

Fuente inorgánica de selenio en el cultivo de callos de *Catharanthus roseus* L.

Luis Guillermo Terreros-Rosales¹

José Juvencio Castañeda-Nava¹

Janet María León-Morales²

Soledad García-Morales^{3,5}

1 Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Camino Arenero núm. 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México. CP. 45019. Tel. 333 3455200, ext. 2032. (luterreros-al@ciatej.edu.mx; jcastaneda@ciatej.mx).

2 Coordinación Académica-Región Altiplano Oeste-Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Carretera Salinas-Santo Domingo núm. 200, Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí, México. CP. 78600. Tel. 496 9634030. (janet.leon@uaslp.mx).

3 CONAHCYT-Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Camino Arenero núm. 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, México. CP. 45019. Tel. 333 3455200, ext. 2033.

Autora para correspondencia: smorales@ciatej.mx

Resumen

Catharanthus roseus (L.) es una especie con alto valor farmacéutico y ornamental, lo que ha llevado a la búsqueda de alternativas biotecnológicas para mejorar el establecimiento de cultivos celulares. El objetivo de este trabajo fue inducir la formación de callo en distintos explantes de *C. roseus* y evaluar el efecto de dos fuentes inorgánicas de selenio (Se) en su crecimiento para identificar el mejor intervalo de concentraciones. La formación de callos se indujo a partir de hipocótilos y de hojas, al evaluar tres medios de cultivo diferentes. Para incrementar la producción de biomasa de callos de *C. roseus*, se utilizó selenito de sodio (Na_2SeO_3) y selenato de sodio (Na_2SeO_4) como fuentes inorgánicas de Se. La inducción de callos y la evaluación del crecimiento se realizó en el año 2022. Se probaron concentraciones de 1, 5, 10, 15, 20, 50 y 100 mg L^{-1} de ambos compuestos, en dos experimentos independientes. Los tratamientos con 1, 5 y 10 mg L^{-1} de Na_2SeO_3 y Na_2SeO_4 produjeron callos friables y con mayor peso fresco. La fuente de Se influyó en el crecimiento de los callos; ya que con 1 mg L^{-1} de Na_2SeO_4 se obtuvo un peso fresco de 0.52 g, superior al obtenido con la misma concentración de Na_2SeO_3 . Las concentraciones mayores a 20 mg L^{-1} , de ambas fuentes, afectaron negativamente el crecimiento de los callos.

Palabras clave:

Catharanthus roseus, callogénesis, selenato, selenito.



Catharanthus roseus, conocida también como vinca, es una especie herbácea perenne con un alto valor ornamental y cultural debido a su uso en la medicina tradicional. Esta especie es utilizada en distintas culturas alrededor del mundo para tratar diversos padecimientos como infecciones estomacales, gastritis o asma. También, se han reportado actividades anticancerígena, antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana en los extractos de hojas y raíces (Das *et al.*, 2020).

Además, diversos alcaloides producidos en esta especie, como la ajmalicina, la vinblastina y la vincristina, tienen actividades anticancerígenas (Dhyani *et al.*, 2022). Existen productos farmacéuticos a partir de estos compuestos que generan más de 100 millones de dólares al año (Rojas-Sandoval, 2022). De este modo, el estudio de *C. roseus* ha ganado gran importancia en la investigación científica enfocada en la producción de fármacos que involucran a los metabolitos secundarios producidos por esta especie (Dhyani *et al.*, 2022).

Aunque esta planta tiene altos rendimientos en su reproducción por semillas, es necesaria la propagación asexual para asegurar menor variabilidad genética y garantizar mayor homogeneidad del material vegetal en la producción a gran escala. Es necesario estandarizar las condiciones del cultivo como temperatura y fotoperíodo en regiones donde las especies no crecen de manera natural; así como, las concentraciones y los tipos de reguladores de crecimiento de acuerdo con la especie vegetal (Salas-Valdivia *et al.*, 2023).

No obstante, la propagación tradicional no es recomendada para su producción a gran escala debido a bajas tasas de multiplicación (Rojas-Sandoval, 2022). Durante las últimas décadas, las tecnologías del cultivo *in vitro* han sido exploradas en *C. roseus*, donde destaca la producción de callos (Rahman *et al.*, 2019).

Por otro lado, los callos se han estudiado en plantas debido a sus efectos positivos en diferentes especies vegetales. En el cultivo de células en suspensión de *C. roseus* se produjo una mayor cantidad de alcaloides como ajmalicina y serpentina cuando el medio de crecimiento tuvo alguna fuente de Se (Na_2SeO_3 o Na_2SeO_4), comparado con el testigo (Arvy *et al.*, 1995). El Na_2SeO_3 mejoró el crecimiento de *Calendula officinalis* (L.), al aumentar la altura de plántula, el área foliar y el número de hojas (Hernández-Díaz *et al.*, 2021). El Se, en forma de nanopartícula, tuvo un efecto bioestimulante en el desarrollo y en el rendimiento de la biomasa de *C. roseus* y de flores de *C. officinalis* (Garza-García *et al.*, 2023).

Las distintas fuentes de Se están asociadas a cambios en el desarrollo de las plantas, en la producción de metabolitos secundarios, en la tolerancia a distintos tipos de estrés, en el balance hormonal y en la eficiencia fotosintética, entre otros (Behbahani *et al.*, 2020). Hay reportes que indican que concentraciones altas de Se pueden causar fitotoxicidad en distintas especies vegetales (Garza-García *et al.*, 2023).

Por lo que, el efecto del Se en las plantas depende de la especie, la etapa de desarrollo y la fuente del selenio (León-Morales *et al.*, 2019). El objetivo de este estudio fue inducir la formación de callo en distintos explantes de *C. roseus*, mediante la combinación de reguladores de crecimiento; así como, evaluar el efecto de dos fuentes inorgánicas de Se en el crecimiento de los callos para identificar el mejor intervalo de concentraciones.

Este trabajo se realizó en las instalaciones de la Unidad de Biotecnología Vegetal, sede Zapopan, del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). Las semillas de *C. roseus*, variedad Mediterranean Burgundy Halo (BallSeed, USA), se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio (NaClO) comercial al 3% durante 8 y 12 min.

Posteriormente, las semillas se lavaron tres veces con agua destilada estéril durante 3 min. El 15 de marzo de 2022, las semillas se sembraron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) 10% (con 3 g L^{-1} de sacarosa y 8 g L^{-1} de agar) y se mantuvieron en incubación a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. El porcentaje de germinación se determinó 10 días después del establecimiento del experimento.

Los explantes de hipocótilos y de hojas de las plántulas obtenidas en cultivo *in vitro* se colocaron en placas Petri con medio MS (30 g L^{-1} de sacarosa, 8 g L^{-1} de agar) y con los tratamientos con reguladores de crecimiento (Cuadro 1). En cada placa se colocaron cinco hojas y tres hipocótilos con un total de 10 repeticiones por tratamiento. Las placas se mantuvieron en incubación a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 40 días.

Cuadro 1. Tratamientos utilizados con reguladores de crecimiento para la inducción de callo.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)		
	2-4-D	BA	NAA
1	3	2	2
2	0	3	2
3	0	1.5	0.5

2,4-D= ácido 2,4-diclorofenoxiacético; BA= 6-bencilaminopurina; y NAA= ácido-3-naftalenacético.

Para evaluar las diferentes concentraciones de Se, se realizaron subcultivos de los callos obtenidos, con el medio de cultivo del tratamiento 1 y se agregó 1, 10, 50 o 100 mg L⁻¹ de Na₂SeO₃ o Na₂SeO₄. Después de analizar los datos obtenidos del primer ensayo, se llevó a cabo un segundo experimento con un intervalo de concentraciones más estrecho (5, 10, 15 ó 20 mg L⁻¹ de ambas fuentes de Se) y el testigo.

En los dos experimentos, los callos se mantuvieron en incubación a 25 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad durante 60 días. La inducción de callo se determinó mediante imágenes fotográficas y se midió el área de cada callo, mediante el software ImageJ (Versión 1.53s, mayo de 2022).

El crecimiento se evaluó con el peso fresco de los callos, en una balanza analítica (BP121S, Sartorius, 120 g. Goettingen, Alemania). Se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias con la prueba de rango múltiple de Duncan, en Statgraphics Centurion XV (StatPoint Inc., 2007), con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

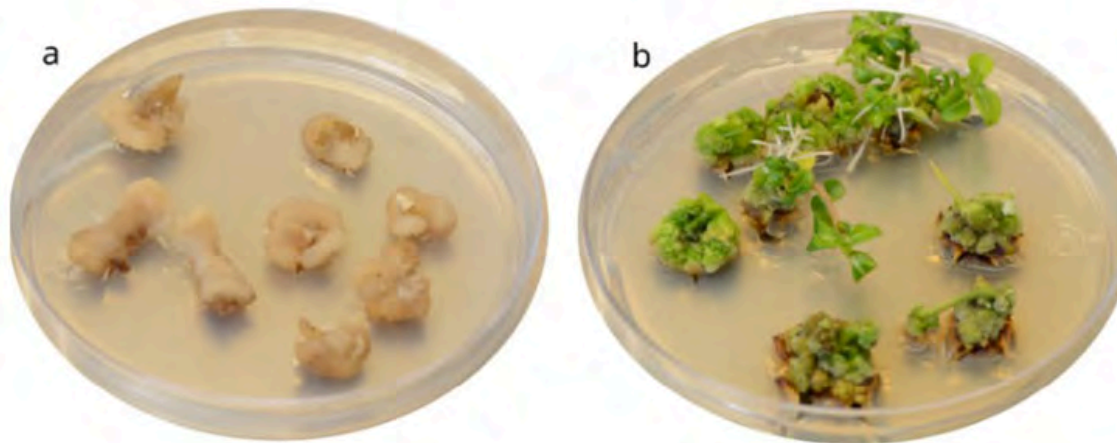
Se obtuvo 93% de germinación después de 10 días de la siembra, la germinación se determinó con la emergencia de la radícula. Con los dos tratamientos (8 y 12 min con NaClO) se tuvo el 95% de éxito en la desinfección de las semillas. Se utilizó el tratamiento con 8 min para el establecimiento del cultivo *in vitro*.

Para la inducción de callos, en el tipo de explante utilizado (hipocótilos u hojas) no se encontró diferencias significativas ($p = 0.3665$). El factor regulador de crecimiento fue estadísticamente significativo ($p = 0.0001$) para el área de callos. Los tratamientos 1 y 3 generaron callogénesis, con un área promedio de callos de 0.72 cm² con el tratamiento 1, en ambos explantes. Con el tratamiento 2 no hubo formación de callos.

Con el tratamiento 3 se obtuvo 0.66 y 0.56 cm² en los callos obtenidos a partir de hipocótilos y de hojas, respectivamente. Se observaron diferencias a nivel cualitativo en los callos de los tratamientos 1 y 3 (Figura 1). La mezcla de reguladores de crecimiento utilizada en el tratamiento 1 estimuló la formación de callos blancos y friables (Figura 1a), estas características del material vegetal son adecuadas para el cultivo masivo de callos en placa o para el establecimiento del cultivo de células en suspensión.



Figura 1. Inducción de callo en *C. roseus*. a) callos obtenidos con el tratamiento 1 (3 mg L⁻¹ de 2,4-D, 2 mg L⁻¹ de BA y 2 mg L⁻¹ de NAA); y b) callos del tratamiento 3 (1.5 mg L⁻¹ de BA y 0.5 mg L⁻¹ de NAA).

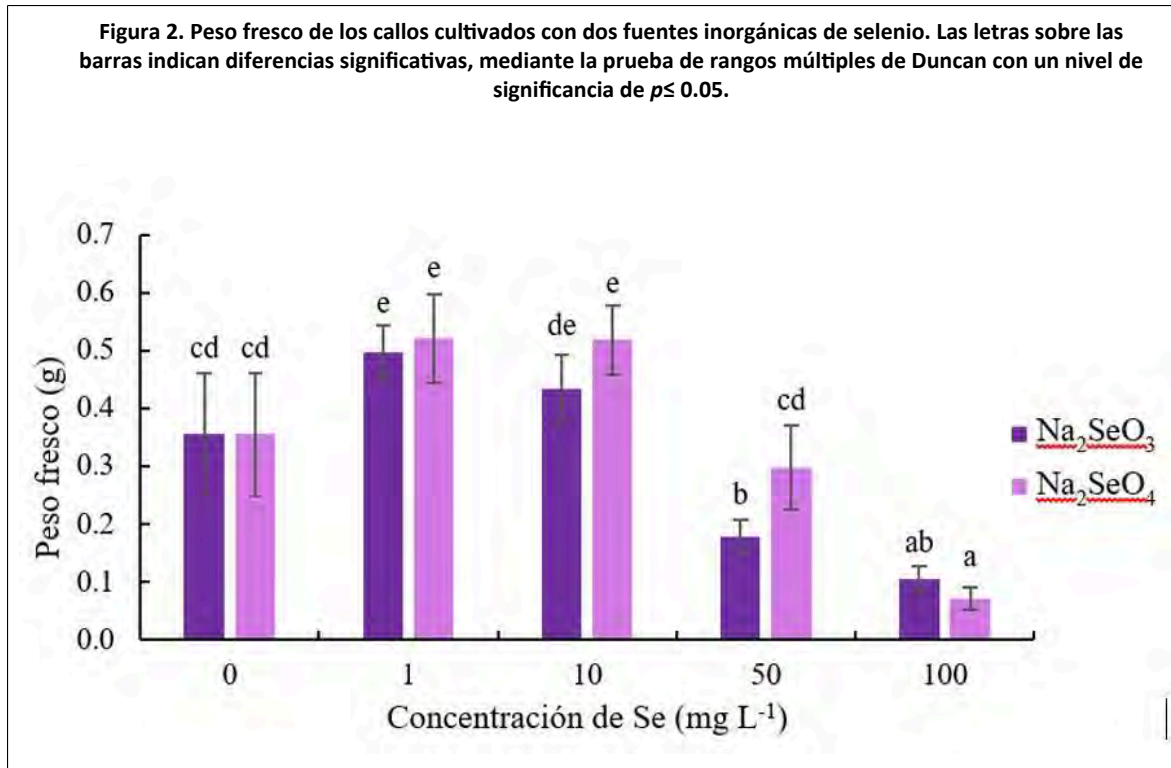


Los resultados de este estudio coinciden con lo reportado por Rahman *et al.* (2019), quienes obtuvieron callos de *C. roseus* con características similares en explantes de hojas provenientes de plántulas crecidas *ex vitro*, en un medio de cultivo con 3 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L⁻¹ de BA. Los callos del tratamiento 3 (Figura 1b) presentaron una consistencia compacta y de color verde, lo que puede deberse a la producción de clorofila, que después de 60 días se observaron procesos de organogénesis. Singh *et al.* (2011) generaron callos con características similares con 1.5 mg L⁻¹ de BA y 1 mg L⁻¹ de NAA.

Los callos con estas propiedades son útiles para la micropropagación debido al proceso de diferenciación observado (Das *et al.*, 2020). Para determinar el efecto del Se en el crecimiento de los callos, sin inducir un proceso de diferenciación, se utilizaron los callos obtenidos con el tratamiento 1. El mejor crecimiento de los callos se obtuvo con 1 y 10 mg L⁻¹ de Na₂SeO₄ (0.52 y 0.53 g de peso fresco, respectivamente) y con 1 mg L⁻¹ de Na₂SeO₃ (0.5 g de peso fresco), estos resultados fueron superiores ($p=0.0001$) al testigo (0.36 g).

Las concentraciones de Se más altas (50 y 100 mg L⁻¹) tuvieron un impacto negativo en el crecimiento de los callos (0.18 y 0.1 g con Na₂SeO₃ y con Na₂SeO₄ 0.3 y 0.07 g, respectivamente) (Figura 2).





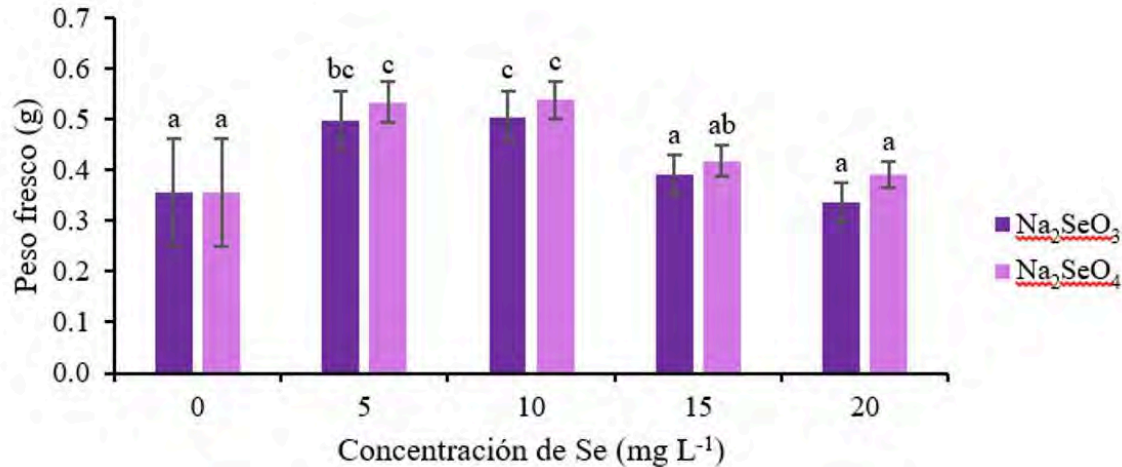
En otros estudios con distintas especies vegetales se obtuvieron resultados semejantes, donde la aplicación de Se tuvo efectos positivos en el desarrollo de las plantas dentro de un intervalo específico de concentraciones (Garza-García *et al.*, 2023). Sotoodehnia-Korani *et al.* (2020) reportaron mayor crecimiento de raíces y de hojas de *Capsicum annuum* con 0.5 y 1 mg L⁻¹ de Na₂SeO₄, mientras que, las plantas mostraron síntomas de toxicidad con dosis mayores a 10 mg L⁻¹.

Contrario a lo observado en *C. roseus*, ya que con 10 mg L⁻¹ de Na₂SeO₄ o Na₂SeO₃ se tuvo el mayor crecimiento de los callos. A su vez, Behbahani *et al.* (2020) reportaron mayor tamaño de hojas, de tallos y de raíces de *Momordica charantia* (L.), cultivada *in vitro*, al utilizar 1 y 4 mg L⁻¹ de Na₂SeO₄; no obstante, concentraciones superiores a 10 mg L⁻¹ disminuyeron el tamaño de las plántulas.

Los resultados obtenidos en el primer experimento permitieron plantear otro ensayo con un intervalo menor de concentraciones. En el segundo experimento, los callos con mayor peso fresco se obtuvieron con 5 y 10 mg L⁻¹ de ambas fuentes de Se ($p= 0.0001$). A partir de 15 mg L⁻¹ se apreció un descenso en el peso fresco de los callos, sin que fuera estadísticamente diferente al testigo ($p= 0.2385$) (Figura 3).



Figura 3. Peso fresco de los callos cultivados con dos fuentes inorgánicas de selenio. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas, mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.



Además, se encontraron diferencias entre las fuentes de Se, el peso fresco de los callos cultivados con 50 mg L⁻¹ de Na₂SeO₃ fue estadísticamente inferior comparado con los callos crecidos a la misma concentración de Na₂SeO₄. Por lo que, el Na₂SeO₃ resultó más tóxico para los callos de *C. roseus* que el Na₂SeO₄. En otros estudios también se estableció un efecto comparativo entre el Na₂SeO₃ y el Na₂SeO₄.

En plantas de *C. annuum*, 5 μM de Na₂SeO₃ incrementó el peso fresco y seco de raíces, hojas y tallo, mientras que, 5 y 10 μM de Na₂SeO₄ resultaron con efectos similares en el crecimiento, al encontrar que *C. annuum* fue más tolerante al Na₂SeO₄. Aunque, ambas fuentes de Se tuvieron un impacto negativo con 20 μM de Na₂SeO₃ o de Na₂SeO₄ (Hernández-Hernández *et al.*, 2018).

De forma similar, León-Morales *et al.* (2019) encontraron que 2.5 μM de Na₂SeO₃ o de Na₂SeO₄ mejoraron el porcentaje de germinación de *C. annuum*. No obstante, el crecimiento de la parte aérea fue superior únicamente en las plántulas que fueron tratadas con Na₂SeO₃. Mientras que, en *Raphanus sativus* (L.) no hubo diferencias significativas en la germinación o en el crecimiento de las plántulas con Na₂SeO₃ o Na₂SeO₄. El efecto del Se en las plantas depende de la fuente, de la concentración, de la especie y del tipo celular.

Conclusiones

El tratamiento con 2 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina, 2 mg L⁻¹ de ácido 3-naftalenacético y 3 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético favoreció la formación de callos friables. La aplicación de Na₂SeO₃ o Na₂SeO₄ (1, 5 o 10 mg L⁻¹) al medio de cultivo tuvo un efecto positivo en el tamaño y en el peso de los callos; mientras que, una dosis mayor a 20 mg L⁻¹ de ambas fuentes de Se afectó negativamente el crecimiento de los callos.

Agradecimientos

El primer autor agradece al CONAHCYT por la beca de Maestría en Ciencias de la Floricultura (CVU 1117428) y al Laboratorio Nacional PLANTECC por las facilidades para la realización de este estudio.

Bibliografía

- 1 Arvy, M. P.; Thiersault, M. and Doireau, P. 1995. Relationships between selenium, micronutrients, carbohydrates, and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cells. *Journal of Plant Nutrition*. 18(8):1535-1546. 10.1080/01904169509365002.
- 2 Behbahani, S. R.; Iranbakhsh, A.; Ebadi, M.; Majd, A. and Ardebili, Z. O. 2020. Red elemental selenium nanoparticles mediated substantial variations in growth, tissue differentiation, metabolism, gene transcription, epigenetic cytosine DNA methylation, and callogenesis in bittermelon (*Momordica charantia*), an *in vitro* experiment. *PLoS ONE*. 15(7):1-22. 10.1371/journal.pone.0235556.
- 3 Das, A.; Sarkhar, S.; Bhattacharyya, S. and Gantait, S. 2020. Biotechnological advancements in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 104:4811-4835. 10.1007/s00253-020-10592-1.
- 4 Dhyani, P.; Quispe, C.; Sharma, E.; Bahukhandi, A.; Sati, P.; Attri, D. C.; Szopa, A.; Sharifi#Rad, J.; Docea, A. O.; Mardare, I.; Calina, D. and Cho, W. C. 2022. Anticancer potential of alkaloids: a key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine. *Cancer Cell International*. 22:206. 10.1186/s12935-022-02624-9.
- 5 Garza-García, J. J. O.; Hernández-Díaz, J. A.; León-Morales, J. M.; Velázquez#Juárez, G.; Zamudio-Ojeda, A.; Arratia#Quijada, J.; Reyes#Maldonado, O. K.; López-Velázquez, J. C. and García-Morales, S. 2023. Selenium nanoparticles based on *Amphipterygium glaucum* extract with antibacterial, antioxidant, and plant biostimulant properties. *Journal of Nanobiotechnology*. 21:252. 10.1186/s12951-023-02027-6.
- 6 Hernández-Díaz, J. A.; Garza-García1, J. J.; García-Gaytán, V.; León-Morales, J. M.; Zamudio-Ojeda, A. and García-Morales, S. 2021. Beneficial elements improve the growth, biomass production, and photosynthetic pigments of *Calendula officinalis* L. seedlings. *Horticultural Science and Technology*. 39(4):413-423. <https://doi.org/10.7235/HORT.20210037>.
- 7 Hernández-Hernández, M.; León-Morales, J. M.; López-Bibiano, Y.; Saldaña-Sánchez, W. D. and García-Morales, S. 2018. Comparative effect of selenite and selenate on the growth and content of photosynthetic pigments in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Biotecnología y Sustentabilidad*. 3(2):26-37. 10.57737/biotecnologiaysust.v3i2.489.
- 8 León-Morales, J. M.; Panamá-Raymundo, W.; Langarica-Velázquez, E. C. y García-Morales, S. 2019. Selenio y vanadio en la germinación y el crecimiento de plántulas de chile (*Capsicum annuum* L.) y rábano (*Raphanus sativus* L.). *Revista Bio Ciencias*. 6:e425. 10.15741/revbio.06.e425.
- 9 Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3):473-497. 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- 10 Rahman, N. N. A.; Rosli, R.; Kadzimin, S. and Hakimian, M. 2019. Effects of auxin and cytokinin on callus induction in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Fundamental and Applied Agriculture*. 4(3):928-932. 10.5455/faa.54779.
- 11 Rojas-Sandoval, J. 2015. *Catharanthus roseus* (Madagascar periwinkle). *CABI Compendium*. CABI Digital Library. 10.1079/cabicompendium.16884.
- 12 Salas-Valdivia, D.; Díaz-Godínez, L. A.; Castañeda-Nava, J. J. y Rodríguez-Domínguez, J. M. 2023. Micropropagación de piña (*Ananas comosus* L. Merr) variedad MD2 mediante proliferación de yemas axilares. *Mexican Journal of Biotechnology*. 8(3):49-62. 10.29267/mxjb.2023.8.3.49.
- 13 Singh, R.; Kharb, P. and Rani, K. 2011. Rapid micropropagation and callus induction of *Catharanthus roseus in vitro* using different explants. *World Journal of Agricultural Sciences*. 7(6):699-704.

- 14 Sotoodehnia-Korani, S.; Iranbakhsh, A.; Ebadi, M.; Majd, A. and Ardebili, Z. O. 2020. Selenium nanoparticles induced variations in growth, morphology, anatomy, biochemistry, gene expression, and epigenetic DNA methylation in *Capsicum annuum*, an *in vitro* study. *Environmental Pollution*. 265(B):114727. 10.1016/j.envpol.2020.114727.
- 15 StatPoint Inc. 2007. Statgraphics® Centurion XV, version 15.2.06. Warrenton, Virginia, USA.



Fuente inorgánica de selenio en el cultivo de callos de *Catharanthus roseus* L.

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 August 2024
Date accepted: 01 September 2024
Publication date: 31 October 2024
Publication date: Aug-Sep 2024
Volume: 15
Issue: 6
Electronic Location Identifier: e3444
DOI: 10.29312/remexca.v15i6.3444
Funded by: CONAHCYT
Funded by: Laboratorio Nacional PLANTECC
Award ID: CVU 1117428

Categories

Subject: Nota de investigación

Palabras clave:

Palabras clave:

Catharanthus roseus
callogénesis
selenato
selenito

Counts

Figures: 3
Tables: 1
Equations: 0
References: 15
Pages: 0