Potencial biotecnológico del cultivo *in vitro* de *Gonolobus niger*, componente de bebida prehispánica denominada “Popo”.

E. Hernández-Domínguez[1], F.J. Gabino Roman[1], H.P. Medorio García[2], A.C. Ortega Martínez[2], A. G. Nila-Méndez[1].*
[1]Unidad de Investigación en Biotecnología Vegetal, Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. Carretera Costera del Golfo Km 216.4. Col Agricola Michapa. Acayucan, Veracruz. 961000. México
[2]Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Av. Universidad km. 7.5. Colonia Santa Isabel I, Coatzacoalcos, Veracruz 96536, México.
**elihed@gmail.com*

***Área de participación**: Ingeniería Química*

Resumen

G. niger conocido como “chupipi”, ingrediente indispensable en la elaboración del “popo”, bebida tradicional a base de cacao, caracterizada por abundante espuma. Dicha particularidad se atribuye a las saponinas, no identificadas en esta especie, actualmente es difícil encontrar este cultivo de forma silvestre. Esto condujo a establecer un cultivo *in vitro* de callos y suspensiones celulares no reportado antes. Nuestros resultados, mostraron el establecimiento de los cultivos de callos en medio MS adicionado con 3 mg/L de 2, 4-D. En la cinética de crecimiento, durante un subcultivo de 30 días, la biomasa incremento 10 veces. En las suspensiones celulares, los resultados sugieren una mayor producción de biomasa durante 30 días a una velocidad de agitación de 100 rpm. De acuerdo, a ensayos rápidos los cultivos son capaces de formar espuma (saponinas). Además, de presentar un diferencial contenido de fenoles totales y compuestos antioxidantes en estos tejidos.

***Palabras clave**: Chupipi, suspensiones celulares, callos, saponinas.*

Abstract

G. niger known as "chupipi", an indispensable ingredient in the preparation of "popo", a traditional cocoa-based drink characterized by abundant foam. This characteristic is attributed to the saponins, which have not been identified in this species, and it is currently difficult to find this crop in the wild. This led to the establishment of an in vitro culture of callus and cell suspensions not reported before. Our results showed the establishment of callus cultures in MS medium supplemented with 3 mg/L of 2, 4-D. In growth kinetics, during a 30-day subculture, biomass increased 10-fold. In cell suspensions, results suggest a higher biomass production during 30 days at an agitation speed of 100 rpm. According to rapid tests, crops are capable of foaming (saponins). In addition, to present a differential content of total phenols and antioxidant compounds in these tissues.

***Key words**: Chupipi, cell suspensions, callus and saponins.*

Introducción

En el sureste del nuestro país existen tradiciones provenientes desde la época prehispánica, una de ellas es una bebida tradicional, caracterizada por su abundante espuma, esta se elabora con agua a la que se le agrega una pasta compuesta por cacao (*Theobroma cacao*), azúcar, canela (*Cinnamomum zeylanicum* y *C. verum*), arroz (*Oryza sativa*) y una planta que actúa como un agente espumante que puede ser una de diversas especies, entre ellas la cocolmeca o axquiote (*Smilax sp.*) y el chupipe o chupipi (*Gonolobus niger*) [1 y 2]. *G. niger*, resulta de nuestro interés por esa

propiedad “tensoactiva” que parece contiene. El conocimiento empírico en la preparación del <<Popo>>, indica que sin la presencia de la raíz o tejidos jóvenes (meristemo apical) de la planta no es posible producir y elevar esa excesiva espuma, principal característica de esta bebida. El uso gastronómico del chupipi en esta región sureste de país, ha provocado una presión negativa sobre la población silvestre de esta especie [2]. Teniendo, como resultado una disminución drástica de la especie en la región, esto ha provocado que se complique colectarlas raíces de la planta. Lamentablemente, no hay programas de propagación por métodos convenciones del chuppi, que permitan repoblar esta especie en traspatio.
Ante este panorama se ha realizado la búsqueda de alternativas como uso de la biotecnología y en particular el cultivo de tejidos para propagarla y de ser posible, determinar el contenido de saponinas y/o compuestos tensoactivos. Por lo tanto, el presente trabajo se enfocó en establecer los cultivos *in vitro* de callos y suspensiones celulares de chupipi para determinar las mejores condiciones de cultivo e incrementar la producción de biomasa que permitan posteriormente, estudiar los metabolitos secundarios (sustancias tensoactivas o saponinas) que pudiera producir dicha planta tanto *in vitro* y comparar con cultivos *ex vitro* debido que no existen reportes publicados hasta la fecha.

Metodología

Materiales y Métodos

En la región sureste del estado de Veracruz en los municipios de: Catemaco, Jaltipán, Oluta, San Juan Evangelista fueron colectados los frutos, durante los meses de agosto a septiembre y transportados al laboratorio UNIBVE del ITSAcayucan. Estos frutos fueron desinfectados con agua y jabón, además de diferentes soluciones (antifúngicos, antioxidantes, hipoclorito de sodio comercial, alcohol y agua oxigenada, agua y plant preservation mixture® o PPM), posteriormente se sembraron las semillas en medio de cultivo [3] para su germinación. Para establecer el cultivo de callos, se tomaron las plántulas germinadas como explantes y se sembraron en medio MS adicionado con diferentes concentraciones del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) de 0.01 hasta 8.0 mg/L de acuerdo al protocolo reportado [4] (Fig. 1).



Figura 1. Plantas de vivero de *G. niger* (A), Frutos inmaduros (B), Endocarpio (C y D), semillas de esta especie.

Posteriormente, se procedió a establecer un protocolo de cultivo *in vitro* para las suspensiones celulares. Este consistió en la siembra de un inóculo que contenía 0.5 g de callos de *G. niger* en matraces Erlenmeyer de 125 mL que previamente se les había adicionado 50 mL de medio MS líquido. Los cultivos se incubaron en un agitador orbital (Orbital Shaker Incubator®) a dos diferentes velocidades de agitación: 50 y 100 rpm a temperatura ambiente. Una vez establecidos los cultivos, se caracterizó el crecimiento de los cultivos *in vitro*, mediante el incremento en materia fresca y seca (Incremento de biomasa= materia fresca/materia seca). El peso fresco (PF) y peso seco (PS) se determinó empleando una balanza analítica Denver® y el secado fue realizado mediante una mufla (Felisa®) durante 24h a 110°C durante un subcultivo.

 ISSN 2007-8102

Por otro lado, se determinó el contenido de saponinas por el método rápido [5]. El contenido de fenoles totales (FT) se realizó por el método colorimétrico [6]. Los antioxidantes se determinaron por el método del radical ABTS [7]. Todos los ensayos en este trabajo fueron realizados por triplicado. Se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia estadística entre los tratamientos con comparación de medias de Tukey con una α=0.5.

Resultados y discusión

Una vez germinadas las semillas de chupipi *in vitro*, las plántulas fueron utilizadas como explantes para establecer los diferentes tipos cultivo. Nuestros resultados en el caso, los callos cultivados en medio MS semisólido con diferentes concentraciones de 2,4-D (0.0, 0.01, 0.10. 1.00, 3.00, 5.00 y 8.00 mg/L), muestran una producción de callos en todos los tratamientos, sin embargo, el que produjo una mayor cantidad de callos fue cuando se utilizó una concentración de 3 mg/L, produciendo el 70%, seguido, del tratamiento de 1 mg/L de 2,4-D con el 52 % en la formación de callos (Fig. 2).

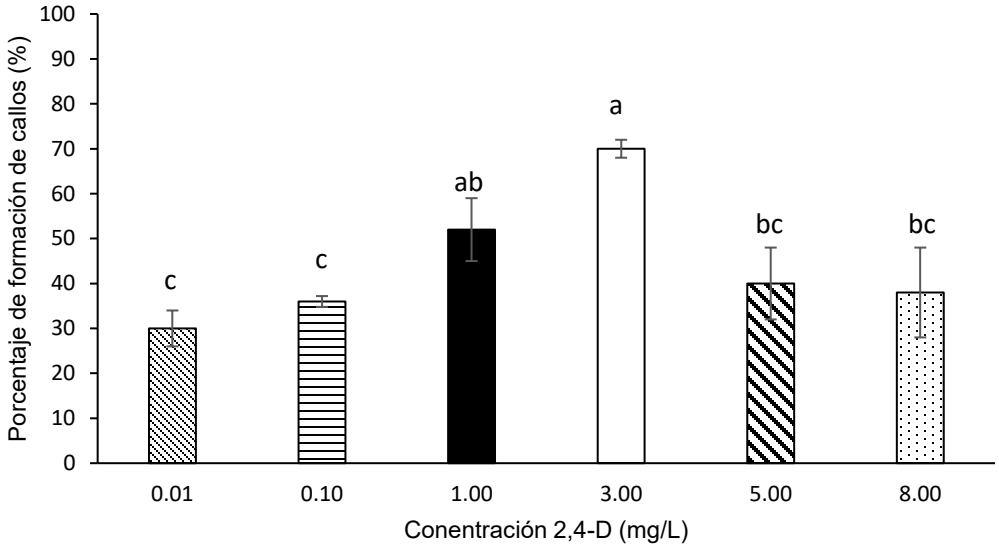


Figura 2. Efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D sobre la formación de callos en explantes de *G. niger*.

Estos resultados, coinciden con otros reportes donde emplean a este regulador de crecimiento para inducir y/o promover la formación de callos, bajo el mismo rango de concentración de 2,4-D [8, 9,10]. Cabe mencionar que este regulador pertenece al grupo de las auxinas, las cuales promueven la división celular mediante una cascada de señalización que terminan produciendo un crecimiento desordenado de los tejidos.

Con base en estos resultados, se estableció el cultivo de callos en medio MS semisólido adicionado con 3 mg/L de 2, 4-D. (Fig. 3 B y C). Por lo tanto, se realizó la caracterización de este cultivo mediante la cinética de crecimiento de los callos durante un subcultivo de 30 días, donde se puede observar un aumento de 10 veces más en la biomasa (Fig.4). Los otros parámetros de crecimiento, muestran un tiempo de duplicación celular (TDC) de 5.426 días con una velocidad específica de crecimiento de 0.18429 d^{-1} (Fig. 4).

 ISSN 2007-8102

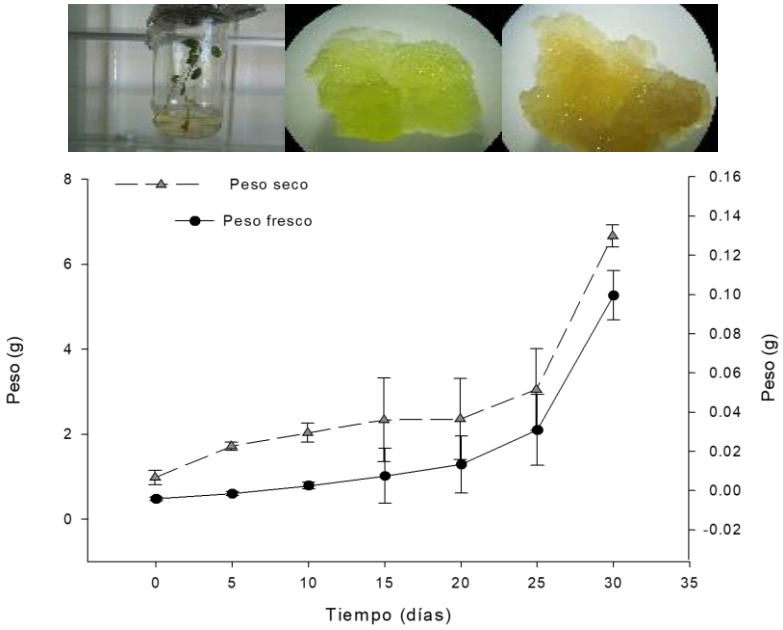


Figura 3. Acumulación de biomasa de los cultivos de callos de *G. niger* durante 30 días de subcultivo en medios semisólidos. A) Plántulas germinadas *in vitro* de las semillas de Chupipi, cultivos de callos color café en primera instancia y color verde.

Una vez establecido este cultivo de callos, estos fueron utilizados como otros explantes para inducir el cultivo de suspensiones celulares (Fig. 4 A y B).

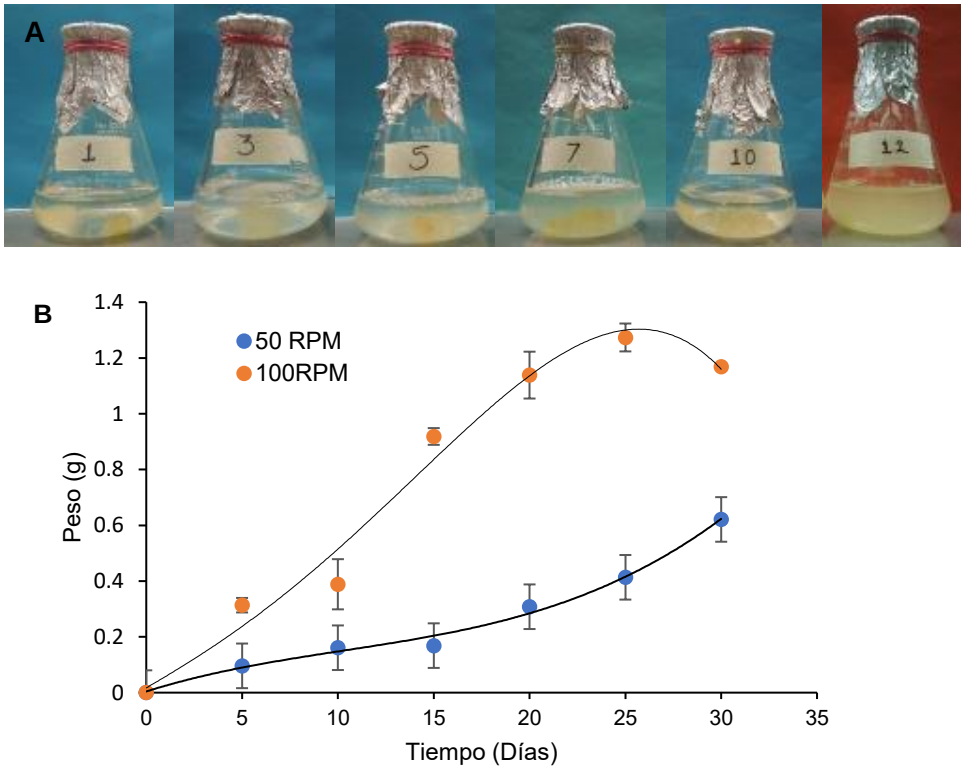


Figura 4. Efecto de la velocidad de agitación sobre el desarrollo de las suspensiones celulares de *G. niger*. A). Cultivo de suspensiones celulares. B). Acumulación de biomasa en peso fresco en un subcultivo de 50 y 100 RPM, respectivamente.

Por lo tanto, en los cultivos de suspensiones celulares, bajo las condiciones evaluadas, la mayor producción de biomasa durante 30 días se obtiene cuando, los callos disgregados se colocan en un matraz Erlenmeyer con una velocidad de agitación de 100 rpm, donde logran duplicar su crecimiento (Fig. 4 B). La cinética de crecimiento a 100 rpm, muestra una fase lag de aproximadamente 5 días, y después un máximo crecimiento a los días 25-26 de subcultivo, con un TDC de 9.24 d^{-1} y una velocidad VEC de 0.10 d^{-1} para el tratamiento (Fig. 4), mientras que el tratamiento de 50 rpm, presentaron un TDC de 0.04 d^{-1} y una VEC de 23.65 $días^{-1}$. En otros cultivos como *Uncaria tomentosa*, la mayor producción de células se obtiene cuando tuvo una velocidad de agitación 100 rpm para su crecimiento [8].

Por otro lado, de acuerdo al ensayo rápido estos cultivos parecen presentar saponinas, siendo las raíces el tejido con mayor producción de espuma, seguido de hojas *ex vitro*, tallos, suspensiones celulares y en menor contenido los callos *in vitro* (datos no mostrados). El contenido de fenoles totales, se muestra en la tabla 1, los tejidos *ex vitro* presentan 100 veces y mayor contenido de EAG/mL en comparación con los tejido *in vitro* (desde suspensiones celulares hasta cultivo de callos; Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de fenoles totales de tejidos *ex vitro* e *in vitro* de Chupipi.

Tejido de planta	Contenido de Fenoles totales (EGA µg ácido gálico/ mL)
Hoja joven *ex vitro*	2299 ± 174^{a}
Hoja madura *ex vitro*	2326.7 ± 118.5^{a}
Callos *in vitro* de color café	27.33 ± 4.93^{b}
Callos *in vitro* de color verde	26.30 ± 4.93^{b}
Suspensiones celulares	34.67 ± 2.08^{b}

Medias dentro de cada columna con letras distintas indican diferencias significativas * = $P \leq 0,05$.

Cabe mencionar, la presencia de estos componentes está asociada con el crecimiento natural de la planta. Sin embargo, estos polifenoles están relacionados con la defensa ante ERO (especies reactivas de oxígeno) que se producen durante el ataque de patógenos y depredadores [11]. En contraste con el cultivo *in vitro*, estos compuestos pueden inhibir el establecimientos otros tipos de cultivos de tejidos, como la embriogénesis somática o enraizamiento [12] o en su defecto presentar problemas oxidación que provoquen la necrosis de los tejidos [13].

En la Fig. 5 se muestran, los valores de la capacidad de antioxidantes de los extractos metanólicos de tejido *ex vitro* (hojas) y cultivo de callos (color café). Como podemos observar ambos tejidos no hay diferencias significativas con 250-265 de ET µmoles equivalentes de Trolox/g de tejido fresco.

En otros trabajos se ha reportado que en hojas y corteza de *Litsea glaucescens* Kunth su capacidad antioxidante presentó valores entre 200-320 de ET µmoles equivalentes de Trolox/g [14], similares a los que encontramos en esta enredadera.

 ISSN 2007-8102

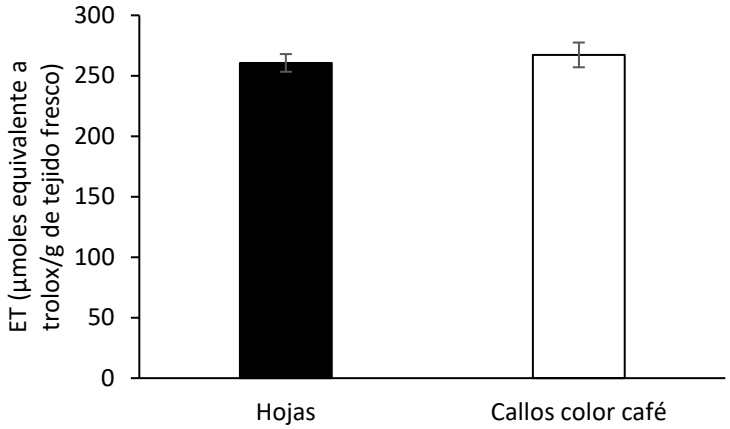


Figura 5. Determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS en tejidos de hojas *ex vitro* y cultivo de callos de Chupipi *in vitro*.

Estos resultados, en consecuencia, nos dan la pauta para posteriores estudios de esta planta con la finalidad de identificar compuestos de interés farmacológico.

Trabajo a futuro

Este trabajo pretende realizar estudios fitoquímicos mediante HPLC en las plantas y sus partes (hoja, tallo, raíces, fruto) tanto *ex vitro*, como *in vitro* y sus metabolitos secundarios que contienen, con objetivo de identificar el compuesto que produce esa propiedad de excesiva espumosidad a esta bebida <<popo>>.

Conclusiones

En esta especie con uso gastronómico, se establecieron tanto los cultivo *in vitro* de callos en medio semisólido así, como las suspensiones celulares que no había sido reportado antes. El cultivo de callos en medio semisólido incrementa 10 veces en el contenido de la biomasa al día 30 del subcultivo, mientras que las suspensiones celulares alcanzan su máximo de crecimiento en los días 22-24 del subcultivo con una agitación de 100 rpm de agitación. Por lo tanto, se cuenta con una alternativa biotecnológica para la propagación clonal y eficiente de esta planta. Cabe mencionar, que estos cultivos producen saponinas (sustancias tensoactivas) en menor cantidad en comparación con los tejidos *ex vitro*. Además, los cultivos *in vitro* presentaron la capacidad de biosintetizar metabolitos secundarios, como fenoles y antioxidantes de manera diferencial. Con esto, se sientan las bases para iniciar los estudios sobre los metabolitos secundarios que produce y tengan uso en la industria alimentaria.

Agradecimientos

El financiamiento de este proyecto se obtuvo del TecNM en la Convocatoria 2019. Además del Instituto Tecnológico Superior de Acayucan encabezado por el Director General, Dr. Nefi David Pava Chipol.

Referencias

[1] C. Barros and M. Buenrostro, “Pozol, popo, champurrado,” *Revista Digital Universitaria*. vol, 12, no. 4, pp.1-9, 2011.

[2] K. G. Briseño. Disfruta Popo, la bebida veracruzana de los dioses. *Universal*. http://www.eluniversalveracruz.com.mx/veracruzanos-personajes/2015/disfruta-popo-la-bebida-veracruzana-de-los-dioses-21379.html. 2015.

[3] T. Murashige and F. Skoog, “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures,” *Physiologia Plantarum*, pp 473-497. 1962.

[4] R.E. G. Juárez, “Evaluación de métodos de propagación (*in vitro* o *ex vitro*) de *Gonolobus taylorianus,”* Tesis de Licenciatura de Ingeniería Bioquímica del Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. Acayucan Veracruz, México, pp.1-98. 2014.

[5] C. E. Peñafiel, and V. L. Díaz, “Determinación espectrofotométrica de ácido oleanolico y saponinas de quinua (*Chenopodium quinua* Willd) Variedad Kancolla,” *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, vol. 38, pp. 113-125, 1988.

[6] V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventós, “Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent,” *Methods in Enzymology*, vol. 299, pp 152-178, 1999.

[7] R. P. Re, “Antioxidant activity applying an improved ABTS radical, “*Biology & Medicine*, vol. 26, pp. 231–1237, 1998.

[8] F. O. Sánchez, R. H. Sánchez, M. A. Zabala, “Establecimiento de un cultivo de células en suspensión de *Eucalyptus cinerea”*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol 4, no. 1, pp. 43-48, 2002.

[9] E. Carrera, C. Peña, M. Jadán, “Establecimiento de suspensiones celulares a partir de segmentos foliares de *Valeriana pyramidalis* kunth,” Ecuador es calidad: *Revista Científica Ecuatoriana*, vol. 2, no. 1, pp. 54-60. 2015.

[10] L. Sánchez-Calvo and S. Alvarenga-Venutolo, “Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC (uña de gato),” *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 28, no. 1, pp. 105-120, 2015.

[11] S.L. Guzmán-Gutiérrez, R. Gómez-Cancino, J.C. García-Zebadúa, N.C. Jiménez-Pérez y R. Reyes-Chilpa, “Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: Identification of b-pinene and linalool as active principles,” *Journal of Ethnopharmacology* vol. 143, no. 2, pp. 673-679, 2012.

[12] M. P. Jofré, D. Ríos, J. Becerra, M. Sánchez-Olate, “Caracterización fisiológica del enraizamiento *in vitro* de *Eucalyptus nitens* y *Eucalyptus globulus*. Gayana. *Gayana Botánica*, vol. 73, no. 2, pp. 421-429, 2016.

[13] Á. Azofeifa, “Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro,” Agronomía mesoamericana*, vol. 20, no. 1, pp. 153-175, 2009.

[14] N.A. Tapia-Torres, C. de la Paz-Pérez-Olvera, A. Román-Guerrero, A. Quintanar-Isaías, E. García-Márquez, F. Cruz-Sosa, “Histoquímica, contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de hoja y de madera de *Litsea glaucescens* Kunth (Lauraceae),” *Madera & Bosques*, vol. 20, no. 3, pp. 125-137, 2014.