

Capítulo 29

Propagación masiva de piretro y guanto mediante el cultivo de tejidos

L. W. Levy*

P. E. Levy*

Agradecimientos

Los autores agradecen la cooperación del Dr. T. Murashige, la Sra. Judith Steiner y el Ing. Julio Cabrera en el desarrollo de las técnicas descritas en el presente informe.

* Industria Extractora C. A. (INEXA), Quito, Ecuador.

El Caso del Piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium*)

La planta de piretro es la fuente de un insecticida de amplio espectro, baja toxicidad para los humanos y animales de sangre caliente, y corta persistencia en el medio ambiente; por estas cualidades es el insecticida preferido en un mundo cada vez más consciente de la ecología y de la necesidad de preservarla (McLaughlin, 1973; Moore y Levy, 1975).

Las áreas más importantes de producción de piretro en el mundo están localizadas en las zonas montañosas altas de Kenya, Tanzania, Ruanda y Ecuador. En Ecuador, la siembra comercial de esta especie se inició en 1954 (Levy, 1954; Moore y Levy, 1975); en 1958, INEXA construyó en Quito una planta para la extracción química del producto, y en 1967 instaló otra para la refinación del extracto.

El extracto de piretro es uno de los principales artículos de exportación de la región de los Andes ecuatorianos y constituye, por lo tanto, no sólo una fuente de divisas para el país sino una fuente de ingresos para cientos de campesinos que viven en zonas marginales, donde es muy difícil sembrar cualquier otro cultivo. El piretro se ha considerado como un factor importante en el progreso social de estas zonas.

Cosecha manual y sus implicaciones

El análisis de un aspecto del cultivo del piretro, el relacionado con la cosecha manual de las flores, y de su efecto económico en los costos de producción permitirán entender mejor la decisión de recurrir a técnicas de propagación por medio del cultivo de tejidos.

Los componentes insecticidas del piretro, las piretrinas, se encuentran en las flores; su contenido aumenta a medida que la flor se desarrolla, y alcanza un nivel máximo cuando se han abierto completamente por lo menos dos anillos de florecillas. Pero las plantas de piretro que crecen en los Andes ecuatorianos a 3000 metros sobre el nivel del mar producen flores en forma continua durante unos cuatro años; de esa manera, las flores totalmente abiertas, que son las que se cosechan, están mezcladas con numerosas flores parcialmente abiertas y con capullos.

Por la razón anterior, es importante cosechar en forma selectiva, y el único método de remover solamente las flores maduras sin afectar el desarrollo de las inmaduras y los capullos, es la cosecha manual; esto hace del piretro un cultivo con altos requerimientos de mano de obra. Se ha

calculado que cada día del año se cosechan a mano unos 150 millones de flores de piretro en Kenya, Tanzania, y Ecuador.

Por ser el piretro un cultivo que requiere tanta mano de obra, sus costos de producción están siempre en aumento, debido principalmente a las constantes alzas de los salarios. Este aumento encarece a su vez el precio del extracto y este hecho, unido a la inestabilidad en la oferta mundial típica de un producto natural —cuya producción sufre por cambios climáticos y fracasos agronómicos— ha influido para que los piretroides sintéticos (Elliot, 1977) alejen el producto natural de los mercados mundiales. Consecuentemente, la demanda por el piretro natural ha disminuido, y si esta tendencia continúa, podrían presentarse desastres económicos y sociales en las áreas productoras del mundo.

Obtención de plantas más eficientes

Tanto en Ecuador como en Kenya se ha aceptado que los aumentos en los costos de producción del piretro, como los de otros productos naturales, se pueden compensar solamente con aumentos permanentes en la eficiencia de la producción. Por lo tanto, se está dando prioridad a la búsqueda de plantas más productivas en términos de volumen de flores y, especialmente, en términos de contenido de piretrinas, siendo este último el factor más importante en los intentos por aumentar la eficiencia.

Tanto en Kenya (Parlevliet, 1975) como en Ecuador se han encontrado plantas individuales con esas características. Para 1975 se habían seleccionado en Ecuador 57 plantas diferentes luego de 10 años de intensos y arduos trabajos financiados por la industria privada local. Había menos de 50 clones de cada una de estas plantas madre, los cuales habían sido multiplicados vegetativamente en la forma convencional. Se presentaba entonces el problema de cómo reproducir masiva y rápidamente estas plantas en cantidades suficientemente altas para sustituir las plantas menos productivas que estaban sembradas en grandes extensiones.

El objetivo de las empresas productoras de piretro consistía en multiplicar las selecciones a razón de 8 millones de plantas por año, para cubrir una extensión de 1000 hectáreas en cuatro años. Siendo el piretro una especie autoincompatible, la producción de semilla alteraría la constitución genética de las plantas seleccionadas; por lo tanto, el camino más rápido y seguro para reproducir estas plantas era mediante algún método de multiplicación vegetativa.

El cultivo de tejidos como alternativa

Toshio Murashige, de la Universidad de California en Riverside, había realizado experimentos preliminares con el cultivo in vitro de plantas de piretro; lo hizo por iniciativa de Joseph B. Moore, de McLaughlin Gormley King Co., la principal distribuidora de piretro de los Estados Unidos. Roest (1976), en Holanda, también había realizado experimentos con el cultivo in vitro de piretro, pero había concluido que el método no era aún apropiado para uso comercial, por las dificultades que encontró en el desarrollo de los brotes.

Los primeros informes sobre el trabajo de Murashige llegaron a Ecuador en 1976¹. Fue entonces cuando se decidió estudiar, junto con R. H. Binnington, la posibilidad de propagar masivamente el piretro en el país, para alcanzar el objetivo de la siembra con plantas seleccionadas.

Usando 100 cortes de uno de los clones ecuatorianos, T. Murashige y Judith Steiner (de Ecuador) efectuaron un experimento en los laboratorios de la Universidad de California en Riverside, en 1976; las plántulas obtenidas de este experimento fueron llevadas en tubos de ensayo a Ecuador, donde se enraizaron en un invernadero improvisado y posteriormente se trasplantaron al campo. Hubo cerca de 90% de sobrevivencia y desarrollo de plantas maduras y sanas con excelentes características de producción floral.

Producción masiva de piretro mediante el cultivo de tejidos. Como laboratorio de cultivo de tejidos se usó un edificio pequeño que ya existía en las instalaciones de la fábrica INEXA, cerca de Quito; tres habitaciones con una superficie total de 30 m² se adecuaron para la preparación del medio de cultivo, la transferencia y el cultivo; se trabajaba allí con 12,500 tubos de ensayo en la etapa I (iniciación del cultivo) y en la etapa II (subcultivo para multiplicación de brotes). Para la etapa III, de enraizamiento, se construyó un invernadero muy simple para 500 frascos Mason (frascos de boca ancha, de 1 litro).

Para ampliar la capacidad de trabajo desde la escala de laboratorio, con sólo unos pocos tubos de ensayo, hasta una escala de producción comercial, se aplicaron los principios clásicos de la ingeniería química para aumentar la escala en procesos químicos. En el diseño inicial de la instalación se tomaron decisiones arbitrarias, basadas en observaciones que el

1. Binnington, R. H. Comunicación personal.

equipo había realizado en diferentes laboratorios de investigación; luego, este diseño se fue optimizando progresivamente, aprendiendo de los éxitos y fracasos de diversos ensayos.

El objetivo era aumentar el ritmo de crecimiento de los cortes en la etapa I y de los cortes de multiplicación en la etapa II, así como aumentar el porcentaje de plántulas que lograban formar raíces en la etapa III. Simultáneamente, se hicieron mejoras sanitarias en respuesta a infecciones que ocurrían en las tres etapas. Los factores que requerían optimización eran los siguientes:

- Condición de la planta madre usada para el primer corte.
- Sistema de preparación de cortes usado en las etapas I y II.
- Composición del medio para las tres etapas.
- Composición de la tierra para la etapa de aclimatación de las plantas en el invernadero.
- Condiciones ambientales en el invernadero.

Esencialmente, se emplearon las técnicas y el medio descritos por Huang y Murashige (1976).

Cuando el número de plántulas producidas en la etapa II se acercaba al requerido para satisfacer el objetivo inicial, se ampliaron las instalaciones de la etapa III para acomodar 2100 frascos (en un invernadero de 42 m²). Para las etapas de 'aclimatación' de las plantas ya enraizadas y sembradas en tierra se construyó un segundo invernadero de 205 m².

A los ocho meses de haber iniciado el programa se logró llegar a un nivel óptimo de trabajo para satisfacer el objetivo deseado. Entonces se diseñó un calendario de producción de plantas, el cual se tenía que seguir rigurosamente, no sólo para evitar la excesiva eliminación de plantas en una etapa en que pudiera ocasionar la interrupción de la siguiente etapa (o hasta el fracaso de todo el programa) sino también para ajustar la producción al período normal de siembra para el piretro. En Ecuador este período se limita a la primera mitad de la estación lluviosa, la cual ocurre normalmente de febrero a julio. En otras palabras, el programa de siembras del año se limita a un período de 90 días, de febrero a mayo y, de acuerdo con éste, hay que organizar el programa de trabajo del laboratorio.

Las plántulas que entraban a la etapa III después de abril ya no podían estar listas para las siembras comerciales que comenzaban en febrero del

año siguiente (Figura 29.1) y se tenían que guardar para las próximas siembras, 12 meses más tarde. Esta limitación era muy severa ya que el objetivo era producir 8 millones de plantas para poder sembrar 200 hectáreas en el año.

La producción de plántulas por cultivo de tejidos para siembras comerciales tolera en menor grado las fallas y contratiempos que comúnmente se aceptan en los programas de investigación a nivel de laboratorio. Esto es así, no solamente porque cada paso de la secuencia tiene que cumplirse a tiempo para permitir el siguiente, sino también por razones económicas obvias. Por ejemplo, en un laboratorio de investigación es común que una de cinco plantas cultivadas *in vitro* no esté creciendo bien, y se puede eliminar; eso representa un 20% de fracaso, porcentaje que es muy aceptable a nivel de investigación pero no así cuando se trabaja a nivel de cultivo comercial; en este caso, tal porcentaje implica eliminar en un solo mes 12,400 plantas en la Etapa III, o sea la cantidad de material de siembra necesario para 50 hectáreas (Figura 29.1).

Durante el trascurso del programa de producción de plantas de piretro *in vitro*, se ha podido demostrar que sí es posible alcanzar un nivel muy aceptable de precisión en el desenvolvimiento de cada etapa, hecho que convierte esta técnica en un proceso comercialmente viable.

Capacidad de producción y costos. Como lo muestra el diagrama de flujo del proyecto (Figura 29.1) que operó en Ecuador, el trabajo comienza con una sola planta de piretro, la cual da hasta 100 cortes para la etapa I en el proceso de micropropagación; el crecimiento inicial de estos cortes tarda unas cuatro semanas.

Luego empiezan las etapas de multiplicación cada cuatro semanas, con un coeficiente de 5 a 1, en la etapa II. Para esta multiplicación, se retiran las plantas de los tubos, se colocan en cajas Petri esterilizadas, y se dividen en cinco secciones iguales. Cada sección se replanta en un tubo con medio de cultivo fresco de tal manera que, después de cuatro semanas, los 100 tubos iniciales de la etapa I se convierten en 500 tubos; cada planta puede subdividirse nuevamente cuatro semanas más tarde, lo que da como resultado 2500 tubos.

Después del tercer período de cuatro semanas, se obtienen 12,500 plantas en igual número de tubos; a este nivel se introduce un cambio en el sistema. Luego de una nueva subdivisión en cinco secciones, la mayor parte de las plantas se transfieren a frascos Mason con medio para enraizamiento, o sea que pasan a la etapa III; un número menor de secciones

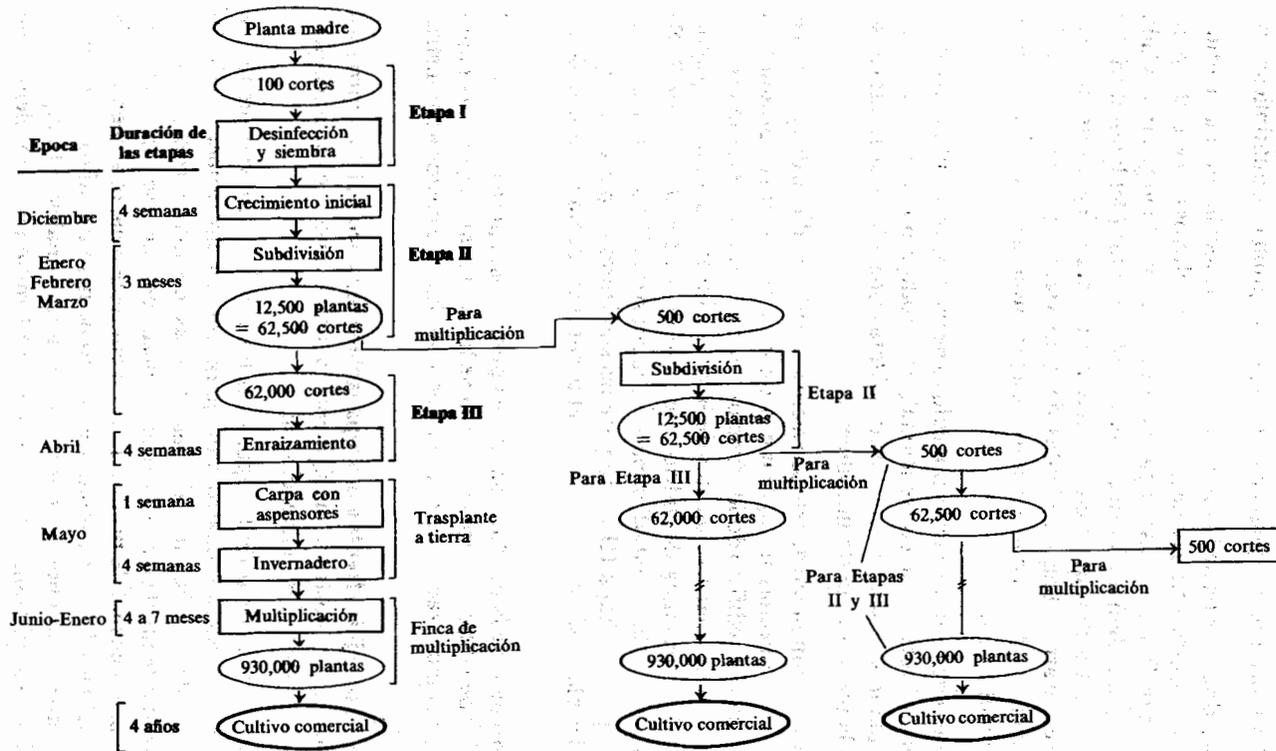


Figura 29.1. Diagrama de flujo para la propagación del piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) mediante el cultivo de tejidos, en un cuarto con capacidad para 12,500 plantas. Pasan 62,000 cortes/mes a enraizamiento, y 930,000 plantas/mes al cultivo comercial.

permanece en la etapa de multiplicación para producir otras 12,500 plantas cuatro semanas más tarde, cuando otra vez una gran parte pasa a la etapa III, y una parte más pequeña queda para continuar la multiplicación.

La finca donde se hacía la multiplicación estaba localizada a una altura de 2700 msnm; esta altura es menor que la de los cultivos comerciales para producción de flores, y más propicia para el crecimiento vegetativo. Cada mes se trasplantaban a esta finca unas 62,000 plantas (del laboratorio) y permanecían allí durante cuatro a seis meses, bajo riego; durante este tiempo se desarrollaban en plantas de gran vigor, apropiadas para la propagación vegetativa convencional. La producción era de 15 a 20 ramillas por planta madre.

Combinando la propagación por cultivo de tejidos con el último paso de propagación vegetativa convencional, se produjeron cada mes unas 930,000 plantas, o sea 11 millones de plantas por año. Por lo tanto, se cumplió la meta propuesta inicialmente.

El aspecto económico de este proyecto se puede dividir en dos partes: las inversiones fijas hechas al empezar el programa y los costos de producción de cada planta. El edificio donde funciona el laboratorio ya existía y sólo se requirió acondicionarlo en un área de 30 m². La inversión total en equipos, instrumentos, artículos de vidrio, etc., fue de US\$30,000 en 1977. Se gastaron otros US\$25,000 adicionales en la construcción de los invernaderos tanto para la Etapa III como para las siguientes etapas de 'aclimatación' de las plantas. La inversión total fue entonces de unos US\$55,000 en 1977.

El costo neto de la producción de una planta, lista para el trasplante al campo, fue de US\$0.15. Este costo incluye los materiales usados, la mano de obra y la amortización de equipos, pero no incluye costos administrativos.

El cultivo de tejidos frente a la propagación convencional. La reproducción in vitro ha demostrado las siguientes ventajas en comparación con la propagación vegetativa convencional:

- a. Importante ahorro de tiempo. Con los métodos convencionales se hubieran requerido cuatro años para obtener las primeras 930,000 plantas de piretro; usando las técnicas de micropropagación se alcanzó este nivel en el primer año y desde entonces se convirtió en el volumen mensual de producción. En consecuencia, el aumento en la productividad de los campos de piretro ocurrió tres años antes de lo que hubiera sido posible por medios convencionales; esto representó un ingreso adicional estimado en US\$4 millones para cientos de campesinos en Ecuador.

- b. Mejores características de crecimiento de las plantas propagadas in vitro.
- c. Posibilidad de mayor previsión en la planificación de las siembras. La micropropagación permite producir un número predecible de plantas en cualquier momento y aplicar por ello sistemas industriales de planificación, ya que la producción de plantas se independiza de las condiciones climáticas.

En resumen, se encontró que la inversión que se había decidido hacer para transformar un trabajo de investigación en un programa a nivel industrial estuvo bien justificada.

La Reproducción del Guanto (*Datura sanguinea*)

Esta especie, conocida comúnmente con el nombre de guanto, es una solanácea arbórea y perenne. Se conoce también como *Brugmansia sanguinea*. Es originaria de los Andes ecuatorianos, entre los 2000 y los 3000 msnm, y tiene una larga historia de uso en la medicina tradicional indígena de la zona (Trease y Evans, 1983).

La planta del guanto contiene varios alcaloides, uno de los cuales es la escopolamina, que INEXA está extrayendo desde comienzos de los años setenta. La escopolamina tiene propiedades calmantes que se aprovechan en todo el mundo en fármacos contra mareos y cólicos de diversa índole.

Igual que con las piretrinas, en el caso de la escopolamina los esfuerzos para aumentar la eficiencia en la producción se orientan hacia la selección de plantas individuales de alta productividad, tanto en términos del volumen (de hojas en este caso) como en términos de contenido del alcaloide de interés comercial; este segundo factor permite aumentar la eficiencia industrial, lo cual es de sumo interés cuando los procesos de extracción son caros.

Por lo tanto, la mayor productividad permite no sólo aumentar la eficiencia de la operación agrícola sino también mejorar la eficiencia industrial, ya que en el proceso de extracción se logran mayores rendimientos usando volúmenes similares de solvente, energía, mano de obra y materia prima.

Para 1979 los productores de hojas de guanto de Ecuador habían logrado seleccionar plantas individuales con estas características. Se presentaba entonces la misma situación que con el piretro en 1975: la necesidad de multiplicar rápida y masivamente estas plantas para aprovechar su alta productividad a la mayor brevedad posible.

A diferencia de la situación de 1975, cuando la reproducción por cultivo de tejidos era un concepto nuevo y lejano, en 1980 se contaba con la infraestructura completa y con personal especializado con amplia experiencia para aplicar estas técnicas. I. Steiner, entrenada en California en 1976 para la multiplicación del piretro, dirigió en Ecuador el desarrollo de la investigación para la reproducción in vitro de *Datura sanguinea*.

Tomando como guía las técnicas usadas en otras especies de la misma familia botánica, se probaron simultáneamente varias combinaciones y concentraciones de medios de cultivo. Las observaciones hechas con respecto al tipo de crecimiento, ritmo de crecimiento, coeficientes de multiplicación, y apariencia general de las plantas permitieron determinar los medios deseables para cada etapa, y optimizar los niveles de sales y hormonas.

En agosto de 1981, 16 meses después de haber iniciado los experimentos, ya se tenían las primeras 6000 plantas de guanto en la etapa de aclimatación, en el invernadero. Las primeras 50,000 plantas producidas in vitro permitieron continuar el programa de multiplicación por la vía vegetativa convencional (estacas), simultáneamente con la micropropagación. Para 1985, la mayor proporción del guanto sembrado en Ecuador estaba conformado por clones de las plantas 'madres' seleccionadas por su productividad y reproducidas usando las técnicas del cultivo de tejidos; además, se había alcanzado el objetivo de aumentar la eficiencia industrial, al aumentar la calidad de la materia prima.

En la actualidad prosigue la selección de plantas con niveles altos de producción, y se cuenta con el apoyo del laboratorio de cultivo de tejidos para la tarea de multiplicar plantas individuales de interés.

Cultivo de Tejidos para Acelerar el Uso de Plantas Seleccionadas

Como ocurre con la mayor parte de las técnicas nuevas que reciben mucha publicidad, el cultivo de tejidos ha creado grandes expectativas acerca de sus posibles aplicaciones industriales y comerciales. Sin embargo, algunos

investigadores han lanzado su voz de alerta en contra de estas esperanzas prematuras y posiblemente exageradas, e insisten en que los usos comerciales del cultivo de tejidos y de células de plantas son actualmente muy limitados. Añaden que la mayoría de las plantas pueden ser propagadas por métodos convencionales, sin tener que acudir al difícil trabajo de desarrollar procesos de cultivo de tejidos comercialmente factibles (Krikorian, 1979).

A pesar de esto, los países en desarrollo, que históricamente han derivado gran parte de sus ingresos de las exportaciones agrícolas, encuentran que en los mercados mundiales 600 de sus productos naturales, constituidos por importantes ingredientes de fármacos, alimentos, textiles, etc., se enfrentan cada día más a la competencia de sustancias análogas, artificiales o sintéticas, producidas por las naciones industrializadas. La producción de estas últimas sustancias es muchas veces más barata que la de sus similares naturales y, además, no sufre las fluctuaciones causadas por el clima o por el impacto considerable de los aumentos salariales a que están sometidas las operaciones agrícolas por el uso intensivo de mano de obra.

Generalmente se reconoce que, por razones meramente económicas, la producción de materiales de origen vegetal en los países en desarrollo no debe disminuir; el cultivo de productos económicamente importantes es la principal y en muchos casos la única fuente de ingresos para importantes segmentos de la población, y la exportación de esos productos es una importante fuente de divisas para estos países. Por otra parte, los productos naturales son también, en general, más seguros que sus análogos artificiales, tanto desde el punto de vista de la toxicología humana como de la preservación del medio ambiente.

El dilema se puede solucionar con el desarrollo y la introducción de nuevas variedades de plantas con mejores características de producción; de esa manera, el aumento en las cosechas y en el rendimiento unitario de los cultivos permite contrarrestar los incrementos en los costos de la mano de obra necesaria para la producción de estas nuevas variedades.

Con los trabajos sobre piretro y *Datura sanguinea* descritos aquí, se ha comprobado que las técnicas del cultivo de tejidos, debidamente incrementadas, pueden contribuir en forma significativa a colocar más tempranamente las plantas mejoradas a niveles comerciales. Sin embargo, se reconoce que es principalmente en la etapa inicial del cumplimiento de este propósito, cuando estas técnicas desempeñan un papel importante.

Una vez que una planta individual con características de producción superiores se ha multiplicado mediante el cultivo de tejidos hasta obtener

varios millones de plantas genéticamente idénticas, la propagación subsiguiente se puede realizar por métodos vegetativos convencionales, los cuales pueden ser mucho más económicos.

Desde este punto de vista, el cultivo de tejidos se debe considerar como el 'motor de arranque' para cualquier introducción de plantas especiales. Su ventaja consiste en el tiempo necesario para completar esta introducción a gran escala, que puede ser de vital importancia para mantener un cultivo o sus productos derivados en los mercados mundiales.

Por lo tanto, la propagación masiva de plantas por medio del cultivo de tejidos es una herramienta cuyo uso puede tener consecuencias de gran alcance para importantes segmentos de la población en los países en desarrollo. La búsqueda de variedades más productivas y su propagación masiva, usando las técnicas del cultivo de tejidos, deben considerarse como objetivos importantes para los investigadores latinoamericanos.

Referencias

- Elliot, M. 1977. Synthetic pyrethroids. Symposium Series, no. 42. American Chemical Society (ACS), Washington, D. C.
- Huang, L. C. y Murashige, T. 1976. Plant tissue culture media: Their preparation and some applications. Manual 3. Tissue Culture Association. p. 539-548.
- Krikorian, A. D. 1979. Book review. *Econ. Bot.* 33(1):97-98.
- Levy, L. W. 1954. El piretro en Ecuador. Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
- . 1981. A large scale application of tissue culture: The mass propagation of pyrethrum clones in Ecuador. *Environ. Exp. Bot.* 21(3-4):389-395.
- McLaughlin, G. A. 1973. Pyrethrum, the natural insecticide. En: Cassida, J. E. (ed.). *Pests and insecticides*. Academic Press, Nueva York. p. 3-15.
- Moore, J. B. y Levy, L. W. 1975. Pyrethrum flowers. En: Nelson, R. H. (ed.). *McLaughlin Gormley King Co., Minneapolis, MN, E.U.* p. 1-9.
- Parlevliet, J. E. 1975. Breeding pyrethrum in Kenya. *Pyrethrum Post* 13 (2):47-54.
- Roest, S. 1976. Flowering and vegetative propagation of pyrethrum in vivo and in vitro. Centre of Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, Holanda.
- Trease, G. E. y Evans, W. C. 1983. *Pharmacognosy*. 12 ed. Baillière Tindall, Londres.