



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
" I Z T A C A L A "**

**OBTENCION DE ALCALOIDES DEL TROPANO A
PARTIR DE CULTIVO DE TEJIDO VEGETAL DE
Solandra nitida Z.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
JOSE LUIS ROQUE RESENDIZ

MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

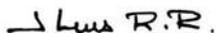
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	M. EN C. SERGIO GONZALES MORENO
VOCAL	DR. BLAS LOTINA-HENNSEN
SECRETARIO	BIOL. GERARDO ORTIZ MONTIEL
1er. SUPLENTE	IRMA DELFIN ALCALA
2do. SUPLENTE	ROBERTO VELASCO GARCIA



ASESOR DEL TEMA: DR. BLAS LOTINA-HENNSEN



SUSTENTANTE: JOSE LUIS ROQUE RESENDIZ

LUGAR DE REALIZACION:

FACULTAD DE QUIMICA. DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO.

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA VEGETAL.

EL ASPECTO FITOQUIMICO SE REALIZO EN EL INSTITUTO DE QUIMICA DE LA UNAM, BAJO LA ASESORIA DEL DR. FEDERICO GARCIA JIMENEZ.

**A MI MADRE FLORA RESENDIZ
POR SU APOYO.**

**A MIS HERMANAS: GUADALUPE, JULIA,
MARIA, JUANA, LULU.**

**A MIS SOBRINAS: MATILDE,
JULIETA, CARMEN.**

INDICE

	Pág
I. INTRODUCCION.....	8
II. FAMILIA SOLANACEA.....	11
III. ALCALOIDES.....	13
A) a. Características generales	
b. Clasificación	
c. Nomenclatura	
d. Función en las plantas	
B) a'. Alcaloides del tropano	
b'. Biosíntesis de alcaloides del tropano	
IV. FITOQUIMICA DEL GENERO <i>Solanandra</i>.....	22
V. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.....	23
C) Características generales de la técnica de cultivo de tejidos y sus aplicaciones	
D) Cultivo de tejidos y producción de alcaloides en la familia Solanacea	
VI. MATERIALES Y METODOS	36

VII. RESULTADOS 40

VIII. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSION 43

VIII. CONCLUSIONES 55

X. RECOMENDACIONES 57

BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS

2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIA	ácido indol 3-acético
AIB	ácido 3-indolbutírico
ANA	ácido naftalenacético
BAP	6-bencilaminopurina
ZiP	N-isopentenilaminopurina
K	6-furfurilaminopurina
GA ₃	ácido giberelico
MS	medio de Murashige & Skoog
LS	medio de Linsmaier & Skoog
SH	medio de Schenk & Hildebrand
WB	medio de Wood & Braun

RESUMEN

En éste trabajo se incluye una revisión bibliográfica, etnobotánica, económica, fitoquímica; cultivo de tejidos vegetales y producción de alcaloides del tropano; así como el siguiente trabajo experimental.

Se indujeron callos de los diferentes órganos de *Solandra nitida* Z., usando el medio estandar de Murashige & Skoog (1962) bajo condiciones de iluminación constante (7000lx). Los callos derivados de tallo se establecieron en medio estandar con 5×10^{-5} M de ANA y 10^{-6} - 10^{-7} M de BAP; 5×10^{-7} M de 2,4-D y 5×10^{-6} , 5×10^{-7} M de K; los callos derivados de hoja se obtuvieron en medio con 5×10^{-6} M de ANA y 5×10^{-6} , 5×10^{-8} M de BAP; 5×10^{-6} M, 5×10^{-7} M de 2,4-D y 5×10^{-6} - 5×10^{-7} M de K. Para el caso de la raíz, no se logró establecer callos pero cuando los segmentos de raíz de plántulas generadas *in vitro* se sembraron en medio estandar con 5×10^{-6} M de ANA y 5×10^{-8} M de BAP se logró el establecimiento de cultivo de raíces *in vitro*.

Los análisis preliminares para alcaloides mostraron que los callos derivados de tallo y hoja no presentan alcaloides; mientras que la raíz cultivada *in vitro* sí. En cuanto a los órganos intactos, el tallo y la raíz dieron positivo y la hoja negativo para la prueba preliminar para alcaloides.

El análisis por cromatografía de gases mostró que sólo la raíz de la planta completa presenta alcaloides: siendo el porcentaje de alcaloides totales de 0.10 %; de los cuales el 0.0017 % corresponde a escopolamina; 0.001288 % a atropina; 0.012 % a la hidroxihiosciamina y más de diez alcaloides no identificados.

I. INTRODUCCION

Para atender la salud del pueblo mexicano, México importa muchos fármacos como son: morfina, narcotina, efedrina, alcaloides del indol, de la pilocarpina y alcaloides del tropano, estos últimos incluyen escopolamina, hiosciamina y atropina. (INEGI 1987). México pagó más de 2 millones de dólares en 1989 por estos. (SECOFI 1987, ver cuadro 1). Los alcaloides del tropano son utilizados con fines terapéuticos, anestésicos y midriáticos;. (Martindale 1982; Glasby 1975), además de estar incluidos en el cuadro básico de medicamentos. (CSG, 1984). Estos alcaloides se obtienen en forma comercial de plantas de la familia Solanacea, que incluyen a los siguientes géneros: *Atropa belladonna*, *Datura stramonium*, *Datura metel* var *fastuosa*, *Hyoscyamus niger*, *Hyoscyamus muticus* y *Scopolia parviflora* (Martindale 1982; Youngken 1951; Tyler Brady & Robbers 1981; Trease & Evans 1973) ver cuadro 2.

Los alcaloides del tropano importados en 1971 incluían: atropina, homatropina, bromhidrato de escopolamina, bromuro de N-metilioscina, sulfato de atropina, sulfato de hioscina, metilnitrato de atropina, clorhidrato de escopolamina, nitrato de metoescopolamina. En 1972 se encontró un comportamiento similar al de 1971, en cambio para 1973 sólo se importó escopolamina y alcaloides totales del tropano, para 1974 ocurrió lo mismo que el año anterior, sólo con la diferencia de que se incluyó atropina: a partir de 1975 éste comportamiento se ha mantenido hasta 1990. (SECOFI 1984 - 1990, INEGI 1970 - 1983).

El presente trabajo incluye una revisión bibliográfica a nivel económico, etnobotánico, fitoquímico y producción de alcaloides del tropano a partir de cultivo de tejidos vegetales en la familia Solanacea. Esta revisión tuvo la finalidad de reunir información acerca de los géneros de la familia, que se hallasen en nuestro país y que pudieran ser potencialmente útiles para la obtención de alcaloides del tropano. Así se encontró que el género *Datura* y *Solandra* tienen amplia distribución en México.

En el caso de *Solandra* se sabe que es un género relativamente grande constituido por 10 ó 12 especies. (Evans 1979; Schultes 1979).

La información recabada acerca de la producción de metabolitos secundarios (alcaloides) a partir de cultivo de tejidos vegetales, indican que es muy amplia para algunos géneros de la familia Solanacea (*Atropa*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Scopolia*, *Duboisia*), pero nulos para el género *Solandra*.

OBJETIVOS

1. Establecer la relación y concentración de fitorreguladores (auxina - citocinina), para la inducción y establecimiento de un cultivo de callos a partir de los diferentes órganos de *Solandra nitida* Z.

2. Determinar la presencia de alcaloides del tropano en cultivo de callos que se obtengan de los diferentes órganos de *Solandra nitida* Z.

3. Cuantificar e identificar los alcaloides de hojas, tallo y raíz de *Solandra nitida* Z.

II. FAMILIA SOLANACEA

La familia Solanacea comprende cerca de 84 géneros y casi 3 mil especies de plantas. Son plantas herbáceas y leñosas, que se distribuyen en las regiones templadas y tropicales del planeta. (Hunziker 1979; D'Arcy 1979). Esta familia tiene enorme importancia mundial, y entre algunos géneros útiles de ella están: *Solanum* (papa), *Lycopersicum* (tomate), *Nicotiana* (tabaco) y *Capsicum* (guindilla, pimienta, pimentón, chile). Otros géneros son ornamentales, tal es el caso de *Petunia*, *Schizanthus*, *Nicotiana*, *Salpiglossis* y *Solanum*. Pero quizá, los más importantes sean aquellos géneros utilizados como materia prima para la obtención de fármacos (alcaloides del tropano), estos incluyen *Hyoscyamus* (beleño), *Atropa* (belladona), *Datura*, (estramonia), *Duboisia* y *Scopolia*. (Evans 1979; Schultes 1979; Mehra 1979).

En el continente Americano, principalmente en Sudamérica se sabe que existe la mayor diversidad de especies; de acuerdo con lo cual, se ha considerado que este sitio pudo haber sido el origen de la familia Solanacea (Hunziker 1979). En este continente existen 50 géneros, 28 son endémicos de Sudamérica y las galápagos; 18 géneros están restringidos a las zonas templadas y las restantes a las tropicales (D'Arcy 1979).

De acuerdo con el sistema de clasificación de Wettsten (Wettsten 1891, citado por Hunziker 1979); y tomando en consideración las características de la semilla, tipo de embrión y cariotipos, la familia Solanacea se ha dividido en dos subfamilias:

1. Subfamilia SOLANOIDAE: compuesta por 2 tribus, 36 géneros y aproximadamente 1400 especies.

2. Subfamilia CESTROIDAE: compuesta por 5 tribus, 24 géneros y 413 especies.

En cuanto al género *Solandra*, nombre que fue dado a estas plantas por los discípulos de Linneo, en honor a Daniel C. Solander, naturalista y viajero del siglo XVII, se sabe que es un género perteneciente a la subfamilia Solanoideae. Son plantas arbustivas trepadoras. Sus características generales son: corola grande de 10 - 30 cm de largo, excediendo el caliz, androceo zigomórfico, filamentos inclinados, insertados en la base de las anteras, entre la teca, anteras de 7 - 11 mm de largo. El ovario está ligeramente hundido en el receptáculo, bicarpelar, tetralocular; estilo inclinado, semillas de 4.2 - 5.2 mm de largo y de 2.0 - 3.5 mm de ancho (Martínez 1966; Matuda 1972; Schultes 1979; O'Gorman 1963). Se les considera un género tropical, aunque existen algunas especies que se desarrollan en zonas templadas. En el continente Americano se reportan las siguientes especies: *Solandra boliviana*, *S. grandiflora*, *S. guerrerense*, *S. guttata*, *S. hartwegii*, *S. hirsuta*, *S. longiflora*, *S. macrantha*, *S. paraensis*, *S. brevicalyx*, *S. nitida* y *S. nizandensis*; el rango de distribución de éste género abarca desde México, Centroamérica y Sudamérica, a altitudes entre los 1500 a 2500 m (Hunziker 1979; Martínez 1966; Matuda 1972; D'Arcy 1979).

En México se sabe existen 5 especies y son: *Solandra guttata* Don., *S. brevicalyx* Standley., *S. guerrerense* sp. nov., *S. nitida*, *S. nizandensis* Matuda. (Matuda 1972; Martínez 1966; Herbario del Instituto de Biología UNAM 1989). Las 4 primeras especies

reportadas por Martínez (1966) son plantas que generalmente se encuentran vegetando en lugares de clima templado y húmedo, y la última especie reportada por Matuda (1972) en lugares más bien secos y cálidos.

Varios grupos étnicos en nuestro país desde épocas remotas han utilizado estas plantas en actividades religiosas y para curar algunas de sus enfermedades. Por ejemplo, el hueipatli (Martínez 1966) *Solandra guerrerense*, en el estado de Guerrero, *Solandra brevicalyx* en el estado de Jalisco (Knab 1977). En general éstas plantas poseen propiedades alucinógenas, provocadas por la presencia de alcaloides del tropano.

III. ALCALOIDES

Los alcaloides son un grupo de compuestos orgánicos nitrogenados, que tienen acción sobre la fisiología de distintos animales. El nombre de alcaloides fue dado porque son básicos, y forman sales con ácidos, como láctico, málico, tartárico y cítrico. Algunos alcaloides en *Solanum* y *Veratrum* se encuentran como glicósidos de ramnosa, galactosa y glucosa; en otros los alcaloides están libres. (Robinson 1981; Domínguez 1973; Martindale 1981; Cordell 1981; Fodor 1979). La mayor fuente de alcaloides han sido sin duda alguna las plantas superiores. No obstante, en años recientes se ha incrementado el número de alcaloides obtenidos de animales, insectos, organismos marinos, microorganismos y plantas inferiores. (Pelletier 1983).

De las plantas superiores, en las gimnospermas se han aislado 115 alcaloides, de las angiospermas (monocotiledóneas) se han

reportado 488 alcaloides y de las dicotiledóneas unos 3000 (Dominguez 1973).

En el sistema de clasificación de las plantas superiores de Engler (Engler 1965 citado por Cordell 1980) hay 60 órdenes, de estos 34 especies presentan alcaloides. 40% de todas las familias vegetales presentan alcaloides. Sin embargo de los 10 mil o más géneros que existen sólo el 2% presentan alcaloides.

Las familias que se caracterizan por la presencia de alcaloides están: Apocynacea (quebracho, matacan), Papaveracea (amapola, y quelidonium), Rubiaceae (cinchona, e ipecacuanha), Papilionacea (lupino), Ranunculacea (aconitina, delfinium), Rutacea (auvaciaea) y Solanacea (tabaco, tomate, belladona, manzano espinoso). (Pelletier 1972; 1983; Cordell 1981). Los alcaloides están localizados en determinados órganos de la planta: por ejemplo en semillas (fisostigma, areca), en frutos (cicuta), en hojas (belladona), en tallos subterráneos (sanguinarina), en raíz (belladona, coca), en rizoma y raíz (ipecacuanha, hidrastis), y tallo (cinchona). (Tyler, Brady & Robbers 1981; Youngken 1951; trease & Evans 1973). Aunque esto no significa que el lugar en el cual se encuentran sea el sitio de su biosíntesis, por ejemplo los alcaloides de los géneros *Datura* y *Nicotiana* son producidos en la raíz y luego transportados a las hojas. (Waller & Newacki 1978; Cordell 1981; Robinson 1981).

Otra variable observada es que los alcaloides sólo se sintetizan en alguna etapa del crecimiento o época del año, y bajo determinadas condiciones ecológicas (Waller & Newacki 1978; Cordell 1981; Pelletier 1983).

A) a. CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS ALCALOIDES

1. Contienen carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno. Frecuentemente el nitrógeno forma parte del anillo heterocíclico, ésto le confiere propiedades de basicidad. (Tyler, Brady & Robbers 1981; Martindale 1981).

2. Muchos son sólidos, otros son líquidos volátiles y éstos frecuentemente no contienen oxígeno en su estructura (Tyler, Brady & Robbers 1981; Cordell 1981; Martindale 1981).

3. En general son cristalizables, aunque algunos son amorfos o líquidos, como la nicotina (Martindale 1981; Tyler, Brady & Robbers 1981; Pelletier 1972; Domínguez 1973).

4. Son incoloros, aunque hay excepciones como la berberina, que es amarilla y sanguinarina roja (Martindale 1981; Domínguez 1974; Pelletier 1972).

5. Son insolubles o ligeramente solubles en agua, como la colchicina, pero solubles en solventes orgánicos como alcohol, cloroformo, benceno y algunos en éter, sus sales son solubles en agua (Martindale 1981; Tyler, Brady & Robbers 1981; Robinson 1981; Pelletier 1972).

6. Muchos de ellos son fisiológicamente activos, algunos son extremadamente venenosos a bajas concentraciones (Martindale 1981; Domínguez 1972; Pelletier 1972; Cordell 1981; Tyler, Brady & Robbers 1981).

7. Se unen con ácidos para formar sales de amonio sustituidas. La estabilidad de éstas sales a la hidrólisis varía con la potencia de la base del alcaloide y de la naturaleza del

ácido usado. Con excepción del grupo de la xantina, los alcaloides tienen un pK menor de 7. Los alcaloides son liberados de sus sales por la adición de álcali (Martindale 1981; Tyler, Brady & Robbers 1981; Pelletier 1972; Cordell 1981; Robinson 1981).

8. Son precipitados por uno o más de los siguientes reactivos, con algunos de ellos forma un compuesto químico definido el cual es usado para su identificación: 1) reactivo de Mayer, 2) reactivo de Marme, 3) reactivo de Dragendorff, 4) reactivo de Sonnenschein, 5) reactivo de Wagner, 6) reactivo de Scheiber, 7) cloruro áurico, 8) ácido tánico y 9) ácido picrico (Martindale 1981; Domínguez 1973; Cordell 1981; Tyler, Brady & Robbers 1981).

b. CLASIFICACION DE ALCALOIDES

Los alcaloides pueden ser clasificados de varias formas: en base a la estructura molecular y la ruta metabólica que interviene para su biosíntesis en alcaloides verdaderos, protoalcaloides y pseudoalcaloides. Los alcaloides verdaderos se caracterizan por ser extremadamente tóxicos, muestran un amplio rango de actividad fisiológica, son casi siempre básicos; comunmente presentan nitrógeno en un anillo heterocíclico, son derivados de los aminoácidos, y tienen una distribución limitada en las diferentes familias de plantas, aunque hay algunas excepciones. Los protoalcaloides son aminas relativamente simples, en las cuales el nitrógeno del aminoácido no está incluido en un anillo heterocíclico, son biosintetizados a partir de aminoácidos y son básicos. Los pseudoalcaloides no son derivados de los aminoácidos, comunmente son básicos, hay dos series importantes en esta clase: los alcaloides esteroidales y las purinas (Vickery & Vickery 1981;

Cordell 1981; Waller & Newacki 1978).

De acuerdo a su procedencia botánica estos compuestos se pueden clasificar en: alcaloides del opio, de la cinchona, del tropano, de la xantina, del ergot, de vinca. También se puede clasificar de acuerdo a la naturaleza de la estructura química de la cual se derivan: por ejemplo la nicotina contiene piridina, mientras que la piperina contiene hexahidropiridina. También algunos presentan más de un núcleo, por ejemplo la quinina contiene quinolina y quinuclidina (Martindale 1981).

c. NOMENCLATURA

Debido a que los alcaloides son un grupo de compuestos con una enorme variedad estructural, no hay un sistema general de nomenclatura, la única característica en común que tienen los nombres de los alcaloides es la terminación -ina. En cuando a sus nombres triviales, éstos son obtenidos de varias formas: 1) del nombre genérico de la planta que lo produce (atropina de *Atropa belladonna*), 2) del nombre específico de la planta (cocaina de *Erythroxylon coca*), 3) del nombre común de la droga producida por la planta (ergotamina del ergot), 4) de su actividad fisiológica (emetina un emético), 5) del nombre de su descubridor (pelletierina). (Pelletier 1970; Tyler, Brady & Robbers 1981; Cordell 1981).

d. FUNCION DE LOS ALCALOIDES EN LA PLANTA

En cuanto a los alcaloides en el metabolismo, catabolismo y en la fisiología vegetal se ha propuesto que podrian ser: 1) productos terminales del metabolismo (Waller & Newacki 1978; Luckner 1985), 2) reservorios de nitrógeno (Luckner 1984; Vickery & Vickery 1981), 3) agentes protectores de la planta contra el

ataque de sus predadores (Whittaker & Feeny 1971; Waller & Newacki 1978), 4) reguladores del crecimiento, la estructura de algunos de ellos se asemeja a la de los fitorreguladores del crecimiento, o por su capacidad para formar quelatos o intervenir en fenómenos de óxido-reducción (Waller & Newacki 1978; Luckner 1984; Whittaker & Feeny 1971).

B) a' ALCALOIDES DEL TROPANO.

Los alcaloides del tropano están presentes principalmente en la familia Solanacea, aunque también se han reportado en otras familias tales como Erythoxylacea y Convolvulacea (Romeike 1978; Evans 1979; Cordell 1980; Pelletier 1970, 1983).

En la familia Solanacea se encuentran géneros importantes desde el punto de vista terapéutico *Datura*, *Atropa*, *Hyoscyamus*, *Duboisia* y *Scopolia*. (Cordell 1981, Pelletier 1970, 1983; Glasby 1975; Fodor 1970; Robinson 1981; Kumar et al 1984).

Una particularidad de la familia Solanacea es que los alcaloides, por ejemplo hiosciamina están esterificados con ácido trópico u otros ácidos relacionados con los aminoalcoholes (Romeike 1978). Los alcaloides del tropano son divididos en alcaloides relacionados con a) la atropina y b) la cocaína. Estos 2 grupos son incluidos dentro de los alcaloides del tropano debido a que son derivados del tropano (Martindale 1982; Pelletier 1970, 1983). Los alcaloides del tropano más conocidos por su uso terapéutico son la (-)-hiosciamina, (-)-escopolamina y cocaína (Robinson 1981; Pelletier 1970, 1983; Martindale 1981; Youngken 1951; Tyler, Brady & Robbers 1981).

El esqueleto básico de éstos alcaloides es el nortropano (azabicyclo-3,2,1-octano), y son ésteres de un ácido

orgánico y un tropan-3-ol teniendo la configuración α o β . Los ésteres de la tropina son llamadas tropeinas. Los ácidos que esterifican al tropano, varían desde ácidos alifáticos de 5 carbonos, por ejemplo el ácido α -metilbutírico, ácido β -metilbutírico y ácido tíglico, o los ácidos aromáticos como el ácido benzoico, verátrico, vanílicico, trópico y cinámico (Pelletier 1970, 1983; Martindale 1982; Fodor 1970).

La atropina es la forma ópticamente inactiva de la l-hiosciamina. La hiosciamina es raramente aislada comercialmente, pero se produce por racemización de la atropina en el proceso de extracción (Cordell 1981; Pelletier 1970; Fodor 1970). La hidrólisis de atropina produce tropina y ácido (+)-trópico. La tropina es ópticamente inactiva, fuertemente básica y contiene un grupo *N*-metilo.

La escopolamina es una base un poco más fuerte que la hiosciamina. La hidrólisis alcalina de ésta produce ácido trópico y oscina. En cambio cuando la escopolamina es hidrolizada con lipasa pancreática produce escopina. La escopina es fácilmente convertida a oscina, bajo condiciones básicas suaves (Cordell 1981; Pelletier 1970, 1983; Fodor 1970).

b'. BIOSINTESIS DE ALCALOIDES DEL TROPANO

Los experimentos con ornitina radioactiva han establecido que este aminoácido es precursor del anillo de pirrolidina encontrado en los alcaloides del tabaco (nicotina, nornicotina), de la pirrolizidina (retronicina), de la fenantroindolizidinas (tilofoforinas) y del tropano (Leete 1980, 1979; Vickery & Vickery 1981; Fodor 1970).

Del mismo modo se sabe que el ácido glutámico y la prolina intervienen en la biosíntesis de los alcaloides del tropano vía ornitina, además de que esta incorporación en la estructura del alcaloide es asimétrica. En la biosíntesis de los alcaloides del tropano Leete (1979) considera que la ornitina es incorporada vía δ -N-metilornitina, a pesar de que este no ha sido detectado todavía en algún género de la familia Solanacea.

En seguida la descarboxilación de δ -N-metilornitina, para formar la N-metilputresina fig 1, un precursor identificado de la tropina en *Datura metel* y *Scopolia lurida* (Liebisch & Schutte 1966, 1969, citado por Leete 1979), así como de los derivados de la higrina, cuscohigrina y de otros alcaloides del tropano en *Atropa belladonna* (Fodor 1970; Vickery & Vickery 1981).

Posteriormente ocurre la oxidación del grupo amino de la N-metilputresina para formar la 4-metilaminobutal fig 1. La forma cíclica de este último conduce a la formación de la N-metilpirrol. Se sabe que los carbonos 2, 3, 4 de la tropina son aportados por el ácido acético; se asume que éste es incorporado vía ácido acetoacético o algún otro derivado activado, como por ejemplo el éster de la coA. El resultado de la condensación entre la N-metil-A-pirrol y el acetoacético es el ácido higrino- α -carboxílico, el cual puede descarboxilarse para rendir hidrina (Kaczowski, Schutte & Mothes 1961; Liebisch, Radwan & Schutte 1969; O'Donovan & Keogh 1969, citado por Leete 1979). En seguida la (+)-(2R)-higrina pasa a través del intermediario deshidrohigrina fig 1, para formar finalmente la tropinona la cual por medio de una reacción estereoespecífica da lugar a la tropina (Leete 1979, 1980). La oxidación del anillo de tropina conduce a

la formación de escopolamina, dicha reacción transcurre vía σ -hidróxihiosciamina y $\sigma,7$ -deshidróhiosciamina mediado por una deshidratación syn. Se asume que esta reacción se puede llevar a cabo también de la siguiente forma: la σ -hidroxihiosciamina es fosforilada en el oxígeno de la posición σ , este carbono es atacado posteriormente por un agente nucleofílico y producir un intermediario a partir del cual puede generarse un doble enlace, por medio de una eliminación anti en la posición σ y 7 , para rendir $\sigma,7$ -deshidrohiosciamina y finalmente escopolamina fig 1. (Leete 1979, 1980)

En cuanto a la ecgonina que forma parte de la cocaína, se propone que esta se forma por una simple modificación de la ruta biosintética de la tropina; en la cual el grupo carboxilo del ácido higrina- α -carboxílico es retenido, este pasa por algún intermediario para formar finalmente la cocaína (Leete 1980).

La meteloidina se asume que se forma por hidroxilación del α - α -tigloiltropano, probablemente vía α - α -tigloiloxitropan- 7β -ol. Después la hidroxilación en la posición σ y 7 forma la meteloidina, dicha reacción transcurre con retención de configuración (Leete 1979, 1980).

Se ha encontrado que los ácidos que esterifican al anillo de tropina es el ácido trópico y algunos ácidos aromáticos. Se sabe que el ácido trópico se forma a partir de la fenilalanina por migración del grupo carboxilo y desaminación de éste aminoácido (Leete, Kowanko & Newmark 1975 citado por Leete 1980). Además se ha demostrado que el ácido fenilpirúvico y el ácido fenilacético son también usadas en la biosíntesis del ácido trópico (Leete & Kyrven 1974 citado por Leete 1979, 1980).

El benzoilo de la cocaína utiliza también a fenilalanina como precursor, éste se forma por rompimiento de la cadena entre el carbono 2 y 3 de la fenilalanina. El ácido tiglico esterifica a la meteloidina y otros alcaloides, se forma a partir de la L-isoleucina, como se ha demostrado en algunas especies de *Datura* (Groos & Schutte 1963, Leete & Murrill 1967; Robinson, Bachhawat & Coon 1956; Woolley 1966 citados por Leete 1979).

IV.FITOQUIMICA DEL GENERO *Solandra*.

Petri fue uno de los primeros en reportar la presencia de alcaloides del tropano en hojas de *Solandra longiflora* (sinomia *Solandra laevis* Hook), como norhiosciamina o 1-tropilnortropeina (conocida inicialmente como solandrina), noratropina, hiosciamina y atropina (Holmes 1950; Henry 1949; Willaman & Schubert 1961).

Por otro lado Evans, Ghani y Woolley (1972) encontraron en *Solandra grandiflora* Sw, *S. guttata* d. Don ex Lindley, *S. hartwegii* N. Br, *S. hirsuta* Don, y *S. macrantha* Dun los siguientes alcaloides: atropina, hiosciamina (como principales), litorina, hioscina, norhioscina, tigloidina, α -tigloiloxitropano, α -acetoxitropano, valtropina, tropina, ψ -tropina, cuscohigrina como secundarios. Estos alcaloides fueron aislados tanto de partes aéreas como de subterráneas. En el cuadro 4 se muestran los alcaloides encontrados en cada especie, así como el órgano en el cual se detectó. Finalmente Rosales (1981) reportó la presencia de atropina y escopolamina en raíz de *Solandra nitida* L. (ver cuadro 4).

Es importante señalar que éstos alcaloides también han sido aislados de varias especies del género *Datura*, en concentraciones

muy semejantes; a diferencia del género *Solandra*, no presenta monotigloil éster y ditigloil éster de tropanodiol y tropanotriol, en cambio si presenta valtropina un alcaloide no detectado en ningun género de la familia Solanacea, a excepción de *Duboisia leichhardtii*. Por lo que al género *Solandra* se le considera quimiotaxonómicamente uniforme (Evans 1979; Evans, Ghani & Woolley 1972) ver cuadro 4.

V. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

C). Características generales de la técnica de cultivo de tejidos y sus aplicaciones. Se define como una técnica que nos permite el mantenimiento de tejidos o células de una planta donadora y su desarrollo en un medio bien definido. La composición del medio varía de acuerdo a la especie en particular, pero en general los componentes del medio de cultivo se divide en 6 grupos: macronutrientes inorgánicos, elementos traza, fuente de hierro, suplementos orgánicos (vitaminas), fuente de carbono y reguladores del crecimiento vegetal (Dixon 1985; Fossard 1985; Staba 1980).

El conocimiento exacto de los constituyentes del medio de cultivo para el desarrollo celular es muy imperfecto para un gran número de especies vegetales. Sin embargo, existe un gran número de formulaciones para la inducción de callos; cuando no existan estos medios algunos autores recomiendan iniciar el experimento usando algún medio de cultivo estándar tal como el MS, SH y variando las concentraciones de fitorreguladores (Dixon 1985). Además, se ha encontrado que los medios mencionados anteriormente son muy efectivos para el desarrollo de una gran variedad de

plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Fossard 1985; Dixon 1985).

En cuanto a la utilidad que tiene esta técnica de cultivo de tejidos, de manera precisa podemos mencionar tres:

1. Util en la investigación básica, como por ejemplo en el entendimiento de la fitoquímica, fisiología, enzimología, fenómenos de diferenciación y desarrollo de células vegetales y organelos, ya que con esta técnica se pueden controlar parámetros tan importante como son el nutricional y ambiental (Ellis 1984; Tabata 1977; Misawa 1985; Loyola 1987; Lozoya 1985; Shiwei 1982).

z. Preservación de germoplasma y micropropagación. Es útil en la propagación masiva, intercambio de germoplasma, inducción de variabilidad genética y recuperación de plantas en peligro de extinción (Fossard 1985; Shiwei 1982; Blanco 1985; Rublúo 1985; Loyola 1987).

a. Obtención de sustancias útiles a partir de cultivo de células vegetales. A finales de 1940 Bonner reportó que el tejido de guayule cultivado *in vitro* podía producir goma. En 1950 Tuleke y Nickell demostraron que se podía producir biomasa celular a partir de algunas células vegetales mantenidas en un medio de cultivo definido (Nickell 1980; Staba 1982; Misawa 1985). Después de la aparición de estos resultados se planteó la posibilidad de poder obtener algunas sustancias químicas a partir de cultivo de células vegetales. En la actualidad no hay duda de que dicha técnica aplicada a nivel industrial es una realidad. Como lo demuestra el hecho de que en 1983, Japón inició la comercialización del primer producto obtenido por cultivo de células vegetales; la shikonina, una naftoquinona producida por

Lithospermum erythrorhizon,, esta shikonina es usada como colorante y astringente (Flores, Hoy & Pickard 1987; Balandrin et al 1985; Misawa 1985; Segura et al 1987; Shiwei 1982).

Los productos del metabolismo vegetal se han clasificado en metabolitos primarios y metabolitos secundarios. Entre los metabolitos primarios estan por ejemplo proteínas, ácidos nucleicos etc; y entre los metabolitos secundarios estan alcaloides, terpenos, flavonoides, fenilpropanoides etc (Balandrin et al 1985; Staba 1980, 1977, 1982; Misawa 1985; Nickell 1980; Luckner 1984; Vickery & Vickery 1981; Fowden 1962).

Como ya se mencionó en las plantas completas las cantidades de metabolitos secundarios tienden a ser acumuladas en sitios específicos y en determinadas condiciones ambientales. Algo muy similar sucede con las células cultivadas *in vitro*. Para maximizar la producción de metabolitos secundarios en las células cultivadas *in vitro* se han propuesto 3 estrategias a seguir:

Desarrollo de técnicas apropiadas de selección y selección de genotipos apropiados. Para la selección de plantas con altas concentraciones del producto deseado, así como de colonias en el transcurso del programa de clonación, es necesario desarrollar métodos de cuantificación. Este método debe ser sensible, así como el permitir el análisis de un gran número de muestras en poco tiempo.

Una de estas técnicas es la de radioinmunoensayo, cuyo uso ha permitido obtener valiosa información, por ejemplo se encontró una amplia variación en el contenido de alcaloides producidos por *Catharanthus roseus* y *Nicotiana tabacum*, dicho carácter de variabilidad se ha tomado como base para seleccionar aquellas

plantas que presentan los máximas concentraciones de alcaloides., y a partir de éstas establecer un cultivo de células altamente productoras. (Yamada 1984: Spiegel & Kochba 1977; Deus & Zenk 1982; Staba 1982). Y es mediante éste proceso de selección celular que se han obtenido líneas celulares que producen metabolitos secundarios en cantidades superiores a las encontradas en la planta completa. entre estos productos se incluyen pigmentos, vitaminas, alcaloides y esteroides (Yamada 1984: Zenk & Deus 1982; Chadhaha & Heble).

El tercer paso consiste en la manipulación de las condiciones de cultivo, componentes nutricionales, pH, temperatura, aereación, agitación, luz etc, o bien la biotransformación de un compuesto químico relacionada con la biosíntesis del producto deseado; esta opción es muy ventajosa siempre y cuando dichas sustancias, precursoras o moléculas relacionada con la biosíntesis del producto sean baratas (Staba 1982, 1984a, 1984b; Ellis 1984; Spiegel & Kochba 1977).

D). CULTIVO DE TEJIDOS Y PRODUCCION DE ALCALOIDEOS EN LA FAMILIA SOLANACEA

En esta parte se da una reseña de los trabajos realizados en los géneros *Datura*, *Duboisia*, *Scopolia*, *Hyoscyamus* y *Atropa*.

Para el caso del género *Datura* Gibson y Abbot (1963) encontraron que las raíces cultivadas *in vitro* de *D. stramonium* var *tatula* producían alcaloides (hiosciamina y escopolamina) y que esta se veía afectada por la adición de prolina (0.745, 1.5, 3ppm); este aminoácido inhibe la biosíntesis de alcaloides, además de

tener efecto en la morfología de las raíces. En esta misma planta se (Gibson y French 1964) encontró que el GA_3 (5, 10, 20ppm) inhiben la biosíntesis de alcaloides del tropano y el crecimiento de las raíces cultivadas *in vitro*.

Staba y Jindra (1968) con cultivos de células en suspensión de *D. stramonium* 5450 encontraron que estos producían alcaloides (cuscohigrina, colina y pseudotropina). Así mismo, se encontró que la adición de manganeso (1, 7 ppm) y la adición de alguno de los siguientes precursores: ornitina, arginina, fenilalanina y asparagina; no tenían efecto sobre la biosíntesis de alcaloides, pero cuando se adiciona con 14 ppm de manganeso y alguno de los precursores mencionados, observan un efecto beneficioso en la producción de alcaloides. En esta misma clona (Stohs 1969) encontró que la tropina y el ácido tropico inducen una mayor producción de alcaloides (hiosciamina, escopolamina y otros alcaloides no identificados). También se estableció que conforme transcurren los subcultivos, este va perdiendo la habilidad para sintetizar alcaloides; confirmando esto cuando se inició un nuevo cultivo denominado *xz* y se comparó con el ya establecido.

Por otro lado en los cultivos de callos de *D. tatula* (Sairam & Khanna 1970) se encontró que la tirosina (0.1%) tiene un efecto beneficioso en la biosíntesis de alcaloides y el crecimiento celular; teniendo un efecto menor la fenilalanina (0.1%). Los alcaloides determinados fueron escopolamina, hiosciamina, atropina y colina. Mientras que Hiraoka, Tabata y Konoshima (1973) establecieron que los cultivos de callos de *D. innoxia* producían alcaloides, y que esta se veía favorecida cuando el medio se adiciona con cualquiera de los siguientes compuestos: tropina, fenilpiruvato,

fenilalanina; mientras que el ácido trópico disminuye la producción de alcaloides, siendo la cantidad de alcaloides inferior a la del control. Los alcaloides detectados en todos los casos incluyeron hiosciamina y escopolamina, excepto para el adicionado con tropina en el que sólo se detectó acetiltropina.

Por otra parte usando cultivos de células en suspensión de *D. innoxia* (Hiraoka & Tabata 1974) se logra la inducción de plántulas a partir de estas células; se usaron varias concentraciones de K/ANA. Además se siguió el patrón de biosíntesis de alcaloides durante la regeneración de las plántulas. Se encontró que la hiosciamina está presente a lo largo de todo el periodo de regeneración; mientras que la escopolamina sólo aparece cuando el tallo empieza a desarrollar raíces. Otros alcaloides sólo se presentan en los callos indiferenciados y luego que se inicia la regeneración desaparecen, mientras que otros sólo aparecen cuando la planta está completamente desarrollada.

Verzar-Petri, Dinh y Szoke (1978) encontraron que los callos de *D. innoxia* desarrollados bajo obscuridad total, la cantidad de alcaloides era inferior a los desarrollados bajo luz continua; además de que las cantidades encontradas eran inferiores a las reportadas para los órganos intactos de la planta completa. Los alcaloides encontrados incluyeron: tropina, cuscohigrina, meteloidina, hiosciamina, escopolamina, σ -hidroxihiosciamina, norescopolamina y ácido trópico. Finalmente también se estableció que la adición de fenilalanina causa inhibición en la producción de alcaloides, mientras que el acetato de sodio la incrementa.

Los cultivos de células en suspensión derivadas de *D. innoxia* (Hiraoka & Tabata 1983) sólo producen acetiltropina,

independientemente del los fitorreguladores usados (2,4-D, ANA, AIB, AIA). Así como la adición de tropina y otros ácidos (tíglico, mandélico, benzoico, isobutírico, transcinámico, cafeico) no tienen efecto en la producción de alcaloides; solo se produce acetiltropina.

Dhoot y Henshaw (1977) encontraron que los callos derivados de *Hyoscyamus niger* producían alcaloides, y que esta se veía favorecida cuando el medio se adiciona con 2,4-D (0.2 y 2 mg/l). Encontrando que las bajas concentraciones de 2,4-D induce una mayor producción de alcaloides, a pesar de lo cual estos valores eran inferiores a los reportados para los órganos intactos de esta planta. Así también se probó que el ácido tropico induce la formación de raíces, estos cultivos produjeron alcaloides, pero esta capacidad de formar raíces y biosintetizar alcaloides se veía afectada con el envejecimiento del cultivo. Los alcaloides encontrados incluyeron hiosciamina, escopolamina y cuscohigrina.

En este mismo género (Hashimoto *et al* 1982) se determinó la capacidad de metabolizar hiosciamina (0.1 mM) y escopolamina (1 mM) por cultivos de callos derivados de hoja y raíz. Encontrando que los cultivos de callos derivados de hoja son incapaces de convertir la hiosciamina a escopolamina; mientras que los cultivos de callos derivados de raíz convierten del 10 - 20% de la hiosciamina agregada a escopolamina. Cuando se agrega escopolamina a cada uno de los cultivos, se encontró que son incapaces de convertirla a hiosciamina.

Se determinó el efecto de varios parámetros físicos y químicos en la producción de alcaloides en cultivos de células en suspensión de *H. muticus* (Koul, Ahuja & Grewal 1982). Encontrando

que a pH bajos (3.5) induce una mayor producción de alcaloides. Para el caso de las vitaminas, se encontró que estas son decisivas para la producción de alcaloides y el crecimiento celular. También la fuente de carbono (sacarosa) se varió, encontrando que con $1x$ de este carbohidrato hay una mayor producción de alcaloides, aunque el crecimiento celular se ve retardado. Para el caso de los fitorreguladores se encontró que AIA induce una mayor producción de alcaloides, seguido por el 2,4-D y finalmente el ANA. Además se estableció que los precursores de estos alcaloides, ácido cítrico, ornitina y el éster acetoacético tienen efecto beneficioso en la producción de alcaloides.

Hashimoto y Yamada (1983) lograron el establecimiento de cultivos de células (*H. niger*), y después de varios subcultivos y modificando el medio de cultivo logran el establecimiento de cultivo de raíces. En estos cultivos se encontró hiosciamina y escopolamina. Se determinó la habilidad de los cultivos de células en suspensión y los cultivos de raíces para metabolizar hiosciamina y escopolamina. Encontrando que los cultivos de células en suspensión no tienen la capacidad para convertir hiosciamina (0.1 mM) a escopolamina; mientras que el cultivo de raíces presentan una gran capacidad para convertir hiosciamina a escopolamina.

Wesolowska y Skrzypca (1985) trabajando con *H. niger* y *H. albus* establecieron cultivos de callos derivados de anteras. Algunos de los callos establecidos sufrieron organogénesis y posteriormente formaron plántulas completas. En los cultivos de callos y en las plántulas se encontró atropina, hiosciamina, escopolamina, apoatropina, tropanol y otros alcaloides no

identificados. Mientras Grewal et al (1979) halló que la producción de alcaloides en los callos derivados de *H. muticus* se veía incrementada con la adición de K y ANA.

Para el género *Duboisia*, Griffin (1979, 1984) logra el establecimiento de callos de híbridos de *D. leichhardtii* y *D. myoporoides*. Para lo cual se usaron varias concentraciones de BAP y 2iP, estos callos posteriormente forman tallos y finalmente plántulas completas. Los callos no produjeron alcaloides, estos cultivos se adicionaron con hiosciamina (1000 ppm), después de un tiempo se determinó la presencia de hiosciamina, escopolamina y α -hidroxihiosciamina; mientras que cuando se adicionó con 1000 ppm de escopolamina el cultivo es incapaz de convertir la escopolamina a otro alcaloide.

En un segundo experimento los callos se cultivaron en medio adicionado con BAP y 2iP, esta vez se detectó butropina un alcaloide menor del género. Estos callos se subcultivaron en medio con AIB y BAP; en este se formó callo y posteriormente se desarrollaron raíces; el análisis para alcaloides reveló la presencia de escopolamina e hiosciamina, estableciendo que la biosíntesis de alcaloides se realiza en la raíz.

Kitamura, Miura y Sugii (1985) establecieron cultivos de callos de *D. myoporoides*, usando varias concentraciones de 2,4-D y K en la obscuridad. Cuando los callos se incubaron con AIB se indujo la formación de raíces; el análisis mostró la presencia de atropina, escopolamina, anabasina, nornicotina y nicotina. Cuando las raíces se cultivaron en medio adicionado con BAP se indujo la formación de tallos, en estos se determinó la presencia de anabasina y nicotina. La composición alcaloidal fue muy semejante

a las reportadas para la planta completa. Estos autores concluyen que las raíces biosíntetizan alcaloides, los que posteriormente son transportados a las partes aéreas.

Por otro lado los callos derivados de *D. leichhardtii* (Yamada & Endo 1984) se establecieron usando varios medios, entre los que se encuentran L-S, Gambor B5, White y adicionados con ANA y BAP. El análisis reveló la presencia de hiosciamina, escopolamina, pero para el cuarto subcultivo no se detectó ningún alcaloide. Después de subcultivarlos por 4 meses los callos mostrarán la formación de tallos; y cuando se subcultivo en medio adicionado con AIB se indujo la formación de raíces, para luego formar plántulas. El análisis para alcaloides de las raíces reveló la presencia de hiosciamina, escopolamina y nicotina, los tallos solo presentaron hiosciamina y escopolamina. Se determinó la capacidad de metabolizar alcaloides (hiosciamina) en los diferentes cultivos; encontrando que los callos no pueden convertir la hiosciamina agregada a escopolamina; mientras que el cultivo de tallos y el de raíz convierten la hiosciamina a escopolamina, siendo más eficaz la raíz para esta conversión. Finalmente se estableció que la adición de ácido trópico, en los diferentes cultivos inhibe completamente el crecimiento; además de no tener efecto alguno en la biosíntesis de alcaloides.

Para el caso de *Scopolia parviflora* (Tabata et al 1972) se establecieron cultivos de callos a partir de rizoma y tallo; esto se logró usando varias concentraciones de 2,4-D, AIA, ANA y K. El análisis para alcaloides reveló la presencia de alcaloides, el contenido de alcaloides en estos cultivos era muy semejante, a pesar de que en los órganos intactos, las diferencias en el

contenido alcaloidal es muy significativa, este a su vez fue inferior a los reportados para los órganos intactos de esta planta. Así mismo se determinó que el 2,4-D y K no modifican la producción de alcaloides. En cambio la luz provoca una reducción del 50 - 70% en la producción de alcaloides, comparados con los desarrollados en la obscuridad permanente. También se encontró que la adición de casaminoácidos, peptona, extracto de levadura provocan un aumento en la producción de alcaloides. Así también se encontró que cada uno de los siguientes precursores: fenilpiruvato, L-fenilalanina, L-ornitina, L-prolina y tropina inducen la producción de alcaloides; mientras que el ácido trópico no solo provoca un aumento en la producción de alcaloides, sino también una reducción del crecimiento celular en un 60%. Finalmente los callos inducidos se subcultivaron en medio adicionado con 2,4-D y K en el cual se logra la formación de raíces, este cultivo de raíz producía hiosciamina y seis alcaloides menores.

Mano *et al* (1986) logra el establecimiento de cultivos de raíces, cuando se inócula la bacteria *Agrobacterium rhizogenes* 15834 en segmentos de tallo de *Scopolia japonica*. De las raíces inducidas se obtuvieron 20 clones, las que se caracterizaron por ser extremadamente ramificadas y un rápido crecimiento. El establecimiento se logró usando varios medios de cultivo, algunos de los cuales se modificaron. Todas las clones produjeron alcaloides, con diferencias significativas entre estas.

Un trabajo similar fue realizado con *Atropa belladonna* (Kamada *et al* 1986). Los segmentos de tallo se inocularon con *A. rhizogenes* 15834, a las cinco semanas se hicieron aparentes las raíces. Después de varios subcultivos en medio sin

fitorreguladores, se determinó la presencia de alcaloides (escopolamina y atropina). La cantidad de alcaloides determinada resulto inferior a las encontradas en las raíces de la planta completa.

Eapen *et al* (1978) estableció cultivos de callos derivados de hojas de plantas haploides de *Atropa belladonna*. Esto se logró usando ANA y K, cuando estos callos se subcultivaron en medio con BAP se obtienen tallos; estos tallos se sembraron en medio adicionado con ANA; en el cual se generan plántulas completas. El análisis citológico mostró que había diferentes ploidias en los callos y plántulas. En este trabajo se determinó escopolamina y atropina, tanto en callos como en las plántulas. Así mismo, se encontró que en las plántulas hay un marcado aumento en el contenido de alcaloides conforme aumenta la ploidia.

MATERIALES Y METODOS

Los ejemplares vivos de *Solandra nitida* fueron recolectados en el estado de Veracruz, se tomaron ejemplares vivos para el herbario del Instituto de biología de la UNAM, en donde fueron identificados.

De los ejemplares vivos recolectados de plantas jóvenes y sanas, se seleccionó tejido como fuente de explantes. Se tomaron porciones de tallo, hoja y raíz, de aquellas partes que se encuentran en división activa, como es el caso de las regiones meristemáticas de estos órganos (Fossard 1985; Dixon 1985; Ikenaga, Takemoto y Ohashi 1985).

La esterilización del material vegetal se realizó de la siguiente manera: los segmentos de tallo, hoja y raíz, primero se lavaron con suficiente agua corriente para quitar el exceso de tierra u otras sustancias extrañas. Posteriormente se sumergieron en etanol absoluto por 10 segundos, con la finalidad de eliminar las grasas del tejido y permitir una mejor penetración del agente desinfectante en el tejido. En seguida el tejido se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl 6 % grado comercial) y se le adicionó 0.05 % de detergente (Tween 80 SigmaCo., St. Louis, USA). El detergente adicionado rompe la tensión superficial y permite que el agente desinfectante penetre y ataque los microorganismos. Finalmente se enjuagaron 3 veces con suficiente agua destilada esteril; se removieron las partes terminales del tejido donde las células fueron dañadas por el tratamiento de

esterilización. El tamaño del explante fué de aproximadamente 5 x 5 mm de diámetro para el caso de la hoja y de 3 mm de ancho para el caso de tallo y raíz, este es un factor importante que se considerero ya que de manera general la dificultad para iniciar un cultivo aumenta con la disminución del tamaño del explante (Fossard 1985; Dixon 1985; Tabata et al 1972; Staba 1980).

Los segmentos de tejido esterilizados fueron sembrados en medio basal Murashige y Skoog (1965) con 3% sacarosa, 0.0% de agar y adicionado con varias concentraciones de fitorreguladores, estos incluyeron: ácido 2,4-diclofenoxiacético (5×10^{-4} - 5×10^{-8}), ácido naftalenacético (5×10^{-4} - 5×10^{-8} M; 10^{-4} - 10^{-8} M), α -bencilaminopurina (5×10^{-4} - 5×10^{-8} M; 10^{-4} - 10^{-8} M); 6-furfurilaminopurina (cinetina) (10^{-4} - 10^{-8} M; 5×10^{-4} - 10^{-8} M) (Sigma Co., St.Louis USA) ver cuadro A, B, C, y D. Incubadas por 4 - 5 semanas a 25 C en condiciones de iluminación continua y obscuridad continua, para determinar la formación de callos.

De los callos formados se tomaron segmentos para hacer una prueba preeliminar para alcaloides. El método consistio en tomar una pequeña pieza de callo fresco de cada tratamiento, de aproximadamente 2.5 cm de diametro (Ogino, Hiraoka y Tabata 1978). Las piezas se colocaron linealmente en una tira de papel filtro de 2 x 20 (Whatman # 1), dejando un intervalo de 3cm entre cada muestra, ésta es colocada entre dos placas de vidrio y luego se presiona sobre una de las placas, de modo que el tejido sea aplastado y los líquidos presentes en las células sean absorbidos por el papel filtro, posteriormente se aplico el reactivo de Dragendorff modificado por Munier, la aplicación se hizo del lado opuesto al de la muestra, el reactivo de Dragendorff revelo la

presencia de alcaloides, de acuerdo con lo cual a mayor concentración de alcaloides mayor intensidad del color naranja formado: el criterio visual que se sigue fue el siguiente: 1 = tenue, 2 = moderado, 3 = intenso, 4 = muy intenso.

Prueba preliminar para alcaloides en hojas, tallo y raíz. El material molido (100 mg) se colocó en un tubo de ensaye y se le adiciono 5 ml de ácido clorhídrico 2N. La mezcla se calentó en baño de vapor, con agitación, de 5- 10 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente la mezcla se filtro, al filtrado se le agrego una pequeña cantidad de carbon activado. Esta mezcla se agitó suavemente, y se filtro con la finalidad de clarificar el extracto. El filtrado se alcalinizó hasta pH 8.3 con hidróxido de amonio y se extrajo dos veces con 5 ml de cloroformo. Las fracciones solubles se combinaron y se evaporo el cloroformo a baño de vapor. Al residuo se le agregaron 2.5 ml de ácido clorhídrico 2N, la mezcla se agito suavemente y se filtro. El filtrado se dividió en tres partes, una de ellas se le agrego unas gotas del reactivo de Mayer a la segunda el reactivo de Wagner y a la tercera el reactivo de Dragendorff modificado por Munier, la formación de un precipitado se tomo como positivo (Smolenski, Silinis & Farnsworth 1972).

Para aquellas partes de la planta y callos que dieron prueba positiva se procedio a la extracción de alcaloides totales. El material molido (100g) se mezcló con 20g de Ca(OH)_2 y 55 ml de agua. Con el procedimiento anterior los alcaloides fueron extraidos exhaustivamente, después se adicionó éter dietilico y finalmente este se eliminó por evaporación. Los alcaloides crudos se analizarón por medio de cromatografía en capa fina, los

sistemas de soporte y fase móvil fueron: alumina y éter, éter dietílico-etanol 1:1 revelados con yodo en tetracloruro de carbono; silica y cloroformo-dietilamina 8:1, MeCO-NH₂ solución fuerte 4:1, reveladas con reactivo iodoplatinico (Evans, Ghani & Woolley 1972; Evans & Treagust 1973;).

La fracción alcaloidal fue sometida a cromatografía de gases según Ylinen *et al* (1986), para determinar el tipo, el número así como la concentración de cada uno de los alcaloides presentes. Se usaron estandares de atropina, escopolamina, hyoscyamina e hidroxihiosciamina. (Sigma Co., St. Louis USA.).

VII. RESULTADOS

EL CUADRO SIGUIENTE MUESTRA EN QUE COMBINACION DE FITORREGULADORES SE LOGRO EL ESTABLECIMIENTO DE CALLOS PARA LOS DIFERENTES ORGANOS DE *Solandra nitida* Z. LOS CULTIVOS FUERON ESTABLECIDOS EN CONDICIONES DE LUZ CONTINUA.

ANA 5×10^{-4} - 5×10^{-8} M / BAP 5×10^{-4} - 5×10^{-8} M				
2,4-D 5×10^{-4} - 5×10^{-8} M / K 5×10^{-4} - 5×10^{-8} M				
ANA 5×10^{-4} - 5×10^{-8} M / BAP 10^{-4} - 10^{-8} M				
ANA 10^{-4} - 10^{-8} M / K 10^{-4} - 10^{-8} M				
TALLO	-	X	X	-
HOJA	-	-	X	X
RAIZ	-	-	-	X

PRUEBA CUALITATIVA PARA TALLOS, HOJAS Y RAIZ INTACTAS
DE *Solandra nitida*, SEGUN EL METODO PROPUESTO POR SMOLENSKI,
SILINIS & FARNSWORTH 1972.

REACTIVO ORGANO	DRAGENDORFF*	MAYER*	WAGNER*
TALLO	-	+	+
HOJA	-	-	-
RAIZ	++	++	++

PRUEBA CUALITATIVA PARA ALCALOIDES DE LOS CALLOS OBTENIDOS DE
Solandra nitida, SEGUN EL METODO PROPUESTO POR OGINO, HIRAOKA &
 TABATA 1978.

PRUEBA	(+)	(++)	(+++)	(++++)
ORIGEN DEL CALLO				
TALLO (ANA 5×10^{-5} M /BAP 10^{-6} M)	+	-	-	-
TALLO (ANA 5×10^{-5} M /BAP 10^{-7} M)	+	-	-	-
TALLO (2,4-D 5×10^{-7} /K 5×10^{-6} M)	+	-	-	-
TALLO (2,4-D 5×10^{-7} /K 5×10^{-7} M)	+	-	-	-
HOJA (ANA 5×10^{-6} M / BAP 5×10^{-6} M)	-	-	-	-
HOJA (ANA 5×10^{-6} M / BAP 5×10^{-8} M)	-	-	-	-
HOJA (2,4-D 5×10^{-6} M /K 5×10^{-6} M)	-	-	-	-
HOJA (2,4-D 5×10^{-7} /K 5×10^{-7} M)	-	-	-	-
*RAIZ (ANA 5×10^{-6} M /BAP 5×10^{-8} M)	-	++	-	-

EL SIGUIENTE CUADRO MUESTRA LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES (SEGUN EL METODO PROPUESTO POR ILINEN ET AL 1986) PARA LOS ORGANOS INTACTOS DE *Solandra nitida*.

ORGANO	ALCALOIDE DETECTADO
TALLO	NINGUNO
RAIZ	ATROPINA, ESCOPOLAMINA, HIDROXIHOSCIAMINA Y 10 ALCALOIDES NO IDENTIFICADOS

EL CUADRO SIGUIENTE MUESTRA LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES (SEGUN LO PROPONE ILINEN ET AL 1986) PARA LOS CALLOS DE *Solandra nitida* QUE DIERON POSITIVO CON LA PRUEBA PREELIMINAR PARA ALCALOIDES.

ORIGEN DEL CALLO	ALCALOIDE DETECTADO
TALLO (2,4-D 5×10^{-7} /K 5×10^{-6} M)	NINGUNO
TALLO (2,4-D 5×10^{-7} /K 5×10^{-7} M)	NINGUNO
TALLO (ANA 5×10^{-5} /BAP 10^{-6} M)	NINGUNO
TALLO (ANA 5×10^{-5} /BAP 10^{-7} M)	NINGUNO
*RAIZ (ANA 5×10^{-6} /BAP 5×10^{-8} M)	NINGUNO

VIII. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSION

Establecimiento de callos

La inducción de callos se realizó en medio basal de Murashige-Skoog (1965), 3% de sacarosa, 0.9% de agar y probó con varias concentraciones de fitorreguladores (ver cuadro A, B, C, D). Encontrando que sólo hay inducción de callos para los diferentes órganos en condiciones de luz continua (7000lx).

La inducción de callos derivados de hoja de *Solandra nitida*; se obtuvieron cuando el tejido se sembró en medio basal adicionado con 5×10^{-6} M de ANA y 5×10^{-6} M de BAP; 5×10^{-6} M de ANA y 5×10^{-8} M de BAP, los callos obtenidos en estas concentraciones de fitorreguladores tenían un color amarillo oscuro, y eran friables. Griffin (1979; 1985) indujo la formación de callos a partir de hojas de híbridos de *Duboisia myoporoides* y *D. leichhardtii* F. Muell, en medio MS con 10 ppm de ANA y 0.25 ppm de BAP bajo condiciones iluminadas. Por su parte Hashimoto *et al* (1982) indujeron callos derivados de hojas de cinco géneros de la familia Solanacea, y entre las que se incluían *Atropa belladonna*, *Datura stramonium*, *Duboisia myoporoides* y *Hyoscyamus niger*; el medio usado fue el LS adicionado con 5×10^{-6} M; 5×10^{-5} M de ANA y 5×10^{-6} M de BAP. y cultivadas bajo luz continua. De acuerdo a lo anterior podemos decir que los resultados obtenidos por nosotros son muy semejantes a los obtenidos por Griffin (1985, 1979) y Hashimoto *et al* (1982); a pesar de que estos autores trabajaron con géneros distintos al nuestro. El uso

de estos fitorreguladores resultó adecuado en la inducción de callos derivados de hoja.

También hubo inducción de callos derivados de hoja cuando el medio basal fue adicionado con 5×10^{-6} M de 2,4-D y 5×10^{-6} M de K; 5×10^{-7} M de 2,4-D y 5×10^{-7} M de K. Cabe mencionar que hubo formación de callos en más de uno de las combinaciones de fitorreguladores usados, pero sólo los mencionados fueron viables. Estos callos obtenidos presentarán un color marrón claro, muy friables (foto 1, 2). resultados similares fueron obtenidos por Verzar-Petri, Kiet & Szoke (1978) quienes establecieron cultivos de callos derivados de hojas de *Datura innoxia*, usando el medio MS (modificado por Maróti 1976) con 2,4-D y K; estos callos fueron obtenidos tanto bajo luz continua como en oscuridad continua. Estos autores no indican las concentraciones exactas de fitorreguladores, sólo mencionaron que usaron mg/l.

Los segmentos de hoja también fueron sembrados en otras combinaciones de fitorreguladores (ver cuadro A, B, C, y D) a pesar de que no se ha reportado que estas sean usadas para la inducción de callos a partir de hoja en algún género de la familia Solanacea. En ninguno de ellos hubo inducción de callos. Sólo cuando se sembraron en medio adicionado con 10^{-5} M de ANA y 10^{-5} M de K, se observó la formación de pequeñas raíces a los 15 días en los segmentos de hoja, en la parte posterior, las que a los 20 días morían, las raíces eran blancas, poco aparentes.

Inducción de callos a partir de tallo:

Cuando los segmentos de tallo fueron sembrados en medio basal adicionado con varias concentraciones de 2,4-D y K (ver cuadro A, B, C y D) se observó la formación de callos; siendo con 5×10^{-7}

M de 2,4-D y 5×10^{-6} M de K; 5×10^{-7} M de 2,4-D y 5×10^{-7} M de K, que se obtienen callos que presentan un rápido crecimiento, un color amarillo verde (foto 3, 4) además de ser muy friables, mientras que Kitamura, Miura & Sugii (1985) indujeron callos a partir de tallos derivados de *Duboisia myoporoides* R.Br. Estos callos fueron obtenidos usando medio MS adicionado con 1 mg/l de 2,4-D y 0.05 mg/l de K. Pero bajo oscuridad continua.

Además hubo inducción de callos derivados de tallo cuando estos fueron sembrados en medio basal con 5×10^{-5} M de ANA y 10^{-6} M de BAP; 5×10^{-5} M de ANA y 10^{-7} M de BAP. Estos callos tenían una consistencia dura, el color que presentan era de un verde claro (foto 5.6). Yamada & Endo (1984) lograron la inducción de callos derivados de tallos de *Duboisia leichhardtii*. El medio usado fue el LS adicionado con 5×10^{-5} M de ANA y 5×10^{-6} M de BAP, bajo condiciones de luz continua y oscuridad continua.

También se probaron otro tipo de combinaciones de fitorreguladores (ver cuadro A, B, C, y D) que no han sido reportadas para inducir callos a partir de tallo, estos incluyeron 10^{-4} - 10^{-8} M de ANA y 10^{-4} - 10^{-8} M de K y con el cual nosotros obtuvimos resultados negativos; mientras que Koul, Ahuja & Grewal (1983) logró la formación de callos a partir de ápices de *Hyoscyamus muticus*. El medio que ellos utilizaron contenía 10^{-5} M de ANA y 5×10^{-6} M de K, los callos eran friables y de color verde pálido.

También existen otras concentraciones de fitorreguladores no probadas por nosotros; por ejemplo Tabata, Yamada, Hiraoka & Konoshima (1972) indujeron callos de tallo de *Scopolia parviflora*, el medio usado fue el LS adicionado con 10^{-5} M de AIA o 10^{-6} M de

2,4-D, inducidos en obscuridad total. Engvild (1973) indujo la formación de callos derivados de internodos y ápices de *Datura innoxia*, en medio MS modificado en la concentración de vitaminas, adicionado con BAP 3×10^{-7} M y variando la concentración de AIA (10^{-4} - 10^{-8} M), de ANA (10^{-4} - 10^{-8} M); y de 2,4-D (10^{-4} - 10^{-8} M). Encontraron que había formación de callos en la mayoría de las combinaciones probadas; además de observar diferencias en el crecimiento, color y textura de los callos.

Inducción de callos a partir de raíces:

Para el caso de la raíz se tomaron segmentos de 1 cm de largo x 0.5 de diametro; el método de esterilización no funciono a pesar de que se probaron varios tiempos de esterilización, concentraciones de hipoclorito de calcio y detergente, al final resultaba en muerte del tejido o contaminación.

De todas las concentraciones y combinaciones de fitorreguladores (ver cuadro A,B, C, y D) probadas con hoja y tallo se encontró que cuando el tallo se siembra en medio basal adicionado con 5×10^{-6} M de ANA y 10^{-8} M de BAP, había formación de un callo a los 20 días de sembrado. A las 4 semanas se hizo aparente la formación de un tallo provisto pequeñas hojas, este se subcultivo en medio de la misma composición; a las cuatro semanas se había desarrollado una plantula sin raíces, las raíces aparecieron hasta el cuarto subcultivo en el mismo medio. Resultados similares fueron obtenidos por Tabata *et al* (1972) quienes lograron la formación de plántulas cuando callos derivados de rizoma de *Scopolia parviflora* fueron sembrados en medio adicionado con 10^{-5} M de AIA y 10^{-7} - 10^{-5} M de K bajo luz fluorescente. Griffin (1979, 1985) también logró la formación de

plántulas a partir de callos derivados de hojas de híbridos de *Duboisia leichhardtii* y *D. myoporoides*. El medio usado por ellos fue el MS, adicionado con 5 ppm de BAP y 2.5 ppm de zIP bajo luz continua. lo que este autor no especifica es que si estas plántulas desarrollaron raices.

Del mismo modo Wesolowska & Skrzypczak (1985) en medio MS adicionado con 2,4-D (0.25mg/l) y K (0.5mg/l) bajo luz continua, logró la formación de plántulas a partir de anteras de *Hyoscyamus niger* L y *H. albus* L. Engvild (1973) así mismo logró la formación de plántulas a partir de cultivo de ápices de *Datura innoxia*. Encontrando que había una mayor organogénesis, es decir formación de plántulas cuando el medio MS era adicionado con 10^{-6} M de BAP.

Mientras que nosotros obtuvimos plántulas usando una combinación de dos fitorreguladores, algunos autores como Yamada & Endo (1984) lograron la formación de plántulas cuando callos derivados de tallo de *Duboisia leichhardtii* se cultivaron en el medio B5 con 10^{-5} M de BAP, durante 4 meses bajo luz continua; el enraizamiento se indujo en el mismo medio con 10^{-5} M de AIB durante 2 - 3 semanas. De igual manera Kitamura, Miura & Sugii (1985) obtuvieron plántulas cuando callos de hoja y tallo de *Duboisia myoporoides* se incubaron en medio MS con 5mg/l de AIB. En obscuridad total (2 - 3 semanas) produjeron raices, y cuando se subcultivaron en el mismo medio pero con 5mg/l de BAP bajo luz continua (2 - 3 meses) produjo tallos y hojas. Eapen *et al* (1978) hizo lo mismo con callos de hojas de plantas haploides de *Atropa belladonna*, los callos fueron cultivados en medio MS con 1 ppm de BAP. El enraizamiento se logró en medio de White con 1 ppm de ANA.

Mientras que West & Mika (1957) usando el medio de Gautheret adicionado con vitaminas, endospermo líquido de coco, hidrolizado de caseína, AIA etc; logró la formación de plántulas cuando segmentos de raíz fueron sembradas en este medio (8 - 10 semanas). de lo anterior se establece que la obtención de plántulas a partir de órganos de *Solandra nitida* sigue un patrón similar al de géneros como *Datura*, *Scopolia*, *Hyoscyamus*, *Atropa*, a pesar de que nosotros obtuvimos plántulas de manera más directa.

**Inducción de callos a partir de raíces de plantulas
obtenidas in vitro.**

De las raíces desarrolladas por las plántulas generadas in vitro se tomaron porciones de 1cm x 0.2 mm de diámetro, se cultivaron en medio basal adicionado con varias combinaciones y concentraciones de fitorreguladores (ver cuadro A,B,C. y D).

Con ninguna de las concentraciones usadas se logró la obtención de callos. Cuando los segmentos de raíz se sembraron en medio basal con 5×10^{-6} M de ANA y 5×10^{-8} M de BAP, tampoco se logró el establecimiento de callos; pero las raíces continuaron creciendo (foto 9). estas raíces se caracterizan por ser extremadamente ramificadas, presentan un crecimiento muy lento, color verde, y una consistencia fibrosa.

En cuanto a los trabajos reportados, Tabata et al (1972) sólo logra la formación de raíces y su cultivo in vitro cuando callos derivados de *Scopolia parviflora* eran cultivadas en medio LS con 10^{-7} - 10^{-5} M de 2,4-D y $0 - 10^{-5}$ M de K en condiciones de obscuridad total. Mientras que Hashimoto & Yamada (1983) encontraron que el medio LS con 10^{-8} M de BAP induce que células de la cepa H15 se organicen y formen raíces en la obscuridad y medio

liquido (*Hyoscyamus niger*). Así mismo Yamada & Endo (1984) establecen un cultivo de raíces a partir de raíces adventicias de plántulas de *Duboisia leichhardtii* generadas *in vitro*, el medio fue el B5 con 10^{-5} M de AIB. Mientras que Thomas & Street (1962) lograron el establecimiento de un cultivo de raíces cuando callos derivados de rizoma (*Atropa belladonna*) se cultivan en medio adicionado con ácido trópico con o sin ANA. Por otro lado Bhandary *et al* (1969) obtienen cultivos de raíces; encontrando que cuando los callos derivados de semillas (*Atropa belladonna*) se cultivan en medio de WB con endospermo líquido de coco producen raíces, creciendo mejor cuando el medio WB se adicionaba con casamonoácidos y 10^{-3} mg/l de AIA. Mientras que Dhoot & Henshaw (1977) establece un cultivo de raíces cuando los callos derivados de semillas (*Hyoscyamus niger*) se cultivan en medio SH con 2 mg/l de 2,4-D; y posteriormente cultivadas en el mismo medio pero sin 2,4-D. Kitamura, Miura & Sugii (1985) encontraron que los callos derivados de tallo y hoja cultivados en medio MS con 5mg/l de AIB (2 - 3 semanas) en obscuridad total producen raíces. Finalmente Griffin (1985) logra el establecimiento de raíces, cuando tallos de híbridos de *Duboisia leichhardtii* y *D. myoporoides*, se cultivan en medio MS con 0.5 ppm de AIB y 1.3 ppm de BAP.

**Prueba cualitativa para alcaloides de órganos intactos
de *Solandra nitida*:**

De acuerdo con los resultados obtenidos con el método propuesto por Smolenski, Silinis & Farnsworth (1972); se encontró que la raíz da prueba positiva con el reactivo de Mayer con el que forma un precipitado; con el reactivo de Wagner formó una solución oscura, y con el reactivo de Dragendorff formó un precipitado

anaranjado.

Para el caso del tallo, este sólo dio positivo con el reactivo de Mayer, pero no con el de Wagner o Dragendorff; mientras que la hoja no dio positivo para alcaloides.

Extracción de alcaloides totales (Evans, Ghani & Woolley 1972) y caracterización de los mismos por cromatografía de gases (Ylinen et al 1986). los alcaloides totales (0.025g) fueron sometidos a cromatografía de gases; se usaron estándares de atropina, escopolamina e hidrohiosciamina.

Los resultados indican que ni en las hojas y tallo hay alcaloides; mientras que en la raíz se encontraron más de diez alcaloides. Encontrándose que el porcentaje total de alcaloides fue de 0.10 %. De los cuales el 0.0012 % corresponde a atropina, el 0.0017 % a escopolamina, el 0.0129 % a hidroxihiosciamina y el resto a otros alcaloides no identificados. Es importante hacer notar que a pesar de que el presente trabajo sólo se detectaron alcaloides en la raíz; Evans, Ghani & Woolley (1972) detectaron alcaloides no sólo en la raíz, sino también el tallos y hojas de cinco especies del género *Solandra*, claro que en esas cinco especies no se incluye a nuestra especie. Estos alcaloides (atropina, escopolamina, hidroxihiosciamina y otros alcaloides) son característicos de géneros como *Atropa*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Scopolia*, y *Duboisia*. ver cuadro 3.

Resultados similares fueron obtenidos por Rosales (1981), pero sólo detecto 2 alcaloides. Es necesario que se determine la presencia de alcaloides en partes viejas (tallo y hojas), ya que nosotros usamos sólo tallos y hojas apicales muy juvenes, por ser de estos de donde se inducieren los callos. Creemos que los

resultados obtenidos con la hojas y tallos de la planta completa; estan relacionados con el tipo de tejido usado, es decir que se relaciona con la epoca del año en el cual se tomo el tejido para el análisis químico. Por ejemplo Cougoul & Cosson (1976) encontraron que la proporción de escopolamina/hioscimamina depende del estadio de desarrollo y de la posición de las hojas en el tallo de *Duboisia myoporoides*. Así mismo Cosson (1969) demostró que existe una gran influencia de la longitud del día, intensidad luminosa, durante la ontogenésis de la planta, en la formación de alcaloides. Encontrando que los días largos con intensa luz promueven la formación y acumulación de alcaloides.

Resultados de prueba cualitativa para alcaloides de los callos obtenidos.

Para los callos obtenidos con las diferentes concentraciones de fitorreguladores; el análisis cualitativo para alcaloides (Ojino, Hiraoka & Tabata 1978), demostró que ni los callos derivados de hoja inducidos con 10^{-6} M de ANA y 5×10^{-6} M de BAP; 5×10^{-6} M de ANA y 5×10^{-8} M de BAP o 5×10^{-7} M de 2,4-D y 5×10^{-6} M 2,4-D y 5×10^{-6} M y 5×10^{-7} M de K dieron prueba positiva

Lo mismo sucedio con los callos derivados de tallo inducidos con 5×10^{-7} M de 2,4-D y 5×10^{-6} M de K; 5×10^{-7} M de 2,4-D y 5×10^{-7} M de K; o 5×10^{-5} M de ANA y 10^{-6} M de BAP; 5×10^{-5} M de ANA y 10^{-7} M de BAP.

Se extrajo (Evans, Ghani & Woolley 1972) y determinó la presencia de alcaloides por cromatografía de gases (Ylinen et al 1985). El análisis reveló que no existia alcaloide alguno para los

diferentes callos obtenidos.

Los resultados obtenidos por nosotros muestran que ni los órganos intactos (tallo y hojas) de *Solandra nitida*; así como los callos obtenidos a partir de estos no presentan alcaloides.

En cuanto al cultivo de raíces desarrollado *in vitro*, este dio prueba positiva para el análisis cualitativo, pero no se detectó alcaloide alguno cuando fueron analizadas por cromatografía de gases. Resultados similares han sido obtenidos por Krikorian & Steward (1969 citado por Verzar-Petri, Kiet & Szoke) no encontraron alcaloides del tropano en callos derivados de varias especies de *Datura*. Griffin (1979, 1985) encontró que los callos derivados de hojas de híbridos de *Duboisia leichhardtii* y *D. myoporoides* no producen alcaloides. Hashimoto *et al* (1982) indujo callos a partir de hojas de *Atropa belladonna*, *Datura stramonium*, *Duboisia leichhardtii*, *D. myoporoides* e *Hyoscyamus niger*; a pesar de que en las hojas de estas plantas se han extraído alcaloides, los callos derivados de estas no presentan alcaloides.

Como ya se menciona las condiciones de cultivo son decisivas para el establecimiento de callos que produzcan alcaloides. Verzar-Petri encontró que los callos derivados de hojas y raíz, cuando son cultivados bajo luz continua presentan una mayor concentración de alcaloides, (0.039% y 0.0226% resp) comparado con los cultivados en obscuridad permanente (0.015% y 0.0075% resp) Yamada & Endo (1984) cultivo callos bajo luz continua encontrando que al tercer subcultivo los callos presentaban alcaloides, hiosciamina y escopolamina, mientras que al cuarto subcultivo no se detectó ningún alcaloide. Kitamura, Miura & Sugii (1985) encontrarán que los callos derivados de tallo y hoja de *Duboisia*

myoporoides no producen alcaloides a pesar de que en los órganos intactos de la planta completa si existen. En este mismo género Sipplly & Friedrich (1975 citado por Kitamura, Miura & Sugii 1985) han reportado que los callos obtenidos por ellos sólo producen valtropina y atropina, del mismo modo Kagei (1980 citado ibid) encontró que los callos de esta misma especie sólo producen valtropina y nicotina; mientras que Hiraoka & Tabata (1983) encontraron que los cultivos de células de *Datura innoxia* producian sólo acetiltropina; independientemente de los fitorreguladores usados o de la adición de otra base o ácido. añadido al medio de cultivo.

Dattagutta y Datta (1984) trabajando con callos de *Datura metel* var *fastuosa* encontró que estos no producian alcaloides, a pesar del uso de diferentes combinaciones de fitorreguladores, precursores y aminoácidos no tienen efecto sobre la biosíntesis de alcaloides.

También se ha reportado que la inducción de callos de órganos que presentan alcaloides en concentraciones diferentes, al inducir la formación de callos estos no presentan diferencias en cuanto al contenido de alcaloides, Tabata *et al* (1972) encontró que los callos derivados de rizoma presentan alcaloides (0.010%) y también los callos derivados de tallo (0.009%), concentraciones que no son muy diferentes entre si; a pesar de que en los órganos intactos la concentración de estos alcaloides es muy significativa (rizoma 0.340% y 0.043% tallo). Así mismo encontraron que algunos parámetros ambientales tienen efecto en la producción de alcaloides en los callos, encontrando que aquellos que crecen bajo luz continua presentan una reducción del 50 - 75% del contenido de

alcaloides, comparado con aquellos desarrollados bajo obscuridad continua; y es aumentada cuando los cultivos desarrollados en obscuridad se adicionan con casaminoácidos, peptona o extracto de levadura (0.012, 0.016, 0.017% resp) comparado con el control (0.008%).

En cuanto a nuestro cultivo de raíces desarrollado *in vitro*, es necesario aclarar que el cultivo se subcultivo 4 veces durante 8 meses antes de ser analizado. Como ya se menciona nuestro cultivo de raíces no produjo alcaloides, a pesar de que en la literatura se reporta la producción de alcaloides del tropano por raíces cultivadas *in vitro*, claro en otros géneros de la familia Solanacea. Por ejemplo Hashimoto & Yamada (1982) reportan que cultivos de raíces desarrolladas de un cultivo de células clonadas H15; producían hiosciamina y escopolamina, pero tenía como desventaja un lento crecimiento. Tabata et al (1972) encontró que las raíces formadas a partir de callos de *Scopolia parviflora* producían alcaloides: hiosciamina y escopolamina y 6 alcaloides menores como apoatropina y tropina. Yamada & Endo (1984) encontraron que los cultivos de raíces de *Duboisia leichhardtii* producían hiosciamina, escopolamina y nicotina. Kitamura, Miura & Sugii (1984) encontraron que los callos de *Duboisia myoporoides*, al diferenciarse y formar raíces estas producen alcaloides entre los que se encuentran atropina, escopolamina, anabasina, nor nicotina y nicotina. Griffin (1985) encontró que los cultivos de raíces desarrollados a partir de cultivo de callos (híbridos de *Duboisia myoporoides* y *D. leichhardtii*) producían alcaloides, hiosciamina y escopolamina. Mientras que West & Mika (1957) establecen un cultivo de raíces de *Atropa belladonna* que sólo

IX. CONCLUSIONES

1. La inducción de callos de diferentes órganos de *Solandra nitida* se establecieron sólo bajo condiciones de luz continua (7000 lx).

2. De los fitorreguladores usados; que se han reportado para géneros como *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, *Hyoscyamus* y *Scopolia*, para *Solandra nitida* encontramos que sólo hay inducción de callos derivados de hoja usando 5×10^{-6} M de ANA/ 5×10^{-6} ; 5×10^{-8} M de BAP y 5×10^{-6} ; 5×10^{-7} M de 2,4-D/ 5×10^{-6} ; 5×10^{-7} M de K; para los tallos sólo se indujeron callos en medio basal adicionado con 2,4-D 5×10^{-7} M / 5×10^{-6} M - 5×10^{-7} M de K y ANA 5×10^{-5} M/ 10^{-6} ; 10^{-7} M de BAP. 3. De todas las concentraciones de fitorreguladores usadas no se logró la inducción de callos derivados de raíz; sin embargo se estableció un cultivo de raíces cuando el medio MS estandar se adicionó con 5×10^{-6} M de ANA y 5×10^{-6} M de BAP.

4. Los callos derivados de tallo y hoja, así como los órganos intactos no se encontró alcaloide alguno.

5. Para las raíces cultivadas *in vitro* no se encontró alcaloide alguno; sin embargo para la raíz de la planta completa se encontró por cromatografía de gases la presencia de alcaloides.

6. El porcentaje de alcaloides encontrados fue de 0.10 %; del cual el 0.0012 % correspondió a atropina, el 0.0017 % a escopolamina, el 0.012 % a hidroxihiosciamina y el porcentaje restante a alcaloides no identificados. Estos porcentajes son

semejantes a los reportados para otros generos de la familia Solanacea (*Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, *Scopolia*, *Hyoscyamus*).

7. Se encontró que las cantidades atropina/escopolamina son muy semejantes, mientras que la de hidroxihiosciamina es mayor respecto a estos dos alcaloides; esto probablemente se deba a que se produce escopolamina a partir de atropina (*dl*-hiosciamina), teniendo como intermediario a la hidroxihiosciamina.

X. RECOMENDACIONES

En nuestro cultivo usamos el medio MS estandar y sólo modificamos la concentración de fitoreguladores. En la revisión bibliográfica encontramos que este medio se ha usado para el establecimiento y obtención de alcaloides (Verzar-Petri, Dinh & Szoke 1978; Griffin 1979, 1984; Kitamura, Miura & Sugii 1985). En base a lo cual proponemos el uso de otros medio que tambien se han usado para establecer callos en géneros relacionados con *Solandra*, estos medio incluyen LS, White, WB, Gambor B5 (Hashimoto & Yamada 1983; Yamada & Endo 1984; Eapen *et al* 1978). Y de este modo determinar el efecto del medio de cultivo en la producción de alcaloides.

Otra de las posibilidades es adicionar algún compuesto, tales como extracto de levadura, peptona, casaminoácido, hidrolizado de caseina; ya que usando estos compuestos algunos autores han encontrado que estimulan la producción de alcaloides (Tabata *et al* 1972). O bien la adición de algún aminoácido implicado en la biosíntesis de alcaloides del tropano. Entre los aminoácidos probados se encuentran L-ornitina, L-arginina, L-tirosina,

L-fenilalanina, L-prolina, asparagina; así como otros compuestos implicados como son el ácido DL-trópico, acetato de sodio, ácido cítrico, éster acetoacético, fenilpiruvato y tropina (Tabata *et al* 1972; Hiraoka, Tabata & Konoshima 1973; Verzar-Petri, Dinh & Szoke 1978; Sairam & Khanna 1970; Staba & Jindra 1968) y con los que se ha estimulado la biosíntesis de alcaloides del tropano.

En cuanto a los fitorreguladores usados: estos juegan un papel muy importante para el establecimiento y producción de alcaloides; este es un parámetro importante ya que este pudo ser una de las causas por las que no obtuvimos alcaloides en nuestros cultivos de raíz; por lo que proponemos el uso de otras concentraciones de fitorreguladores. Se sabe que en algunos casos los fitorreguladores inducen o estimulan la producción de alcaloides (Koul, Ahuja & Grewal 1982; Dhoot & Henshaw 1977; Grewal *et al* 1979), mientras que en otros trabajos se establece que la producción de alcaloides es independiente de los fitorreguladores usados (Tabata *et al* 1972).

Finalmente recomendamos variar otros parámetros, tales como la concentración de sacarosa, se sabe que esta influye en la producción de alcaloides (Koul, Ahuja & Grewal 1982), así también las vitaminas (*ibid*). Se recomienda también que se determine el efecto de la obscuridad permanente en la producción de alcaloides, en algunos casos la luz continua favorece la producción de alcaloides (Verzar-Petri, Dinh & Szoke 1978), mientras que en otros casos el efecto es opuesto; la luz inhibe la producción de alcaloides (Tabata *et al* 1972).

CUADRO 1. ALCALOIDES DEL TROPANO. PRECIOS MEDIOS DE IMPORTACION DE LOS DOS ULTIMOS AÑOS (SECOFI 1990).

PRECIOS MEDIOS DE IMPORTACION 1989			
ALCALOIDE	VALOR TOTAL	VOLUMEN(K)	PREC. MED
ATROPINA	6,149	27	222
ESCOPOLAMINA	44,112	91	484
ALC. TOT	787,050	1001	785
PRECIOS MEDIOS DE IMPORTACION 1990			
ATROPINA	1,967	4	491
ESCOPOLAMINA	2,726	4	681
ALC. TOT	1,33355	1206	1106

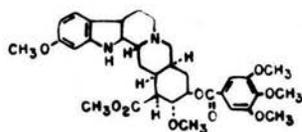
PRECIO MEDIO CORRESPONDE AL VALOR DE 1K DE ALCALOIDE EN DOLLARES E. U.

CUADRO 2. ALGUNOS GENEROS MAS IMPORTANTES A PARTIR DE LOS
 CUALES SE EXTRAEN LOS ALCALOIDES DEL TROPANO (Youngken 1951;
 Tyler; Brady & Robbers 1981; Kumar *et al* 1984; Levii & Lovett 1984
).

ESPECIE	<i>H. niger</i>	<i>H. muticus</i>	<i>Atropa belladonna</i>
% DE ALCALOIDES TOTALES			
ORGANO			
HOJA	0.04-0.08	0.5-1.4	0.40-0.45
TALLO	0.01-0.025	0.40-0.6	0.05-0.06
RAIZ	0.16-0.1.7	0.90-1.3	0.60-0.61
SEMILLAS	0.06-0.10	0.06-0.10	0.33-0.36
PRIMORDIOS	0.70-1.0	0.70-0.10	0.19-0.21
O FRUTOS			

Hyoscyamus niger y *Hyoscyamus muticus*.

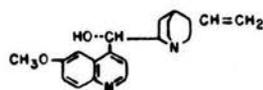
CUADRO 3. SE MUESTRA LA ESTRUCTURA DE ALGUNOS ALCALOIDES, SE PUEDE NOTAR LA VARIEDAD ESTRUCTURAL.



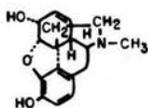
I



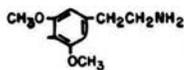
II



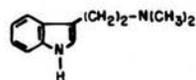
III



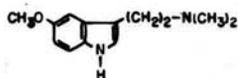
IV



V



VI



VII

I. Reserpina

II. Nicotina

III. Quinina

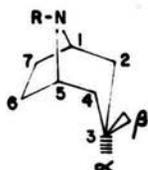
IV. Morfina

V. Mescalina

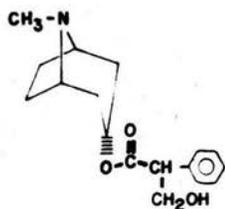
VI. Dimetiltriptamina

VII. 5-Metoxi-N,N-Dimetiltriptamina

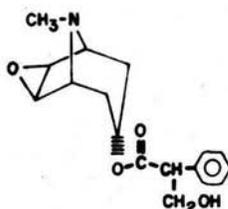
CUADRO 4. ALCALOIDES DEL TROPANO AISLADOS DEL GENERO *Solandra*; ALGUNOS DE LOS CUALES TAMBIEN SE HAN ENCONTRADO EN *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, *Scopolia*, *Hyoscyamus*.



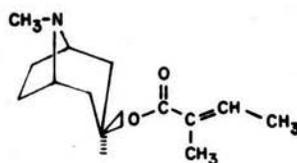
NORTROPANO (AZABICICLO-3,2,1-OCTANO)



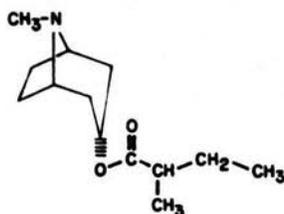
ATROPINA



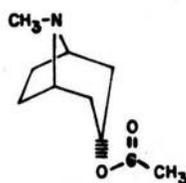
ESCOPOLAMINA



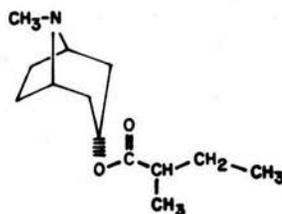
TIGLOIDINA



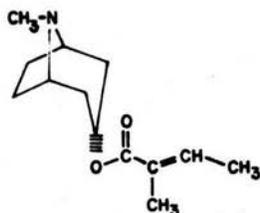
LITORINA



3- α -ACETOXITROPANO



VALTROPINA

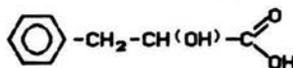


3- α -TIGLOILTROPANO

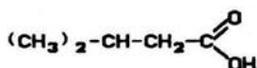
CUADRO 5. ACIDOS QUE COMUNMENTE SE ENCUENTRAN FORMANDO ESTERES EN LOS ALCALOIDES DEL TROPANO.



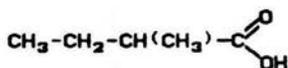
ACIDO TROPICO



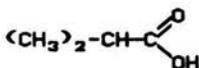
AC. α -HIDROXI- β -FENIL
PROPIONICO



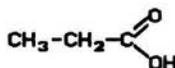
AC. ISOVALERICO



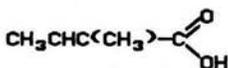
AC. 2-METILBUTIRICO



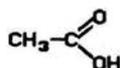
AC. ISOBUTIRICO



AC. PROPIONICO

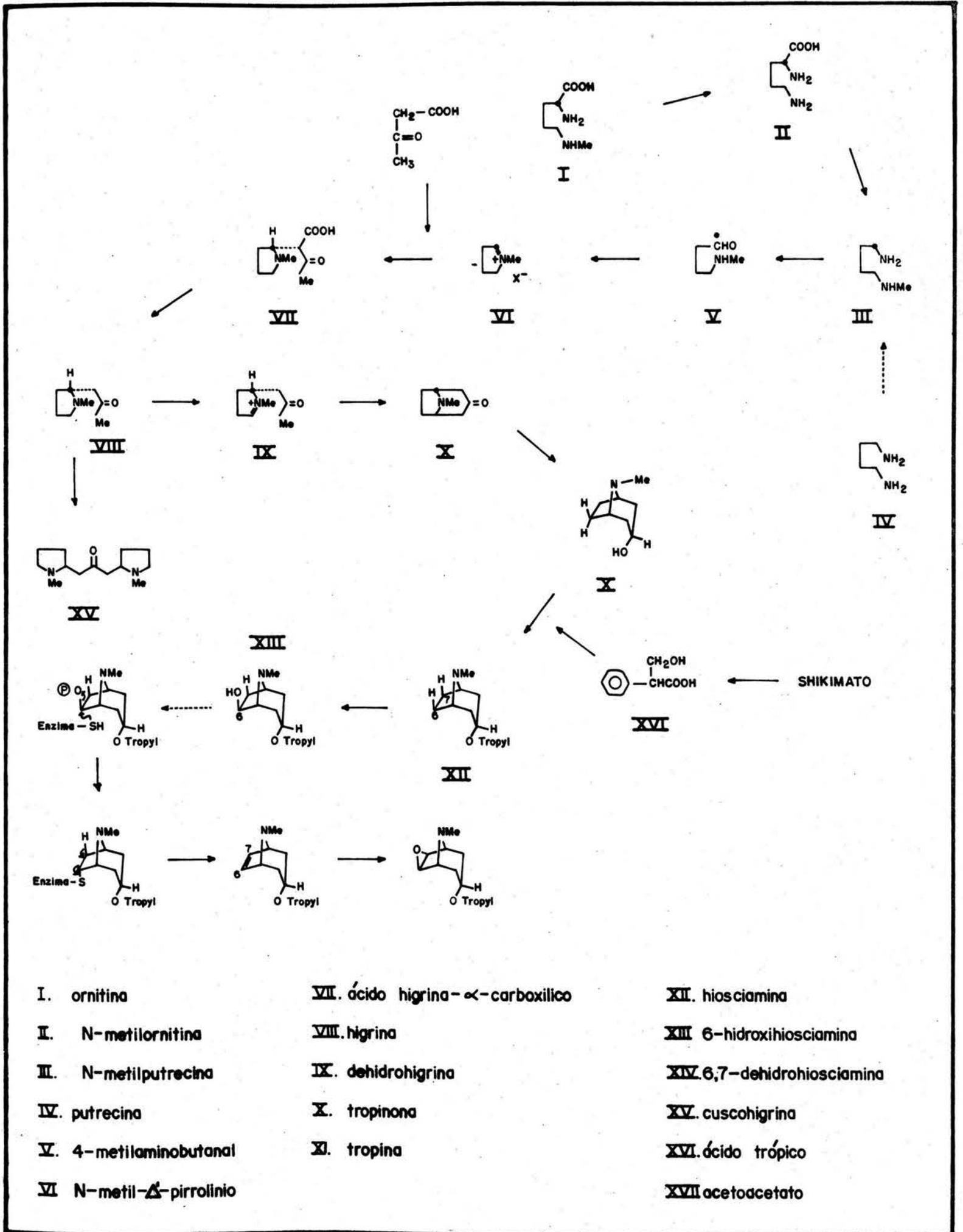


AC. TIGLICO



AC. ACETICO

Figura I. Panorámica general de la biosíntesis de alcaloides del tropano (hiosciamina y escopolamina)



**CUADRO 6. ALCALOIDES DEL TROPANO AISLADOS DE SIETE ESPECIES
DEL GENERO *Solandra*.**

ALCALOIDE ESPECIE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>S. grandiflora</i>	p.a	r	p.a	r	r p.a		r p.a						
<i>S. guttata</i>	r,h t	r,h t	r	r	r,h t	t	r,t	r	r,h	r,h	r,h t	r,h t	r
<i>S. hartwegii</i>	r p.a	r p.a	p.a		r p.a		r p.a						
<i>S. hirsuta</i>	r p.a		r p.a	r	r p.a		r p.a						
<i>S. macrantha</i>	r p.a	r p.a	r p.a		r p.a		r p.a	r p.a	r	r p.a	r p.a	r p.a	r
<i>S. ongiflora</i>	h	h	h										
<i>S. nitida</i>	r				r								
<p>1. ATROPINA 2. HIOSCIAMINA 3. NORATROPINA 12. Ψ-TROPINA 13. CUSCOHIGRINA</p> <p>4. LITORINA 5. HIOSCIAMINA 6. NORHIOSCINA r = RAIZ t = TALLO h = HOJA</p> <p>7. TIGLOIDINA 8. 3α-TIGLOILOXITROPANO p.a = PARTES AEREAS</p> <p>9. 3α-ACETOXITROPANO 10. VALTROPINA 11. TROPINA</p>													

CUADRO 7. LISTA DE SUSTANCIAS QUE SE HAN PRODUCIDO POR CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES *IN VITRO*. (NICKELL 1980)

ALERGENOS	FITORREGULADORES
ALCALOIDES	HORMONAS
AMINOACIDOS	INMUNOQUIMICOS
ANTRAQUINONAS	LATEX
AGENTES ANTILEUCEMICOS	LIPIDOS
ANTITUMORALES	NAFTOQUINONAS
DERIVADOS DEL AC. BENZOICO	ACIDOS NUCLEICOS
BENZOPIRANOS	ACEITES COMERCIALES
CARBOHIDRATOS	OPIATOS
GLICOSIDOS CARDIOTONICOS	PEPTIDOS
CHALCONAS	PERFUMES
CONDIMENTOS	FENOLES
DIANTRONAS E	PIGMENTOS
EMULSIFICANTES	POLIZACARIDOS
ENZIMAS	PROTEINAS
INHIBIDORES DE ENZIMAS	ESPECIAS

CUADRO 8. CUADRO COMPARATIVO DE LOS PORCENTAJES DE ALCALOIDES DETERMINADOS EN RAIZ CULTIVADAS *IN VITRO* Y DE RAIZ DE LA PLANTA COMPLETA.

PLANTA	% DE ALCALOIDES TOTALES	
	CULTIVO DE RAIZ <i>IN VITRO</i>	RAIZ INTACTA
<i>Scopolia parviflor</i> < Tabata et al 1972 >	0.082	0.430
<i>Duboisia leichhardtii</i> < Yamada & Endo 1984 >	0.81	0.90
<i>Duboisia myoporoides</i> < Kitamura, Miura & Sugii 1985 >	0.231	0.22

CUADRO 10. EL SIGUIENTE CUADRO MUESTRA EL PORCENTAJE DE ALCALOIDES TOTALES OBTENIDOS DE RAIZ DE VARIAS ESPECIES DEL GENERO *Solandra*.

% DE ALCALOIDES TOTALES				
ESPECIE	RAIZ	ATRO/HIOSC	HIOSCINA	HOHIOSC
<i>S. grandiflora</i> *	0.64	0.49	0.004	-
<i>S. guttata</i> *	0.13	0.02	0.007	-
<i>S. hartwegii</i> *	TRAZAS	TRAZAS	TRAZAS	-
<i>S. hirsuta</i> *	0.36	0.16	0.003	-
<i>S. macrantha</i> *	TRAZAS	TRAZAS	TRAZAS	-
<i>S. nitida</i> **	0.06	0.0016	0.002	-
<i>S. nitida</i> ***	0.10	0.0012	0.0017	0.012

*Evans, Ghani & Wooley 1972

**Rosales 1981

*** Realizado por nosotros

CUADRO A

ANA/BAP	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
5×10^{-4}	A	B	C	D	E
5×10^{-5}	F	G	H	I	J
5×10^{-6}	K	L	M	N	O
5×10^{-7}	P	Q	R	S	T
5×10^{-8}	U	V	W	X	Y

CUADRO B.

ANA/BAP	5×10^{-4}	5×10^{-5}	5×10^{-6}	5×10^{-7}	5×10^{-8}
5×10^{-4}	a	b	c	d	e
5×10^{-5}	f	g	h	i	j
5×10^{-6}	k	l	m	n	o
5×10^{-7}	p	q	r	s	t
5×10^{-8}	u	v	w	x	y

CUADRO C

2,4-D/K	5×10^{-4}	5×10^{-5}	5×10^{-6}	5×10^{-7}	5×10^{-8}
5×10^{-4}	1	2	3	4	5
5×10^{-5}	6	7	8	9	10
5×10^{-6}	11	12	13	14	15
5×10^{-7}	16	17	18	19	20
5×10^{-8}	21	22	23	24	25

CUADRO D

ANA/K	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
10^{-4}	I	II	III	IV	V
10^{-5}	VI	VII	VIII	IX	X
10^{-6}	XI	XII	XIII	XIV	XV
10^{-7}	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX
10^{-8}	XXI	XXII	XXIII	XXIV	XXV

Fig. 1. Callos derivados de hoja (4 semanas) de *Solandra nitida* Z., en medio MS con 5×10^{-6} M de 2,4-d y 5×10^{-6} M de K.

Fig. 2. Callos derivados de hoja (4 semanas) de *S. nitida*, en medio MS con 5×10^{-7} M de 2,4-D y 5×10^{-7} M de K.

Fig. 3. Callos derivados de tallo (4 semanas) de *S. nitida*, en medio MS con 5×10^{-7} M de 2,4-D y 5×10^{-6} M de K.

Fig. 4. Callos derivados de tallo (4 semanas) de *S. nitida* en medio MS con 5×10^{-7} M de 2,4-D y 5×10^{-7} M de K.

Fig. 5. Callos derivados de tallo (4 semanas) de *S. nitida*, en medio MS con 5×10^{-5} M de ANA y 10^{-6} M de BAP.

Fig. 6. Callos derivados de tallo (4 semanas) de *S. nitida* en medio MS con 5×10^{-5} M de ANA y 10^{-7} M de BAP.

Fig. 7. Cultivo de raíces *in vitro* (8 semanas) de *S. nitida* en medio MS con 5×10^{-6} M de ANA y 5×10^{-8} M de BAP

fig 1

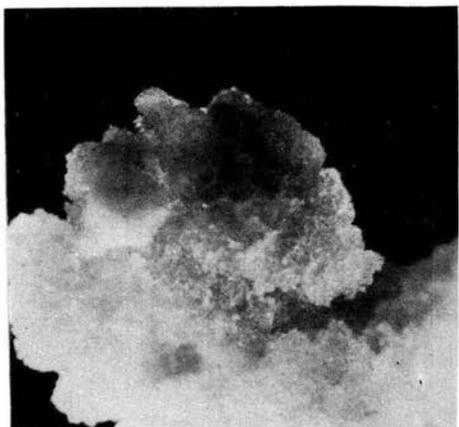


fig 2



fig 5

fig 6



fig 3

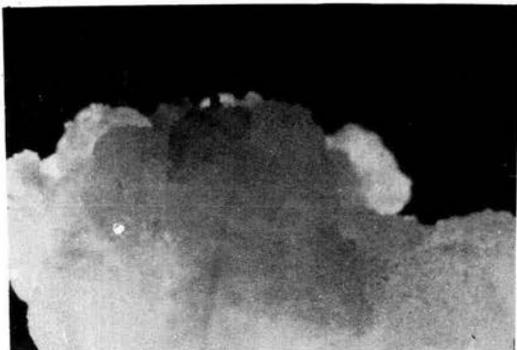


fig 4

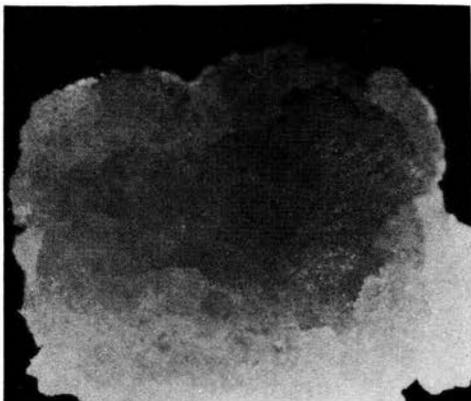
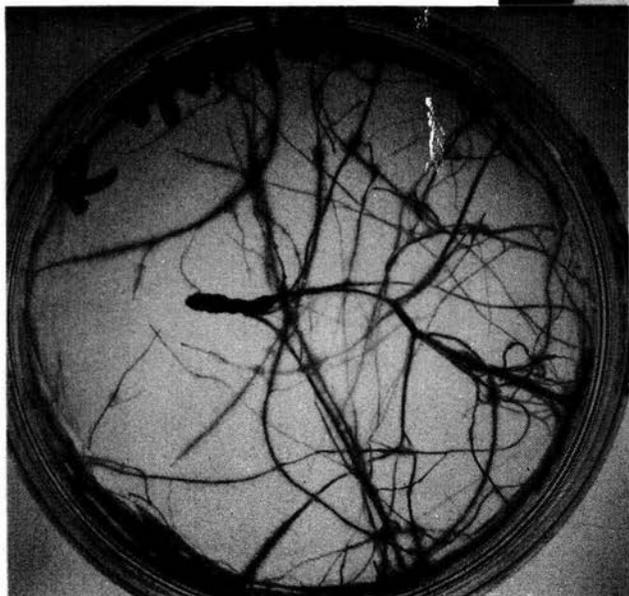


fig 7



BIBLIOGRAFIA

1. Balandrin, M. F., Klocke, J. A., Wurtele, E. S. & Bollinger, W. H. 1985. Natural plant chemicals: source of industrial and medicinal material. **Bioscience**. 228: 1154 - 1160.
2. Blanco, L. A. 1985. El problema del germoplasma en el mundo. En :El cultivo de tejidos vegetales en México. M. L. Robert & V.M. Loyola. (compiladores). México. CONACYT. 27 - 34.
3. Bhandary, S. B. R., Collin, H. A., Thomas, E. & Street, E.E. 1969. Root, callus and cell suspension cultures, from *Atropa belladonna* L. and *Atropa belladonna* cultivar lutea Doll. **Ann. Botany**. 33:647 - 656.
4. Consejo de Salubridad General. 1984. Cuadro básico de medicamentos. Ed. SSA, IMSS, ISSSTE y DIF. México. 45 - 46.
5. Cordell, G. A. 1981. Introduction to alkaloids: a biogenetic approach. A Wiley Interscience Publication. USA. 1 - 79; 81 - 119.
6. Cosson, L. 1969. Influence de l'éclaircissement sur les variations ontogéniques des teneurs en scopolamine et en hyoscyamine des feuilles de *Datura metel*. **Phytochemistry**. 8: 2227 - 2233.
7. Cougoul, E. N., Miginiac, E. & Cosson, L. 1979. Un gradient métabolique: rapport scopolamine/hyoscyamine dans les feuilles du *Duboisia myoporoides* en fonction de leur niveau d'insertion et du stade de croissance. **Phytochemistry**. 18: 949 - 951.

8. Chan, W. N. & Staba, E. J. 1965. Alkaloid production by *Datura* callus and suspension tissue cultures. **Lloydia**. 28: 55 - 62.
9. Chadha, M. S. & Heble, M. R. 1980. Biotechnological applications of plant tissue and cell cultures: Problems and prospects. **National Academy of Science, India: Golden Jubilee Commemoration**. 1980: 1 - 28.
10. D'Arcy, W. G. 1979. The classification of the Solanaceae. In : The biology and taxonomy of Solanaceae. J.G. Hawkes., R. N. Lester & A. D. Skelding. (Ed.) Academic Press. Great Britain. 3 - 48.
11. Datagupta, S. & Datta, P. C. 1984. A search for alkaloids in the callus cultures of black *Datura* by changing the tissue environment. **Bangladesh. J. Sci. Ind. Res.** 19: 30 - 36.
12. Deus, B. & Zenk, M, H. 1982. Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. **Biotechnology & Bioengineering**. 24: 1965 - 1974.
13. Dixon, R: A. 1985. Plant cell cultures: a practical approach. R. A. Dixon. (Ed.). IRL. Press. Oxford. 1 - 20.
14. Dhoot, G: K. & Henshaw, G: G. 1977. Organization and alkaloid production in tissue cultures of *Hyoscyamus niger*. **Acta Bot.** 41: 943 - 949.
15. Domínguez, X. A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Limusa. México. 23 - 79; 211 - 228.
16. Duez, P., Chamart, S., Hanoco, M., Molle, I., Vanhaelen, M. & Vanhaelen-Fastré, R. 1985. Comparison between thin-layer chromatography-densitometry and high-performance liquid chromatography for the determination of hyoscyamine and hyoscyne

in leaves, fruits and seeds of *Datura* (*Datura ssp*). **Journal of chromatography. 329 - 421.**

17. Eapen, S., Rangan, T. S., Chadha, M. S., & Heble, M. R. 1978. Factor influencing the synthesis of tropane alkaloids in cultured tissue of *Atropa belladonna*. L. **Cand. J. Bot. 56: 27 - 2784.**

18. Ellis, B. E. 1984. Probing secondary metabolism in plant cell cultures. **Canadian. J. Bot. 62: 29 - 2917.**

19. Engvild, K. C. 1973. Shoot differentiation in callus cultures of *Datura innoxia*. **Physiol. Plant. 28: 155 - 159.**

20. Evans, W.C., Ghani, A. & Woolley, V. A. 1972. Alkaloids of *Solandra* species. **Phytochemistry. 11: 470 - 472.**

21. Fodor, G. 1970. Tropane alkaloids. In: Chemistry of alkaloids. S. W. Pelletier (Ed). Van Nostrand Reinhold Company. USA. **4: 431 - 467.**

22. Fodor, G. B. 1982. Secondary plant products. A. Bell & Charlwood (Ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. **8: 92 - 127.**

23. Flores, H. E., Hoy, M. W. & Pichard, J. J. 1987. **Trends in biotechnology. 5 : 64 - 69.**

24. Fossard, R. A. 1985. Tissue culture for plant propagators. University of New England. Australia.

25. Fowden, L. 1962. Secondary plant products. **Endeavour. 21: 135 - 142.**

26. Gautheret, R. J. 1982. Plant tissue cultures: the history. In : Plant tissue cultures 1982. A. Fujiwara. (Ed.) Japanese Association for Plant Tissue Cultures, Tokyo. **7 - 24.**

27. Glasby, J.S. 1975. Encyclopedia of the alkaloids. Plenum Press. New York. **1: 2: 3.**

28. Gibson, M. R. & Abbott, E. R. 1963. Effect of proline on growth and alkaloid synthesis in *Datura stramonium* var *tatula*. *Lloydia*. 26: 125 - 1322.

29. Gibson, M. R. & Frech, D. I. 1964. The effect of gibberellic acid on growth and alkaloid synthesis in *Datura stramonium* var *tatula*. *Lloydia*. 27 : 47 - 51.

30. Grewal, S., Koul, S., Ahuja, A. & Atal, C. K. 1979. Hormonal control of growth, organogenesis and alkaloid production in *vitro* cultures of *Hyoscyamus muticus* Linn. *Ind. J. Exp. Biol.* 17: 558 - 561. (*C.A.* 92: 3277f. 1979).

31. Griffin, W. J. 1979. Organization and metabolism of exogenous hyoscyamine in tissue cultures of *Duboisia* hybrids. *Naturwissenschaften*. 66: 58.

32. Griffin, W. J. 1984. Advances in tropane alkaloids. *Research Poisonous Plants Symp.* 1984. 375 - 380.

33. Hashimoto, T., Sato, F., Mino, M. & Yamada, Y. 1982. Production of tropane alkaloids from cultured Solanaceae cells. In : *Plant Tissue Culture 1982*. A. Fujiwara. (Ed.). Japanese Association for Plant Tissue Culture. Tokyo. 305 - 308.

34. Hashimoto, T. & Yamada, Y. 1983. Scopolamine production in suspension cultured and redifferentiated roots of *Hyoscyamus niger*. *Planta Medica*. 47: 195 - 199.

35. Henry, T. A. 1949. *The plant alkaloids*. 4 ed. Blakiston, Philadelphia.

36. Hiraoka, N., Tabata, M. & Konoshima. 1973. Formation of acetyltropine in *Datura* callus cultures. *Phytochemistry*. 12: 795 - 799.

37. Hiraoka, N. & Tabata, M. 1974. Alkaloid production by plants regenerated from cultured cells of *Datura innoxia*. **Phytochemistry**. 13: 1671 - 1675.

38. Hiraoka, N. & Tabata, M. 1983. Acetylation of tropane derivatives by *Datura innoxia* cell cultures. **Phytochemistry**. 22 : 409 - 412.

39. Holm, H. L. 1950. The alkaloids. H. Holmes & H. F. Manske. (Ed.) Academic Press. New York. 1:

40. Hunziker, J. T. 1979. South American Solanaceae: a synoptic survey. In :The biology and taxonomy of Solanaceae. J. G. Hawkes., R. N. Lester. & A. D. Skelding. (Ed.). Academic Press. Great Britain. 49 - 86.

41. I.N.E.G.I. 1990. Anuario Estadístico del Comercio Exterior de los Estados Unidos Mexicanos. 1971 - 1984. México.

42. Jain, M. & Khanna, P. 1982. Effect of aminoacids on growth and production of atropine in suspension cultures of *Atropa belladonna* Linn. **Indian. J. Bot.** 5: 60 - 62. (C. A. 98:12892d. 1982).

43. Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H. & Shimomura, K. 1986. Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. **Plant Cell Report**. 5: 239 - 242.

44. Kitamura, Y., Miura, H. & Sugii, M. 1985. Alkaloid composition and atropine esterase activity in callus and differentiated tissue of *Duboisia myoporoides*. **R. Br. Chem. Pharm. Bull.** 33 : 5445 - 5448.

45. Knab, T. 1977. Notes of *Solandra* among the Huichol. **Economic Botany**. 31: 80 - 86.

46. Koul, S., Ahuja, A. & Grewal, S. 1983. Growth and alkaloid production in suspension cultures of *Hyoscyamus muticus* as influenced by various cultural parameters. **Planta Medica.** 47: 11 - 16.

47. Kumar, A., Sharma, A., Singh, A. K. & Virmani, D. P. 1984. Cultivation of *Hyoscyamus* as source of tropane alkaloids: a review. **Curr. Res. Med. Aromat. Plants.** 6 : 197 - 211.

48. Leete, E. 1979. Biosynthesis and metabolism of tropane alkaloids. **Planta Medica.** 36: 97 - 111.

49. Leete, E. 1982. Alkaloids derived from ornithine, lysine and nicotinic acid. In : Secondary Plant Products. A. Bell & B. V. Charlwood. (Ed).Springer-Verlag Berlin. 8 : 5 - 91.

50. Levitt, J. & Lovett, J. V. 1984. *Datura stramonium*.: alkaloids and allelopathy. **Australian Weed.** 3: 108 - 112.

51. Loyola, M. M. & Reyes, L. J. 1985. El cultivo de tejidos vegetales para la producción de sustancias naturales. En :El cultivo de tejidos vegetales en México. M. L. Robert & V. M. Loyola. (Compiladores). **CONACYT. México.** 27 - 34.

52. Loyola, V. M. 1987. Obtención de productos secundarios de interes farmacologico a partir de cultivo de tejidos. I. Consideraciones generales y proposición de un modelo. **Rev. Mexicana de Ciencias Farmaceuticas.** 14 : 26 - 36.

53. Lozoya, S. H. 1985. Micropropagación de especies herbáceas. En :El cultivo de tejidos vegetales en México. M. L. Robert & V. M. Loyola (Compiladores). México. **CONACYT.** 65 - 79.

54. Luckner, M. 1984. Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals. 2nd ed. Springer-Verlag Berlin.

55. Mano, Y., Nabeshima, S., C. & Ohkawa, H. 1986. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agric. Biol. Chem.* 50 (11): 2715 - 2722.
56. Martindale, W. 1982. The extrapharmacopeia. E. F. Reynolds. (Ed.). 28 ed. London. 289 - 333; 690 - 693.
57. Martinez, M. 1966. Las Solandras de México con una nueva especie. *Anales del Instituto de Biología. Univ. Nac. Aut. México.* 34 87 - 106.
58. Matuda, E. 1972. Plantas nuevas de México. *Anales del Instituto de Biología, Univ. Nac. Aut. México.* 1 : 51 - 62. 59.
59. Mehra, K. L. 1979. Ethnobotany of Old World Solanaceae. In :The biology and taxonomy of Solanacea. J. G. Hawkes., R. N. Lester & A. D. Skelding. (Ed.). Academic Press. Great Britain. 161 - 180.
60. Misawa, M. 1985. Production of useful plant metabolites. *Biochem. Eng/Biotechnol.* 31: 39 - 88.
61. Murashige, T. & Skoog, F. 1965.. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473 - 497.
62. Nickell, L. 1980. Products. In :Plant Tissue cultures as a source of biochemicals. E. J. Staba. (Ed.). CRS. Press, Inc., Boca Raton, Fl. 235 - 256.
63. O'Gorman, H. 1963. Plantas y flores de México. Dirección General de Publicaciones. Univ. Nac. Aut. de México.
64. Pelletier, S. W. 1970. The plant alkaloids- general information. In :Chemistry of the alkaloids. S. W. Pelletier. (Ed.).Van Nostrand. Reinhold. Company. USA. 1 - 10; 123 - 187.

65. Pelletier, S. W. 1983. Alkaloids: chemical and biological perspectives. S. W. Pelletier. (Ed). John Wiley and Sons, New York. 2: 1.
66. Robinson, T. 1981. The biochemistry of alkaloids. Springer-Verlag. Berlin. 58 - 66; 113 - 136.
67. Romeike, A. 1978. Tropane alkaloids -ocurrence and syatematic importance in Angiosperms. **Bot. Notiser.** 131: 85 - 96.
68. Rosales, L. C. 1981. Alcaloides presentes en la raiz de *Solandra nitida*. Fac. Química, Univ. Nac. Aut. de México.
69. Rublúo, I. A. 1985. Estrategias para la preservación de germoplasma vegetal *in vitro*. En :El cultivo de tejidos vegetales en México. M. L. Robert & V. M. Loyola. (comp.). CONACYT. México. 35 - 53.
70. Sairam, T. V. & Khanna, P. 1971. Effect of tyrosine and phenylalanine on, growth and production of alkaloids in *Datura tatula* tissue cultures. **Lloydia.** 34: 170 - 172.
71. Schultes, R. E. 1979. Solanaceous hallucinogens and their role in the development of New World cultures. In :The biology and taxonomy of Solanacea. J. G. Hawkes, R. N. Lester, & A. D. Skelding. (Ed).Academic Press. Great Britain. 137 - 160.
72. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Precios medios de importación 1984 - 1987. México.
73. Smolenski, S. J., Silinis, H. & Farnsworth, N. R. 1972. Alkaloids screening. I. **Lloydia.** 35: 1 - 34.
74. Staba, E. & Jindra, A. 1989. *Datura* tissue cultures: produccion of minor alkaloids from chlorophyllous and nonchlorophyllous strains. **Journal of Pharmaceutical.** 57: 701 - 704.

75. Staba, E. J. 1977. Tissue culture and pharmacy. In :Plant cell, tissue and organ culture. J. Reinert & Y. P. S. Bajag. (Ed.). Springer-Verlag. Berlin. 694 - 702.

76. Staba, E. J. 1980. Plant tissue culture as a source of biochemicals. E. J. Staba. (Ed.). CRC. Press, Inc. Boca Raton Fl.

77. Staba, E. J. 1982. Production of useful compound from plant tissue cultures. In :Plant tissue culture 1982. A. Fujiwara. (Ed.). Japanese Association for Plant Tissue Cultures. Tokyo. 25 - 30.

78. Stohs, S. J. 1969. Production of scopolamine and hyoscyamine by *Datura stramonium* L. suspension cultures. **Journal of Pharmaceutical Sciences.** 58: 703 - 705.

79. Shihwei, L. 1982. Perspective on the application of plant cell and tissue culture. In :Plant tissue culture 1982. A. Fujiwara. (Ed.). Japanese Association for plant tissue culture. Tokyo. 19 - 24.

80. Spiegel-Roy, P. & Kochba, J. 1976. Application of tissue culture for improvement. In :Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. J. Reinert & Y. P. S. Bajag, (Ed.). Springer-Verlag. Berlin. 404 - 413.

81. Tabata, M., Yamamoto, H., Hiraoka, N. & Konoshima, M. 1972. Organization and alkaloid production in tissue cultures of *Scopolia parviflora*. **Phytochemistry.** 11: 949 - 955.

82. Tabata, M. 1977. Recent advances in production of medicinal substances by plant cell culture. In :Plant tissue culture and it's biotechnological application. W. Barz., Reinhard, & M. H. Zenk. (Ed.). Springer-Verlag, Berlin. 3 - 16.

83. Thomas, E. & Street, H. 1970. Organization in cell suspension cultures of *Atropa belladonna* L. and *Atropa belladonna* cultivar *lutea*. *Doll. Ann. Bot.* **34**: 657 - 669.
84. Trease, G. E. & Evans, W. C. 1973. *Pharmacognosy*. 10th ed. Bailliere Tindall. London.
85. Tyler, V. E., Brady, L. R. & Robbers, J. E. 1981. *Pharmacognosy*. Lea & febiger. USA.
86. Verzar-Petri, G., Dinh, H. K. and Szoke, .E. 1978. The alkaloid production in *Datura innoxia* tissue culture. *Acta. Bot. Acad. Sci. Hung.* **24** :351 - 362.
87. Vickery, M. L. & Vickery, B. 1981. *Secondary plant metabolism*. University Press. Baltimore, Hong Kong.
88. Waller, G. R. & Newacki, E. K. 1978. *Alkaloid biology and metabolism in plants*. Plenum Press. New York.
89. Wesolowska, M. & Skrzypezak, L. 1985. *In vitro* androgenetic cultures of *Hyoscyamus niger* L., *H. albus* and alkaloid content assay. *Acta. Societatis Botanicorum Poloniae.* **54**: 107 - 113.
90. West, F. R. & Mika, E. S. 1957. Synthesis of atropina by isolated roots and root-callus cultures of belladonna. *Botanical Gazette.* **119** : 50 - 55.
91. Whittaker, R. H. & Feeny, P. P. 1971. Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science.* **171** : 757 - 770.
92. Willaman, J. J. & Schubert, B. G. 1961. Alkaloid bearing plant and their contained alkaloids. *USDA: Agric. Res. Serv. Tech. Bull. No 1234.*
93. Yamada, Y. & Hashimoto, T. 1982. Production of tropane alkaloids in cultures cells of *Hyoscyamus niger*. *Plant Cell Rep.* **1**

: 101 - 103.

04. Yamada, Y & Endo, T. 1984a. Tropane alkaloids production in cultured cells of *Duboisia leichhardtii*. *Plant Cell Rep.* 33 : 186 - 188.

05. Yamada, Y. & Endo, T. 1984b. Selection of cell lines for high yields of secondary metabolites. In : Cell cultures and somatic cell genetics of plants. I. K. Vasil (Ed). Academic Press. New York. 1 : 629 - 636.

06. Ylinen, M., Naaranlahti, T., Lapinjoki, S., Huntikangas, A., Salonen, M. L., Simola, L. K. & Lounasmaa, M. 1986. Tropane alkaloids from *atropa belladonna*; Part I. Capillary Gas Chromatographic Analysis. *Planta Medica.* 2 : 85 - 87.

07. Youngken, H. W. 1951. Tratado de farmacognosia. Atlante, S. A. México.

08. Zenk, M. & Deus, B. 1982. Natural products synthesis by plant cell cultures. In : Plant tissue cultures 1982. A. Fujiwara (Ed). Japanese Association for plant tissue cultures. Tokyo. 391 - 394.