capsulas de porcelana taradas, se secaron en estufa a 100°C durante 4 horas y por triplicado lotes de 5g de albahaca. Trascurrido este tiempo, las muestras se colocaron dentro de un desecador de vidrio con sílice por 20 minutos y se pesaron en una balanza analítica. En el cuadro 23 se muestra el porcentaje de humedad contenido en las plantas y en callos de la albahaca propagados in vitro.

**Tabla 15. Porcentaje de humedad en plantas y callos de albahaca propagada in vitro.**

Muestra	Humedad (%)
Plantas de albahaca grande verde	95.34 ± 0.1
Callos de albahaca grande verde	94.56 ± 0.1
Plantas de albahaca fina verde	95.48 ± 0.1
Callos de albahaca fina verde	94.16 ± 0.1

Posteriormente, se secaron en estufa 3 lotes de 8g de albahaca. Las muestras fueron colocadas dentro de la estufa a 35 °C. Durante este proceso se pesó en balanza analítica cada media hora y se calculó la humedad para elaborar curvas de secado, muestran la perdida de agua a través del tiempo a una temperatura dada y ayudan a predecir el tiempo de secado necesario para eliminar el agua libre contenía en las muestras a una temperatura de 35°C.

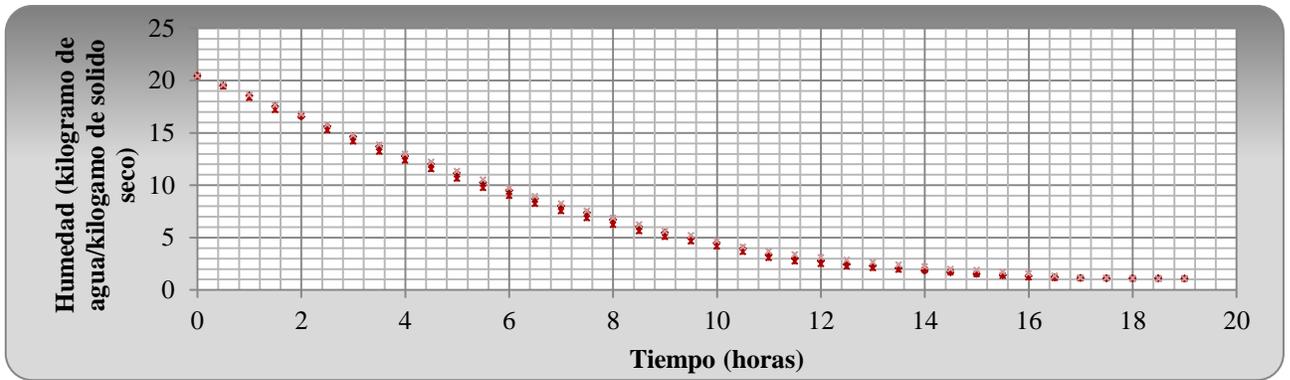


Figura 23. Curva de Secado de plantas Albahaca Grande Verde.

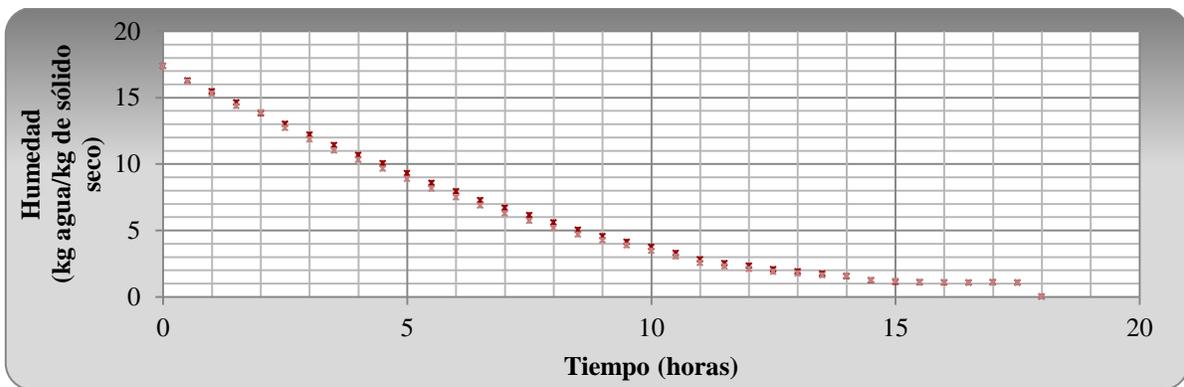


Figura 24. Curva de secado de callos de Albahaca Grande verde.

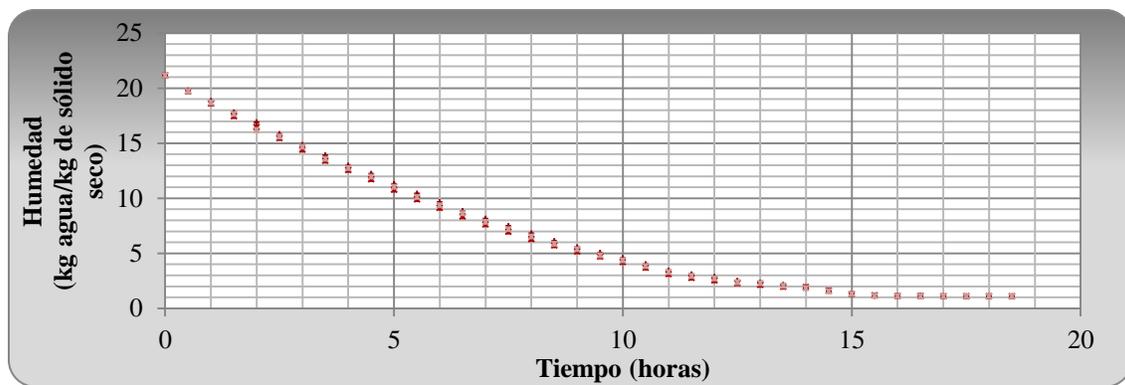


Figura 25. Curva de secado de plantas de Albahaca Fina Verde.

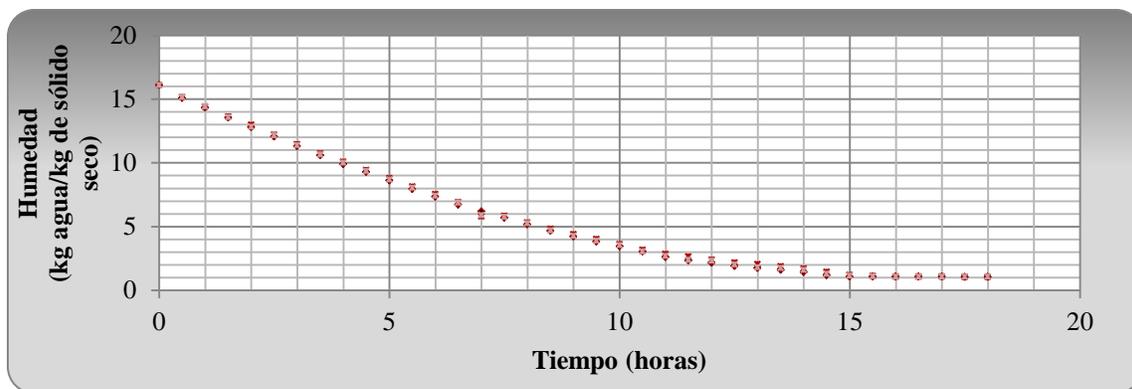


Figura 26. Curva de Secado de callos de Albahaca Fina Verde.

Las curvas de secado muestran las cinéticas de secado globales, se observó que la rapidez de secado es mayor en el periodo velocidad creciente. En la primera fase la humedad del material es suficiente para mantener una condición saturada en la superficie del mismo. El segundo periodo la condición del material no es suficientemente húmeda en la superficie de las hojas y tallos de albahaca, presentándose un fenómeno de contracción del material debido a la eliminación del agua retenida en las paredes celulares y los poros del sólido. Finalmente, en la última fase del secado, se transportan algunas moléculas de agua de la monocapa que están adheridas al sólido como parte del agua ligada. La temperatura de secado no es suficiente para arrancar el agua ligada y llevar al material a una actividad de agua inferior.

El secado de la albahaca es un punto crítico previo a la extracción. Su finalidad es eliminar la humedad preservando los compuestos volátiles de las muestras. De acuerdo a las observaciones realizadas, son necesarias 18 horas de secado a 35°C para acondicionar las muestras para la extracción.

### 8. 3. 2. Determinación del extracto etéreo de albahaca por el método de Soxhlet.

Se realizó por duplicado de manera cuantitativa la determinación del extracto etéreo de las muestras de plantas y callos de albahaca de las variedades albahaca hoja ancha y albahaca hoja fina, utilizando un equipo Soxhlet. Fueron necesarios 125 ml de éter de petróleo a temperatura de ebullición para un reflujo

de 6 horas a una velocidad de condensación de 3 gotas por segundo. En cada extracción se usaron  $4 \pm 0.01\text{g}$  de muestra.

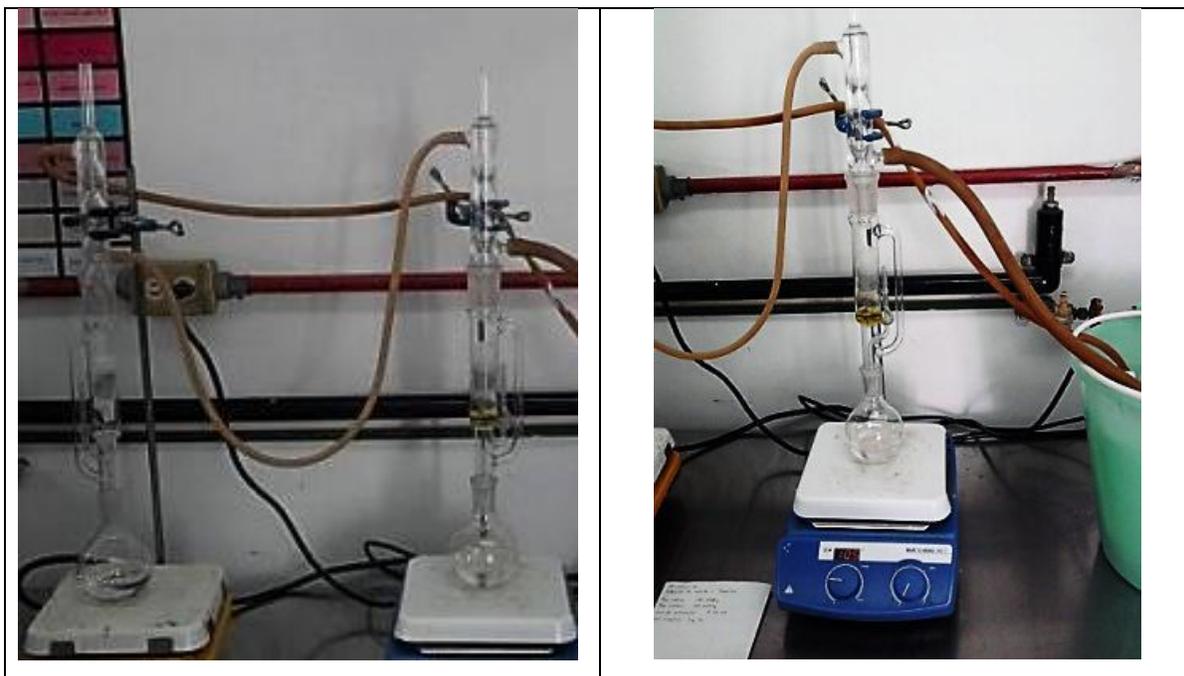


Figura 27. Extracción de compuestos solubles en éter por el método de Soxhlet.

Una vez finalizado el tiempo de extracción se destiló el éter de petróleo con ayuda de un rota vapor Yamato Rotary Evaporator RE500, a  $60^\circ\text{C}$  y 30 rpm durante 8 minutos.

Se utilizaron matraces de bola, aforados y a peso constante; se registró el peso antes y después de la extracción y mediante diferencia de pesos se calculó el porcentaje de extracto etéreo contenido en las muestras analizadas. La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos en la extracción realizada por el método de Soxhlet.

La extracción se aplicó a muestras de planta y callo de albahaca de las variedades grande verde y verde fina. Para tener un punto de comparación, se realizó el mismo proceso de secado y extracción a una muestra de albahaca proveniente del mercado local, esta planta fue cultivada en condiciones normales.

La tabla 16 muestra el contenido de extracto etéreo obtenido en las diferentes muestras de albahaca analizadas.

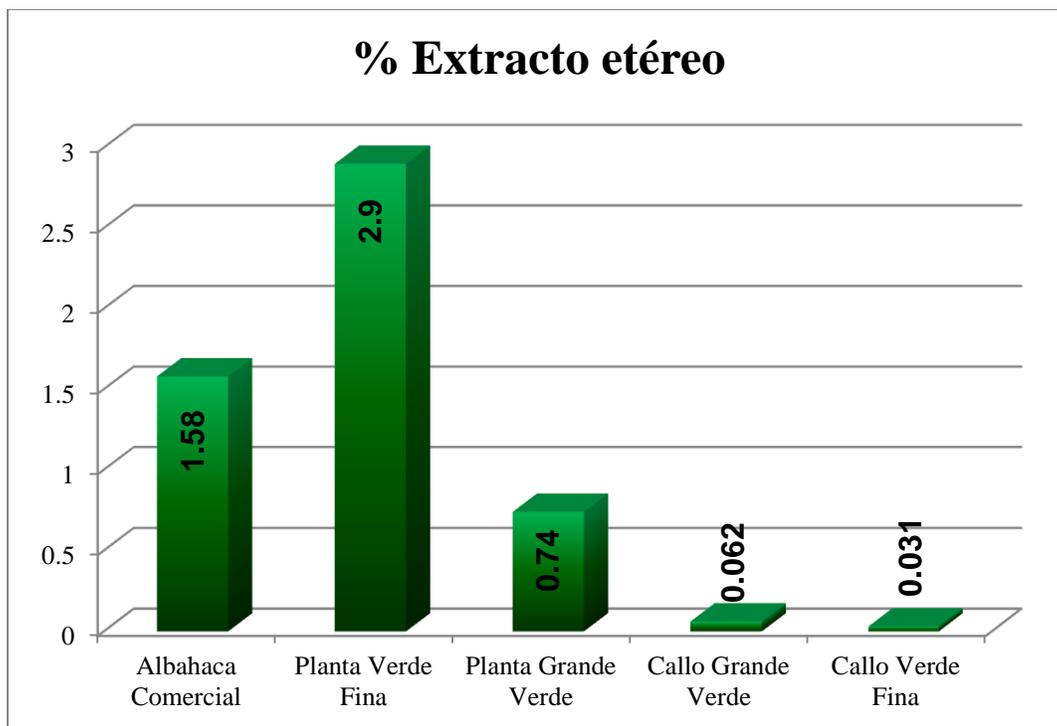
Tabla 16. Porcentaje de extracto etéreo contenido en plantas y callos de albahaca (*Ocimum basilicum*).

Tipo de muestra	Extracto etéreo	Gramos de extracto etéreo por kg de albahaca seca
Albahaca Grande Verde del mercado local	1.584 %	15.84
Plantas de albahaca var. Grande Verde	0.742 %	7.42
Callos de albahaca var. Grande Verde	0.062 %	0.62
Plantas de albahaca var. Fina Verde	2.903 %	29.03
Callos de albahaca Fina Verde	0.031 %	0.31

De las muestras analizadas, las plantas de Albahaca Fina Verde presentaron mayor porcentaje de extracto etéreo, seguido de las plantas de Albahaca adquiridas en el mercado; sin embargo, las plantas de albahaca verde grande cultivadas in vitro produjeron menos del 1% de extracto etéreo. Esto se puede deber a que en el cultivo in vitro las plantas solo desarrollaron tallo y hojas sin flores a diferencia de las muestras adquiridas en el mercado que si presentaban flores.

Los callos de ambas variedades tienen la capacidad de producir aceites esenciales; sin embargo, no se obtuvieron rendimientos favorables por lo que la técnica de cultivo de tejidos vegetales no es viable para la producción compuestos terpénicos a partir de los callos de albahaca.

En la figura 28 se aprecian de manera gráfica los rendimientos en porcentaje de extracto etéreo obtenidos de la presente investigación.



**Figura 28. Extracto etéreo en plantas y callos de Albahaca micropropagada in Vitro.**

En el método de extracción con solventes volátiles, la muestra seca y molida se puso en contacto con solventes orgánicos. Estos compuestos solubilizan el aceite esencial, pero también extraen otras sustancias como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio, pues a nivel industrial resulta costoso por el alto valor comercial de los solventes y porque se obtienen esencias mezcladas con otras sustancias.

Existen métodos para caracterizar el extracto obtenido tales como la espectrometría infrarroja y la cromatografía de gases; sin embargo, no están consideradas dentro del presente estudio.

## **Conclusiones**

Al término de la investigación realizada se pudo comprobar que las plantas de albahaca propagadas in vitro son capaces de producir aceite esencial tal como lo harían en condiciones normales de cultivo.

El mayor rendimiento de extracto etéreo se obtuvo de las plantas de albahaca fina verde (2.90%) seguido de la muestra de referencia (1.58%) y en menores cantidades la albahaca grande verde (0.74%) y los callos de ambas variedades (<0.1%). Los resultados sugieren la albahaca fina verde es viable para la producción de aceite esencial a partir de cultivos in vitro.

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales permitieron la micropropagación de *O. basilicum* a partir de explantes provenientes de plantas madre geminadas in vitro. Los tejidos de ambas variedades de albahaca se desarrollaron de manera adecuada bajo condiciones in vitro y se observó el crecimiento de brotes adventicios, callos, tallos y raíces a partir del tejido subcultivado.

La organogénesis directa se ve favorecida adicionando al medio de cultivo MS, 1.0 mg/L de ANA y 0.5 mg/L de BAP. Tanto en la variedad Grande Verde como en la variedad Fina Verde este tratamiento es recomendable para la producción de brotes.

La presencia de la citoquinina BAP influye de manera positiva en la formación de brotes adventicios. También se le relaciona con la formación de callos principalmente en el tejido directamente en contacto con el medio de cultivo. La auxina ANA favorece la rizogénesis en la base del tallo y la aparición de callos en ambas variedades de albahaca.

La variedad de Albahaca Verde Fina produce más brotes por explante y muestra una mejor adaptación a las condiciones de cultivo in vitro. Su tamaño es reducido y su crecimiento retardado. La variedad de Albahaca Verde Grande produce hojas de gran tamaño y sus tallos se desarrollan tanto como lo permita el tubo de cultivo, su producción de brotes es limitada.

## **Sugerencias**

El primer paso para realizar cualquier micropropagación consiste en asegurarse de contar con los recursos necesarios para este proceso, estos son:

- Cuarto de cultivo.
- Medio de cultivo.
- Material Vegetal.
- Material de laboratorio.

El cuarto de cultivo debe contar con un sistema de iluminación fluorescente y una temperatura estable para que las plantas se desarrollen de manera adecuada y evitemos que los factores externos influyan en el desarrollo de las mismas. Nos podemos auxiliar de un “timer” que sea programado para que el encendido y apagado de las luces se realice de manera automática. También es de utilizad contar con un termómetro que nos indique la temperatura al interior del cuarto de cultivo. Una fuente de calor si la temperatura es baja y un sistema de ventilación en caso de que la temperatura aumente.

Existen en el mercado gavetas de cultivo, estas proveen de las condiciones de iluminación y temperatura adecuadas para la micropropagación, la principal limitante de estas es su elevado costo; pero, si se cuenta con una es de gran ayuda para obtener datos más confiables ya que las condiciones ambientales externas no influyen en la experimentación.

El principal medio de cultivo utilizado es el MS. Debe ser vertido en frascos de vidrio perfectamente lavados y esterilizarse en autoclave antes de ser usado. Dejar enfriar y solidificar en el lugar donde se realizara la micropropagación.

Una vez que ha seleccionado la planta de estudio, es necesario buscar la mayor cantidad de información posible acerca de las necesidades de dicha planta para su desarrollo. No es recomendable germinar la planta en condiciones in-vitro ya que el tiempo de desarrollo es prolongado. Se pueden sembrar una gran cantidad de semillas en condiciones de invernadero y seleccionar para la experimentación las que destaquen del resto por su crecimiento.

Para obtener plantas Madre de con genéticas favorables, es recomendable realizar una siembra masiva de semillas de Albahaca y una vez desarrolladas las plantas, una selección de aquellas que presenten una morfología deseable. Las plantas más desarrolladas serán las plantas madre que aportaran los explantes necesarios para la micropropagación.

Lavar y desinfectar el material vegetal de manera adecuada antes de iniciar la micropropagación. Se puede hacer uso de meristemos ya que a partir de ellos se pueden regenerar plantas completas. Evitar los tejidos leñosos o bien, raspar un poco la superficie de los mismos para que las células jóvenes estén más contacto con el medio de cultivo.

El proceso de micropropagación se debe realizar en condiciones de máxima asepsia. Lo más recomendable es la utilización de una cámara de flujo laminar, se pueden limpiar las superficies de la misma con alcohol etílico. El investigador también se debe lavar perfectamente las manos antes de iniciar el proceso, utilizar bata limpia y de ser posible cofia y cubrebocas. Eliminar cualquier fuente de contaminación.

Atemperar medio de cultivo antes de sembrar. La siembra de explantes de debe realizar con delicadeza, los explantes se pueden mantener en agua destilada hasta el momento de sembrarlos en el medio de cultivo. Colocar los explantes en una caja Petri, realizar cortes limpios a 45° de una sola tajada y sembrar a la brevedad posible evitando se esté en contacto con el aire por un tiempo prolongado.

Mantener siempre los frascos dentro del cuarto de cultivo y dar seguimiento al desarrollo de explantes, mantener la iluminación con un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 de oscuridad. Evitar variaciones de temperatura menor a 15° o superior a los 30° y procurar mantener entre 20 a 25°C.

Tomar evidencias con notas y fotografías de la experimentación en todo momento.

## Referencias Bibliográficas

- Banthorpe DV. (1985). "Pigments formation by callus of *Lavandula Angustifolia*". Chemistry Department, University College, London, UK.
- Barlow, S. M. (1990). Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In *Food Antioxidants*. Amsterdam: Elsevier.
- Bina S., Huma A., Sabira B., Sobiya P. (2012). Evaluation of the anti-mycobacterium activity of the constituents from *Ocimum basilicum* against *Mycobacterium tuberculosis*. International Center for Chemical and Biological Sciences, HEJ Research Institute of Chemistry, University of Karachi, Pakistan. Elsevier.
- Bonga, J. M. Y Durzan, D. J. (1982). Tissue culture techniques: Tissue culture in forestry. Boston; Mirtinas Nijhoff Publishers.
- Castillo A. (2004). "Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo". Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay
- Chung IS, Kang YM, Oh JM, Kim T. Lee HJ, Chae YA (1994). continuous suspended cultures of *Menta piperata* in cell recycled airlift bioreactor. *Biotechnology Tech.* pp. 789-792.
- Cobos, A., Díaz, O., Perales, L. y Ordóñez, J. A. (1997) *El dióxido de carbono supercrítico en la elaboración de alimentos de origen vegetal. Otras aplicaciones, alimentación, equipos y tecnología*, 16, 55-63.
- Echenique V, Rubinstein C, Mroginski L. (2010). Biotecnología y mejoramiento vegetal II Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Ar.
- Ernst D. (1989). *Pimpinella anisum* L. (Anise). Cell culture somatic embryogenesis and the production of anise oil. In Bajaj YPS, editor. *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 1. Berlin: Springer. P. 381.
- Evans, D. A., Sharp, W.R., Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (1983). *Handbook of plant cell culture: Techniques and aplicaciones*. Nueva York: MacMillan Publishing.

- Garcia, Q. R. y Munguia, L. (2004). *Biotecnología Alimentaria*; Mexico DF: Limusa.
- Geankopolis, Ch. J. (1999). *Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias*, México: Editorial Continental.
- Govindarajan M. Sivakumar R., Rajeswary M., Yogalakshmi K. (2013). Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). Division of Vector Biology and Phytochemistry, Department of Zoology, Annamalai University, Annamalai Nagar, Tamilnadu, India. Elsevier.
- Hicham H., Hana S., Nour el H., Mohammed A., Souliman A., (2007). Hypolipemic activity of polyphenol-rich extracts from *Ocimum basilicum* in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic mice. Laboratoire de Biochimie, Laboratoire de Biologie des Plantes et des Microorganismes, Laboratoire de Physiologie et d'Ethnopharmacologie, Faculté des Sciences, Morocco. Elsevier.
- Hill, T. A. (1984). *Cuadernos de Biología: Hormonas Reguladoras del Crecimiento Vegetal*. España: Omega.
- Hurtado, B. A. M. (2002). *Estudio del proceso de extracción de componentes minoritarios de aceite de oliva con CO<sub>2</sub> supercrítico en contracorriente*, España: Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Dpto. de Ing. Química, Madrid.
- Kireeva PM, Malone DM, Macloughlin PF. (1993). Variation of aggregate size in plant suspension batch and semi continuous cultures. *Trans Inst Chem Eng*, 40-6.
- Kundan S., Shruti A., Richa S., 2011. Role of *Ocimum basilicum* L. in prevention of ischemia and reperfusion-induced cerebral damage, and motor dysfunctions in mice brain. Institute of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Sciences and Drug Research, Punjabi University Patiala, India. Elsevier.

- Lachowicz, K. J., Jones, G. P., Briggs, D. R., Bienvenu. F. E., Palmer, M. V., Ting, S. S. T. Y Huerter M. (1997). Characteristics of Plants and Plant Extracts from Five Varieties of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Grown in Australia. Australia. Journal of Agriculture and Food Chemistry. ACS.
- Luque-Garcia, J. L. y Luque de Castro, M. D. (2004). *Ultrasoundassisted Soxhlet extraction: An expeditive approach for solid sample treatment: Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds.* Chromatogr.,1034, 237–242.
- Mamidipally, P. K. y Liu S. X. (2004). *First approach on rice bran oil extraction using limonene*, Eur. J. Lipid Sci. Technol., 106, 122–125.
- Mangold, H.K, Borz, W., Reinhard E. y Zenk M. H. (1987). Plant tissue culture and its biotechnical application. Nueva York: Springer Verlag.
- Marassi, M. A. (1991). Principios básicos, metodologías y técnicas del cultivo de tejidos vegetales. Argentina: Fac. Cs. Exactas y Naturales y Agrimensura.
- Mergara, J. (1988). Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro: Los meristemos y la organogenesis. Madrid: Mundi Prensa.
- Mc Cabe, W. L., Smith, J. C. y Harriott, P. (2001). Operaciones unitarias en ingeniería química. España 2001: McGraw-Hill.
- NMX-F-083-1986. Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios.
- Poole, C. F. (2000). *Progress in packed column supercritical fluid chromatography: materials and methods*, J. Biochem. Bioph. Methods, 43, 3-23.
- Reinert, M.M. Yeoman (1982). Plant cell and tissue culture; Nueva York: Springer Verlag.
- Sacchetti, G., Mendici, A., Maietti, S., Radice, M., Muzzoli, M., Manfredini, S., Braccioli, E. Y Bruni, R. (2004). Composition and Functional Properties of the Essential Oil of Amazonian Basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in Comparison with Commercial Essential Oils. Italia: Journal of Agriculture and Food Chemistry. ACS.

- Segretín ME. (2007). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología.
- Sharma, S. K., Mulvaney, S. J. y Rizvi, S. H. (2003). Ingeniería de alimentos: Operaciones unitarias y prácticas de laboratorio. Nueva York: Limusa Wiley.
- Scott, T. K. (1984). Hormonal regulation of development: The functions of hormones from the level of the cell to whole plant. Nueva York: Springer-Verlag.
- Thorpe, T. A. (1981). Plant tissue culture, methods and applications in agriculture. United Kingdom: Academic Press.
- Velasco, R. J., Villada S. H. y Carrera J. E. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria, *Información Tecnológica – Vol. 18 N° 1*
- Zancan, K. C., Marques, M. O. M., Petenate, A. J. y Meireles, M. A. A. (2002), *Extraction of ginger (Zingiber officinale Roscoe) oleoresin with CO<sub>2</sub> and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts*, J. Supercrit Fluids, 24, 57–76.

## Anexos

### Anexo 1. Preparación de soluciones Stock

Las principales recomendaciones para la correcta preparación de soluciones Stock son:

- Pesar los componentes en balanza analítica.
- Asegurarse que el material que entra en contacto con los componentes de soluciones se encuentra perfectamente limpio. En caso de duda, lavarlo y hacer un último enjuague con agua destilada para retirar trazas de sales minerales del agua corriente.
- Mezclar los componentes con ayuda de agitador magnético.
- Una vez obtenida la solución Stock, etiquetar debidamente los recipientes.

#### Preparación de una solución stock de macronutrientes MSx10

Para obtener un litro de dicha solución llénese un matraz Erlenmeyer de 2 Lt con 500 ml de agua destilada. A continuación añádase cada uno de los siguientes componentes (Tabla 17) disolviéndolo totalmente antes de añadir el siguiente:

Tabla 17. Composición de la solución de macronutrientes MSx10.

Sustancia	Peso en gramos
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	16.5
$\text{KNO}_3$	19
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.7

Para finalizar verter el contenido en un matraz aforado de 1 L, aforar con agua destilada, trasladar la solución a su recipiente definitivo y agitarlo. Almacenar la solución a 4° C.

### Preparación de una solución Stock de micronutrientes MSx100

Para obtener un litro de dicha solución llenar un matraz Erlenmeyer de 1 L con 500 mL de agua destilada. A continuación añadir cada uno de sus componentes (Tabla 18) disolviendo totalmente antes de añadir el siguiente.

Tabla 18. Composición de la solución de micronutrientes MSx100.

Sustancia	Peso en miligramos
MnSO <sub>4</sub> -4H <sub>2</sub> O	2230
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	860
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620
KI	83
Na <sub>2</sub> MoO-2H <sub>2</sub> O	25
CUSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	2.5
CoCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	2.5

Verter la solución en un matraz aforado de 1 L, aforar con agua destilada. Trasladar a recipiente definitivo y almacenar a 4° C.

### Preparación de una solución MSx200

Para obtener 100 ml de la solución MSx200 deben seguirse los siguientes pasos:

- Calentar 50 ml de agua destilada en una parrilla eléctrica hasta ebullición.
- Añadir 556 mg de FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O y disolver por completo.
- Añadir 744 mg de Na<sub>2</sub>EDTA-H<sub>2</sub>O.
- Añadir una lejía de NaOH.

Una vez disueltos todos elementos, verter el contenido en un matraz aforado de 100 ml, aforar con agua destilada y trasladar la solución a su envase definitivo debidamente identificado y almacenar a 4°C.

### Preparación de una solución stock de vitaminas y myo-inositol MSx200.

Para obtener 100 ml de dicha solución llenar un matraz Erlenmeyer con 50 ml de agua destilada y añadir uno a uno, hasta disolución total los siguientes componentes:

Tabla 19. Composición de la solución de vitaminas y myo-inositol MSx200.

Sustancia	Peso (mg)
Myo-inositol	2
Acido nicotínico	10
Piridoxina-HCl	10
Tiamina-HCl	2
Glicina	40

A continuación, verter el contenido en un matraz aforado de 100 ml, aforar con agua destilada y trasladar la solución a su envase definitivo debidamente identificado y almacenar a 4°C.

Anexo 2. Análisis de Varianza aplicado durante el desarrollo del experimento.

Análisis de varianza para desarrollo de brotes de albahaca grande verde.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	SC ajust.	Media de Cuadrados	F	Significancia
ANA	4	3378.67	3378.67	844.67	12.67	0
BAP	4	5218.67	5218.67	1304.67	19.57	0
ANA+BAP	16	7661.33	7661.33	478.83	7.18	0
Error	50	3333.33	3333.33	66.67		
Total	74	19592				

Análisis de varianza para desarrollo de brotes de albahaca fina verde.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	SC ajust.	Media de Cuadrados	F	Significancia
ANA	4	440	440	110	1.72	0.161
BAP	4	2240	2240	560	8.75	0
ANA*BAP	16	9786.67	9786.67	611.67	9.56	0
Error	50	3200	3200	64		
Total	74	15666.67				

Análisis de varianza para desarrollo de callo de albahaca grande verde.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	SC ajust.	Media de Cuadrados	F	Significancia
ANA	4	7365.3	7365.3	1841.3	10.15	0
BAP	4	4525.3	4525.3	1131.3	6.24	0
ANA*BAP	16	11261.3	11261.3	703.8	3.88	0
Error	50	9066.7	9066.7	181.3		
Total	74	32218.7				

Análisis de varianza para desarrollo de callo de albahaca fina verde.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	SC ajust.	Media de Cuadrados	F	Significancia
ANA	4	981.3	981.3	245.3	1.02	0.408
BAP	4	4488	4488	1122	4.65	0.003
ANA*BAP	16	7858.7	7858.7	491.2	2.04	0.029
Error	50	12066.7	12066.7	241.3		
Total	74	25394.7				

Análisis de varianza para desarrollo de rizogénesis de albahaca grande verde.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	SC ajust.	Media de Cuadrados	F	Significancia
ANA	4	36258.7	36258.7	9064.7	60.16	0
BAP	4	512	512	128	0.85	0.501
ANA*BAP	16	12274.7	12274.7	767.2	5.09	0
Error	50	7533.3	7533.3	150.7		
Total	74	56578.7				

Análisis de varianza para desarrollo de rizogénesis de albahaca fina verde.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	SC ajust.	Media de Cuadrados	F	Significancia
ANA	4	8594.7	8594.7	2148.7	6.52	0
BAP	4	13034.7	13034.7	3258.7	9.89	0
ANA*BAP	16	12338.7	12338.7	771.2	2.34	0.011
Error	50	16466.7	16466.7	329.3		
Total	74	50434.7				

Análisis de varianza para desarrollo de tallo de albahaca grande verde.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	SC ajust.	Media de Cuadrados	F	Significancia
ANA	4	3578.67	3578.67	894.67	13.42	0
BAP	4	7645.33	7645.33	1911.33	28.67	0
ANA*BAP	16	8274.67	8274.67	517.17	7.76	0
Error	50	3333.33	3333.33	66.67		
Total	74	22832				

Análisis de varianza para desarrollo de tallo de albahaca fina verde.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	SC ajust.	Media de Cuadrados	F	Significancia
ANA	4	2954.7	2954.7	738.7	8.03	0
BAP	4	13261.3	13261.3	3315.3	36.04	0
ANA*BAP	16	8538.7	8538.7	533.7	5.8	0
Error	50	4600	4600	92		
Total	74	29354.7				

Análisis de varianza para desarrollo de oxidación de albahaca grande verde.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	SC ajust.	Media de Cuadrados	F	Significancia
ANA	4	6605.3	6605.3	1651.3	9.45	0
BAP	4	6578.7	6578.7	1644.7	9.42	0
ANA*BAP	16	7941.3	7941.3	496.3	2.84	0.002
Error	50	8733.3	8733.3	174.7		
Total	74	29858.7				

Análisis de varianza para desarrollo de oxidación de albahaca fina verde.

Fuente	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	SC ajust.	Media de Cuadrados	F	Significancia
ANA	4	5792	5792	1448	6.07	0
BAP	4	1938.7	1938.7	484.7	2.03	0.104
ANA*BAP	16	10288	10288	643	2.69	0.004
Error	50	11933.3	11933.3	238.7		
Total	74	29952				