

Propagación *in vitro* de *piper umbellatum*

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere al desarrollo de métodos de micropropagación *in vitro* de la planta *Piper umbellatum*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las especies pertenecientes a la familia Piperaceae, tradicionalmente conocidas como "pimienta", "*Pariparoba caapeba*" y "*falso jaborandi*", incluyen aproximadamente 2000 especies que se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales. Este género se utiliza para diferentes propósitos tales como la preparación de bebidas en diferentes culturas, condimento y para el tratamiento de varias enfermedades, incluyendo, trastornos digestivos, inflamación y pérdida del apetito, entre otras. Las evaluaciones químicas y farmacológicas han revelado que muchas especies del género *Piper* poseen metabolitos secundarios con importante actividad terapéutica, ansiolítica, analgésica, antiinflamatoria, antitumoral, entre otras.

Teniendo en cuenta lo anterior, es de interés realizar el cultivo *in vitro* de especies de la familia Piperaceae. El estado de la técnica se refiere a métodos de propagación *in vitro* en algunas especies pertenecientes a la familia Piperaceae, como la patente US 7402433, la cual se refiere a la micropropagación de *Piper longum* a partir del explante de brote lateral (meristemático) (material de partida), cultivando los explantes en diferentes medios. Así mismo, en el documento de patente CN 1586172 se describe la micropropagación de *Peperonia* en un medio suplementado con kinetina y 2,4 D aproximadamente de 3 a 4 semanas, luego transferidas a BA y ANA obteniendo plántulas a partir de organogénesis indirecta.

Sin embargo, no existe dentro del estado de la técnica un método que realice la propagación *in vitro* de *Piper umbellatum*, en donde se establezcan las condiciones necesarias para la obtención y propagación de callos. Particularmente, el método de la presente invención busca obtener un gran número de plantas sanas de *Piper umbellatum* a partir de un solo explante en tiempos relativamente cortos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un nuevo método de micropropagación *in vitro* de *Piper umbellatum* a partir de explantes del material vegetal, obteniendo callos que luego son proliferados.

Particularmente, en una modalidad preferida, la presente invención se refiere a un método de micropropagación mediante la obtención de callos de *Piper umbellatum* que comprende las etapas de:

i) seleccionar explantes de hojas jóvenes de *Piper umbellatum* mediante el corte de las hojas en segmentos de entre 8 y 10 mm alrededor de la nervadura central;

ii) desinfectar los explantes;

iii) establecer los explantes, en donde el establecimiento de los explantes se realiza en un medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con una citoquinina y una auxina a una temperatura entre 20°C y 27°C, una humedad relativa entre 80% y 60%, en un periodo entre 12 y 18 horas de luz y entre 6 y 12 horas de oscuridad a una intensidad lumínica entre 1800 y 2500 Lux, por un periodo de entre 4 y 8 semanas hasta obtener callos;

iv) limpiar y dividir los callos formados;

v) cultivar los callos limpios y divididos en un medio MS suplementado con una citoquinina y una auxina;

en donde la citoquinina de los pasos iii) y v) es 6-BAP y se encuentra en una concentración entre 0.5 mg/L a 10 mg/L;

en donde la auxina de los pasos iii) y v) se selecciona del grupo que consiste en 2,4-D, AIA, AG₃ y picloram, y se encuentra en una concentración entre 0.5mg/L y 10 mg/L.

El anterior método de propagación permite la multiplicación *in vitro* de *Piper umbellatum* mediante una pequeña muestra de la planta sin necesidad de cortar o extraer del medio ambiente grandes cantidades de material biológico, contribuyendo así a la conservación de los recursos naturales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1. se refiere a un ejemplo del desarrollo del explante de hojas de *piper umbellatum*, en donde A. muestra un ejemplar de la planta de *Piper umbellatum*; B. muestra explantes de

hojas con primeras formaciones de callo a los 20 días en la etapa de establecimiento; C. muestra el crecimiento de callos después de ser separados de las hojas a las 4 semanas en la etapa de establecimiento; y D. muestra callos después de 8 semanas en la etapa de establecimiento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método de micropropagación *in vitro* de *Piper umbellatum* que comprende las etapas generales de:

- i) Selección y desinfección del material vegetal de partida;
- ii) obtención de los explantes;
- iii) establecimiento de los explantes hasta la obtención de callos;
- iv) desinfección y división de los callos obtenidos;
- v) cultivo de los callos obtenidos.

En el contexto de la presente invención, un explante se refiere a una porción de material vegetal de la planta *Piper umbellatum*, usada para iniciar un cultivo *in vitro*. Particularmente, los explantes son obtenidos a partir del material vegetal seleccionado del grupo que consiste en hojas, yemas axilares, raíces o semillas de *Piper umbellatum*. Preferiblemente, los explantes usados son obtenidos a partir de las hojas de *Piper umbellatum*.

Posterior a la selección del material vegetal de partida de *Piper umbellatum* se procede a la desinfección de este para remover bacterias, virus y hongos presentes en el material, los cuales puedan interferir en el proceso de micropropagación. La desinfección se realiza mediante el tratamiento con soluciones acuosas de etanol al 70% v/v e hipoclorito de sodio al 3% p/v, en donde entre cada lavado con las soluciones acuosas mencionadas, se realizaron lavados con agua destilada. Particularmente, se realizaron uno más tratamientos con solución de etanol al 70% v/v por un tiempo entre 1 y 10 min, 3 y 10 min, 5 y 10 min, 7 y 10 min y 9 y 10 min. Posteriormente, se realizaron uno o más tratamientos con hipoclorito de sodio al 0.5% p/v por un tiempo entre 1 y 10 min, 3 y 10 min, 5 y 10 min, 7 y 10 min y 9 y 10 min. Finalmente, se realizó un lavado con agua destilada.

En una realización preferida de la presente invención, los explantes son obtenidos mediante el corte de las hojas, yemas axilares o raíces en segmentos de entre 6 y 10 mm. En el caso de

las hojas, los cortes son realizados alrededor de la nervadura central y en el caso de las yemas axilares los cortes son realizados alrededor del nudo. En otra modalidad de la invención, se realizan cortes de entre 7 y 10 mm, 8 y 10mm, 9 y 10 mm. En el caso de las semillas, estas fueron usadas completas sin realizar ningún tipo de corte.

Posterior a la obtención de los explantes de *Piper umbellatum*, se realiza el establecimiento de estos en un medio de cultivo. Para efectos de la presente invención, la etapa de establecimiento se refiere a la regeneración del material vegetal en presencia de reguladores de crecimiento a condiciones de temperatura, humedad relativa y luminosidad controladas. Particularmente, los reguladores de crecimiento se refieren a hormonas producidas por las plantas o de origen sintético que afectan la expresión de genes, niveles de transcripción, división celular y crecimiento de las plantas, entre las cuales se encuentran la familia de las auxinas y las citoquininas.

De acuerdo con una realización preferida de la invención el establecimiento de los explantes de *Piper umbellatum* se realiza un medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con una citoquinina y una auxina a una temperatura, humedad relativa y luminosidad controladas. En una modalidad de la presente invención, la citoquinina usada en la etapa de establecimiento es 6-BAP y se encuentra en una concentración entre 0.2 mg/L a 12 mg/L, 0.5 mg/L a 10 mg/L, 1 mg/L a 10 mg/L, 2 mg/L a 10 mg/L, 4 mg/L a 10 mg/L, 6 mg/L a 10 mg/L o 8 mg/L a 10 mg/L. En una modalidad de la presente invención la auxina usada en la etapa de establecimiento se selecciona del grupo que consiste de 2,4-D, AIA, AG₃ y picloram y se encuentra en una concentración entre 0.2 mg/L a 12 mg/L, 0.5 mg/L a 10 mg/L, 1 mg/L a 10 mg/L, 2 mg/L a 10 mg/L, 4 mg/L a 10 mg/L, 6 mg/L a 10 mg/L o 8 mg/L a 10 mg/L.

En una modalidad de la presente invención el medio usado en la etapa de establecimiento comprende además goma gellan en una concentración de 2 a 2.5 g/L, 2 a 3 g/L, o 2 a 3.5 g/L, sacarosa en una concentración entre 20 y 30 g/L o 25 y 30 g/L. Adicionalmente, el medio usado en la etapa de establecimiento comprende además sales y una fuente de carbono. En una modalidad preferida de la invención, la fuente de carbono es sacarosa.

De manera preferida, la etapa de establecimiento se realiza a una temperatura entre 20°C y 27°C, 22°C y 27°C, 24°C y 27°C, o 22°C y 27°C y a una humedad relativa entre 50% y 80%, 60% y 80%, 70% y 80%.

De acuerdo con una realización de la invención, la etapa de establecimiento se realiza por un periodo entre 12 y 18 horas de luz y entre 6 y 12 horas de oscuridad a una intensidad lumínica de entre 1600 y 2500 Lux, entre 1800 y 2500 Lux, entre 2000 y 2500 Lux, entre 2200 y 2500 Lux o entre 2400 y 2500 Lux. En otra realización de la invención, la etapa de establecimiento se realiza por un periodo de 18 horas de luz/6 horas de oscuridad, 16 horas de luz/8 horas de oscuridad o 12 horas de luz/ 12 horas de oscuridad.

Particularmente, la etapa de establecimiento de los explantes de *Piper umbellatum* se realiza durante entre 4 y 5 semanas, 4 y 6 semanas, 4 y 8 semanas, 5 y 8 semanas o 6 y 8 semanas, en donde al final de dicha etapa se obtienen callos de células de *Piper umbellatum*. Para efectos de la presente invención, el término “callos” se refiere a un grupo de células con alta división celular que han perdido el control de la diferenciación, que crecen de modo continuo en forma de cúmulos celulares, a partir de los cuales pueden formarse brotes o embriones somáticos.

Posterior a la obtención de callos de *Piper umbellatum* mediante la etapa de establecimiento, estos son desinfectados para remover hongos, virus o bacterias producto de posibles contaminaciones durante la etapa de establecimiento. Particularmente, la desinfección de los callos se realizó mediante el tratamiento con soluciones acuosas de etanol al 70% v/v e hipoclorito de sodio al 3% p/v, en donde entre cada lavado con las soluciones acuosas mencionadas, se realizaron lavados con agua destilada. Más específicamente, se realizaron uno más tratamientos con solución acusa de etanol al 70% v/v por un tiempo entre 1 y 10 min, 3 y 10 min, 5 y 10 min, 7 y 10 min y 9 y 10 min. Posteriormente, se realizaron uno o más tratamientos con hipoclorito de sodio al 0.5% p/v por un tiempo entre 1 y 10 min, 3 y 10 min, 5 y 10 min, 7 y 10 min y 9 y 10 min. Finalmente, se realizó un lavado con agua destilada.

Posterior de la etapa de desinfección de los callos de *Piper umbellatum*, estos son divididos entre 2 y 4 partes, o entre 2 y 6 partes, las cuales son nuevamente cultivadas en un medio MS suplementado con citoquinas y auxinas en condiciones controladas de temperatura, humedad relativa y luminosidad. Más específicamente, el cultivo se realiza un medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con una citoquinina y una auxina a una temperatura, humedad relativa y luminosidad controladas. Para efectos de la presente invención, a la etapa descrita anteriormente se le denomina etapa de multiplicación de los callos.

En una modalidad de la presente invención, la citoquinina usada en la etapa de multiplicación de los callos es 6-BAP y se encuentra en una concentración entre 0.2 mg/L a 12 mg/L, 0.5 mg/L a 10 mg/L, 1 mg/L a 10 mg/L, 2 mg/L a 10 mg/L, 4 mg/L a 10 mg/L, 6 mg/L a 10 mg/L o 8 mg/L a 10 mg/L. En una modalidad de la presente invención la auxina usada en la etapa de establecimiento se selecciona del grupo que consiste de 2,4-D, AIA, AG₃ y picloram y se encuentra en una concentración entre 0.2 mg/L a 12 mg/L, 0.5 mg/L a 10 mg/L, 1 mg/L a 10 mg/L, 2 mg/L a 10 mg/L, 4 mg/L a 10 mg/L, 6 mg/L a 10 mg/L o 8 mg/L a 10 mg/L.

Adicionalmente, el medio usado en la etapa de multiplicación de los callos comprende además sales y una fuente de carbono. En una modalidad preferida de la invención, la fuente de carbono es sacarosa.

De forma preferida, la etapa de multiplicación de los callos del método aquí revelado se realiza a una temperatura entre 20°C y 27°C, 22°C y 27°C, 24°C y 27°C, o 22°C y 27°C y a una humedad relativa entre 50% y 80%, 60% y 80%, 70% y 80%.

De acuerdo con una realización de la invención, la etapa de multiplicación de los callos se realiza por un periodo entre 12 y 18 horas de luz y entre 6 y 12 horas de oscuridad a una intensidad lumínica de entre 1600 y 2500 Lux, entre 1800 y 2500 Lux, entre 2000 y 2500 Lux, entre 2200 y 2500 Lux o entre 2400 y 2500 Lux. En otra realización de la invención, la etapa de multiplicación de los callos se realiza por un periodo de 18 horas de luz/6 horas de oscuridad, 16 horas de luz/8 horas de oscuridad o 12 horas de luz/ 12 horas de oscuridad.

En concordancia con el método de la invención, la duración de la etapa de multiplicación de los callos de *Piper umbellatum* se encuentra entre 4 y 5 semanas, 4 y 6 semanas, 4 y 8 semanas, 5 y 8 semanas o 6 y 8 semanas, en donde al final se obtiene nuevos callos, los cuales tienen una actividad antioxidante sin diferencias significativas al ser comparada con la obtenida de hojas y plantulas cultivadas en un vivero.

De acuerdo con el método aquí revelado, las anteriores etapas de desinfección, división y multiplicación de los callos pueden ser repetida de manera indefinida con el fin de multiplicar los callos y así obtener plántulas de *Piper umbellatum* por vía de micropropagación *in vitro*.

El anterior método de propagación permite multiplicar *in vitro* la planta *Piper umbellatum* mediante una pequeña muestra de esta sin la necesidad de cortar o extraer del medio ambiente grandes cantidades de material biológico, contribuyendo así a la conservación de los recursos naturales.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Selección y desinfección de los explantes.

Se obtuvieron explantes a partir de las hojas, yemas axilares, raíces y semillas de *Piper umbellatum*. Antes de obtener los explantes, el material vegetal de partida fue desinfectado de acuerdo con la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos de desinfección empleados en la especie *P. umbellatum*.

Tratamiento	Parte vegetal desinfectada	Tratamiento desinfectante		
		Etanol 70%	NaOCl	
		(min)	(%)	(min)
1	Hojas	1	3	10
2	Raíces, yemas, hojas	1	5	5
3*	Yemas	1	3	5
4	Yemas	1	3	5
5	Yemas	1	3	2
6	Hojas	1	3	8

* Desprendimiento de yemas en cabina y desinfección de estas con NaOCl 0,5% 30 segundos en cabina

Para cada uno de los tratamientos, los explantes fueron lavados tres veces con agua destilada entre los pasos de desinfección con etanol y NaOCl y al finalizar.

Posterior a la desinfección del material vegetal, se obtuvieron los explantes en cada caso, tal y como se resume en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros de obtención de los explantes

Material vegetal de partida	Tamaño de los segmentos	Observaciones
Hojas	± 10 mm	Cortes alrededor de la nervadura central
Yemas axilares	± 10 mm	Cortes alrededor del nudo
Raíces	± 10 mm	--
Semillas	--	Se usaron las semillas completas

Ejemplo 2. Establecimiento de los explantes.

Posterior a la obtención y desinfección de los explantes, estos fueron establecidos en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) que además comprende GelRite (2.7 g/L); sacarosa (30.0 g/L); y diferentes concentraciones de 6-benzylaminopurina (BAP), Ácido Indol Acético (AIA), 2,4-Ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), Picloram, Ácido naftilacético (ANA) y Ácido Giberélico (AG₃) de acuerdo con la Tabla 3. Los explantes fueron establecidos en condiciones de temperatura entre 20°C y 27°C, humedad relativa entre 60% y 80%, periodos de 18 horas de luz/6 horas de oscuridad a una intensidad lumínica de 1800-2500 Lux.

Tabla 3. Medios de cultivo para el establecimiento de los explantes según el contenido de citoquinas y auxinas específicas.

Medio	Reguladores de crecimiento
I	ANA 2mg/L+ BAP 1mg/L+AG ₃ 0.02mg/L
II	BAP 0.5mg/L + AIA 0.5mg/L
III	2,4-D 2mg/L
IV	Picloram 2mg/L
V A	BAP 10mg/L + 2,4-D 0.5mg/L
V B	BAP 2.5mg/L + 2,4-D 5 mg/L
V C	BAP 0.5mg/L + 2,4-D 10 mg/L
V D	BAP 5 mg/L + 2,4-D 2.5mg/L
VI A	BAP 10 mg/L + Picloram 0.5mg/L
VI B	BAP 2.5 mg/L + Picloram 5 mg/L
VI C	BAP 0.5 mg/L + Picloram 10 mg/L
VI D	BAP 5 mg/L + Picloram 2.5mg/L

Los explantes fueron cultivados durante un periodo entre 4 y 8 semanas hasta visualizar la obtención de callos. A manera de ejemplo, en la Figura 1 es posible observar el proceso de establecimiento de explantes obtenidos a partir de hojas, en donde se pueden observar las hojas de *Piper umbellatum* (A), los explantes obtenidos luego de 20 días (B), 4 semanas (C) y 8 semanas de crecimiento (D). Se evaluaron parámetros de porcentaje de contaminación (hongos y bacterias), oxidación y supervivencia, crecimiento y desarrollo.

Ejemplo 3. División y posterior cultivo de los callos.

Posterior a la obtención de callos, estos fueron desinfectados y divididos para realizar un nuevo cultivo. Particularmente, los callos obtenidos fueron divididos para su posterior cultivo de acuerdo con los medios descritos en el Ejemplo 2.

REIVINDICACIONES

1. Un método de micropropagación mediante la obtención de callos de *Piper umbellatum* que comprende las etapas de:

i) seleccionar explantes de hojas jóvenes de *Piper umbellatum* mediante el corte de las hojas en segmentos de entre 8 y 10 mm alrededor de la nervadura central;

ii) desinfectar los explantes;

iii) establecer los explantes, en donde el establecimiento de los explantes se realiza en un medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con una citoquinina y una auxina a una temperatura entre 20°C y 27°C, una humedad relativa entre 80% y 60%, en un periodo entre 12 y 18 horas de luz y entre 6 y 12 horas de oscuridad a una intensidad lumínica entre 1800 y 2500 Lux, por un periodo de entre 4 y 8 semanas hasta obtener callos;

iv) limpiar y dividir los callos formados;

v) cultivar los callos limpios y divididos en un medio MS suplementado con una citoquinina y una auxina;

en donde la citoquinina de los pasos iii) y v) es 6-BAP y se encuentra en una concentración entre 0.5 mg/L a 10 mg/L;

en donde la auxina de los pasos iii) y v) se selecciona del grupo que consiste en 2,4-D, AIA, AG₃ y picloram, y se encuentra en una concentración entre 0.5mg/L y 10 mg/L.

2. El método según la Reivindicación 1, en donde la desinfección de los explantes de hojas jóvenes se realiza por inmersión en alcohol etílico al 70% durante 1 minuto seguido de una solución comercial de NaClO al 5 % durante 5 minutos

3. El método según la Reivindicación 1, en donde la auxina de los pasos i) y v) es AIA.

4. El método según la Reivindicación 1, en donde la 6-BAP y la AIA se encuentran cada una en una concentración de 0.5 mg/L.

FIGURAS

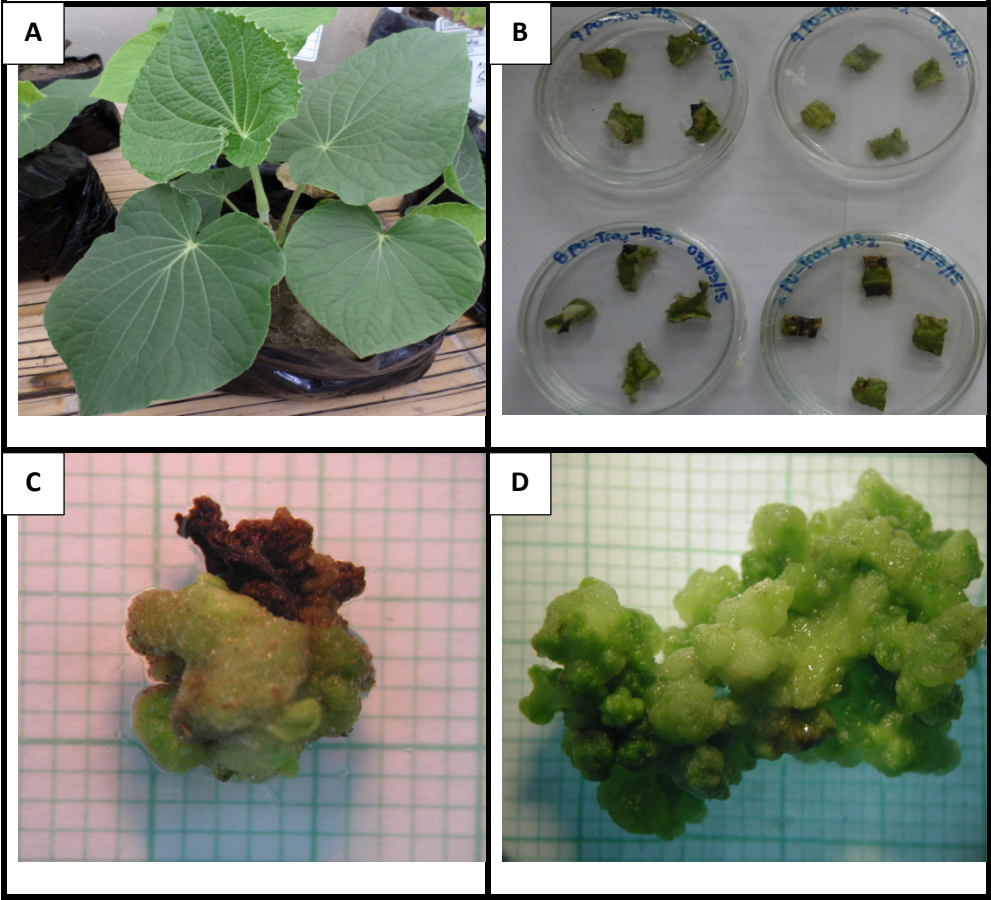


Figura 1

Propagación *in vitro* de *piper umbellatum*

RESUMEN

La presente invención se refiere al desarrollo de métodos de micropropagación *in vitro* de la planta *Piper umbellatum*, que incluyen la selección y desinfección del material vegetal de partida, obtención de explantes, establecimiento de los explantes hasta la obtención de callos y división y posterior cultivo de los callos obtenidos.