

18  
2 ej<sup>o</sup>



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Regeneración in vitro de *Salvia elegans*  
( especie con potencial industrial )  
a partir de secciones de tallo.

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 :

MARIA NOEMI BARRON SERRANO



MEXICO, D.F.  
FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
Regeneración in vitro de Salvia elegans (especie con  
potencial industrial) a partir de secciones de tallo  
realizado por María Noemí Barrón Serrano

con número de cuenta 574825 , pasante de la carrera de

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Víctor Manuel Chávez Avila

Propietario

Dr. Abraham Rubiñó Islas

Propietario

Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón

Suplente

M. en C. Francisco González Medrano

Suplente

M. en C. Sonia Vázquez Santana

Consejo Departamental de Biología

A mis Padres.

Gracias,

Victor, por tu valiosa dirección y arduo trabajo en la consecución de esta tesis.

Lorena, por tu cariño, traducido en trabajo y estímulo constante para la realización de esta tesis.

A mi esposo Guillermo y a mis hijos, Guillermo, Juan Carlos, Iván y Jaime.

Flip Rainnie, por tu arte.

Con sincero agradecimiento.

Dr. Abraham Rubluó

Jardín Botánico.  
Instituto de Biología, UNAM

M. en C. Ana Laura Escamilla

Jardín Botánico.  
Instituto de Biología, UNAM

Biol. Carmen Loyola

Instituto de Biología, UNAM

Biol. Ma. del Rosario García Peña.

Instituto de Biología, UNAM

M. en C. Martín Mata Rosas

Jardín Botánico.  
Instituto de Biología, UNAM

## INDICE

### ABREVIATURAS

RESUMEN	1
I INTRODUCCIÓN	2
1 Situación Mundial y Consecuencias de la Pérdida de la Biodiversidad	2
2 Principales Factores que Determinan la Pérdida de la Biodiversidad	4
3 Biodiversidad Vegetal en México	9
4 Familia Lamiaceae	11
5 <u>Salvia elegans</u> Vahl.	13
6 Descripción	14
7 Distribución Geográfica y Abundancia	14
8 Disminución de las Poblaciones	15
9 Usos del Género	17
10 Alternativas para la Conservación de la Biodiversidad	17
a) Conservación <u>in situ</u>	18
b) Conservación <u>ex situ</u>	19
c) Cultivo de Tejidos Vegetales	21
d) Vías de Regeneración <u>in vitro</u>	24
11 Cultivo de Tejidos Vegetales en la Familia Lamiaceae	27

II OBJETIVO	29
III MATERIALES Y METODOS	29
1 Material Biológico	29
2 Desinfección y Siembra de Semillas	29
3 Desinfección y Siembra de Explantes de Plantas Adultas y Plántulas Generadas <u>in vitro</u>	31
4 Trasplante	33
5 Cultivo en Suelo de Semillas, Apices y Nudos de Plantas Adultas	34
IV RESULTADOS	35
1 Cultivos de Semillas <u>in vitro</u>	35
2 Cultivo <u>in vitro</u> de Explantes Maduros y Jóvenes	40
a) Callo	40
b) Regeneración	44
c) Oxidación	50
3 Trasplante	52
4 Cultivo en Suelo de Semillas, Apices y Nudos de Plantas Adultas	54
a) Semillas	54
b) Apices y Nudos	54
V CONCLUSIONES	57
LAMINAS	
APENDICE 1	
APENDICE 2	
VI BIBLIOGRAFIA	

## ABREVIATURAS

<b>AIA</b>	Acido Indol-3-Acético IAA 3-Indolacetic acid
<b>AIB</b>	Acido Indol-3-butírico IBA Indole-3-Butyric Acid
<b>ANA</b>	Acido Naftalenacético NAA Naphthalene Acetic Acid
<b>BA o BAP</b>	6-Bencilaminopurina 6-Benzylaminopurine
<b>B5</b>	Medio de Cultivo Gamborg, Miller y Ojima (1968)
<b>CI</b>	Conservation International
<b>2, 4-D</b>	Acido 2, 4-Diclorofenoxiacético
<b>2IP</b>	N-6 Dimetil Alil Aminopurina N6-2-Isopentyl Adenine
<b>FAO</b>	Food and Agricultural Organization. "United Nations"
<b>GA<sub>3</sub></b>	Acido Giberélico Gibberelic Acid
<b>IBPGR</b>	International Board for Plant Genetic Resources
<b>IBUNAM</b>	Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México
<b>IUCN</b>	International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources
<b>K</b>	Kinetina; 6-Furfurilaminopurina 6-Furfurylaminopurine
<b>MEXU</b>	Acrónimo Oficial con que se designa el Herbario Nacional de México
<b>MS</b>	Medio de Cultivo Murashige y Skoog (1962)
<b>WRI</b>	World Resources Institute
<b>WWF</b>	World Wild Life Fund
<b>Z</b>	Zeatina; 4-Hidroxi-3-Metil-Trans-2-Butenilaminopurina

## RESUMEN

Regeneración in vitro de Salvia elegans Vahl. (especie con potencial industrial) a partir de Secciones de Tallo.

Salvia es un género dentro de las Labiadas, reconocido por su interés biológico y económico debido a su contenido de metabolitos secundarios los cuales pueden ser aprovechados en muy diversas e importantes industrias, tales como las de perfumería, farmacéutica, agrícola, etc..

La especie S. elegans Vahl. es endémica de México, presenta un importante contenido de terpenos, sin embargo, muchas de sus poblaciones están disminuyendo rápidamente con la consecuente pérdida de genotipos que podían ser aprovechados.

La alteración de su habitat, adicionado a los bajos porcentajes de germinación encontrados, hacen deseable el establecimiento de un método de micropropagación para su propagación y conservación, predominantemente in situ.

En el presente estudio se describe un procedimiento para la regeneración y propagación in vitro de S. elegans, que podría permitir explorar la extracción de metabolitos secundarios (aceites esenciales) que contiene esta especie.

La regeneración de plántulas se produjo a partir de ápices y nudos de plántulas y plantas adultas en medio Litz, en el tratamiento con kinetina (1.5 mg/l) en ausencia de auxina. No se requirió de un segundo medio para la obtención de plantas completas. En este único tratamiento se logró la inducción y desarrollo de yemas axilares y adventicias y la formación de raíces.

Se encontraron diferencias en los promedios de formación de brotes, las cuales estuvieron asociadas al tipo, origen y estado fisiológico de los explantes, así como a la época del año en que se realizaron los cultivos.

Los ápices y nudos disectados de plántulas tuvieron una mayor capacidad morfológica, que los tomados de plantas maduras.



## I INTRODUCCION

Se estima que existen entre 15 y 30 millones de especies de organismos con los que compartimos el planeta, tales cifras representan la biodiversidad más prolífica que jamás haya existido (Erwin, 1990; Wilson, 1990; McNeeley *et al.*, 1990), y también es cierto que el hombre actúa como su principal amenaza. Se considera que para el año 2050 su reducción podría hacerla alcanzar su nivel más bajo desde finales de la era Mesozoica (Cretácico tardío), hace aproximadamente 65 millones de años.

Distintas especies han desaparecido y otras han surgido dentro de un proceso natural que ocurre desde que la vida se originó en la tierra hace unos 4 mil millones de años (Myers, 1990). La tasa de extinción al menos en los últimos 600 millones de años había sido aproximadamente del orden de una especie por año (Raup y Sepkoski, 1984; y Myers, 1990), actualmente es más alta por cientos o miles por año (Ehrlich y Ehrlich, 1981; Myers, 1990; Raven, 1990; Soule, 1986; Western y Pearl en prensa y Wilson 1990, citados por Myers, 1990) y tiene un carácter no natural debido a que está ocurriendo en un período muy corto (menos de 300 años) a una escala mundial, sincrónicamente en flora y fauna, y como consecuencia de las actividades del hombre.

### **1 Situación Mundial y Consecuencias de la Pérdida de la Biodiversidad**

La biodiversidad permite aumentar la productividad biológica de nuestro planeta con base en los genes contenidos en plantas y animales, los que por su diversidad, permiten a las especies adaptarse a cambios ambientales (Swaminathan, 1990). Este factor esencial para la vida apenas está empezando a ser valorado y con ello no es de extrañar que aún no se conozca el número exacto de especies existentes. Se considera que sólo han sido descritas entre 1.4 millones (Parker, 1982, citado por Wilson, 1990) a 1.66 millones (Erwin, 1990).

Tampoco existe un criterio único en cuanto al número de plantas vasculares, 250 mil a 400 mil (Raven, 1976; Conway, 1990; Balick, 1991; Wilson, 1990). De éstas, se estima que sólo 1,100 han sido mejor estudiadas (Balick, 1991).

El mayor número de especies y en particular de especies vegetales (155 mil, 70-90% del total mundial) se encuentra en las selvas tropicales húmedas que actualmente sólo cubren el 6% de la superficie terrestre (originalmente el 15%); son el reservorio más grande de la diversidad biótica del planeta (Ehrlich y Ehrlich, 1981; Myers, 1991). De las especies que ahí crecen, sólo el 15% han sido clasificadas y se conoce muy poco de su biología (Ehrlich y Ehrlich, 1981) y sin embargo, se estima que para el año 2000 habrá desaparecido el 20% de plantas y animales que habitan en selvas y bosques. A esta cantidad habría que agregar el porcentaje que se refiere al resto de los biomas. Tan sólo, en la selva tropical húmeda 50 mil especies de plantas alcanzarán el status de amenazadas o se habrán extinguido. El mayor número corresponderá a Latinoamérica con aproximadamente el 15% de las 92 mil especies de plantas vasculares que ahí se encuentran (Simberloff, 1986, citado por Wilson, 1990) (Raven, 1990). Los científicos de la IUCN (1986) consideran que para el año 2050 se habrán extinguido unas 60 mil especies de plantas de las zonas tropicales.

En cuanto a las 85 mil especies de la zona templada, 4 mil quinientas se consideran amenazadas y de éstas, 750 se encuentran en peligro de extinción (Raven, 1976).

Wilson (1990) considera que si se toma una cifra muy prudente de 2 millones de especies confinadas en las selvas, la pérdida global que resulte de la deforestación podría ser de 4 mil a 6 mil especies por año, ritmo que es 10 mil veces superior a la tasa natural de extinción que existió antes de la aparición del hombre.

Raven (1991) estima que casi una cuarta parte de las especies pueden perderse en las próximas tres décadas. En 1986, calculaba que a partir de esa fecha y hasta finales de siglo se perderían 5 especies vegetales por día, mientras que en las siguientes dos décadas se pueden perder 10 especies por día.

## **2 Principales Factores que Determinan la Pérdida de la Biodiversidad**

1. Crecimiento poblacional.
2. Acelerado desarrollo tecnológico y su uso indiscriminado.
3. Desconocimiento de especies silvestres hasta ahora no aprovechadas.

### **1. Crecimiento Poblacional:**

La humanidad entró a la era industrial con una población de 1,000 millones, actualmente alcanza unos 5,300 millones y cada año se suman 93 millones más, de los que la mayor parte corresponde a los países pobres (Porrit, 1991). La población mundial podría ser de 7,500 millones en el año 2100, sin embargo es más probable que alcance entre 11 mil y 14 mil millones (Porrit, 1991).

La sobrepoblación no sólo implica numerosos habitantes por unidad de espacio, sino que las presiones de población deben medirse en función de los recursos necesarios para soportar tal población (Ehrlich y Ehrlich, 1981). Para generar los mismos recursos a los que la humanidad se ha limitado en aprovechar, se ha optado por aumentar la producción y el consumo a través de un desarrollo tecnológico indiscriminado y la transformación de numerosos habitats naturales en zonas agrícolas, de pastoreo, industriales y urbanas. Esto ha incidido predominantemente sobre las selvas tropicales, tan complejas como vulnerables son destruidas a un ritmo de 160 mil Km<sup>2</sup> cada año (Myers, 1991).

De acuerdo con un informe del Instituto de Recursos Mundiales en cooperación con el Banco Mundial y la ONU se prevé que para el año 2000 habrán desaparecido unos 556 millones de hectáreas entre bosques y selvas, lo que ya se manifiesta en algunos signos: reducción de insumos industriales, calentamiento del planeta y en general una alteración del clima. Una hectárea de bosque tropical puede absorber hasta 10 ton. carbono/año. Así, un millón de Km<sup>2</sup> de selva puede absorber hasta mil

millones de toneladas de CO<sub>2</sub> de los 4 mil adicionales que se acumulan cada año en la atmósfera; 30% de los cuales deriva de la quema de estas biomás (Myers, 1991).

También los bosques desempeñan un papel muy importante al intervenir en el ciclo del agua del planeta, evitan la erosión, inundaciones, moderan el clima, pues mediante el follaje regulan la temperatura del ambiente, la velocidad del viento, disminuyen la evaporación de la humedad del suelo, abaten el ruido en zonas urbanas. No obstante que la destrucción de estos ecosistemas no es tan acelerada como la de las selvas tropicales, su efecto se ha empezado a sentir.

En los países industrializados más de la mitad de los bosques mueren prematuramente a causa de la contaminación y la desecación. Los bosques más afectados son los del pacífico noroccidental de los que en 1987 se obtuvieron 1,700 millones m<sup>3</sup> de tablonés, y el Bosque Nacional de Tongass (Alaska) donde se han talado el 50% de las zonas más productivas (Wilson, 1989).

## 2. Acelerado desarrollo tecnológico y su uso indiscriminado:

La mayor destrucción ocurre desde que el hombre hace 250 años empezó a utilizar el petróleo.

El desarrollo de la tecnología está transformando el ambiente global amenazando la biodiversidad principalmente a través de:

- a. Crecientes cantidades de CO<sub>2</sub> que acumulado en la atmósfera contribuye al calentamiento del planeta.
- b. Destrucción de la capa de ozono de la atmósfera por halógenos y sustancias como los clorofluorocarbonos basadas en el cloro.
- c. Productos como los óxidos de nitrógeno, liberados por los autos y el dióxido de sulfuro de las centrales de energía eléctrica contribuyen a la acidificación del agua de lluvia que daña vegetación, suelos y cuerpos de agua.

- d. Uso indiscriminado de insumos agrícolas sintéticos (herbicidas, plaguicidas, fertilizantes, etc).

Ante el acúmulo de distintas sustancias en el medio ambiente, es posible que ocurra un incremento de  $3\pm 1.5^{\circ}\text{C}$  de temperatura en el planeta; pero aún un aumento de  $2^{\circ}\text{C}$  resultará exagerado comparado con las fluctuaciones normales, lo que determinará también cambios en la precipitación pluvial, en las características del suelo y por consiguiente afectará la distribución de las especies y la estabilidad de las comunidades biológicas (Hansen *et al.*, 1981; Manabe *et al.*, 1981; Wigley *et al.*, 1980 citados por Peters, 1990), asimismo al aumentar el  $\text{CO}_2$  atmosférico es de esperarse efectos directos en la fisiología fotosintética (Lemon, 1983; Emmanuel *et al.*, 1985; Kellison y Weir, en prensa, citados por Peters, 1990).

Otro grave problema lo generan los avances biotecnológicos, como es la adopción de un número muy limitado de cultivares de alto rendimiento sobre extensas áreas, lo que ha provocado el abandono y pérdida de variedades silvestres (erosión genética) adaptadas a una región y genéticamente más variables, reduciendo las posibilidades de variación y diferenciación específica.

### 3. Desconocimiento de especies hasta ahora no aprovechadas:

Con el surgimiento de la agricultura, el pastoreo y por ende la adquisición de la condición sedentaria, hace 10,000 a 12,000 mil años, el hombre empezó a intervenir en los mecanismos de adaptación de las especies con la domesticación de algunas y dejando de lado muchas otras, incidiendo drásticamente sobre la diversidad biológica al reemplazar los habitats naturales por tierras de cultivo, zonas de pastoreo y de asentamientos humanos.

A medida que las sociedades humanas han crecido tanto en número como en complejidad, las presiones que ejercen sobre su medio ambiente son cada vez

- d. Uso indiscriminado de insumos agrícolas sintéticos (herbicidas, plaguicidas, fertilizantes, etc).

Ante el acúmulo de distintas sustancias en el medio ambiente, es posible que ocurra un incremento de  $3 \pm 1.5^\circ\text{C}$  de temperatura en el planeta; pero aún un aumento de  $2^\circ\text{C}$  resultará exagerado comparado con las fluctuaciones normales, lo que determinará también cambios en la precipitación pluvial, en las características del suelo y por consiguiente afectará la distribución de las especies y la estabilidad de las comunidades biológicas (Hansen *et al.*, 1981; Manabe *et al.*, 1981; Wigley *et al.*, 1980 citados por Peters, 1990), asimismo al aumentar el  $\text{CO}_2$  atmosférico es de esperarse efectos directos en la fisiología fotosintética (Lemon, 1983; Emmanuel *et al.*, 1985; Kellison y Weir, en prensa, citados por Peters, 1990).

Otro grave problema lo generan los avances biotecnológicos, como es la adopción de un número muy limitado de cultivares de alto rendimiento sobre extensas áreas, lo que ha provocado el abandono y pérdida de variedades silvestres (erosión genética) adaptadas a una región y genéticamente más variables, reduciendo las posibilidades de variación y diferenciación específica.

### 3. Desconocimiento de especies hasta ahora no aprovechadas:

Con el surgimiento de la agricultura, el pastoreo y por ende la adquisición de la condición sedentaria, hace 10,000 a 12,000 mil años, el hombre empezó a intervenir en los mecanismos de adaptación de las especies con la domesticación de algunas y dejando de lado muchas otras, incidiendo drásticamente sobre la diversidad biológica al reemplazar los habitats naturales por tierras de cultivo, zonas de pastoreo y de asentamientos humanos.

A medida que las sociedades humanas han crecido tanto en número como en complejidad, las presiones que ejercen sobre su medio ambiente son cada vez

mayores, provocando en la flora y en la fauna cambios tanto cualitativos como cuantitativos.

La disminución de los recursos vegetales no es un proceso aislado, Raven (1976) estima que por cada especie vegetal que se extingue, se puede causar en promedio la extinción de 10-30 especies animales o vegetales dependientes, por lo que la diversidad vegetal controla la existencia y diversidad de otros organismos y la estabilidad del ecosistema global. Unas 15 mil culturas tribales pueden desaparecer con todo su conocimiento sobre la naturaleza (Linden, 1991). Bajo estas premisas, la conservación del mundo vegetal es, en última instancia, un asunto de supervivencia para la raza humana y el resto de la vida animal (Raven, 1976).

La rapidez con que están desapareciendo los habitats naturales y con ellos numerosas especies silvestres que son parientes de las plantas cultivadas que podrían ser fuente de nuevos alimentos, medicamentos y materias primas para industrias, hace imprescindible proteger toda la biodiversidad y realizar un inventario que permita identificar especies de uso inmediato o potencial para el hombre.

De acuerdo a las estimaciones hechas por Myers (1990), el hombre sólo ha utilizado 7 mil especies vegetales en su alimentación, aún cuando existen al menos 75 mil especies comestibles, muchas de ellas con valor nutricional superior. Balick (1991) considera que son unas 40 mil especies las que pueden tener valor medicinal y alimenticio. Según Ehrlich y Ehrlich (1981) sólo se han utilizado 3 mil especies (aprox. 1% de especies vegetales), de éstas, sólo 150 han sido cultivadas a nivel comercial y la base alimenticia principal la constituyen sólo tres granos: arroz, trigo y maíz y casi la mitad de las tierras cultivables están destinadas a éstos.

Uno de esos múltiples beneficios posibles de obtener de especies silvestres, son los metabolitos secundarios, los cuales son un grupo heterogéneo de sustancias (Fowler, 1986), de los que el hombre ha aprendido a beneficiarse.

Para la planta, son mediadores químicos en procesos ecológicos (Marini-Bettolo, 1988, citado por Peña, 1990) que atraen polinizadores, son defensas químicas contra otros organismos, y en general, se presentan como adaptaciones químicas en respuesta a presiones del medio ambiente.

De acuerdo a Constabel (comunicación personal) estas sustancias mejoran el desempeño, crecimiento y reproducción de las plantas. Se encuentran en pequeñas cantidades y comprenden esencialmente cuatro categorías, aceites esenciales, alcaloides, glucósidos y esteroides (algunos consideran a las enzimas como uno de los grupos). Entre estas sustancias se encuentran compuestos tan importantes como los alcaloides antitumorales vincristina y vinblastina que alcanzan un precio de \$5 mil (E.U.) dólares por gramo, o bien los aceites esenciales utilizados en la industria de los cosméticos con precios de más de \$1000 (E.U.) dólares la libra y un mercado de 20 a 30 kgs por año (Peña, 1990).

Otro grupo de sustancias de gran importancia son los insecticidas biológicos, se conocen cerca de 2 mil especies de plantas que producen algunos de estos compuestos, varios son utilizados a nivel comercial como las piretrinas, extraídas de flores de Chrysanthemum cinerariaefolium; la rotenona y los rotenoides extraídos de raíces de leguminosas; de especies de Nicotiana se extraen nicotina y la nornicotina, fácilmente degradables y no resultan tóxicos para otros organismos, a diferencia de los pesticidas sintéticos. En la familia de las labiadas encontramos evidencias que en algunos géneros tales como Mentha y Teucrium los monoterpenoides y diterpenoides, respectivamente, pueden disuadir a los insectos de alimentarse de éstas y otras plantas. Otros monoterpenos tales como la pulegona y la isopulegona resultan ser potentes insecticidas contra Spodoptera litoralis (larva de insecto) (Simmonds y Blaney, 1992) y obran como controladores biológicos.

No obstante los avances en el campo de la síntesis orgánica, las plantas siguen siendo fuente de compuestos químicos. En los EUA el 25% de todas las prescripciones



médicas incluyen al menos un compuesto de origen vegetal (Farnsworth y Morris, 1988, citados por Farnsworth, 1990). Por síntesis química se han obtenido algunos de estos compuestos, pero no la de muchos otros que por su complejidad y bajos rendimientos no resultan rentables (fragancias y saborizantes), y en consecuencia las poblaciones silvestres de plantas que contienen las sustancias de interés son diezmadas. La recomendación es que su aprovechamiento racional deberá lograrse mediante estrategias que no agoten las poblaciones silvestres: Una de las alternativas es el cultivo agronómico de las especies silvestres, como se ha hecho para la obtención de aceites esenciales de la familia Lamiaceae, (Salvia officinalis, S. sclarea, Mentha piperita y M. spicata) (Guenther, 1950).

Si se considera que sólo del 5% al 15% de las plantas superiores han sido investigadas en busca de compuestos biológicos activos (Balandrin et al., 1985; Marderosian y Liberti, 1988; Wagner et al., 1989, citados por Peña, 1990) y si muchas de las plantas investigadas fueron analizadas para un sólo tipo de actividad biológica (Marderosian y Liberti, citados por Peña, 1990), se vislumbra todo el potencial que en materia de principios activos representa el reino vegetal.

### **3 Biodiversidad Vegetal en México**

La diversidad biológica de México está considerada como la 4a. más grande del mundo (Vovides, 1989); estimaciones recientes indican que entre el 8 y 10% de las especies de plantas y animales se encuentran en nuestro país. Se calculan en 30 mil las especies de plantas vasculares (Rzedowski, 1978, citado por Toledo, 1988) de las cuales 20-30% son endémicas. Además de los enormes servicios ecológicos que brindan en los ecosistemas, muchas tienen características que les permitirían ser fuente de alimentos, de nuevos fármacos, o de insumos industriales, no obstante ello, la gran mayoría de las investigaciones, han sido dedicadas a plantas ya domesticadas. Aunado a este desconocimiento y desinterés, múltiples actividades del hombre están

reduciendo drásticamente los habitats naturales en nuestro país, orillando a la extinción a cientos de especies vegetales y animales.

Según el Atlas Nacional del Medio Físico de 1987, sólo 40.8% (80 millones ha) del país aún mantenía en los 70's una vegetación natural sin disturbios y si la tasa anual de pérdida de vegetación de 1.5 millones de hectáreas declarada en cifras oficiales es válida (Toledo, 1988), estas áreas se verían reducidas a sólo 45 millones de hectáreas para el año 2000, es decir que sólo quedará el 22.95% del territorio cubierto por vegetación natural. No es de extrañar que México ocupe el tercer lugar dentro de los veinte países más afectados por la tala (1.47 millones de hectáreas por año) (Aridjis, 1991). Los habitats naturales más afectados son los bosques mesófilos de montaña, los bosques de neblina, los manglares y sobre todo las selvas altas y medianas del trópico húmedo, reducidas ya al 10% de su distribución original (Toledo, 1988).

Este problema se ha agudizado en aquéllas áreas densamente pobladas. La Cuenca de México que ocupa sólo el 0.03% de la superficie del país, constituye el habitat del 22% de su población y consume cerca del 30% de sus recursos energéticos (Ezcurra, 1990). La densidad poblacional más alta se encuentra en el Distrito Federal, entidad que abarca una extensión de 148 mil hectáreas de acuerdo al Atlas de la Ciudad de México (1987), de las cuales teóricamente el 57.4% corresponden a 7 áreas de conservación ecológica (Sosa, 1991). De acuerdo al Atlas de la Ciudad de México (1987), antes de la conquista, la superficie del Valle de México estaba ocupada en un 54% por bosques de coníferas y latifoliadas; 18% por matorrales; 17% por pastizales y 9% por zonas lacustres. Actualmente la Cuenca ha perdido 73% de los bosques y 99% de los lagos y el 7% del suelo se encuentra en proceso de degradación avanzada (Guevara y Moreno, 1987).

Ya desde 1870, Manuel Paynó (citado en el Atlas de la Ciudad de México, 1987) estimó que durante el primer siglo de la colonia (1524-1624) se habían utilizado 80 millones de árboles de la cuenca para trabajos de construcción, minas, producción de

carbón y como combustible. Entre 1959 y 1983 la ciudad de México perdió el 17% de bosques, el 40% de matorrales y el 42% de chinampas. Si este ritmo de destrucción continúa, se calcula que para el año 2000, el área de vegetación por habitante será de tan sólo 1.7 m<sup>2</sup>, la mitad de la dotación actual (3.4 m<sup>2</sup>/habitante), muy inferior a los 16 m<sup>2</sup>/habitante recomendados por la ONU y los 9 m<sup>2</sup> señalados por normas internacionales (Guevara y Moreno, 1987).

La permanencia de estos ecosistemas determina la calidad de vida de sus habitantes, la supervivencia de los mismos y la posibilidad de aprender a aprovechar los recursos potenciales que guardan esas especies hasta ahora ignoradas. S. elegans tiene potencial para ser aprovechada en la industria, pues al igual que otros miembros de la familia Lamiaceae, produce aceites esenciales (metabolitos secundarios) (Figura 1).

Entre las múltiples especies amenazadas en el Valle de México, se encuentran las poblaciones de S. elegans Vahl. (Lamiaceae o Labiatae), lo que representa un gran riesgo, ya que la pérdida de poblaciones genéticamente diversas es por lo menos en este momento, tan importante como la pérdida de una especie. Una vez que el número de individuos de una especie es reducido a un remanente, es factible su total extinción en un futuro cercano. Para cuando un tipo de organismo se reconoce como amenazado, frecuentemente es muy tarde para salvarlo (Ehrlich, 1990).

#### 4 Familia Lamiaceae

Las labiadas forman una familia extensa (cerca de 4,000 especies) (Hedge, 1992) y ampliamente distribuida en el mundo. Por siglos han sido consideradas como un grupo de gran importancia comercial. Constituyen la materia prima de muy diversas industrias, que van desde las que manejan especies aromáticas como condimentos (Origanum spp., Thymus spp., Mentha spicata, Majorana spp.), hasta las que extraen y utilizan aceites esenciales de muy diversas especies (Mentha piperita L., M. spicata Huds., Lavandula hybrida, Pogostemon cablin Benth., Salvia sclarea L., S. officinalis L.)

para la elaboración de perfumes, cosméticos, aditivos para dentífricos, jabones, detergentes, desodorizantes, etc. El conocimiento actual de los diversos compuestos en esta familia (monoterpenos, diterpenos, etc.), revela que puede considerarse que los aceites de algunos géneros tienen efectos de antibióticos de amplio espectro (El-Gazzar y Watson, 1969b), también representan un potencial en la industria de los insecticidas. La gran mayoría de estas especies son cultivadas en grandes extensiones de tierra, principalmente en Norteamérica, el sur de Europa, el sudeste de Asia y en menor escala en Argentina y Brasil, pero también se explotan las poblaciones silvestres.

El-Gazzar y Watson (1969b) distinguen dos grandes series de géneros de labiadas tanto taxonómicamente como por la cantidad y calidad de los aceites esenciales:

Grupo A.- Pobre en aceites esenciales pero resistentes al hongo Puccinia menthae.

Grupo B.- Comprende aquéllos ricos en aceites esenciales, pero susceptibles al ataque del hongo P. menthae. El género Salvia pertenece a este grupo.

Los principales metabolitos secundarios aislados de labiadas son: flavonoides, glicósidos iridoides, esteroides, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, y triterpenos (Esquivel, 1986; Hegnauer, 1989, citados por Richardson, 1992) (Figura 1). Todos estos compuestos se encuentran presentes en el género Salvia.

Una revisión somera sobre los estudios fitoquímicos de labiadas realizados en el período 1981-1994 (Tabla 1) nos muestra la importancia de esta familia como fuente de una extensa gama de compuestos con un gran potencial, tanto en la farmacopea, como en muy diversas industrias (insecticidas, agrícola, perfumería, detergentes, alimentos, etc.). Así tenemos, que de varias especies del género Rhabdosia se han aislado compuestos que son utilizados como agentes anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios, antipiréticos, en padecimientos intestinales, etc.

TIPO DE METABOLITO SECUNDARIO	GENERO
Flavonoides	Salvia Agastache Galeopsis
Iridoides	Aguja Galeopsis Lagochilus Lamium Leonurus Melitis Phlomis Physostegia Salvia Satureja Scutellaria Stachys Teucrium
Esteroles	Salvia
Monoterpenos	Salvia Sideritis Mentha Melissa
Sesquiterpenos	Salvia Meriandria
Diterpenos	Galeopsis Salvia Lepechinia Sideritis Ajuga Stachys Rhabdosia Teucrium
Sesteterpenos	Salvia
Triterpenos	Salvia Lepechinia Hyptis

Fig 1. Principales Metabolitos Secundarios Aislados de Labiadas (Esquivel, 1983; Simmonds y Blaney, 1992)

Tabla 1. Metabolitos Secundarios en Labiadas y sus Usos

Especie	Metabolitos Secundarios	Usos	Referencia
1. <i>Cunila lythriifolia</i>	Triterpenoides	Alteraciones gastrointestinales	Delgado et al., 1989
2. <i>Hoslundia opposita</i>	4 esteres tipo abietano	Inhiben crecimiento <i>Plasmodium falciparum</i>	Achenbach et al., 1993
3. <i>Hyptis capitata</i>	Diterpenos y Triterpenos Acido hiptálico	Citotóxico colon humano	Yamagishi et al., 1988
4. <i>Hyptis suaveolens</i>	B sosterol Ac. oleanólico	Antimicostático contra <i>Helminthosporium</i>	Misra et al., 1981
5. <i>Melissa officinalis</i>	Ac. rosmarinico	Anti-inflamatorio	Peake et al., 1991
6. <i>Ocimum sanctum</i>	Acido oleanólico	Protege contra peroxidación por adriamicina	Balanehru y Nagarajan, 1992
7. <i>Ocimum suave</i>	Eugenol Terpenos	Repelente mosquitos y antimicrobiano	Chogo y Crank, 1981
8. <i>Origanum spp.</i>	Aceites esenciales	Antiséptico Bactericida	Scorticini y Rosi, 1989
9. <i>Rabdosia umbrosa</i>	Diterpenos	Antibacteriano Antitumoral	Takeda et al., 1989
10. <i>Salvia apiana</i>	Benzyl Trans-4 coumarate y Ac. 16 hidrox. y hydroxicarnosico	Antibacteriano Antimicostático Antimicostático	Dentali y Hoffman, 1992
11. <i>Salvia ballotaeflora</i>	Conacytona icetexona	Problemas gástricos	Rodríguez-Hahn et al., 1989
12. <i>Salvia divinorum</i>	Salvinorin	Considerado halucinógeno	Rodríguez-Hahn et al., 1994
13. <i>Salvia fulgens</i> <i>Salvia microphylla</i>	Diterpenos	Padecimientos estomacales (Mirto)	Rodríguez-Hahn et al., 1992
14. <i>Salvia lasiantha</i>	Diterpenos	Antimicostático	Sánchez et al., 1987
15. <i>Salvia miltiorrhiza</i>	16-tetrahidrolanshi-quinona I y III	Inhibe in vitro células leucémicas	Li et al., 1991
16. <i>Salvia miltiorrhiza</i>	Ac. Salvínico Ac. Rosmarínico	Inhibe peroxidación lipida de Fe-2+ - cupteina y NADPH, Vit C (in vitro)	Huang y Zhang, 1992
17. <i>Salvia officinalis</i>	Diterpenos	Antivirales	Masahiro et al., 1993
18. <i>Salvia palaefolia</i>	Squalone Lupeol	Antihipertensivo	González et al., 1989
19. <i>Salvia phlomoides</i>	Taxodiona Taxodona	Citotóxico	Rodríguez y Savona, 1989
20. <i>Salvia prionitis</i>	Sapriolactona norditerpenos	Antibacteriano, antifuberculoso, antiflogístico	Lin et al., 1989
21. <i>Salvia przewalskii</i>	Diterpenos	Sustituto de Tan-shen	Li et al., 1991
22. <i>Salvia texana</i>	Taxodione	Contra Gram-positivos	González et al., 1989
23. <i>Salvia texana</i>	Diterpenoides raiz	Contra carcinoma en ratas y carcinoma nasofaríngeo en humano	González et al., 1987
24. <i>Teucrium pernyi</i>	Diterpenos	Tóxico para insectos	Ning et al., 1990

De Coleus forskohlii, se ha obtenido una droga que ha sido utilizada experimentalmente en casos de glaucoma, en cardiopatologías congestivas y asma, entre otros padecimientos (Raj et al., 1989).

De Salvia milthiorrhiza conocida en China como Dan-Shen se utiliza la raíz en anomalías hematológicas, enfermedades del corazón, hepatitis, hemorragias, alteraciones en la menstruación, abortos, edemas, etc. (Yasuma et al., 1989).

##### 5 Salvia elegans Vahl.

Pertenece a la familia Labiatae (Lamiaceae) cuya única monografía completa es la de Bentham (1832-36), la que posteriormente se modificó en el Prodrumus De Candolle (Hedge, 1992) y el Genera Plantarum (1876). Las clasificaciones subsecuentes en floras y textos, son repeticiones o modificaciones menores (e. g. Komarov, 1954; Clapham, Tutin y Warburg, 1962; Gleason y Cronquist, 1963; Melchior, 1964) del tratamiento de Briquet (1897) resumido por Airy Shaw (1966), y no hacen ninguna contribución apreciable para un mejor entendimiento en el arreglo del género (El-Gazzar y Watson, 1969a).

##### **Clasificación Botánica (Cronquist, 1975; Cantino, Harley y Wagstaff, 1992)**

Reino: Plantae  
Subreino: Embryophyta  
División: Magnoliophyta  
Subdivisión: Magnoliopsida  
Clase: Magnoliatae  
Subclase: Asteridae  
Orden: Lamiales  
Familia: Lamiaceae (Labiatae)  
Subfamilia: Nepetoideae (Lamioideae)  
Tribu: Mentheae  
Género: Salvia  
Subgénero: Catospace  
Especie: Salvia elegans

## 6 Descripción

Planta herbácea perenne semiarbustiva, presenta tallos y ramas cuadrangulares; el tallo exfoliante densamente glanduloso-pubescente, en particular en las partes más jóvenes. Hojas opuestas, láminas foliares ovadas, de 0.8 a 5.5 cm de largo, de 0.6 a 3.5 cm de ancho, agudas en el ápice, cuneadas a truncadas en la base, pubescentes en ambas caras, pálidas y con numerosas glándulas en el envés y el haz, de un verde intenso en la etapa vegetativa tornándose verde grisáceo con puntos rojizos oscuros durante la etapa de floración y fructificación; peciolo de 0.3 a 2 cm de largo, por lo común glandulosos-pubescentes; inflorescencias terminales, de 15 a 25 cm de largo, compuestas verticiladas, pedicelos de 1 a 2.5 mm de largo, flores bisexuales zigomórficas, cáliz hirsuto persistente de 4 a 8 mm de largo, de 1.5 a 3 mm de ancho, glanduloso-pubescente sobre las costillas, glanduloso entre las mismas; corola típica simpétala bilabiada de 5 lóbulos de 2.2 a 3 cm (tubo de 1.5 a 2.1 cm) de largo, de ca 4 mm de ancho, el tubo ensanchado hacia la boca, pubescente en su mitad superior labio superior de 8 a 9 mm de largo el inferior de 6 a 8 mm de largo, de 5 a 6 mm de ancho, los bordes laterales de los lóbulos por lo común enrollados; estambres 2 ligeramente exsertos, anteras de ca 1.2 mm de largo, conectivos de ca 6 mm de largo; estilo de ca 2.3 mm de largo pubescente, 1 pistilo, ovario súpero, 2 carpelos, 2 lóbulos, placentación basal, óvulos anátropos, el micrópilo hacia abajo; semillas de color crema a café oscuro de ca 2mm, con endospermo escaso y carnoso que generalmente es absorbido por el embrión; aparecen las inflorescencias a principios de octubre y fructifica de noviembre a principios de mayo.

## 7 Distribución Geográfica y Abundancia

El género Salvia es el más abundante de la familia, hasta ahora han sido descritas alrededor de 900 especies, distribuidas en zonas tropicales y subtropicales.



En México se encuentran alrededor de 300 especies del género Salvia con un gran número de endemismos, más del 88% (Ramamoorthy, 1984).

S. elegans es endémica de México. De acuerdo a los registros del Herbario Nacional del Instituto de Biología (MEXU), UNAM, esta especie ha sido colectada en 21 estados y el Distrito Federal (Tabla 2).

Se le encuentra generalmente desde los 900 a los 3,000 m.s.n.m. en bosques de pino, de pino y encino, de pino y oyamel, raras veces en bosques de Abies, lugares abiertos de encinares, cañadas y selva tropical. Las poblaciones pueden encontrarse entremezcladas con diversos géneros y especies tales como Clethra, Lopezia, Calceolaria, Valeriana, Lycopodium, Selaginella, Carpinus, Laurus, Prunus y Ximenia, Salvia purpurea, S. polystachia, S. fulgens.

Sus poblaciones aunque frecuentes en muchos de estos habitats, son escasas en individuos (baja densidad). Numerosas poblaciones parecen formar parte de áreas altamente perturbadas. Esta especie y otras herbáceas y arbustivas, tienen una participación cuantitativa significativa en la vegetación natural, sobre todo en las zonas de clima templado.

Los bosques de Pinus y Quercus, tan característicos de las montañas de México, cubrían antes de la fuerte intervención del hombre más del doble del área que hoy ocupan y su superficie va en disminución constante ante el avance de la agricultura, los desmontes con fines ganaderos, la construcción de carreteras, los asentamientos humanos, los incendios y las plagas.

En los últimos 40 años la destrucción ha alcanzado una intensidad y rapidez inusitadas.

## **8 Disminución de las Poblaciones**

El habitat predominante de S. elegans son los bosques de pino y encino, los cuales ocupan una superficie de 10 millones 937,964 hectáreas (5.56% de la superficie

total del país, equivalente a 1 millón 967,183 km<sup>2</sup>) (Inventario Nacional Forestal de México, 1994). Si como estima la FAO y el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), se han deforestado anualmente un mínimo de 500 mil hectáreas (1981-1985) (citado por Toledo, 1988), un gran número de poblaciones de S. elegans serán destruidas.

En varios estados como Sonora, Hidalgo, Estado de México y el Distrito Federal, numerosas poblaciones están reportadas como escasas desde hace varios años (datos obtenidos de las colecciones del herbario MEXU) (Tabla 2).

Las poblaciones de S. elegans, monitoreadas durante el desarrollo de la presente tesis (1989-1992) se localizan en las siguientes Reservas Naturales: 1) "Parque Nacional Cumbres del Ajusco" (Distrito Federal), 2) En los remanentes de bosques de pino y encino situados entre los kilómetros 54 y 55 de la autopista México-Cuernavaca (Morelos) y 3) "Parque Nacional Desierto de los Leones" (D.F.). En la primera localidad, las poblaciones han sido continuamente taladas y el número de individuos se redujo, se estima en más de un 60%. Las poblaciones de la segunda localidad se han visto severamente disminuidas por la ampliación de la autopista; mientras que en la tercera localidad que es un área altamente perturbada, los individuos presentan en su follaje manchas café rojizas posiblemente debido a un parasitismo y a la contaminación.

Uno de los factores que actualmente está afectando a estas poblaciones son los efectos fitotóxicos del dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) (emisiones de las industrias de energía carboeléctrica), lo cual ocurre cuando el CO<sub>2</sub> penetra a través de los estomas y es oxidado a sulfito (Hernández y Bauer, 1989), lo que probablemente esté provocando la pigmentación foliar antes mencionada.

Tabla 2. Distribución y Abundancia de *Salvia olegans* (Lamiaceae)\*

1/2

ESTADO	LOCALIDAD	ALTITUD (msnm)	TALLA (m)	HABITAT Y VEG. ASOC.	FECHA DE COLECTA	COLECTOR	POBLACION
Colima	Nevado de Colima		2.0		1956 1949	C. Epling	Abundante
Chihuahua	S.W.				1885	E. Palmer	
Distrito Federal	2º Dinamo	2600-2800		Cañada húmeda	1952	C. Rzedowski	
	San Rafael	2900			1952		
	Desierto Leones	2900			1950	Matuda	
	Dinamos	3150			1953	F. Ramos	
	Santa Rosa	2800		Bosque pino oyamel	1953 1950	C. Rzedowski	Escasa
	Xitle	3000		Pino		M. Pantli	Escasa
	Milpa Alta	2900			1952	Dudler Gold	Escasa
	Tepellahuato	3000	1.2		1978	C. Rzedowski	Escasa
	Sta. Ana M.A.	2700	1.8		1976	C. Rzedowski	Escasa
	Sta. Cecilia					C. Rzedowski	Escasa
	Contreras				1950		
	Salazar				1953		
	Desierto Leones				1936	Hnos. Lyonnet	
Desierto Leones				1950	Matuda		
Santa Rosa				1940	Miranda		
Durango	S.M. Occidental	8600 ft			1962		
Guanajuato		2800	0.9		1986		
Guerrero	Chichihualco	2600	1.0	Pino, Encino, <u>Abies</u> y <u>Chiranthodendron</u>	1983	Esc. Nat. C. Biológicas IPN	No reportó
Hidalgo	México Jacala	2100	2100	Pino juníferos	1966	L. Scheinvar	
	Cerca Pachuca	9400 ft	4 ft	Encino	1944	Carl Epling	
	Cd. Hidalgo	2850-3000	1.5		1949	Carl Epling	Abundante
	Mpio. Tepeapulco	3100		Ladera	1975	C. Rzedowski	Escasa
	Camino al Chico			Encinos	1951 1952	Matuda	
	8 km albergue carr.	2590	1.0	Rocas	1978	C. Rzedowski	
	Agua Blanca	5900 ft			1945	Carl Epling	
Sn. Ignacio					J. Gonzalez		
Jalisco	Nevado de Colima	2250	1.0	<u>Abies</u> , <u>Alnus</u> <u>Abies religiosa</u> <u>Quercus</u> , <u>Pinus</u> <u>Clethra</u> , <u>Piper</u>	1965 1983	C. Rzedowski	
	Jalisco				1983		
	Jalisco				1949 1956 1970	Carl Epling	
México	Cerca Valle Bravo	1300			1952 1953		
	Amanalco Texcoco				1982	C. Rzedowski	Escasa
	Amecameca	3200		Pino encino	1953	C. Rzedowski	Regular
	Chalco	2750	1.4	Pino	1977	C. Rzedowski	Escasa
	Ixtapaluca	3240	1.5	<u>Pinus</u> , <u>Abies</u> , <u>Salinus</u>			Abundante
	Acayucan	2850		Pino, Encino, Abeto	1978	C. Rzedowski	
	Cuautitlán		1.2	<u>Abies</u> , <u>Carpinus</u> <u>Laurus</u> , <u>Prunus</u>	1985		Abundante
	Temascaltepec				1911	Inst. Med. Nat.	Escasa
	Popocatepetl				1986		
	Cuautitlán				1974		
Otumba							
Acayucan	2850		Bosque	1975	C. Rzedowski	Escasa	
						C. Rzedowski	

Tabla 2. (Continuación)

2/2

ESTADO	LOCALIDAD	ALTITUD (msnm)	TALLA (m)	HABITAT Y VEG. ASOC.	FECHA DE COLECTA	COLECTOR	POBLACION	
Michoacán	Mirto del Norte	2800	0.7-1.0	<i>Pinus pseudostrobus</i>	1984	D. Ramamoorthy	Frecuente Veg. Alt.	
	Anganguo	3010	2	<i>Abies</i>	1983			
	San Juan Morelia	2300	0.8-1	Pino Encino	1909	Guinceo Arcens	Frecuente	
	Lago Zirahuén Patzcuaro	2100	0.6-0.8 0.5	Bosque mesófilo	1981		Abundante	
	Lago Zirahuén Municipio Cheran Cerca Patzcuaro	2100 2200	1.3 1	Bosque mesófilo	1981	C. Rzedowski C.G. Pringle	Abundante	
	Morelos	Entre Tres Marías y Zempoala Cuernavaca Zempoala Tepozteco Carretera Vieja	2570 1500-1750	2.0	<i>Pinus quercus</i> <i>Pinus arbutus</i>	1982 1972 1941	J. Vázquez	No reportó
Oaxaca		Sierra de Juárez	2400			1984	Herb. CIIDIR	Abundante
		Sierra Las Huertas	1700	0.7 3.0	<i>Lopezia, Calceolaria,</i> <i>Lycopodium, Selaginella, S. purpurea,</i> <i>S. polystachia</i>	1984		
	Sierra de Juárez	2800 2800	0.8 0.8	Roble encino Roble encino				
Puebla	Teziutlan entre Tlax y Puebla Sierra Negra	2800 2835	1.0 0.8 1.2-1.5	Encinares Encino cañada <i>Abies</i> y <i>Pinus</i>	1944 1980 1983 1979 1944 1984 1907 1906 1909 1914	Miranda C. Rzedowski Carl Epling G. Arsene Hno. G. Nicolas	Escasa No reportó	
	Puebla Manzanilla					Wolfgang Boege		
	Puebla			<i>Polygonum, Mahonia</i> <i>Garrya, S. cardinalis</i>				
	Querétaro	Amealco	8000 ft	0.5	Pino Encino	1970	Gary Brockon	Frecuente
			2700	0.4-0.6	Encino, Madroño, <i>Crataegus, Buddleia</i>	1977	E. Argüelles	Veg. Alt.
Sinaloa	Mpio. Badiraguato	2000	0.2-0.8 0.7-0.8	Pino Encino		U.A.S.	No reportó	
Sonora	Río Mayo			Cañón húmedo	1935		Escasa	
Tlaxcala	entre Tlax y Puebla	2835	1.0	<i>Abies, Pinus</i>	1979	U.A.M.		
	Nanacamilpa	2500	0.6		1985			
Veracruz	Cosautlán	940-1060		Ecolono Encinar	1979	F. Ramos M.	Escasa	
	Mpio. Las Vigas	2200		Selva Med. Encino	1977			
	El Bordo R. Ramírez			Pino Encino	1975			
	La Yoya				1945			
	Córdoba				1984			
	Orizaba			Pino	1970			
Mpio. Jalacingo	2050	1.2	Encino	1979	Abundante Escasa			

\* Herbario Nacional (MEXU) del Instituto de Biología, U.N.A.M.

## 9 Usos del Género

El género Salvia incluye numerosas especies cuyos compuestos son utilizados experimentalmente como hipotensores, antibacterianos (Gram+), antiflogísticos en anomalías hematológicas, padecimientos estomacales e intestinales, como citotóxicos, micostáticos, antisépticos, diuréticos, cicatrizantes, para tratar enfermedades del corazón, hepatitis, hemorragias, abortos, como relajantes, etc.

Varias especies de salvias mexicanas son utilizadas en medicina tradicional, como es el caso de S. elegans, S. microphylla, S. fulgens, S. ballotaeflora, S. texana, S. divinorum, etc. (Tabla 1).

El Instituto de Química de la UNAM con la colaboración del IBUNAM han llevado al cabo el análisis fitoquímico de alrededor de 35 especies de Salvia, encontrándose constituyentes tales como flavonoides, esteroides y terpenos, etc. (Figura 1), estableciendo entre otras, relaciones quimiotaxonómicas y fitogeográficas con Salvia spp. de Europa y Asia.

Para llevar al cabo este tipo de investigaciones, es necesario contar con suficiente material vegetal, muy frecuentemente se utiliza todo el individuo e inclusive, se colecta toda la población cuando está constituida por sólo unos cuantos ejemplares, propiciando la erosión genética de la especie, por lo que el cultivo de tejidos vegetales puede representar la fuente del recurso en cuestión, no sólo para la investigación, sino también para su aprovechamiento sostenido, y la restauración de habitats en donde estos individuos (genotipos) desempeñan un papel ecológico importante, para tratar así de evitar una mayor alteración de las poblaciones silvestres.

## 10 Alternativas para la Conservación de la Biodiversidad

De acuerdo al World Conservation Strategy (1989) la conservación es definida como la administración de la biósfera para el aprovechamiento humano, de tal manera que rinda los mayores beneficios sostenidos para las presentes generaciones y que

mantenga sus potencialidades para enfrentar las necesidades de las generaciones futuras (McNeely et al., 1990).

Los métodos para la conservación de los sistemas vivos, pueden dividirse en dos categorías:

1. Conservación in situ. - áreas naturales protegidas.

2. Conservación ex situ. -

- a) Bancos de semillas.
- b) Bancos genéticos en el campo.
- c) Cultivos de tejidos vegetales.

a) Conservación in situ

Se refiere a la conservación del habitat natural, que debería permanecer sin ser alterado por acciones del hombre y permitiría:

- a) Conservar como recursos genéticos, muestras representativas de los ecosistemas del mundo.
- b) Ofrecería sitios para investigación científica.

En general se acepta que la conservación del habitat sería la forma más recomendable de conservación de la biodiversidad, pero en la práctica implica grandes riesgos de que no se respete y se pierda la vida silvestre, por contiínuas agresiones del hombre. Este método presenta múltiples ventajas, una de las cuales es que las especies pueden seguir sus procesos evolutivos, lo que no ocurre con los otros métodos de conservación (Hoyt, 1992); sin embargo, en la elección de la mayoría de las áreas protegidas no se han seguido criterios biogeográficos sino económicos (Toledo, 1988) y se ha demostrado que aún las especies en estas áreas, pueden perderse debido a que la fragmentación de estos espacios no permite mantener

poblaciones viables de todas las especies (Frankel y Soulé, 1981; Schonewald-Cox et al., 1983; Soule y Wilcox, 1980; Wilcox, 1980, citados por Peters, 1990).

Actualmente, a nivel mundial, las áreas protegidas son más de 6,900, con una superficie total de 6.5 millones km<sup>2</sup> (4.4%) de la superficie de la tierra. McNeely et al., (1990), señalaron que en 1989 existían unas 4 mil quinientas reservas de más de 1 mil ha cada una (IUCN), que cubrían casi 500 millones de hectáreas.

En México existen 73 áreas naturales protegidas que ocupan aproximadamente una extensión de 6.2 millones ha equivalentes al 3.07% de la superficie territorial de México (Lesser, 1994).

#### b) Conservación ex situ

Todo método ex situ, presenta limitaciones, sobre todo en el manejo de especies amenazadas y no es económicamente factible el mantenimiento de muestras grandes de la diversidad genética de una especie, lo que determina su pérdida a largo o mediano plazo, además, limita el proceso evolutivo. Las poblaciones ex situ tienen una base genética muy reducida, y es poco probable que la población colectada sea representativa de un amplio rango de genotipos.

No obstante estas limitaciones, la velocidad a la cual están desapareciendo numerosas especies y con ellas los servicios ecológicos que éstas desempeñan, obliga a utilizar todos los medios disponibles para intentar salvar a aquellas especies que de otra manera se perderían.

La conservación ex situ ha sido dirigida predominantemente a especies cultivadas, en estas actividades han participado la FAO y múltiples centros de investigación agrícola, que juntos manejan unas 500 especies de plantas cultivadas (0.2% del total de especies vegetales, incluyendo parientes silvestres de plantas cultivadas).

a Bancos de semillas.- Son colecciones almacenadas bajo condiciones especiales que aseguran su supervivencia a largo plazo.

Las semillas son las estructuras de la planta más adecuadas para ser almacenadas, tanto por su tamaño, como por ser los órganos naturales de almacenamiento de germoplasma. Existen aproximadamente 50 bancos de semillas en todo el mundo, más de la mitad se encuentran en los países en desarrollo.

Las ventajas que presenta este método son: una muestra incluye una amplia variabilidad genética, es "fácil" su almacenamiento, hay economía de espacio, demanda laboral reducida y bajos costos.

Entre las desventajas: se detiene el proceso evolutivo, se depende de abasto de energía, se requiere de monitoreo constante de la viabilidad de las semillas, existencia de semillas recalcitrantes (se calcula que más del 15% de la flora mundial, 37 mil quinientas especies poseen este tipo de semillas) (BGCS, 1989).

No obstante que este método representa grandes ventajas, (Peeters y Williams, 1984, citados por Ashton, 1990), estiman que de los 2 millones de adquisiciones de germoplasma vegetal almacenado en estos bancos, el 65% carece de los datos básicos sobre su origen, del 80% se desconoce su potencial, incluyendo métodos de propagación y el 95% de datos de evaluación sobre aspectos tales como su resistencia a patógenos o factores fisicoquímicos del ambiente, etc. Se calcula que sólo del 1% se tienen datos más completos.

Se considera que sólo 2% de los parientes silvestres de las especies cultivadas se encuentran representados, no obstante que son el recurso de los fitomejoradores y han desempeñado un papel determinante en el desarrollo de la agricultura.

b. Bancos Genéticos en el Campo.- son colecciones de plantas vivas de especies que no producen semillas fácilmente o que presentan semillas recalcitrantes, se mantienen en jardines botánicos, arboretos y otras plantaciones (Hoyt, 1992).



La mayor parte del germoplasma ex situ de plantas silvestres se encuentra distribuido en 1,300 jardines botánicos los que conservan unas 20,000 especies (8% del total de especies).

c. Cultivo de Tejidos Vegetales.- Es otra alternativa que permite el crecimiento de células, tejidos en condiciones asépticas durante tiempo indefinido y hace posible la regeneración de plantas completas (Staba, 1980). Entre los distintos procedimientos para almacenar células y tejidos vegetales, se encuentran:

1. El subcultivo periódico de los tejidos in vitro.
2. La aplicación de agentes osmóticos para reducir el crecimiento de los cultivos.
3. Refrigeración.
4. Congelación en nitrógeno líquido (-196°C) (Kartha, 1985; López, 1995; Mata, 1995).

### **c) Cultivo de Tejidos Vegetales**

Es una rama de la biología, que basada en la totipotencialidad de la célula vegetal ha establecido un conjunto de técnicas que hacen posible dividir a un organismo en sus bloques constituyentes y cultivar asépticamente in vitro protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones, plantas, e inducir y estudiar respuestas morfogénicas y biosintéticas de estos constituyentes, bajo condiciones controladas (nutrientes, pH, luz, temperatura, gases, estado físico del sustrato, etc.), lo que permite al investigador variar las condiciones de cultivo y/o el tipo de explante, a fin de lograr una gran variedad de objetivos tanto en investigación básica (fisiología, bioquímica, patología, genética, citología, etc.), como en la aplicada, ya que constituye una valiosa herramienta en el área biotecnológica, por ejemplo: ingeniería genética, inducción y aislamiento de mutantes, selección de nuevas variedades, detección de especies resistentes a distintos factores y obtención de metabolitos secundarios (Chávez, 1993).

Los fundamentos de estas metodologías se encuentran en la teoría celular expresada por Schleiden y Schwann en 1838-1839, la cual postula que las células son autónomas y totipotentes, es decir que cada célula vegetal tiene el potencial de regeneración para formar plantas completas (Staba, 1980; Gautheret, 1982). Los primeros intentos los realizó Haberlandt en 1902. A principios de los años 20's se lograron los primeros éxitos, cuando Robbins cultivó ápices de raíces de jitomate y logró su proliferación; después, White (1939) mantuvo por tiempo indefinido callo de zanahoria. La Rue en 1948 (citado por Attree y Fowke, 1993), fue el primero en obtener embriones somáticos (adventicios). Morel, a principios de los años 60's cultivó meristemas para erradicar el virus del mosaico de Cymbidium y descubrió que era posible generar millones de plantas (estimó 4 millones) en corto tiempo a partir de un sólo explante, lo que superaba por mucho a los métodos convencionales (Morel, 1974). Murashige, es la figura más representativa en el establecimiento de las técnicas de micropropagación, pues entre otros méritos, identificó tres estados en el desarrollo de esta técnica (Murashige, 1974, citado por George y Sherrington, 1984):

- I. Establecimiento del explante, asépticamente in vitro.
- II. Multiplicación del propágulo.
- III. Enraizamiento y endurecimiento para su transferencia a suelo.

Entre los principales beneficios de esta técnica se encuentran :

1. La micropropagación como en: jitomate, papa, fresa, clavel, rosa, helechos, orquídeas, palmas, pinos, etc., (George y Sherrington, 1984; Beversdorf, 1990; Kozai et al., 1995.)

2. Obtención de plantas libres de patógenos (hongos y bacterias) en Dianthus, Gladiolus, Dieffenbachia, Pelargonium, (Walkey, 1978); hongos en Citrus spp., (Deng et al., 1995); virus en Nicotiana, Geranium, Brassica, (Walkey, 1978).
3. Almacenamiento de germoplasma en chícharo, fresa, yuca, etc., (Kartha, 1985); espárrago, coliflor, (Grout, 1990); Pinus, Pseudotsuga, (Gupta et al., 1993).
4. Aplicación de nuevos métodos de mejoramiento genético: haploides en arroz, (Alejar et al., 1995); en chile, (Nervo et al., 1995); introducción de DNA por electroporación, bombardeo de microproyectiles y uso de protoplastos: maíz, arroz, avena, trigo, caña de azúcar, sorgo, etc. (Vasil, 1995).
5. Obtención in vitro de productos naturales (metabolitos secundarios) iguales o diferentes a los producidos por la planta, como: shikonina, pigmento rojo a partir de Lithospermum erythrorhizon; vainillina a partir de callos de Vanilla planifolia, sanguinarina utilizado en pastas dentales y enjuagues bucales a partir de Papaver somniferum, (Smith, 1995).

La regeneración de plantas es el paso clave en la aplicación de la metodología del cultivo de tejidos, la piedra angular de todas estas técnicas la constituye la regeneración, pues sin ésta las otras metodologías de cultivos de tejidos se tornan impotentes (Tisserat, 1985; Rao, 1987).

De acuerdo a Robert y Loyola (1985), las principales ventajas de la micropropagación in vitro son las siguientes:

1. La propagación in vitro es una alternativa para aquéllas especies que no pueden propagarse masivamente por métodos convencionales.
2. Es altamente eficiente para especies de crecimiento relativamente lento (cactáceas, orquídeas, gimnospermas, etc.), y plantas que aunque se propaguen asexualmente, su número se incrementa considerablemente cuando se manejan in vitro.
3. El material reproducido vegetativamente in vitro puede ser almacenado por largo tiempo.
4. Las plantas obtenidas del cultivo in vitro son de alta calidad fitosanitaria.
5. La utilización sistemática de esta técnica para fines comerciales garantiza una mayor uniformidad genética.
6. Asegura el abasto de plantas durante todo el año.
7. Factibilidad de la propagación.

**d) Vías de Regeneración in vitro.**

Se considera que existen 3 métodos de propagación in vitro (Hu y Wang, 1983):

1. Desarrollo de brotes a partir de yemas axilares.
2. Organogénesis (morfogénesis directa o indirecta) de primordios de órganos. Comúnmente define la formación de brotes y el subsecuente enraizamiento. El brote inicial es una estructura unipolar y su tejido vascular está físicamente unido al tejido de origen.
3. Embriogénesis somática (morfogénesis directa o indirecta) es el desarrollo de embriones adventicios a partir de células gaméticas o somáticas que forman estructuras bipolares (brote y raíz) semejantes a los embriones cigóticos, cuyos haces vasculares no están ligados a los del tejido original.

La morfogénesis directa o indirecta se refieren respectivamente, al desarrollo de estructuras organizadas directamente del explante o bien con mediación de callo.

Entre los principales factores para lograr una respuesta morfogénica se encuentran el tipo y el estado de desarrollo de los explantes y la interacción del explante con el medio de cultivo (Litz y Jaiswal, 1991).

#### Desarrollo de Brotes a Partir de Yemas Axilares.

Siempre que sea posible y los objetivos así lo justifiquen es preferible este método, entre otras razones porque:

- a. Sólo es necesario estimular el crecimiento de las yemas axilares. Como la formación de callo es poco probable disminuye el riesgo de alteraciones genéticas.
- b. En yemas axilares previamente se ha diferenciado el tallo incipiente y sólo es necesario su crecimiento y la diferenciación radicular, mientras que en la embriogénesis y la organogénesis pueden no ocurrir.
- c. Si bien la tasa de multiplicación a partir del cultivo de yemas es relativamente lenta inicialmente, aumenta durante los primeros subcultivos y eventualmente se estabiliza (Kehr y Schaeffer, 1976; Yie y Liaw, 1977, citados por Hu y Wang, 1983).
- d. Una vez establecido un cultivo con brotación múltiple, funciona como fuente de propágulos.

Un número considerable de especies ha sido regenerado por este método (Tabla 3), en su mayoría herbáceas, ya que presentan generalmente una dominancia apical débil y una regeneración radicular vigorosa. Esta frecuencia en la respuesta comúnmente no se alcanza en especies leñosas, debido a: escasez de explantes morfogénicos, gran cantidad de polifenoles, es difícil romper la quiescencia de las yemas axilares, e inducir

Tabla 3. Especies de Diversas Familias Regeneradas in vitro.

1/2

Especie	Explante	Medio de Cultivo	Reguladores del Crecimiento	Respuesta Morfo-genética	Referencia
<i>Avena sativa</i> <i>A. nuda</i> <i>A. bizantina</i>	Callo	MS Sacarosa (50 mg/l) Tiamina HCl (150 mg/l) asparagina (200 mg/l) myo-inositol (1.15 g/l) proline (8 g/l)	Picloram (0.5 mg/l) 4 amino-3,5,6 thioclro picolinic acid + K (5mg/l)	Regeneración	Gana et al., 1995
<i>Chlorophytum borvillianum</i>	Tallos jóvenes	MS	BA (22 µM) + K (µM)	Micro- propagación	Purohit et al., 1994
<i>Cornus florida</i> (árbol)	Apices y segmentos nodales	Macronutrientes WPM (Lloyd y Mc Cown 1980) Nit (Nitsch y Nitsch 1969)	BA (> 3.3 µM)	Proliferación de brotes	Declerk et al., 1994
<i>Cucumis sativa</i>	Cotiledones	MS + Sacarosa (40 g/l) + Tryptone L 4 2 + Oxoid (500 mg/l)	K (50 µM) + IAA (0.1 µM)	Regeneración	Hooymans et al., 1994
<i>Dianthus cariophyllus</i>	Tallos, Hojas y Pétalos	MS	BA (5 - 10 µM) + ANA Chloro-4 pyridil- N phenylurea y N -1,2,3 -Thidiazol- 5 - YL - N' - pheny- lurea K (5 - 10 µM)	Regeneración	Nakano et al., 1994
<i>Dioscorea opposita</i>	Hojas Inmaduras	MS	BA (8.9 µM)	Micro- propagación	Kohmura et al., 1995
<i>Eclipta alba</i>	Segmentos nodales	MS	2 i P (2.4 µM)	Micropropa- gación para obtención de Metabolitos secundarios	Franca et al., 1995
<i>Elaeagnus angustifolia</i> (árbol)	Hojas jóvenes	WPM(Lloyd and McCown, 1980)	BA (1 µM) + GA <sub>3</sub> (1 µM)	Regeneración	Economov y Maloupa, 1995
<i>Fagus sylvatica</i> (árbol)	Yemas epicales	WPM Hidrolizado de caseína Fructosa (0.1% w/v) Myo-inositol (100 mg/l)	BA (4.5 µM)	Micro- propagación	Maiar y Reuthe, 1994
<i>Fernonja limonia</i> (árbol)	Cotiledones	MS	BA (4.4 µM) K (4.6 µM)	Organo- génesis	Hossain et al., 1994

Tabla 3. (Continuación)

Especie	Expiante	Medio de Cultivo	Reguladores del Crecimiento	Respuesta Morfo-genética	Referencia
<i>Grevillea robusta</i> (árbol)	Nudos jóvenes	WPM	BA (4.4 $\mu$ M) + NAA (0.27 $\mu$ M)	Micro-propagación	Rajasekaran, 1994
<i>Ipomoea batatas</i>	Proto-plastos	MS	BA (2.0 mg/l) + K (1.0 mg/l) + GA <sub>3</sub> (1.0 mg/l)	Regeneración	Belardino et al., 1994
<i>Meconopsis paniculata</i>	Callo	MS	BA (2.0 mg/l) + K (1.0 mg/l) + GA <sub>3</sub> (1.0 mg/l)	Regeneración	Sulaim, 1994
<i>Nepenthes khasiana</i>	Tallo con 2 a 3 segmentos nodales	WPM	BA (2.2 $\mu$ M)	Multiplicación	Latha y Seeni, 1994
<i>Pinus banksiana</i>	Embriones	AE; QP; M CM; SH; myo-Inositol (100 mg/l) asparagina (100 mg/l) ácido nicotínico 4 mg/l Tiamina HCl (5 mg/l)	BA (10 $\mu$ M) K(10 $\mu$ M)	Regeneración	Indra et al., 1994
<i>Rubus idaeus</i>	Hojas	MS + N8 (Chueta, 1975)	IBA (0.5 - 1 mg/l)	Regeneración de brotes adventicios	Ambrozic et al., 1994
<i>Swartzia madagascariensis</i>	Nudos y ápices	MS	BA (2.2 $\mu$ M)	Micro-propagación	Berger y Schaffner, 1995
<i>Ulinus americana</i>	Hojas	Driver and Kuniyuki Walnut (DKW)	BA (15-22 $\mu$ M) + TDZ (Thidiazuron)	Capacidad de regeneración de brotes	George y Tripepi, 1994
<i>Verbena tenera</i>	Nudo	MS	BA (0, 0.44 y 4.4 $\mu$ M)	Micro-propagación	Hosoki y Katahira, 1994
<i>Xanthium strumarium</i>	Apices	MS	BA (4.4-8.9 mM) + ANA(1.1-2.1 $\mu$ M) Enraizamiento K (2.3 $\mu$ M) + ANA (1.1 $\mu$ M)	Micro-propagación	Ellis y Camper, 1994

la diferenciación radicular, sobre todo cuando se trabaja con árboles maduros (Hu y Wang, 1983).

Martin (1985) obtuvo de 200 mil a 400 mil individuos por año, a partir de una sola yema de rosa que subdividió cada mes en cuatro secciones, mientras que se obtuvieron de 30-50 plantas en el mismo tiempo con métodos convencionales.

#### Organogénesis y Embriogénesis.

Con un trabajo experimental previo, es posible a partir de cualquier estructura vegetal lograr la regeneración de plantas por estas vías, si bien las tasas de multiplicación llegan a ser más altas que en el cultivo de yemas, iniciar y mantener estos procesos morfogénicos puede resultar complicado.

Con la conversión de los tejidos en callo aumenta la biomasa, que por su carácter meristemático y la plasticidad de sus respuestas puede ser orientada para lograr algunos objetivos, por ejemplo en la biosíntesis de metabolitos (Webb *et al.*, 1984; Falk *et al.*, 1990) o en la regeneración de plantas (vía indirecta) (Turk *et al.*, 1994; Sulaim, 1994; Gana *et al.*, 1995). En esta nueva conducta que adquieren los tejidos juegan un papel fundamental los reguladores del crecimiento para redeterminar la fisiología y morfología de las células.

En el proceso morfogénico directo, los reguladores del crecimiento no redeterminan la respuesta de las células morfogénicas sino que sólo facilitan el proceso de formación de un nuevo órgano o embrión (Sharp *et al.*, 1980).

Auxinas, citocininas y ácido giberélico son los fitorreguladores más utilizados. Han pasado casi 40 años desde que Skoog y Miller (1957), (citados por George y Sherrington, 1984) establecieron un principio que aún es válido, pero que en muchas ocasiones es requisito modificar, y es que entre auxinas y citocininas, un balance a favor de las auxinas puede promover la formación de raíces y/o callo; con una concentración mayor de citocininas que de auxinas la respuesta puede ser la formación



de brotes (Figura 2). El papel de las giberelinas se ha centrado básicamente en su efecto de elongación de entrenudos y la promoción de la germinación.

La experiencia ha demostrado que los embriones y tejidos de plántulas son morfogénicamente más plásticos (competentes) que los tejidos maduros (Ammirato, 1989; Fasolo *et al.*, 1989), y sería más recomendable utilizarlos. Sin embargo, cuando no existe la posibilidad de contar con ese material deberán realizarse los ensayos pertinentes con individuos maduros para tratar de lograr respuestas morfogénicas, por ejemplo: Phoenix dactylifera (ápice, tallo, Reynolds y Murashige, 1979; citados por George y Sherrington, 1984; Euphoria longan (hojas, Litz, 1988); Musa spp. (rizoma, Novak *et al.*, 1988); Ceratozamia hildae (hojas, Litz *et al.*, 1995).

Durante los últimos veinte años, las técnicas para el cultivo *in vitro* de células y tejidos han tenido grandes avances en el conocimiento de las plantas y un enorme desarrollo, sobre todo en el área de micropropagación, lo que hace posible aplicarlas virtualmente a todas las especies vegetales, con lo que se ha encontrado solución a problemas en las industrias químico-farmacéuticas y sobre todo en la agrícola y hortícola, y recientemente en la conservación de genotipos y especies amenazadas (Mistretta, 1994; Fay, 1994). Entre los grupos vegetales con mayor potencial por estudiar y aprovechar se encuentra la familia de las Lamiaceae.

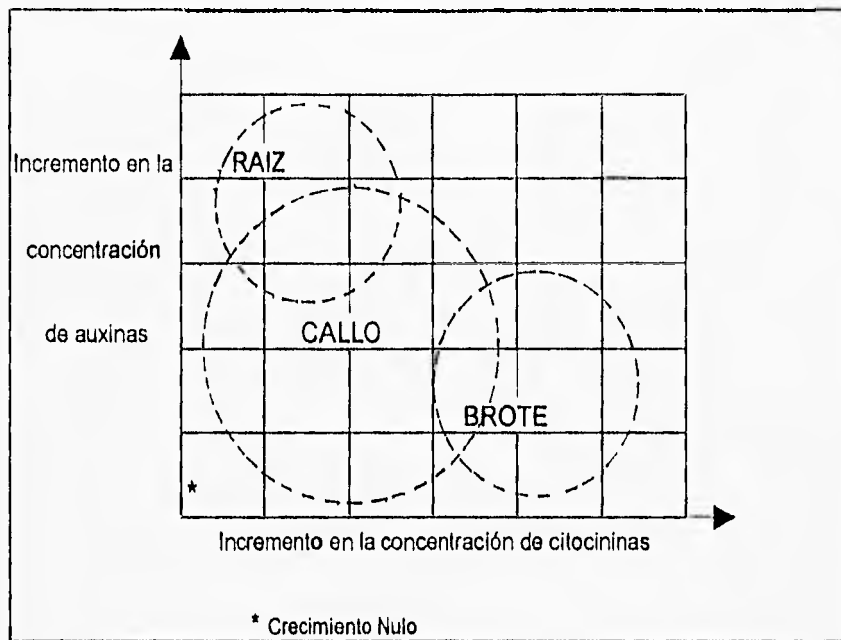
## 11 Cultivo de Tejidos Vegetales en la Familia Lamiaceae

El cultivo de tejidos de especies de esta familia se ha realizado básicamente por el interés de lograr *in vitro* distintos metabolitos secundarios (Tabla 4), ya que muchos de ellos tienen entre otras, una aplicación en la industria farmacéutica, alimenticia, de perfumes, cosméticos y de insecticidas.

Mele *et al.* (1992) lograron la micropropagación de Ajuga reptans para la obtención de equisteroides.

Tabla 4. Cultivo in vitro de Labiadas (Labiatae)

Especie	Explante	Medio de Cultivo	Reguladores Crecimiento	Respuesta in vitro	Referencia
1. <u>Coleus blumei</u>	Hojas	MS	BA (21 mg/l) + NAA (1 mg/l)	Evaluar tolerancia al NaCl	Ibrahim et al., 1992
2. <u>Coleus forskohlii</u>	Apices de tallo y raíz hipocótilo	MS + W	BA (2 mg/l)	Producción de forskolin	Sen et al., 1992
3. <u>Coleus forskohlii</u>	Segmentos nodales	MS	IAA (1.0 mg/l) + K (2.0 mg/l)	Reg. plántulas Prod. forskolin	Sharma et al., 1992
4. <u>Lavandula angustifolia</u>	Tallos	MS	2,4-D (9 mg/l) + NAA (0.5 mg/l) + leche coco (10% v/v)	Pigmento azul tóxico para <u>Cladosporium herbarium</u>	Banthorpe et al., 1990
5. <u>Lavandula latifolia</u>	Cotiledones	MS	2,4-D (0.34 µM) IAA o NAA (0.60 µM)	Regeneración	Jordan et al., 1990
6. <u>Mentha arvensis</u>	Nudos	MS	IAA o NAA (0.5-2.0-3.0 mg/l) + BAP (2.0-3.0 mg/l)	Regeneración mayor producción de aceites esenciales	Kukreja et al., 1991
7. <u>Mentha citrata</u>	Brotos	Raíces transformadas con <u>Agrobacterium tumefaciens</u>	Cultivos axénicos	Producción de monoterpenos	Spencer et al., 1993
8. <u>Mentha piperita</u>	Hojas		K (0.5 mg/l)	Regeneración plántulas libres de roya	Nadaska et al., 1990
9. <u>Mentha spicata</u>	Apices	B5 y MS Tiamina 10 ppm	BAP (0, 0.02, 0.2 y 2 ppm) NAA (2,4 ppm)	Producción monoterpenos	Hirata et al., 1990
10. <u>Ocimum basilicum</u>	Tallo	MS	K (0.5 mg/l) + NAA (1 mg/l)	Síntesis y acumulación Terpenoides	Banthorpe et al., 1996
11. <u>Salvia sclarea</u>	Tallo Callo		2,4-D (1 mg/l) + K(0.1 mg/l) NAA (1 mg/l) + BA (5 mg/l)	Sciareol inhibe roya	Banthorpe et al., 1990
12. <u>Salvia miltiorrhiza</u>	Células en suspensión	MS	2,4-D (0.1 ppm) + K (0.1 - 1 ppm)	Influencia nutrientes en prod. de Cryptotanshinone y Ferruginol	Miyasaki et al., 1987
13. <u>Salvia officinalis</u>	Hojas Callo	MS	2,4-D (0.2 mg/l) + K (1 mg)	Metabolismo de monoterpenos	Falk et al., 1990
14. <u>Thymus piperella</u>	Apices 1 yema apical y 3 nudos	MS modificado	IAA (2.8 µM) + BA (6.6 µM)	Micropropagación	Saez et al., 1994



**Fig 2. Relación de la Concentración de Auxinas y Citocininas de un Medio de Cultivo y sus Efectos en el Crecimiento y Desarrollo de Células Vegetales (Wetherell, 1985)**

Webb *et al.* (1984) a partir de callo generado de tallos lograron brotación múltiple de Lavandula angustifolia y L. officinalis y la producción de monoterpenos, en MS+ 10% leche de coco+ BA 20mg/l; también el establecimiento de cultivos *in vitro* de tallos de L. angustifolia en MS+2,4-D 6 mg/l o ANA 0.5 mg/l+K 0.1 mg/l+10% leche de coco, se utilizó para lograr la producción de un pigmento azul tóxico para Cladosporium herbarium (Banthorpe *et al.*, 1990). Utilizando células en suspensión en MS+2,4-D 9mM y K 0.4 mM de L. angustifolia se obtuvo la reducción de monoterpenos a sus respectivos alcoholes (Lappin *et al.*, 1987).

Cultivos de tallos de Ocimum basilicum en MS+K 0.5 mg/l+ANA 1mg/l fueron utilizados para la obtención de thymol y linalool (Banthorpe *et al.*, 1986).

Banthorpe *et al.* (1990) establecieron cultivos de tallo de Salvia sclarea en MS+2,4-D 1mg/l o ANA 1mg/l+K 0.1 mg/l para obtener diterpenos y un inhibidor de hongos de la roya.

Miyasaki *et al.* (1987) exploraron el efecto de los nutrientes en la producción de cryptotanshinone y ferruginol en cultivos de raíces de Salvia miltiorrhiza.

Sharma *et al.* (1991) utilizaron cultivos de nudos en MS+K 2mg/l+ AIA 1mg/l para regenerar plantas de Coleus forskohlii y producir forskolina.

Salvia elegans, especie endémica, cuyas poblaciones han sido severamente disminuidas, sobre todo en el Valle de México y en varios estados del país, podrá en poco tiempo situarse en la categoría de amenazada; de ahí que el cultivo de tejidos tiene una implicación directa a través del establecimiento de una metodología de micropropagación como una medida que puede ser aprovechada para la conservación de su germoplasma.

Con base en lo anterior, en el presente estudio se plantea el siguiente objetivo.

## II OBJETIVO

Establecer las condiciones experimentales que permitan la regeneración in vitro de Salvia elegans Vahl. a partir de tejidos de plántulas y plantas maduras.

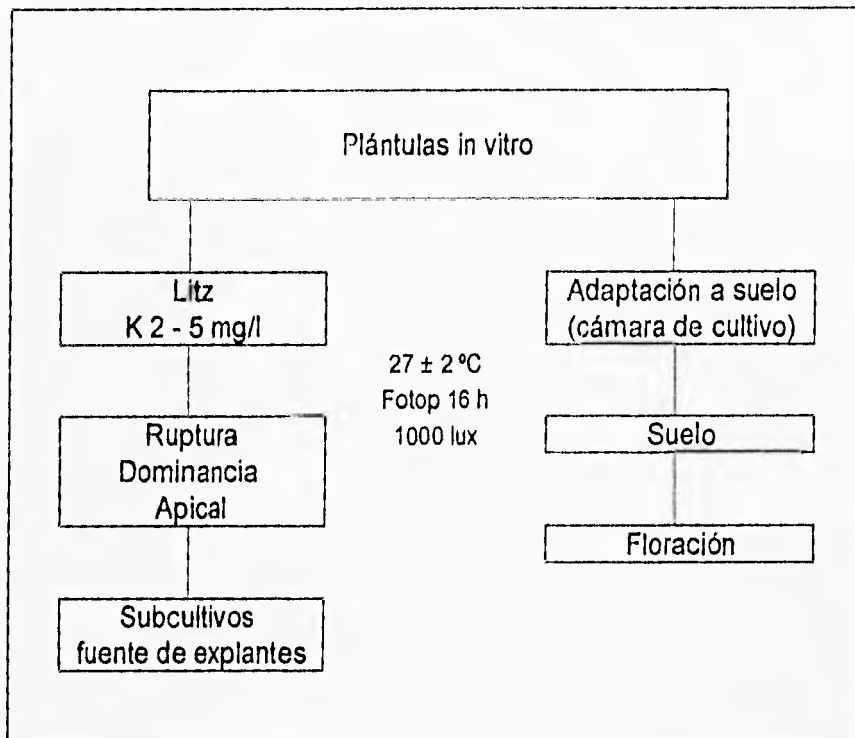
## III MATERIALES Y METODOS

### 1 Material Biológico

Se utilizaron como fuente de explantes: a) plantas adultas del campo así como de un individuo que se extrajo de su habitat para ser plantado en un sitio protegido. De éstas se emplearon: semillas maduras, ápices, nudos y entrenudos (tallos), hojas, raquis e inflorescencias; y b) de plántulas germinadas in vitro: ápices, nudos y entrenudos (tallos), hojas y raíces. Las plántulas regeneradas a su vez sirvieron como fuente de explantes (Diag 1). Los explantes se denominaron "maduros" y "jóvenes" respectivamente.

### 2 Desinfección y Siembra de Semillas

Semillas maduras colectadas en los meses de diciembre a febrero, meses en que ocurre la floración y fructificación de Salvia elegans, siguieron tres vías alternativas para promover su germinación: la primera consistió en utilizar un lote de 332 semillas



Diag 1. Brotación Múltiple de Plántulas in vitro y Adaptación a Suelo

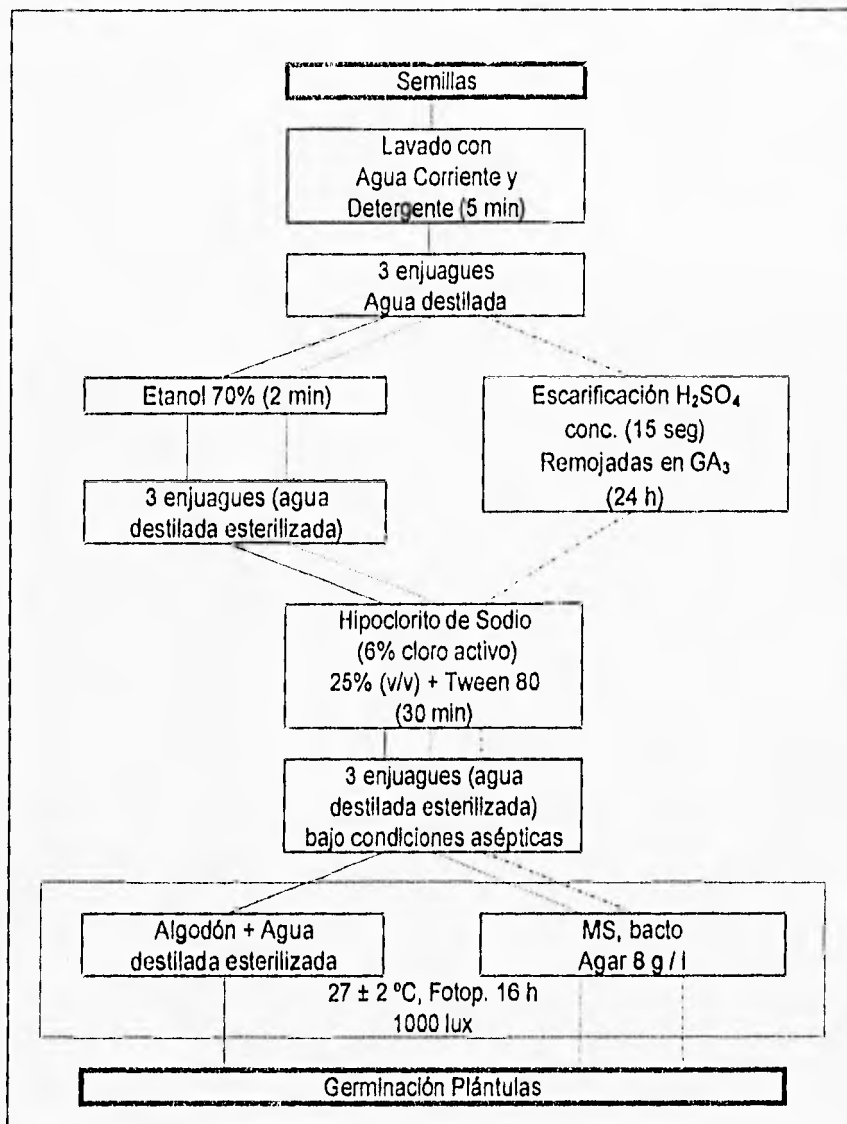
que fueron lavadas en agua corriente con detergente líquido y escarificadas sumergiéndolas en ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) durante 15 segundos, posteriormente se enjuagaron 3 veces con agua destilada esterilizada y se remojaron durante 24 h en ácido giberélico ( $GA_3$ ) 1mg/l,  $27\pm 2^\circ C$ . Previo a la siembra se desinfectaron superficialmente sumergiéndolas en etanol al 70% (v/v) durante 2 min seguido de 3 enjuagues con agua destilada esterilizada. Se introdujeron en hipoclorito de sodio ( $NaOCl$ , 6% de cloro activo) 25% (v/v) con 2 gotas de Tween 80 por cada 100 ml de solución en agitación constante durante 30 min. En condiciones asépticas se enjuagaron 3 veces con agua destilada esterilizada y se sembraron en medio Murashige y Skoog (MS) sin reguladores del crecimiento (Diag 2) (Apéndice 1).

La segunda vía comprendió un lote de 868 semillas las cuales se desinfectaron superficialmente en la misma forma que el lote anterior y se sembraron en medio MS sin reguladores del crecimiento.

La tercera opción consistió en colocar, después del proceso de desinfección, 700 semillas en "frascos germinadores" estériles con algodón humedecido en agua destilada esterilizada. Se sembraron de 10 a 20 semillas por frasco, procurando distribuir las homogéneamente. Todos los frascos se sellaron con ega-pack y se rotularon. Las condiciones de incubación en los tres métodos fueron  $27\pm 2^\circ C$ , 16 h luz y 1000 lux.

Después de casi 1 mes de cultivo, las plántulas obtenidas se pasaron a medio Litz (Litz, 1988) (Apéndice 2) adicionado con Kinetina (K) 1.5 mg/l.

Para conocer el comportamiento de las semillas bajo condiciones de oscuridad, se utilizaron 3 frascos con medio MS conteniendo 20 semillas cada uno y 3 frascos



Diag 2. Procedimiento para el Cultivo in vitro de Semillas de *S. elegans*



"germinadores con algodón" con el mismo número de semillas. La germinación en el medio MS fué de un 80% más baja que las cultivadas en presencia de luz, y de un 40% más baja en los "germinadores con algodón". Las plántulas presentaron un tallo alargado, débil y etiolado, y al ser subcultivadas se observó un crecimiento lento por lo que no se continuó con su cultivo.

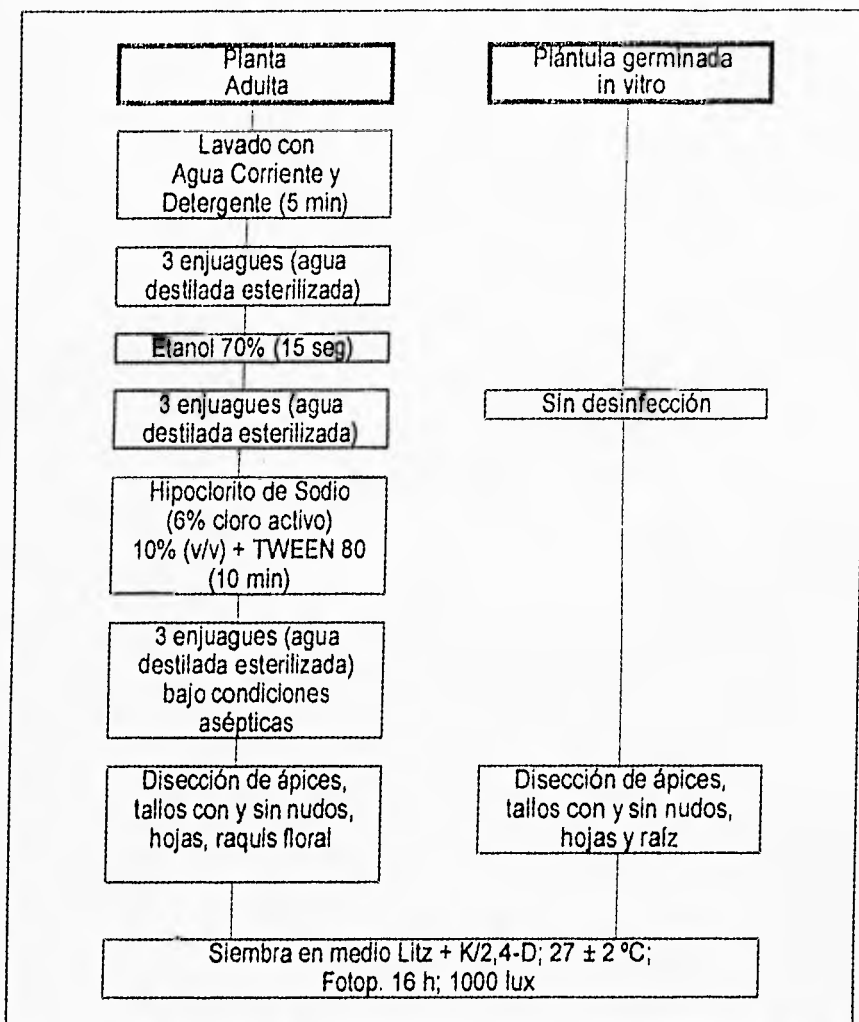
### **3 Desinfección y Siembra de Explantes de Plantas Adultas y Plántulas Generadas in vitro**

De individuos adultos, se aislaron los siguientes tipos de explantes "maduros": **ápices (10-15 mm), nudos con o sin hojas (8-10 mm), tallos con o sin nudos (10-20mm), hojas de 35 x 25 mm (que fueron seccionadas en 2 y 4 partes);** también se colectaron **Inflorescencias** y el raquis fué segmentado en porciones de 20 mm que llevaba un par de yemas florales (Lámina a).

Las secciones de la planta adulta fueron sometidas al siguiente proceso de desinfección: fragmentos maduros recién cortados fueron lavados con agua corriente y detergente líquido durante 5 minutos, posteriormente se realizaron 3 enjuagues con agua destilada esterilizada, se desinfectaron con etanol al 70% (v/v) durante 15 segundos en agitación constante, posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada, después se desinfectaron, 10 min en agitación con hipoclorito de sodio (NaOCl, blanqueador comercial) 10% (v/v) con dos gotas de Tween 80 por cada

100 ml de solución. Bajo condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, se enjuagaron con agua destilada esterilizada y se procedió a obtener los explantes. Los cortes se hicieron con un bisturí y dentro de una caja de petri estéril, humedecida con agua destilada esterilizada; con pinzas de disección se introdujeron los explantes a los frascos conteniendo el medio de cultivo (Diag.3).

Asimismo de plántulas de 3 a 5 cm de altura obtenidas después de 4 a 7 semanas a partir de semillas germinadas in vitro, se disectaron asépticamente para obtener distintos tipos de explantes "jóvenes": **ápices** (5-10 mm) generalmente con 2 a 4 hojas y primordios foliares, **nudos** (3-5 mm) con 2 hojas, **tallos con o sin nudos** (3-8 mm), **hojas** (3-5 mm) y **raíces** (20-40 mm). Los explantes, tanto jóvenes como maduros, se sembraron en medio Litz adicionado con 96 combinaciones diferentes de Kinetina (K) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Tabla 5). Se sembraron de 2 a 5 explantes por frasco de acuerdo al tamaño, de 8 a 10 frascos por tratamiento y el experimento se repitió un mínimo de 2 veces, los cultivos fueron incubados en una cámara de crecimiento a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , 16 h luz y 1000 lux. Se seleccionaron también 3 frascos con medio MS y combinaciones de K/2,4-D y se incubaron a la temperatura antes referida pero bajo condiciones de oscuridad con el objeto de explorar su efecto en la inducción de callo. Se realizaron observaciones periódicas cada 8 y 15 días.



Diag 3. Procedimiento para el Cultivo de Secciones de Tallo, Hojas, Raquis y Raíces de Plántulas y de Plantas Adultas de S. elegans

Tabla 5. Combinaciones de K/2,4-D empleadas para promover respuestas morfogénicas en explantes jóvenes y maduros de Salvia elegans.

K (mg/l)	2,4-D (mg/l)												
	0	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0.0													
0.5													
1.0													
1.5													
2.0													
3.0													
4.0													
5.0													

#### 4 Trasplante

Las plántulas obtenidas in vitro provenientes de la germinación así como las plántulas provenientes del cultivo de explantes disectados de la planta madura, ambas subcultivadas en medio Litz + K (1.5 mg/l) siguieron tres vías: 1) algunas plántulas se utilizaron nuevamente como fuente de explantes. 2) otras se subcultivaron en medio Litz con altas concentraciones de K (2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 y 5 mg/l) y 3) aquéllas que se sometieron a un proceso de aclimatación en suelo, en el que las plántulas fueron sacadas de los frascos de cultivo, sus raíces se lavaron con agua corriente y las plántulas se colocaron en vasos de poliuretano con suelo, consistente éste, en dos partes de tierra de hoja y una parte de tierra negra, altamente hidratada pero evitando la saturación.

Estos vasos fueron cubiertos con bolsas de plástico y se mantuvieron en la cámara de crecimiento. Gradualmente las bolsas fueron levantadas hasta que las plantas quedaron completamente expuestas a las condiciones del cuarto de cultivo

##### **5 Cultivo en Suelo de Semillas, Apices y Nudos de Plantas Adultas**

Se sembraron 30 semillas en el sustrato natural de una de las poblaciones del "Desierto de los Leones", provenientes de individuos de esta población.

Asimismo, en condiciones de "cielo abierto" en charolas con suelo colectado de una localidad del "Desierto de Los Leones" se sembraron 30 semillas maduras, procedentes de un individuo adulto in situ, así como ápices y nudos disectados del individuo transferido. Se plantaron dos lotes: uno de 15 ápices y 15 nudos con una cubierta para mantener una alta humedad y otro lote de 30 ápices y 30 nudos sin protección. En todos los casos los explantes se seleccionaron de acuerdo a su apariencia: inmaduros, verdes, sin perforaciones ni decoloraciones y se les proporcionó un riego diario. Estas siembras se realizaron en los meses de febrero-abril, y en mayo-junio cuando se observaron nuevos brotes en los individuos de las poblaciones naturales así como en la planta fuente de los explantes, posiblemente producto de la propagación vegetativa.

#### IV RESULTADOS

##### 1 Cultivos de Semillas in vitro

De un total de 1900 semillas sembradas asépticamente en medio MS y en germinadores de algodón, durante diciembre (1989), enero y febrero (1990), febrero (1992), después de dos meses de cultivo en total germinaron 285 semillas (15%), se contaminaron 100 (5.26%) y 1518 (79.8%) no germinaron.

El porcentaje de germinación fué bajo en general, sobre todo en las semillas sembradas en medio MS (2.9%); este porcentaje se incrementó ligeramente en las semillas escarificadas (4.5%) y fué más significativo en las semillas sembradas en germinadores de algodón (34.8%). En relación al tiempo, el mayor porcentaje (61.7%) se observó entre los 10 y 20 días, disminuyendo éste (30.2%) entre los 20 y 30 días hasta caer al 8.1% en el último mes (30 y 60 días) (Tabla 6).

**Tabla 6.** Germinación in vitro de semillas de *S. elegans* en medio a) Murashige y Skoog (1962) (MS), b) previamente escarificadas\*, c) en germinadores con algodón y agua destilada.  $27 \pm 2$  °C, 16 h luz, 1000 lux.

a) Medio MS			b) escarificacion* y siembra en MS		c) germinadores	
Tiempo en días	No. semillas germinadas	(%)	No semillas germinadas	(%)	No semillas germinadas	(%)
10-20	26/868	2.9	13/332	3.9	163/700	23.2
20-30					60/700	8.6
30-60			2/332	0.62	21/700	3.0
Total semillas germinadas	26		15		244	

\*Escarificación con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado 15 s, inmersión durante 24 h en GA<sub>3</sub> 1 mg/l.

El hecho de que las semillas germinaran en un menor porcentaje en medio MS (con o sin pretratamiento en GA<sub>3</sub>) puede indicar que el agua es menos disponible en el medio al encontrarse incorporada a un gel, en tanto que en los germinadores con algodón, ésta se encuentra más disponible y es posible que se forme una película de agua que cubra a la semilla favoreciendo la imbibición así como la germinación. También se observó que durante el proceso de desinfección, al ser colocadas las semillas en hipoclorito de sodio, éstas liberaron y se rodearon de un mucílago que podemos considerar hidrofílico y que quizá podría cumplir en el ambiente natural con la función de captar agua y mantenerla disponible durante la germinación. Otro hecho notorio en los ensayos de germinación fue que el GA<sub>3</sub> a la concentración utilizada y por el tiempo empleado no promovió la germinación, aún cuando se considera que las giberelinas son necesarias para iniciar la germinación (Bidwell, 1990). Los resultados parecen indicar que un lote de semillas se presenta quiescente (15%) en tanto que otro se mantuvo latente (79.7%) bajo las condiciones ensayadas.

El mayor porcentaje de contaminación se presentó en las semillas que se sembraron en MS (7.4%), seguido de las que se colocaron en los germinadores (3.7%) y por último las semillas que fueron previamente escarificadas (2.7%).

Se exploró someramente la condición de los embriones y se cultivaron in vitro para observar su respuesta; de 25 semillas maduras disectadas, 6 contenían sus tejidos internos totalmente secos y necrosados, 19 embriones fueron sembrados en medio MS y sólo 7 de éstos germinaron en forma incipiente y acabaron por necrosarse a las tres semanas. Es probable que el medio de cultivo y/o la manipulación in vitro

hayan causado daños en algunos de estos embriones, y por lo tanto se presentarían los bajos niveles de germinación anteriormente mostrados. Asimismo fue posible detectar anomalías existentes en las estructuras reproductoras, la observación y disección de estas semillas bajo el microscopio estereoscópico evidenció una alta incidencia de óvulos atrofiados. Generalmente de 4 óvulos contenidos en el cáliz residual, de 1 a 3 se encontraron atrofiados. Al realizarse el conteo de semillas provenientes de 71 cálices sólo se obtuvieron 82 (25%) de 284 semillas posibles (Lámina b)

Durante el primer mes de cultivo, las plántulas germinadas en medio MS se observaron con un tallo alargado, delgado, de 2 a 3 cm de longitud, hialino a verdoso con 2 pares de hojas opuestas, su raíz era menor a 1 cm de longitud, escasamente ramificada.

Las plántulas en los germinadores de algodón fueron menos verdes, sus tallos etiolados muy alargados pero curvándose hacia abajo y un par de hojas opuestas más pequeñas que la observadas en las plántulas en medio MS, lo que puede ser definido como una condición débil; posteriormente algunas se marchitaban y necrosaban.

**Tabla 7.** Plántulas obtenidas a partir de semillas germinadas *in vitro* de *S. elegans* en medio a) Murashige y Skoog (1962) (MS), b) previamente escarificadas, c) en germinadores con algodón y agua destilada.  $27 \pm 2$  °C. 16 h luz. 1000 lux.

Medio	No. de plantulas germinadas	No. de plantulas contaminadas al subcultivo en MS+K	(%)	Aspecto
a) MS	26	0	0	robusto
b) MS	15	0	0	robusto
c) Germ	244	98	41.1	débil



No obstante que inicialmente ocurrió la contaminación de algunas de las semillas colocadas en germinadores (3.7%), al subcultivarse las plántulas germinadas en medio MS + K (1.5 mg/l), la contaminación se incrementó considerablemente (40.1%)(Tabla 7).

Una posible explicación de ello es que los microorganismos estuvieron presentes en el interior de la semilla pero en un ambiente (agua destilada y algodón) carente de suficientes nutrientes para proliferar.

Esta idea encuentra soporte en los trabajos de Dale, 1979; Lane, 1979; Anderson, 1980; James y Thurbon, 1981 (citados por Hu y Wang, 1983) en los cuales para detectar y pronto desechar cultivos contaminados, adicionaron a sus medios compuestos orgánicos, tales como hidrolizado de caseína, extracto de levadura y peptona.

Las plántulas provenientes de las semillas pretratadas con  $GA_3$  y sembradas en MS, así como las plántulas de semillas sembradas en MS, después de casi 1 mes de cultivo se pasaron a medio Litz con K (1.5 mg/l). Este cambio se realizó al considerarse que el establecimiento aséptico de los cultivos y de las primeras etapas de desarrollo de las plántulas podía ser sostenido por el medio MS, que presenta una composición menos rica y menos compleja que el Litz el cual ha apoyado la obtención de cultivos morfogénicos de especies con poco potencial regenerativo como son las cícadas (Litz *et al.*, 1995).

Al cabo de 15 días en el medio Litz con K (1.5 mg/l), presentaron el desarrollo de yemas axilares y algunas yemas adventicias, los tallos se engrosaron, las plántulas alcanzaron de 3 a 5 cm altura y presentaban de 3 a 6 nudos (Lámina d).

Fue posible observar que en aquellas plántulas provenientes de Litz + K (1.5 mg/l) y subcultivadas nuevamente a medio Litz con distintas concentraciones de K (2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 y 5 mg/l), se rompió la dominancia apical, lográndose nuevos brotes fundamentalmente a partir del desarrollo de las yemas axilares y la formación de yemas adventicias (en menor grado de brotes que emergían de la base del tallo, zona de la corona).

Los mejores resultados se obtuvieron en las concentraciones de kinetina 2.5, 3.0 y 3.5 mg/l, en lo que se refiere al número de individuos que presentaron brotación múltiple así como al número de brotes por plántula (Tabla 8).

Al utilizar concentraciones más altas (4.5, 5.0 mg/l) las plántulas adquirieron un aspecto de marchitez y cesó su crecimiento, sin que hubiera brote alguno, posteriormente se necrosaron.

**Tabla 8.** Desarrollo de brotes adventicios en plántulas *in vitro* de *S. elegans* a los 60 días de iniciados los cultivos en medio Litz adicionados con diferentes concentraciones de K e incubados a  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , 16 h, 1000 lux.

Kinetina mg/l	N/P	(%)	No. de brotes	origen %		necrosis %
				corona	nudo	
2.0	4/24	16.6	1-2	45	55	0
2.5	13/24	54.1	3-5	40	60	0
3.0	14/24	58.3	3-5	10	90	0
3.5	10/24	41.6	1-3	0	100	0
4.0	8/24	33.3	2-4	0	100	4
4.5	2/24	8.3	1	0	100	10
5.0	0/24	0	0	0	0	18

N Número de plántulas que generaron brotes axilares y adventicios

P Número total de plántulas ensayadas

Las plántulas obtenidas en medio MS y después subcultivadas a Litz (con K + 1.5 mg/l) constituyeron la fuente de los "explantes jóvenes" que a su vez llegaron a formar nuevas plántulas y sirvieron para repetir el procedimiento a lo largo de tres años.

## 2 Cultivo *in vitro* de Explantes Maduros y Jóvenes

De los cultivos establecidos en las 96 combinaciones hormonales de K/2,4-D en medio Litz, se obtuvo callo y la regeneración de plántulas.

### a) Callo

Una de las respuestas morfogénicas que se manifestaron fue la formación de callo, la cual de manera general fué lenta, escasa, limitada por la oxidación y en menor grado por la contaminación, además fue errática pues no se estableció una clara correlación entre el tipo de explante y las concentraciones hormonales (Tablas 9, 10 y 11). Se presentaron varios tipos de callo que se caracterizaron por ser friables con un color

crema (24.2%) y en algunos casos verdes (10.4%) y verde cremoso (10.4%); poco friables, de un color crema-pardo (13.8%) y compactos de color blanco con trazas grises y completamente gris (17.2%), así como compactos y de color pardo (17.2%) y blanco pardusco (6.8%) (Tabla 11).

Los explantes tomados de plántulas in vitro, tuvieron una mayor capacidad de respuesta y el callo formado permaneció más tiempo sin oxidación.

Se observó que en las hojas (H,h) el más alto volumen de callo (aprox. 3 cm<sup>3</sup>) se formó en el tratamiento (K/2,4-D) 2/6, para explantes maduros (H) y de 0.5/3 para los explantes jóvenes (h) este fue de aspecto friable y verde en H; friable cremosos así como también compactos grisaseos en h y presentaron menos oxidación. En algunos casos se observó en estas estructuras la formación de raíces en la concentración 0/1. El enraizamiento en hojas ha mostrado tener un efecto antisenescente y se obtiene in vitro al utilizar bajas concentraciones de citocininas (Chibnal, 1939, citado por Jacobs, 1979). Sin embargo, en el presente trabajo, esta respuesta morfogénica se obtuvo con 2,4-D; esta condición también fué observada en hojas de Prunus (Osborne, 1959, citado por Jacobs, 1979) (Lámina e).

En los tallos (T,t) la producción de callo fué muy escasa tanto para explantes jóvenes como para los maduros, en general los callos fueron compactos de color gris y algunos pardos por la oxidación de los tejidos (Tablas 9, 10 y 11).

El raquis floral (R) formó callos pequeños, poco friables así como también compactos, de color pardo y limitado crecimiento. Un hecho notable fue que algunas de las yemas florales presentaron anthesis in vitro (Lámina f).

Finalmente en la raíz (r), la formación de callo fué mas lenta (aprox. 35 días), la mayor cantidad se obtuvo en la concentración de 3/1, (Tablas 9, 10 y 11). Se formó un callo relativamente friable de color crema el cual se distribuyó a lo largo de las extensiones radiculares.

A partir de la raíz se formó la mayor cantidad de callo y permaneció más tiempo sin oxidación que en el resto de los cultivos (aprox. 45 días). También se formó callo pero en menor volumen en los tratamientos 3/2 y 5/10. La oxidación de la raíz en esta última concentración ocurrió desde la siembra del explante.

De acuerdo a los resultados, la producción de callo estuvo influenciada por el origen, el tipo y el estado fisiológico del explante, el medio de cultivo y las condiciones de incubación ya que ningún explante se desdiferenció en condiciones de oscuridad, así como tampoco se observó proceso morfogénico alguno en callos ya formados.

Desde el punto de vista morfogénico, la característica más importante del callo es la totipotencialidad de sus células, ya que en general con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, pueden lograr (o manifestar) la capacidad de desarrollar brotes, raíces, embriones, y llegar a formar plántulas completas, sin embargo inducir su capacidad morfogénica (expresión de la totipotencia) puede representar un serio problema. Fossard *et al.*, 1974 (citados por Barba, 1987) probaron 175 combinaciones de fitorreguladores y no promovieron respuestas morfogénicas. Ojima y Ohira (1978) señalan que el establecimiento de cultivos de tejidos de distintas especies no se ha logrado, o como reporta Ammirato (1989) ha sido muy difícil tratar de lograr a satisfacción objetivos particulares, por



Tabla 10. Formación de callo (+) y regeneración *in vitro* a partir de secciones de plántulas de *S. elegans* (1).

K (mg/l)	2, 4 - D (mg/l)												
	0	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0			h +		h +								
0.5		t +	h +		h +++								
1	t +					h +							
1.5	a, n												
2								h ++					
3	t +	h +	r + + + +	h + r +				h +					
4													
5													r +

a = ápice, h = hoja, n = nudo, r = raíz, t = entrenudo con o sin nudo  
a, n = regeneración de plántulas a partir de ápices y nudos

(1) Resultados entre los días 9 a 35, en medio Litz, 27±2 °C, Fotop. 16 h, 1000 lux.

volumen de callo      + : menor o igual a 0.5 cm<sup>3</sup>  
                             ++ : de 0.6 a 2.5 cm<sup>3</sup>  
                             +++ : mayor a 2.5 cm<sup>3</sup>  
                             ++++ : igual o mayor a 3 cm<sup>3</sup>

Tabla 11. Producción de Callo a partir de Secciones de Plántulas *in vitro* y de Plantas Adultas de *S. elegans* (a).

Explante	Longitud (mm)	K/2,4-D mg/l *	N/Exp (%)	Volumen (cm <sup>3</sup> )	Callo	Color
<b>Plántula</b>						
hoja	5 - 10	0.5/3	14 / 120 (11.6)	+++	Friable	Crema
		2/6	11 / 120 (9.1)	++	Compacto	Grisáceo
		1/4	6 / 120 (5.0)	+	Compacto	Grisáceo
tallo	5 - 10	0.5/0	1/40 (2.5)	+	Compacto	Gris
		1/0	3 / 40 (7.5)	+	Compacto	Gris
		3/0	2 / 40 (5.0)	+	Compacto	Gris
raíz	15 - 25	3/1	9 / 32 (28.1)	++++	Friable	Crema
		3/2	2 / 23 (8.6)	+	Compacto	Blanco grisáceo
		5/10	1 / 18 (5.5)	+	Compacto	Blanco grisáceo
<b>Planta Adulta</b>						
Hoja	15 - 25	2/6	62 / 240 (25.8)	+++	Friable	Verde
		3/6	32 / 240 (13.3)	+++	Poco friable	Cremoso verde
		1/4	18 / 240 (7.5)	++	Compacto	Blanco Pardusco
Tallo	8 - 12	1/5	4 / 60 (6.6)	+	Poco friable	Crema Pardusco
		0.5/6	3 / 60 (5.0)	+	Compacto	Pardo
		3/5	2 / 60 (3.3)	+	Compacto	Pardo
Raquis Floral	12 - 15	3/1	3 / 24 (12.5)	++	Poco friable	Crema Pardusco
		0.5/3	1 / 24 (4.1)	+	Compacto	Pardusco

(a) = Resultados a los 60 días de iniciados, medio Litz, 27 ± 2 °C, Fotop 16 h, 1000 lux

\* Se indican los mejores tratamientos bajo las condiciones de cultivo ensayadas.

N: Explantes que respondieron

Exp: Número total de explantes

+ : menor o igual a 0.5 cm<sup>3</sup>

++ : de 0.6 a 2.5 cm<sup>3</sup>

+++ : mayor a 2.5 cm<sup>3</sup>

++++ : igual o mayor a 3 cm<sup>3</sup>



ejemplo en cereales y pastos, plantas leñosas, algunas leguminosas y cultivos tropicales recalcitrantes y la forma en que se ha tratado de resolver este reto experimental es a través de una prudente elección del tipo de explante.

Así por ejemplo, los explantes jóvenes presentaron una mayor capacidad para formar callo con bajas concentraciones de los reguladores del crecimiento, lo cual es una ventaja (menos costosa) en los procedimientos en el laboratorio, pero por otro lado, por ejemplo la formación de callo a partir de hoja de planta madura requirió altas concentraciones de 2,4-D (6 mg/l) lo que pareció indicar cantidades muy bajas de auxinas endógenas en este explante o que requirió cantidades muy altas para lograr su desdiferenciación, pero a cambio de esto la presencia de clorofila en el callo formado hace a la hoja, un explante con posible potencial para la producción de metabolitos secundarios, pues se ha encontrado que las reacciones dependientes de los cloroplastos (que se realizan en ellos, o al menos parcialmente) son una parte necesaria en las rutas metabólicas en la biosíntesis de algún compuesto (Zenk, 1978; De Luca y Cutler, 1987).

Las combinaciones y concentraciones de los reguladores del crecimiento fueron capaces de inducir la formación de callo en los tejidos de los diversos explantes (raíz, tallo, hoja y raquis floral) (Lámina g) pero no su crecimiento y cultivo prolongados. La oxidación y la contaminación incidieron predominantemente sobre los explantes maduros (hojas, raquis y tallos). El hecho de que requirieran de 2,4-D en altas concentraciones puede asociarse a lo señalado por Rabechault y Martin, 1976 (citados por George y Sherrington, 1984) que encontraron que las hojas jóvenes constituían los

mejores explantes, pero la extensión de la oxidación de éstas, estaba en función de la presencia de auxinas en el medio.

La oxidación fue un factor determinante en la falta de respuesta de los explantes, presentándose la necrosis durante los primeros días a partir de la siembra. Es posible que la esterilización superficial de los explantes, en la forma en que se realizó, acelerara la oxidación, sin embargo, este proceso debió hacerse pues una menor concentración del desinfectante o un menor tiempo de exposición al mismo, no impidieron la contaminación de casi todos los explantes.

#### **b) Regeneración**

La regeneración ocurrió sólo a partir de ápices y nudos tanto de los explantes maduros de la planta ex situ, como de los jóvenes (plántulas in vitro), en la concentración 1.5/0, y fué a partir del desarrollo de yemas axilares, de la formación de yemas adventicias y el enraizamiento de los ápices (Tablas 9 y 10). Por otro lado, la falta de respuesta de ápices y nudos provenientes de la planta madura en campo se debió fundamentalmente a la contaminación y en menor grado a la oxidación ya que esta última se vió favorecida por el proceso de desinfección.

De acuerdo a George y Sherrington (1984) la morfogénesis directa algunas veces depende del uso de compuestos específicos, particularmente citocininas y podría ocurrir sólo en un rango muy limitado en las concentraciones de la sustancia reguladora del crecimiento, como ocurrió en el presente estudio.

El uso del medio MS y la kinetina son dos factores que se han utilizado en diversos cultivos de especies de Lamiaceae con el objeto de inducir regeneración de

individuos, así como la obtención de metabolitos secundarios *in vitro*: hojas, Mentha piperita (K 0.5 mg/l, Nadaska *et al.*, 1990), Salvia officinalis (K 1 mg/l + 2,4-D 1 mg/l, Falk *et al.*, 1990); hojas, ápices de Mentha spp. (K 0.2 mg/l + 2,4-D 1 mg/l, Charlwood y Charlwood, 1983), Salvia sclarea (K 0.1 mg/l + 2,4-D 1 mg/l Banthorpe *et al.*, 1990).

Los cultivos de ápices y nudos maduros presentaron ciertas diferencias respecto a los cultivos de estructuras jóvenes. Los tejidos de la planta adulta respondieron en un tiempo más corto y las plántulas resultantes fueron más vigorosas, contaron con un sistema radicular muy desarrollado y de rápido crecimiento.

En cambio ápices y nudos jóvenes presentaron una mayor capacidad de regeneración de nuevos individuos.

Tanto en los explantes maduros como en los jóvenes, el mayor porcentaje de regeneración se observó en los cultivos sembrados durante mayo y junio.

Los primeros resultados de los explantes jóvenes, sembrados durante febrero-marzo se observaron a partir del 9o. día y el mayor número de respuestas ocurrió entre los 15 y 35 días, en cambio los explantes sembrados en mayo-junio respondieron entre los 24 y 28 días para explantes jóvenes y entre 12 a 30 días los explantes maduros. Los ápices continuaron su desarrollo cuando los entrenudos se alargaron y extendieron hojas nuevas, en tanto que en los nudos aislados se desarrollaron las yemas axilares (Lámina c).

La presencia de raíces en ápices y nudos ocurrió dentro de los primeros 10 días, mientras que en un número menor de explantes aparecieron tardíamente, a partir del decimoquinto día. Esta rapidez en la respuesta ocurre en cultivos de otras especies por

ejemplo, en callos de tabaco se formaron meristemoides entre los 8 y 14 días que dieron origen a brotes (Thorpe, 1978). Altman y Goren, 1974 (citados por Hu y Wang, 1983) estudiaron el tiempo requerido para la brotación *in vitro* de las yemas disectadas de Citrus, y encontraron que tanto los periodos de latencia como de brotación de las yemas *in vitro* correspondían con los periodos naturales ocurridos bajo condiciones de campo. Asimismo, von Arnold y Wallin (1988) señalan que el tiempo para la disección de los explantes es un factor clave para su establecimiento, sobre todo con especies leñosas que cumplen etapas de crecimiento, por lo que la mejor estación para iniciar sus cultivos es en primavera que coincide con la germinación de yemas.

En S. elegans en los dos periodos de siembra (febrero-abril y mayo-junio) de los explantes jóvenes, los ápices tuvieron los porcentajes de regeneración más altos, 68.4% durante el primer periodo y 74.2% durante el segundo, en tanto los nudos alcanzaron el 54.1% y 72.3%, respectivamente. En cambio los de la planta adulta tuvieron un porcentaje de regeneración en ambos periodos de cultivo de 35.8% y 53.1% en los ápices y de 19.6% y 46.2% en los nudos (Tablas 12 y 13).

Por otro lado la contaminación microbiana, en los explantes jóvenes, cuando ocurrió, se debió a deficiencias en la manipulación aséptica y fue de 6.5% en ápices y de 18.8% en nudos, durante la primera etapa de cultivo y disminuyó para ambos tipos de estructuras en la segunda etapa 5.7% en ápices y 6.5% en nudos. Sin embargo, para los explantes maduros fue una gran limitante para el establecimiento de cultivos asépticos, principalmente en los explantes sembrados durante los primeros meses del

año, fue de 34.6% para ápices y 52.9% para nudos, y resultó menor en los meses de mayo y junio de 28% en ápices y 33.7% en nudos (Tablas 12 y 13).

**Tabla 12.** Regeneración *in vitro* de *S. elegans* a partir de secciones de tallo (nudos y ápices) de plántulas y plantas maduras durante febrero-abril, sembrados en medio Litz + K (1.5 mg/l), 27 ± 2°C, 16 h, 1000 lux.

EXPLANTE JOVEN	LONGITUD (mm)	N/EXP	(%)	CONTAMINADOS (%)	OXIDADOS (%)
ápice	5-10	63/92	68	6.5	4.3
nudo	3-5	181/334	54	18.8	9.2
<b>EXPLANTE MADURO</b>					
ápice	10-15	28-78	35	34.6	14.1
nudo	8-10	53/270	19	52.9	17.7

**Tabla 13.** Regeneración *in vitro* de *S. elegans* a partir de secciones de tallo (ápices y nudos) de plántulas y plantas maduras durante mayo-junio, sembrados en medio Litz + K (1.5 mg/l), 27 ± 2°C, 16 h, 1000 lux.

EXPLANTE JOVEN	LONGITUD (mm)	N/EXP	(%)	CONTAMINADOS (%)	OXIDADOS (%)
ápice	5-10	26/35	74	5.7	0
nudo	3-5	89/123	72	6.5	4
<b>EXPLANTE MADURO</b>					
ápice	10-15	17/32	53	28.0	6.2
nudo	8-10	37/80	46	33.7	12.5

El mayor número de brotes se generó a partir de los ápices (3.6%) de plántulas mientras que en nudos fue de 3.4%. El rango de brotes por individuo, en ápices fue de 2 a 6, y en nudos fue de 0 a 8 brotes por individuo (Tabla 14).

Fue común observar que aquellos nudos tomados de las partes cercanas al ápice (proximales, 1 y 2 por debajo del ápice) regeneraron más brotes (49) que aquellos nudos disectados de regiones cercanas a la raíz (distales, 3 ó más por debajo del ápice) que sólo generaron 29 (Tabla 15).

Tabla 14. Formación de brotes a partir de ápices y nudos de plántulas, cultivados en medio Litz + K (1.5 mg/l),  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , 16 h, 1000 lux.

EXPLANTES JOVENES	NO. DE EXPLANTES	BROTOS FORMADOS	PROMEDIO	RANGO
ápices	34	123	3.6	2-6
nudos	55	190	3.4	0-8

Tabla 15. Formación de brotes a partir de nudos proximales y distales, cultivados en medio Litz + K (1.5 mg/l),  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , 16 h, 1000 lux.

EXPLANTES JOVENES	NO. DE EXPLANTES	BROTOS FORMADOS	PROMEDIO	RANGO
nudos proximales	13	49	3.7	2-3
nudos distales	15	29	1.9	4-7

Los resultados con *S. elegans* concuerdan con lo reportado por Hasegawa, 1979; Hollings y Stone, 1968 (citados por Hu y Wang, 1983) sobre que las yemas terminales tienen un mayor potencial de crecimiento que las laterales. Hasegawa, 1979 (citado por Hu y Wang, 1983) observó en *Rosa* que en un más alto porcentaje, los ápices respondieron desarrollando más individuos que las yemas laterales.

Sen y Sharma (1991) lograron micropropagar *Coleus forskohlii* a partir de ápices de tallo. Así también, Spencer *et al.*, 1993 utilizaron ápices de tallo transformados por *Agrobacterium tumefaciens* en ausencia de reguladores de crecimiento, con el objeto de explorar la producción de terpenos.

Roest y Bokelmann, 1981 (citados por Hu y Wang, 1983) encontraron diferencias en el cultivo de nudos de clavel, compararon cultivos de explantes tomados de la parte superior y la base del tallo y obtuvieron una respuesta de 88.6% y 69.8% respectivamente.

Por su parte van Altvorst et al. (1995) encontraron en su estudio con clavel, un gradiente en la regeneración de brotes adventicios que aumentaba conforme utilizaban explantes cada vez más cercanos al meristemo apical, esta misma respuesta encontraron en cultivos de nudos de Swartzia madagascariensis (Berger y Schaffner, 1995), nudos de Grevillea robusta (Rajasekaran, 1994), ápices de Thymus piperella (Saez et al., 1994).

A partir de secciones de tallo de la especie amenazada Chlorophytum borivilianum se estableció un método de micropropagación como una medida para evitar su extinción (Purohit et al., 1994).

En el medio Litz, con K 1.5 mg/l se generó una plántula por explante, o bien la proliferación de hasta 8 brotes. Esto ofrece la posibilidad de obtener ese mismo número de plantas al repetir el proceso inicial cada 15 y 35 días. Este resultado podría no extrapolarse "al infinito" pues se observó que ya en la F7 la regeneración decayó en forma notoria(70%).

Una posible explicación para esta situación es que la alta concentración de compuestos orgánicos (incluyendo la sacarosa) en el medio Litz, en un momento dado, tuvo un efecto negativo en los cultivos, tal vez en la saturación de las vías metabólicas. Thorpe (1978) señala, que el proceso de regeneración requiere un alto consumo de energía, y encontró en cultivos de callo de tabaco que al aumentar la concentración de sacarosa hasta 3% (p/v) lograba un incremento en el número de regenerantes, pero al rebasar este porcentaje la respuesta disminuía. Este mismo efecto se presentaba

cuando sustituía parte de la sacarosa por manitol (poco o no metabolizable), con lo que concluyó que esta respuesta era por un efecto osmótico.

### c) Oxidación

Un problema persistente fue la necrosis de tejidos provocada por la oxidación, ésta se presentó con mayor frecuencia en los nudos maduros (17%) que en los jóvenes (9.2%) de la primera etapa, y fue ligeramente menor en la segunda, 12% y 4% respectivamente, en tanto que los ápices sólo presentaron oxidación en la primera serie, 4.3% para los explantes jóvenes y 14% para explantes maduros; se observó una sensible disminución de la oxidación en la segunda siembra de ápices del 0 y 6.2% respectivamente (Tablas 12 y 13).

Se observó que la oxidación en nudos maduros se presentó a los pocos días de la siembra, lo que puede estar indicando una gran cantidad de polifenoloxidasas en estos tejidos y que puede alcanzar distintos niveles relacionados a la época del año, la edad del explante y la presencia de tejido semileñoso. No obstante que en el medio Litz se incluyó ácido ascórbico como antioxidante no se observó cambio alguno, así como tampoco cuando los cultivos fueron incubados en condiciones de oscuridad como una medida para evitar los productos dañinos de oxidación fenólica que se forman durante la iluminación (Hu y Wang, 1983). Aquellos explantes que se observaron oxidados, sin crecimiento, se subcultivaron a medio MS con K (1.5 mg/l) donde finalmente regeneraron nuevos individuos y parecieron recuperar su desarrollo, posteriormente se cambiaron de nuevo al medio Litz de regeneración donde continuaron un desarrollo vigoroso. La manifestación de la oxidación de los explantes puede ser provocada por



diversos factores: 1) al disectar los tallos con nudos se requiere realizar dos cortes, uno en su base y otro en su parte superior, con estas heridas son más las células lesionadas que exudan fenoles (von Arnold y Wallin, 1988) y sintetizan polifenoloxidasas que se presentan con carácter oxidativo en los tejidos lesionados; 2) debido a que los tejidos jóvenes (más cercanos al ápice) son menos propensos a oxidarse por la disección que los más maduros (más lignificados) (George y Sherrington, 1984), es posible esperar que en los meses de mayor actividad vegetativa en que se ensayaron los cultivos (mayo-junio) un mayor número de tejidos y células se encontraran en activa división celular y por ello en un estado inmaduro.

En Pistacia la oxidación ocurrió mas frecuentemente en los ápices colectados de las plantas de invernadero que de los explantes provenientes de las plántulas germinadas asépticamente (Alderson y Barghchi, 1982, citados por George y Sherrington, 1984).

En S. elegans se observó que la oxidación en nudos maduros se presentó a los pocos días de la siembra, lo que puede estar indicando una gran cantidad de polifenoloxidasas en estos tejidos, además el ápice se presenta como una estructura que se mantiene en una constante renovación y asociado a ello posiblemente en los meses de mayo-junio la actividad celular permitió una más rápida cicatrización.

De acuerdo a Bidwell (1990) se conocen varias enzimas que oxidan a los fenoles dando quinonas. Dos de las más importantes son la monofenoloxidasas (tirosinasa) y la polifenol oxidasas (catecol oxidasas). Estas enzimas participan en la característica "reacción traumática" de las plantas y contribuyen a la respiración

traumática convirtiendo los fenoles liberados en la herida a quinonas, que son tóxicas a microorganismos, ayudando así a impedir infecciones. El color café que se desarrolla en la herida es un resultado de dicha reacción. Las fenoloxidasas están involucradas en los cambios químicos de los precursores de la lignina y otros componentes celulares. Quizá por esto último en los tejidos más maduros (lignificados) fue más común y extensa la oxidación en S. elegans.

Se observó también que en los tratamientos con altas concentraciones de 2,4-D el proceso de oxidación se aceleró. Rabechault y Martin, 1976 (citados por George y Sherrington, 1984) señalaron que en la palma de aceite, las hojas jóvenes fueron los mejores explantes, pero la extensión del oscurecimiento fué muy sensible a la presencia de auxinas en el medio; es posible pensar que un contenido bajo de auxinas endógenas y bajo o nulo en el medio de cultivo pueden reducir o evitar la extensión de la necrosis por oxidación.

### 3 Trasplante

Un lote de las plántulas regeneradas in vitro fue transferido a condiciones de suelo y aunque la aclimatación a condiciones de invernadero implicó aproximadamente 3 meses, el 100% de las plántulas se lograron adaptar, no sin previamente resolver problemas de deshidratación durante su aclimatación. Este relativo retraso, fue tiempo invertido para reducir la desecación que llegaron a sufrir las hojas. Esta condición tan propensa a la deshidratación es común que la sufran plantas regeneradas in vitro

(Roberts y Matthews, 1995) y se conoce como hiperhidratación que implica cambios en la anatomía, morfología y fisiología (Debergh *et al.*, 1992).

En *S. elegans* entre otros cambios que pudieron presentarse podemos señalar: un tejido epidérmico defectuoso incluyendo una menor superficie cerosa, una delgada cutícula con menor contenido de cutina, pectina y celulosa; los estomas pudieron ser más o menos abundantes con un funcionamiento anormal en el que no cierran en respuesta a un estrés hídrico; y posiblemente una conexión defectuosa entre raíz y tallo (Debergh *et al.*, 1992). Dentro de los factores que pueden provocar esta condición anormal se encuentran: el recipiente, que puede afectar al intercambio gaseoso y con ello la concentración de CO<sub>2</sub>, etileno y vapor de agua; el medio ambiente, donde intervienen los gradientes de luz, temperatura, humedad relativa y aún la posición de los frascos de cultivo en los estantes; el medio de cultivo, afecta con el grado de consistencia, el nivel y tipo de citocinina, la concentración y presencia de algunas sales minerales.

La forma más común en que se intenta reducir la hiperhidratación es aumentando la concentración del agente gelificante para hacer menos disponible el agua y reduciendo o eliminando la citocinina del medio (Debergh *et al.*, 1992; Kataeva *et al.*, 1991).

Dado que la regeneración en *S. elegans* requirió de una concentración relativamente alta de kinetina y sólo de ésta, es posible considerar que el tiempo de exposición a este fitorregulador tuvo relación con la dificultad para establecer las plantas en condiciones de invernadero.

#### **4 Cultivo en Suelo de Semillas, Apices y Nudos de Plantas Adultas**

##### **a) Semillas**

De las 30 semillas sembradas en el sustrato natural de una de las poblaciones del "Desierto de los Leones" provenientes de algunos de los individuos de esta población, al cabo de un mes no se observó que germinara semilla alguna; como tampoco se observaron plántulas originadas de la germinación natural en las poblaciones silvestres visitadas (Desierto de Los Leones y Parque Nacional Cerro del Ajusco).

Por otro lado, de las 30 semillas sembradas fuera del hábitat en charolas con una cubierta de plástico transparente, con riegos diarios, en un plazo de 2 a 3 semanas se obtuvieron 6 individuos (20%) de los cuales sólo 3 (10%) llegaron a la madurez, los tres restantes se marchitaron. Sin embargo un alto porcentaje de semillas que no germinaron *in vitro* e *in situ* permite suponer que deben participar otros factores externos e internos como luz, temperatura, concentración de O<sub>2</sub>, nutrientes y pH o la edad fisiológica de las semillas así como la presencia de sustancias del crecimiento, entre otros, (Bidwell, 1990) que coactúan durante la posible quiescencia o latencia de estas semillas. Quizá un alto número se ve afectado por microorganismos u otros depredadores, que diezman la población inicial de semillas y/o el nivel, el tiempo de acción y la conjunción de los factores, pueden limitar la germinación.

##### **b) Apices y Nudos**

Después de dos meses de haber plantado en suelo ápices y nudos de plantas adultas, del primer lote (protegido con cubierta de plástico), de 15 ápices y 15 nudos, se logró la regeneración de 11 plántulas provenientes de nudos y 9 plántulas a partir

de ápices. De los nudos, comúnmente se desarrollaron dos yemas, observándose las plántulas ramificadas, no más de dos ramas por individuo, esto sugiere que ante la falta de una dominancia apical sólo se desarrollaron las yemas preformadas y no se generaron yemas de nueva formación. En las plántulas formadas por ápices se mantuvo la dominancia apical original pues se desarrollaron en un solo tallo. Del otro lote de 30 nudos y 30 ápices (sin cubierta de protección), se obtuvieron sólo dos plántulas a partir de los nudos y sólo una a partir de los ápices. El resto de las estructuras cultivadas no generaron respuesta alguna y murieron.

Aquellos brotes que se mantuvieron verdes y vivos generaron raíces dentro de los primeros 15 días, y llegaron a alcanzar una altura de 5 a 7 cm, cuando se intentó su adaptación a condiciones semejantes a la de la planta adulta, después de 45 días se marchitaron y no se recuperaron.

En el campo se pudo observar que los nuevos individuos no provienen de semillas sino de la reproducción vegetativa de brotes generados de la base del tallo y posiblemente de yemas axilares de tallos que enraizaron al quedar cubiertos por el suelo, otra posibilidad es que la actividad meristemática en la raíz quizá llega a generar nuevos individuos. Esto fue posible observarlo en la planta transferida fuera de su habitat, ya que algunas ramas que se encontraron dobladas y cerca del suelo presentaban raíces adventicias a la altura de los nudos. Al entrar en contacto con el suelo, las raíces se fijaron a él y se desarrollaron nuevos brotes hasta llegar a constituir un nuevo individuo.

Este proceso es posiblemente predominante en las poblaciones naturales en cierta época y bajo ciertas condiciones. Puede considerarse que cada rama tiene la capacidad de convertirse en un propágulo o unidad de reproducción que depende nutricionalmente en forma directa de sí misma y de la planta pues renueva sus suministros fotosintéticos, a diferencia de lo que ocurre en las semillas que son entidades independientes y cuyas reservas son limitadas.

Los nuevos individuos posiblemente se generaron a partir de yemas axilares en tallos. En ocasiones se observó que nuevos brotes se originaban de zonas muy cercanas a la raíz, pero por la naturaleza del trabajo no fue posible definir su origen.

Para S. elegans se lograron las condiciones para su regeneración parcialmente, a pesar de que se trabajó con diferentes tipos de explantes (jóvenes y maduros) bajo condiciones in vitro. Así también se intentó propagar por vías convencionales los explantes maduros.

Si las técnicas de cultivo de tejidos han de jugar un papel importante en la exploración y en hacer utilizable el potencial que guardan especies silvestres como S. elegans, distintas etapas deberán cubrirse, pero sin duda el establecimiento de un método de regeneración in vitro deberá considerarse de interés primario, por lo que el presente estudio contribuye a cumplir dicho objetivo con base en el conocimiento generado, que puede redundar en la conservación y futuro aprovechamiento de esta especie.

## V CONCLUSIONES

- 1) Con base en las observaciones realizadas en el campo, de la ausencia de plántulas provenientes de semillas, la presencia de óvulos deformes en sus cálices y semillas con tejidos necrosados indican dificultades en la reproducción sexual de las poblaciones visitadas, que pueden ser graves para la especie, o en particular para ciertos genotipos, y más aún si se considera el deterioro que sufre su hábitat por acciones antropogénicas.
  
- 2) La depredación y la polinización constituyen aspectos muy importantes en la reproducción sexual de esta especie, al respecto Dieringer *et al.* (1991) señalan que el género *Salvia* posee lo que podría ser el mecanismo polinizador más complicado dentro de las Lamiaceae. Todo apuntaría hacia la selección natural de individuos con un tipo de reproducción vegetativa exitosa, y con ello su predominio en la(s) población (es) (Dieringer *et al.*, 1991). Estas aseveraciones podrían ser parte de la explicación del porqué de la presencia de semillas sin embrión, óvulos atrofiados y la falta de plántulas provenientes de germinación de semillas en el campo y que se reflejó en un bajo porcentaje de germinación *in vitro*.
  
- 3) De acuerdo a lo anterior es posible que en el hábitat sólo un bajo número de semillas germinen y den origen a nuevos individuos.

- 4) El mayor porcentaje de germinación in vitro (34.8%) se presentó en las semillas que fueron colocadas en germinadores, que aquellas que fueron soportadas por el gel del medio de cultivo, un 4.5% para las semillas previamente escarificadas y 2.9% para las que no se sometieron a la escarificación
  
- 5) No se obtuvo un incremento en el porcentaje de germinación de las semillas pretratadas con GA<sub>3</sub> en la concentración de 1 mg/l.
  
- 6) La regeneración de plántulas a partir de ápices y nudos se logró en presencia de K (1.5 mg/l) en ausencia de 2,4-D y se completó dentro del primer mes de cultivo. Bajo estas condiciones ocurrió el enraizamiento de los explantes, el desarrollo de yemas axilares y la formación de yemas adventicias.
  
- 7) La formación de plántulas y yemas adventicias estuvo asociada al origen, tipo y condición fisiológica de los explantes, así como a la estación del año en que se realizaron los cultivos.
  
- 8) Los tejidos de las partes superiores e inmaduras presentan una mayor capacidad morfogénica que las basales y maduras.



- 9) Se obtuvo la formación de callo, que se caracterizó por ser de tres tipos: friable, poco friable y compacto, en algunos casos de color verde, crema-pardo, blanco con algunas áreas grises.
- 10) Los explantes que tuvieron la capacidad de respuesta para la formación de callo fueron: hoja, entrenudo y raíz para explantes jóvenes y hoja, entrenudo y raquis floral para explantes maduros.
- 11) Los explantes tomados de individuos maduros fueron de brotes de reciente formación cuya condición fisiológica pudo considerarse semejante a la de los explantes de individuos jóvenes pero esto no fue así del todo pues si bien se logró la regeneración en el mismo medio de cultivo (Litz+K 1.5 mg/l), y tuvieron un comportamiento semejante en relación a las siembras hechas en distintos meses del año con una baja y una alta respuesta morfogénica asociada a estas distintas épocas; no obstante estas coincidencias, los explantes jóvenes siempre presentaron una mayor capacidad morfogénica.
- 12) En general se puede establecer que la capacidad para regenerar nuevos individuos se manifestó en el siguiente orden de mayor a menor: ápices y nudos de plántulas, y ápices y nudos de plantas maduras. Hubo una mayor regeneración en primavera (mayo-junio) que a finales de invierno (febrero-abril).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 13) Hubo una mayor producción de brotes a partir de ápices que de nudos.
- 14) Fue posible establecer en suelo plantas regeneradas in vitro
- 15) El hecho de haber regenerado plantas a partir de estructuras de plantas adultas y jóvenes permite señalar que las condiciones de cultivo ensayadas tienen la ventaja de ser aplicables con éxito a un intervalo amplio de condiciones fisiológicas de la planta y lograr la micropropagación.
- 16) Asimismo los resultados de este estudio pueden servir de base para ser aprovechados en el futuro para la obtención de metabolitos secundarios de S. elegans. La pequeña cantidad de biomasa (callo) producida por los distintos tipos de explantes y su oxidación deberán superarse. Sin embargo, el procedimiento aquí definido de regeneración de plantas a partir del cultivo de ápices y nudos puede tener una aplicación inmediata o a corto plazo para la realización de otros estudios sobre esta especie, en la conservación de genotipos de la misma y la selección y propagación de aquellos que contengan una mayor cantidad de aceites esenciales para su aprovechamiento industrial.

## LAMINAS

**Lámina a:** Hojas (H) e Inflorescencias (I) de Salvia elegans.

1. Flor con estilo, estigma y un par de estambres.
2. Cáliz residual.
3. Yemas florales.

**Lámina b:** Cálices conteniendo 1, 2, 3 ó 4 óvulos en desarrollo.

**Lámina c:** Desarrollo de yemas axilares (nudos) de plantas adultas.

1. Nudo recién disectado.
2. Nudo a los 4 días de cultivo.
3. Nudo a los 8 días de cultivo.

**Lámina d:** Yemas axilares y yemas adventicias a partir de plántula.

1. Nudo recién disectado.
2. Crecimiento de yemas axilares a los 6 días.
3. Plántula a los 12 días con desarrollo de yemas axilares, yemas adventicias y raíces.

**Lámina e:** Raíces a partir de hojas de plántulas.

**Lámina f:** Flores en anthesis originadas de yemas florales in vitro

**Lámina g:** Distintos tipos de callo de acuerdo a su origen (explante):

1. Hoja inmadura: de color blanco a grisáceo, compacto y limitado crecimiento.
2. Hoja madura: inicialmente friable, verde, nodular y rápido crecimiento en su inicio.
3. Tallo de planta madura: compacto, pardo desde su inicio (oxidación) y crecimiento muy escaso.
4. Raíz de plántula: de color blanco grisáceo a crema, friable, posteriormente se compacta, forma la mayor cantidad de callo.

# LAMINAS



a



b



c



d



e



g



f

Apéndice I. Medio Murashige y Skoog (1962). Utilizado para la Siembra de Semillas y el Subcultivo de Plántulas de Salvia elegans.

<b>Murashige y Skoog (1962) MS</b>		
<b>Componentes Inorgánicos</b>		
<b>Macronutrientes</b>		<b>Concentración (mg/l)</b>
Nitrato de Amonio	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1,650
Nitrato de Potasio	$\text{KNO}_3$	1,900
Cloruro de Calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
Fosfato de Potasio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
<b>Micronutrientes</b>		
Yoduro de Potasio	KI	0.83
Acido Bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
Sulfato de Manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
Sulfato de Zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
Molibdato de Sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
Sulfato de Cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
Cloruro de Cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{Na}_2\text{EDTA}$		37.3
Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
<b>Componentes Orgánicos</b>		
Inositol		100
Acido Nicotínico		0.5
Piridoxina . HCl		0.5
Tiamina . HCl		0.1
Glicina		2
Sacarosa		30,000
Agar		7,800
<b>pH 5.6</b>		
<b>Medio Basal MS</b>		

Apéndice II. Medio Litz (Litz, 1988). Utilizado para la Regeneración e Inducción de Brotes de *Salvia elegans*.

<b>Macronutrientes del B5 (Gamborg, Miller and Ojima, 1968).</b>		
<b>Micronutrientes y Componentes Orgánicos de Murashige y Skoog (1962) MS</b>		
<b>y Componentes Orgánicos Adicionales</b>		<b>Concentración (mg/l)</b>
<b>Macronutrientes B5</b>		
Nitrato de Potasio	KNO <sub>3</sub>	2,500
Cloruro de Calcio	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	150
Sulfato de magnesio	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	250
Sulfato de Amonio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
Fosfato de Amonio	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	150
<b>Micronutrientes MS</b>		
Yoduro de Potasio	KI	0.83
Acido Bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
Sulfato de Manganeso	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3
Sulfato de Zinc	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6
Molibdato de Sodio	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
Sulfato de Cobre	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025
Cloruro de Cobalto	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> EDTA		37.3
Sulfato ferroso	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8
<b>Componentes Orgánicos MS</b>		
Inositol		100
Acido Nicotínico		0.5
Piridoxina · HCl		0.5
Tiamina · HCl		0.1
Glicina		2
Sacarosa		60,000
Agar		7,800
<b>Componentes Orgánicos Adicionales</b>		
Glutamina		400
Hidrolizado de Caseína		100
Arginina		100
Asparagina		100
Acido Ascórbico		100
<b>pH 6.6</b>		

## VI BIBLIOGRAFIA

- ACHENBACH-H., R. Waibel, M.H.H. Nkunya and H. Ween, 1993. Antimalarial Compounds from Hoslundia opposita. *Phytochemis. (Oxford)* 31: 3781-3784.
- ALEJAR, M.S., F.J. Zapata, D. Senadhira, G.S. Khush and S.K. Datta, 1995. Utilization of Anther Culture as a Breeding Tool in Rice Improvement, 137-142. En: M. Terzi, P. Cella and A. Falavigna (Eds). *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- AMMIRATO, P.V., 1989. Recent Progress in Somatic Embryogenesis. *Newsletter IAPTC No. 57*: 2-16.
- ARIDJIS, H., 1991. Introducción, 11. En: J. Porrit. *Salvemos la Tierra*. M. Aguilar Editor, S.A. de C.V.
- ASHTON, P.S. 1990. Conservation of Biological Diversity in Botanical Gardens, 275. En: E.O. Wilson *Biodiversity*. National Academy Press, Washington, D.C.
- ATLAS NACIONAL DEL MEDIO FISICO, 1987, 33. Instituto de Geografía, UNAM.
- ATTREE, S.M. and L.C. Fowke, 1993. Embriogeny of Gymnosperms: Advances in Synthetic Seed Technology. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 35: 1-35.
- BALANEHRU, S. and B. Nagarajan, 1992. Intervention of Adriamycin Induced Free Radical Damage. *Biochemistry International*, 28: 735, 744.
- BALDOMERO, E., 1986. Estudio Quimiotaxonómico de la Sección Fulgentes del Género Salvia (Labiatae), 5, 6. Tesis de Maestría (Químico) Facultad de Química U.N.A.M. México, D.F.
- BALICK, M., 1991. En: L. Eugene. *Lost Tribes. Lost Knowledge*. Time, 138 (12): 37. Time Magazine Company.
- BANTHORPE, D.V., H.J. Bilyard and G.D. Brown, 1989. Enol Esters of Caffeic Acid in Several Genera of the Labiatae. *Phytochemis.*, 28: 2109-2113.
- BANTHORPE, D.V., J.T. Brown, G.S. Morris, 1990. Accumulation of the Anti-Fungal Diterpene Sclareol by Cell Cultures of Salvia sclarea and Nicotiana glutinosa. *Phytochemis.*, 29: 2145-2148.
- BANTHORPE, D.V., S.A. Branch, C.O. Njar, M.G. Osborne and D.G. Watson, 1986. Ability of Plant Callus Cultures to Synthesize and Accumulate Lower Terpenoids. *Phytochemis.*, 25: 629-636.



- BARBA, A., 1987. Cultivo de Callos, 93-100. En: D.V. Hurtado y M.F. Merino (eds). Cultivo de Tejidos Vegetales, Trillas, México.
- BELARMINO, M.M., T. Abe and T. Sasahara, 1994. Plant Regeneration from Stem: and Petiole Protoplasts of Sweet Potato (*Ipomoea batatas*) and its Wild Relative, *I. lacunosa*. Plant Cell Tiss Org. Cult., 37: 145-150.
- BENTHAM, G. (1832-1836). Labiat. Gen. et Sp. 1xviii. 783 pp.- (1876). Labiatae. In Bentham and Hooker, Genera Plantarum 2: 1160-1223.
- BERGER, K. and W. Schaffner, 1995. In Vitro Propagation of the Leguminous Tree *Swartzia madagascariensis*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 40: 289-291.
- BEVERSDORF, W.D., 1990. Micropropagation in Crop Species, 3-12. En: H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van Der Plas and J. Van Artrijk (Eds.), 1990. Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- BIDWELL, R.G.S., 1990. Fisiología Vegetal. AGT (Ed.) S.A. México, D.F., 138, 456, 610.
- CANTINO, P.D., Harley, R.M. and Wagstaff, S.J., 1992. Genera of Labiatae: Status and Classification. In: R.M. Harley and T. Reynolds (Eds). Advances in Labiatae Science, 511-522. Royal Botanic Gardens, Kew.
- CHARLWOOD, B.V., K.A. Charlwood, 1983. The Biosynthesis of Mono and Sesquiterpens in Tissue Culture. Biochem. Soc. Trans., 11 (5): 592-593.
- CHAVEZ, V.M., 1993. Embriogénesis Somática a partir de Foliolos Jóvenes de Plantas Maduras de *Ceratozomia mexicana* Var. Robusta (Miq.) Dyer (Zamiaceae) Especie en Peligro de Extinción. Tesis Doctoral. Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México, 18,19.
- COLIJN-HOOYMANS C.M., J.C. Hakkert, J. Jansen and J.B.M. Custers, 1994. Competence for Regeneration of Cucumber Cotyledons is Restricted to Specific Developmental Stages. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 39: 211-217.
- CONWAY, W., 1990. Can Technology Aid Species Preservation?. 265. En: E.O. Wilson. Biodiversity. National Academy Press.
- CRONQUIST, A., 1975. Introducción a la Botánica. Compañía Editorial Continental, S.A., México, D.F., 75.
- CROTEAU, R., 1992. Clomazone does not Inhibit the Conversion of Isopentenyl Pyrophosphate to Geranyl, Farnesyl, or Geranylgeranyl Pyrophosphate In Vitro. Plant Physiol. (Bethesda), 98 (4): 1515-1517.

DE LUCA, V. and A.J. Cutler, 1987. Subcellular Localization of Enzymes Involved in Indole Alkaloid Biosynthesis in Catharanthus roseus. *Plant Physiol.*, 85: 1099-1102.

DEBERGH, P., J. Aitken-Christie, D. Cohen, B. Grout, S. von Arnold, R. Zimmerman and M. Ziv. 1992. Reconsideration of the Term Vitrification as Used in Micropropagation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 30: 135-140.

DECLERK, V. and S.S. Korban, 1994. Effects of Source of Macronutrientes and Plant Growth Regulator Concentrations on Shoot Proliferation of Cornus florida. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 38: 57-60.

DELGADO, G., J. Hernández, R. Pereda-Miranda, 1989. Triterpenoids Acids from Cunila lythrifolia. *Phytochemis.*, 28: 1483-1485.

DENG, N.A., F. Gentile, F. Domina, F. Nicolosi, F. Tribulato and A. Vardi, 1995. Recovery of Citrus Somatic Hybrids Tolerant to Phoma tracheiphila Toxin, Combining Selection and Identification by RAPD Markers. En: M. Terzi, R. Cella and A. Falavigna (Eds.) 1995. *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

DENTALI, S.J., J.J. Hoffman, 1992. Potential Antiinfective Agents from Eriodictyon angustifolium and Salvia apiana. *International Journal of Pharmacognosy*, 30: 223-231.

DIERINGER, G., T.P. Ramamoorthy and P.T. Lezama, 1991. Floral Visitors and Their Behaviour to Sympatric Salvia Species (Lamiaceae) in Mexico. *Acta Botánica Mexicana*, 13: 75-83.

DIMAYUGA, R.E., S.K. García, P.H. Nielsen, C. Christophersen, 1991. Carnosol a Diterpene Antibiotic from Lepechinia hastata. *Journal of Ethnopharmacology*, 31(1): 43-48.

DUNSTAN, D.I. and K.C. Short, 1977. Improved Growth of Tissue Cultures of the Onion Allium cepa. *Physiological Plantarum*, 41: 70-72.

ECONOMOU, A.S. and E.M. Maloupa, 1995. Regeneration of Elaeagnus angustifolia from Leaf Segments of In Vitro Derived Shoots. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 40: 285-288.

EHRlich, P. and A. Ehrlich., 1981. *Extinction*, 8, 11, 73, 74, 172, 191. Ballantine Books. New York.

EHRlich, P., 1990. The Lost of Diversity, 22. En: E.O. Wilson. *Biodiversity*. National Academy Press. Washington, D.C.

EL-GAZZAR, A. and L. Watson., 1969a. Taxonomic Study of Labiatae and Related Genera. *New Phytol.* (1970), 69, 452.

EL-GAZZAR, A. and L. Watson., 1969b. Some Economic Implications of the Taxonomy of Labiatae. *Essential Oils and Rusts*. *New Phytol.* (1970) 69, 487, 488.

ELLIS, J.P. and N.D. Camper, 1994. In Vitro Culture of Xanthium strumarium (Cocklebur). Plant Cell Tiss. Org. Cult., 36: 369-372.

EPLING, C., 1939. Synopsis of the South American Labiatae by Carl Epling. Dahlem Alemania. Verlag DES Repertorium.

ERWIN, T.L., 1990. The Tropical Forest Canopy, 123. En: E.O. Wilson. Biodiversity. National Academy Press, Washington, D.C.

ESQUIVEL, B., 1986. Estudio Quimiotaxonómico de la Sección Fulgentes del Género Salvia (Labiatae). Tesis de Maestría (Químico) Facultad de Química, UNAM. México, 5,6.

EZCURRA, E., 1990. El Medio Ambiente y la Concentración Urbana. Oikos 1: S/N, Ene-Feb 1990. Boletín del Centro de Ecología UNAM).

FALK, K.L., J. Gershenzon and R. Croteau, 1990. Metabolism of Monoterpenes in Cell Cultures of Common Sage (Salvia officinalis). Plant Physiol., 93: 1559-1567.

FARNSWORTH, N.R., 1990. Screening Plants for New Medicines, 83. En: E.O. Wilson. Biodiversity. National Academy Press.

FASOLO, F., R.H. Zimmerman and I. Fordham, 1989. Adventitious Shoot Formation on Excised Leaves of In Vitro Grown Shoots of Apple Cultivars. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 16: 75-87.

FAY, M.F., 1994. In What Situations is In Vitro Culture Appropriate to Plant Conservation?. Biodiversity and Conservation, 3: 176-187.

FOWLER, M.W., 1986. Tibtech, 214. Elsevier Science.

FRANCA, S.C., B.W. Bertoni and A.M.S. Pereira, 1995. Antihepatotoxic Agent in Micropropagation Plantlets of Eclipta alba. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 40: 297-299.

GANNA, J.A., G.C. Sharma, A. Zipf, S. Saha, J. Roberts and D.M. Wesenberg, 1995. Genotype Effects on Plant Regeneration in Callus and Suspension Cultures of Avena. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 40: 217-224.

GAMBORG, O.L., R. A. Miller and K. Ojima, 1968. Plant Cell Cultures. I. Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Roots Cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.

GAUTHERET, R.J., 1982. Plant Tissue Culture: The History. In: A. Fujiwara (Ed). Plant Tissue Culture. I.A.P.T.C. Tokyo, 7-12.

GEORGE, E.F. and P.D. Sherrington, 1984. Plant Propagation by Tissue Culture, 44-48, 126, 389-469. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics. Limited. Great Britain.

- GEORGE, M.W. and R. Tripepi, 1994. Cytokinins, Donor Plants and Time in Culture Affect Shoot Regenerative Capacity of American Elm Leaves. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 39: 27-36.
- GONZALEZ, A.G., Z.E. Aguiar, J.G. Luis, A.G. Ravelo and X. Dominguez, 1987. Quinone Methide Diterpenoids from the Roots of Salvia tejana. *Phytochemis.*, 27: 1777-1781.
- GONZALEZ, A.G., Z.E. Aguiar, J.G. Luis, A.G. Ravelo and X. Dominguez, 1989. Diterpenos Efectivos contra Bacterias Gram Positivos., Staphylococcus aureus y Bacillus subtilis. *Revista Latinoamericana Quim.*, 20 (3): 105-110.
- GROUT, B.W.W., 1990. Genetic Preservation In Vitro, 13-22. En: A.J.J. Nijkamp, L.H. van der Plas and J. van Nartijk (Eds), 1990. *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht.
- GUENTHER, E., 1950. Essential Oils of the Plant Family Labiatae, 594, 677, 724. En: E. Guenther. *The Essential Oils*. D. Van Nostrand Company Inc. New York.
- GUEVARA, S. y P. Moreno., 1987. Areas Verdes de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, 231-236. En: *Atlas de la Ciudad de México*. Departamento del Distrito Federal. Secretaría General de Desarrollo Social. El Colegio de México.
- GUPTA, P.K., G. Pullman, R. Timmis, M. Kreiling, W.C. Carlson, J. Grob and E. Welty, 1993. Forestry in 21st Century. *The Biotechnology of Somatic Embryogenesis*. *Biotech.*, 11: 454-459.
- HARRY, I.S. and T.A. Thorpe, 1994. Regeneration of Plantlets through Organogenesis from Mature Embryos of Jack Pine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 37: 159-164.
- HEDGE, I.C., 1992. A Global Survey of the Biogeography of the Labiatae. In: R.M. Harley and T. Reynolds (Eds). *Advances in Labiatae Science*, 7-17. Royal Botanic Gardens, Kew.
- HERNANDEZ, T. y L. de la I. de Bauer, 1989. *La Supervivencia Vegetal ante la Contaminación Atmosférica*, 60. Editorial Futura, S.A.
- HIRATA, T., S. Murakami, K. Agihara and T. Suga, 1990. Volatile Monoterpenoid Constituents of the Plantlets of Mentha spicata Produced by Shoot Tip Culture. *Phytochemis.*, 29: 493-495.
- HOSOKI, T. and S. Katahira, 1994. Micropropagation of Verbena lernera by Node Culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 36: 373-375.
- HOSSAIN, M., B.K. Biswas, M.R. Karim, S. Rahman, R. Islam and O.I. Joarder, 1994. In Vitro Organogenesis of Elephant Apple (Feronia limonia). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 39: 265-268.
- HOYT, E., 1992. *Conservando los Parientes Silvestres de las Plantas Cullivadas*. Addison-Wesley Useroamericana, S.A. Wilmington, Delaware, 1-52.

HU, C.Y., P.J. Wang, 1983. Meristem, Shoot Tip, and Bud Cultures, 177-227. In: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.). Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1. Techniques for Propagation and Breeding. Mcmillan Publishing Co.

HUANG, Y.S. and J.T. Zhang, 1992. Acta Pharmaceutica Sinica, 27 (2): 96-100.

IBRAHIM, K.M., J.C. Collins and H.A. Collin, 1992. Characterization of Progeny of Coleus blumei Following an In Vitro Selection for Salt Tolerance. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 28 (2): 139-145

Inventario Nacional Forestal Periódico, 1994. Subsecretaría Forestal y de Fauna Silvestre. S.A.R.H., 31-70.

IUCN., 1986. Boletín de la Plantas Amenazadas, 3. IUCN Conservation Monitoring Centre.

IUCN., 1990. En: J.A. Mcneely, R.K. Miller, R.A. Mittermeier and T.B. Werner. Biological Diversity: What it is and Why it is Important, 17. IUCN, WRI, CI, WWF and The World Bank, Gland.

JACOBS, W.P., 1979. Plant Hormones and Plant Development. Cambridge University Press. New York, 122, 268.

JORDAN, A.M., M.C. Calvo and J. Segura, 1990. Morphogenesis in Callus and Single Cell Cultures of Lavandula latifolia, Medicus. Journal of Horticultural Science, 65(1): 49-53.

KARTHA, K.K., 1985. Cryopreservation of Plant Cells and Organs. Newsletter, International Association of Plant Tissue Culture, 45: 2-15.

KATAEVA, N.V., I.G. Alexandrova, R.G. Bulenko and E.V. Diagavloeva, 1991. Effect of Applied and Internal Hormones on Vitrification and Apical Necrosis of Different Plants Cultured In Vitro. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 27: 149-154.

KOHMURA, H., H. Araki and M. Imoto, 1995. Micropropagation of "Yamatoimo" Chinese Yam (Dioscorea opposita) from Immature Leaves. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 40: 271-276.

KONOSHIMA, T., M. Kokumai, M. Kosuka, M. Inuma and Mizuno, 1992. Studies on Inhibitors of Skin Tumor Promotion: Inhibitory Effects of Flavonoids from Scutellaria basicalensis. Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo), 40 (2): 531-533.

KOSAI, T., Y. Kitaya, K. Fujiwara and J. Adelberg, 1995. Environmental Control for Large Scale Production of In Vitro Plantlets, 659-667. En: M. Terzi, R. Cella, A. Falavigna (Eds.). Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- KUKREJA, A.K., O.P. Dhawan, A.K. Mathur, P.S. Ahuja and S. Mandal, 1991. Screening and Evaluation of Agronomically Useful Somaclonal Variations in Japanese Mint (Mentha arvensis) L. *Euphytica*, 53 (3): 183-192.
- LAPPIN, G.J., J.D. Stride and J. Tampion, 1987. Biotransformation of Monoterpenoids by Suspension Cultures of Lavandula angustifolia. *Phytochemis.*, 26: 995-997.
- LATHA, P.G. and S. Seeni, 1994. Multiplication of the Endangered Indian Pitcher Plant (Nepenthes khasiana) through Enhanced Axillary Branching In Vitro. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 38: 69-71.
- LAWRENCE, G.H.M., 1969. *Taxonomy of Vascular Plants*, 688, 691. The Macmillan Company: New York.
- LESSER, H., 1994. Areas Naturales Protegidas. *Revista "Mundo Celular"*, 44-47.
- LI, C.P., K.H. Yung and K.W. Chu, 1991. Hypotensive Action of Salvia miltiorrhiza. *Cell Culture Extract. American Journal of Chinese Medicine*, 18: 157-166.
- LI, Z.T., B.J. Yang and G.E. Ma, 1991. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 26 (3): 209-213.
- LIN, L.Z., Wang, X.M., Huang, X.L., Huang, Y. and Cordell, G.A., 1989. Sapriolactone, a Cytotoxic Norditerpene from Salvia prionitis. *Phytochemis.* 28 (12): 3542-3543.
- LINDEN, E., 1991. Lost Tribes, Lost Knowledge. *Time*, 138 (12): 32. Time Magazine Company.
- LITZ, R.E. and V. Jaiswal, 1991. Micropropagation of Tropical and Subtropical Fruits, 247-263. En: P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (Eds). *Micropropagation., Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- LITZ, R.E., 1988. Somatic Embryogenesis from Cultured Leaf Explants of the Tropical Tree Euphoria longan. *Stend. J. Plant Physiol.*, 132: 190-193.
- LITZ, R.E., P.A. Moon and V.M. Chávez, 1995. Somatic Embryogenesis from Leaf Callus derived from Mature Trees of the Cycad Ceratozomia hildae (Gymnospermae). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 40: 25-31.
- LOPEZ-ESCAMILLA, A.L., 1995. Evaluación de la Sobrevivencia In Vitro de Diferentes Especies Vegetales Sometidas a Temperaturas Super-Bajas. Tesis de Maestría (Biología Vegetal). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
- LOYOLA, H., 1985. Micropropagación de Especies Herbáceas, 65-66. En: M.L. Robert y V.M. Loyola (Compiladores). *El Cultivo de Tejidos Vegetales en México*. CICY y CONACYT, México.

LOYOLA-VARGAS, V.M. 1990. Preface. En: Production of Secondary Metabolites from Plant Tissue Cultures and its Biotechnological Perspectives. V.M. Loyola-Vargas Editor (CICY), Yucatán.

LOZOYA, S.H., 1985. Micropropagación de Especies Herbáceas, 65-79. En: M.L. Robert, El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. CICY Y CONACYT, México.

MARCOTRIGIANO, M., S. Mcglew, 1990. Laboratory Exercise Demonstrating the Importance of Leaves in the Rooting of Herbaceous Stem Cuttings. Hortscience, 25(11): 1441-1442

MARTIN, C., 1985. Cultivo de Plantas en Probeta. Mundo Científico 5 (44): 160-169.

MASAHIRO, T., K. Okuno, K. Chiba, E. Ohnishi and T. Yoshii, 1993. Antiviral Diterpenes from Salvia officinalis. Phytochemis., 35: 539-541.

MATA, R.M., 1995. Crioconservación de Germoplasma In Vitro de Especies Vegetales de Interés Económico: Análisis de la Eficiencia de un Sistema Sencillo de Congelación. Tesis de Maestría (Biología Vegetal). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.

MCNEELY, J.A., R.K. Miller, R.A. Mittermeier, W.V. Reid and T.B. Werner, 1990. Approaches to Conserving Biological Diversity, 11, 12. En: Conserving the World's Biological Diversity. IUCN, WRI, CI, WWF-US and The World Bank, Gland.

MEIER, K. and G. Reuther, 1994. Factors Controlling Micropropagation of Mature Fagus sylvatica. Plant Cell Tiss. Cult., 39: 231-238.

MELE, E., J. Messeguer, R. Gabarra, J. Tomas, J. Coll and F. Campos, 1992. In Vitro Bioassay for the Effect of Ajuja reptans phytoecdysteroids on Trialeurodes vaporariorum Larval Development. Entomologia Experimentalis et Applicata, 62(2): 163-168.

MEYER, H.J. and J. van Staden, 1995. The In Vitro Production of an Anthocyanin from Callus Cultures of Oxalis lineary. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 40: 55-58.

MISRA, T.N., R.S. Singh, T.N. Ojha and J. Upadhyay, 1981. Chemical Constituents of Hyptis suaveolens. Journal of Natural Products, 6: 735-738.

MISTTRETA, O., 1994. Genetics of Species Re-Introductions: Applications of Genetic Analysis Biodiversity and Conservation, 3: 184-190.

MIYASAKI, H., M. Nasu, T. Yamamoto, Y. Shiomi, H. Ohno, Y. Endo and K. Yoneda, 1987. Effect of Nutritional Factors on Cryptotanshinone and Ferruginol Production by Cell Suspension Cultures of Salvia milliorrhiza. Phytochemis. Oxf. 26(5): 1421-1424.

MOREL, G.M., 1960. Producing Virus-Free Cymbidium. Am. Orch. Soc. Bull, 29: 495-497.

- MOREL, G.M., 1974. Clonal Multiplication of Orchids. In: C.L. Whitner (Ed). The Orchids Scientific Studies. John Wiley and Sons, New York: 169-222.
- MURASHIGE, T., 1974. Plant Propagation through Tissue Cultures. Ann. Rev. Plant Physiol., 25: 135-166.
- MURASHIGE, T. and F. Skoog, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant, 15: 473-497.
- MYERS, N., 1990. Tropical Forests and their Species. Going Going, 28. En: E.O. Wilson. Biodiversity. National Academy Press.
- MYERS, N., 1991. La Desaparición del Bosque, 47, 50, 51. En: J. Porrit. Salvemos la Tierra. M. Aguilar Editor, S.A. de C.V.
- MYERS, N., 1994. Protected Areas. Protected from a Greater "What". Biodiversity and Conservation, 3: 411-418.
- NADASKA, M., K. Erdelsky and P. Cupka, 1990. Improvement of the Czechoslovak Cultivar Perpeta (Mentha piperita) by Means of In Vitro Micropropagation and Stabilization of Contained Substances. Biología (Bralistava), 45(11): 955-960.
- NAKAHIMA, H., K. Sonomoto, H. Morikawa, F. Sato, K. Ichimura, Y. Yamada and Tanaka Atsuo, 1986. Entrapment of Lavandula vera Cells with Synthetic Resin Prepolymers and its Application to Pigment Production. App. Microbiol. Biotechnol, 24: 266-270.
- NAKANO, M., Y. Hoshino and M. Masahiro, 1994. Adventitious Shoot Regeneration from Cultured Petal Explants of Carnation. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 36: 15-19.
- NERVO, G., G. Carannante, M.T. Azzimonti and G.I. Rotino, 1995. Type of Anther Culture Method in Pepper Breeding., Factors Affecting Plantlets Production, 155-160. En: M. Terzi, R. Cella and A. Falavigna (Eds.), 1995. Current Issue in Plant Molecular and Cellular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- NORMAN, D.J. and A.M. Alvarez, 1994. Latent Infection of In Vitro Anthurium Caused by Xanthomonas campestris p.v. differenbachiae. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 39: 55-61.
- OJIMA, K. and K. Ohira, 1978. Nutritional Requirements of Callus and Cell Suspension Cultures, 1978. En: T.A. Thorpe (ed) Frontiers of Plant Tissue Culture, 267-275. I.A.P.T.C., Calgary.
- PEAK, P.W., B.A. Pussel, P. Martyn, S.V. Timmerman and J.A. Charlesworth, 1991. The Inhibitory Effect of Rosmarinic Acid on Complement Involves the C5 Convertase. International Journal of Immunopharmacology, 13: 853-858.



- PEÑA, L.M., 1990. Some Examples of Economically Important Plant Secondary Metabolites, 21, 23. En: Production of Secondary Metabolites from Plant Tissue Cultures and its Biotechnological Perspectives. V.M. Loyola-Vargas (Ed) (CICY). Yucatán, México.
- PETERS, R.L., 1990. The Effect of Global Climatic Change on Natural Communities, 450-451. En: E.O. Wilson. Biodiversity. National Academy Press.
- PHAN, C.T. and P. Hegedus, 1986. Possible Metabolic Basis for the Developmental Anomaly Observed in In Vitro Culture, Called "Vitreous Plants". Plant Cell Tiss. Org. Cult., 6: 83-94.
- PORRIT, J., 1991. Las Cifras Agobiantes, 117. En: J. Porrit. Salvemos la Tierra. M. Aguilar Editor, S.A. de C.V.
- PUROHIT, S.D., D. Ashish and K. Gotam, 1994. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 39: 93-96.
- RAJ, M., R.A. Vishwakarma and R.S. Thakur, 1989. Abietane Diterpenoids from Coleus zeylanicus. Phytochemis., 28: 3135-3137.
- RAJASEKARAN, P., 1994. Production of Clonal Plantlets of Grevillea robusta in In Vitro Culture Via Axillary Bud Activation. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 39: 277-279.
- RAMAMOORTHY, T.P. y M. Elliott, 1993. Mexican Lamiaceae: Diversity, Distribution, Endemism and Evolution. En: Biological Diversity of Mexico. Origins and Distribution. Ed. by T.P. Ramamoorthy, Robert Bye, Antonio Lot, John F., New York Oxford Press.
- RAVEN, P.H., 1976. Ethics and Attitudes, 155, 157. En: J.B. Simmons, R.I. Beyer, P.E. Brandham, G.L.I. Lucas and T.H. Parry (Eds). Conservation on Threatened Plants. Plenum Press. New York.
- RAVEN, P.H., 1990. Our Diminishing Tropical Forest, 21. En: E.O. Wilson. Biodiversity. National Academy Press.
- RAVEN, P.H., 1991. La Riqueza de la Vida, 71. En: J. Porrit. Salvemos la Tierra. M. Aguilar Editor, S.A. de C.V.
- RICHARDSON, P., 1992. The Chemistry of the Labiatae: An Introduction and Overview. In: R.M. Harley and T. Reynolds (Eds). Advances in Labiatae Science, 291-297. Royal Botanic Gardens, Kew.
- ROBERTS, A.V. and D. Matthews, 1995. The Propagation In Vitro of Chrysanthemum for Transplantation to Soil. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 40: 191-193.
- RODRIGUEZ-HAHN, L., B. Esquivel and J. Cárdenas, 1994. Clerodane Diterpenes in Labiatae, 147. En: W. Herz, G.W. Kirby, R.E. Moore, W. Steglich and Ch. Tam. En: Progress in Chemistry of Organic Natural Products. Springer-Verlag. New York.

RODRIGUEZ-HAHN, L., B. Esquivel, A.A. Sánchez, C. Sánchez, J. Cárdenas y T.P. Ramamoorthy, 1989. Diterpenos Abietánicos de Salvias Mexicanas. Rev. Latinoamer. Quim., 20: 105-110.

RODRIGUEZ-HAHN, L., B. Esquivel, J. Cárdenas and T.P. Ramamoorthy, 1992. The Distribution of Diterpenoids in Salvia. In: R.M. Harley and T. Reynolds (Editors). Advances in Labiatae Science, 335-347. Royal Botanic Gardens.

RZEDOWSKY, J., 1978. Vegetación de México, 264. Editorial Limusa, México.

SAEZ, F., P. Sánchez and A. Piqueras, 1994. Micropropagation of Thymus piperella. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 39: 269-272.

SANCHEZ, A.A., B. Esquivel, A. Pera, J. Cárdenas, M. Soriano García, A. Toscano and L. Rodríguez-Hahn, 1987. Lasianthin a Neo-clerodane Diterpenoid from Salvia lasiantha. Phytochemis., 26: 479-482.

SCORTICHINI, M. and M.P. Rossi, 1989. In Vitro Activity of Some Essential Oils Against Some Isolates of Erwinia amylovora. Acta Phytopatologica et Entomologica Hungarica 24: 423-432.

SEN, J. and A.K. Sharma, 1991. In Vitro Propagation of Coleus forskohlii Briq. for forskolin Synthesis. Plant Cell Reports, 9(12): 696-698.

SHARMA, N., K.P.S. Chandel and V.K. Srivasta Va, 1991. In Vitro Propagation of Coleus forskohlii Briq. Plant Cell Reports, 10 (2): 67-70.

SHARP, W.R., M.R. Sondahl, I.S. Caldas and S.R. Maraffa, 1980. The Physiology of In Vitro Asexual Embryogenesis, 268-310. En: J. Janick (ed). Horticultural Reviews, Vol. 2. Purdue University. Avi Publishing Co. Westport.

SIMMONDS, M.S.J. and W.M. Blaney, 1992. Labiatae-Insect Interactions: Effect of Labiatae derived Compounds on Insect Behaviour. In: R.M. Harley and T. Reynolds (Eds.). Advances in Labiatae Science, 375-392. Royal Botanic Gardens, Kew.

SMITH, M.A.L., 1995. Large Scale Production of Secondary Metabolites, 669-674. En: M. Terzi, R. Cella and A. Falavigna (Eds.), 1995. Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

SOSA, I., 1991. Inexorable, el Avance de la Mancha Urbana sobre las Areas de Conservación Ecológica. Diario El Financiero, 5 de abril, 40.

SPENCER, A., J.D. Hamill and M.J.C. Rhodes, 1993. In Vitro Biosynthesis of Monoterpenes by Agrobacterium Transformed Shoot Cultures of Two Mentha Species. Phytochemis., 32(4): 911-919.

STABA, E.J., 1980. Tissue Culture as a Source of Biochemicals, 2. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

SULAIM, I.M., 1994. Regeneration of Plantlets through Organogenesis in the Himalayan Yellow Poppy, Mecanopsis paniculata. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 36: 377-380.

SWAMINATHAN, M.S., 1990. Foreward, 9. En: J.A. Mcneely, R.K. Miller, R.A. Mittermeier and T.B. Werner. Conserving the World's Biological Diversity. IUCN, WRI, CI, WWF and The World Bank, Gland.

TAKEDA, Y., T. Ichihara, T. Fujita and A. Veno., 1989. Ent-Kaurenoids from Rabdosia umbrosa. Phytochemis., 28: 1691-1694.

THORPE, T.A. (Ed), 1978. Frontiers of Plant Tissue Culture. Proc. 4th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, 1978. I.A.P.T.C., Calgary.

THORPE, T.A., 1978. Physiological and Biochemical Aspects of Organogenesis In Vitro, 19-58. En: T.A. Thorpe. Frontiers of Plant Tissue Culture, 1978. I.A.P.T.C., Calgary.

TISSERAT, B., 1985. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration, 79. En: R.A. Dixon (Ed). Plant Cell Culture, a Practical Research. I.R.L., Press, Oxford.

TOLEDO, V.M., 1988. La Diversidad Biológica de México. Ciencia y Desarrollo.14 (81): 17, 22,23.

TURK, A.B., H.J. Swartz and R.H. Zimmerman, 1994. Adventitious Shoot Regeneration from In Vitro Cultured Leaves of Rubus Genotypes. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 38: 11-17.

VAN ALTVORST, A.C., S. Yancheva and H. Dons, 1995. Cells within the Nodal Region of Carnation Shoots Exhibit a High Potential for Adventitious Shoot Formation. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 40: 151-157.

VASIL, I.K., 1995. Cellular and Molecular Genetic Improvement of Cereals, 5-15. En: M. Terzi, R. Cella and A. Falavigna (Eds.), 1995. Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

VON ARNOLD, S. and A. Wallin, 1988. Tissue Culture Methods for Clonal Propagation of Forest Trees. Newsletter, I.A.P.T.C. No. 56: 2-13.

VOVIDES, A.P., 1989. Problems of Endangered Species Conservation in Mexico: Cycads an Example. Encephalartos No. 20: 29-35.

WALKEY, D.G.A., 1978. In Vitro Methods for Virus Elimination, 243-254. En: T.A. Thorpe (Ed.). Frontiers of Plant Tissue Culture, 1978. I.A.P.T.C., Calgary.

WEBB, J.K., D.V. Banthorpe and D.G. Watson, 1984. Monoterpene Synthesis in Shoots Regenerated from Callus Cultures. *Phytochemis.*, 23: 903-904.

WETHERELL, D.F., 1985. *Plant Tissue Culture*, 2, 3. J.J. Head (Ed.). Carolina Biological Supply Company. Burlington, North Carolina.

WHITE, P.R., 1939. Potentially Unlimited Growth of Excised Plant Callus in an Artificial Nutrient. *Am. J. Bot.*, 26, 59-64.

WILSON, E.O., 1989. *La Biodiversidad Amenazada. Investigación y Ciencia*. No. 158: 68.

WILSON, E.O., 1990. The Current State of Biological Diversity, 3, 5, 11, 15. En: E.O. Wilson. *Biodiversity*. National Academy Press.

YAMAGISHI, T., D. Cheng Zhang, J.J. Chang, D. Mc Phail, T. Mc Phail and K. Hsiung Lee, 1988. The Cytotoxic Principles of *Hyptis capitata* and the Structures of the New Triterpenic Hyptalic Acid-A and B. *Phytochemis.*, 27: 3213-3216.

YASUMA, I., I. Mase and Y. Tomita, 1989. Abietane Type Diterpenoids from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemis.*, 28: 3139-3141.

ZENK, M.H., 1978. The Impact of Plant Tissue Culture on Industry and Agriculture, 1-13. En: T.A. Thorpe (Ed.) *Frontiers of Plant Tissue Culture*, 1978. IAPTC, Calgary.