

00381



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

2
Lej

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTUDIO DE LAS CONDICIONES PARA LA
MICROPROPAGACION DE DAMIANA
(*Turnera diffusa*).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
P R E S E N T A :
LILIA ALCARAZ MELENDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE GERONIMO ABRAHAM RUBLUO ISLAS

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

274750

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

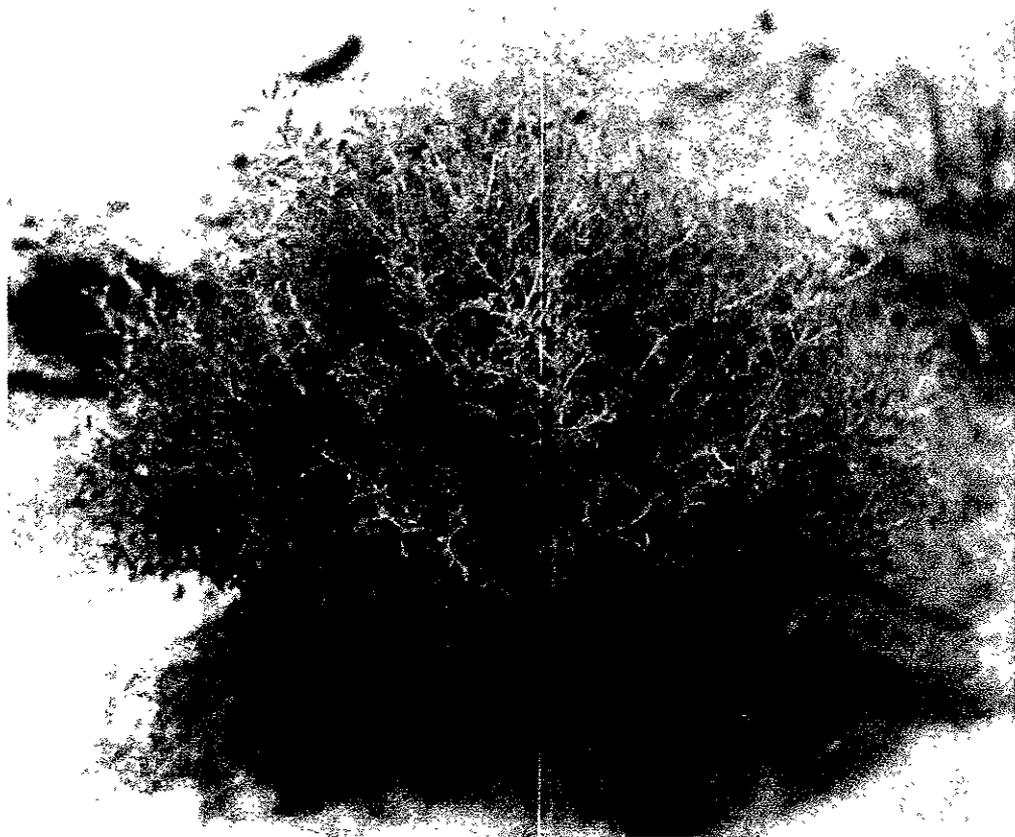
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.

PAGINACION .

DISCONTINUA.



Damiana
(*Turnera diffusa*)

DEDICATORIA

Realizo este trabajo con mucho cariño a:

Dios que me ha dado Todo

A mis padres Manuel Alcaraz Guadarrama y Bertha Meléndez de Alcaraz que con su apoyo y ejemplo me ayudaron a salir adelante

A Teodoro Reynoso Granados quien con sus consejos, ayuda siempre valiosa y su apoyo absoluto en todo momento me permitieron avanzar, continuar y llegar a la meta

A Alejandro y Bertha Alcaraz Meléndez quienes con su ternura y empeño me otorgaron una invaluable ayuda.

A Raúl Reynoso Granados por las asesorías y sugerencias benéficas que me aportó.

A Don Teodoro Reynoso Bermejo y Alicia Granados y Juárez por favorecerme e impulsarme para seguir adelante.

A Don Jesús Díaz González por compartir su valiosa experiencia.

GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al Director General del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. , Dr. Mario Martínez García, todas las facilidades y el impulso para que se lograra avanzar en este trabajo.

Un profundo agradecimiento al Tec. Sergio Real Cosío, por su eficiente y excelente apoyo técnico en el desarrollo de este estudio.

Al Dr. Abraham Rubluo Islas, le agradezco haber aceptado dirigir esta tesis, que con sus sugerencias ayudaron de manera sustancial a mejorar la calidad de esta investigación.

Al Dr. Manuel Robert, quien con su experiencia en el tema de cultivo de tejidos vegetales ayudó a fortalecer la presentación de este trabajo.

A la Dra. Cristina Pérez Amador y al Dr. Guillermo Laguna en quienes siempre encontré una gran ayuda y una magnífica disposición durante el progreso de esta tesis.

Al Dr. Rafael Salgado, al Dr. Manuel Jiménez y a la Dra. Guadalupe Palomino, les agradezco las sugerencias y comentarios que hicieron en la revisión del manuscrito, gracias a los cuales se mejoró la versión final.

Agradezco también a la Dra. Margarita Collazo su ayuda siempre gentil y su trato de gran calidad humana, que me permitió progresar para poder cumplir con este objetivo.

A la Dra. Judith Márquez que con su optimismo me ayudó a continuar en los momentos claves para finalizar esta tarea.

A mis amigos del Departamento de Informática del CIBNOR, quienes me ayudaron a obtener toda clase de información con gran eficiencia, Ma. Esther Ojeda, Edgar Yuen, Tony Díaz, Horacio Goytortúa, Verónica Vázquez y Josefina Villa.

INDICE

I. Resumen	1
II. Abstract	3
III. Introducción	5
IV. Antecedentes	7
1. Importancia de las plantas como fuente de metabolitos de interés antropocéntrico.	7
2. Importancia de la extinción de las especies productoras de fármacos	11
3. Domesticación de especies	13
3.1 Evolución de plantas bajo domesticación	14
3.2 Proceso de domesticación	15
4. Las zonas áridas, su interés e importancia	18
5. Características e importancia de la damiana	22
5.1 Características y clasificación taxonómica de la damiana	22
5.2 Ecosistemas donde se desarrolla la damiana	23
5.3 Usos e importancia económica de la damiana	26
6. Aplicación de la biotecnología	28
7. Cultivo de tejidos vegetales	34
7.1 Descripción del cultivo de tejidos	34
7.2 Selección de explantes	34
7.3 Factores importantes en el cultivo de tejidos	35
7.4 Micropropagación	39
7.4.1 Desarrollo de yemas axilares o apicales	44
7.4.2 Desarrollo de brotes adventicios	45
7.4.3 Embriogénesis somática	45
7.5 Criterios de éxito en la micropropagación	48
7.6 Calidad de las plantas micropropagadas en relación a las plantas silvestres y cultivadas	49
7.7 Factor económico en la micropropagación	51
V. Objetivos	53
1. Objetivos generales	53
2. Objetivos específicos	54
VI. Materiales y métodos	55
1. Material biológico	55

2. Cultivo <i>in vitro</i>	57
3. Cultivo <i>ex vitro</i>	59
4. Análisis de los aceites esenciales	60
5. Análisis estadísticos	62
VII. Resultados	63
1. Selección de explantes para la micropropagación de damiana	63
2. Pruebas de esterilización de los explantes	63
3. Cultivo <i>in vitro</i> de explantes de damiana	63
3.1 Organogénesis con diferentes medios nutritivos y reguladores de crecimiento	64
3.2 Organogénesis probando diferentes fuentes de explantes y reguladores de crecimiento	72
3.3 Inducción de raíces	76
4. Análisis de aceites esenciales	81
VIII. Discusión	83
1. Selección de explantes	83
2. Esterilización de los explantes	84
3. Cultivo <i>in vitro</i> de explantes de damiana	85
3.1 Organogénesis variando medios y reguladores de crecimiento	85
3.2 Organogénesis variando fuentes de explantes y reguladores de crecimiento	88
3.3 Inducción de raíces	89
4. Cultivo <i>ex vitro</i> de damiana	91
5. Análisis de aceites esenciales de damiana	93
IX. Conclusiones	94
X. Bibliografía	
XI. Anexo	
1. Medios de cultivo	
2. Calendario de producción de damiana propagada por cultivo de tejidos	
3. Clima en la Cd. de La Paz, Baja California Sur	
XII. Publicaciones	

ESTUDIO DE LAS CONDICIONES PARA LA MICROPROPAGACION DE DAMIANA (*Turnera diffusa*).

I. RESUMEN

Damiana es una planta arbustiva caducifolia que en condiciones silvestres mide entre 0.3 a 2 m de altura. Se desarrolla dentro de la vegetación denominada Matorral Xerófilo, con clima árido a semi-árido. Esta planta tiene importancia socio-económica porque sus hojas se emplean para preparar bebidas de infusión, como saborizante de licor y tiene usos medicinales. A pesar de la importancia de la damiana, la única fuente de producción son las plantas silvestres, debido a que no se conocen las condiciones para la germinación de la semilla y no se han encontrado otros métodos de propagación, lo cual provoca una producción irregular. Así mismo, la escasa distribución y la imposibilidad de su cultivo pueden provocar que al aumentar la demanda exista el peligro de extinción de dicha especie debido a una sobre explotación. Por estas razones, el objetivo general del presente trabajo fue implementar una tecnología enfocada hacia el proceso de domesticación de esta planta por medio de la técnica de cultivo de tejidos vegetales.

Los objetivos específicos fueron:

- 1) Investigar las condiciones que favorecieran la propagación de la planta de damiana por medio de la técnica de cultivo de tejidos.
- 2) Estudiar los requerimientos para la adaptación de estas plantas desarrolladas *in vitro* al transplantarlas a macetas.
- 3) Llevar a cabo investigaciones sobre la adaptación de estas plantas al sembrarlas en el campo experimental.
- 4) Analizar y comparar el contenido de lípidos totales y aceites esenciales de las plantas de damiana micropropagadas y plantas silvestres.

En la metodología empleada se establecieron las condiciones de asépsia para el cultivo de explantes de hojas; se probaron 2 medios de cultivo diferentes y un total de 78 combinaciones de reguladores de crecimiento.

Los resultados mostraron que en el medio MS después de 3 meses se iniciaba el desarrollo de hojas y a los 9 meses se desarrollaron plantas completas y posteriormente se resembraron para obtener brotes nuevos para la formación de nuevas plántulas. Después de obtener las plántulas *in vitro*, se transplantaron a macetas y se mantuvieron en un cuarto de cultivo con condiciones controladas, con 70% de humedad, luz y temperaturas controladas. En cuanto se adaptaron a macetas se transplantaron al campo con una sobrevivencia del 90%. Se sembraron 60 plantas en el campo experimental del CIBNOR a una distancia de 1 m entre cada una, regándose cada 8 días durante 3 meses, cada 15 días durante 6 meses y posteriormente cada mes. Después de transplantar las plantas al campo, se podaron cada año. Se cuantificó la producción durante 3 años consecutivos y posteriormente al 8 año, tomando el peso fresco y peso seco de hojas y tallos, hojas solamente y tallos solamente. Se analizó el contenido de lípidos totales y aceites esenciales de las plantas micropropagadas (transplantadas al campo experimental) y de plantas silvestres; después de comparar los resultados estadísticamente, no se observaron diferencias significativas entre los dos tipos de plantas.

En conclusión, de acuerdo con los resultados obtenidos, durante los 8 años de investigación sobre la micropropagación de damiana, se propone que esta tecnología es un método factible para la propagación y un importante avance en el proceso de domesticación de la damiana.

II ABSTRACT

Damiana (Turnera diffusa) is a deciduous shrub. In wild conditions it grows 0.3 to 2.0 m high in arid and semiarid regions. This plant has socioeconomic importance because its leaves are used, by infusion, for drinks, as liquor flavoring, and for medicinal uses. In spite of the importance of damiana, the only production source is the wild plant, because seed germination conditions or other propagation methods are not known. This causes an irregular production. The scarce distribution and the impossibility of its cultivation cause the species to be endangered because of overexploitation. For these reasons, the general objective of the present work was implement a technology focused toward the domestication of this plant by means of plant tissue culture technique.

The specific objectives were:

- 1) Investigate the conditions for successful propagation using plant tissue culture technique.
- 2) Study the requirements for adaptation of these plants developed in vitro for transplant to pots.
- 3) Investigate conditions to transplant these plants to an experimental field and obtain yield.
- 4) Analyze and compare the content of total lipids and essential oils between micropropagated and wild plants.

With the methodology proved, we worked out the sterilization conditions of the leaf explants. We tested two different media and two different source of explants. Different combinations of plant growth regulator (78) were tested.

Results showed development of leaves in MS media after 3 months and complete plants were developed after 9 months. Later in each transplant we obtained new buds and afterwards new plants. In vitro plants were transplanted to pots and grown at 70% humidity in a light and temperature controlled room. After adaptation in pots, plants were transplanted to the field with 90% survival. Plants (60) were sown in the CIBNOR experimental field. They were irrigated every 8 days for three months,

every 15 days for 6 months and in the following years each month. Yield was measure by pruning each year for 3 years and at year 8. We weighed leaves and stems, both fresh and dry weight. Total lipids and essential oils from the leaves of wild and micropropagated plants growing in the field were analyzed. There was no significant difference between them.

In conclusion, with results obtained over 8 years of research on damiana micropropagation, we propose this technology is a feasible method for propagation and an important advance in the domestication process of damiana.

III INTRODUCCION

La conservación de los recursos naturales, especialmente las plantas silvestres con valor socio-económico, es un punto que interesa a varios sectores de la sociedad.

La extinción de algunas especies de interés farmacológico, puede provocar la pérdida de compuestos de interés para la terapéutica. Así mismo, son importantes las plantas de las zonas áridas, ya que desarrollan estrategias de sobrevivencia para tolerar las altas temperaturas y la sequía; al cultivar este tipo de plantas pueden hacerse productivas las zonas áridas, donde los cultivos tradicionales difícilmente se desarrollarían.

Es por ésto, que es importante el cultivo para la conservación de estas especies, como es el caso de la damiana (*Turnera diffusa*), que es una planta arbustiva caducifolia en condiciones silvestres, mide entre 0.30 a 2 m de altura, con tallos ramificados, lisos y rectos, de color pardo rojizo, flores axilares pequeñas de 8 a 12 mm color amarillo brillante; el fruto es una cápsula ovoide de 4-6 mm de longitud color verde, dehiscente del ápice a la mitad, trivalvar; semilla de color café o blanquecino cremoso, testa dura de superficie áspera (Thomson, 1980). Se desarrolla dentro de la vegetación denominada Matorral Xerófilo, esta vegetación se encuentra a una altitud de 0-300 msnm con clima de árido a semi-árido, con temperaturas medias anuales de 22.1 a 24°C con máximas de 40°C en los meses de Julio y Agosto y mínimas de 12°C en los meses de Enero y Diciembre; baja precipitación pluvial con una media anual de 180 a 267 mm; los suelos son de textura ligera, clasificados como migajón arenoso o arena migajonosa, con pH ligeramente alcalino, pobres en nitrógeno (Wiggins, 1980). La damiana tiene importancia socio-económica, porque sus hojas se emplean para preparar bebidas de infusión, como saborizante de licor y tiene uso medicinal. A pesar de la importancia de la damiana, la única fuente de producción son las plantas silvestres, debido a que no se conocen las condiciones para la germinación de la semilla y no se ha desarrollado un método para la propagación, lo cual provoca una producción irregular. La escasa distribución y la imposibilidad de su cultivo puede provocar que al aumentar la demanda se lleve a

esta especie hacia el peligro de extinción debido a una sobre-explotación (Alcaraz-Meléndez, *et al.* 1994).

Por lo anterior, la micropropagación de damiana es una buena alternativa para conservar y reproducir esta especie, debido a que esta técnica tiene ventajas tales como:

Disponibilidad permanente del recurso; es posible controlar las condiciones medio ambientales de propagación, como son la calidad e intensidad de luz, temperatura, humedad, etc.; dosificación de nutrientes que requiere la especie; no existe influencia de microorganismos como, bacterias, algas, hongos o invertebrados microscópicos en el desarrollo de la planta; producción masiva de un clon con características genéticamente deseables, lo cual acelera el proceso de domesticación con un ahorro considerable de tiempo y favorece la propagación a gran escala en un espacio reducido.

IV ANTECEDENTES

1. IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS COMO FUENTE DE METABOLITOS DE INTERES ANTROPOCENTRICO.

Las plantas son la fuente primaria de la vida por el proceso de la fotosíntesis, pero además, las ramas y hojas han protegido al hombre, proporcionando calor al prender la leña, alimentándolo con frutos, semillas y raíces. Gradualmente, en un proceso de ensayo y error, el hombre fue descubriendo las plantas que se podían o no comer y también descubrió ciertas cualidades mas allá de la simple alimentación, como fibras para elaborar vestidos, tinturas para teñir la ropa, el cuerpo o el cabello, perfumes extraídos de las flores, analgésicos contra el dolor, alivio contra la fiebre, entre otros muchos usos.

El uso medicinal de las plantas y su eficiencia desde tiempos remotos, ha influido para promover la investigación sobre la búsqueda de nuevos compuestos biológicamente activos a partir de fuentes naturales. Actualmente el 75% de la población emplea plantas o sus extractos y otras herramientas de la medicina tradicional, reportándose alrededor de 121 compuestos clínicamente aceptados como medicamentos a nivel mundial (Abelson, 1990).

Las plantas han sido una fuente importante de medicamentos porque producen moléculas bioactivas, muchas de las cuales probablemente actúan como defensa química contra depredadores o infecciones, en la tabla 1 se describen algunas de las más importantes plantas que se han empleado tradicionalmente como medicina antes de que los científicos empezaran a analizar los componentes químicos y detectar los compuestos activos (Cox y Balick, 1994).

Tabla 1. Productos naturales descubiertos por conocimientos etnobotánicos.

PRODUCTO NATURAL	USO MEDICINAL	PLANTA PRODUCTORA
Aspirina	Reduce el dolor y la inflamación	<i>Filipendula ulmaria</i>
Codeína	Disminuye el dolor y suprime la tos	<i>Papaver somniferum</i>
Ipecac	Induce el vómito	<i>Psychotria ipecacuanha</i>
Pilocarpina	Reduce la presión ocular	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
Pseudoefedrina	Reduce la congestión nasal	<i>Ephedra sinica</i>
Quinina	Combate la malaria	<i>Cinchona pubescens</i>
Reserpina	Baja la presión sanguínea	<i>Rauwolfia serpentina</i>
Scopolamina	Disminuye las enfermedades motoras	<i>Datura stramonium</i>
Teofilina	Abre los bronquios	<i>Camellia sinensis</i>
Vinblastina	Combate la enfermedad de Hodgkin	<i>Catharanthus roseus</i>

Soejarto (1996) reporta que una porción significativa de los compuestos farmacéuticos no sintéticos o semi-sintéticos actualmente empleados provienen de plantas superiores, seguido de productos provenientes de microorganismos, animales y por último de minerales.

Los estudios etnobotánicos suponen que el uso que le dan a las plantas los indígenas, pueden ofrecer fuertes señales sobre su actividad biológica. Estos estudios son actualmente uno de los varios métodos que pueden ser aplicados en la búsqueda de plantas para estudios farmacológicos, se estima que 265,000 especies de plantas cubren la tierra y de éstas, menos de la mitad del 1% han sido estudiadas exhaustivamente para valorar su composición química y medicinal (Cox y Balick, 1994).

El material vegetal o animal que se va a buscar o usar para una investigación inicial debe seleccionarse a través de numerosos criterios (Waterman, 1990; Cordell, 1993) tales como:

a) **Información sobre el uso de la medicina tradicional.** Los conocimientos de la medicina tradicional están ampliamente aceptados como indicadores de la presencia de compuestos biológicamente activos en las plantas, es el primer paso para iniciar estudios sobre este campo. El uso continuo y prolongado de una planta en particular en la cultura indígena, para tratar cierta enfermedad es una demostración clara de su eficiencia. La información de los usos medicinales pueden ser obtenidos por medio de interrogatorios a las personas de una cultura en especial (medicina etnobotánica o *etnofarmacología*) (Soejarto, 1996).

b) **Aprovechamiento de la gran diversidad taxonómica del material de origen.**

Una práctica ampliamente adoptada en la investigación de los compuestos naturales de las plantas es hacer una búsqueda en un gran número de muestras para detectar uno o mas compuestos biológicamente activos. La razón de ésto es el hecho de que hay una mezcla en la diversidad taxonómica que refleja una gran variedad de compuestos químicos, debido a que cada especie de planta produce un juego de diferentes sustancias químicas, esta capacidad ha sido desarrollada a través de millones de años de evolución biológica.

c) **Observaciones en el campo enfocadas hacia la interacción entre organismos.**

Las acciones en las que un organismo repele a otro, indican la presencia de defensa química, donde se protege la presa del depredador, pudiendo ser una interacción de planta-insecto, de planta-planta, etc. Este tipo de observaciones se ha incrementado como criterio para evaluar plantas de interés biomédico.

d) **Relaciones quimiotaxonómicas de organismos de los que se conoce previamente algún compuesto con actividad biológica.**

Cuando existen relaciones taxonómicas cercanas, la posibilidad de que los compuestos activos se encuentren en el mismo taxa son muy altas, cuando se encuentra un compuesto de importancia médica o farmacológica los ensayos se hacen buscando el mismo compuesto en taxas cercanas como por ejemplo en otras variedades de la misma especie, otras especies del mismo género u otros géneros pero de la misma familia. Estos conocimientos se basan en la quimiotaxonomía.

e) Resultados prometedores de pruebas biológicas (publicados o no) de un organismo en particular previamente estudiado.

Los resultados de pruebas de laboratorio positivas o prometedoras proveen fuertes bases para regresar al campo y recolectar muestras del mismo taxon pero en gran cantidad para estudios posteriores , como aislamiento de químicos y otros bioensayos.

Cox y Bally (1994), describen que en 1960, los ensayos estándares de búsqueda de varios tipos de drogas, consistía en hacer pruebas inyectando a roedores y esperando a ver si el animal se enfermaba, se mejoraba o presentaba algún otro cambio de comportamiento o de salud. Este tipo de búsqueda consumía mucho tiempo, era costoso y sin precisión. Ahora, treinta años después, los bioensayos son más rápidos, generalmente automatizados y significativamente más específicos. Muchos ensayos pueden hacerse probando la capacidad del extracto para influir en la actividad de una sola enzima involucrada en interacciones bioquímicas que determinan una enfermedad, por ejemplo, los científicos buscan un tratamiento contra el SIDA, el cual pueda inhibir la actividad de la enzima reverso transcriptasa en las células. La reverso transcriptasa codifica para el material genético del HIV que es necesario para reproducir las partículas virales.

Las técnicas para el aislamiento e identificación de compuestos químicos en productos naturales son ahora muchos y más potentes, empleándose técnicas de cromatografía, espectrofotometría de masas y resonancia magnética nuclear principalmente (Abelson, 1990). El Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos ha creado una tecnología revolucionaria para detectar drogas anticáncer, empleando en sus pruebas 60 diferentes líneas celulares de tumores cancerígenos, como por ejemplo tumores de cerebro, leucemia, melanomas, etc. Estas nuevas técnicas de rastreo para drogas anticáncer permiten evaluar alrededor de 20,000 substancias diferentes por año (Abelson, 1990).

Las plantas representan una importante fuente para elaborar las medicinas actuales, consecuentemente la mayoría de las especies de plantas son un reservorio para descubrir nuevos productos bioactivos; la conservación de estos recursos permite la continuidad de su uso desde el punto de vista farmacológico (Soejarto, 1996).

2. IMPORTANCIA DE LA EXTINCION DE LAS ESPECIES PRODUCTORAS DE FARMACOS

La extinción de las especies puede presentarse como una respuesta a los cambios medio-ambientales, al ir cambiando la calidad del bioespacio, las especies han evolucionado y adquirido nuevas adaptaciones o se han extinguido. Los registros fósiles demuestran que como regla general van produciéndose extinciones o pseudoextinciones de forma más o menos continua, aunque las tasas de extinción varían mucho en el tiempo (Newell, 1956). Los organismos altamente especializados están menos capacitados para enfrentarse a los cambios medio-ambientales que los organismos flexiblemente adaptados; los organismos especializados poseen por lo general morfologías elaboradas y esto conduce a la teoría de la senectud racial. Dobzhansky, *et al.* (1980), definen dos tipos de extinción que se traslapan, uno resulta de la disminución del número máximo de especies de toda la biosfera y en el otro que, no se encuentra relacionado con la regulación de la diversidad, se presenta como resultado de cambios ambientales, ya sea factores bióticos o físicos, que resultan deletéreos para las adaptaciones de algunos linajes; el primer tipo depende de la diversidad y el segundo es independiente de ésta.

Las extinciones independientes de la diversidad se producen de forma más o menos continua, la mayoría de los factores independientes de la diversidad son climáticos, al aumentar o disminuir la temperatura o al modificarse la precipitación pluvial, se extinguen las especies.

Las extinciones dependientes de la diversidad pueden llevarse a cabo local o globalmente y en algunos casos han afectado el nivel de diversidad de la biota de todo el planeta, los descensos en el número máximo de especies que provocan extinciones no pueden ser contrarrestados por la diversificación hasta que vuelva a ascender dicha capacidad.

Es imposible predecir que compuestos de interés farmacológico pueden presentarse en especies que no han sido analizadas, la extinción de estas especies puede resultar, por lo tanto, en la pérdida de compuestos importantes para la

terapéutica, existe un gran número de especies en peligro de extinción como *Gingo biloba*, que es una planta antigua, la cual fue salvada de la extinción natural por el hombre y de este árbol se aislaron los compuestos ginkgolides, los cuales son inhibidores potentes del factor activador de las plaquetas y promete ser eficaz en el tratamiento de isquemia y edema cerebral (Huxtable, 1992).

La conservación de las plantas medicinales es importante para mantener las especies y las razas químicas para uso local y aplicaciones futuras, cambiando los patrones de uso de la tierra y la sobre explotación pueden provocar que la vegetación esté en peligro de extinción, como en el caso de las plantas como *Valeriana* (valeriana mexicana) y *Psacalium* (matarique); la disminución de las poblaciones silvestres debido al incremento de la demanda ha propiciado que algunos agricultores mexicanos inicien el cultivo de plantas medicinales populares como *Heterotheca* (árnica) y *Agastache* (toronjil) (Bye et al. 1994).

Farnsworth y Soejarto (1985) hicieron un estudio sobre la pérdida económica que representa la extinción de una especie vegetal con aplicación farmacéutica que se desarrolla en los Estados Unidos; estos cálculos se basan en varios datos como: el número de especies de plantas superiores que se desarrollan en Estados Unidos que es de 20,674 (Kartesz y Kartesz, 1980), y se estima que para el año 2,000 se extinga el 10%, lo que equivale a 2,067 especies. Se llevó a cabo una encuesta sobre las medicinas recetadas e identificaron las que contenían extractos crudos vegetales, mezclas semipurificadas de compuestos activos, solamente los compuestos activos o compuestos activos que han sido modificados químicamente; encontrándose que durante el período comprendido entre 1959-1973 hubo un promedio de 25.36% de medicinas que contenían uno o más compuestos activos derivados de plantas superiores (Farnsworth y Morris, 1976). El número de medicinas recetadas con estas características fue multiplicado por el promedio del precio por cada año (en el período de 1959-1973), obteniéndose así un valor en dólares para 1973 de \$ 3.188 billones de dólares. En 1980, el precio promedio de medicinas con principios activos vegetales era de \$8 dólares y multiplicado este precio por el número de medicinas es alrededor de 1,014 millones , resulta un total de \$ 8.112 billones de dólares. El tercer punto a

considerar para estimar el costo de las especies que pueden extinguirse, es la posibilidad de que contengan algún compuesto activo, aún no descubierto, para controlar algún tipo de enfermedad como cáncer, malaria o hipertensión; estas plantas estudiadas exhaustivamente suman un total de 5,000. De estas 5,000 especies en Estados Unidos, solamente se usan 40, lo que nos indica que 1 especie de cada 125 esta siendo empleada. Tomando los datos anteriores y como se indicó previamente, se calcula que se extinguirá el 10 % de todas las plantas superiores para el año 2,000, lo que corresponde a 2,067 especies. Así, se calculó que 2,067 especies divididas entre 125 resultó que 16 especies empleadas farmacológicamente se habrán extinguido en el año 2,000. Basándose en los cálculos anteriores sobre el valor monetario de las especies que se emplearon en 1980, que fue de \$8.112 billones, ésto determinó el valor de cada especie de las 40 empleadas como medicinales; dividiendo \$8.112 billones entre 40, se obtiene el valor por especie de \$203 millones de dólares, y proyectando la posibilidad de que se extingan 16 especies útiles para el año 2,000 en Estados Unidos, el valor total calculado de pérdida será de \$3.248 billones de dólares.

3. DOMESTICACION DE ESPECIES

La domesticación es un proceso evolutivo dirigido por el hombre, que resulta de la manipulación de los genotipos de plantas y animales. En la domesticación se emplea el sistema de cultivo, que es un proceso donde se manipula el ambiente y se propagan plantas en un medio artificial (Casas y Caballero, 1995). En el cultivo de una especie silvestre es necesario modificar el esquema genético resultante de procesos de selección natural a otro esquema adaptado a condiciones controladas por el hombre y a otros propósitos antropocéntricos (Hernández, 1985).

En la domesticación se obtienen atributos en las plantas como: a) características convenientes para el hombre en las cuales generalmente se reduce la adaptación de las plantas en los hábitats naturales y b) la reducción o total incapacidad para diseminar progenie viable. Así, estos cultivos sobreviven gracias a las condiciones especiales de crecimiento y estrategias de reproducción impuestas por

el hombre (Harlan, 1992; Van Raamsdonk, 1993). Es decir que la domesticación de las plantas implica los esfuerzos deliberados del ser humano para mejorar las antiguas variedades y desarrollar las nuevas variedades de cultivo con el fin de satisfacer las demandas alimenticias y de salud de los seres humanos y de los animales (Borojevic, 1990).

3 1 Evolución de plantas bajo domesticación

Las plantas han ido evolucionando de acuerdo a los diferentes mecanismos de domesticación que les han aplicado. Por ejemplo, en el siglo pasado la remolacha azucarera contenía 9 % de azúcar, actualmente hay variedades que producen arriba del 20 % de azúcar. En la época entre las dos guerras mundiales, las variedades de girasol contenían 30% de aceite, mientras que los híbridos que crecen actualmente contienen 50% de aceite y hay algunos genotipos individuales que llegan a contener hasta el 60% de aceite. Se han observado más desarrollos espectaculares en la producción de legumbres y plantas ornamentales, donde un cambio de color o forma ha llevado a grandes ganancias económicas, como por ejemplo las nuevas variedades de tomate, pimiento y lechuga y la belleza de las nuevas variedades de gladiola, clavel y rosa (Borojevic, 1990).

Después de la segunda guerra mundial, empezaron a desarrollarse nuevos métodos de domesticación y fitomejoramiento, junto con los métodos de hibridación convencionales. Las técnicas nuevas han permitido el desarrollo de nuevas variedades o especies sintéticas que nunca antes habían existido, estas técnicas consisten en, inducción de poliploidía, inducción de mutaciones, ingeniería cromosómica (adición de cromosomas y sustitución), y el más reciente método de fusión de protoplastos y manipulación genética (técnicas de ADN recombinante) (Borojevic, 1990).

La domesticación puede tomar dos caminos evolutivos diferentes, dependiendo de como se usa el recurso y el manejo que se le da, ésto fue probado por Mapes, *et al.* (1996), en estudios realizados con amaranto (*Amaranthus*, spp.) donde analizaron las variaciones morfofisiológicas en algunas especies mexicanas de amaranto y su

relación con el uso y manejo de este género. Al realizar análisis estadísticos de multivarianza, determinaron que las plantas que se empleaban para producir granos, tendían a destinar gran proporción de su energía a producir inflorescencias; mientras que, las plantas que se emplean para ser consumidas como verdura fresca, destinaban una gran proporción de energía para aumentar su biomasa en forma de follaje.

3.2 Proceso de domesticación

Prescott-Allen y Prescott-Allen, (1986) definen varios fenómenos que se presentan en el proceso de domesticación como son:

- a) La predomesticación, es la primera etapa de la domesticación y consiste en recolectar las plantas útiles o sus estructuras directamente de las poblaciones silvestres, tolerando su dispersión en el medio donde cohabitan. La siguiente etapa es alterar la frecuencia génica, recolectando ciertas formas de una especie preferentemente que otras y propagándolas.
- b) Transdomesticación, es definida por Hymowitz como el movimiento de especies silvestres, por el hombre, de su área original a otras regiones donde sean susceptibles de ser domesticadas.
- c) Multidomesticación, se lleva a cabo cuando una especie ha sido domesticada más de una vez en forma independiente, en diferentes regiones.
- d) Policultivo de especies, es cuando alguna especie es la fuente de varios cultivos que surgen a diferentes tiempos.
- e) Poliespecies de cultivos, al contrario de la anterior, es la combinación de muchos cultivos de diferentes especies domesticadas a diferentes tiempos.
- f) Metamorfosis, en general, la evolución y el desarrollo de las plantas domesticadas es generalmente un proceso gradual, pero ocasionalmente un evento o una sucesión rápida de eventos puede transformar un cultivo ya sea genéticamente, económicamente o ambos. Esta metamorfosis generalmente ocurre cuando un cultivo se desarrolla fuera de su lugar de origen.

g) Domesticación incipiente, la domesticación es un proceso lento. El producto de una especie debe ser identificado, y eventualmente una forma particular de esta especie, debe ser encontrada, identificando las alternativas y las necesidades, y después los cultivos deben desarrollarse de tal forma que sean lo suficientemente productivos y fáciles de propagar para los productores. La domesticación requiere del desarrollo tanto del mercado como de la fuente de producción.

El término nuevas plantas domesticadas, implica no solamente tomar plantas silvestres sino cierto grado de éxito en la producción, en muchos cultivos establecidos, de 3000 a 10000 generaciones aproximadamente, se han necesitado para seleccionar una extensa base genética de materiales cultivados para mejorar el cultivo además de las variaciones encontradas en las plantas silvestres. El trabajo de crianza para la mayoría de las plantas potencialmente domesticables, está actualmente en la fase de selección de las especies más promisorias para promover investigaciones futuras.

La domesticación de las plantas incluye varios mecanismos evolutivos, que implican cambios biológicos a nivel citológico y genético. Estos mecanismos son la hibridación, inducción de poliploidía, inducción de mutaciones e ingeniería genética.

Las técnicas de cultivo de células y tejidos, han abierto un nuevo campo de investigación: la variación somaclonal, esta área es considerada como una nueva fuente de variabilidad que revela y/o produce variabilidad sin tratamientos mutagénicos, producida solamente por el trasplante *in vitro* (Petersen y Alferman, 1993).

En principio, las plantas derivadas de cultivo de tejidos son fenotípicamente y genotípicamente idénticas a los tejidos o células que les dieron origen, dependiendo del origen del explante. Sin embargo, dependiendo del medio de cultivo, la edad de las células o tejidos cultivados, genotipo, efecto de la temperatura, luz, etc., se observa un gran índice de variabilidad en las características de un solo gen (color, forma, etc.) o en características producidas por varios genes (altura, ramificaciones, etc.). Larkin y Scowcroft (1981), denominaron este tipo de variaciones como "variaciones somaclonales" y consideraron que podría ser usada en el fitomejoramiento como una fuente de variabilidad genética. Larkin y Scowcroft (1981, 1983), Scowcroft y Larkin

(1982) y Lörz y Brown (1986) hicieron una revisión extensiva de la literatura sobre la variación somaclonal y citan los siguientes eventos como las principales causas de la variación somaclonal: 1) cambios totales en el cariotipo; 2) rearreglos cromosómicos ; 3) entrecruzamiento somático e intercambio de cromatidas; 4) elementos transformadores y 5) amplificación genética y disminución. Dependiendo de la naturaleza de los cambios, los somaclones son más o menos estables, fértiles o estériles.

Las variaciones somaclonales más frecuentes son la deficiencia de clorofila, este tipo de variación no afecta en la domesticación de cultivos forrajeros y cereales; pero si son importantes en plantas hortícolas. Las segundas variaciones más frecuentes son relativas a los cambios en el número de cromosomas y estructura, como la poliploidía, aneuploidía y varias aberraciones cromosómicas; estos cambios producen una inestabilidad genómica y gran número de estas variaciones se eliminan en subsecuentes generaciones sexuales y no tienen prácticamente valor en la domesticación. En plantas propagadas vegetativamente, como la papa y la caña de azúcar, las variaciones cariotípicas somaclonales, pueden ser propagadas pero no se ha probado que sean mejores que las plantas que les dieron origen. El siguiente grupo de variaciones somaclonales involucra cambios en caracteres cuantitativos, principalmente reduciendo la altura, la fertilidad, prolongando la madurez, número de cultivos, morfología de la espiga, etc. (Borojevic, 1990). Un ejemplo de la aplicación práctica de las variaciones somaclonales fue desarrollado por DeVries y Stephens (1997) donde probaron 283 variaciones somaclonales provenientes de 12 variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) autopolinizados. Las variaciones fueron generadas a partir de callos producidos con explantes de hojas, para investigar si las variaciones somaclonales podrían incrementar la resistencia a 2 cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (bacteria que provoca cáncer en el tomate), probando variedades de tomate susceptibles o parcialmente resistentes. Los resultados obtenidos mostraron que si hubo variación somaclonal en tomates provenientes de la primera generación de callos. También se incrementó la resistencia a la enfermedad para ambas cepas de las bacteria probadas. Una línea de

la variedad de tomate "Bulgaria 12" redujo su susceptibilidad a la enfermedad hasta 130 veces.

4. LAS ZONAS ARIDAS, SU INTERES E IMPORTANCIA

La damiana es una planta originaria de las zonas áridas y semi-áridas, por lo que, se describirán las condiciones medio-ambientales donde se desarrolla y las estrategias fisiológicas que requieren este tipo de plantas para su sobrevivencia.

Los ecosistemas de desierto han sido definidos por varios autores de diferentes formas, sin embargo para este trabajo tomamos la definición de Shmida (1985) quien los ha clasificado de acuerdo a la precipitación pluvial en tres categorías principales que son:

- a. Semi-desiertos.- que se caracteriza por tener una precipitación entre 150 y 300 a 400 mm por año, esta definición aplica especialmente en desiertos con lluvias en invierno, en desiertos con lluvias en verano o bi-estacionales, los límites pueden subir o bajar. En este tipo de ecosistema se desarrollan las plantas de damiana.
- b. Desiertos verdaderos.- son regiones que reciben lluvias menores a 120 mm por año.
- c. Desiertos extremos.- reciben una precipitación anual menor a 70 mm.

Las zonas áridas y semi-áridas mexicanas son alrededor de 1 millón de Km² estas zonas son 8 y sus nombres son: a) Sonorense; b) Chihuahuense; c) Queretano; d) Hidalguense; e) Poblano; f) Guerrerense; g) Oaxaqueño y h) Yucateco; estos nombres derivan de las regiones de donde proceden. Las zonas más extensas son la Sonorense (275, 000 Km²) y la Chihuahuense (453,000 Km²) (Macmahon y Wagner, 1985).

La vida de los organismos que viven en los desiertos está controlada principalmente por una escasez generalizada de agua y para muchos organismos de desierto, también la escasez de alimento. La concentración y disponibilidad de ambos recursos varía grandemente a través del tiempo y del espacio a través de los años y entre cada año, hay períodos cortos de abundancia de agua y alimento después de las

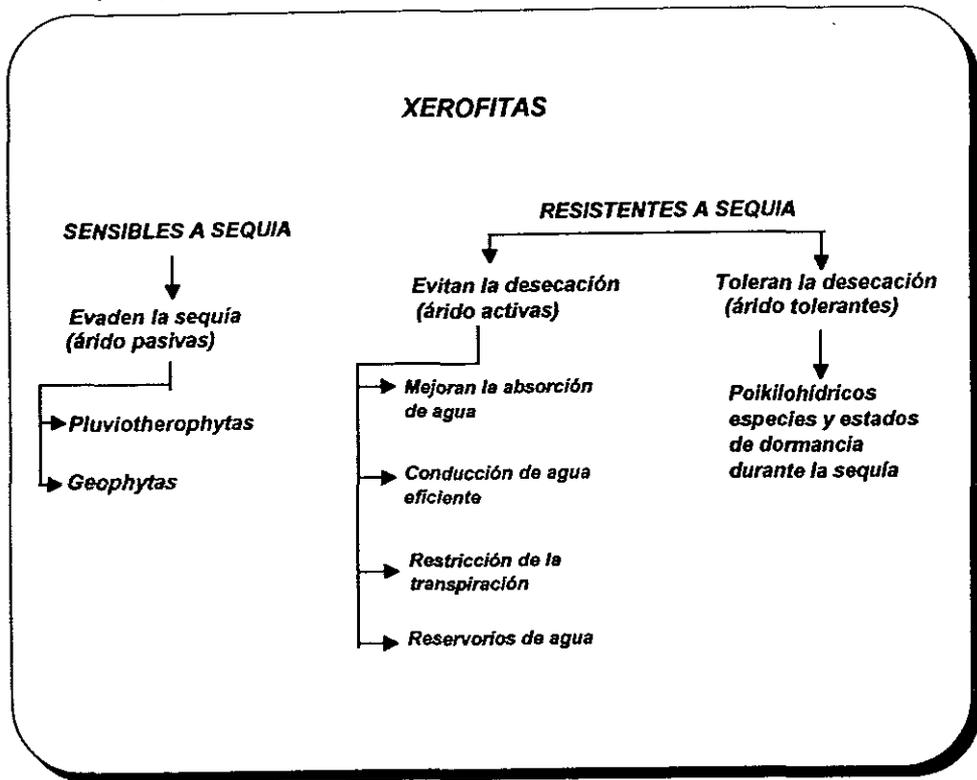
lluvias; pero su temporada, duración y nivel son variables e impredecibles (Shmida, *et al.* 1986)

Las plantas adaptadas al desierto pueden sobrevivir debido a diferentes ciclos de vida como son : a) las plantas anuales, que evitan la sequía creciendo solamente cuando hay humedad adecuada. b) las suculentas, como los cactus que almacenan agua. c) los arbustos de desierto, que tienen numerosas ramas que inician de un tronco corto basal y tienen hojas pequeñas y gruesas caducifolias cuando los períodos secos son muy prolongados (Odum, 1972).

Las plantas de regiones secas, como regla general tienen raíces que crecen profundamente dentro del suelo o tienen tejidos que almacenan agua y que no se forzan hacia una restricción drástica de la transpiración. La restricción más efectiva de la transpiración se encuentra en las plantas CAM (Crassulacean Acid Metabolism) , en las que los estomas permanecen cerrados durante todo el día durante la época de sequía y se abren completamente en la noche.

La resistencia a la sequía es la capacidad de las plantas a soportar períodos secos, esta capacidad es una característica compleja.

Figura 1. Mecanismos de las plantas para la sobrevivencia a la sequía. Tomado de Larcher (1980).



Levitt (1972) define que la resistencia a la sequía es el resultado de evitar y tolerar la desecación. Entre las plantas vasculares la tolerancia a la desecación es muy leve, así las diferencias en la resistencia a la sequía de diferentes especies son principalmente debidos a evitar la desecación. En regiones con periodos regulares secos y en los desiertos, hay plantas que evitan la sequía programando su crecimiento y reproducción en el corto período en que hay suficiente agua disponible.

La mayoría de las plantas xerófilas nativas resisten la sequía, evitándola mas que tolerándola, enfatizando diferentes características dependiendo de la etapa de desarrollo de las plantas (Levitt, 1972). En la Figura 1 se resumen los mecanismos de sobrevivencia de las plantas en las regiones áridas.

De acuerdo con estas estrategias se puede ver que la adaptación de las plantas a las zonas áridas implica la capacidad de evitar el marchitamiento y de permanecer latente durante largos periodos.

La productividad primaria neta anual de los desiertos verdaderos es inferior a 2,000 Kg/ha o menos de 0.5 gr/m²/día. La producción anual de la materia seca está en función lineal de la precipitación pluvial, lo que demuestra que el agua es un factor limitante general y dominante para la productividad en los desiertos (Odum, 1972).

A pesar de la escasa vegetación de las zonas áridas existen especies que son utilizadas por el hombre para diferentes fines, las especies que constituyen los principales recursos económicos debido al volumen e intensidad con que se explotan (Marroquín *et al.*, 1981) son las siguientes :

a) Candelilla (*Euphorbia antisiphilitica*), se extrae cera mediante la cocción de una solución de ácido sulfúrico; esta cera tiene múltiples usos industriales en las ceras para pulimentos, manufactura de discos fonográficos, lubricantes, aisladores, pomadas, etc.

b) Nopales (*Opuntia* spp.) estas especies se emplean como forraje, para alimentación humana tanto las pencas como los frutos.

c) Lechuguilla (*Agave lechuguilla*) la porción aprovechable es el conjunto de hojas centrales más jóvenes que vulgarmente se llaman cogollos, de los que se extrae el ixtle mediante el tallado de las hojas.

d) Palma (*Yucca* spp.) se utiliza el ixtle de las hojas y también se emplean como alimento para el ganado.

De acuerdo con los datos expuestos, las zonas desérticas constituyen un gran potencial para el desarrollo económico en México, ya que ocupan una extensa superficie del territorio mexicano y abunda la variedad de recursos de fauna y flora silvestres; sin embargo antes de explotar estos recursos es necesario cuantificar su potencial, debido a que su equilibrio ecológico es muy frágil y fácilmente podría alterarse en forma tal que costaría mucho tiempo recuperarlo . El uso efectivo de los recursos vegetales de las zonas áridas implican evitar el sobrepastoreo y la destrucción de la población antes de que se recupere. Esta destrucción casi

irreversible conduce hacia la invasión o incremento de especies no palatables o venenosas, el establecimiento temporal de algunas especies anuales y el subsecuente desmonte de la superficie del suelo y la erosión del mismo dejando áreas inútiles.

5. CARACTERISTICAS E IMPORTANCIA DE LA DAMIANA (*Turnera diffusa*)

5.1 Características y clasificación taxonómica de la damiana.

Se han llevado a cabo diferentes tipos de clasificaciones de la planta de damiana, una de estas clasificaciones es la del sistema de Engler . (1964) y es la siguiente

División: Tracheophyta

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotyledoneae

Subclase: Arquiclamiidae

Orden: Violales

Familia: Turneraceae

Género: *Turnera*

El género *Turnera* tiene varias especies reportadas como son *T. pumilla*, *T. velutina*, *T. callosa*, *T. ulmifolia* y *T. palmeri* (Ramírez, 1903; Ramírez, 1904).

La damiana que se empleó para este estudio se ha clasificado con diferentes nombres de acuerdo a lo reportado por Shreve y Wiggins (1964); en 1825 se clasificó como *T. microphylla*, en 1835 como *Bohadschia humifusa*, en 1843 como *T. humifusa*, en 1876 *T. aphrodisiaca*, en 1883 *T. diffusa* var. *aphrodisiaca* y en 1899 *T. pringlei*. El nombre científico que se reconoce actualmente es *Turnera diffusa*, Willd. clasificada en 1820, el nombre genérico *Turnera* es en honor a William Turner, herbolario inglés y la especie *diffusa*, hace referencia a su hábito difuso o expandido (Vines, 1960). El nombre común que se le ha asignado a esta especie en México es damiana, pero dependiendo de la zona donde se desarrolla se le han dado otros nombres comunes

como son: hierba de la pastora, hierba del venado, ítamo real, misibkok y pastorcita (Martínez, 1959).

La damiana tiene las siguientes características botánicas, es un arbusto caducifolio que mide entre 0.30 a 2 m de altura, con tallos ramificados, lisos y rectos, de color amarillo a pardo rojizo (Thomson, 1980); las ramas son pubescentes cuando jóvenes y posteriormente son lisas; las hojas son simples, alternas o arracimadas, oblongas o estipuladas con peciolo cortos, ápice obtuso, agudo, base corta acunada, márgenes dentados con 8 a 10 dientes de cada lado; el tamaño de la hoja varía entre 10 y 25 mm y presenta nervaduras prominentes por el envés e impresas en el haz, la superficie es lisa de color verde olivo brillante. Las yemas son grises con pubescencia abundante, estípulas lineales y aromáticas sobre todo cuando están frescas. Las flores de la damiana son axilares, pequeñas de 8 a 12 mm, color amarillo brillante, perfectas, regulares, su cáliz es sécil, de 13 mm aproximadamente, tubular, tomentoso con 5 pétalos de 6-8 mm de longitud escasamente acunados, a veces retorcidos insertos en la entrada del tubo del cáliz, 5 estambres insertos cerca de los pétalos; 5 sépalos oblongos o un poco aovados. El fruto es una cápsula ovoide de 4-6 mm de longitud dehiscente del ápice a la mitad, trivalvar, de color verde. La semilla es de color café o blanquecino cremoso, testa dura de superficie áspera, reticulada, dando apariencia de mazorca de maíz. El embrión es recto con abundante endospermo, carnoso, mide aproximadamente 2 mm de longitud por 1 mm de ancho y pesa de 1.04 a 1.06 mg (Vines, 1960).

5.2 Ecosistemas donde se desarrolla la damiana.

La distribución de la damiana está reportada en el Oeste de Texas, Sur de California, México, Las Antillas y Sudamérica (Vines, 1960).

En México, la damiana se encuentra localizada en los estados de Baja California Sur, San Luis Potosí, Coahuila, Chihuahua, Sinaloa, Nayarit, Tamaulipas, Querétaro, Zacatecas y Guerrero (Martínez, 1959), Figura 2. En Baja California Sur (figura 3), se localiza dentro de la vegetación denominada Matorral Xerófilo, asociada florísticamente a plantas como cardón (*Pachycereus pringlei*), choya (*Opuntia choya*),

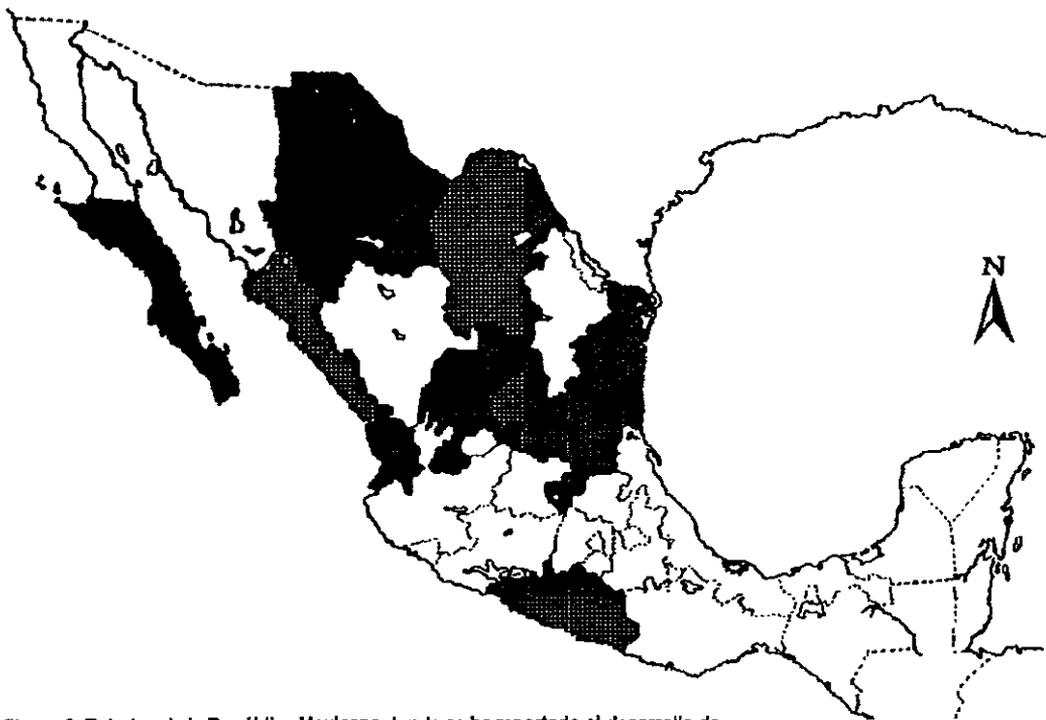


Figura 2. Estados de la República Mexicana donde se ha reportado el desarrollo de damiana (*Turnera diffusa*), en condiciones silvestres (Martínez, 1959).

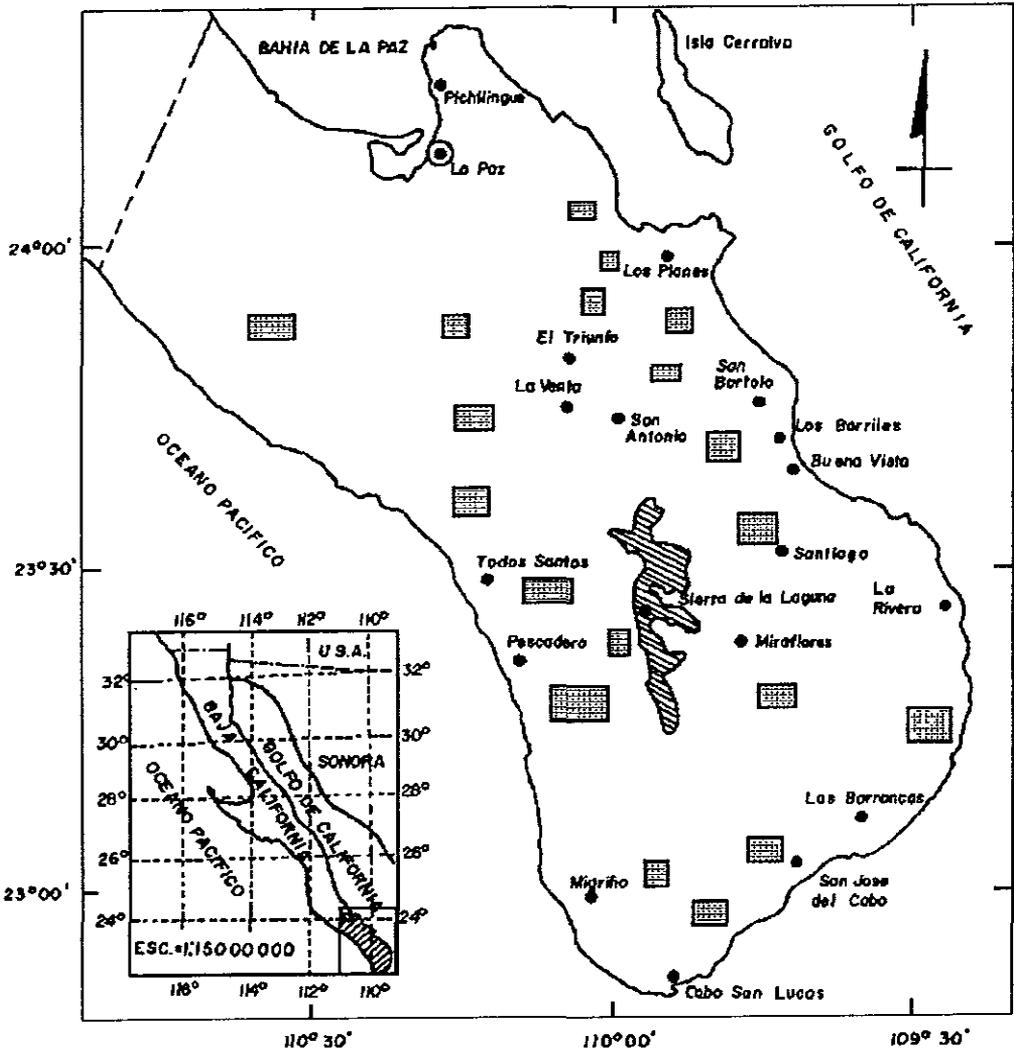


Figura 3. Sitios donde se desarrollan las poblaciones silvestres de damiana en la Península de Baja California. 

mezquite (*Prosopis*, spp.), pitaya dulce (*Lemaero cereus* var. *thurberi*), pitaya agria (*Machaerocereus gummosus*), san miguelito (*Antigonon leptotus*), incienso (*Encelia farinosa*), liga (*Euphorbia xanthii*), biznaga (*Ferocactus* spp.), palo adán (*Fouquieria diguetii*), lomboy (*Jatropha cinerea*), datilillo (*Yucca válida*), torote colorado (*Burcera microphylla*), mala mujer (*Cnidoscopus angustidens*) y jojoba (*Simmondsia chinensis*), principalmente (Sandoval, 1982). Esta vegetación se encuentra a una altitud de 0-300m con clima de árido a semi-árido, con temperaturas medias anuales de 22.1 a 24° C y baja precipitación pluvial con una media anual de 180 a 267 mm. Los suelos son de textura ligera clasificados como migajón arenoso a arena migajonosa, con pH ligeramente alcalino, pobres en nitrógeno, con pendiente de no más del 5% en laderas, planicies y mesetas (Wiggins, 1980)

5.3 Usos e importancia económica de la damiana.

En el aspecto de farmacopea, la damiana se ha empleado por los indios del norte, desde tiempo inmemorial, con el fin de aliviar la debilidad muscular y nerviosa, empleando un macerado de las hojas y tomándolo en forma de té, también la recomendaban como afrodisiaco. En Estados Unidos de América, se reporta que desde 1874 a la fecha, la damiana es considerada como excelente tónico y afrodisiaco, por lo que se comercia con esta planta. También se reporta su uso en los padecimientos originados por la debilidad nerviosa, en la inflamación de la vejiga, y especialmente en los estados alterados de los órganos sexuales, especialmente en casos de impotencia producida por excesos; por último, también se ha recomendado en casos de espermatorrea, impotencia, nefritis y diabetes (Martínez, 1959). Díaz (1976), publicó un catálogo de usos y aplicaciones de plantas medicinales, enriqueciéndolo con evaluaciones dadas de acuerdo a informaciones clínicas, farmacológicas o tradicionales, lo cual fundamenta las ideas sobre su efectividad para el tratamiento de las diferentes enfermedades, indicando para cada uso la vía de administración, la parte usada y la referencia bibliográfica correspondiente; en cuanto a la damiana, este autor reporta que, en general, la parte de la planta que se emplea para usos medicinales son las hojas secas, en forma de infusión o extractos



Figura 4. Productos comerciales obtenidos de las plantas de Damiana

etanólicos. León y Coria (1992), reportan que se emplea contra la disentería, malaria, sífilis, dolores de estómago, de intestinos, dispepsia y algunas parálisis.

En la industria, las hojas secas de damiana se pulverizan y se empacan en pequeñas bolsas de material permeable, para usarse como bebida, al igual que cualquier otro tipo de té. Otro uso industrial importante que se le da a las hojas de damiana, es como saborizante de licor, actualmente existen al menos 3 compañías que emplean las hojas de damiana como base para la elaboración del licor que producen, estas compañías se ubican, una en La Paz, Baja California Sur, otra en Guadalajara, Jalisco y otra en la Ciudad de México (Figura 4).

Las hojas secas y los extractos de damiana son muy aromáticos, debido a los aceites esenciales que contienen, estos compuestos han sido investigados por varios autores, aunque todavía falta mucho por investigar. Domínguez e Hinojosa, (1976) han detectado en extractos etanólicos la presencia de alfa-pineno, beta-pineno, triacontano, beta-sitosterol, triacosanona, acetovainillina, hexacosanol-1 y 5-hydroxy-7,3',4'-trimethoxy-flavona; en una mezcla de etanol y cloroformo detectaron beta-sitosterol y un flavonoide denominado gonzalitosin I. Spencer y Seigler, (1981) detectaron la presencia de un glicósido cianogénico identificado como tetraphyllin B.

Hasta la fecha la totalidad de las hojas secas de damiana que se encuentran en el mercado, proceden de las poblaciones silvestres, debido a que no se pueden cultivar, por la dificultades que representa la germinación de la semilla, para la propagación masiva de esta planta. Por tal motivo, la damiana silvestre se recolecta en el campo y se comercializa, por intermediarios o por empresas beneficiadoras que empacan el producto, destinando una parte al consumo local y otra para el interior del país o en algunos casos para exportación.

6. APLICACION DE LA BIOTECNOLOGIA

La biotecnología es una tecnología que emplea sistemas biológicos. La unidad básica de cualquier sistema biológico es la célula. En todos los métodos biotecnológicos se involucran diferentes tipos de células pertenecientes a bacterias,

microorganismos eucariotes, plantas y animales (incluyendo al hombre). Dependiendo de los propósitos específicos o necesidades, se emplean células del tipo silvestre, mutantes que ocurren en condiciones naturales o células y organismos manipulados genéticamente. En la mayoría de los casos estos organismos o células no crecen en condiciones naturales, por lo que son cultivadas en condiciones de control estricto en un medio ambiente artificial o semi-artificial, las células y organismos desarrollados en estas condiciones pueden mostrar cambios en su morfología y ultraestructura (Mayer, 1993).

La biotecnología es una herramienta útil para aplicarla en aspectos prácticos de producción y conservación de plantas de interés económico o ecológico.

Esta tecnología se emplea para producir metabolitos secundarios a partir de células vegetales. Actualmente, más de 20,000 diferentes compuestos han sido aislados y la mayoría de ellos se emplean para fines farmacéuticos, colorantes, gomas, fragancias o sabores. Hahlbrock (1986), describe las ventajas de la producción de estos compuestos por medio del cultivo de células vegetales : a) se pueden obtener altos rendimientos optimizando las condiciones de producción. b) la producción puede ser independiente de factores políticos, económicos, climáticos y circunstancias geográficas. c) se evitan las pérdidas por invasión de patógenos o herbívoros. d) optimizando la producción se puede estandarizar el contenido de los compuestos activos. e) los compuestos altamente tóxicos como los narcóticos se pueden producir bajo condiciones controladas. f) la adaptación a los cambios de mercado puede ser rápida y fácil.

Es posible establecer estrategias para mejorar la producción de los compuestos (Petersen y Alfermann, 1993) como:

a) Optimizar el medio de cultivo: buscando los nutrientes, la fuente de carbono y el equilibrio hormonal adecuados para la producción de metabolitos secundarios. Como resultado del proceso de optimización generalmente se emplean dos formulaciones, la primera para el crecimiento óptimo y la otra para la producción de metabolitos secundarios. Rubluo *et al.* (1995), investigaron la composición del medio nutritivo necesario para producir callos, que posteriormente originaron estructuras similares a

pelos absorbentes, el compuesto piquero, a partir de una planta ruderal denominada *Piqueria trinervia*, este compuesto es útil como agroquímico y medicinal. Los resultados que obtuvieron mostraron que hubo mayor producción de este compuesto en los cultivos *in vitro* que en las plantas completas.

b) Selección de líneas celulares altamente productivas: diferentes cultivos celulares de la misma planta pueden producir diferentes cantidades de metabolitos secundarios, aún en un mismo callo se pueden encontrar células que produzcan diferentes concentraciones de metabolitos secundarios, por lo que es importante la selección.

c) Conocimiento y manejo de factores de estrés que pueden estimular la acumulación de metabolitos secundarios como: i) estrés en el medio variando los nutrientes como nitrógeno, fósforo, sacarosa, fitohormonas ii) estrés físico, variando la luz, luz ultravioleta, aireación, osmolaridad, pH. iii) estrés químico, aplicando metales pesados, elicitores abióticos. iv) estrés infeccioso, por medio de patógenos, elicitores bióticos.

d) Diseño de los recipientes de cultivo y condiciones físicas: es importante el tamaño de los recipientes de cultivo, así como la velocidad de agitación, lo cual influye en la oxigenación de los cultivos, la intensidad y tipo de luz.

e) Aplicación de precursores metabólicos y reacciones de biotransformación: como enzimas que catalizan las reacciones y provoquen una mayor producción de los metabolitos secundarios.

f) Inmovilización de las células vegetales para la producción de metabolitos secundarios: este sistema ha sido investigado extensamente debido a las ventajas que proporciona en los procesos biotecnológicos, una de las ventajas de este sistema sería el volver a usar las mismas células, sin embargo esto no ha sido posible debido a que la mayoría de los compuestos se almacenan en las células y los procesos para extraerlos reducen grandemente la viabilidad.

g) Permeabilización de las células vegetales: un obstáculo desde el punto de vista económico en la producción de metabolitos secundarios, es que éstos se encuentran almacenados intracelularmente y recuperarlos es muy costoso. El lugar donde las células vegetales almacenan estos compuestos depende de la función fisiológica codificada genéticamente y es difícil de manipular. Por tal razón las investigaciones

han sido hacia la permeabilización de las células, para extraer los metabolitos secundarios, pero sin disminuir su viabilidad. Se han aplicado métodos físicos y químicos y dependiendo de la especie han dado resultados satisfactorios. Los métodos químicos empleados son por ejemplo la aplicación de dimetil sulfóxido, que permite que la membrana sea más permeable o la aplicación de solventes orgánicos para formar dos fases con el medio. Los métodos físicos, empleados son aumento de temperatura, permeabilización eléctrica o sonicación.

h) Cultivo de estructuras diferenciadas: la síntesis de metabolitos secundarios en varias especies está asociada al grado de diferenciación de los tejidos. Esto explica la imposibilidad para obtener ciertos compuestos a partir del cultivo de células en suspensión. La iniciación y propagación de diferentes cultivos puede controlarse por medio del régimen hormonal; además, la diferenciación de brotes y raíces en algunas especies se puede obtener al inocularlos con *Agrobacterium tumefaciens* o *A. rhizogenes*, debido a que los genes bacterianos codifican para ciertas enzimas que catalizan la biosíntesis de fitohormonas en las plantas o interfieren con ellas, logrando una estabilidad integrada dentro del genoma de la planta.

i) Ingeniería genética de células vegetales: durante los últimos años un gran número de enzimas se han aislado e identificado su función en las vías metabólicas involucradas en la producción de metabolitos secundarios, identificando posteriormente los genes que codifican estas enzimas y clonándolos para introducirlos en el genoma de las células vegetales.

La biotecnología es una herramienta valiosa para la conservación de especies en peligro de extinción debido a que provee métodos para la propagación de plantas a partir de tejidos somáticos, meristemas, células y embriones; obteniendo plantas clonadas con las características fenotípicas y genotípicas de la planta que le dio origen. La extinción de una especie puede poner en peligro de extinción alrededor de 10-30 diferentes especies que dependen de ésta (Raven, 1976). Por medio de la técnica de cultivo de tejidos se han logrado rescatar varias especies en estas condiciones, como en el trabajo desarrollado por Rubluo *et al.* (1993) con la cactácea *Mammillaria san-angelensis* de la cual solamente se encontraron 5 ejemplares en

condiciones silvestres y al implementar las condiciones de micropropagación, se logró recuperar las poblaciones en el sitio original. Otro ejemplo, es la aplicación de la técnica de cultivo de tejidos para inducir la germinación de semillas de una orquídea (*Bletia urbana*), clasificada como especie en peligro de extinción y que lograron re-establecer en su hábitat original con una sobrevivencia del 56% (Rubluo, *et al.* 1989).

Si se combinan las técnicas de domesticación tradicionales con la biotecnología, se pueden lograr grandes avances en el mejoramiento de las especies, en menor tiempo. La biotecnología vegetal tiene gran potencial para ayudar a la agricultura en la domesticación de especies, suministrando técnicas que permiten llevar a cabo mejoras genéticas de alguna especie por medio del cultivo y fusión de protoplastos incrementando material genético nuevo. Además se pueden hacer cruza entre especies genéticamente distantes por medio de rescate de embriones y el subsiguiente cultivo *in vitro* del híbrido, siguiendo con la introducción de material genético del individuo silvestre. Para la regeneración rápida de especies haploides se han cultivado óvulos y anteras. La micropropagación provee métodos para mantener el germoplasma de individuos elite y así suministrarlos a programas de domesticación manteniendo el genotipo parental o la generación F1 (Giles y Morgan, 1987). Es posible inducir mutagénesis por medio de factores físicos o químicos para incrementar las fuentes de variación genética y posteriormente hacer un barrido para seleccionar las especies de interés. Actualmente, algunos genes seleccionados pueden introducirse en las células vegetales empleando como vectores *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes* o una transferencia directa bombardeando los tejidos vegetales con ADN cubierto con partículas de oro o de tungsteno (Vasil, *et al.*, 1991). La regeneración de plantas vía embriogénesis somática puede proveer nuevos y efectivos medios para una propagación rápida. El almacenamiento de material vegetal viable, a bajas temperaturas, abre amplias posibilidades para la conservación del germoplasma (Chen y Sharp, 1990).

El fitomejoramiento de cultivos tolerantes a la salinidad es un paso adelante para combatir el problema del incremento de salinidad en los suelos agrícolas del

mundo. Al menos el 25% de las tierras de cultivo sufren de exceso de salinidad, principalmente por NaCl; el 25% por acidez excesiva causada principalmente por iones de aluminio y entre el 40 y el 60% por sequía (Nabor, 1990). Tanto la salinidad como la sequía, son los principales factores que limitan el desarrollo de las plantas en las zonas áridas y semi-áridas. El cultivo de tejidos vegetales provee una alternativa para el estudio y posibles soluciones a la problemática del estrés por sequía y salinidad (Alcaraz-Meléndez, *et al.* 1989), ya que permite estudiar los mecanismos de resistencia y adaptación de plantas halotolerantes (Vázquez-Duhalt, *et al.* 1991), seleccionar células resistentes mediante barridos *in vitro*, promover la hibridación interespecífica e inducir variaciones genéticas. Se ha reportado la selección de callos o células en suspensión tolerantes a la salinidad de diversas especies (Zacchini, *et al.* 1997). Los datos reportados sobre crecimiento, mediciones fisiológicas de adaptación osmótica por exposición continua a estrés por sequía o salinidad, demuestran que las células vegetales son tolerantes como resultado de una adaptación fisiológica y no como la selección de diferentes tipos de células tolerantes (Chandler y Thorpe, 1986). Estas líneas celulares, dependiendo de su estabilidad y tolerancia son una herramienta valiosa para el estudio y confirmación de aspectos asociados a los mecanismos del estrés por sequía o salinidad. Otro avance importante en el cultivo de tejidos es la regeneración a plantas completas de estas líneas celulares tolerantes al estrés del medio ambiente (Chaudhary, *et al.* 1997). Es importante mencionar que las metas de la selección son producir plantas tolerantes, no plantas dependientes al estrés, y esto debe lograrse sin perder el rendimiento o las características deseables del cultivo. Algunos cultivos son difíciles de regenerar e inclusive difíciles para establecer cultivos celulares, en estos casos y en los que la capacidad de regeneración se pierde rápidamente, la selección a largo plazo es inapropiada. En el caso de plantas adaptadas a condiciones áridas difíciles de propagar por los métodos convencionales, la propagación clonal o multiplicación de genotipos específicos es de gran ayuda (Petersen y Alfermann, 1993). Como ejemplo tenemos la propagación de cactáceas por medio de cultivo de tejidos para sembrarlas en zonas áridas (Rubluo, *et*

al. 1996), la micropropagación de plantas tolerantes a sequía como el orégano (Alcaraz-Meléndez y Real-Cosío, 1992, b) y la jojoba (Llorente y Apóstolo, 1998).

7. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

7.1 Descripción del cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica que se emplea para el desarrollo de células, tejidos y órganos de plantas en un medio nutritivo, preparado en condiciones asépticas y bajo condiciones ambientales controladas. Esta técnica es una herramienta única y valiosa en la investigación, porque permite disminuir variables, debido a que es posible controlar la calidad e intensidad de luz, la temperatura, la mezcla de gases y los nutrientes; también reduce la interrelación entre dos o más órganos relacionados entre sí y además no hay influencia de microorganismos (Staba, 1980). Dentro del cultivo de tejidos se han desarrollado diferentes tipos de cultivo, dependiendo del material vegetal que se emplee y los objetivos que se deseen llevar a cabo, como por ejemplo: a) cultivo de semillas o plantas, b) aislamiento de embriones maduros e inmaduros, c) aislamiento de órganos de la planta, d) cultivo de células indiferenciadas y e) cultivo de células en suspensión. Todas las técnicas de cultivo de tejidos están basadas en 3 fundamentos principales, que son: a) los explantes deben ser aislados del resto de la planta, b) los explantes deben mantenerse en un medio definido, controlado y preferencial y c) los cultivos deben mantenerse en condiciones asépticas (Brown y Thorpe, 1980).

7.2 Selección del explantes.

Es muy importante que la planta donadora de explantes sea cuidadosamente monitoreada y seleccionada, puesto que el estado fisiológico y el medio ambiente donde se desarrollan afectan su respuesta *in vitro*; las condiciones *in vivo* de la planta pueden estar determinadas por efectos del medio ambiente y no necesariamente por factores genéticos (Ketchum *et al.*, 1987) y además determinar la estabilidad de los

caracteres fenotípicos y la capacidad de regeneración del cultivo (Dix y Collin, 1990). La edad del explante también es importante, los tejidos jóvenes generalmente son las mejores fuentes de explantes; porque se ha reportado que producen células y tejidos con mayor eficiencia.

Una vez seleccionado el tipo de tejido o explante que se va a cultivar, éste debe ser aislado, desinfectado y transferido al medio de cultivo en condiciones estériles. La eliminación de contaminantes, generalmente se realiza con sustancias desinfectantes, dentro de una campana de flujo laminar o en un cuarto esterilizado con luz ultra violeta o vapor (Constabel, 1984).

Los explantes no deben ser muy grandes, ya que esto aumenta el riesgo de contaminación; un explante con una superficie adecuada en un volumen pequeño son las condiciones óptimas para facilitar el intercambio gaseoso y la absorción de nutrientes (Costabel, 1984).

7.3 Factores importantes en el cultivo de tejidos.

Los principales factores que afectan el cultivo de tejidos son: la composición de los medios de cultivo, pH del medio, reguladores de crecimiento, volumen óptimo del medio de cultivo, esterilidad del medio nutritivo, tipo e intensidad de luz, temperatura y humedad; los cuales se describen a continuación:

Composición del medio de cultivo.- Uno de los factores más importantes que intervienen en el desarrollo y morfogénesis de los explantes vegetales desarrollados en cultivo de tejidos es la composición del medio nutritivo. Los medios nutritivos que se emplean con mayor frecuencia son el medio Murashige y Skoog, (1962) (MS) y el medio Gamborg (B5). El primer medio se usa frecuentemente cuando el objetivo es inducir la morfogénesis y el segundo medio se emplea cuando se requiere de una rápida proliferación de células. Ambos medios nutritivos son muy similares entre sí, la principal diferencia estriba en que el medio B5 contiene una baja concentración de nitrógeno en forma amoniacal, alto contenido de nitrato de potasio y alta concentración de cloruro de tiamina (Chen y Evans, 1990).

La selección del medio nutritivo depende de la especie con que se vaya a trabajar, el tejido u órgano que se desee desarrollar y el propósito del experimento (Dodds y Roberts, 1990).

En general, todos los medios de cultivo empleados para el cultivo de tejidos vegetales están compuestos de: a) sales minerales, b) una fuente energética de carbono c) vitaminas, d) aminoácidos, e) bases nitrogenadas, f) compuestos naturales y g) hormonas o reguladores de crecimiento (Conger, 1981). En los medios de cultivo, éstos elementos presentan las siguientes características:

a) Sales minerales: Al igual que las plantas en condiciones normales, el cultivo de células requiere de macro y micronutrientes como: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, hierro, magnesio, manganeso, zinc, cobre, boro, molibdeno y azufre, además de oxígeno e hidrógeno que son tomados del agua (Butcher e Ingram, 1976).

b) Fuente energética de carbono: La adición de una fuente de carbono al medio nutritivo es absolutamente necesaria, independientemente del tipo de células que se cultiven, debido a que muy pocas células vegetales cultivadas *in vitro* son autótrofas. La fuente de carbono y energía que se utiliza con mayor frecuencia en el cultivo de tejidos es la sacarosa, la cual es generalmente utilizada en concentraciones del 2 al 3%. Existen evidencias de que la producción de algunos metabolitos en los tejidos vegetales cultivados *in vitro* son afectados por la concentración de sacarosa que contiene el medio (Staba, 1980).

c) Vitaminas: Las vitaminas tienen efecto catalítico en el sistema enzimático y se requieren en bajas concentraciones. Las vitaminas que se emplean comúnmente en el cultivo de tejidos vegetales son: tiamina que es la única vitamina esencial para todas las plantas cultivadas *in vitro*, ácido nicotínico, piridoxina (Dodds y Roberts, 1990), biotina, ácido pantoténico e inositol (Gamborg, 1984). Además de las vitaminas mencionadas, se ha reportado la adición de otras vitaminas al medio nutritivo, cuando el desarrollo o morfogénesis del tejido cultivado lo requiera (Staba, 1980).

d) Aminoácidos: La mayoría de los tejidos cultivados *in vitro* son capaces de sintetizar los aminoácidos necesarios para su desarrollo; sin embargo, en ocasiones es necesario adicionar mezclas de aminoácidos al medio, a excepción de la glicina que se

emplea en varios medios (Dodds y Roberts, 1985). Los aminoácidos y amidas reportados que tienen efecto benéfico en los cultivos *in vitro* son: la L-arginina, L-ácido aspártico, L-asparagina, L-ácido glutámico y L-glutamina (Staba, 1980).

e) Bases nitrogenadas: Existen reportes de que el ácido guanilínico y el ácido citidílico producen efectos sobre el desarrollo de las células en el cultivo de callos (Staba, 1980).

f) Compuestos naturales: Los compuestos naturales como el agua de coco, extractos naturales e hidrolizados de proteínas como la caseína, lactoalbúmina, peptona y triptona, han sido empleados para enriquecer el medio nutritivo; sin embargo, no es posible mantener el control de calidad de éstos compuestos, por lo que no se aseguran resultados reproducibles (Staba, 1980; Conger, 1981).

g) Hormonas o reguladores de crecimiento: Son fitorreguladores naturales o artificiales que se desplazan en la planta desde el órgano de producción hacia otro órgano donde se lleva a cabo la reacción. Las hormonas vegetales son agentes extremadamente importantes para el desarrollo de las plantas y tienen una gran influencia en su respuesta a las condiciones ambientales externas, siendo de esta manera, los principales reguladores de la expresión genética potencial de los vegetales (Moore, 1979); es así como el desarrollo, diferenciación celular de los tejidos y el metabolismo en general son afectados por las hormonas (Staba, 1980). Los tipos de hormonas comúnmente reconocidas son: las auxinas, giberelinas, citocininas, ácido absísico y otros inhibidores del crecimiento como el etileno (Moore, 1979). Las auxinas y las citocininas son los reguladores de crecimiento que más se emplean en el cultivo de tejidos. Las auxinas son compuestos que estimulan el alargamiento de las células de los brotes y son similares al ácido indol acético en su actividad dentro de la fisiología de las plantas. Las citocininas promueven la división celular bajo ciertas condiciones de bioensayos, regulan el crecimiento y desarrollo de la misma manera que la cinetina (6-furfurilaminopurina) (Dodds y Roberts, 1990).

pH del medio nutritivo.- El efecto de crecimiento y la selectividad de las plantas por un medio específico depende en gran parte del pH. El pH del medio nutritivo generalmente se ajusta entre 5.0 y 6.0 antes de agregar el agar y esterilizarlo por medio de la autoclave, conforme pasa el tiempo el pH tiende hacia el pH neutro, lo cual ayuda a la disponibilidad de los nutrientes para la absorción por los tejidos vegetales (Staba, 1980).

Volumen óptimo del medio de cultivo.- Es importante mantener una proporción adecuada del volumen del medio con respecto al volumen del tejido y el recipiente que los contenga, ya que cualquier extremo afecta el desarrollo de las células (Staba, 1980). En general, se emplea entre la cuarta y quinta parte del volumen para el medio, por ejemplo, 20 a 25 ml de medio en un frasco de 100 ml de capacidad para sembrar entre 3 y 5 explantes, o 4 a 5 ml de medio para un tubo de 20 ml para sembrar un meristemo.

Esterilidad del medio nutritivo.- El medio nutritivo para el cultivo de tejidos en todos los casos deberá ser esterilizado, ya sea por medio de una autoclave o por ultrafiltración, a fin de obtener un medio aséptico. El método de esterilización más frecuentemente utilizado es dentro de una autoclave a una temperatura de 121° C, a 15 libras de presión, durante 15 minutos; pero cuando el medio contiene compuestos que se desnaturalizan a altas temperaturas y presión, es preferible esterilizar por medio de ultrafiltración, con membranas de 0.45 o 0.2 μ m de abertura (Staba, 1980; Conger, 1981).

Efecto de la luz.- Los medios de cultivo para células vegetales contienen sacarosa lo cual disminuye la necesidad de efectuar la fotosíntesis, y de hecho, varias especies se cultivan rutinariamente en la obscuridad. Sin embargo, la mayoría de los estudios reportados han demostrado que la luz juega un papel importante en la inducción a la organogénesis. Los efectos de la luz se subdividen en fotoperíodo, intensidad de luz y longitud de onda, al variar uno o más de estos parámetros, es posible inducir la morfogénesis con mayor éxito (Conger, 1981).

Temperatura.- El rango óptimo de temperatura para la incubación de los cultivos *in vitro*, generalmente el rango óptimo de temperatura es de 26 a 28° C, aunque se ha reportado que algunas plantas requieren alternar diferentes ciclos de temperatura para que se lleve a cabo la organogénesis (Conger, 1981).

Humedad.- La humedad es un factor ambiental importante que debe ser considerado en el cultivo de tejidos. Los tejidos deben tener un suministro adecuado de humedad, pero si ésta es muy alta se incrementa el rango de contaminación de los medios de cultivo por hongos o bacterias y si la humedad es muy baja se dificultará la difusión de los nutrientes en el medio y además los tejidos se deshidratarán. El empleo de sellos de parafilm (®) alrededor de las tapas de los recipientes de cultivo, es una buena opción para mantener la humedad y aireación adecuadas y además es una medida de control de la entrada de agentes patógenos a los medios de cultivo (Costabel, 1984).

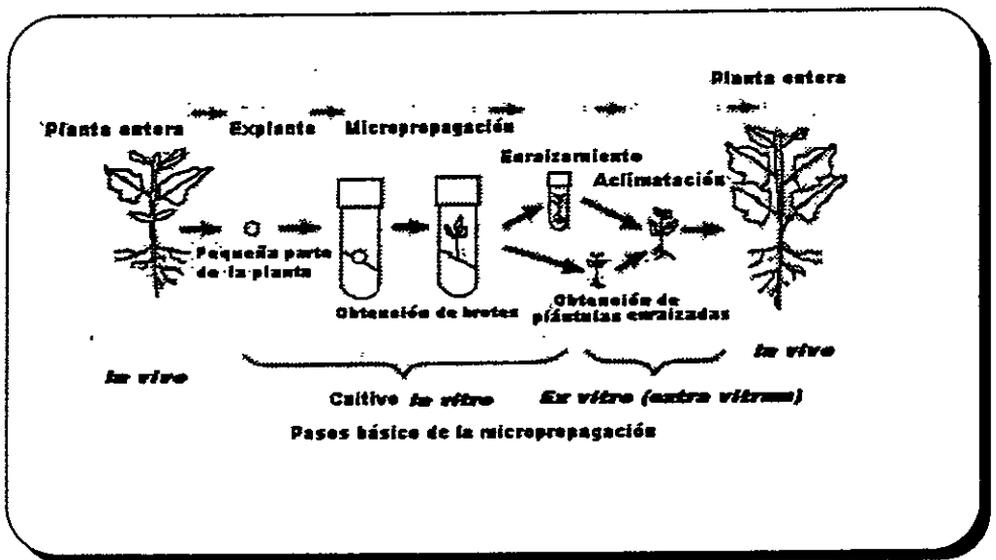
La aplicación práctica potencial de la técnica de cultivo de tejidos para la agricultura es muy diversa e importante, como por ejemplo: la inducción y selección de plantas haploides a partir del cultivo de anteras y polen para la obtención de individuos homocigotos con características recesivas útiles; inducción y selección de mutantes por medio de agentes químicos o físicos y la propagación clonal o multiplicación rápida de genotipos específicos que a diferencia de la propagación asexual por otros métodos, la técnica de cultivo de tejidos provee un medio ambiente aséptico y controlado, agregando además que la multiplicación es esencialmente más rápida (Conger, 1981).

7.4 Micropropagación

La micropropagación es la técnica para lograr el desarrollo de nuevas plantas en un medio artificial, en condiciones asépticas, a partir de porciones muy pequeñas de la planta, tales como embriones, semillas, tallos, puntas de ramas, puntas de raíces, callos, células individuales y granos de polen (Hartmann y Kester, 1980).

La micropropagación es la verdadera propagación de un genotipo seleccionado por medio de la técnica de cultivo *in vitro*. Con gran frecuencia, la micropropagación se asocia a la producción masiva con un precio competitivo (Figura 5).

Figura 5. Pasos básicos para la micropropagación de la mayoría de las especies vegetales (George, 1993).



En la micropropagación, Debergh y Read (1991) han definido 5 etapas críticas para el desarrollo exitoso de las plantas *in vitro*. Estas etapas son las siguientes:

Etapa 0.- La etapa preparativa, consiste en evitar los problemas de contaminación cultivando la planta madre bajo condiciones higiénicas. Cambiar el status de la planta madre que será la fuente de los explantes, controlando el fotoperíodo y la calidad de luz, estableciendo los rangos de temperatura adecuados para las diferentes etapas de desarrollo de la planta y determinar un adecuado pretratamiento de la planta madre con reguladores de crecimiento.

Etapa 1.- La iniciación del cultivo, que tiene como finalidad inducir las condiciones para mantener los cultivos axénicos y resolver los problemas relacionados con la salud y estado de los cultivos.

Etapa 2.- La multiplicación, que consiste en investigar las condiciones para inducir la propagación de brotes adventicios que proporcionen retoños, los cuales tengan las características necesarias para transferirlos y continuar con la siguiente etapa de desarrollo.

Etapa 3.- Es la inducción, desarrollo y alargamiento de la raíz. Fundamentalmente hay solamente dos opciones en esta etapa, ya sea producir plántulas *in vitro* o inducir la formación de raíces en macetas con suelo, los factores que influirán en la decisión que se tome serán las implicaciones comerciales, que dependerán de la infraestructura disponible, la calidad y cantidad de las plantas que se deseen establecer en el campo.

Etapa 4.- Esta etapa consiste en investigar sobre las condiciones de transferencia al invernadero; el método y el equipo requeridos para evitar problemas en esta etapa no son autónomos, porque dependen principalmente de la calidad y tipo de material producido en las etapas anteriores. En esta etapa la eficiencia también es importante. El uso de sistemas conectados (McCown, 1986) con sustratos naturales o artificiales, ofrecen la posibilidad de robotizar la mayoría de los requerimientos manuales de la micropropagación. El uso de invernaderos tradicionales no siempre es la mejor elección. Se ha desarrollado un sistema de multicapas que es viable para que el propagador emplee el espacio más eficientemente y también obtenga un mayor control

del medio ambiente, logrando así la mejor alternativa, para producir el mayor número de plantas en el menor espacio.

La aplicación práctica potencial de la técnica de cultivo de tejidos para la agricultura es muy diversa e importante, como por ejemplo: la inducción de plantas haploides a partir del cultivo de anteras y polen para la obtención de individuos homocigotos con características recesivas útiles; inducción y selección de mutantes por medio de agentes químicos o físicos y la propagación clonal o multiplicación rápida de genotipos específicos que a diferencia de la propagación asexual por otros métodos, la técnica de cultivo de tejidos provee un medio ambiente aséptico y controlado, agregando además que la multiplicación es substancialmente más rápida (Conger, 1981). Las ventajas de la micropropagación de una especie, propuestas por Hussey (1978) y Fossard (1976), son las siguientes:

- a) multiplicación rápida de especies híbridas nuevas , con características comerciales importantes.
- b) eliminación de virus a partir de una planta infectada.
- c) propagación de clones en cualquier época del año.
- d) propagación a gran escala de plantas genéticamente uniformes.
- e) propagación vegetativa de especies difíciles de propagar.
- f) producción, selección y propagación de plantas con características de resistencia al medio ambiente hostil o resistentes al ataque de cierto tipo de patógenos.
- g) potencial para propagar plantas que no se pueden regenerar por medio de otros métodos de propagación.

Al igual que la mayoría de las técnicas de propagación asexual, anteriormente analizadas esta técnica también presenta desventajas, por ejemplo:

- a) se necesita mano de obra calificada.
- b) los procedimientos son muy laboriosos por lo que se requiere emplear mucha mano de obra.
- c) altos costos debido al tipo de instalaciones, mantenimiento y mano de obra.
- d) gran variabilidad genética.
- e) mortalidad significativa de las plantas al transplantarlas a macetas.

Estas desventajas se pueden minimizar si la propagación de las plantas tienen demanda constantemente, si se incrementan las especies seleccionadas genéticamente, si se multiplican stocks resistentes a patógenos, si se establecen nuevos cultivos a partir de plantas silvestres y si se logra la clonación de líneas de híbridos producidos por semilla (Murashige, 1983)

Los factores que favorecen la inducción de la organogénesis en células y tejidos vegetales, son los siguientes: composición del medio; el tipo de explante que se elige tomando en cuenta el genotipo, el tamaño, el estado fisiológico y el tejido u órgano del cual procede; el tipo de luz, tiempo de iluminación e intensidad y la temperatura, cuyo rango óptimo normal de la mayoría de las plantas es de 26 a 28° C. Así mismo, cuando se hacen varios subcultivos se va perdiendo el potencial para la organogénesis. En esencia el genotipo de la planta escogida para la propagación, la estación del año y la variación morfológica pueden influir en la respuesta de la planta (Skivin, 1981).

Los pasos a seguir para la micropropagación consisten como primer punto, en el establecimiento de cultivos asépticos, es decir, que deben ser removidos los contaminantes superficiales como hongos o bacterias. Posteriormente se deben buscar las condiciones para la multiplicación del explante promoviendo el desarrollo de yemas axilares y terminales o la inducción de brotes adventicios. Como siguiente paso se deben investigar las condiciones para el enraizamiento y la preparación de los propágulos para la transferencia al suelo, ya que en este último punto las plantas pierden grandes cantidades de agua por evapotranspiración y consecuentemente se deben tener cuidados en la etapa de adaptación (Hughes, 1981).

Varios procedimientos alternativos han sido usados para la multiplicación clonal de plantas por medio de la micropropagación, como el desarrollo de yemas axilares y apicales, desarrollo de brotes adventicios y embriogénesis somática, los cuales se describen a continuación:

7.4.1. Desarrollo de yemas axilares y apicales.

En este método, las yemas axilares y apicales, pueden producir ya sea un solo brote o varios, dependiendo de la especie que se trate y del medio utilizado, la multiplicación clonal por este sistema está limitada a los brotes disponibles. La

propagación a través del cultivo de meristemas, es más amplia debido a que el meristemo es una pequeña área de células dividiéndose activamente, aunque carece de primordio de hojas y raramente se obtienen buenos resultados (Hughes, 1981). La ventaja de usar yemas axilares, sobre el cultivo de meristemas y las puntas de los brotes, es que el brote incipiente ya está diferenciado *in vivo*; así para establecer una planta completa solamente se requiere el crecimiento y la diferenciación de la raíz (Hu y Wang, 1983). Este método se emplea en clavel (Roest y Bokelmann, 1981), en soya (Evans, 1981) donde otros métodos de organogénesis o embriogénesis fallan.

7.4.2. Desarrollo de brotes adventicios.

En varias plantas, los órganos vegetales como las hojas, tallos, raíces o bulbos, pueden ser inducidos hacia la organogénesis, formando una planta completa o varias plántulas, este método tiene mayor potencial para producir una multiplicación masiva de clones que la inducción por brotes axilares. Por ejemplo, una sola hoja, puede producir miles de yemas o brotes, que son genéticamente iguales a la planta que les dio origen. Varias plantas se pueden multiplicar por este método, como la damiana (*Turnera diffusa*) (Díaz-Rondero y Alcaraz-Meléndez, 1987; Alcaraz-Meléndez y Real-Cosío, 1992,a ; Alcaraz-Meléndez, . 1994), crisantemo (*Crysanthemum morifolium*) (Grewal y Sharma, 1978), etc.

7.4.3. Embriogénesis somática.

Uno de los descubrimientos más espectaculares en el cultivo de plantas ha sido la inducción de embriones somáticos en cultivos celulares (Reinert, 1959). Esto demostró la persistencia de la totipotencialidad de las células de las plantas superiores para la regeneración (Reinert, *et al.* 1977), varios estados de desarrollo de los embriones somáticos son notablemente similares a los desarrollados por un embrión ocurrido después de la fertilización. El fenómeno de la embriogénesis somática, actualmente, ha sido reportada en más de 300 especies en un amplio rango de plantas, como árboles, cereales, pastos, plantas de ornato, plantas medicinales, etc. (Bajaj, 1995 a). Esta metodología disminuye la lentitud y la laboriosidad de las otras técnicas de cultivo de tejidos (Murashige, 1983). Durante la última década, se han hecho trabajos sobre los factores que afectan la embriogénesis somática, estudios de

ultraestructura, aspectos moleculares, transformación genética y expresión génica en embriones somáticos. Algunas de las aplicaciones prácticas que han llamado más la atención son (Bajaj, 1995 a):

a) Transformación genética de embriones somáticos y la producción de plantas transgénicas.

Se ha probado que los embriones somáticos son un excelente material para estudios sobre la transformación genética, especialmente en especies arbóreas. Los embriones somáticos son adecuados para expresar el ADN introducido, y la regeneración puede iniciar a partir de una célula en la superficie del embrión, y están capacitados para regenerar plantas no quiméricas, la regeneración de los sistemas es de suma importancia para la ingeniería genética. Así, los embriones responden favorablemente a la aplicación de *Agrobacterium tumefaciens* (Mathews, *et al.* 1992), a la microinyección (Neuhaus, *et al.* 1987 y al bombardeo de partículas (Wilde, *et al.* 1992).

b) Microinjerto de embriones somáticos.

El microinjerto es una técnica relativamente nueva y se injerta la punta del brote o ápice de la planta madre a una planta joven decapitada y creciendo en condiciones asépticas a partir de semilla, así, se rejuvenece la planta y se eliminan virus, especialmente en cítricos (Navarro, 1992). Aguilar, *et al.* (1992) aplicó la técnica de microinjerto a embriones somáticos de cacao, los cuales normalmente son difíciles de diferenciar a plantas completas, tomó embriones somáticos y los injertó en un segmento de raíz procedente de una semilla germinada de 3 semanas de edad, obteniendo plantas completas después de 18 meses.

c) Producción de embriones somáticos en bioreactores.

En la micropropagación convencional se requiere de mucho tiempo y es un trabajo laborioso y muy intensivo. Durante la última década, se ha incrementado el interés sobre los problemas que afectan el escalamiento (Bajaj, 1991). Para incrementar la eficiencia del escalamiento, se han empleado sistemas automatizados, para la producción de plantas; con este propósito se han desarrollado bioreactores, robots y otros variados sistemas mecanizados. Los bioreactores que se han utilizado

por varios autores para producir plantas a gran escala son: bioreactor de tambor rotatorio (Tanaka, *et al.* 1983), bioreactor de fase gaseosa (Ushiyama *et al.*, 1984), bioreactor con luz interna, etc. (Margaritis y Wallace, 1984). Con estos sistemas Ammirato y Styler (1985), pudieron obtener 60,000 embriones somáticos de células en suspensión de zanahoria en un bioreactor de un litro.

d) Producción de semillas sintéticas

Las semillas sintéticas pueden ser de embriones somáticos quiescentes o no quiescentes con encapsulación protectora, para la encapsulación se han empleado diferentes tipos de agentes gelificantes, como alginato de calcio, gelrite, gelatina, carraginata, etc. La encapsulación provee a los embriones somáticos una protección física, nutrientes, reguladores de crecimiento, antibióticos, fungicidas, etc. (Redenbaught *et al.*, 1991). Sakamoto, *et al.* (1992), desarrolló un sistema automatizado para producir semillas sintéticas de zanahoria, con el que produjo y sembró 70,000 semillas sintéticas por día, obteniendo el 52% de plantas completas.

e) Siembra directa en las camas de propagación de plántulas obtenidas por embriones somáticos y embebidas en un agente gelificante .

Esta técnica es para el establecimiento de cultivos la cual incluye, germinación, incorporación de las semillas a un gel y plantación de la mezcla del gel y la semilla en las camas de propagación. Este sistema puede proveer: i) uniformidad y rapidez en la emergencia de las plántulas; ii) mejores y más rápidos rendimientos y iii) en algunos cultivos, mayor uniformidad en la maduración que al sembrar semillas convencionales (Gray, 1984). Esta técnica tiene el potencial para la manipulación a granel de pequeñas plántulas, sin necesidad de manejarlas individualmente; además el gel acarreador y protector puede contener aditivos como fertilizantes, reguladores de crecimiento, pesticidas, etc.; también crea un medio ambiente 'empacado' para semillas y plántulas (Salter, 1978).

f) Criopreservación de embriones somáticos para la conservación de germoplasma.

Los embriones somáticos son un material excelente para estudios de criopreservación. Desde el momento en que se pueden producir a gran escala en bioreactores y tener un amplio rango de aplicaciones, se han mejorado las técnicas de

criopreservación, almacenando en congelador . Esta es una proposición viable para la conservación del germoplasma de ciertas especies a largo plazo y un posible intercambio de especies entre diferentes países (Bajaj, 1995 b).

7.5. Criterios de éxito en la micropropagación

El éxito en la micropropagación está asociado a la producción comercial. Desde el punto de vista comercial, la ventaja de la micropropagación puede estar en el desarrollo y el comercio de algún producto mejorado, en tres puntos de vista importantes: desarrollo de las plantas, incremento del producto y comercialización del producto (Chu y Kurtz, 1990).

Desarrollo de las plantas

Existen varios puntos en los cuales la micropropagación puede mejorarse y aumentar la velocidad de producción como:

a) multiplicación rápida, b) uniformidad en la producción, c) volumen abundante, d) plantas heterocigotas, e) plantas producidas por ingeniería genética, y f) conservación de germoplasma.

Incremento del producto

La micropropagación puede incrementar efectivamente la calidad deseable de una especie y por lo tanto proveer un producto de alto valor agregado, mejorando el fenotipo y propagando plantas libres de enfermedades.

Comercialización del producto

Además de los beneficios asociados a la comercialización en la micropropagación, es importante facilitar el flujo y distribución de las plantas propagadas, tomando en cuenta los siguientes puntos: a) presentación del producto, b) facilidad en la movilización y entrega a tiempo del producto, y c) producir especies fuera de temporada.

7.6. Calidad de las plantas micropropagadas en relación a las plantas silvestres y cultivadas.

Las plantas en condiciones naturales, pueden reproducirse por dos métodos: sexual, por medio de semillas y asexual por medio de órganos vegetativos; dependiendo de las ventajas selectivas y la etapa evolutiva de los diferentes tipos de especies. Hay plantas que solamente pueden reproducirse por semillas, como en el caso de la mayoría de las plantas anuales; o exclusivamente por medios vegetativos, como las plantas acuáticas; o pueden emplear ambos métodos como en el caso de la mayoría de las plantas herbáceas perennes (Fenner, 1985). Las plantas de damiana se reproducen por medio de semillas.

Las plantas seleccionadas y explotadas por el hombre también tienen diferentes tendencias para la propagación por semilla o por medios vegetativos; por lo tanto la calidad de las plantas dependerá del desarrollo de las técnicas probadas, las necesidades agronómicas, el producto que se desea obtener de cada especie y los costos de producción.

La propagación por medio de semillas tiene ventajas tales como,

- a) las semillas son pequeñas comparadas con la planta original.
- b) se producen en grandes cantidades.
- c) su tamaño pequeño facilita la dispersión a nuevas tierras.
- d) pueden sobrevivir en condiciones adversas, como sequía, la cual difícilmente podría tolerar la progenie propagada por medios vegetativos.
- e) cada una de las semillas es genéticamente diferente o única, esto es una consecuencia de la mezcla del material genético de los padres (por el entrecruzamiento de los genes). La diversidad heredada de la progenie producida sexualmente, provee a la población flexibilidad genética que asegura que al menos algunos individuos puedan sobrevivir a los estragos de la selección natural.

La propagación vegetativa presenta ventajas tales como:

- a) produce progenie que es siempre genéticamente igual o idéntica a las plantas madres, habiendo muy poca posibilidad de mutaciones somáticas.

- b) las semillas producidas apomícticamente producen poblaciones que tienen una flexibilidad genética muy pequeña producida por cambios medio ambientales
- c) el índice de sobrevivencia es más alto que en las plantas propagadas por semilla.

El objetivo en la propagación clonal es reproducir plantas de calidad deseable y cantidades uniformes. Este tipo de reproducción es más rápida por medio de cultivo de tejidos vegetales, que con los métodos de propagación tradicional, las ventajas de la micropropagación son (George, 1993):

- a) los cultivos inician con una pequeña parte de la planta (explante).
- b) se lleva a cabo en condiciones asépticas, libre de patógenos como hongos, bacterias y otros microorganismos.
- c) se pueden propagar grandes cantidades de plantas libres de virus.
- d) hay mayor flexibilidad para ajustar los factores que influyen en la regeneración vegetativa como medio nutritivo, reguladores de crecimiento, luz, temperatura, etc.
- e) es posible producir clones de algún tipo de plantas, que de otra forma su propagación vegetativa sería lenta y difícil.
- f) las plantas micropropagadas pueden adquirir características temporales más útiles para los agricultores.
- g) la producción es independiente de las estaciones del año y por lo que puede haber producción todo el año.
- h) el material para la propagación vegetativa puede almacenarse por largos períodos de tiempo (criopreservación).
- i) se requiere menos espacio y energía para el mantenimiento y propagación de las plantas madre.
- j) el material vegetal requiere poca atención entre subcultivos.

La habilidad para lanzar un producto con alta calidad es de primera importancia para que sean aceptadas las plantas micropropagadas por los consumidores. Para asegurar un alto nivel de calidad, es importante dirigir los esfuerzos hacia el control de calidad, incluyendo gradientes por tamaños, pruebas del producto y aclimatación. Además mantener la estabilidad genética y fenotípica de las plantas, teniendo cuidado

del medio de crecimiento para evitar la producción de callos que puedan provocar un cambio genético en las plantas micropropagadas.

Por todo lo anterior se podría decir que en las plantas micropropagadas es posible controlar y mejorar la calidad, no siendo esto posible en las plantas silvestres y cultivadas.

7.7. Factor económico en la micropropagación.

Los costos de producción por micropropagación son comparativamente mayores que los métodos convencionales (George y Sherrington, 1984). Aunque, para muchas especies la micropropagación no es competitiva comparada con la propagación por semilla o por estacas. La micropropagación es conveniente solamente cuando hay alguna ventaja sobre los métodos convencionales, que incremente el valor, como cuando: a) una planta no pueda ser propagada fácil y rápidamente por otros métodos, b) el alto costo de otros métodos, c) los métodos convencionales requieran de técnicas especiales como el injerto, y d) la capacidad de producir plantas libres de enfermedades (George y Sherrington, 1984).

Los costos de micropropagación pueden determinarse por diversos métodos, Donnan (1986) sugiere los siguientes aspectos:

a) el costo total de operación por producción en cierto período de tiempo, puede ser dividido entre el total de plantas vendidas. Estos cálculos dan una vista general de los costos, pero esto no proporciona información para comparar costos de producción de otras especies.

b) los costos de operación por transferencias en la campana de flujo laminar pueden calcularse dividiendo el costo total de operación entre el número de transferencias en la campana y multiplicando por el número de horas por transferencia por el tiempo en cuestión. El resultado es el costo de operación en la campana de flujo laminar por hora.

c) otro aspecto que debe ser calculado desde el punto de vista de producción es el espacio ocupado en los anaqueles del cuarto de cultivos, al analizar este factor ilustra la importancia de mantener ocupados todos los espacios.

d) determinar el costo de cada producto en las diferentes etapas de la micropropagación, llevando un control diario de cultivos por frasco, velocidad de multiplicación, pérdidas y asignación de espacios. Para las operaciones en las que las plantas llegan a la etapa 4, se debe incluir registros del invernadero, velocidad de plantación, tiempos de finalización y pérdidas al trasplante.

Para poder controlar y reducir los costos de producción es necesario examinar los componentes necesarios para la producción, hasta obtener plantas en macetas, estos componentes los desglosan Chu y Kurtz (1990) en los siguientes puntos: mano de obra en el laboratorio, utilidades, depreciación de las instalaciones, supervisión tanto en laboratorio como en el invernadero, mano de obra para la plantación directa y otros costos de producción como mantenimiento y reparación, aseguradoras, impuestos y viajes. Otros costos que pueden considerarse son los pagos por derechos de autor para patentar la metodología empleada.

El futuro exitoso de la industria de la micropropagación depende de dos puntos principales (Chu y Kurtz, 1990):

- a) la producción de productos cuidadosamente elegidos, basados en un análisis de mercado exhaustivo.
- b) reducción de los costos de producción, tanto como sea posible sin disminuir la calidad del producto.

Para lograr el último punto, es necesario optimizar los sistemas de producción, nivelando las condiciones de producción de grandes cantidades de plantas eficientemente y aplicando sistemas de micropropagación mecanizada que disminuya tanto como sea posible los costos de mano de obra.

V. OBJETIVOS

1. Objetivos generales.

Debido a la importancia socio-económica que representa la explotación de la planta de damiana en zonas semi-desérticas y además de que su uso sostenido sin implementar la domesticación y cultivo, puede conducirla en un futuro cercano a la extinción, sobre todo en un mercado en extensión lo cual puede suceder eventualmente, y tomando en cuenta que, la única fuente de explotación comercial son las poblaciones silvestres, se planteó como objetivo general del presente trabajo, desarrollar una tecnología para iniciar la domesticación de las plantas de damiana, considerando que el primer paso para la domesticación de las especies es la propagación, y basándonos en los trabajos reportados, se ha demostrado que a pesar de que la damiana produce semillas, éstas no germinan en condiciones controladas y en condiciones silvestres no se tiene registro de la germinación pero se infiere que es muy baja debido a que no existen, ni han existido grandes poblaciones de damiana, . Con estas bases el presente trabajo se enfocó hacia la investigación de las condiciones para la propagación de esta especie, empleando la técnica de cultivo de tejidos vegetales, la cual es una alternativa que proporciona grandes ventajas, ya que se mantienen las condiciones medio ambientales controladas, se selecciona y dosifica el tipo de nutrientes que requiere la especie, se evita la influencia de cualquier tipo de microorganismos, también es posible seleccionar y propagar un clon de interés tanto ecológico como económico, se dispone del recurso permanentemente y cuando se han establecido las condiciones para la propagación es posible la producción masiva en un espacio reducido.

El objetivo de este trabajo desde el punto de vista ecológico es proveer una metodología para la propagación de damiana dirigida hacia la domesticación, creando así un nuevo potencial para las zonas áridas agrícolas de México. Esperando que sea un medio eficiente de domesticación que reduzca el interés comercial de cosechar las plantas silvestres.

2. Objetivos específicos.

Los objetivos específicos del presente trabajo son:

- 1) Investigar las condiciones que favorezcan la propagación de la planta de damiana por medio de la técnica de cultivo de tejidos vegetales. Probando dos medios nutritivos diferentes, 4 tipos de explantes, varias concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento, como ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 6-bencil adenina (BA) y ácido indol butírico (AIB).
- 2) Investigar el efecto en el enraizamiento de plántulas de damiana desarrolladas en cultivo de tejidos vegetales probando dos diferentes concentraciones de AIB, ácido naftalen acético (alfa y beta) (ANA) y ácido indol acético (AIA).
- 3) Evaluar el desarrollo y producción de plantas de damiana propagadas mediante cultivo de tejidos y su transplante al campo.
- 4) Comparar el contenido de aceites esenciales y lípidos totales de las plantas silvestres y las plantas propagadas por cultivo de tejidos vegetales.

VI MATERIALES Y METODOS.

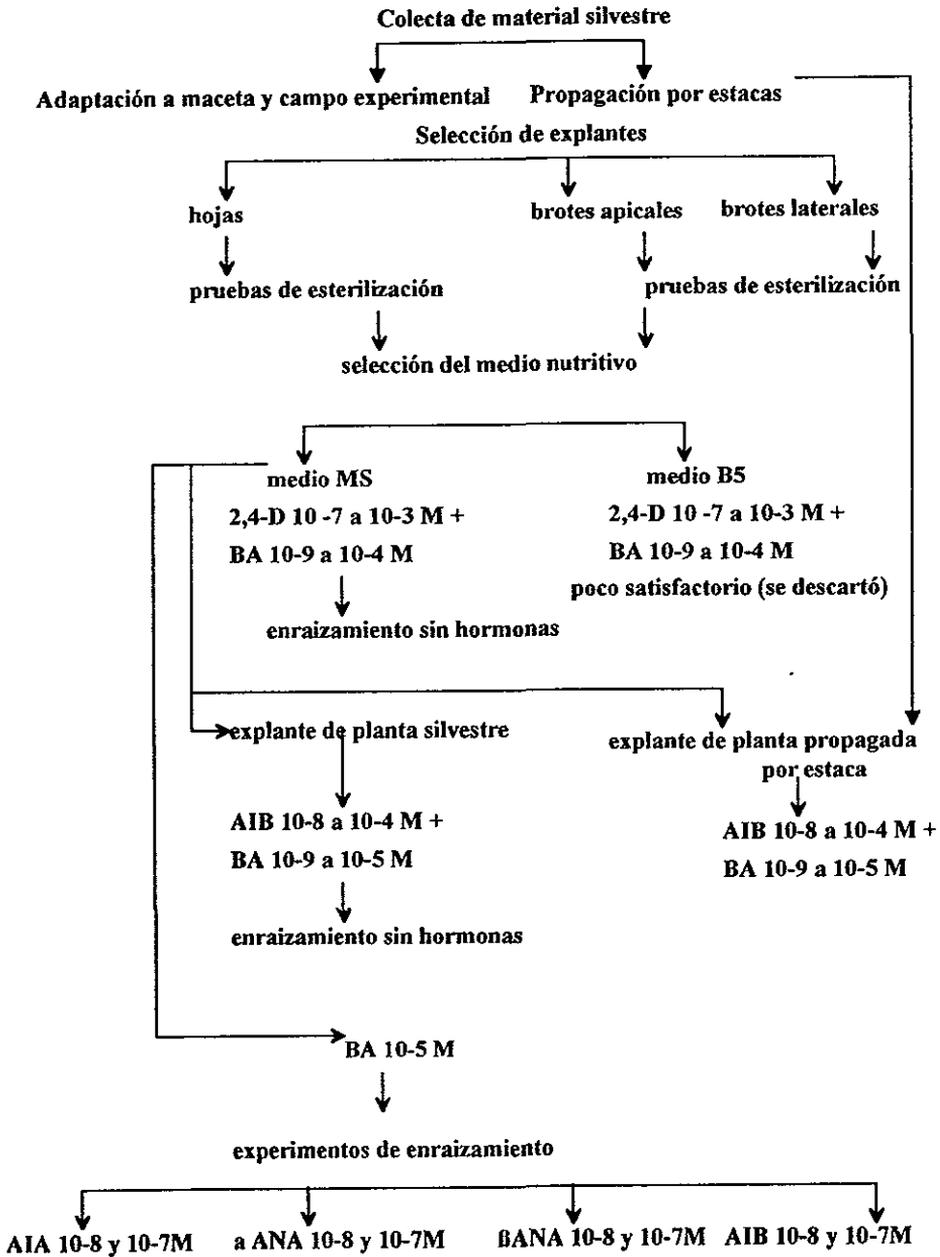
1. Material biológico

Se emplearon plantas procedentes de poblaciones silvestres de damiana ubicadas en el área fitogeográfica denominada Región de los Cabos. Esta zona presenta una altitud que va entre los 0 y 300 msnm, y se encuentra localizada al sur de la Península de Baja California, entre los paralelos 23° 27' latitud norte y 110° 14' longitud oeste (Figura 3)

Se colectaron plantas de 25 a 35 cm de altura y se transplantaron a macetas (10 cm longitud X 10 cm de ancho X 15 cm de altura) conteniendo suelo arenoso del sitio original y se llevaron al laboratorio, con el fin de emplearlas como fuente de explantes para los experimentos de micropropagación. Un año después se transplantaron al campo experimental del CIBNOR, ubicado en El Comitán, a 17 km. al norte de la ciudad de La Paz, Baja California Sur. Las plantas fueron comparadas con ejemplares del herbario del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR), ubicándolas en la familia de las Turneraceas y clasificándolas con el género *Turnera*, especie *diffusa*.

También se emplearon como fuente de explantes hojas de plantas propagadas por enraizamiento de estacas. Las estacas se obtuvieron en las mismas poblaciones de plantas silvestres. Para inducir el enraizamiento de estacas, se sumergieron en una solución acuosa conteniendo ácido naftalen acético 2.15×10^{-4} M, durante 10 min. y posteriormente se les aplicó un fungicida comercial (Captán, N-[tricloro metiltio]-4-ciclohexano-1-2-dicarboximida); durante el período de enraizamiento las estacas se colocaron en camas de propagación cubiertas con plástico, con suelo arenoso y vermiculita (1:1 v/v) a temperaturas entre 30 y 45 °C entre 67 y 75 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa.

Figura 6 . Experimentos realizados *in vitro* en la micropropagación de damiana.



2. Cultivo *in vitro*

La figura 6 resume la estrategia seguida para llevar a cabo la investigación sobre las condiciones para la micropropagación de damiana . La cual incluyó:

a) Selección de explantes.

Después de acondicionar las plantas a macetas, se procedió a buscar los explantes adecuados para el cultivo de tejidos, probando con brotes apicales, brotes laterales y hojas.

b) Pruebas de esterilización de los explantes.

Como se indicó anteriormente, el primer paso para establecer cultivos *in vitro* es esterilizar del material vegetal. Para esto se probaron diversas concentraciones de hipoclorito de calcio de 5, 10 y 15 % sobre los explantes de brotes apicales, brotes laterales y hojas, variando los tiempo de tratamiento en 5, 10, 15 y 20 min. Cada tratamiento se probó en 20 explantes, sembrando 2 explantes por frasco en 3 experimentos independientes . Se hicieron revisiones periódicas cada tercer día durante 15 días, para observar en que condiciones de esterilización se obtuvo menor contaminación. Con base en estas observaciones, se diseñó el siguiente procedimiento: se emplearon hojas jóvenes y se lavaron con detergente comercial al 5% (filtrando los precipitados que quedaron después de disolverlo), posteriormente los explantes se trataron los explantes primero con etanol al 95% durante 15-20 seg y después con hipoclorito de calcio al 10% durante 10 min; finalmente, se enjuagaron 5 veces con agua destilada estéril y posteriormente se sembraron en los medios de cultivo.

c) Selección del medio nutritivo para la propagación de damiana

En este trabajo se experimentó con los medios B5 (Gamborg, *et al.*, 1976) y Murashige y Skoog (1962) (MS). Se emplearon 20 ml de cada medio en frascos de vidrio de 120 ml de capacidad con tapas de plástico translúcidas .

d) Reguladores de crecimiento

Para inducir la organogénesis, y el enraizamiento se probaron diferentes reguladores de crecimiento.

Inicialmente se experimentó con los medios B5 y el medio MS complementados con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones de 10^{-7} M a 10^{-3} M combinado con 6-bencil adenina (BA) en concentraciones de 10^{-9} M a 10^{-4} M (42 combinaciones en total). Se efectuaron 6 repeticiones por tratamiento en 3 experimentos independientes (Díaz-Rondero y Alcaraz-Meléndez, 1987).

Posteriormente, se probaron dos fuentes diferentes de explantes, a) hojas de plantas silvestres y b) hojas de plantas propagadas por medio de estacas. Para los experimentos *in vitro*, se empleó el medio nutritivo MS suplementado con ácido indol butírico (AIB) en concentraciones de 10^{-8} M a 10^{-4} M, combinadas con BA en concentraciones de 10^{-9} M a 10^{-6} M. El AIB se esterilizó por medio de filtración con membranas de $0.45 \mu\text{m}$ y se agregó antes de que solidificara el medio. Se probaron 6 recipientes por concentración, 2 explantes de hoja por frasco y se repitieron los experimentos 3 veces (Alcaraz-Meléndez *et al.* 1994).

Para mejorar el enraizamiento de los brotes desarrollados en el medio MS se probaron el ácido indol acético (AIA), alfa y beta ácido naftalen acético (ANA) y ácido indol butírico (AIB) en concentraciones de 10^{-8} y 10^{-7} M. Se emplearon 50 brotes por tratamiento y se repitió el experimento 3 veces (Alcaraz-Meléndez, *et al.* 1998).

e) Metodología de siembra y condiciones medio ambientales de los cultivos

Todas las operaciones de cultivo *in vitro* fueron realizadas bajo condiciones de total asépsia empleando una campana de flujo laminar (Labconco). Después de la esterilización, se cortó el extremo inferior de los brotes apicales y axilares y se sembraron en el medio en posición vertical. Las hojas empleadas como explantes, fueron hojas jóvenes de 17-20 mm de longitud, se cortaron a la mitad transversalmente y ambos segmentos se colocaron horizontalmente en el medio. Todos los explantes se sembraron en frascos de vidrio de 120 ml de capacidad y cubiertos con tapas translúcidas esterilizables. Los explantes se incubaron en un cuarto de cultivo iluminado con luz fluorescente continua, con una intensidad de $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$, a una temperatura de 25 ± 2 °C. Después de dos meses, cuando los explantes presentaban principios de brotes se transfirieron a medio fresco. Esta operación se repitió cada cuatro semanas a lo largo de nueve meses.

f) Evaluación *in vitro*

En las pruebas de esterilización de los explantes se cuantificó el número de muestras contaminadas y el daño producido en los tejidos por los tratamientos con hipoclorito de calcio.

Se evaluó el porcentaje de explantes que produjeron brotes, en los diferentes medios y concentraciones hormonales probadas así como el número de brotes producidos.

Posteriormente, se cuantificó el porcentaje de explantes que enraizaron en el medio libre de hormonas, pero que habían sido tratados con diferentes concentraciones hormonales para inducir el desarrollo de los brotes.

En los experimentos para inducir el enraizamiento, se cuantificó en forma porcentual el número de brotes que enraizaron con las diferentes concentraciones hormonales probadas y se cuantificó el número de raíces desarrolladas por brote en cada tratamiento.

3. Cultivo *ex vitro*

Las plántulas de damiana enraizadas *in vitro*, se transfirieron a macetas conteniendo suelo arenoso, y se colocaron en una cámara de cultivo a temperaturas entre 25 y 30° C y fotoperíodo de 12 horas de luz por 12 horas de oscuridad. La humedad relativa se mantuvo entre 95 y 99% cubriendolas con bolsas de plástico de 20 cm de alto por 10 de ancho o con frascos de vidrio invertidos de 150 ml de volumen, estas condiciones se mantuvieron durante 3 meses.

Después del periodo de adaptación, las plántulas se transplantaron al campo experimental del CIBNOR ubicado en El Comitán, Baja California Sur. Se sembraron a una distancia de 1 m por 1.5 m entre cada una y se regaron cada 8 días durante 3 meses, cada 15 días durante 3 años y posteriormente cada mes. El transplante se efectuó entre los meses de Octubre y Marzo, en los periodo en que la temperatura medio ambiental no es tan alta ni la sequía tan extrema .

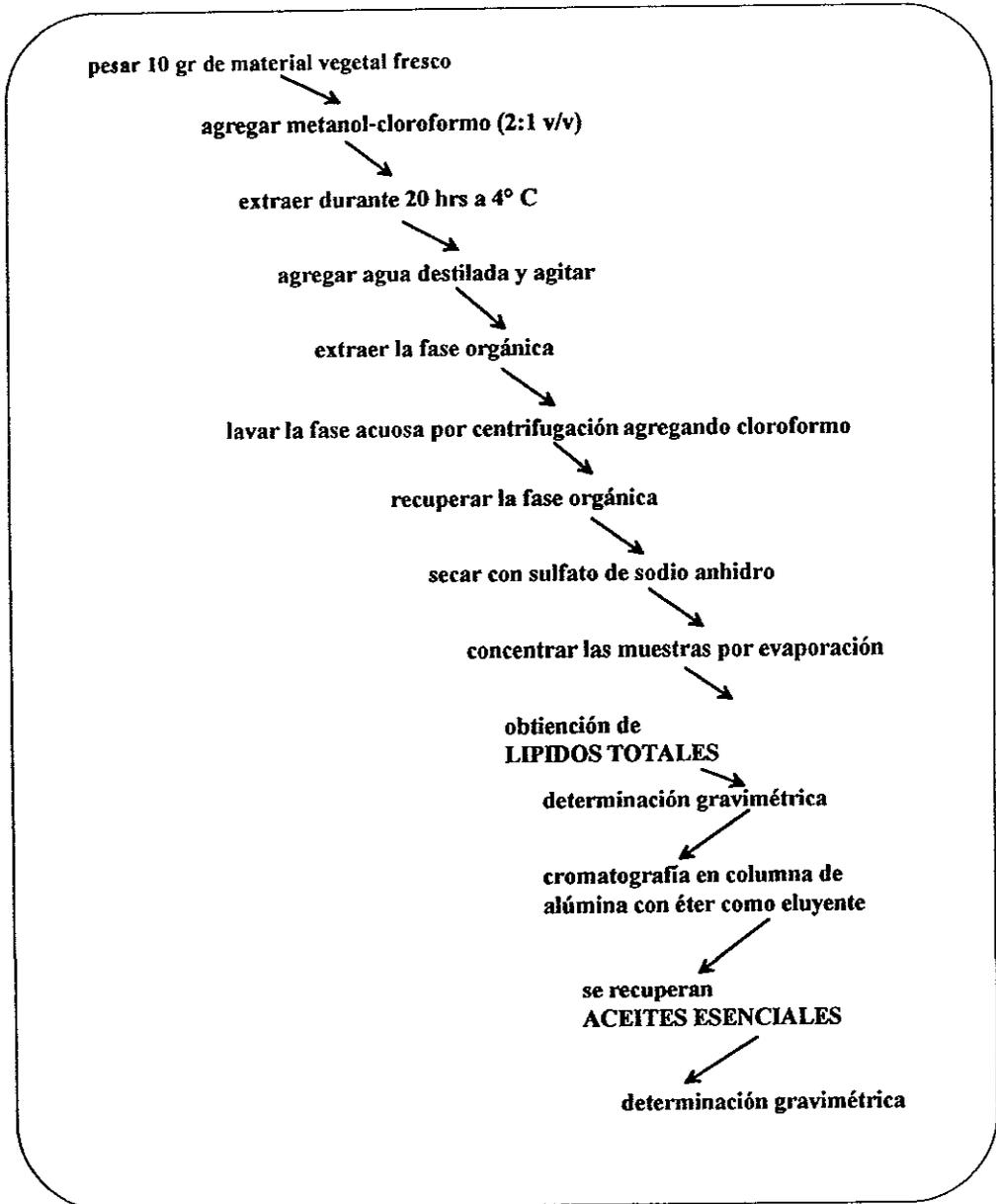
Para calcular el crecimiento, el peso fresco y el peso seco de las plantas, se realizaron muestreos anuales de 42 plantas micropropagas sembradas en el campo

experimental pesándose por separado hojas y tallos, el peso seco se obtuvo secando las muestras en el horno a 60° C y por diferencia entre peso fresco y peso seco se determinó el porcentaje de humedad. Estas evaluaciones se llevaron a cabo durante 3 años consecutivos y posteriormente al octavo año (Tabla 9).

4. Análisis de los aceites esenciales

La metodología empleada (Figura 7) es la descrita por Vázquez-Duhalt y Greppin (1987) para la extracción de lípidos totales y aceites esenciales con una mezcla de metanol-cloroformo (2:1 v/v) durante 24 hrs. a una temperatura de 4 °C. Posteriormente se filtró el extracto y se agregaron 3 ml de agua destilada, la mezcla se centrifugó, la fase clorofórmica se colectó y la fase acuosa se lavó 3 veces más con 3 ml de cloroformo cada vez, la solución resultante se secó a una corriente de nitrógeno y se pesaron los lípidos totales; los aceites esenciales se obtuvieron al fraccionar la solución anterior con una columna cromatográfica de alúmina, eluyendo con éter etílico, el filtrado se concentró con el rotavapor, se resuspendió la muestra en 1 ml de éter etílico para transferirla a viales de 1.5 ml, se secó la muestra con nitrógeno y se determinó la concentración por peso.

Figura 7. Procedimiento empleado para la extracción y cuantificación de aceites esenciales en hojas de plantas silvestres y plantas micropropagadas de damiana.



El método empleado para la cromatografía en capa fina de los aceites esenciales fue el descrito por Kates (1982), y se llevó a cabo de la siguiente forma:

Se tomaron los extractos de aceites esenciales y se concentraron con N_2 .

Las placas de vidrio (20 X 20 cm) cubiertas con 250 μm de silica gel, con indicador fluorescente de 254 nm (Baker), se activaron a 100° C durante 30 min, posteriormente se aplicaron 7 muestras diferentes a cada placa de cromatografía. La mezcla de solventes empleados fué éter de petróleo, éter etílico y ácido acético en proporciones 90: 10: 1 (v/v/v). La cromatografía se corrió 15 cm para observar la separación de los compuestos. Las placas se revelaron rociando con una mezcla de etanol y ácido sulfúrico en proporciones 95: 5 (v/v) y colocándolas en el horno a 200 °C hasta que las muestras son visibles. Se midió la distancia de migración de cada compuesto revelado y se calculó el R_f de acuerdo a la siguiente fórmula :

$R_f = \text{distancia del origen a la migración de la muestra} / \text{distancia del origen a la máxima migración del solvente.}$

5. Análisis estadísticos

El efecto de los reguladores de crecimiento en la formación de brotes, raíces y los datos obtenidos al muestrear las plantas desarrolladas en el campo experimental, se analizaron por medio del análisis multifactorial de varianza (ANOVA) y el análisis de una vía para determinar las diferencias significativas (Least Significant Test, LSD), empleando el programa estadístico "Statgraphics" versión 5.1 (Statistical Graphics Co.). Los datos de porcentajes, se transformaron a valores arcsine antes de someterlos a las pruebas estadísticas, porque son de distribución binomial y se tienen que cambiar a una distribución normal como lo requiere el análisis de ANOVA (Zar, 1974). El nivel de significación fué de 5%.

Para comparar los datos de los aceites esenciales de las plantas silvestres y las plantas micropropagadas se empleó la "t" de Student. Se empleó también el programa estadístico "Statgraphics" versión 5.1 (Statistical Graphics Co.).

VII RESULTADOS

1. Selección de explantes para la micropropagación de damiana

Los resultados obtenidos mostraron que las hojas son los explantes más adecuados para el cultivo de tejidos, debido a su mayor disponibilidad en las plantas colectadas y sembradas en macetas; porque en una rama de 20 cm de largo se observaron 67 hojas, 11 brotes apicales y 28 brotes laterales; otro factor importante es que hubo un menor índice de contaminación en las hojas.

2. Pruebas de esterilización de los explantes

Los resultados obtenidos en la esterilización de las hojas, brotes apicales y laterales se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentaje de explantes no contaminados después de 15 días de tratamiento con hipoclorito de calcio.

Tipo de explante	% de Hipoclorito de calcio	Tiempo de tratamiento (min)			
		5	10	15	20
Hojas	5	0	54 ± 2	63 ± 4	*
	10	43 ± 6	95 ± 3	97 ± 2 *	*
	15	49 ± 2	*	*	*
Brotes	5	0	10 ± 2	15 ± 5	*
	10	5 ± 2	15 ± 4	28 ± 3*	*
	15	8 ± 3	*	*	*

± desviación standard

* daños visibles en los tejidos

3. Cultivo *in vitro* de explantes de damiana

En este trabajo el cultivo *in vitro* se dividió en tres etapas principales, las cuales se detallan a continuación.

3.1. Organogénesis con diferentes medios nutritivos y reguladores de crecimiento.

Los resultados de estos experimentos que consistieron en probar los medios MS y B5 para la micropropagación de damiana y las combinaciones hormonales de 2,4-D 10^{-7} a 10^{-3} M combinado con BA 10^{-9} a 10^{-4} M (Díaz-Rondero y Alcaraz-Meléndez 1987) (Tablas No. 3 y 4).

Inducción de callos.

Al aplicar diferentes concentraciones hormonales, en ambos medios, se observó producción de callos, como se muestra en las Tablas No. 3 y 4.

Tabla 3. Respuesta morfogénica de hojas de damiana cultivadas en medio B5 con diferentes concentraciones de 2,4-D y BA. Los números entre paréntesis representan el porcentaje de producción de (c) callos, (b) brotes, (h) hojas, (r) raíces, (-) no hubo respuesta.

BA (M)	Estructura	2,4-D (M)					
		0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
0	c	3/18 (17)	6/18 (33)	9/18 (50)	18/18(100)	15/18 (83)	-
	b	-	-	-	-	-	-
	h	-	-	-	-	-	-
	r	3/18 (17)	-	-	-	-	-
10^{-9}	c	3/18 (17)	3/18 (17)	6/18 (33)	12/18 (67)	18/18(100)	-
	b	-	-	-	-	-	-
	h	-	3/18 (17)	-	-	-	-
	r	-	-	-	-	-	-
10^{-4}	c	3/18 (17)	-	-	12/18 (67)	17/20 (86)	-
	b	-	-	-	-	-	-
	h	-	-	-	-	-	-
	r	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	c	3/18 (17)	-	-	18/18(100)	6/19 (33)	-
	b	3/18 (17)	-	-	-	-	-
	h	-	-	-	-	-	-
	r	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	c	3/18 (17)	3/18 (17)	-	15/18 (83)	15/18 (83)	-
	b	-	-	-	-	-	-
	h	3/18 (17)	-	-	-	-	-
	r	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	c	12/18 (67)	6/18 (33)	3/18 (17)	18/18(100)	18/18(100)	-
	b	9/18 (50)	12/18 (67)	-	-	-	-
	h	3/18 (17)	9/18 (50)	9/18 (50)	-	-	-
	r	-	-	-	-	-	-
10^{-4}	c	6/18 (33)	3/18 (17)	-	6/18 (33)	3/18 (17)	-
	b	-	-	-	-	-	-
	h	-	-	-	-	-	-
	r	-	-	-	-	-	-

Tabla 4. Respuesta morfológica de hojas de damiana cultivadas en medio MS con diferentes concentraciones de 2,4-D y BA. Los números entre paréntesis representan el porcentaje de producción de (c) callos, (b) brotes, (h) hojas, (r) raíces, (-) no hubo respuesta.

BA (M)	Estructura	2,4-D (M)					
		0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
0	c	12/18 (67)	6/18 (33)	18/18(100)	12/18 (67)	18/18(100)	-
	b	12/18 (67)	6/18 (33)	-	-	-	-
	h	6/18 (33)	6/18 (33)	-	-	-	-
	r	-	-	-	6/18 (33)	-	-
10^{-9}	c	15/18 (83)	14/19 (75)	12/18 (67)	18/18(100)	15/18 (83)	-
	b	15/18 (83)	13/18 (75)	-	-	-	-
	h	3/18 (17)	9/18 (50)	-	-	-	-
	r	-	-	-	-	-	-
10^{-4}	c	6/18 (33)	18/18(100)	12/18 (67)	18/18(100)	18/18(100)	-
	b	6/18 (33)	18/18(100)	-	-	-	-
	h	3/18 (17)	9/18 (50)	-	-	-	-
	r	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	c	18/18(100)	15/18 (83)	18/18(100)	18/18(100)	18/18(100)	-
	b	-	15/18 (83)	-	-	-	-
	h	-	12/18 (67)	-	-	-	-
	r	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	c	18/18(100)	12/18 (67)	18/18(100)	18/18(100)	18/18(100)	-
	b	18/18(100)	12/18 (67)	-	-	-	-
	h	12/18 (67)	6/18 (33)	-	-	-	-
	r	3/18 (17)	-	6/18 (33)	12/18 (67)	-	-
10^{-5}	c	18/18(100)	18/18(100)	18/18(100)	18/18(100)	18/18(100)	-
	b	18/18(100)	18/18(100)	18/18(100)	-	-	-
	h	18/18(100)	15/18(83)	9/18 (50)	-	-	-
	r	-	-	-	6/18 (33)	-	-
10^{-4}	c	-	-	-	3/18 (17)	-	-
	b	-	-	-	-	-	-
	h	-	-	-	-	-	-
	r	-	-	-	-	-	-

El Análisis de Varianza con 95% nivel de confianza y la prueba de rangos múltiples (LSD, Least Significant Difference Test) (Zar, 1974), mostró que si hubo diferencias significativas en la producción de callos entre los medios B5 y MS.

El efecto de los reguladores de crecimiento en los explantes desarrollados en el medio B5 (Tabla 3), fué analizado estadísticamente por medio del análisis de varianza de dos factores (Zar, 1974). Para las muestras tratadas con 2,4-D, en el porcentaje de producción de callos hubo diferencias significativas entre las concentraciones probadas al nivel de significación de 1%. También hubo diferencias significativas en el efecto de las diferentes concentraciones de BA al mismo nivel de significación. La aplicación de 2,4-D 10^{-3} M inhibió la inducción de callos y los explantes se tornaron cafés. En contraste los explantes tratados con 2,4-D 10^{-5} y 10^{-4} M solos o combinados con BA produjeron mayor porcentaje de callos. Al aplicar BA 10^{-5} solo o combinado con 2,4-D 10^{-6} o 10^{-7} M, se observó mayor desarrollo de brotes y hojas.

Cuando se examinó estadísticamente la inducción de callos en el medio MS con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (Tabla 4), el análisis de varianza de dos factores mostró que si hubo diferencias significativas entre los explantes tratados tanto con 2,4-D como con BA al 1% de significación. Los explantes tratados con 2,4-D 10^{-3} M en todas las combinaciones con BA al igual que en el medio B5, se tomaron cafés y murieron. Los explantes tratados con BA 10^{-4} M + 2,4-D 10^{-5} M produjeron un % muy bajo de callos y de color café. Los callos formados con 2,4-D 10^{-4} M en todas las combinaciones con BA, fueron de color amarillento y consistencia friable. Los callos formados con 2,4-D 10^{-5} M en todas las combinaciones con BA, fueron verdes y compactos. Los callos formados con 2,4-D 10^{-6} M con las diferentes concentraciones de BA fueron blancos y muy compactos. La mayoría de los callos formados con 2,4-D 10^{-7} y las combinaciones de BA y los explantes tratados solamente con BA formaron tejidos diferenciados.

Organogénesis en explantes de damiana.

Después de la formación de callos y dependiendo del regulador de crecimiento aplicado, se observó organogénesis en ambos medios (Tablas 3 y 4).

La organogénesis en el medio B5 fué menor que en el medio MS (Tablas 3 y 4). En el medio B5 la organogénesis fué mejor en los explantes tratados con BA 10^{-5} M y 2,4-D 10^{-7} M + BA 10^{-5} M, observándose que la mayor producción de brotes fué el 67%. El enraizamiento solo se produjo cuando se cambiaron a medio sin reguladores de crecimiento.

En el medio MS adicionado con BA 10^{-5} M se produjo un gran número de brotes por explante (40.2 ± 18.6 brotes por explante). Al aplicar BA 10^{-5} M + 2,4-D 10^{-7} M, la producción promedio máxima de brotes fué de 34 ± 29 . El mayor porcentaje de brotes enraizados (Tabla 4), fueron los tratados con BA 10^{-6} + 2,4-D 10^{-5} M, aunque el mayor número de raíces por brote fué en los explantes tratados con BA 10^{-5} M + 2,4-D 10^{-5} M y fueron en promedio 6 ± 1.4 .

Se analizó la eficiencia de los tratamientos para inducir la organogénesis de explantes de hoja de damiana, en el medio MS, con las concentraciones de reguladores de crecimiento que produjeron brotes (Tabla 5) empleando el "Índice Relativo de Rendimiento de los Brotes" (IRRB) (Rubluo *et al.*, 1984) y se observó que al aplicar BA 10^{-5} M se obtuvo la mayor eficiencia en la organogénesis.

Los explantes tratados con BA 10^{-5} M y BA 10^{-5} M + 2,4-D 10^{-7} M, enraizaron y crecieron al ser transferidos 3 veces al medio MS sin hormonas. Bajo estas condiciones se produjeron entre 4 y 5 plántulas por explante; las plántulas desarrolladas se separaron y transfirieron a macetas con suelo arenoso.

Los resultados obtenidos en los medios y las concentraciones hormonales probadas se muestran gráficamente en la Figura 8 para los explantes tratados con el medio B5 y la Figura 9 para los explantes tratados con el medio MS.

Tabla 5. Análisis de eficiencia de producción de brotes al cultivar explantes de hoja de damiana en el medio MS con diferentes concentraciones de BA y 2,4-D

Concentración de reguladores de crecimiento		% producción de brotes	Número de brotes por explante	IRRB*
BA (M)	2,4-D (M)			
0	0	67	8.5	569.5
10 ⁻⁹	0	83	2.4	199.2
10 ⁻⁴	0	33	6	198
10 ⁻⁶	0	100	20.3	2,030
10 ⁻⁵	0	100	40.2	4,020
0	10 ⁻⁷	33	9.5	313.5
10 ⁻⁹	10 ⁻⁷	75	9	675
10 ⁻⁴	10 ⁻⁷	100	6.8	680
10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	83	8.4	697.2
10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	67	15.3	1,025.1
10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	100	34	3,400
10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	100	14	1,400

* Índice relativo de rendimiento de brotes (Rubluo, *et al.* 1984).

Figura 8. Representación gráfica de los callos, brotes, hojas y raíces producidas al sembrar explantes de hoja de damiana en el medio B5 con diferentes combinaciones de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BA. La escala representa 1 cm.

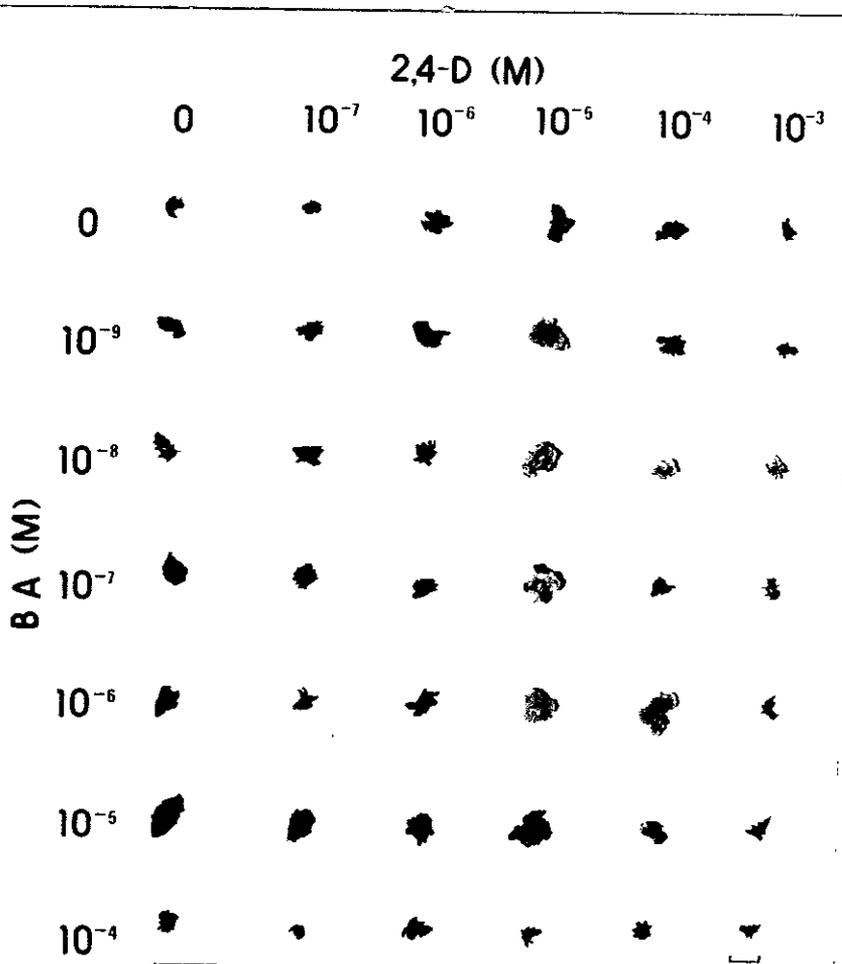
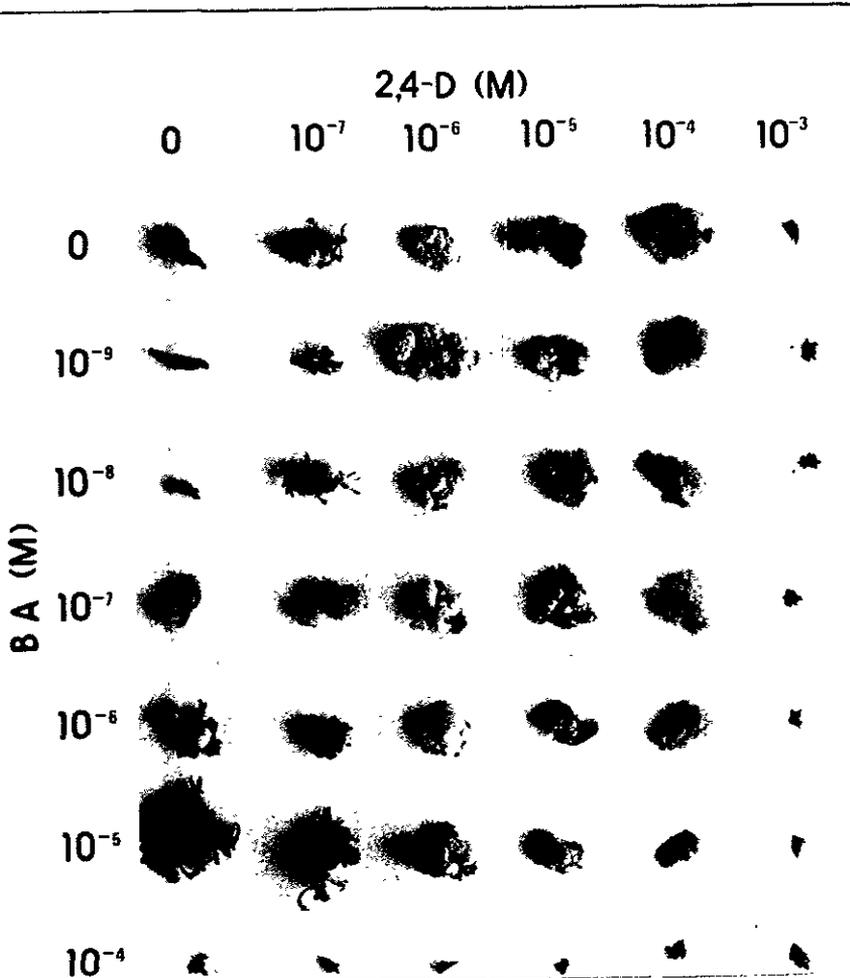


Figura 9. Representación gráfica de los callos, brotes, hojas y raíces producidas al sembrar explantes de hoja de damiana en el medio MS con diferentes combinaciones de los reguladores de crecimiento 2,4-D y BA. La escala representa 1 cm.



3.2 Organogénesis probando diferentes fuentes de explantes y reguladores de crecimiento.

Estos experimentos se desarrollaron para evaluar la fuente mas adecuada de explantes, a partir de plantas silvestres transplantadas al campo experimental del CIBNOR y a partir de plantas propagadas por estaca. Los explantes fueron evaluados en medio MS con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, BA en concentraciones entre 10^{-9} M y 10^{-5} M y AIB en concentraciones entre 10^{-8} M y 10^{-4} M (Alcaraz-Meléndez, *et al.* 1994).

Los explantes provenientes de las plantas propagadas por estacas no mostraron ninguna respuesta en ninguna de las combinaciones de reguladores probados. En todos los casos éstos se tomaron café y murieron después de 15 días de haber sido sembrados.

Los explantes provenientes de plantas silvestres que fueron incubados en las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, formaron brotes nuevos y el desarrollo de callos fué mínimo (Figura 10).

La mejor combinación hormonal para inducir la producción de brotes a partir de explantes de hojas, en el medio MS fué AIB 10^{-6} M + BA 10^{-7} M con una respuesta del 92%. Las siguientes mejores combinaciones fueron AIB 10^{-4} M con 84% de producción de brotes y BA 10^{-5} M con 87% de respuesta (Tabla 6). Sin embargo, se observó una interacción compleja entre los dos reguladores de crecimiento y varios tratamientos fueron estadísticamente equivalentes. Cada explante produjo entre 3 y 5 brotes con hojas.

Para promover el enraizamiento, los explantes con brotes y hojas se transfirieron al medio MS sin reguladores de crecimiento. El mayor porcentaje de enraizamiento se observó en las plántulas tratadas previamente con AIB 10^{-8} M o tratadas previamente con BA 10^{-5} M (Tabla 7), en la que se obtuvo el 100% de enraizamiento. El segundo pre-tratamiento para inducir la formación de brotes, y promover el mejor enraizamiento fué con AIB 10^{-6} M + BA 10^{-8} M con el 92% de explantes enraizados. Todos los demás explantes que produjeron brotes tuvieron un porcentaje de enraizamiento muy bajo (Tabla 7).

El "Análisis de Varianza" con 95% de nivel de confianza y la "Prueba de Rangos Múltiples" (LSD), mostraron una compleja interacción entre las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, y varios tratamientos fueron estadísticamente equivalentes.

Tabla 6. Desarrollo de brotes en el medio MS, al aplicar diferentes concentraciones de BA y AIB .

BA (M)	AIB (M)					
	0	10-8	10-7	10-6	10-5	10-4
0	6/17 (35) ab	5/20 (25) a	9/17 (53) abc	10/20 (50) abc	13/22(59) abc	16/19 (84) bc
10-9	14/18 (78) abc	9/18 (50) abc	13/21 (61) abc	15/20 (75) abc	9/18 (50) abc	14/22 (63) abc
10-8	10/18 (56) abc	12/18 (67) abc	8/19 (42) abc	14/24 (58) abc	16/23(69) abc	10/17 (59) abc
10-7	15/20 (75) abc	12/20 (60) abc	8/23 (34) abc	11/12 (92) c	12/18(67) abc	15/20 (75) abc
10-6	14/19 (74) abc	14/21 (67) abc	12/21 (57) abc	14/19(73) abc	13/19(68) abc	14/23 (61) abc
10-5	20/23 (87) bc	6/19 (31) ab	5/19 (26) a	11/20 (55) abc	12/22(54) abc	16/22 (73) abc

Los números entre paréntesis corresponden al porcentaje de producción de brotes.

Cada valor representa 3 experimentos independientes.

(a,b,c) representan las diferencias significativas entre columnas y renglones, determinadas por medio del análisis estadístico de varianza (ANOVA) y rangos múltiples (LSD) al 95% de confianza.

Tabla 7. Enraizamiento de plántulas cultivadas en medio MS libre de reguladores de crecimiento, que fueron previamente inducidos bajo diferentes concentraciones de BA y AIB.

BA (M)	AIB (M)					
	0	10-8	10-7	10-6	10-5	10-4
0	6/11 (75) abc	5/5 (100) c	4/8 (50) abc	9/10 (90) abc	11/13(84) abc	6/13 (46) abc
10-9	11/14 (78) abc	3/7 (42) a	8/13 (61) abc	11/15 (74) abc	3/5 (61) abc	11/13 (84) abc
10-8	8/18 (44) abc	6/12 (50) abc	6/8 (75) abc	12/13 (92) bc	10/14(71) abc	9/17 (54) abc
10-7	14/18 (78) abc	8/11 (72) abc	4/6 (67) abc	8/10 (80) abc	6/7 (86) abc	15/20(74) abc
10-6	7/14 (48) abc	9/14 (65) abc	10/12 (79) abc	8/12 (67) abc	9/12 (65) abc	8/11 (72) abc
10-5	20/20 (100) bc	3/5 (61) abc	5/9 (56) abc	6/11 (55) abc	8/18 (44) ab	8/18 (44) ab

Los números entre paréntesis corresponden al porcentaje de enraizamiento

Cada valor representa 3 experimentos independientes.

(a,b,c) representan las diferencias significativas entre columnas y renglones, determinadas por medio del análisis estadístico de varianza (ANOVA) y rangos múltiples (LSD) al 95% de confianza.

3.3 Inducción de raíces.

El efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de auxinas para el enraizamiento de brotes de damiana desarrollados en el medio MS, se reportan en Alcaraz-Meléndez, *et al.* 1998. Los resultados obtenidos después de 150 días de haber transferido los brotes a los medios con diferentes auxinas, mostraron el 99% de enraizamiento en brotes sembrados en medio sin hormonas, en brotes sembrados en medio con beta ANA 10^{-8} M y en brotes sembrados en medio con AIB 10^{-7} M. El mayor porcentaje de enraizamiento (99.96%) fue en brotes tratados con AIA 10^{-8} M (Tabla 8). El número de raíces fué homogéneo en todos los tratamientos, entre 3 y 5 raíces por brote.

Los resultados se analizaron por medio del "Análisis de Varianza" con 95% nivel de confianza, y se determinó el nivel de diferencia significativa por medio de la "Prueba de rangos múltiples" (LSD), los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de brotes enraizados de damiana, aplicando diferentes auxinas al medio.

Regulador de crecimiento	Concentración (M)	Enraizamiento (%)
Control	0	99.33 ± 0.33 c
Acido indol acético	10 ⁻⁸	99.96 ± 0.03 c
	10 ⁻⁷	79 ± 4.04 b
alfa-ácido naftalen acético	10 ⁻⁸	61.33 ± 3.48 a
	10 ⁻⁷	79.33 ± 3.76 b
beta-ácido naftalen acético	10 ⁻⁸	99 ± 0.58 c
	10 ⁻⁷	98.67 ± 0.33 c
Acido indol butírico	10 ⁻⁸	68 ± 4.50 a
	10 ⁻⁷	99 ± 0.58 c

Promedio de 3 experimentos con 50 / tratamiento.

(±) desviación standard.

Las letras representan las diferencias significativas calculadas por análisis de varianza (ANOVA) y rangos múltiples (LSD), al 95% de confianza.

4. Cultivo *ex vitro* de damiana

Las plantas de damiana micropropagadas se sembraron en macetas, obteniéndose un 45 ± 2 % de sobrevivencia. La sobrevivencia del transplante de macetas al campo experimental del CIBNOR, fué de 100% (Alcaraz-Meléndez, *et al.* 1994).

Se muestreó el follaje de las plantas una vez al año para conocer su productividad. Los resultados del crecimiento y producción de biomasa, tanto de hojas como de tallos se muestran en la Tabla 9. Estos resultados corresponden a 3 años consecutivos de muestreo y al octavo año, los cuales pueden ser utilizados para extrapolar la producción por hectárea, bajo las mismas condiciones de cultivo descritas en este trabajo. Estos cálculos corresponderían a una producción de entre 1,054 y

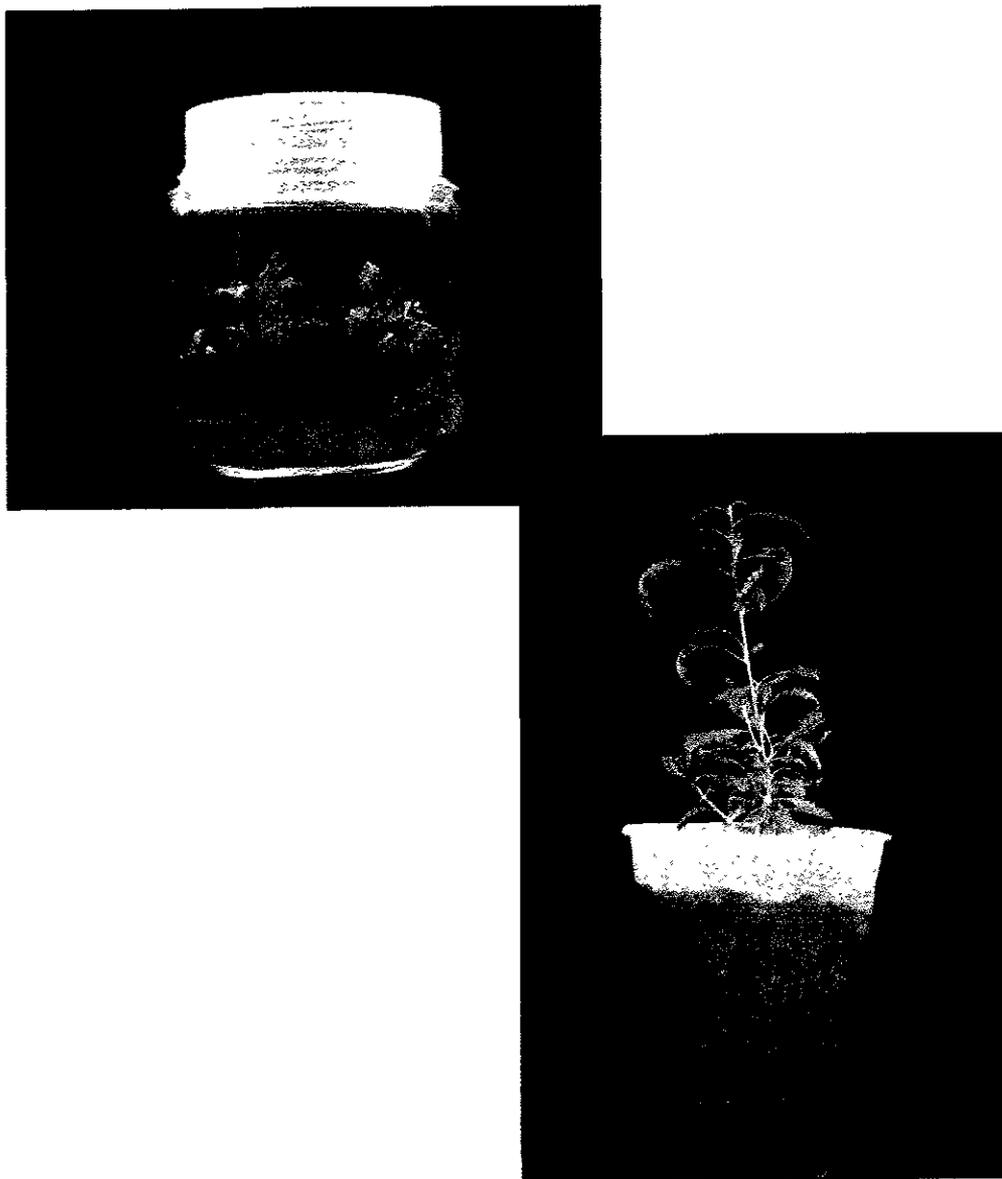


Figura 10. Damiana micropropagada en medio MS y posteriormente transplanteda a maceta conteniendo suelo arenoso procedente del campo experimental del CIBNOR

2,300 kg/ ha de hojas secas, dependiendo de las condiciones medio ambientales (Figura 11).

Tabla 9. Producción y desarrollo de 42 plantas de damiana micropropagadas y sembradas en el campo .

	1° Año	2° Año	3° Año	4° Año
Altura (cm)	103.7 ± 2.3 a	114.9 ± 2.2 b	129.8 ± 2.3 c	110 ± 5.1 a
Peso fresco/ planta (g)	910.7 ± 73.2 a	1,266.7 ± 114.2 b	1,785.4 ± 133.7 c	703 ± 100.1 a
Peso seco/ planta (g)	434.2 ± 34.2 a	914.1 ± 82.0 b	902.2 ± 67.6 b	465 ± 52.1 a
Humedad (%)	45.7	27	44	33.9
Cociente de producción peso seco/peso fresco	0.48	0.72	0.55	0.66
Peso seco de hojas por planta (g)	159.7 ± 12.6 a	346.5 ± 31.1 b	347.3 ± 26 b	171 ± 20 a
Peso seco de tallos por planta (g)	274.5 ± 21.6 a	579.4 ± 51 b	539.7 ± 42 b	293.9 ± 18.1 a
Cálculo del rendimiento de hojas en peso seco (kg/ha/año)	1054 ± 226	2287 ± 205	2292 ± 171	1129 ± 132

Los números marcados con las letras representan las diferencias significativas entre renglones, calculadas por análisis de varianza (ANOVA) y rangos múltiples (LSD) al 95% de confianza.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

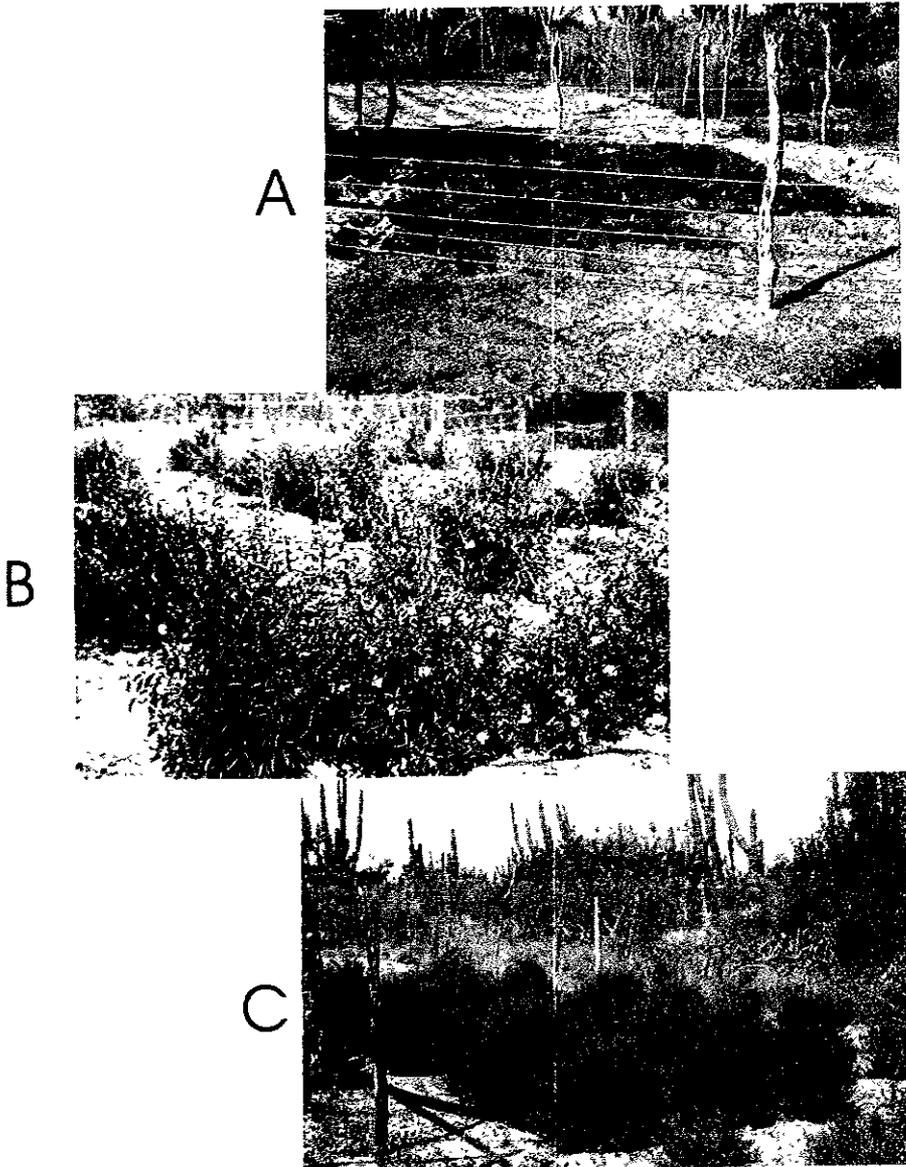


Figura 11. Cultivo de Damiana micropropagada en el campo experimental del CIBNOR. A. Damiana después de dos meses de transplante. B. Damiana de un año de edad en etapa de floración. C. Damiana de siete años de edad.

4. Análisis de aceites esenciales de damiana.

Los principales metabolitos que se extraen de las hojas de damiana son los aceites esenciales. En este trabajo se comparó la cantidad de lípidos totales y aceites esenciales entre las plantas micropropagadas y las plantas silvestres, (Alcaraz-Meléndez, *et al.* 1994). Los contenidos de lípidos totales y aceites esenciales extraídos de hojas de plantas silvestre y micropropagada, se analizaron estadísticamente por medio de la prueba de "t" de Student, y no hubo diferencia significativa entre los dos tipos de plantas, lo cual indica que las plantas de damiana micropropagadas pueden ser empleadas de la misma manera que las plantas silvestres. Estos resultados se muestran en la Tabla 10. Cada valor representa el promedio de 20 muestras analizadas.

Tabla 10. Análisis de lípidos totales y aceites esenciales de damiana silvestre y micropropagada. Cada valor representa el promedio de 20 muestras analizadas.

	Lípidos totales (mg/ g. p.s.)	Aceites esenciales (mg/g. p.s.)
Plantas silvestres	77.72 ± 13.03	32.34 ± 9.41
Plantas micropropagadas	67.04 ± 15.48	29.33 ± 5.24

(mg/g. p.s.) miligramos por gramo de peso seco de hojas.

El análisis por cromatografía en capa fina de los aceites esenciales de damiana, se realizó midiendo la migración de los compuestos en cm desde el origen y posteriormente empleando la fórmula para determinar R_f , los compuestos se identificaron de acuerdo a los reportados por Kates (1982) y por Vázquez-Duhalt y Greppin (1987), dentro de los siguientes rangos, hidrocarburos (R_f 0.9 - 1), triglicéridos (R_f 0.3 - 0.4), esteroides (R_f 0.1 - 0.13) y se reportan en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados de la cromatografía en capa fina de aceites esenciales de hojas de damiana.

Plantas analizadas	Rf	Posibles compuestos de acuerdo a la polaridad *
Damiana silvestre (desarrollada en condiciones silvestres)	0.01	-
	0.05	-
	0.07	-
	0.14	esteroles
	0.23	-
	0.32	triglicéridos
	0.81	-
	0.97	hidrocarburos
Damiana madre (desarrollada en el campo experimental del CIBNOR)	0.02	-
	0.07	-
	0.23	-
	0.81	-
	0.99	hidrocarburos
Damiana micropropagada (desarrollada en el campo experimental del CIBNOR)	0.03	-
	0.2	-
	0.38	triglicéridos
	0.81	-
	0.93	hidrocarburos

(*) compuestos identificados de acuerdo con Kates (1982) y Vázquez-Duhalt y Greppin (1987).

(-) compuesto no identificado.

VIII DISCUSION

1. Selección de explantes

Los explantes empleados para la micropropagación de damiana, se tomaron de plantas silvestres transplantadas a macetas, y adaptadas a condiciones controladas de luz y temperatura y posteriormente al campo experimental del CIBNOR, la selección de estas plantas se hizo considerando su aspecto saludable y que sus características fenotípicas fueran representativas de las poblaciones de damiana, debido a que como mencionan Debergh y Read (1991), la planta original puede influir de diferentes formas al explante haciéndolo más adecuado o más confiable como material inicial; los parámetros que más se manipulan para la planta original son la luz, temperatura y reguladores de crecimiento. En la mayoría de los trabajos de micropropagación, los explantes que se escogen generalmente son los brotes apicales y laterales porque hay más riesgo de empezar un esquema de micropropagación con la formación de nuevos brotes, habiendo la posibilidad de incrementar la producción de plantas de características diferentes a las establecidas en la planta original; pero cuando hay limitación de estos órganos, se emplean partes de las hojas, como sucedió en el presente trabajo y como se reporta en la micropropagación de *Ficus lyrata* (Debergh y DeWael, 1977) y *Anthurium* spp. (Pierik y Steegmans, 1976). También es importante la edad de la planta original, el estado fisiológico, edad del explante y el tamaño del explante (George, 1993).

Los explantes más adecuado para la micropropagación de damiana fueron las hojas jóvenes entre 17 y 20 mm de longitud y como se describió en los experimentos *in vitro*, los explantes a partir de plantas silvestres fueron los adecuados (Tablas 6 y 7). En contraste, los explantes de plantas de damiana propagadas por estaca, que habían sido tratadas con reguladores de crecimiento para enraizarlas (ANA 2.15 X 10⁻⁴ M) (Alcaraz, *et al.* 1994), no se desarrollaron en los medios probados, tornándose café y muriendo a los 15 días en los medios y en las concentraciones hormonales probadas, lo que confirma que el efecto de un tratamiento previo a la planta madre influye en el desarrollo de los explantes *in vitro*. Aunque no en todos los casos, la aplicación de

reguladores de crecimiento en la planta madre puede ser negativa, como en el caso de *Magnolia soulangeana* en la que la inyección de BA (arriba de 500 mg/lit) al tronco, mejoró la etapa de iniciación del cultivo *in vitro* (Debergh y Read, 1991).

2. Esterilización de los explantes

El propósito de la desinfección es destruir o remover los hongos o bacterias, sin matar a las células vegetales. La contaminación microbiana es citada generalmente como una de las principales causas de pérdida y altos costos en la micropropagación (Withersand y Alderson, 1986) Existen generalmente 3 fuentes de contaminación reconocidas (Long, 1997) que son: a) microorganismos epífitos en el explante; b) microorganismos endófitos en el explante y c) microorganismos que pueden ser patógenos o saprófitos y que pueden introducirse en el cultivo debido a técnicas deficientes de operación o invasión de los recipientes de cultivo. Los microorganismos capaces de sobrevivir y crecer en los cultivos requieren fuentes de nutrientes y carbohidratos; tanto los organismos epífitos como los endófitos, en condiciones ricas de nutrientes de los cultivos *in vitro*, crecen fuera del tejido vegetal e inundan o dañan los tejidos.

Los agentes desinfectantes, más comunes empleados en el cultivo de tejidos vegetales, son el hipoclorito de calcio, hipoclorito de sodio, agua con bromo y etanol (Constabel, 1984). La efectividad del hipoclorito como desinfectante consiste en que, es una molécula pequeña y su carga neutra le permite penetrar dentro de las células y atacar los microorganismos infecciosos (Sauer y Burroughs, 1986).

Estos tratamientos son muy importantes en la micropropagación de cualquier especie, debido a que si el tratamiento con agentes desinfectantes es muy severo, no hay contaminación, pero los explantes se dañan o mueren, como se reporta en los tratamientos que se aplicaron en explantes de damiana de 15% de hipoclorito de calcio y tiempos entre 10 y 20 min (Tabla 2). Debe, por lo tanto, haber equilibrio entre la concentración del agente desinfectante y el tiempo de tratamiento para que el explante

se descontamine y no se dañe, como ocurrió al emplear 10% de hipoclorito de calcio durante 10 min en explantes de hojas (Tabla 2)

3. Cultivo *in vitro* de explantes de damiana

3.1 Organogénesis variando medios y reguladores de crecimiento

En esta parte del trabajo se experimentó con dos medios diferentes, B5 y MS. Para el cultivo de tejidos y órganos es de gran importancia la composición del medio nutritivo que se emplee. En la naturaleza, para crecer saludables y vigorosas, las plantas necesitan elementos que toman del suelo, denominados elementos mayores y elementos menores, dependiendo de la cantidad que necesitan para su desarrollo. Por tal razón, los medios nutritivos para el cultivo de tejidos están formulados con base en estas necesidades. Además los medios proveen una fuente de carbono como la sacarosa, para reemplazar el carbono que las plantas normalmente fijan de la atmósfera por medio de la fotosíntesis. Para mejorar el crecimiento varios medios incluyen pequeñas cantidades de ciertos compuestos orgánicos, como vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento (George, 1993).

En este trabajo los explantes de hoja de damiana, respondieron en forma diferente a los dos medios nutritivos, siendo el medio MS el más adecuado para la micropropagación (Tablas 3 y 4) . El medio MS contiene mayor cantidad de sales minerales, vitaminas y 1% más de sacarosa que el medio B5 y éste último tiene menor concentración de nitrógeno en forma de nitratos y amoniacal (Gamborg, 1984). Este punto es importante para el crecimiento y organogénesis, porque en el cultivo de tejidos vegetales, es fundamental la forma y disponibilidad en que se aplica el nitrógeno; la mayoría de las plantas toman el nitrógeno más eficientemente y crecen más rápido, si la solución nutritiva contiene tanto iones nitrato como amoniacales, que si solamente contienen alguno de los dos iones. Si bien, la damiana en forma natural se desarrolla en suelos pobres en nitrógeno, al aplicar la combinación de nitrato-amoniaco, del medio MS, la respuesta fue favorable para el crecimiento y organogénesis, comparándola con la formulación del medio B5. Otra diferencia

notoria entre los dos medios es el contenido de iones calcio, donde se observa 2.93 veces mayor concentración de este elemento en el medio MS, el calcio se encuentra en los suelos donde crece la damiana en concentraciones normales, ente 60 y 80 % con respecto a los iones totales intercambiables (Alcaraz y Ayala, 1985; Chapman, 1973), por lo que probablemente afectó la menor concentración de calcio en el medio B5, el desarrollo y organogénesis de los explantes de hoja . La suma de todas estas diferencias ayudó a que los explantes se desarrollaran mejor en el medio MS que en el medio B5.

Algunas combinaciones de reguladores de crecimiento, 2,4-D y BA en diferentes concentraciones hubo producción de callos. Los callos son una masa desorganizada de células parenquimatosas, que son tejidos con mucha plasticidad, como consecuencia de su bajo nivel de diferenciación (Esau, 1965). Con la edad los callos muestran islas meristemáticas o grupos de traqueidas y células pigmentadas. La formación de callos por un explante marca el principio de un cultivo de tejidos vegetales exitoso (Constabel, 1984). Los callos no son de un solo tipo, pueden diferir en apariencia, color, grado de compactación y morfogénesis potencial (George, 1993) como se observó en el tipo de callos que se formaron en el medio MS de los explantes de hoja de damiana. En general es necesario aplicar auxinas al medio nutritivo para que se formen callos a partir de explantes. La auxina que más frecuentemente se emplea para producir callos es el 2,4-D (Constabel, 1984). Los resultados obtenidos en este trabajo confirman lo anteriormente expuesto, debido a que en el medio MS se formaron 4 tipos diferentes de callos al aplicar las concentraciones de 2,4-D solo o combinado con BA, observándose callos amarillos y friables en la concentración de 2,4-D 10^{-4} M, callos verdes y compactos en la concentración de 2,4-D 10^{-5} M, callos blancos y compactos en la concentración de 2,4-D 10^{-6} M y callos con potencial organogénico al aplicar 2,4-D 10^{-7} M . Esto nos muestra que conforme disminuye la concentración de 2,4-D, hay menor producción de callos, mayor compactación de los callos y se incrementa la tendencia hacia la organogénesis

Las citoquininas tienden a promover la formación de clorofila en callos y células en suspensión y las auxinas pueden inhibirla como lo reportan Hildebrandt, *et al.*

(1963), al aplicar 2,4-D en el cultivo de callos de chícharo, tomate y papa. Esta misma respuesta se observó en el presente trabajo, notándose la formación de callos con clorofila conforme aumenta la concentración de BA y disminuye la concentración de 2,4-D. En experimentos realizados por Davey, *et al.* (1971) observaron que el AIA y el ANA inhibían menos la producción de clorofila en callos que el 2,4-D.

Sauders y Bingham (1975), reportaron en experimentos con alfalfa la disminución entre 0 y 5 % la producción de callos, aumentando la producción de brotes cuando incubaron los explantes en diferentes concentraciones y combinaciones de auxinas y citoquininas. El balance entre auxinas y citoquininas produce organogénesis más efectiva. En general, se ha publicado que es necesaria una proporción mayor de citoquininas que de auxinas para la inducción a la formación de brotes y brotes adventicios (George, 1993). Los resultados que se muestran en la Tabla 4 y en la Figura 7 confirman este último punto, debido a que el mayor porcentaje de producción de brotes fue al aplicar BA 10^{-5} M y la menor concentración de 2,4-D (10^{-7} M), aunque el mayor número de brotes por explante fue al suministrar BA 10^{-5} M al medio nutritivo MS.

El porcentaje de enraizamiento de los explantes (Tabla 4) fue muy bajo y en algunos casos como en el medio MS adicionado con BA 10^{-6} M + 2,4-D 10^{-5} M solamente hubo producción de raíces y no de brotes y hojas. La inhibición del enraizamiento puede deberse a las altas concentraciones de citoquininas, esto ha sido demostrado por varios autores (Harris y Hart, 1964; Ben-Jaacov *et al.* 1991), aumentando la inducción al enraizamiento debido a las auxinas aplicadas ya que las auxinas inducen la síntesis de poliaminas, las cuales incrementan la acción de los reguladores de crecimiento (Friedman, *et al.* 1985)

Los brotes de damiana obtenidos en el medio MS con BA 10^{-5} M, se sembraron en el medio MS sin reguladores de crecimiento para inducir enraizamiento, obteniéndose suficientes raíces para transplantar posteriormente las plántulas desarrolladas. Este efecto de enraizamiento de brotes al transferirlos a medio nutritivo sin reguladores de crecimiento es frecuente en algunas especies, según lo reportan

Dodds y Roberts (1990) y es debido a que los brotes y hojas de la plántula producen reguladores de crecimiento endógenos que inducen la formación de raíces.

El índice relativo de rendimiento de brotes (IRRB) que se muestra en la Tabla 5, indicó que la mejor respuesta morfogénica fué al aplicar BA 10^{-5} M, aunque este parámetro nos muestra la eficiencia en cuanto a producción, es importante definir posteriormente el tamaño y calidad de los brotes que van a permitir que las plantas logren enraizar y posteriormente ser transplantadas exitosamente al suelo. En la *damiana* se observó que las plantas de mejor calidad para el enraizamiento y trasplante fueron las obtenidas con el mayor IRRB aunque no se obtuvo el mismo número de brotes y de plantas.

3.2 Organogénesis variando fuentes de explantes y reguladores de crecimiento.

Los resultados obtenidos al probar explantes de *damiana* silvestre sembrados en el medio MS y probando otra combinación de auxinas y citoquininas, que fueron BA y AIB en diferentes concentraciones, tablas 6 y 7.

En estos experimentos la producción de callos fue mínima formándose brotes en todas las concentraciones probadas, este efecto fue debido a la aplicación de AIB, esta respuesta es ventajosa debido a que al haber poca producción de callos disminuye la variabilidad genética, porque los callos pueden ser inestables genéticamente. El AIB es un agente particularmente efectivo en el enraizamiento (Dodds y Roberts, 1990) y en la mayoría de los trabajos sobre micropropagación, se emplea con el fin de inducir enraizamiento (Sudha, *et al.* 1998; Trindade y Pais, 1997); sin embargo en este trabajo, se observó que a altas concentraciones (10^{-4} M) se produjo un alto porcentaje de brotes 84% estadísticamente igual a los explantes tratados con BA 10^{-5} M y al combinar AIB 10^{-6} M + BA 10^{-7} M hubo mayor producción de brotes (92%). Logrando así el equilibrio entre auxinas y citoquininas para inducir brotes en explantes de *damiana*.

Se indujo el enraizamiento, transfiriendo los brotes a medio MS sin reguladores de crecimiento. Los resultados demuestran que si influyen los reguladores de crecimiento en los explantes tratados aunque se hayan eliminado del medio nutritivo,

ya que el enraizamiento fue muy diferente en los explantes tratados con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. George (1993) reporta que es necesario transferir los explantes a medio sin reguladores de crecimiento, al menos dos veces para eliminar el efecto residual de algunas auxinas como el ANA. Las concentraciones de reguladores de crecimiento más adecuados para la micropropagación de damiana fueron la combinación de BA 10^{-7} M + AIB 10^{-6} M. Hasta ahora no hay otros reportes sobre micropropagación de damiana, sin embargo se ha reportado la organogénesis y regeneración de embriones cigóticos de una planta del mismo género denominada *Turnera subulata* (Rao, *et al.* 1988) donde también se empleó el medio MS y se indujo la formación de plántulas directamente al emplear BA 5.3×10^{-7} M. Se formaron callos al emplear ANA 6.4×10^{-7} M. Después se transfirieron los callos al medio MS adicionado con BA 5.3×10^{-7} M produciendo múltiples brotes, posteriormente se transfirieron los brotes al medio MS adicionado con BA 8.8×10^{-8} M + AIA 5.7×10^{-7} M induciendo el enraizamiento. Aunque es otra especie y se empleó otro tipo de explante, hay similitud en los resultados obtenidos con damiana, en cuanto a que el medio MS fue favorable para la organogénesis y la aplicación de BA, aunque en menor concentración produjo plántulas y el enraizamiento fue inducido al aplicar auxinas y citoquininas en bajas concentraciones, no mencionan el porcentaje de producción, ni la sobrevivencia al transplante.

3.3 Inducción de raíces

Se probaron diferentes tipos de auxinas en concentraciones de 10^{-8} y 10^{-7} M en brotes de damiana desarrollados en el medio MS adicionado con BA 10^{-5} M, con el fin de observar si los reguladores de crecimiento exógenos favorecían la producción de raíces, porque como se ha reportado en trabajos anteriores con otras especies como *Atropa belladonna* y *Atropa belladonna* var. *lutea* (Thomas y Street, 1970), las auxinas exógenas inhibieron la rizogénesis y fueron estimuladas al aplicar compuestos antagónicas a las auxinas.

Las auxinas han sido ampliamente empleadas en la micropropagación y se incorporan en el medio nutritivo para promover el crecimiento de callos, células en

suspensión u órganos. Las auxinas promueven el crecimiento por dos medios: el primero en la pared celular induciendo la producción de iones hidrógeno dentro y a través de la pared celular uniendo los enlaces de las auxinas a los lípidos desnaturalizados y acidificando la pared incrementando su elasticidad; los iones de potasio del interior de la célula son tomados para contrarrestar la electrogenicidad de los iones de H⁺ exportados (protones), esto tiene efecto en la disminución del potencial hídrico de la célula permitiendo así que el agua entre y la célula se expanda (Böttger, 1986); esta es la probable explicación de la estimulación al rápido crecimiento debido a las auxinas. La segunda forma de actuar de las auxinas es en el metabolismo de los aminoácidos y proteínas actuando en el metabolismo del ARN incrementando la síntesis de proteínas (Moore, 1979).

La rizogénesis es producida al aplicar auxinas al medio, la acción inductora de raíces por medio de auxinas es debido a la promoción de la síntesis de poliaminas (Friedman *et al.*, 1985).

La única auxina natural en las plantas es el AIA, y las otras auxinas sintéticas han sido de gran ayuda en la organogénesis, el efecto básico es el mismo, sin embargo dependiendo del tipo de planta y el medio empleado la respuesta puede variar, como en los resultados que se reportan en el presente trabajo (Tabla 8), donde observamos que en general el enraizamiento fue alto al incorporar las auxinas al medio nutritivo, observándose que no hubo diferencias significativas entre el control y los explantes tratados con AIA 10⁻⁸ M, β ANA 10⁻⁸ M y 10⁻⁷ M y AIB 10⁻⁷ M; por lo que suponemos que los brotes de damiana producen suficientes concentraciones de auxinas endógenas para inducir la rizogénesis.

Estos resultados nos muestran que no hay un incremento significativo al aplicar auxinas en el medio nutritivo para inducir la rizogénesis en brotes de damiana, por tal razón la recomendación es no emplear reguladores de crecimiento para promover el enraizamiento, ya que esto incrementaría los costos al micropropagar plantas de damiana a nivel comercial.

4. Cultivo ex vitro de damiana

En este punto la aclimatación de las plantas de damiana micropropagadas al ser transplantadas a macetas es un paso muy importante y el paso donde se pierde un alto porcentaje de la producción, estas pérdidas se deben principalmente a la disminución de la humedad relativa, altos niveles de iluminación y el cambio de un medio aséptico a un medio séptico (Preece y Sutter, 1991) dado lo cual provoca estrés en las plantas, muchas de las cuales no son capaces de superarlo. En los resultados obtenidos con las plántulas de damiana, se obtuvo una sobrevivencia del $45 \pm 2 \%$ debido a que no fue posible adaptar un invernadero, y debido a que las condiciones climáticas en el sitio donde se lleva a cabo este trabajo, (El Comitán, Baja California Sur) son desérticas con nomenclatura BW (cálido y muy seco) con temperatura media anual de 21 a 26 °C y precipitación media anual entre 100 y 200 mm (García, 1973). Algunos autores (Preece y Sutter, 1991) sugieren que la aclimatación sea progresiva, disminuyendo poco a poco la humedad relativa para que las plántulas se adapten anatómicamente y fisiológicamente, incrementando la posibilidad de sobrevivencia al cambio.

Actualmente no hay ningún campo de producción comercial de damiana, y la producción de las poblaciones silvestres depende de las condiciones climáticas de cada año, por tal motivo no hay reportes sobre producción ya que varía año con año; sin embargo se llevó a cabo una comparación relativa entre los resultados de crecimiento y biomasa obtenidos en plantas de damiana micropropagadas (tabla 9), y la producción de plantas silvestres transplantadas y cultivadas en el campo experimental del Centro de Investigaciones Forestales del Noroeste ubicado en Todos Santos, Baja California Sur, a 150 Km al Suroeste de la Ciudad de La Paz, B.C.S., donde se llevaron a cabo dos experimentos, en el primero obtuvieron una producción estimada de 90 a 120 kg/ha de peso seco y en el segundo experimento obtuvieron 695 kg/ha de peso seco a los 5 meses de haber transplantado las plantas y efectuando un riego inicial y después uno cada mes (Sandoval, 1982).

Otros datos proporcionados por ejidatarios del ejido "Todos Santos" ubicado a 5 Km de la ciudad de Todos Santos, B.C.S., donde hacen una propuesta para sembrar plantas de damiana, las cuales esperan obtener propagándolas por medio de estacas, empleando un enraizador comercial (Raizone-Plus), y calculan producir entre 43 y 49% de enraizamiento en dos épocas del año, marzo y noviembre, obteniendo 67.5 ± 7.5 gr / planta de hojas secas y estimando la producción de 11,000 plantas por ha obtendrían 742.5 kg / ha al año.

Los datos estimados de producción anteriores, son inferiores comparados con los de las plantas de damiana micropropagadas, presentados en este trabajo, donde estimamos una producción de entre 1,054 y 2300 kg / ha de hojas secas por año (tabla 9) con una densidad de 6,600 plantas por hectárea sembradas a 1 m X 1.5 m de distancia entre cada una, estos resultados se deben probablemente a que las plantas de damiana micropropagadas una vez aclimatadas; son más vigorosas y se adaptan mejor al campo que las plantas silvestres transplantadas y propagadas por estaca, como por ejemplo en las plantas de damiana que logramos propagar por estaca, donde se obtuvo el 40% menos producción que las plantas micropropagadas, desarrollándose en las mismas condiciones de cultivo. Además hay menos variabilidad debido a que las plantas micropropagadas proceden por lo general de una sola planta, la cual puede seleccionarse de acuerdo a las características fenotípicas de interés ecológico y económico.

Estos resultados muestran que después de ocho años de cosecha, las plantas de damiana micropropagadas siguen teniendo altos rendimientos de producción y abren una importante posibilidad de producción para las zonas áridas y semi-áridas, ya que el riego y los cuidados del cultivo han sido mínimos comparados con los cultivos tradicionales, que difícilmente podrían sobrevivir a estas condiciones medio-ambientales.

En cuanto al valor comercial de las hojas secas de damiana, se presentan datos obtenidos en 1990 (Alcaraz y Real, 1992 a; ver anexo) donde se reporta que pagaron el kg de damiana en greña (hojas y tallos recién cortados y sin separar) a los recolectores, la cantidad proporcional al 55 % del salario mínimo por día de ese año.

Los comercios de la ciudad de La Paz, B.C.S., vendieron el kg a granel, lo correspondiente a 128.3 y 137.5 % del salario mínimo por día y el kg de hojas secas en la Cd. de México lo correspondiente a 256.7 % del salario mínimo por día en 1990. Estos resultados nos indican que es un cultivo rentable y que al fomentarlo se podrá controlar la producción y la calidad del producto además la cosecha será mucho más fácil, manteniéndose además la sobrevivencia de esta especie.

5. Análisis de aceites esenciales de damiana.

Uno de los aspectos fundamentales que se buscan al propagar plantas por medio de cultivo de tejidos vegetales, es controlar o evitar la variabilidad genética, manteniendo las características fenotípicas de estas plantas. Por tal motivo, en este trabajo se seleccionó un parámetro que permitiera comparar las plantas de damiana silvestres y las plantas de damiana micropropagadas, este parámetro fueron los aceites esenciales, los cuales son los metabolitos secundarios que se emplean en la industria del licor y en las bebidas de infusión. En los resultados obtenidos en este trabajo, se observó que en los análisis cuantitativos, no hubo diferencias significativas entre las damianas silvestres y las damianas micropropagadas (Tabla 10). Al llevar a cabo el análisis cualitativo (Tabla 11), se observó que tanto en damianas silvestres desarrolladas en condiciones silvestres, como las damianas silvestres y las micropropagadas transplantadas al campo experimental del CIBNOR, mostraron que contenían hidrocarburos y tanto las plantas silvestres como las micropropagadas contenían triglicéridos. Estos resultados preliminares nos muestran que es necesario llevar a cabo análisis con mejor resolución, como por ejemplo empleando cromatógrafo de gases, para detectar con mayor precisión el contenido de aceites esenciales que contiene cada tipo de planta.

Con base en los resultados obtenidos, la micropropagación de damiana abre amplias posibilidades para la conservación y domesticación de esta especie, con importancia desde el punto de vista ecológico y económico para las zonas áridas.

IX CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante los 8 años de investigación sobre la micropropagación de damiana demuestran que es factible la micropropagación y posterior domesticación de las plantas de damiana, el balance entre las auxinas y las citoquininas para inducir la producción de brotes y posteriormente el enraizamiento. La metodología recomendada es emplear hojas jóvenes esterilizadas con hipoclorito de calcio al 10% durante 10 min, sembrarlas en medio MS adicionado con BA 10^{-5} M o BA 10^{-7} M + AIB 10^{-6} M para el desarrollo de brotes laterales y transferir los brotes a medio MS sin hormonas para inducir el enraizamiento. Además se definieron las condiciones para el trasplante a macetas empleando suelo procedente de los sitios donde se desarrolla la damiana y disminuyendo paulatinamente la humedad relativa. Posteriormente se establecieron las condiciones para transplantarlas al campo experimental, seleccionando la época del año en que la temperatura medio ambiental no es extremadamente alta y aplicando riegos iniciales cada 8 días durante 3 meses, cada 15 días durante 3 años y posteriormente cada mes.

Un aspecto importante que surge de estos resultados, es que puede iniciarse un proceso de selección y domesticación con un enfoque basado en las características de los metabolitos secundarios. Lo anterior requeriría de un muestreo de poblaciones silvestres para seleccionar plantas con alto contenido de metabolitos y de esos ejemplares producirían líneas clonales.

Al cultivar la damiana a nivel comercial, se beneficiaría la producción agrícola en las zonas áridas y semi-áridas, debido a que es un cultivo que requiere poca agua, suelos pobres, un mínimo de fertilizantes y plaguicidas, ya que en el cultivo de damianas del campo experimental del CIBNOR, solamente se aplicaron 100 gr de estiércol de vaca por planta por año y no fue necesario emplear plaguicidas ya que no fueron invadidas por ninguna plaga de insectos. Estos requerimientos son pocos porque comparándolos con algunos cultivos comerciales en el estado de Baja California Sur, como en el cultivo de chile, se requiere el doble de fertilizantes por ha y en cuanto a plaguicidas en este mismo tipo de cultivo se aplica de 1 a 2 kg por ha cada

3 o 4 días hasta que disminuye la plaga o hasta la cosecha (Aguilar, R. y Nieto, A. comunicación personal).

También es importante mencionar que al disponer de una metodología para cultivar plantas de damiana, se abatirá la sobre explotación y la posible extinción de las poblaciones silvestres, debido a la forma actual de explotación.

Si bien estos experimentos han sido la clave para iniciar el proceso de *domesticación*, aún podemos mejorar la metodología tendiendo hacia el escalamiento comercial, analizando los puntos donde pueden disminuirse los costos y buscando estrategias tales como la inducción de la embriogénesis somática, para promover la propagación masiva un aspecto importante es mejorar la aclimatación, estudiando y analizando los requerimientos fisiológicos de las plantas de damiana micropropagadas tales como la adaptación gradual al medio ambiente promoviendo el desarrollo de hojas nuevas mejor adaptadas a las condiciones ambientales bajo las cuales crece la planta, adaptándolas al fotoperíodo y al sustrato donde se puedan desarrollar mejor las raíces. También es importante profundizar más sobre el análisis cuantitativo y cualitativo de los aceites esenciales empleando técnicas de cromatografía de gases para identificar los compuestos y la cantidad que producen las plantas para posteriormente seleccionar plantas élite y generar líneas clonales de plantas con mayor y mejor producción de aceites esenciales. Y al mismo tiempo buscar plantas que produzcan más hojas y que su crecimiento sea más dinámico que otras plantas del mismo tipo, para producir mas de hojas de damiana.

Como punto final es importante mencionar que la metodología desarrollada en estas investigaciones, además de generar nuevos conocimientos y evitar el riesgo de provocar el peligro de *extinción de esta especie*, es de aplicación inmediata para transferirla al sector productivo, debido a la importancia económica, por la industria que la emplea como materia prima la cual se ha ido incrementándose a través del tiempo. También es importante puntualizar que al sembrar plantas de damiana aumentará la productividad agrícola de las zonas áridas y semi-áridas mejorando la calidad de vida de sus habitantes.

FALTAN PAGINAS

De la:

1

A LA 38

X. BIBLIOGRAFIA

Abelson, P.H. 1990. Medicine from plants. *Science* 247: 513.

Aguiar, M. E.; Villalobos, V.M. y Vázquez, N. 1992. Production of cocoa plants (*Theobroma cacao* L.) via micrografting of somatic embryos. *In Vitro* 28: 15-19.

Alcaraz, M.L y Ayala, R. B. 1985. Análisis edafológico del Comitán, Baja California Sur. Conferencia Uso y Preservación de los Recursos Biológicos y Marinos y de Zonas Áridas. La Paz, B.C.S. Memorias pp. 42-45.

Alcaraz-Meléndez, L y Real-Cosío S. 1992 (a). Propagación, cultivo y aprovechamiento de damiana (*Turnera diffusa*, Willd) En: Ortega, A, (ed.) Uso y manejo de los recursos naturales en la Sierra de la Laguna Baja California Sur. Publ. No. 5. Ed. Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur, A.C. pp. 97-107.

Alcaraz-Meléndez, L y Real-Cosío S. 1992 (b). Aplicación de la técnica de cultivo de tejidos para la propagación de orégano (*Lippia palmeri*) de la Región del Cabo, B.C.S. En: Ortega, A, (ed.) Uso y manejo de los recursos naturales en la Sierra de la Laguna Baja California Sur. Publ. No. 5. Ed. Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur, A.C. pp. 69-78.

Alcaraz-Meléndez, L; Real-Cosío, S. y Bashan, Y. 1994. Domestication of micropropagated plants of the specie damiana (*Turnera diffusa*). *Plant Cell Reports* 13:679-682.

Alcaraz-Meléndez, L; Real-Cosío S. y A. Rubluo. 1998. Inducción al enraizamiento de brotes de damiana (*Turnera diffusa*) *In vitro*. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. 1-5 de Junio. La Habana, Cuba. Resumen pp. 22.

Alcaraz-Meléndez, L; Real-Cosío S. y Vázquez-Duhalt. R. 1989. El cultivo de tejidos vegetales como una biotecnología para el aprovechamiento de zonas áridas y semi-áridas. III Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Monterrey, N.L., México.

Ammirato, P.V. 1987. Organitacional events during somatic embryogenesis. En: Somers, D.A.; Gengenback, B.G.; Biersboer, B.D.; Hackett, W.P. y Green, C.E. (eds.) *Plant tissue and cell culture*. Ed. Alan Liss, Nueva York pp. 57-81.

Bajaj, Y.P.S. 1991. Automated micropropagation for in masse production of plants. En: Bajaj, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 17. High-tech and micropropagation I. Springer, Berlin Heidelberg, Nueva York. pp. 3-16 .

Bajaj Y.P.S. (ed.). 1995a. Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 31. Somatic embryogenesis and synthetic seed II. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 444.

Bajaj Y.P.S. 1995b. Somatic embryogenesis and its applications for crop improvement. En: Bajaj Y.P.S. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 30. Somatic embryogenesis and synthetic seed II. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 107-125 .

Ben-Jaacov, J. ; Ackerman A; Tal E. y Jacobs G. 1991. Vegetative propagation of *Alberta magna* by tissue culture and grafting. HortScience 26 : 74.

Borojevic, S. 1990. Principles and methods of plant breeding. Developments in Crop Science 17. Elsevier Sci. Publ. B.V. pp 368 .

Böttger, M. 1986. Proton translocation system at the plasmalemma and its possible regulation by auxin. Acta Hort. 179: 83-93.

Brandegeee, T.S. 1891. Flora of the Cape Region of Baja California. Proc. California Acad. Sci., serie 2, 3:108-182.

Brown, D.C.W. y Thorpe, T.A. 1980. Changes in water potential and its components during shoot formation in tobacco callus. Physiol. Plant. 49:83-87.

Butcher, D.N. e Ingram, D.S. 1976. Plant tissue culture. Ed. Arnold: Londres.

Bye, R.; Linares, E. y Estrada, E. 1994. Biological diversity of medicinal plants in México. Phytochemistry of Medicinal Plants, Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America.

Casas, A. y Caballero, J. 1995. Domesticación de plantas y origen de la agricultura en Mesoamérica. Ciencias 40: 36-45.

Chandler, S.F. y Thorpe T.A. 1986. Variation from plant tissue cultures: biotechnological applications to improving salinity tolerance. En: Moo-Young, M.; J.D., Bu'lock; C.L. Cooney; B.R. Glick y R.F. Gómez (eds.) Biotechnology advance, research review and patent abstracts. Ed. Pergamon Press, New York, Vol .4. pp. 117-135.

Chapman, H.D. 1973. Diagnostic criteria for plant and soils. Ed. Quality Printing, Co. Inc. Abilene, Texas. pp. 65-92.

Chaudhary, M.T.; Merret, M.J. y Wainwright, S.J. 1997. Ion accumulation in lucerne plants regenerated from salt adapted suspension cultures compared with recultured cells from these plants. Plant Cell Reports 17(2): 145-149.

Chen, Z. y Evans, D.A. 1990. General techniques of tissue culture in perennial crops. En: Chen, Z.; Evans, D.A.; Sharp, W.R. Ammirato, P.V. y Sondahl, M.R. Handbook of plant cell culture. Perennial crops. Ed Mac-Graw Hill Co. Vol. 6 pp 22-61..

Chen, Z. y Sharp, W.P. 1990. Potential of biotechnology in perennial crop improvement. En: Chen, Z.; Evans, D.A.; Sharp, W.R. Ammirato, P.V. y Sondahl, M.R. Handbook of plant cell culture. Perennial crops. Ed Mac-Graw Hill Co. Vol. 6. pp. 3-21.

Chong, C. 1987. Plant propagation. En: Christie, B.R. (ed.) Handbook of Plant Science in Agriculture. Vol.I. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida. pp. 91-114.

Chu, I.Y.E. y Kurtz S.L. 1990. Commercialization of plant micropropagation. En: Ammirato, P.V.; Evans, D.A.; Sharp, W.R. y Bajaj, Y.P.S. (eds.) Handbook of plant cell culture. Ornamental species. Ed Mac-Graw Hill Co. Vol.5 pp. 126-164.

Conger, B.V. 1981. Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. CRC Press. pp 1-4.

Constabel, F. 1984. Callus culture: Induction and Maintenance. En: Vasil, I. K. (Ed.) Cell culture and somatic cell genetics of plants: Laboratory procedures and their applications. San Diego, Ca. Academic Press. pp. 27 - 34.

Cordell, G.A. 1993. Pharmacognosy - new roots for an old science. In: Atta-ur-Rahman and F.Z. Basha (eds) Studies in natural products chemistry, Vol. 13 Bioactive natural products (part A). Ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 629-675.

Cox, P.A. and Balick, J. 1994. The ethnobotanical approach to drug discovery. Scientific American, June 60-65.

Davey, M.R.; Fowler, M.W. y Street, H.E. 1971. Cell clones contrasted in growth, morphology and pigmentation isolated from a callus culture of *Atropa belladonna* var *lutea*. Phytochem 10 : 2559-2575.

Debergh, P.C. y De Wael J. 1977. Mass propagation of *Ficus lyrata*. Acta Hort. 78: 361-364.

Debergh, P.C. y Read, P.E. 1991. Micropropagation. En: Debergh, P.C. y Zimmerman, R.H. (edit.) Micropropagation, technology and application. Ed. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 1-14.

De Vries, R.M. y Stephens, Ch. T. 1997. Response of first generation tomato somaclone progeny to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Plant Science 126 : 69-77.

Díaz, J.L. 1976. Usos de las plantas medicinales de México. Monografías Científicas II. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, México, pag. 123.

Díaz-Rondero, A.J. y Alcaraz-Meléndez, L. 1987. Callus induction and plantlet regeneration in damiana (*Turnera diffusa*, Willd.) Plant Cell Tissue and Organ Culture. 10:39-45.

Dix, J. P. y Collin, H. A. 1990. Culture Systems and Selection Procedures. En: Plant Cell Line Selection. Dix, J. P. (Ed). Edit. VCH. N. York. pp. 3 - 18.

Dodds, J. H. y Roberts, L. W. 1990. Nutritional components of tissue culture media. En: Experiments in plant tissue culture. Dodds, J. H. (Ed.). Cambridge University Press. Cambridge. pp. 21 - 35.

Domínguez, X.A. y Hinojosa M. 1976. Isolation of 5-hydroxy-7,3',4'- trimethoxy-flavone from *Turnera diffusa*. Planta Medica. 30: 68-71.

Donnan, A. Jr. 1986. Determining and minimizing production costs. En: Zimmerman R.H; Griesbach, R.J Hammerschlag, F.A. y Lawson, R.H. (eds.) Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. Ed. Martinus Nijhoff Publ. Boston. pp. 167-173.

Dobzhansky, T.; Ayala, F.J.; Stebbins, G.L. y Valentine, J.W. 1980. Evolución. Ed. Omega, S.A., Barcelona, España. pp. 9-11.

Engler A.; Melchior, H.; Wendermann, E. 1964. Syllabus der Pflanzenfamilien. Vol.2. Ed. Lubrecht & Cramer, Ltd. Forestburgh, N.Y. USA.

Esau, K. 1965. Plant anatomy. Ed. Wiley, N.Y. pp. 125.

Evans, D.A. 1981. Soybean tissue culture. Soybean Genetics Newsletter 8: 27-29.

Farnsworth, N.R. y Morris, R.W. 1976. Higher plants-the sleeping giant of drug development. Amer. J. Pharm. 148: 46-52.

Farnsworth, N.R. y Soejarto, D.D. 1985. Potential consequence of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. Economic Botany 39 (3) : 231-240

Fenner, M. 1985. Seed ecology. Ed. Chapman and Hall. Londres. pp. 1-16.

Flohn, H. 1969. Climate and weather. World Univ. Lib. Weidenfield and Nicolson, Londres, pag. 252 .

Fossard, R.A. 1976. Tissue culture for plant propagators. Univ. of New England Print., Armidale. pag. 125.

Friedman, R. ; Altman A. y Bachrach U. 1985. Polyamines and root formation in mung bean hypocotyl cuttings. II. Incorporation of precursors into polyamines. Plant Physiol. 79: 80-83.

García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köeppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana) 2° ed. Inst. de Geografía, UNAM, México pag. 252.

Gamborg, O.L. 1984. Plant cell cultures: nutrition and media. En: Vasil, I.K. Cell culture and somatic cell genetics of plants: laboratory procedures and their applications. Ed. American Press, Orlando, San Diego, California. pp. 18-26.

Gamborg, O.L.; Murashige, T.; Thorpe, T.A. y Vasil, I.K. 1976. Plant tissue culture media. In vitro 12:473-478.

George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1, the technology. Ed. Exegetics Ltd. England, pp. 37- 97.

George, E.F. y Sherrington P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories. Eastern Press, Reading, U.K.

Giles, K.L. y Morgan W.M. 1987. Industrial-scale plant micropropagation. TIBTECH 5: 35-39.

Gray, D. 1984. The role of fluid drilling in plant establishment. Aspects Appl. Biol. 7: 153-172.

Grewal, S. y Sharma, K. 1978. Clonal multiplication of medicinal plants by tissue growth, 4, Pyrethrum plant (*Crysanthemum cinerariaefolium* Vis) regeneration from shoot tip culture. Indian J. Exp. Biol. 16: 1119-1122 .

Hahlbrock, K. 1986. Secondary products. En: Silver, S. (ed.) Biotechnology: potentials and limitations, Dahlem Conference Konferenzen 1986. Ed. Berlin-Springer. pp. 241-257

Harlan, J.R. 1992. Crops and man. 2° ed. American Soc. of Agron., Crop Science Soc. of America, Madison.

Harris, G.P. y Hart E.M.H. 1964. Regeneration from leaf squares of *Peperomia sandersii* A.D.C. a relationship between rooting and budding. Ann. Bot. 28: 509-526.

Hartmann, H.T. y Kester, D.E. 1980. Propagación de plantas, principios y prácticas. CECSA, México. 814 pp.

Hernández, X. 1985. Biología Agrícola. Ed. CECSA. México.

Hildebrandt, A.C.; Wilmar, J.C.; Johns H. y Riker, A.J. 1963. Growth of edible chlorophyllous plant tissues in vitro. Am. J. Bot. 50: 248-254.

Hu, C.Y. y Wang, P.J. 1983. Meristem, shoot tip, and bud cultures. En: Evans D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V. y Yamada, Y. (eds.) Handbook of plant cell culture. Vol. 1 techniques for propagation and breeding. Macmillan Publ. Co. Nueva York. pp. 177-227

Hughes, K.W. 1981. Ornamental species. En: Conger, B.V. (ed.) Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida. pp. 5-50 .

Hussey, G. 1978. The application of tissue culture to the vegetative propagation of plants. Sci. Prog. pp 65-185

Huxtable, R.J. 1992. The pharmacology of extinction. J. Ethnopharmacol. 37 (1) :1-11.

Kates, M. 1982. Laboratory techniques and biochemistry and molecular biology. Techniques of lipidology, isolation, analysis and identification of lipids. Ed. North-Holland Publ. Co. Amsterdam, Oxford. pp 610.

Kartesz, J.T. y Kartesz, R. 1980. A synonymized checklist of the vascular flora of the United States, Canada, and Greenland. Univ. North Carolina Press, Chapel Hill, N.C.

Ketchum, J. L. F.; Gamborg, O. L.; Hanning, G. E. y Nabors, M. W. 1987. Tissue culture for Crops Project Progress Report. Ed. Colorado State University, Fort Collins, Colorado. pp. 74-78.

Larcher, W. 1980. Physiological plant ecology. Ed. Springer-Verlag Nueva York. 2nd ed. pp. 123-126

Larkin, P.J. y Scowcroft, N.R. 1981. Somaclonal variation - A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.

Larkin, P.J. y Scowcroft, N.R. 1983. Somaclonal variation and eyespot toxin tolerance in sugar cane. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 2 : 111-121.

León de la Luz, J.L. and Coria, R. 1992. Flora iconográfica de Baja California Sur. Ed. Centro de Inv. Biol. de Baja California Sur A.C., La Paz, B.C.S. México. Publ. No. 3. pag. 156

Levitt, J. 1972. Responses of plants to environmental stresses. Ed. Academic Press, New York and London.

Llorente, B.E. y Apóstolo, N.M. 1998. Effect of different growth regulators and genotype on *in vitro* propagation of jojoba. *New Zealand J. of Crop and Hort. Science* 26: 55-62.

Long, R.D. 1997. Photoautotrophic micropropagation- A strategy for contamination control?. En: Cassells, A.C. (ed.) *Pathogen and microbial contamination management in micropropagation*. Ed. Kluwer Acad. Publ. pp. 267-278.

Lórz, H. y Brown, P.T.M. 1986. Variability in tissue culture derived plants - possible origins; advantages and drawbacks. En: Horn, W.; Jensen, C.J.; Odenbach, W. y Schrieder, O. (ed.) *Genetic manipulation in plant breeding*. Walter de Gruyter, Berlin-Nueva York. pp. 217-229.

Mapes, C.; Caballero, J.; Espitia, E. y Bye R.A. 1996. Morphophysiological variation in some Mexican species of vegetable *Amaranthus*: Evolutionary tendencies under domestication. *Genetic Resources and Crop Evolution* 43 (3): 283-290.

Margaritis, A. y Wallace, J.B. 1984. Novel bioreactor systems and their applications. *Bio/Technology* 2: 447-453.

Marroquín, J.S.; Borja, G.; Velázquez, R. and De la Cruz, J.A. 1981. Estudio ecológico dasonómico de las zonas áridas del norte de México. Ed. Sec. de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Inst. Nac. de Inv. Forestales. , México. pag.166.

Mathews, H.; Litz, R.E.; Wilde, H.D.; Merkle, S.A.; Wetzstein, H.Y. 1992. Stable integration and expression of b-glucuronidase and NPT II genes in mango somatic embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 28: 172-178.

Martínez, M. 1959. *Las plantas medicinales de México*. 4 ed. Ed. Botas, México.

Mayer, F. 1993. Cell structure. En: Rehm, H.J. y Reed, G. (eds.) *Biotechnology: a multi volume comprehensive treatise*. Vol. I *Biological fundamentals*. Ed. VCH, Weinheim, Rep. Fed. Alemana. pp. 7-42.

McCown, D.D. 1986. Plug systems for micropropagules. En: Zimmerman, R.H.; Griesbach, R.J.; Hammerschlang, F.A. y Lawson, R.H.(eds) *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops* . Martinus Nijhoff Publ. Dordrecht, Boston, Lancaster pp. 53-60.

Molisch, H. 1928. *The longevity of plants*. Lancaster.

Moore, T. C. 1979. *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones* Springer - Verlag. New York Inc. pp. 27 - 28.

Murashige, T. 1983. Plant propagation by tissue culture: a practice with unrealized potential. En: Ammirato, P.V.; Evans, D.A.; Sharp, W.R. y Bajaj, Y.P.S. (eds.) Handbook of plant cell culture. Ornamental species. Vol. 5. McGraw-Hill Publ. Co. Nueva York. pp. 2-9 .

Macmahon, J. A. y Wagner, F.H. 1985. The mojave, sonoran and chihuahuan deserts of north America. En: Evenari, M., Noy-Meir, I. y Goodall, D.W. (eds). Ecosystems of the world 12A, hot deserts and arid shrublands, A. Ed. Elsevier Sci. Publ. Amsterdam. pp. 105-202.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

Nabor, M.W. 1990. Environmental stress resistance. En: Dix P.J. (ed.) Plant cell line selection. Procedures and applications. Ed. VCH, Nueva York. pp. 167-186.

Navarro, L. 1992. Citrus shoot tip grafting in vitro. En: Bajaj, Y.P.S. (ed.) Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 18. High-tech and micropropagation II. Springer, Berlin Heidelberg, Nueva York. pp. 327-338 .

Neuhaus, G.; Spangenberg, G.; Mittelsten Scheid, O. y Schweiger, H.G. 1987. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoids. *Theor. Appl. Genet.* 75: 30-36.

Newell, N.D. 1956. Catastrophism and the fossil record. *Evolution.* 10: 97-101.

Odum, E.P. 1972. *Ecología*. Ed. Interamericana, México, D.F. pp. 434-440.

Petersen, M. y Alfermann, A.W. 1993. Plant cell cultures. En: Silver, S. (ed.) *Biotechnology: potentials and limitations*, Dahlem Conference Konferenzen 1986. Ed. Berlin-Springer. pp. 577-614.

Pierik , R.L.M. y Stegmans H.H.M. 1976. Vegetative propagation of *Anthurium scherzerianum* shoot through callus culture. *Scientia Hort.* 4: 291-292.

Poehlman, J.M. 1983. *Breeding field crops*. AVI Westport, Conn, E.U.A. 2nd. ed. pag. 486 .

Preece, J.E. y Sutter E.G. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. En : Debergh P. C. and R.H. Zimmerman (ed.) *Micropropagation technology and applications*. Ed. Kluwer Acad. Publ., Netherlands pp. 71-93.

Prescott-Allen, C. y Prescott-Allen, R. 1986. *The first resource. Wild species in the North American economy*. Yale Univ. Press. pp. 197-274.

Ramírez, J. 1903. Lectura de turno. La damiana-*Turnera diffusa*-afrodisiaca. Anales del Instituto Médico Nacional (México) Vol.5 pp. 238-243.

Ramírez, J. 1904. La damiana *Turnera diffusa* afrodisiaca. En: Ramírez, J. Estudios de Historia Natural. Imprenta de la Secretaría de Fomento. México.

Rao, G.P.; Reddy, K.R.K. y Bir Bahadur. 1988. Organogenesis and plant regeneration from zygotic embryo callus cultures of *Turnera subulata* J.E. Smith. Ad. Plant Sci. 1 (2): 126-130.

Raven, P.H. Ethnic and attitudes in conservation of threatened plants. NATO Conference Series, 1. Ecology 1: 155-180.

Reinert, J. 1959. Ueber die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventiveembryonen an gewebeulturen aus karotten. Planta 53: 318-333.

Reinert, J., Bajaj, Y.P.S., y Zbell, B. 1977. Aspects of organization- organogenesis, embryogenesis, cytodifferentiation. En: Street, H.E. (ed.) Plant tissue and cell culture. Blackwell, Londres. pp. 389-427.

Robles Gil, M.S.M.G. 1998. El clima en la ciudad de La Paz, Baja California Sur. Tesis de Maestra en Geografía, Facultad de Filosofía y Letras, División de Posgrado, UNAM. pag. 233.

Roest, S. y Bokelmann, S. 1981. Vegetative propagation of carnation in vitro through multiple shoot development. Sci. Hort. 14 : 357-366.

Rubluo, A.; Chávez, V. y Martínez, A. 1989. In vitro seed germination and re-introduction of *Bletia urbana* (orquidaceae) in its natural habitat. Lindleyana 4(2) : 68-73.

Rubluo, A.; Chávez, V.; Martínez, A.P. y Martínez-Vázquez, O. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through in-vitro culture. Biol. Conserv. 63 (2): 163-169.

Rubluo, A.; Flores, A.; Jimenez, M. y Brunner, I. 1995. XXI *Piqueria trinervia* Cav. (St. Nicholas herb): in vitro culture and the production of piquerol. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 33 Medicinal Aromatic Plants VIII. Ed. Springer-Verlag, Berlin. pp. 377-387.

Rubluo, A.; Kartha, K.K.; Mroginski, L.A. y Dick, J. 1984. Plant regeneration from pea leaflets cultured in vitro and genetic stability of regenerants. J. Plant Physiol. 117: 119-130.

Rubluo, A.; Reyes, J. Brunner, I.; Rodríguez-Garay, B. y Pimienta-Barrios, E. 1996. Biotechnological and conventional methods of cacteaceae propagation for arid areas. En: Izquierdo, J. y Palomino, G. (eds.) Conventional and biotechnological techniques for plant propagation in arid areas. Serie: Zonas Áridas y Semi-Áridas FAO/PNUMA No. 9 pp. 3-54.

Sakamoto, Y.; Mashiko, T.; Suzuki, A.; Kawata, H. e Iwasaki, A. 1992. Development of encapsulation technology for synthetic seeds. *Acta Hort.* 319: 71-76.

Salter, P.J. 1978. Fluid drilling of pregerminated seeds: progress and possibilities. *Acta Hort.* 33: 245-249.

Sandoval, G. 1982. La damiana (*Turnera diffusa*, Willd.) una revisión bibliográfica y experiencias en su aprovechamiento e inducción al cultivo. Tesis Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, México, pp 205.

Sauer, D.B. y Burroughs R. 1986. Disinfection of seed surfaces with sodium hypochlorite. *Phytopathology* Vol. 76 No. 7 : 745-749.

Saunders, J.W. y Bingham E.T. 1972. Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Science* 12: 804-808.

Scowcroft, N.R. y Larkin, P.J 1982. Somaclonal variation: a new option for plants. En: Vasil, I.K.; Scowcroft, W.R. y Frey, K.J. (eds.) Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Press, Nueva York. 159-178.

Shmida, A.; Evenari, M. and Noy-Meir, I. 1986. Hot desert ecosystems: an integrated view. En: Evenari, M.; Noy-Meir, I y Goodall, D.W. (eds.) Ecosystems of the world. Hot deserts and arid shrublands. Ed. Elseviere, Sci. Publ. Amsterdam, The Netherlands. Vol. 12B. pp. 379-387.

Shmida, A. 1985. Biogeography of the desert flora. En: Evenari, M.; Noy-Meir, I y Goodall, D.W. (eds.) Ecosystems of the World. Hot deserts and arid shrublands. Ed. Elseviere, Sci. Publ. Amsterdam, The Netherlands. Vol. 12A. pp. 23-79.

Shreve, F. y Wiggins I.L. 1964. Vegetation and Flora of the Sonoran Desert. Stanford University Press. pp 938-939.

Skivin, R.M. 1981. Fruit crops. En: Conger, B.V. (ed.) Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida. pp. 51-139.

Soejarto, D.D. 1996. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field. *J. of Ethnopharmacology* 51: 1-15.

Spencer, K.C. y Seigler, D.S. 1981. Tetraphyllin B from *Turnera diffusa*. *Planta Medica, Journal of Medicinal Plant Research*. 43: 175-178.

Stabata, E.J. 1980. Secondary metabolism and biotransformation. En: Stabata, E.J. (ed.) *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. CRC Press, Boca Ratón, Florida. pp. 59-98

Sudha, C.G.; Krishnan P.N. y Pushpangadan P. 1998. *In vitro* propagation of *Holostemma annulare* (Roxb.) K. Schum., a rare medicinal plant. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 33: 57-63.

Tanaka, H.; Nishijima, F.; Suwa, M. e Iwamoto, T.1983. Rotating drum fermenter for plant cell suspension cultures. *Biotech. Bioeng.* 25: 2359-2370.

Thomas, E. y Street, H.E. 1970. Organogenesis in cell suspension cultures of *Atropa belladonna* L. and *Atropa belladonna* cultivar *lutea* Döll. *Ann. Bot.* 34: 657-669.

Thomson, W.A.R.(ed.) 1980. Guía práctica de las plantas medicinales. Ed. Blume, España pp. 106-107.

Trindade, H. y Pais M.S. 1997. *In vitro* studies on *Eucalyptus globulus* rooting ability. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 33: 1-5.

Ushiyama, K.; Miyamoto, Y.; Oda, H. e Ishida, Y. 1984. Gaseous phase culture equipment for continuous culture of plant tissues. *Jpn. Patent Kokai Tokayo Koho* 59-45873.

VanRaamsdonk, L.W.D. 1993. Wild and cultivated plants: the parallelism between evolution and domestication. *Evol. Trends Pl.* 7: 73-84.

Vasil, V.; Brown, S.M.; Fromm, M.E. y Vasil, I.K. 1991. Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *Biotechnology* 9: 743-747.

Vázquez-Duhalt, R.; Alcaraz-Meléndez, L. y Greppin, H. 1991. Variation in polar-group content in lipids of cowpea (*Vigna unguiculata*) cell cultures as a mechanism of haloadaptation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 26: 83-88.

Vázquez-Duhalt, R. y Greppin, H. 1987. Growth and production of cell constituents in batch cultures of *Botryococcus sudeticus*. *Phytochemistry*. 26:885-889.

Vines, R.A. 1960. Trees shrubs and woody vines of the southwest. University of Texas Press, Austin, USA pp. 764-765.

Waterman, P.G. 1990. Searching for bioactive compounds: various strategies. *Journal of Natural Products*, 53: 13-22.

Wilde, H.D.; Meagher R.B.; Merkle, S.A. 1992. Expression of foreign genes in transgenic yellow-poplar plants. *Physiol.* 98: 114-120.

Withersand, L.A y Alderson, P.G. 1986. Plant tissue culture and its agricultural applications, Ed. Butterworths, Guildford, Reino Unido. pp. 175-186.

Wiggins, I.L. 1980. Flora of Baja California. Stanford Univ. Press, Stanford, California, USA. pp 817-818.

Zacchini, M.; Marotta, A. y Deagazio, M. 1997. Tolerance to salt stress in maize callus lines with different polyamine. *Plant Cell Reports* 17(2) : 119-122

Zar, J.H. 1974. Biostatistical analysis. Ed. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, N.J. pp. 162-183.

XI. ANEXO

MEDIOS DE CULTIVO

REACTIVOS	MEDIO M S (Murashige y Skoog, 1962) mg/lit	MEDIO B5 (Gamborg, et al., 1976) mg/lit
$(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$	1,650	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	134
KNO_3	1,900	2,500
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150
$\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	370	250
KH_2PO_4	170	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	150
Na_2EDTA	33.6	37.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	27.8
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3	10
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.6	2
H_3BO_3	6.2	3
KI	0.83	0.75
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025
Glicina	0.2	-
Acido nicotínico	0.05	1
Piridoxina. HCl	0.05	1
Tiamina. HCl	0.01	10
mio-Inositol	100	100
Sacarosa	30,000	20,000
Agar	8,000	8,000
pH	5.7	5.5

CLIMA EN LA CIUDAD DE LA PAZ, B.C.S.

AÑOS				
	1988	1989	1990	1995
Temp. max. promedio anual (° C)	32.38	31.38	31.5	31.69
Temp. min. promedio anual (° C)	17.33	18	16.5	17.42
Temp. promedio anual (° C)	24.86	24.72	25.22	24.51
Promedio de precipitación anual (mm)	38.4 extremadamente seco	242.2 muy lluvioso	261.5 muy lluvioso	138.0 normal

Clima correspondiente a los años en los que se tomaron los datos de producción de las plantas de damiana micropropagadas sembradas en el campo experimental del CIBNOR.

Tomado de: Robles Gil, 1998.

CALENDARIZACION PARA LA PRODUCCION DE DAMIANA PROPAGADA POR CULTIVO DE TEJIDOS

	MESES													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Colecta, esterilización y siembra de explantes	*													
Formación de las primeras hojas y primera transferencia a medio fresco			*											
Formación y proliferación de brotes laterales y dos transferencias a medio fresco					*		*							
Formación de plántulas sin raíz, transferencia a medio fresco para enraizamiento								*						
Enraizamiento de las plántulas y transferencia a medio fresco										*				
Transplante y adaptación a macetas											*			
Transplante al campo														*

En esta tabla se muestra la integración de las etapas que se siguieron para la propagación de damiana por medio de la técnica de cultivo de tejidos vegetales y los tiempos que se requieren en cada una.

XII. PUBLICACIONES

Short communication

Callus induction and plantlet regeneration in damiana (*Turnera diffusa*, Willd.)

ANTONIO J. DÍAZ-RONDERO & LILIA ALCARAZ-MELÉNDEZ*

*Div de Biología Experimental, Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur, Apdo. Postal 128, La Paz, Baja California Sur 23000, México (*addressee for correspondence)*

Received 17 November 1986; accepted in revised form 23 March 1987

Key words: *Turnera diffusa*, damiana, vegetative propagation, callus culture

Abstract. Experiments were performed to determine optimal conditions for callus induction and plantlet regeneration from damiana (*Turnera diffusa*, Willd.) leaf explants. MS media [7] and B5 media [4] were used; both of them were supplemented with different combinations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 6-benzyl-adenine (BA). In all cases the samples were incubated under continuous fluorescent light, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$, at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for 60 days. Highest callus percentage was obtained in MS media supplemented with 2,4-D 10^{-5} M plus BA 10^{-8} M. Maximum percentage and multiple shoots and leaves were produced in MS media with BA 10^{-5} M and BA 10^{-5} M plus 2,4-D 10^{-7} M. These explants were transferred for rooting to MS medium without plant growth regulators. Later, rooted plantlets were successfully established in soil.

Introduction

Turnera diffusa (Turneraceae) commonly known as damiana [6] is a shrub that grows in the West Indies, South America and some regions of Mexico and the United States [11]. Its economic importance in the industry is due to the use of leaves and stems as a flavoring and as an infusion [10, 9]. In medicinal uses, damiana had been principally reported as a nervous stimulant, aphrodisiac and diuretic [8, 5, 1]. In spite of the economic importance of damiana, there are no commercial plantations in existence, due to the fact that there is no available methods for seed germination or soft-wood cuttings propagation. The main source of production is still wild plants [9].

An option for the reproduction of damiana plants is the use of tissue culture. The purpose of this study was to investigate the initiation and proliferation of callus and plantlets of damiana by means of tissue culture with various concentrations of 2,4-D and BA.

Materials and methods

Damiana plants were collected in the final stage of flowering (February), from areas near Todos Santos, Baja California Sur, Mexico (Fig. 1). They were transplanted to flower pots containing the same soil as that of the site where they had grown, and placed in a shaded area to conserve the plant tissues. Young leaves (17–20 mm) were removed from plants and their surfaces sterilized with 5% filtered commercial detergent (Salvo plus) for 3 min, 96% ethanol for 15–20 sec and 10% calcium hypochlorite for 10 min, followed by 5 rinses in sterile distilled water. They were cut (5–10 mm) and were transferred as follows; 3 explants for each glass vessel (150 ml) capped with clear autoclavable lids. Each vessel contained 20 ml MS media [7] or 20 ml B5 media [4], supplemented with 2,4-D 10^{-7} M to 10^{-3} M and BA 10^{-9} M to 10^{-4} M, as detailed in the diverse experiments. The final culture medium was adjusted to pH 5.7 for MS medium and 5.5 for B5 medium as in the original media, 0.8% agar (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.) and 3% sucrose for MS media and 2% sucrose for B5 media were added. The media were autoclaved at 121 °C for 15 min. The cultures were incubated under continuous fluorescent light, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$, at 25 ± 2 °C for 60 days. After this period, growth and development of callus and plantlets were recorded. Percentage of production of callus, shoots, leaves and roots are relative to all the explants tested, 9 per treatment, over 2 replicated experiments. In a few days (60) explants with shoots and leaves

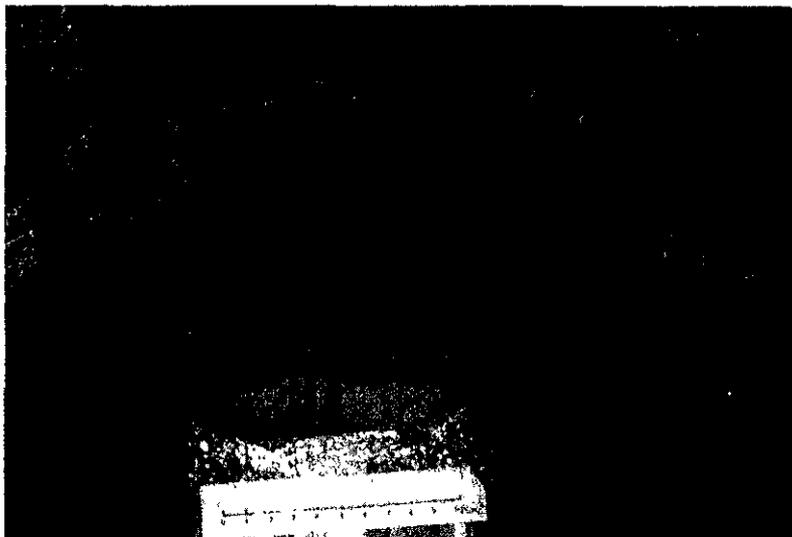


Fig. 1. Damiana (*Turnera diffusa*) mother plant from areas near Todos Santos, Baja California Sur, Mexico. Scale is 10 cm.

grown in MS medium supplemented with BA 10^{-5} M and BA 10^{-5} M plus 2,4-D 10^{-7} M, were transferred 3 times to MS medium, without plant growth regulators, every 20 days for rooting. At the third transfer the glass vessels were of 750 ml capacity and capped with aluminum foil. After this, plantlets were transferred to 10 cm plastic flower pots containing sandy soil. For their acclimatization they were placed in the laboratory under indirect day light at $25 \pm 5^\circ\text{C}$.

Results and discussion

Callus tissue induction

The results showed that multiple callus induction can be obtained from tissue cultures of damiana, when a suitable balance between auxin and cytokinin is present in the culture media (Fig. 2).

A paired-sample t-test [3] between the two media tested for callus induction (Table 1) gave $t = 4.67$ with 41 d.f. which was significant at 1%.

The effect of growth regulators on explants grown on B5 media for callus induction (Table 1) was statistically analyzed by means of a two-factor analysis of variance [12]. For 2,4-D treatments the percentage of callus induction was significantly different at 1%. There were no significant differences between BA treatments at the same levels of significance. The

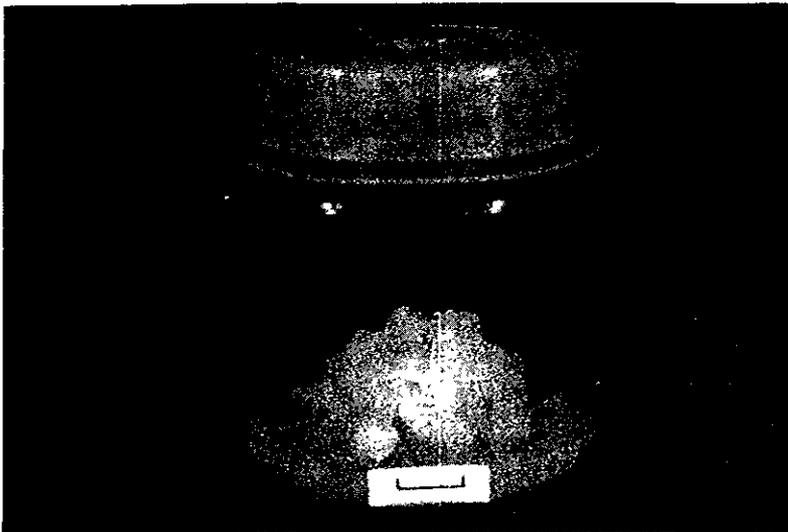
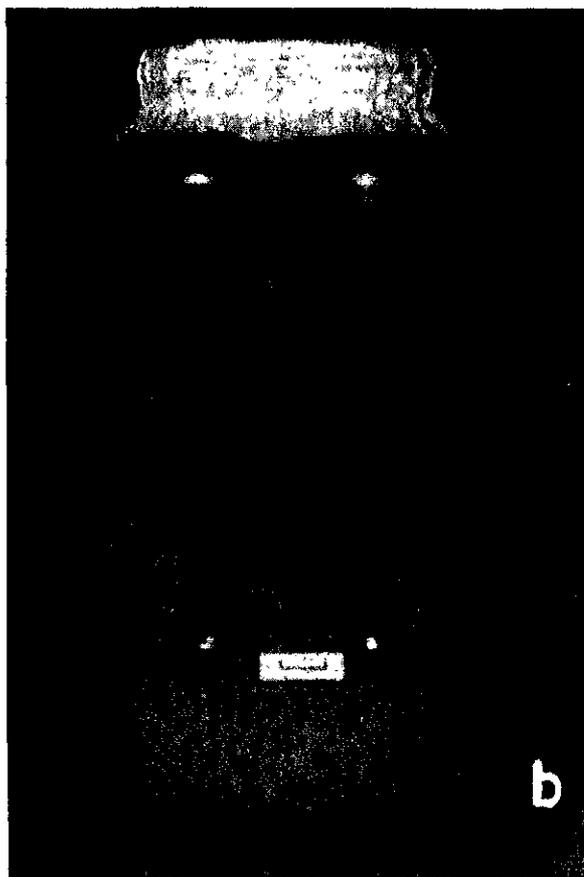
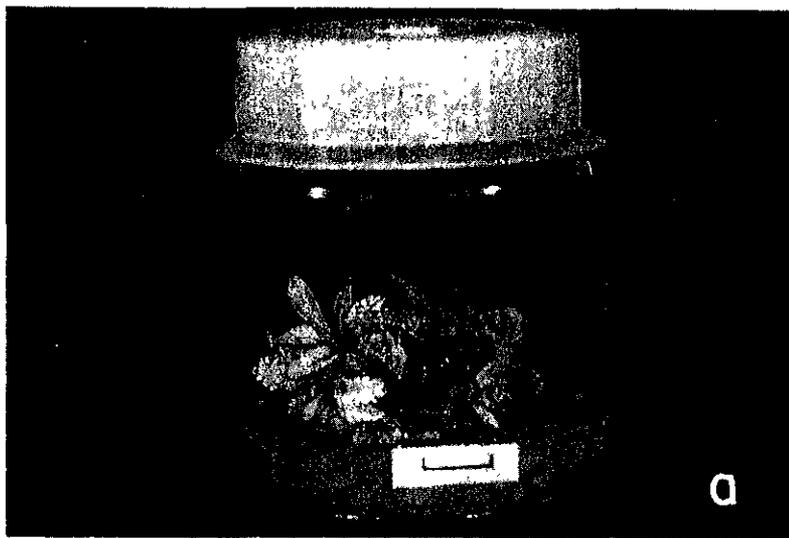


Fig. 2. Leaf callus cultured 60 days on MS medium with 2,4-D 10^{-4} M Scale is 1 cm.



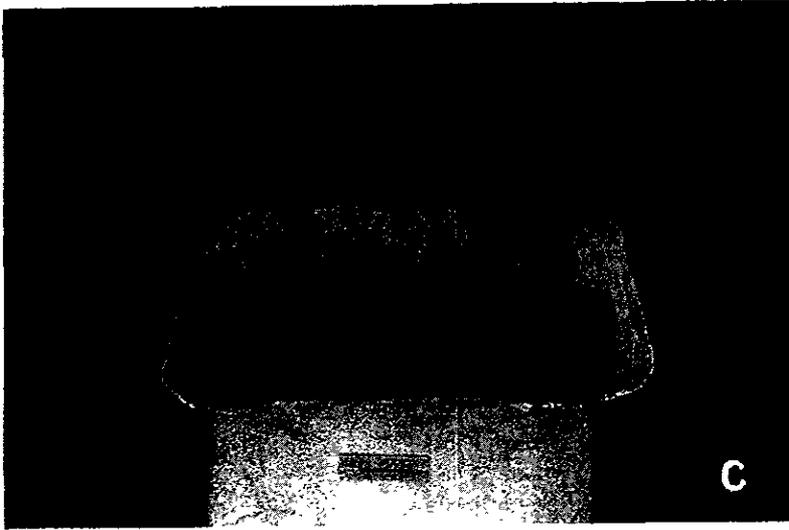


Fig. 3. Plant regeneration from leaf segments of *Turnera diffusa*. (a) Proliferating shoot culture on MS media with BA 10^{-5} M; (b) Third transfer to MS media without plant growth regulators; (c) Rooted plants transplanted to sandy soil after 30 days. Scale is 1 cm.

2,4-D 10^{-3} M inhibited callus induction and the explants turned brown. In contrast, the explants treated with 2,4-D 10^{-5} M and 10^{-4} M alone and combined with BA produced higher callus frequency. With 2,4-D 10^{-6} M or 10^{-7} M combined with BA, shoots, leaves and roots were formed.

When callus induction on MS media with different concentrations of growth regulators (Table 1) was examined by analysis of variance, the 2,4-D and BA effects were significant at 1%. 2,4-D 10^{-3} M at all combinations with BA and BA 10^{-4} M plus 2,4-D 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-4} M and 10^{-3} M produced no callus, and showed brownish pigmentation. Calli formed with 2,4-D 10^{-4} M at all BA combinations were yellowish and friable. Calli formed with 2,4-D 10^{-5} M at all BA combinations were greenish and compact. Calli formed with 2,4-D 10^{-6} M plus BA concentrations were whitish and very compact. Most of the explants treated with 2,4-D 10^{-7} M plus BA and only BA, formed differentiated tissues.

Plant differentiation

After callus formation and depending on growth regulator concentrations, organogenesis was observed on both culture media tested (Table 1).

Organogenesis in B5 media was lower than on MS media. In B5 medium organogenesis was best in treatments which contained BA 10^{-5} M and 2,4-D 10^{-7} M plus BA 10^{-5} M. Maximum percentage of cultures producing

Table 1. Percentage of 18 explants which grew in B5 and MS media supplemented with different concentrations of 2,4-D and BA and developed callus (c), shoots (s), leaves (l) and roots (r) or (-) showed no tissue response.

		2,4-D (M)											
BA (M)		B5						MS					
		0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	0	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
		%						%					
0	c	17	33	50	100	83	-	67	33	100	67	100	-
	s	-	-	-	-	-	-	67	33	-	-	-	-
	l	-	-	-	-	-	-	33	33	-	-	-	-
	r	17	-	-	-	-	-	-	-	-	33	-	-
10^{-9}	c	17	17	33	67	100	-	83	75	67	100	83	-
	s	-	-	-	-	-	-	83	75	-	-	-	-
	l	-	17	-	-	-	-	17	50	-	-	-	-
	r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	c	17	-	-	67	86	-	33	100	67	100	100	-
	s	17	-	-	-	-	-	33	100	-	-	-	-
	l	-	-	-	-	-	-	17	50	-	-	-	-
	r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	c	17	-	-	100	33	-	100	83	100	100	100	-
	s	17	-	-	-	-	-	-	83	-	-	-	-
	l	-	-	-	-	-	-	-	67	-	-	-	-
	r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	c	17	17	-	83	83	-	100	67	100	100	100	-
	s	-	-	-	-	-	-	100	67	-	-	-	-
	l	17	-	-	-	-	-	67	33	-	-	-	-
	r	-	-	-	-	-	-	17	-	33	67	-	-
10^{-5}	c	67	33	17	100	100	-	100	100	100	100	100	-
	s	50	67	-	-	-	-	100	100	100	-	-	-
	l	17	50	50	-	-	-	100	83	50	-	-	-
	r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33	-	-
10^{-4}	c	33	17	-	33	17	-	-	-	-	17	-	-
	s	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	r	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

shoots was 67%. Root initiation only occurred without growth regulators.

In MS media all explants produced shoots in many treatments. In BA 10^{-5} M multiple shoot production occurred on all explants (average 40.2 ± 18.6 shoots/explant). At BA 10^{-5} M plus 2,4-D 10^{-7} M there was an

average of 34 ± 29 shoots/explant. In calli, the highest percentage of explants with roots was with BA 10^{-6} M plus 2,4-D 10^{-5} M but BA 10^{-5} M plus 2,4-D 10^{-5} M produced the highest number of roots per explant (6 ± 1.4).

The explants treated with BA 10^{-5} M and BA 10^{-5} M plus 2,4-D 10^{-7} M rooted and grew when transferred to MS medium without plant growth regulators (3 times). Under these conditions 4-5 plantlets per explant which were produced were separated and transferred to sandy soil. All plantlets survived and grew normally during 45 days (Fig. 3).

Acknowledgements

The authors are indebted to Biol. Teodoro Reynoso for critical reading of the manuscript. We also would like to thank Mrs. Alicia Bowling and Mrs. Coleen Johanson for help in preparing the English manuscript.

References

1. Arias H, Costas F (1976) Plantas Medicinales. México: Biblioteca Práctica
2. Conger BV (1981) Cloning Agricultural Plants via In Vitro Techniques. Florida: CRC Press, Inc
3. Dixon WJ, Massey FJ (1965) Introducción al Análisis Estadístico. México: McGraw-Hill
4. Gamborg OL, Murashige T, Thorpe TA, Vasil IK (1976) Plant tissue culture media. In vitro 12: 473-478
5. Lifchitz A (1968) Guía práctica de Botánica Medicinal. Buenos Aires, Argentina: Kier
6. Martínez M (1979) Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. México: Fondo de Cultura Económica
7. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
8. Ramírez J (1903) La Damiana Turnera Diffusa Afrodisiaca. México. Anales del Inst. Médico Nac
9. Sandoval G (1982) La Damiana (*Turnera diffusa*, Willd) una revisión bibliográfica y experiencias en su aprovechamiento e inducción al cultivo. Chapingo, México: Thesis UACH
10. Vines RA (1960) Trees, Shrubs and Woody Vines of the South West. Austin, Texas: Texas University Press
11. Wiggins IL (1980) Flora of Baja California. Stanford: Stanford University Press
12. Zar JH (1974) Biostatistical Analysis. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall Inc

CAPITULO 5

PROPAGACION, CULTIVO Y APROVECHAMIENTO
DE LA DAMIANA (Turnera diffusa, Willd).

Lilia Alcaraz Meléndez y Sergio Real Cosío

Resumen

La Damiana (Turnera diffusa) es un arbusto que se desarrolla en climas áridos y semi-áridos, en vegetación de matorral xerófilo y selva baja caducifolia con una amplia distribución en el Continente Americano. En Baja California Sur se encuentra en las áreas de amortiguamiento e influencia de la zona propuesta como Reserva de la Biosfera de la Sierra de la Laguna. (Arlaga y Ortega, 1988).

La planta de Damiana tiene importancia socio-económica porque se emplea en la elaboración de licor, como bebida de inebriación y porque en la medicina tradicional se le emplea como estimulante nervioso, afrodisíaco y diurético principalmente (Martínez, 1959; Del Amo, 1979). Aunque la Damiana se desarrolla en algunos estados de la República Mexicana, la que se emplea con más frecuencia es la que se desarrolla en Baja California Sur, argumentándose que posee mejor calidad que la procedente de otras regiones. Es muy importante precisar el hecho que, a la fecha, este recurso natural se encuentra sobreexplotado, debido principalmente a que su extracción se basa exclusivamente en la recolección, no existiendo a la fecha, campos de cultivo productivos de esta planta. El principal obstáculo para ello es la incapacidad para promover la germinación de sus semillas. Por estas razones en el presente trabajo se describen las características taxonómicas y el hábitat de las poblaciones silvestres de Damiana que crecen en la Región del Cabo, Baja California Sur. Se describe el empleo de la técnica de cultivo de tejidos, como un método para la propagación de esta planta y se reportan los resultados que se han obtenido, haciendo énfasis en la producción durante 3 años del cultivo de estas plantas, propagadas por cultivo de tejidos, en el campo a nivel experimental. Finalmente

Ortega, A. (editor) 1992. Usos y manejo de los recursos naturales en la Sierra de la Laguna, Baja California Sur. Ed. CIB de BCS, A.C.

se reportan datos sobre la comercialización de las poblaciones silvestres y los ingresos que aportó la venta del producto del año anterior.

Abstract

Damiana (*Turnera diffusa*) is a shrub with wide distribution, which grows in arid and semi-arid regions of scrub vegetation. It is found surrounding the area proposed for preservation in Sierra de la Leguna (Ariaga y Ortega, 1988). The leaves of this plant have a socio-economic importance in liquor flavorings, beverages, and in traditional medicines such as nervous stimulant, aphrodisiac and diuretics (Martínez, 1959; Del Amo, 1979). Damiana grows in many states of Mexico, but most people prefer the high quality of Damiana from Baja California Sur. Since its seeds don't germinate under cultivation, Damiana is over-harvested in the wild; it is simply the only source available. This work describes the taxonomic characteristics of Damiana and its habitat the Cabo Region of Baja California Sur. In addition, it discusses the economic potential of Damiana, proposes a method of tissue culture for its propagation, and reports on the results of a three year experimental cultivation using this method.

Introducción

La Damiana (*Turnera diffusa*), es un arbusto perteneciente a la familia de las Turneraceas y se desarrolla en las Antillas, América del Sur, Estados Unidos y México (Wiggins, 1980). Dentro de la República Mexicana, se encuentra en las zonas áridas y semi-áridas de los estados de Querétaro, San Luis Potosí y Baja California Sur (Standley, 1924). La Damiana es una planta caducifolia, que en condiciones silvestres, mide entre 0.3 a 1.8 m. Sus tallos son ramificados, lisos y rectos, de color amarillo a pardo rojizo (Thomson, 1980) (Fig. 1). Las ramas son pubescentes cuando son jóvenes y posteriormente son lisas. Las hojas son simples, alternas o arracimadas, oblongas o estipuladas con pecíolos cortos, ápice obtuso, agudo, base corta acunada, con márgenes dentados con 2-10 dientes a cada lado. El tamaño de la hoja varía entre 10-25 mm, y presenta nervaduras prominentes por el envés e impresas en el haz, la superficie es lisa de color verde olivo brillante. Las yemas son grises con pubescencia abundante, eslipulas lineales y aromáticas sobre todo cuando están frescas. Las flores de esta planta son axilares, pequeñas de 8-12 mm, de color amarillo, perfectas,



Figura 1. Ilustración de las características morfológicas de la Damiana *Turnera diffusa*, Willd

regulares, su cáliz es césil, de alrededor de 13 mm tubular tomentoso con 5 plúmulas de 6-8 mm de longitud escasamente acunadas, a veces retorcidas insertas en la entrada del tubo del cáliz, 5 espiambres insertos cerca de los pétalos; 5 sépalos oblongos o un poco avovados. El fruto es una cápsula ovoidal de 4.6 mm de longitud deliscente del ápice a la base, trivalvar, de color verde. La semilla es de color café o blanquesino cremoso, testa dura de superficie áspera, reticulada, dando la apariencia de mazorca de maíz. El embrión es raclio con abundante endospermo carnosos y mide aproximadamente 2 mm de longitud por 1 mm de ancho y pesa de 1.04 a 1.08 mg (Vines, 1960).

En Baja California Sur la Damiana se localiza dentro de la vegetación denominada Matorral Xerófilo, que se encuentra a una altitud de 0.400 m cuyas climas son áridos y semi-áridos, con temperaturas medias anuales de 22.1 a 24°C y baja precipitación pluvial con una media anual de 180 a 287 mm. Los suelos donde se desarrolla son de textura ligera de migajón arenoso a arena migajonosa con pH ligeramente alcalino, pobres en Nitrógeno, con pendiente de no más del 5% en laderas, planicies y mesetas (Wiggins, 1980).

Esta especie es de importancia económica a nivel industrial porque se empaca para utilizarla como bebida de infusión; también es empleada como saborizante en dos tipos diferentes de licor y como ingrediente fundamental para la preparación de otro. Además, la Damiana ha sido utilizada desde hace varios años como planta medicinal dentro de la herbolaria mexicana tradicional como estimulante nervioso, atrodiclaco y diurético principalmente (Atlas y Costas, 1976; Del Amo, 1979; Martínez, 1959; Martínez, 1979). A pesar de las grandes cantidades de Damiana requeridas para las industrias antes mencionadas, la mayor parte de la Damiana que se utiliza, es recolectada en el Estado de Baja California Sur, específicamente de la Región de los Cabos. Actualmente la única fuente de obtención son las plantas silvestres ya que estas no han sido domesticadas, y la demanda de este producto va en aumento lo que propicia a mediano plazo la extinción de la especie o al menos el abatimiento de las poblaciones silvestres. Para que sea posible llevar a cabo un programa de reintroducción o de domesticación de la planta, es necesario como primer punto conocer las condiciones de propagación. Es por esto que en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la División de Biología Experimental del C.I.B., se han investigado las condiciones de propagación de la Damiana mediante los métodos convencionales, los resultados que se han obtenido demuestran que los es posible germinar semillas de esta planta, por lo que se desarrollaron experimentos sobre la propagación asexual por medio de cultivo de tejidos vegetales.

El presente trabajo tiene como objetivo dar a conocer los resultados que han sido obtenidos en la propagación y aprovechamiento de la Damiana a nivel experimental, utilizando la técnica de cultivo de tejidos como metodología fundamental para el desarrollo tecnológico, en la domesticación y aprovechamiento racional de este recurso.

Se analizaron los resultados obtenidos por varios autores en la Sierra de la Laguna, con respecto al tipo de suelo, clima y localización del recurso (Ariaga y Ortega, 1988), para conocer las características de las zonas en donde se desarrollan las poblaciones silvestres de Damiana.

Se establecieron las condiciones de regeneración clonal por medio de la técnica de cultivo de tejidos, en condiciones controladas de luz, con tiempo de iluminación de 24 hrs al día e intensidad de 100 ómol.m⁻².sec⁻¹ y una temperatura de 25 ± 2 °C (Díaz-Rondero y Alcaraz-Meléndez, 1987). Los experimentos fueron enfocados a la obtención del medio nutritivo y la combinación de fitohormonas adecuada para la formación de nuevas plantas, empleando hojas como explante inicial. El medio nutritivo adecuado fue el de Murashige y Skoog (1962). Se transfirieron los explantes cada mes a medio nuevo, observándose el inicio del desarrollo de las hojas a los 2 meses y el desarrollo de las plantas completas a los 9 meses del 25% de los explantes. Posteriormente se transplantaron a macetas con suelo arenoso y 25% de vermiculita, se mantuvieron en un cuarto de cultivo con 70% de humedad relativa y 25 ± 2 °C. Después de la adaptación a macetas se transplantaron al campo experimental. Las plantas transplantadas a macetas fueron sembradas en el campo experimental del C.I.B., localizado en el Comilán, Baja California Sur. Se sembraron a 1 m de distancia entre cada una, se regaron cada 8 días durante 3 meses y posteriormente cada 15 días. Se midieron y se podaron cada año durante 3 años consecutivos para cuantificar el desarrollo y producción de estas plantas.

Se cuantificó el contenido de lípidos totales y lípidos neutros de tallos y hojas de plantas silvestres, y de hojas de Damiana propagadas por cultivo de tejidos y transplantadas al campo experimental. Los lípidos totales se analizaron por el método descrito por Vázquez-Duhait, et al. (1991) y los lípidos neutros con la metodología desarrollada por Vázquez-Duhait y Greppin (1987).

También se investigaron las condiciones de explotación de este recurso en el Estado de Baja California Sur y su comercialización.

Resultados

En los estudios realizados por Ariaga y Ortega (1988), se observa que en la zona núcleo, del área propuesta como Reserva de la Biosfera de la Sierra de la Laguna, el clima y el suelo no son adecuados para el desarrollo de las plantas de Damiana, ya que esta zona presenta un clima frío para esta especie y los suelos son arcillosos con drenaje pobre, por lo que no sería posible el desarrollo de esta planta en esta región, y como es de esperar no existen

poblaciones silvestres en estos sitios. Sin embargo, en las zonas de amortiguamiento e influencia existen regiones con suelos del tipo de Litosoles con Regoso Eútrico y de textura gruesa (Maya, 1988) donde el desarrollo de la Damiana es propicio. Además el clima donde se reporta que crecen poblaciones de Damiana es del tipo de semi-árido cálido que corresponde a algunas regiones de la zona de amortiguamiento y de influencia de la zona propuesta como Reserva de la Biosfera (Coria, 1988).

Las poblaciones silvestres que han sido dielecadas en la Región del Cabo son de los 0 a lo 800 msnm desde San Pedro hasta Los Cabos (Amado Colla, com. pers.).

Los resultados obtenidos empleando la técnica de cultivos de tejidos para la propagación de Damiana fueron del 70% de plantas producidas "in vitro" con respecto al total de los explantes sembrados, 45% de sobrevivencia al trasplante de macetas y un 100% al trasplantarlas al campo; es decir, con una eficiencia total del 31.5%.

La Tabla 1 muestra los resultados de la producción durante tres años consecutivos de las plantas propagadas por medio de cultivos de tejidos y sembradas en el campo experimental. Con estos resultados se calculó que en 1 ha sembrada con plantas a 1 X 1.5 m de distancia, habría aproximadamente 6,600 plantas y bajo las condiciones de cultivo descritas anteriormente se se produciría el primer año 1.2 ton/ha de hojas secas y el segundo y tercer año alrededor de 2.3 ton/ha de hojas secas.

Tabla No. 1.- Resultados obtenidos de 42 plantas propagadas por medio de cultivos de tejidos y sembradas en el campo experimental del C.I.B., localizado en el Camillán, Baja California Sur. Las plantas se poseen cada año durante tres años consecutivos.

	Años		
	1	2	3
Altura (cm)	103.7	115	130
Peso fresco por planta (gr)	941.0	1252.2	1680.2
Peso seco por planta (gr)	511.0	914.7	970.5
Porcentaje de humedad	45.7	27.0	44.0
Peso seco de las hojas por planta (gr)	188.0	336.6	357.1
Peso seco de las ramas por planta (gr)	323.0	578.1	613.4

Con respecto a la cantidad de los metabolitos secundarios que contienen, se analizó el contenido de lípidos totales y lípidos neutros (Fig. 2), observándose que los tallos contienen 8.5 veces menos lípidos totales que las hojas y 14.4 veces menos lípidos neutros que las hojas. Al comparar el contenido lipídico entre las hojas de las plantas propagadas por cultivos de tejidos y las plantas silvestres, no se observó diferencia significativa, por lo tanto, se considera que las plantas propagadas por cultivos de tejidos son adecuadas para proveer la materia prima a las industrias que emplean este recurso.

Los datos sobre la explotación y comercialización del recurso (Tabla 2) se obtuvieron del trabajo desarrollado por Sanchoval, (1980) y también se solicita información en la Jefatura del Programa Forestal de la Delegación de Baja California Sur, dependiente de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos

Tabla No. 2 Producción y comercialización de la damiana durante 8 años. Fuentes de información: Sanchoval G. 1980 y "Jefatura del Programa Forestal de la Delegación de Baja California Sur perteneciente a la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos."

AÑO	PRODUCCION (Tons)	DESTINO
1977 *	18	América, Europa
1978 *	32	América, Europa y Asia
1979 *	114	América, Europa y E.U.A.
1985 **	4.5	Ensenada, BCS, México
1987 **	12.72	Cd. de México, Tijuana, La Paz
1988 **	6.0	Cd. de México, Tijuana, La Paz
1989 **	20.9	Cd. de México, Tijuana, La Paz
1990 (hasta Septiembre) **	3.0	Cd. de México, Tijuana, La Paz

Discusión

Se ha reportado (Brandege, 1891) que las poblaciones silvestres de Damiana en Baja California Sur se desarrollan en la Región de Los Cabos y una zona importante para su desarrollo es la zona de influencia y la zona de amorti-

ligamiento del área propuesta como Reserva de la Biosfera de la Sierra de la Laguna.

La propagación por medio de cultivo de tejidos para conservar la Damiana y reforestar las zonas donde crece esta especie, ha sido desarrollada a nivel experimental con buenos resultados, como se mostró anteriormente. Habiendo así establecido las condiciones básicas para la propagación de Damiana mediante el cultivo de tejidos, el siguiente paso es continuar con una investigación de escalamiento a nivel comercial, con el fin de establecer las condiciones para la producción masiva, determinar los costos de producción e investigar las condiciones para que sea rentable económicamente esta producción.

En cuanto a los resultados de producción obtenidos, se compararon con los reportados por el Centro de Investigaciones Forestales del Noroeste, quienes transplataron plantas de Damiana al campo experimental de Todos Santos, Baja California Sur, donde hubo una producción estimada de 90 a 120 kg/ha y en otro experimento realizado en el mismo Centro, se obtuvo una producción estimada de 85 kg/ha a los 5 meses de haberlas transplantado; y efectuando un riego inicial y después uno cada mes (Sanflovai, 1980). Como se puede observar, los resultados del segundo experimento, son similares a los resultados que obtuvimos en las plantas propagadas por cultivo de tejidos.

En cuanto al valor comercial del producto, se considera que es alto, debido a que en 1990 los recolectores obtuvieron un pago de \$ 6,000.00 el Kg de Damiana con hojas y tallos sin separar, este pago correspondió al 55% del salario mínimo diario, a la fecha. En los comercios de la Cd. de la Paz Baja California Sur se vendió entre \$ 14,000 y \$ 15,000 el Kg de hoja seca a granel y en la Cd. de México se vendió a \$ 28,000 de hoja seca a precio de mayorero. También se obtuvo la información sobre el costo de la Damiana procedente de San Luis Potosí, la cual se vendió en la Cd de México a \$ 7,000 el Kg de hoja seca al mayorero; lo que nos indica que la Damiana de Baja California Sur tiene valor comercial considerablemente más alto, debido a su calidad y demanda.

Conclusiones

De acuerdo con la información presentada se puede concluir que la Damiana, considerada como un recurso forestal no maderable, es una planta que tiene importancia socio-económica porque se emplea en la industria y produce ingresos económicos a las personas que la recolectan en las áreas que rodean la zona propuesta como Reserva de la Biosfera de la Sierra de la Laguna. Si

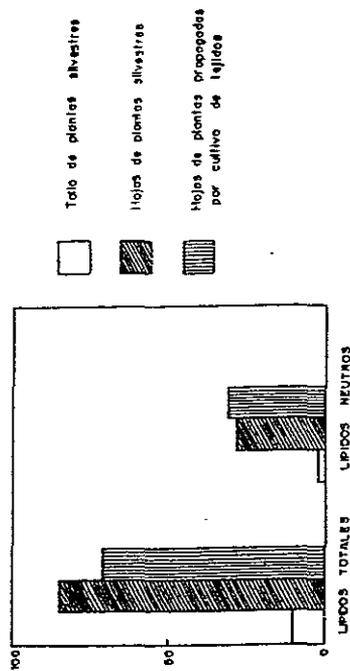


Figura 2. Análisis de lipidos totales y lipidos netos de hojas y tallos de Damiana silvestre procedente de Todos Santos, Baja California Sur y de hojas de Damiana propagada por medio de cultivo de tejidos

se incrementarían las poblaciones naturales, implementando programas de reforestación a gran escala y bajo sistemas de cultivo con el mínimo de cuidados, se transformarían las poblaciones silvestres en ecocultivos, con criterios de optimización y conservación del recurso. Lo cual además de beneficiar a los pobladores, preservará las poblaciones silvestres.

Agradecimientos

Al Dr. Alfredo Ortega y al Biot. Teodoro Reynoso por sus comentarios y revisión del manuscrito. Al Arq. Alejandro Alcazar por su participación en la elaboración del dibujo de Damiana.

Literatura Citada

- Arias, H. y F. Costas. 1978. PLANTAS MEDICINALES. Biblioteca Práctica, México.
- Arizaga, L. y A. Ortega. 1989. LA SIERRA DE LA LAGUNA DE BAJA CALIFORNIA SUR. Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur, A.C. México, pp.237.
- Brandegee, T. S. 1891. FLORA OF THE COPE REGION OF BAJA CALIFORNIA. Ed. California Acad. of Sci. 2d ser., Vol. III pp. 109-182.
- Celis, R. 1989. Climatología. IN. L. ANRIKSA Y A. ORTEGA (EDS.). "LA SIERRA DE LA LAGUNA DE BAJA CALIFORNIA SUR". Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur, A.C. México, pp. 45-52.
- Del Amo, R. S. 1978. PLANTAS MEDICINALES DEL ESTADO DE VERACRUZ. Ed. Ins. Nac. de Inv. sobre Recursos Bióticos, Xalapa, Veracruz, México, ppg. 224.
- Díaz-Rodrigo, J. A. y L. Alcazar-Maldonado. 1987. Cultivo, inducción and plantlet regeneration in damiana ("Turnera diffusa", Willd.) plant culture tissue and organ culture. 10:39-45.
- Martínez, M. 1959. LAS PLANTAS MEDICINALES DE MEXICO. 4 ed. Ed. Bolos, México.
- Martínez, M. 1978. CATALOGO DE NOMBRES VOLGARES Y CIENTÍFICOS DE PLANTAS MEDICINAS. Fondo de Cultura Económica, México.
- Maya, Y. 1988. Edafología. IN. L. ANRIKSA Y A. ORTEGA (EDS.). "LA SIERRA DE LA LAGUNA DE BAJA CALIFORNIA SUR". Centro de Investigaciones Biológicas de Baja California Sur, A.C. México. pp. 53-65.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. PHYSIOL. PLANT. 15:473-497.
- Rzedowski, J. 1978. VEGETACION DE MEXICO. Ed. Limusa, México. pp. 237-261.
- Sandoval, G. 1982. La damiana ("Turnera diffusa", Willd.) una revisión bibliográfica y experiencias en su aprovechamiento e inducción al cultivo. TESIS UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUANAJUATO, Chapingo, México. pp. 205.
- Standley, P.C. 1924. CONTRIBUTIONS FROM THE UNITED STATES NATIONAL HERBARIUM, Vol. 23 Part 4 (Trees and shrubs of México) Ed. Smithsonian Institution, United States National Museum, Washington Government Printing Office.
- Thomson, W.A.R. (Ed.). 1980. GUÍA PRÁCTICA ILUSTRADA DE LAS PLANTAS MEDICINALES. Ed. Blume, España. pp. 106-107.
- Vázquez-Duhail, R. y Greppin, H. 1987. Growth and production of cell constituents in batch cultures of "Botryococcus sudeticus". PHYTOCHEMISTRY, 26: 885-889.

- Vázquez-Duhail, R.; Alcazar-Maldonado, L. y Greppin, H. 1991. VARIATION IN POLAR ORGAN CONTENT IN UNDS OF COFFEE ("Vigna speciosa") CELL CULTURES AS A MECHANISM OF ADAPTATION. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 26: 83-88.
- Went, R.A. 1950. TREES SHRUBS AND WOODY VINES OF THE SOUTHWEST. Univ. of Texas Press, Austin, E.U.A. pp.784-785.
- Wiggins, I.L. 1980. FLORA OF BAJA CALIFORNIA. Blaisdell Univ. Press, Stanford, California.

Domestication of micropropagated plants of the spice damiana (*Turnera diffusa*)

Lilia Alcaraz-Meléndez, Sergio Real-Cosío, and Yoav Bashan

Dept. of Microbiology, The Center for Biological Research (C.I.B.), P.O. Box 128, La Paz, Baja California Sur, 23000, Mexico

Received 22 October 1993/Revised version received 7 March 1994 – Communicated by G. C. Phillips

Abstract. Tissue culture propagation was performed on the spice shrub damiana (*Turnera diffusa*, Willd.) using MS medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with different combinations of the plant growth regulators, 6-benzyl adenine (BA) and indole-3-butyric acid (IBA). Organogenesis of leaf explants from wild plants and explants from propagated cuttings was compared; only the former regenerated complete plants. The highest shooting rate (92%) occurred at a concentration of 10^{-7} M BA plus 10^{-4} M IBA. Regenerated shoots were rooted in MS medium without any plant growth regulators. Foliage productivity of the micropropagated plants under field cultivation was determined yearly over 3 years. The yield increased annually for the first two years. The quantity of essential oils in propagated plants was similar to that of wild plants growing nearby. We propose tissue culture propagation of damiana as a viable means of domestication of this wild plant for semi-arid agriculture in Mexico. Commercial propagation would help to conserve wild populations of damiana that are currently threatened by overharvesting.

Abbreviations

BA - 6-benzyl adenine; IBA - indole-3-butyric acid.

Introduction

The conservation of natural resources, especially wild plant species with commercial value, is an official objective of the current Mexican government. As the market for wild plant products increases, escalating harvests of wild plants endanger the existence of slow growing arid plants.

The wild spice shrub damiana (*Turnera diffusa*) grows in arid and semi-arid regions of Mexico, the U.S.A., the West Indies and South America (Wiggins 1980). The leaves and stems of this species are used for liqueur flavoring and beverages (Vines 1960), and in traditional medicine as a stimulant, aphrodisiac and diuretic (Arias 1976; Martínez

1979). The damiana eco-type grown in Baja California Sur, Mexico is generally preferred by consumers (unpublished data). At the present time, damiana leaves are heavily harvested from wild plants, causing concern for the plant's survival in the wild. The harvest of wild plants is done for 3 reasons: 1) the seeds can not germinate under laboratory conditions, and seed germination in the wild is rare, thus the first usual step to possible domestication is not available; 2) propagation by cuttings has been unsuccessful on a commercial scale (Sandoval 1982); and, 3) it is easy to collect and sell the foliage of wild damiana.

Previous experiments with damiana tissue culture (Díaz-Rondero and Alcaraz-Meléndez 1987) found that Murashige and Skoog (1962) medium (MS) was better than B5 medium (Gamborg et al. 1976) for callus formation before the initiation of shoot organogenesis and subsequent rooting of microshoots.

The aims of this study were: 1) to domesticate wild damiana plants by means of tissue culture propagation using plant material originating from wild plants and from plants that were propagated by cuttings; 2) evaluate the growth and yield of tissue cultured plants for 3 consecutive years in the field, and 3) compare the essential oil content of wild and tissue culture-propagated plants. Our ecological goal was to provide a method of damiana propagation leading to domestication, thus creating a new potential for rural, arid-zone agriculture in Mexico. It is hoped that an efficient means of damiana domestication will reduce the commercial incentive to harvest wild plants.

Materials and methods

Leaf samples for tissue culture propagation were taken from two types of plants: a) wild plants, and b) plants propagated from cuttings. The wild plants (30 cm high) were collected from the wilderness area near Todos Santos (23° north latitude and 110° 11' west longitude), Baja California Sur, Mexico, transplanted into pots (10 cm long X 10 cm wide X 15 cm high) containing sandy soil from their original location, and maintained in the laboratory for one year under natural illumination and temperature ranging from 25–35°C. One year later, they were transplanted to the experimental

field of the Center for Biological Research, La Paz, Baja California Sur, Mexico.

The cuttings were obtained from plants of the same eco-type in the same location. The cuttings were immersed in an aqueous solution of naphthaleneacetic acid (NAA) ($2.15 \times 10^{-4} \text{ M}$) for 10 min, then dusted with a commercial fungicide (Captan; *N*-(trichloro methylthio)-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide; Rhone Poulenc Agro Co., México). During the rooting period, the cuttings were grown in propagation beds in soil mixture containing sandy soil and medium vermiculite (1:1, v/v) at temperatures ranging from 30-45°C at $67.75 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ light intensity. For experiments using cuttings, 6 leaves were used for each treatment. Likewise, for experiments using wild plants, 6 leaves were used for each treatment.

Young leaves (17-20 mm long) were collected from both types of plants at the same time, washed with 5% filtered commercial detergent (Salvo plus; Procter & Gamble Co.) followed by successive surface disinfection with 95% ethanol (15-20 s) and 10% calcium hypochlorite (10 min), then rinsed 3 times with sterile distilled water. The leaves were cut transversely in the middle, and both segments were placed horizontally with the cut edges touching the medium surface. Two segments were placed in 100 ml glass vessels (55 mm diameter X 72 mm high) containing 20 ml of MS medium and capped with clear autoclavable lids. Six vessels were used for each medium concentration of BA and/or IBA; the experiments were repeated 3 times. The six vessels were supplemented with combinations of 6 different concentrations of IBA (10^{-6} M to 10^{-2} M) and BA (10^{-6} M to 10^{-1} M) for a total of 36 different treatments (Table 1). The medium was prepared with different BA concentrations adjusted to pH 5.7 and mixed with 0.8% agar and 3% sucrose before autoclaving at 121°C for 20 min. IBA (pH 5.7) was sterilized by filtration through a 0.45 μm Millipore filter and added to the sterile medium before solidification.

The explants were incubated under continuous fluorescent light ($100 \mu\text{E m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) at $25 \pm 2^\circ \text{C}$ for 60 d. After this period, those that developed shoots were transferred monthly over 3 months to fresh MS medium lacking plant growth regulators to develop roots. Due to their relatively large size at the last transfer, the plantlets were moved into glass vessels approximately 750 ml (76 mm diameter X 125 mm high) containing 70 ml of MS medium and sealed with aluminum foil. Finally, after 5 months in the growth chamber, plantlets were transferred to 500 ml pots containing untreated natural sandy soil. The pots were covered with 750 ml glass vessels for one month to acclimatize the plants to the lower relative humidity (40-60%). For further acclimatization, plantlets were placed in the laboratory under indirect daylight ($71-109 \mu\text{E m}^{-2} \text{ sec}^{-1}$) at $25 \pm 5^\circ \text{C}$ for 6-8 months. When the plants were 5-8 cm high, they were transplanted 1 m apart in the soil of the experimental field. The plants were irrigated with 33 dm³ water per m² every 8 d for 3 months, and thereafter, every 15 d for the duration of the study. Plants were fertilized once a year in the winter with cow manure at 100 g/plant. Each autumn, the plants were measured and pruned. The pruned leaves and stems were weighed to determine productivity for both fresh weight and dry weight (oven dried at 60°C for 24 h).

Total lipids and essential oils of leaves and stems were extracted using methanol-chloroform (2:1, v/v) for 24 h at 4°C. Then, the extract was filtered, 3 ml of distilled water was added, the mixture was centrifuged, the lower chloroform phase was withdrawn, and the aqueous phase was washed 3 times with 3 ml of chloroform. The resulting solution was dried with N_2 , and the total lipids were weighed. The essential oils were obtained by fractionation using alumina column chromatography according to Vázquez-Duhali and Greppin (1987). Wild plants and micropropagated plants used in the lipid analysis were grown under the same environmental conditions at Baja California Sur and were chosen at random.

The effect of growth regulators on shoot and root formation was statistically analyzed by multifactorial Analysis of Variance (ANOVA) and Least Significant Different Test (LSD). Before analysis, the data were arcsine transformed because they were of binomial distribution and had to be changed to a normal distribution as required by analysis of variance (ANOVA) at 5% level of significance (Zar 1974). Student's *t*-test was used to analyze the essential oils data.

Results and discussion

The explants originating from plants that were propagated by cuttings showed no response to any combination of plant growth regulator treatments during the tissue culture procedure. They turned brown and died within 15 d, both times this experiment was performed. This study provides no physiological explanation for this phenomenon. However, it is known that pre-treatments of plant stock can affect the micropropagation properties of its plant parts (Debergh and Zimmerman 1990).

Explants originating from wild plants that were incubated with any combination of the plant growth regulators formed new shoots (Fig. 1), and the growth of callus was minimal.

The best plant growth regulator combination to induce shoots on the explants (92%) was 10^{-4} M IBA plus 10^{-2} M BA. The second best combinations were 10^{-4} M IBA with no BA and 10^{-2} M BA with no IBA, where regeneration was 84% and 87%, respectively (Table 1). However, there was a complex interaction between the two growth regulators, and many treatments were statistically equivalent. Each explant produced had 3 to 5 leafy shoots (Fig. 1).



Fig. 1. Plantlets regenerated from damiana leaf explants in MS medium. Scale is 1 cm.

Generally, explant rooting can be promoted in media lacking plant growth regulators. In this study, the most rooting occurred on hormone-free medium in plantlets that had previously been treated with 10^{-8} M IBA (and no BA) or 10^{-1} M BA (and no IBA) for shoot induction (Table 2). In the optimal pre-treatments, 100% of the explants developed roots. Second best rooting was achieved on shoots previously induced with 10^{-6} M IBA plus 10^{-8} M BA, in which 92% of explants developed roots. All other combinations of plant growth regulators in the pre-treatments resulted in lower percentages of rooting (Table 2).

In summary, to produce the greatest number of damiana plantlets through micropropagation, explants should be placed on optimal shoot induction medium (MS + 10^{-6} M IBA + 10^{-7} M BA). Thereafter, they should be transferred to a MS medium lacking plant growth regulators for root development. Under this procedure, rooting was found to take place in 80% of all transferred shoots.

Transplant survival of plantlets from the tissue culture flasks to the pots was 45%, and from pots to the field, survival was 100%. Table 3 shows the growth and the dry weight productivity of the leaves and stems (the commercially viable parts) of micropropagated plants over the 3 consecutive years of this study, and the increased productivity of these plants for the first 2 years. These results can be used to calculate the hypothetical production per hectare under the growing conditions described in our study. The first harvest year would have produced 1200 kg/ha of dry leaves, and the second and third years, 2300 kg/ha.

Table 1. Effect of different concentrations of BA and IBA on shoot production from damiana. Each determination represents 18 replicates expressed as percentage data. ^aMean separation by ANOVA and LSD at 5% level with each value transformed to its arcsine.

BA (M)	IBA (M)					
	0	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
0	35ab ²	25a	53abc	50abc	59abc	84bc
10^{-8}	78abc	50abc	61abc	75abc	50abc	63abc
10^{-6}	56abc	67abc	42abc	58abc	69abc	59abc
10^{-7}	75abc	60abc	34abc	92c	67abc	75abc
10^{-4}	74abc	67abc	57abc	73abc	68abc	61abc
10^{-5}	87bc	31ab	26a	55abc	54abc	73abc

The main secondary metabolites extracted from damiana foliage are the essential oils, which are used for flavoring in the liqueur industry or packed for "tea-like" beverages. The quantity of total lipids and essential oils is shown in Table 4. When the lipids and essential oil content between micropropagated and wild plants was compared by student's t-test, there were no significant differences, indicating that

micropropagated damiana plants can be useful for the food industry as well. We propose tissue culture propagation as a practical technique for damiana propagation and later domestication. This could make semi-arid lands in Mexico more productive and decrease the probability of over-exploitation and the possible extinction of native damiana populations.

Table 2. Percentage of roots developed in damiana plantlets grown on hormone-free medium following initial cultural steps on different concentrations of BA and IBA. ^aMean separation by ANOVA and LSD at 5% level with each value transformed to its arcsine.

BA (M)	IBA (M)					
	0	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
0	75abc ²	100c	50abc	90abc	84abc	46bc
10^{-8}	78abc	42a	61abc	74abc	61abc	84abc
10^{-6}	44abc	50abc	75abc	92bc	71abc	54abc
10^{-7}	78abc	72abc	67abc	80abc	86bc	74abc
10^{-4}	48abc	65abc	79abc	67abc	65abc	72abc
10^{-5}	100bc	61abc	56abc	55abc	44ab	44ab

Table 3. Production from 42 damiana plants propagated by tissue culture and placed in the experimental field of the Center for Biological Research of Baja California Sur, located in El Comitan, Baja California Sur, México. The plants were put off every year for three years; results are averages from all the plants sampled. Numbers denoted by a different letter, in each parameter (row) are significantly different at $P \leq 0.05$ by One-way ANOVA and LSD

	1st year	2nd year	3rd year
Height (cm)	103.7 ± 2.3a	114.9 ± 2.2b	129.8 ± 2.3c
Fresh weight for plant (g)	910.7 ± 73.2a	1266.7 ± 114.2b	1785.4 ± 133.7c
Dry weight for plant (g)	434.2 ± 34.2a	914.1 ± 82.0b	902.2 ± 67.6b
Humidity (%)	45.7	27	44
Leaves, dry weight (g)	159.7 ± 12.6a	346.5 ± 31.1b	347.3 ± 26.0b
Stems, dry weight (g)	274.5 ± 21.6a	579.4 ± 51.0b	539.7 ± 42.0b

Table 4. Lipid content and neutral group lipids from leaves of wild and micropropagated damiana plants (d.w. = dry weight), ^aSD

	Total lipids (mg/g d.w.)	Essential oils (mg/g d.w.)
Wild plants	77.72 ± 13.03 ^a	32.34 ± 9.41
Micropropagated plants	67.04 ± 15.48	29.33 ± 5.24

Acknowledgments The authors wish to thank Mr. Teodoro Rayoso Granados for his comments on the manuscript, Mr. Gerardo Toledo for advising in statistical analysis, Mr. Sergio Rosas for photography and Mr. Roy Bowers for careful English correction.

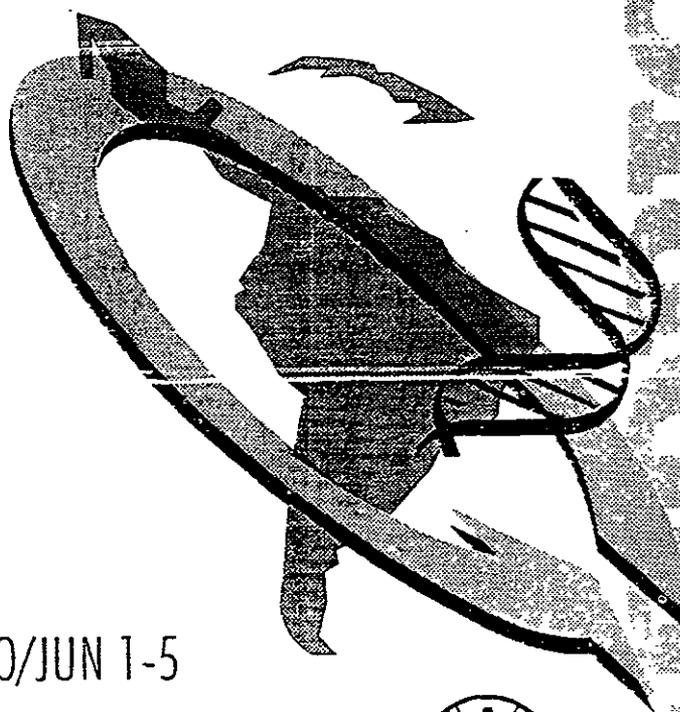
Y.B. participated in this study for the memory of the late Mr. Avner Bashan from Israel.

References

- Arias H, Costas F (1976) Plantas medicinales. Biblioteca Práctica, Mexico
- Debergh PC, Zimmerman RH (eds)(1990) Micropropagation technology and application. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 3-4
- Díaz-Rodrigo JA, Alcaraz-Meléndez L (1987) Plant Cell Tiss Org Cult 10:39-45
- Gamborg OL, Murashige T, Thorpe TA, Vasil IK (1976) In Vitro 12: 473-478
- Martínez M (1979) Catálogos de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, Mexico
- Murashige T, Skoog F (1962) Physiol Plant 15:473-497
- Sandoval G (1982) La Damilata (*Tournefortia diffusa*, Willd) una revisión bibliográfica y experiencias en su aprovechamiento e inducción al cultivo. Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, Mexico
- Vázquez-Duhalt R, Greppin H (1987) Phytochemistry 26:885-889
- Vines RA (1960) Trees, shrubs and woody vines of the South West. Texas University Press, Austin
- Wiggins IL (1980) Flora of Baja California. Stanford University Press, Stanford
- Zar JH (1974) Biostatistical analysis. Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs, NJ

III ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL

3RD LATIN-AMERICAN MEETING
ON PLANT BIOTECHNOLOGY



JUNIO/JUN 1-5

PALACIO DE CONVENCIONES DE LA HABANA
Havana International Conference Center



TRANSFORMANDO LA AGRICULTURA

INDUCCIÓN AL ENRAIZAMIENTO DE BROTES DE DAMIANA (*Turnera diffusa*) *In vitro*

L. Alcaraz-Meléndez; S. Real-Cosío; A. Rubluo

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR), Biología Experimental, La Paz, Baja California Sur; Instituto de Biología, Jardín Botánico Exterior, UNAM, México D.F., México

La damiana es un arbusto de la familia de las Turneraceas, se encuentra localizada en el ecosistema denominado Selva Baja Caducifolia, es decir crece en condiciones semi-áridas. Esta planta tiene importancia socio-económica debido a que sus hojas se emplean en la industria como saborizante de licor y como bebida de infusión. En la medicina tradicional se emplea como diurético, estimulante nervioso y afrodisiaco, principalmente. A pesar de su uso comercial la única fuente de producción son las plantas silvestres, debido a que no se pueden germinar las semillas en condiciones de laboratorio. En trabajos anteriores hemos reportado las condiciones para la propagación de damiana, *pc.* medio de cultivo de tejidos, el objetivo de este trabajo fué probar diferentes auxinas aplicadas en concentraciones de 10^{-6} M y 10^{-7} M, para mejorar el enraizamiento de brotes desarrollados en el medio Murashige y Skoog, adicionado con Bencil amino purina (BA) 10^{-5} M. Las auxinas probadas fueron Acido Indol Acético (AIA), alfa y beta Acido Naftalen Acético (NAA) y Acido Indol Butírico (AIB). Se probaron 50 brotes por tratamiento. Los resultados obtenidos después de 150 días mostraron, el 99% de enraizamiento en brotes sin hormonas, en brotes con beta NAA 10^{-6} M y AIB 10^{-7} M. El enraizamiento en brotes tratados con AIA 10^{-6} M fue del 100%. De acuerdo con los resultados obtenidos se observa que en general el porcentaje de enraizamiento es alto y la aplicación de AIA 10^{-6} M indujo el mayor porcentaje de enraizamiento de brotes de damiana *in vitro*.