

00345



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO

4

ESTUDIO COMPARADO DE LA PRODUCCIÓN DE
METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Hippocratea excelsa* Kunth
(HIPPOCRATEACEAE), EN CONDICIONES *in vivo* E *in vitro*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

(BIOLOGIA VEGETAL)

P R E S E N T A:

JOSEFINA HERRERA SANTOYO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA CRISTINA PEREZ-AMADOR BARRON

MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias, UNAM con la dirección de la Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón, y en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Ing. Agrónoma Teresa de Jesús Olivera Flores, dentro del programa de Formación y Superación del Personal Académico de la UNAM bajo el estatus de becaria y con el auspicio del Programa de Apoyo a la División de Estudios de Posgrado (PADEP).

A mi Madre

Agradecimientos

Directora de Tesis

Dra. María Cristina Pérez-Amador Barrón

Facultad de Ciencias, UNAM

Asesora del Cultivo de Tejidos Vegetales

Ing. Agrónoma Teresa de Jesús Olivera Flores

Facultad de Química, UNAM

Sinodales

Dr. Victor Manuel Chávez Ávila

Instituto de Biología, UNAM

Dr. José Waizel Bucay

Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, IPN

Dr. Leovigildo Quijano

Instituto de Química, UNAM

Dr. Guillermo Delgado Lamas

Instituto de Química, UNAM

Dra. Ana Laura López Escamilla

Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

M. en C. José Luis Villarruel Ordaz

Facultad de Ciencias, UNAM

Al Biólogo José Luis Contreras Jiménez por el gran apoyo botánico y disposición al trabajo.

A las personas del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Química, por haberme hecho parte de su equipo.

Y a todos mis compañeros y amigos que estuvieron colaborando conmigo y a veces a pesar de mí, en todas y cada una de las diferentes etapas del proceso.

ÍNDICE

Abreviatura.....	1
Resumen	2
1. Introducción.....	4
Objetivos	8
2. Antecedentes	9
2.1 Distribución geográfica.....	9
2.2 Ubicación taxonómica y descripción de la especie.....	9
2.3 Usos en la medicina tradicional	14
2.4 Antecedentes Farmacológicos	15
2.5 Antecedentes Químicos	17
2.6 Antecedentes de Cultivo de Tejidos	21
3. Materiales y Métodos.....	26
3.1 Material biológico.....	26
3.2 Métodos.....	29
3.2.1 Del Cultivo de Tejidos Vegetales.....	31
3.2.2 Ensayos de germinación <i>in vivo</i>	44
3.2.3 Del análisis fitoquímico.....	46
4. Resultados y Discusión.....	49
4.1 Material biológico.....	49
4.2 Cultivo de tejidos vegetales.....	49
4.3 Ensayos de germinación <i>in vivo</i>	71
4.4 Análisis fitoquímico	75
5. Conclusiones.....	81
5.1 Recomendaciones.....	83
Anexo I	85
Anexo II.....	88
Bibliografía.....	89

ABREVIATURAS

AIA	Ácido Indolacético
ANA	Ácido Naftalenacético
2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
AIB	Ácido Indolbutírico
BAP	Bencilaminopurina
MS	Murashige y Skoog (1962)
WPM	Woody Plant Medium, Lloyd y McCown (1981)
MCPP	Ácido 2-metil-4-clorofenoxipropiónico
AG ₃	Ácido giberélico
Dicamba	Ácido 2-metil-3,6-diclorobenzoico
H	Medio Heller (1953)
PF	Peso Fresco
PS	Peso Seco
TRC	Tasa Relativa de Crecimiento
TD	Tiempo de Duplicación
ND	Número de Duplicaciones
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución

RESUMEN

Una especie utilizada en México por tener importancia medicinal, es la llamada "cancerina" (*Hippocratea excelsa* Kunth), especie de distribución restringida en el país, y de la cual es utilizada tanto la corteza del tallo como la de la raíz, situación que hace que la especie sea devastada de sus ambientes naturales. Por esta razón es importante implementar estudios que ayuden a conservar las poblaciones en su lugar de origen así como también encontrar métodos que hagan posible obtener los compuestos que la planta produce y que tienen diferentes aplicaciones farmacológicas potenciales como lo es la friedelina que tiene actividad insecticida antiulcérica y anti-inflamatoria, o el transpoli-isopreno (del tipo de la guta) por tener importancia comercial.

El presente estudio tiene los siguientes objetivos:

- Determinar qué explante de *Hippocratea excelsa* Kunth, es el que da mejores resultados para la obtención de tejido indiferenciado (callo).
- Establecer cultivos de células en suspensión.
- Determinar la presencia de **friedelina** en callo así como en células en suspensión, mediante técnicas cromatográficas.
- Analizar comparativamente la producción de friedelina tanto de tejidos obtenidos bajo condiciones de cultivo *in vitro* y a partir de material silvestre.
- Proponer alternativas metodológicas para la utilización y conservación de la especie.

Para el cumplimiento de los objetivos, se realizaron tres recolectas con la finalidad de encontrar el explante adecuado para la inducción y establecimiento de los cultivos *in vitro* que permitiera obtener los cultivos celulares en suspensión y la micropropagación de la especie. Se probaron diferentes variaciones en el método de esterilización, así como también diferentes medios nutritivos: Murashige y Skoog, Heller y Lloyd y McCown.

Se hicieron diferentes pruebas de germinación, así como ensayos para lograr el establecimiento de las plántulas en diferentes substratos y se determinaron las condiciones de aclimatización de las mismas al invernadero.

De explantes de semillas se obtuvieron los crecimientos celulares (callos), que permitieron establecer los cultivos de células en suspensión. Se realizaron las mediciones de peso fresco y peso seco para obtener la cinética de crecimiento de los cultivos de células en suspensión.

De los ensayos *in vivo*, se encontró que la temperatura óptima de germinación fue de 30 °C, el tiempo de germinación de 7 días y el mejor substrato para el desarrollo de plántulas en invernadero fue una mezcla de agrolita y germinasa (1:3), se observó también que un factor limitante para el establecimiento de las plantas en el invernadero es la humedad. Se lograron establecer 15 plantas en invernadero que sirvieron como fuente de explantes para los ensayos *in vitro*.

En los ensayos *in vitro*, la semilla fue el órgano que se utilizó como explante para la inducción de callo y el establecimiento de cultivos de células en suspensión debido a que por problemas de contaminación, no fueron útiles los explantes obtenidos del material de campo. De las plantas crecidas en invernadero se utilizaron hojas y brotes como explantes, lográndose obtener callo de ambos órganos.

Para el análisis fitoquímico se realizaron extracciones hexánicas de hoja, tallo y raíz de plantas silvestres, así como también de los cultivos de callo, de los cultivos de células en suspensión así como del medio nutritivo en el que crecieron.

A través de la comparación con una muestra estándar por cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), se determinó la presencia de friedelina en los extractos obtenidos.

En el análisis químico se observó que, de la planta en su hábitat natural, la friedelina sólo se encuentra en la corteza de la raíz en muy bajas concentraciones, por lo que se hizo necesaria su determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución. De los callos, así como también de los cultivos de células en suspensión y de los medios nutritivos en los que ambos cultivos crecieron, se pudo demostrar la presencia de ese compuesto, por lo que se puede concluir que la obtención de la friedelina por medio de esta técnica resulta factible.

1. INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales poseen algunas características de gran importancia para el hombre, entre éstas se pueden identificar propiedades por las cuales han sido utilizadas por diferentes culturas. Dichas propiedades han cambiado incluso el curso de la historia, y han repercutido en distintos aspectos de la vida del hombre, tales como: la alimentación, la construcción, la vestimenta, la ornamentación, en el aspecto religioso y también en un uso medicinal, por lo que es importante el estudio y la conservación de estas especies.

Cabe mencionar que el uso medicinal de las plantas, ha sido manejado por el hombre desde los inicios de la civilización; la adquisición de esta información a través del conocimiento empírico, le ha permitido utilizar su entorno para su propio beneficio.

El mantener a estas especies en sus ambientes naturales se hace cada vez más difícil, ya que los ecosistemas se han visto alterados, por un lado debido a las necesidades de espacio para viviendas y/o cultivos y, por otro lado, por el uso indiscriminado de especies que son saqueadas de sus ambientes naturales para ser comercializadas, razón por la cual, las poblaciones no se mantienen constantes dentro de los ecosistemas.

Muchas plantas medicinales se encuentran en esta situación, principalmente las que se localizan en zonas en las que la producción agrícola depende de la estacionalidad y, si además la especie presenta un crecimiento lento, es muy factible que la población disminuya paulatinamente hasta su desaparición del ecosistema. Por esta razón es importante la implementación de nuevas estrategias que permitan la utilización de los recursos además de su conservación.

Farnsworth en 1985, mostró que cerca de la cuarta parte de todos los medicamentos prescritos en EUA son de origen vegetal (citado por Alferman y Petersen, 1995).

Lozoya (1986) menciona que por lo menos 119 compuestos obtenidos a partir de las plantas, son considerados los medicamentos más importantes en uso en todos los países industrializados, estos productos se obtienen de 91 especies, la mayoría puede ser adaptada a cultivo en prácticamente cualquier parte del mundo. Cuando se revisó el origen de estos compuestos, se observó que 88 de ellos fueron incorporados a la medicina moderna como resultado de estudios dirigidos a comprobar el uso que tenían esos mismos vegetales en la medicina tradicional de los países donde fueron redescubiertas por la ciencia occidental.

Una opción para el aprovechamiento y conservación de especies es la biotecnología, que consiste en la utilización y transformación de microorganismos y células vegetales o animales para la obtención de productos benéficos para el hombre. Entre los procesos utilizados tanto en microbiología, como en la biotecnología vegetal, se halla el cultivo de células y tejidos con el cual es posible aislar grupos celulares, sintetizar compuestos de interés, hacer micromanipulaciones, fusiones de distintos grupos celulares y transformaciones genéticas específicas. En este sentido, la biotecnología brinda diferentes posibilidades para el manejo de recursos, como lo pueden ser: la propagación masiva de plantas, la obtención de plantas libres de patógenos, la generación de plantas resistentes a factores que limiten su crecimiento (sequía, salinidad, temperatura, etc.), así como también la producción de metabolitos secundarios a gran escala (Strauch, 1989).

Los metabolitos secundarios, son compuestos sintetizados por plantas y microorganismos, cuya función en el metabolismo primario es desconocida, sin embargo algunos son responsables de diferentes actividades fisiológicas en organismos

animales, siendo muchos de ellos los principios activos que se utilizan en farmacia. La compleja estructura de la mayor parte de ellos hace que a pesar de los avances científicos y tecnológicos, su síntesis sea todavía incosteable, por lo que se estima que muchos de estos compuestos continuarán obteniéndose a partir de las plantas durante algún tiempo. También es probable que el desarrollo de nuevos métodos para el crecimiento de cultivos de células vegetales a gran escala en los que se puedan obtener metabolitos secundarios, y el descubrimiento de nuevos compuestos biológicamente activos a partir de especies aún no estudiadas, influyan notablemente en el desarrollo de la industria química basada en productos naturales, de aquí que sea necesario incrementar la producción de los compuestos vegetales *in vitro* por encima de los niveles alcanzados por estos organismos en condiciones naturales y por otro lado preservar el inventario químico de las mismas.

El análisis químico de las plantas medicinales, abre la posibilidad de completar el estudio de los compuestos biológicamente activos previamente determinados, así como de aquellos que no han sido aislados y que puedan tener actividad biológica de interés.

Entre la gran cantidad de plantas medicinales usadas en México, *Hippocratea excelsa* Kunth conocida como "cancerina" es una especie que tiene una distribución restringida en el país, y de la cual se utiliza la corteza del tallo y de la raíz (ésta última con mayor frecuencia), situación que hace que la especie sea devastada de sus ambientes naturales. La forma de crecimiento de la especie, la utilización que de ella hace el hombre, la restricción en la distribución así como el escaso número de individuos que se han observado en las diferentes recolectas, han hecho reflexionar en la problemática de establecimiento y permanencia que esta especie tendrá en un futuro próximo dentro de los ecosistemas.

Por las razones antes expuestas, se justifica la realización del presente estudio, en aras de la protección de la especie y para proponer métodos que hagan posible obtener

en el laboratorio mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales, los compuestos que la planta produce. En este estudio se dio particular énfasis a la friedelina que ha probado tener diferentes actividades farmacológicas como lo son la insecticida, la anti-inflamatoria y la antiulcérica.

OBJETIVOS

- Determinar qué explante de *Hippocratea excelsa* Kunth, es el que da mejores resultados para la obtención de tejido indiferenciado (callo).
- Establecer cultivos de células en suspensión.
- Determinar la presencia de friedelina en callo y células en suspensión, mediante técnicas cromatográficas.
- Analizar comparativamente la producción de friedelina tanto de tejidos obtenidos bajo condiciones de cultivo *in vitro* y a partir de material silvestre.
- Proponer métodos alternativos para la utilización y conservación de la especie.

2. ANTECEDENTES

2.1 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La distribución geográfica de *Hippocratea excelsa* está restringida a México y Centroamérica. En México se ha localizado en los estados de: Chiapas, Durango, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Yucatán (Fonseca, 1995) y Puebla (López Cedeño, 1989).

El tipo de vegetación en el que se le ha encontrado, es el de bosque tropical caducifolio (Fonseca, 1995), principalmente creciendo en las orillas de los ríos.

2.2 UBICACIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

La especie *Hippocratea excelsa* es reconocida por Cronquist (1981), dentro de la familia Hippocrateaceae, mientras que Takhtajan (1997) la ubica dentro de la familia Celastraceae, los criterios que utiliza cada autor para hacer esta diferencia se presentan a continuación.

Para Cronquist (1981), el orden Celastrales, se encuentra representado por 11 familias:

- 1.- Geissolomataceae (1)
- 2.- Celastraceae (800)
- 3.- Hippocrateaceae (300)
- 4.- Stackhousiaceae (20-25)
- 5.- Salvadoraceae (12)
- 6.- Aquifoliaceae (300+)
- 7.- Icacinaceae (400)
- 8.- Aextoxicaceae (1)
- 9.- Cardiopteridaceae
- 10.- Corynocarpaceae (5)

1.- Dichapetalaceae (200)

Algunas de las características del orden son las siguientes:

Celastrales Wettstein 1907

Plantas autotróficas, terrestres, leñosas o algunas veces herbáceas frecuentemente producen algún tipo de alcaloide, con o más frecuentemente sin proantocianinas y sólo algunas veces con ácido elágico o compuestos iridoides.

La diferencia entre las Celastraceae y las Hippocrateaceae las señala en la siguiente clave:

Disco intraestaminal, o los estambres puestos en el disco, o rara vez el disco extraestaminal, estambres 4-5 (-10), semillas frecuentemente con endospermo, plantas con un sistema de látex o frecuentemente sin él; semillas frecuentemente ariladas
.....CELASTRACEAE

Disco extraestaminal, estambres (2) 3 (-5), semillas sin endospermo, plantas generalmente con un buen desarrollado sistema de látex bien desarrollado
.....HIPPOCRATEACEAE

En cuanto a la química de las familias, el autor menciona que las Celastraceae presentan células taníferas, que contienen proantocianinas y sólo algunas veces ácido elágico, algunas veces son saponíferas, frecuentemente con aminas, alcoholes tales como catina y rara vez cianogénicos y sin compuestos iridoides. Mientras que las Hippocrateaceae presentan células taníferas, pero aparentemente carecen de proantocianinas y sólo algunas veces son saponíferas.

Para Takhtajan (1997), el orden Celastrales está representado por 4 familias, para este autor la familia Hippocrateacea que reconoce Cronquist, está incluida como una subfamilia dentro de la familia de las Celastraceae, las cuatro familias son:

- | | | |
|---------------------|------------|---|
| 1. Goupiaceae | | |
| 2. Celastraceae | Subfamilia | Celastroideae
Tripterygoideae
Cassinoideae
Hippocrateoideae
Siphonodontoideae |
| 3.- Lophopyxidaceae | | |
| 4.- Stackhousiaceae | | |

Las características del orden Celastrales según Baskerville (1839) en el sistema de clasificación de Takhtajan (1997) son las siguientes.

Árboles arbustos o lianas leñosas, algunas veces hierbas perennes. Frecuentemente con laticíferos en el tallo y hojas. Vasos en su mayor parte con divisiones (Celastraceae) o exclusivamente perforaciones escaliformes (Goupiaceae). Elementos de tubo criboso con plastidios de tipo S. Nudos uniloculares. Hojas alternas u opuestas, simples, usualmente enteras, con estípulas pequeñas o sin estípulas. Estomas anomocíticos. Flores en cimas terminales o axilares o menos frecuentemente inflorescencias racemosas, raramente solitarias en las axilas, pequeñas, verdosas o blanquecinas, bisexuales o unisexuales, actinomorfas, usualmente tetrámeras o pentámeras. Sépalos libres o connados en la base, usualmente imbricados. Pétalos libres o más o menos connados, imbricados o menos frecuentemente torcidos o valvados, raramente ausentes. Androceo haplostémoneo con estambres antisépalos o (en pocas Celastraceae) diplostémoneo. Anteras tetrasporangiadas con dehiscencia longitudinal, comunmente introrsas. Tapetum secretor. Microsporogénesis simultánea. Granos de polen binucleados o trinucleados usualmente tricolporados. Disco nectarífero bien desarrollado frecuentemente mas o menos adnado al ovario. Gineceo de 3-5 ó rara vez 2

carpelos unidos con estilo terminal usualmente corto o estilodio libre (Goupiaceae); ovario súpero o rara vez semi-inferior, (1) 2-5 loculado, con (1) 2 ó algunas veces más de 6 óvulos (numerosos en Goupiaceae) en cada lóculo. Óvulos anátropos, apótopos o raramente epítropos, bitégmicos, crasinucelares o tenuinucelares, frecuentemente con endotelio. Gametofito femenino de tipo *Polygonum*, Endospermo nuclear. Frutos cápsulas loculicidas, samaras, drupáceos, o cápsulas indehiscientes separándose en mericarpos indehiscientes secos. Semillas con exotegumento fibroso, embrión grande y recto, endospermo usualmente abundante y más o menos aceitoso o menos frecuentemente ausente.

De acuerdo a Takhtajan (1997) las características descriptivas de la familia Celastraceae son:

Árboles, arbustos o lianas leñosas. Vasos con perforaciones simples o (en algunas Celastraceae) escaliformes. Fibras con perforaciones simples o bordeadas frecuentemente septadas. Hojas alternas u opuestas, con estípulas pequeñas cáducas o sin estípulas; venación no transversal. Flores en inflorescencia cimosa o raramente racemosa, pocas veces solitarias, usualmente verdosas o blancas, bisexual o menos frecuentemente unisexuales, usualmente tetra- a pentámeras, disco nectarífero bien desarrollado intraestaminal o extraestaminal (Hippocrateoideae), frecuentemente cupular, adnado al ovario, algunas veces formando un androginóforo corto, muy raramente ausente (como en *Campylostemon*); sépalos libres o basalmente connados, en su mayor parte imbricados en el botón; pétalos usualmente libres, imbricados o raramente torcidos o valvados, raramente ausentes, no muy largos y claramente inflexos en el botón; estambres (2) 3-5 (8-10), antipétalos, anteras extrorsas o introrsas. Granos de polen tricolporados algunas veces (como en *Siphonodon*) triporados, en su mayor parte reticulados. Gineceo de 2-5 carpelos, con estilo comúnmente corto; estigma capitado o algunas veces 2-5 lobado, raramente sólo 1 lóculo desarrollado, con (1) 2-10(-15) óvulos por lóculo. Óvulos anátropos, apótopos o muy raramente epítropos (*Tripterygium*),

crasinucelado a tenuinucelado, con endotelio. Frutos cápsulas, sámaras, bayas o drupas. Semillas mas o menos envueltas por un arilo originado del integumento cerca del funículo con abundante endospermo mas o menos aceitoso, o menos frecuentemente sin endospermo embrión con radícula corta o diminuta. $x = 12, 16 + \dots$ CELASTRACEAE.

La descripción de la especie trabajada, es la siguiente:

Hippocratea excelsa Kunth, In: Humb., Bonpl. & Kunth, Nov. Gen. Sp. 5:139. 1821.

Tipo: México, Guerrero, Mazatlán, A. Humboldt y A. Bonpland 3933 (P).
(microficha MEXU)

Arbustos o árboles delgados hasta de 10 m de altura; tallos delgados, ramas y ramillas grisáceas y cerosas. Hojas de color verde olivo en fresco y verde grisáceo cuando secas, oblongo-elípticas, obovadas, o estrechamente obovadas, de 6 a 14 cm de largo y 3 a 7.5 cm de ancho, delgado cartáceas o delgado-coriáceas, vena media prominente en el haz y envés, con 5 a 9 pares de nervaduras secundarias, oscuramente anastomosadas cerca de los márgenes, en ocasiones poco prominentes en el haz, prominentes en el envés, las venillas planas o impresas en el haz, ligeramente prominentes en el envés, puberulentas cuando jóvenes en ocasiones poco persistentemente así, ápice redondeado, obtuso, cuspidado o rara vez mucronado, margen entero a levemente crenulado o crenado serrado, (2 a 3 crenaciones en 1 cm), en ocasiones revoluto, base redondeada o subatenuada, frecuentemente decurrente sobre el pecíolo; pecíolos delgados, canaliculados de 5 a 12 mm de largo. Inflorescencias ramificadas dicotómicamente, axilares, en ocasiones en grupos de 4 a 6 en los ápices de ramas sin hojas, aparentando grandes panículas terminales, sobre pedúnculos de 1 a 4 cm de largo, pedúnculo y ramas de la inflorescencia glabrescentes; brácteas ovadas u ovado oblongas de 1 a 1.5 mm de largo; bractéolas 2 ó 3 por cada flor, de aproximadamente 0.5 mm de largo; pedicelos 1 a 5 mm de largo. Flores de 7 a 10 mm de diámetro en la antesis; sépalos verdes, ovados, deltados, o semiorbiculares, de 1 a 1.5

mm de largo y 0.9 a 2 mm de ancho, submembranosos a carnosos, puberulentos por fuera, en ocasiones glandular punteados o lineolados, ápice subagudo, margen entero o finamente eroso; a veces escorioso; pétalos verdes, o verde amarillentos, oblongos, elíptico-oblongos, de 3 a 5 mm de largo y 2 a 3 mm de ancho, delgados, carnosos o submembranosos, glabros, ápice redondeado u obtuso, margen entero, en ocasiones revoluto, base truncada; disco anular, pulvinulado de 2 a 3 mm de diámetro y 0.5 a 1.3 mm de alto; filamentos 0.8 a 1.8 mm de largo y 1.3 a 1.5 mm de ancho en la base, anteras de 0.3 a 0.6 mm de alto y 0.7 a 1.1 mm de ancho; ovario verde oscuro, de 1 a 1.3 mm de diámetro, glabro, estilo de 0.5 a 1.5 mm de largo. Fruto lobulado un tercio o hasta dos tercios de su longitud, lóbulos elípticos a ampliamente ovoides, de 4 a 6 cm de largo y 3.5 a 6 cm de ancho, emarginados en el ápice, margen entero y adelgazado, dehiscencia longitudinal; pericarpo verde a verde amarillento, flabelado-costado por fuera y liso por dentro. Semillas 6 a 7 por lóbulo, ala obovado elíptica, ligeramente falcada, 3.5 cm de largo y 1.5 cm de ancho (Fonseca, 1995).

2.3 USOS EN LA MEDICINA TRADICIONAL

La corteza pardo rojiza de la "cancerina" se vende en muchos mercados nacionales debido a las múltiples propiedades curativas que se le atribuyen; los usuarios la emplean para el tratamiento de varias enfermedades entre las que destacan: afecciones de la piel, úlcera gástrica, padecimientos renales, amenorrea e infecciones uterinas. En todos los casos se prepara una infusión a partir de la corteza machacada, sola o combinada con otras hierbas medicinales; esta infusión es consumida diariamente hasta por períodos de tres meses (Bye, 1988 en López Cedeño, 1989). También se considera un insecticida muy efectivo, de ahí el sobrenombre de matapiojo.

De otra especie de la misma familia, se encontró también un uso en la medicina tradicional. Bhima y col. en 1990 dieron a conocer que el polvo o la decocción de hojas y corteza de *Pristimera grahamii* A. C. Smith, es utilizada en la India, por las tribus de

Maharashtra para aliviar la tos crónica, dolores de articulaciones, enfermedades urinarias así como enfermedades de la piel.

Otra especie relacionada, con uso en la medicina tradicional de Mozambique es *Salacia kraussii*, la cual es utilizada contra la disentería (Figuereido y col. 1998).

Las hojas de *Maytenus ilicifolia* Martius y *M. aquifolium* Martius conocidas como "Espinheira santa", son utilizadas en programas de salud en Brasil, como alternativa a las costosas drogas sintéticas antiulcéricas, por su probada actividad contra la gastritis y la úlcera gástrica (Vilegas y col, 1998).

2.4 ANTECEDENTES FARMACOLÓGICOS

Se han reportado algunos ensayos farmacológicos, en los cuales han sido empleados extractos alcohólicos de *Hippocratea excelsa*; los resultados obtenidos se presentan en el cuadro No. 1.

CUADRO No. 1 RESULTADOS DE ALGUNOS ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE LA CORTEZA SECA DE *Hippocratea excelsa*.

ACTIVIDAD	EXTRACTO UTILIZADO	Resultados	Referencia
Antiamibiótica	Extracto etanólico 95 % en <i>Entamoeba histolytica</i>	Inactivo	Heinrich y col., 1992
Antiinflamatoria	Extracto etanólico 95 % Intragástrica en ratas macho Dosis 100 mg/kg.	Activo	Pérez y col., 1995
Inhibición de hemólisis	Extracto etanólico 95 % en ratas, dosis 25µg/ ml	Activo	Pérez y col. 1995
Antiespasmódica	Extracto etanol acuoso 1:1 en conejillo de indias	Activo	Dhawan y col.,1977
Antitumoral	Extracto etanol acuoso 1:1 en células Leuc-P388 de ratones	Activo	Dhawan y col.,1977
Diurética	Extracto etanol acuoso 1:1 en rata macho a una dosis de 0.185 mg/kg	Activo	Dhawan y col.,1977

(Banco de datos NAPRALERT información obtenida en el año 1997)

Abbassy y col. 1977 citados por López Cedeño (1989), mencionan que la presencia de friedelina en esta planta podría estar relacionada con la actividad anti-alimentaria en insectos, encontrada bajo condiciones *in vitro*.

Brüning y Wagner, (1978) citados por López Cedeño (1989), mencionan que la friedelina y compuestos relacionados han sido considerados para el tratamiento de cáncer de uréter, convulsiones, inflamaciones, úlceras de la piel, inflamaciones de origen reumático, fiebre y disentería.

Sánchez (1991), así mismo encuentra que el alto contenido de trans-poli-isopreno en la corteza de la planta podría estar relacionado con su uso como agente antiulceroso.

Popoca y col (1998), probaron la actividad del extracto de éter de petróleo de la raíz de cancerina, en tres líneas celulares derivadas de tumores cancerosos, KB (carcinoma nasofaríngeo), HCT-15 COLADCAR (carcinoma de colon) y SQO-1-UIISO (carcinoma escamoso de cerviz) y encontraron que el extracto fue activo ante las tres

líneas celulares, siendo la línea de carcinoma de colon en la que se observó una mayor respuesta.

De *Pristimera grahamii*, una especie relacionada con *Hippocratea excelsa*, Sukumar y col. (1991) reportaron que la actividad analgésica, anti-inflamatoria y antipirética en ratones, así como la mediana actividad bactericida contra bacterias del grupo Gram positivo, encontradas en el extracto clorofórmico de hojas de esta especie, se pueden deber a uno o una combinación de triterpenos del tipo de los friedelanos.

De *Salacia kraussii* Figueredo y col. 1998 aislaron pristimerina que mostró tener actividad antimalárica.

El extracto etanólico de tallos de *Celastrus hindssi* Benth fue probado contra células de hepatoma (HEPA-2B) de carcinoma de colon (COLO-205), de carcinoma de cerviz (HELA) y de células de carcinoma nasofaríngeo (KB) y mostró tener una potente actividad citotóxica contra todas estas líneas celulares (Kuo y Kuo, 1997).

2.5 ANTECEDENTES QUÍMICOS

En la bibliografía consultada se encontraron pocos estudios químicos acerca de *Hippocratea excelsa*, sin embargo existen un número considerable de estudios de otras especies de este género y de géneros afines, como *Pristimera* y *Salacia* de la familia Hippocrateaceae y los géneros *Maytenus*, *Gymnosporia*, *Celastrus* y *Tripterygium* de la familia Celastraceae.

López Cedeño en 1989 aisló e identificó de *Hippocratea excelsa*, seis metabolitos, cuatro de ellos triterpenos pentacíclicos del tipo friedelano: la friedelina, canofilol, canofilal y el ácido canofilico, β -sitosterol y poli-isopreno del tipo de la guta, el autor menciona también que el alto contenido de este último compuesto en *Hippocrateen excelsa*,

es mayor al contenido de caucho en *Parthenium argentatum* Gray. (guayule) y al contenido de guta en otras especies.

Mata y col. en 1990, aislaron de la corteza de raíz y tallo de *Hippocratea excelsa* tres alcaloides sesquiterpénicos: hippocrateína I, hippocrateína II y emarginatina A. Éste es el primer trabajo en el que se reportó la presencia de alcaloides en la familia de las Hippocratéaceas y sugiere una relación estrecha con la familia de las Celastráceas.

Calzada y col. en 1991, también de *Hippocratea excelsa* obtuvieron de la corteza de tallo y de la raíz quinonas triterpénicas, tingenona, celastrol, pristimerina y excelsina, que probaron contra *Artemia salina*, siendo activas la tingenona, el celastrol y la pristimerina.

De algunos estudios químicos que se han realizado sobre *Hippocratea excelsa*, se aislaron y caracterizaron diversos compuestos, que se enlistan en el cuadro No. 2.

CUADRO No. 2 ALGUNOS COMPUESTOS QUÍMICOS PRESENTES EN CORTEZA DE TALLO Y RAÍZ DE *Hippocratea excelsa*

NOMBRE	GRUPO	RENDIMIENTO %	Referencia
Canofilol	Triterpeno	0.02101	Calzada y col., 1991
Canofilal	Triterpeno	0.013633	Calzada y col., 1991
Ácido Canofílico	Triterpeno	0.00152	Calzada y col., 1991
Celastrol	Triterpeno	0.0049	Calzada y col., 1991
Excelsina	Triterpeno	0.00112	Calzada y col., 1991
Friedelina	Triterpeno	0.00157	Calzada y col., 1991
Pristimerina	Triterpeno	0.00126	Calzada y col., 1991
Tingenona	Triterpeno	0.00242	Calzada y col., 1991
Hippocrateína I	Alcaloide sesquiterpénico	0.00577	Mata y col., 1990
Hippocrateína II	Alcaloide sesquiterpénico	0.0009	Mata y col., 1990
Hippocrateína III	Alcaloide sesquiterpénico	0.001	Calzada y Mata, 1995
Mayteína	Alcaloide sesquiterpénico	0.0005	Calzada y Mata, 1995
Trans-poliisopreno	Poliprenoide	9.87719	Palacios y col., 1989

(Banco de datos NAPRALERT, información obtenida en 1997).

A partir de la parte aérea de *Hippocratea celastroides* Kunth, González y col. en 1989 aislaron friedelina, epifriedelinol, 3-oxo-lup-20-en-30-ol y el lup-20-en-3 β ,30-diol.

Figueredo y col. (1998), aislaron de raíces de *Salacia kraussii* (Harv.) Harv., quinonas, celastrol, pristimerina e isoiguesterol.

Bhima y col. en 1990 lograron aislar de la corteza de raíz de *Pristimera grahamii*, pristimerina y dulcitol y de hojas $\Delta^{5,25}$ estigmastadien-3 β -ol, pristimeronol y eritrodiol. De raíces de esta misma especie Sukumar y col. (1990) aislaron y caracterizaron: friedelan-2 α ,3 α ,28 triol, friedelina, epi-friedelinol, canofilol, α -amirina, β -amirina, paquisandioliol-A, 3 α -hidroxifriedelan-2-ona y friedelan-3 α ,28-diol.

González y col. (1997), caracterizaron de cinco especies de *Maytenus*, así como de *Orthosphenia mexicana* y de *Rzedowskia tolatonguensis*, sesquiterpenos con esqueleto de dihidro- β -agarofurano (5,11-epoxi-5 β ,10 α -eudesm-4(14)-eno), los cuales son considerados como marcadores taxonómicos de la familia Celastraceae.

Corsino y col. (1998), aislaron y caracterizaron de *Maytenus aquifolium* Martius, alcaloides sesquiterpénicos piridínicos, las aquifoliuninas E-I y E-II.

De *Maytenus aquifolium* Martius, Vilegas y col. (1999), aislaron los flavonoides quercetina y kaempferol, además de los triterpenos friedelan-3-ol y friedelina, que se han considerado marcadores útiles para diferenciar *M. aquifolia* (Celastraceae) de *Sorocea bomplandii* Baill (Moraceae), especie con una estrecha relación morfológica pero diferente composición química.

Alvarenga y col. (1999), aislaron de *Maytenus catingarum* Reiss, una quinona nortriterpénica la 15 α -hidroxy-21-ceto-pristimerina, este tipo de quinonas son compuestos aislados exclusivamente de las familias Celastraceae e Hippocrateaceae y

son considerados como marcadores taxonómicos, además encontraron pristimerina y tingenona.

Chávez y col. (1998), caracterizaron de *Maytenus amazonica* C. Martius, siete triterpenos fenólicos y dos nortriterpenos quinónicos. Los triterpenos aromáticos y quinoides constituyen un grupo pequeño de D:A-friedo-nor-oleanos insaturados y oxigenados. Estos pigmentos nortriterpenoides están restringidos a la familia Celastraceae (incluyendo a las Hippocrateaceae); aislaron también, pristimerina, tingenona, celastrol, netzahualcoyeno, blefarodol, 6-oxo-pristimerol, 6-oxo-tingenol y dos derivados del tingenol.

Chávez y col. (1999a), obtuvieron de *Maytenus macrocarpa* Briq., tres ésteres sesquiterpénicos polioles, lupeol, friedelina y epifriedelinol, además del carotenoide luteína.

Chávez y col. (1999b), encontraron en *Maytenus amazonica*, cinco nortriterpenos relacionados con la tingenona, además de pristimerina, tingenona, celastrol, netzahualcoyeno, blefarodol, 6-oxo-pristimerol, 6-oxo-tingenol.

Hussein y col. (1999), reportaron de *Maytenus senegalensis* metilepigalocatequina, glucopiranosido metil galocatequina, epicatequina.

Avilla y col. (2000), aislaron de *Maytenus sp.* pristimerina, tingenona y 20 α -hidroxitingenona.

Kuo y Kuo (1997), encontraron de *Celastrus hindsii* Benth., maytenfolona A, celasdina B y C, friedelina y canofilol.

Pistelli y col. (1998), identificaron de *Gymnosporia senegalensis* var. *spinosa* (Celastraceae); β -sitosterol, β -amirina derivados del lupeno, n-triacontanol, epigalocatequina, dulcitol, pigmentos quinoides, L-estaquidrina y dos cumarinas; escopoletina y preniletina.

Takaishi y col. (1997), obtuvieron de *Tripterygium wilfordii* var. *regelii* Makino, los triterpenos, regeol A, B y C, wilforol, ácido salaspérmico, ácido ortofénico, celastrol, y ácido dulcioico.

Duan y col. (1997), reportaron de *Tripterygium hypoglaucum* y de *Celastrus stephanotifolius*, alcaloides sesquiterpénicos del tipo de las triptofolinas, triptofordíninas, triptogelinas y celafolinas, además de tres alcaloides, hiponinas A, B y C.

Duan y Takaishi (1998), aislaron de *Tripterygium hypoglaucum*, hiponina A, B, C, 4 alcaloides piridínicos sesquiterpénicos, hipoglaunina A, B, C, y D, y 5 alcaloides sesquiterpénicos, wilfortrina, wilforina, wilforgina, wilfordina y eunimina. Y en 1999 aislaron de la misma especie los alcaloides sesquiterpénicos neoeunoimina y forestina.

Li y col. (1999), logran obtener de *Tripterygium hypoglaucum*, hipoglaunina I, wilfordina, wilfortrina, wilformina y wilformina.

Fujita y col. (2000), aislaron de *Tripterygium hypoglaucum* los terpenoides triptoquinona H, triptobenceno L, y triptohipol D, E, y F.

2.6 ANTECEDENTES DE CULTIVO DE TEJIDOS

Aunque esta técnica tiene un gran potencial de utilización y representa una alternativa para: la conservación de especies amenazadas, la obtención de plantas libres de patógenos, la obtención de metabolitos secundarios a gran escala, etc., es importante

hacer notar que para que los cultivos *in vitro* sean exitosos, se debe contar con una adecuada selección del material biológico con el cual se va a trabajar, así como de los medios nutritivos incluyendo a los reguladores de crecimiento y de las condiciones de crecimiento de los cultivos, condiciones que muchas veces son difíciles de adecuar para la producción masiva de biomasa vegetal.

En la revisión bibliográfica consultada, no se encontró información relativa a la propagación de *Hippocratea excelsa*, utilizando la técnica de cultivo de tejidos. Sin embargo en una gran cantidad de estudios de otras especies, se ha descrito la acumulación de metabolitos secundarios por técnicas de cultivo de tejidos, algunos de los cuales son compuestos muy importantes desde el punto de vista económico.

De *Tripterygium wilfordii* (Celastraceae), Nakano y col. (1997a y 1997b), aislaron de extractos de callo, tres nuevos compuestos diterpénicos del tipo del abietano y ursano y el ácido multiflorenol-29-oico. Además de tres nuevos triterpenos pentacíclicos: 1) el ácido D:B-friedolean-3-ol-5,6-epoxi-29-oico, 2) el ácido 3 α ,22 α -dihidroxi-olean-12-en-29-oico, y 3) 24,29-dinor_D:A-friedoolean_4-en-2beta,22beta-dihidroxi-3,21-dion, que fueron denominados como: ácido triptocálico C, D y triptocalina A, respectivamente y cinco triterpenos ya conocidos: ácido dulcioico, ácido maytenoico, wilforlido A, wilfolor D y ácido salaspérmico.

Estudios sobre la producción de alcaloides así como para la obtención de otros tipos de metabolitos secundarios tales como terpenos, esteroides, flavonoides, pigmentos, etc. mediante cultivo de tejidos, son muy atractivos ya que algunas de dichas sustancias han sido utilizadas como fármacos o tienen alguna otra aplicación dentro de la industria, p. e. los alcaloides de *Catharanthus roseus* (Constable y col., 1981, citado en Rout y col. 2000), la solasodina de *Solanum eleagnifolium* (Nigra y col. 1987, citado en Rout y col. 2000) los alcaloides pirrolizidínicos de *Senecio vulgaris*, *S. vernalis* y *S. crucifolius* (Toppel y col. 1987, citado en Rout y col. 2000), la cefalina y emetina de

Cephaelis ipecacuanha, (Teshima y col. 1988, citado en Rout y col. 2000), los alcaloides quinolínicos de *Cinchona ledgeriana* (Scragg y col. 1987, citado en Rout y col. 2000), la sanguinarina de *Papaver somniferum* (Park y col. 1987, citado en Rout y col. 2000), diosgenina de *Dioscorea deltoidea* (Ravishankar y Grewal, 1991, citado en Rout y col. 2000), cardenólidos de *Digitalis lanata* (Pradel y col. 1997, citado en Rout y col.2000), azaridactina y nimbina de *Azadirachta indica* (Srividya y col. 1998, citado en Rout y col. 2000), las antocianinas de *Vitis vinifera*, etc.

Carew y Krueger en 1977 (citados por Dicosmo y Towers, 1988) lograron producir en cultivos celulares de *Catharanthus roseus* los alcaloides antitumorales: vincalécoblastina y leucocristina.

Simola y Nieminen en 1988 obtuvieron, después de nueve subcultivos de líneas celulares de *Atropa belladonna*, una gran cantidad de alcaloides derivados del tropano (0.8-0.9 g/kg de peso seco).

Hatano y col. en 1988 reportaron la multiplicación clonal de plantas de *Acontium carmichaeli* y encontraron que se puede incrementar la concentración de alcaloides en una planta y que los clones que se producen de la misma, mantienen el alto contenido de alcaloides.

Zenk y col. en 1975 (citados por Dicosmo y Towers, 1988) encontraron acumulaciones de antraquinonas en cultivo de células en suspensión de *Morinda citrifolia* y que esta acumulación es diez veces mayor que en la planta.

Ikeda y col. en 1976 (citados por Dicosmo y Towers, 1988) encontraron que cultivos de células en suspensión de *Nicotiana tabacum* acumularon diez veces más ubiquinona-10 que las hojas de tabaco que crecen en forma natural.

Dicosmo y Towers, (1988), hacen una revisión de trabajos de cultivo de tejidos y reportan un grupo de compuestos producidos por estas técnicas, en cantidades comparables o excedentes a los que se encuentran en las plantas naturalmente, dentro de estos compuestos se encuentra el Acteósido obtenido de *Syringa vulgaris*, el ácido rosmarínico de *Coleus blumei*, la putrescina cafeoyl de *Nicotiana tabacum*, la serpentina de *Catharanthus roseus*, la berberina de *Thalictrum minus*, el glutation de *Nicotiana tabacum*, la diosgenina de *Dioscorea deltoidea*, la ubiquinona-10 de *Nicotiana tabacum* y la alizarina de *Morinda citrifolia*.

Enaksha y Arteca en 1993 realizaron un estudio acerca de la iniciación, optimización de crecimiento, caracterización y producción de taxol en cultivos de callos en el género *Taxus*.

Srdjan y Cornelis en 1995 analizaron la producción de piretrinas en un sistema *in vitro*, abordando algunos puntos clave sobre la producción de este compuesto, algunos de los aspectos que estudiaron fueron: la producción de piretrinas en cultivo de callos, de tallos y raíces, de células en suspensión y bioconversión de precursores como alternativas biotecnológicas a la extracción convencional de flores de algunas especies de la familia Asteraceae de las cuales se obtienen piretrinas, analizaron además el aspecto económico y control de calidad que debe reunir esta alternativa para ser redituable.

Rech y col. en 1998, obtuvieron de cultivos de callo y de células en suspensión de *Rauwolfia sellowii*, los mismos alcaloides que se encuentran en las hojas de la planta madre.

Del análisis de los estudios consultados se puede apreciar, que la producción de metabolitos secundarios *in vitro* es una alternativa biotecnológica para algunos compuestos con interés comercial.

Aún así la producción de estas sustancias en un sistema *in vitro* no se obtiene de una manera fácil, debido a que el reto es encontrar las condiciones necesarias para optimizar y estandarizar la producción de estos compuestos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

RECOLECTAS

El material biológico se recolectó en dos diferentes localidades, una de ellas se encuentra ubicada en San Miguel Teutla, Municipio de Jolalpan en el estado de Puebla, (18° 17' 21.1" 98° 56' 30.1") a 960 msnm, (localidad # 1) y la otra en el estado de Guerrero, entre San Antonio y la Estación Arroyo, Municipio de San Marcos (16° 47' 32.5" 99° 39' 31.8") a 30 msnm, (localidad # 2). En las dos zonas de recolecta se encontró vegetación derivada de bosque tropical caducifolio *sensu* Rzedowski (1984), con dos épocas características, la época de sequía y la de lluvias además de encontrarse perturbada por actividades agrícolas.

Las fechas de las recolectas fueron: de enero a marzo de 1997 en Puebla y en junio de 1997 en Guerrero.

El material obtenido fue tanto para el trabajo de laboratorio (hojas jóvenes y maduras completamente expandidas, yemas, tallos, raíces y semillas), así como algunos ejemplares que fueron determinados taxonómicamente por el Biólogo José Luis Contreras Jiménez curador del Herbario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, que se incluyeron posteriormente en la colección de esta Universidad:

Las recolectas tuvieron como finalidad, la obtención de material que sirviera como explante (porción de tejido escindido u órgano tomado de la planta para crecer en un cultivo) para el establecimiento del cultivo *in vitro*. Inicialmente se emplearon como explantes las raíces de la "cancerina", por ser el órgano en el que se ha encontrado a la friedelina y a las yemas para la micropropagación de la especie.

De la primera recolecta que se realizó en el Municipio de Jolalpan (localidad # 1) y se obtuvieron algunas raíces de dos individuos de aproximadamente 2 y 3 metros de altura, se recolectaron trozos de raíces de diferentes diámetros (1 a 4 cm), y de manera colateral se recolectaron 7 yemas axilares. Para transportarlo, el material se envolvió inmediatamente en papel absorbente húmedo y se puso en una hielera a 4° C, con la finalidad de evitar marchitamiento y en la medida de lo posible el ataque de microorganismos que pudieran dañar al tejido.

Raíces de tres individuos y frutos (lámina1: Foto 1) de un individuo se obtuvieron en la segunda recolecta, la cual fue realizada en la misma localidad (#1), una parte se requirió para el análisis químico y otra parte de las raíces, se utilizó para el cultivo de tejidos por lo que, en el campo se tomaron las siguientes medidas de precaución para contrarrestar la contaminación:

- ◆ Se eliminó, a través de un cepillado fino y cuidadoso, la mayor cantidad de tierra.
- ◆ Se enjuagó el material con agua esterilizada.
- ◆ Las raíces se rociaron con una solución acuosa del fungicida "captán"® (500 mg l⁻¹).

Los frutos y el resto de raíces se transportaron en costales de tejido abierto para facilitar el secado del material. El transporte del material para el cultivo de tejidos se realizó en las mismas condiciones de la recolecta anterior.

La tercera recolecta se realizó en el estado de Guerrero (localidad # 2), de ésta se obtuvieron hojas jóvenes y maduras, tallos y raíz de un mismo individuo para llevar a cabo el análisis químico, así como también hojas jóvenes del mismo individuo para el cultivo de tejidos. Para el transporte de este material, las hojas se colocaron en recipientes de plástico, manteniéndolas en condiciones de humedad alta y a una temperatura de 4° C

Para el transporte de raíz se trataron de mantener las mejores condiciones y evitar en la medida de lo posible, factores de estrés que pudieran repercutir en la salud y vigor del órgano, así como también evitar condiciones que pudieran favorecer los riesgos de contaminación por ataque de microorganismos, por lo que se recolectaron 4 individuos jóvenes completos de 20 a 30 cm de altura. Una vez localizados en el campo, se excavó alrededor del individuo a 30 cm de radio y a una profundidad de 40 cm, para evitar que las raíces se expusieran al aire, se colocaron las raíces de los ejemplares con su respectivo suelo, en bolsas de plástico y se transportaron al invernadero, durante el traslado las plantas fueron muy sensibles al cambio de humedad aunque se trató de mantenerla a través de un rociado constante con agua.

Ya en el invernadero se regaron cada 15 días con una solución de BAP 0.5 mg l^{-1} , para estimular la formación de brotes.

La planta que presentó mejor aspecto y eliminó la menor cantidad de hojas se utilizó como fuente de explante para el cultivo de sus raíces *in vitro*.

Cuando se obtuvieron las raíces se observó que se encontraban en buenas condiciones, inmediatamente se aplicaron las diferentes variaciones en el método de esterilización, y se realizó la siembra en primera instancia solamente en un medio nutritivo, ya que el principal factor que se necesitaba salvaguardar era la contaminación.

Con el material obtenido de las tres recolectas, se procedió a realizar: el cultivo *in vitro*, el análisis químico y los ensayos de germinación, para el posterior establecimiento de las plántulas en condiciones de invernadero.

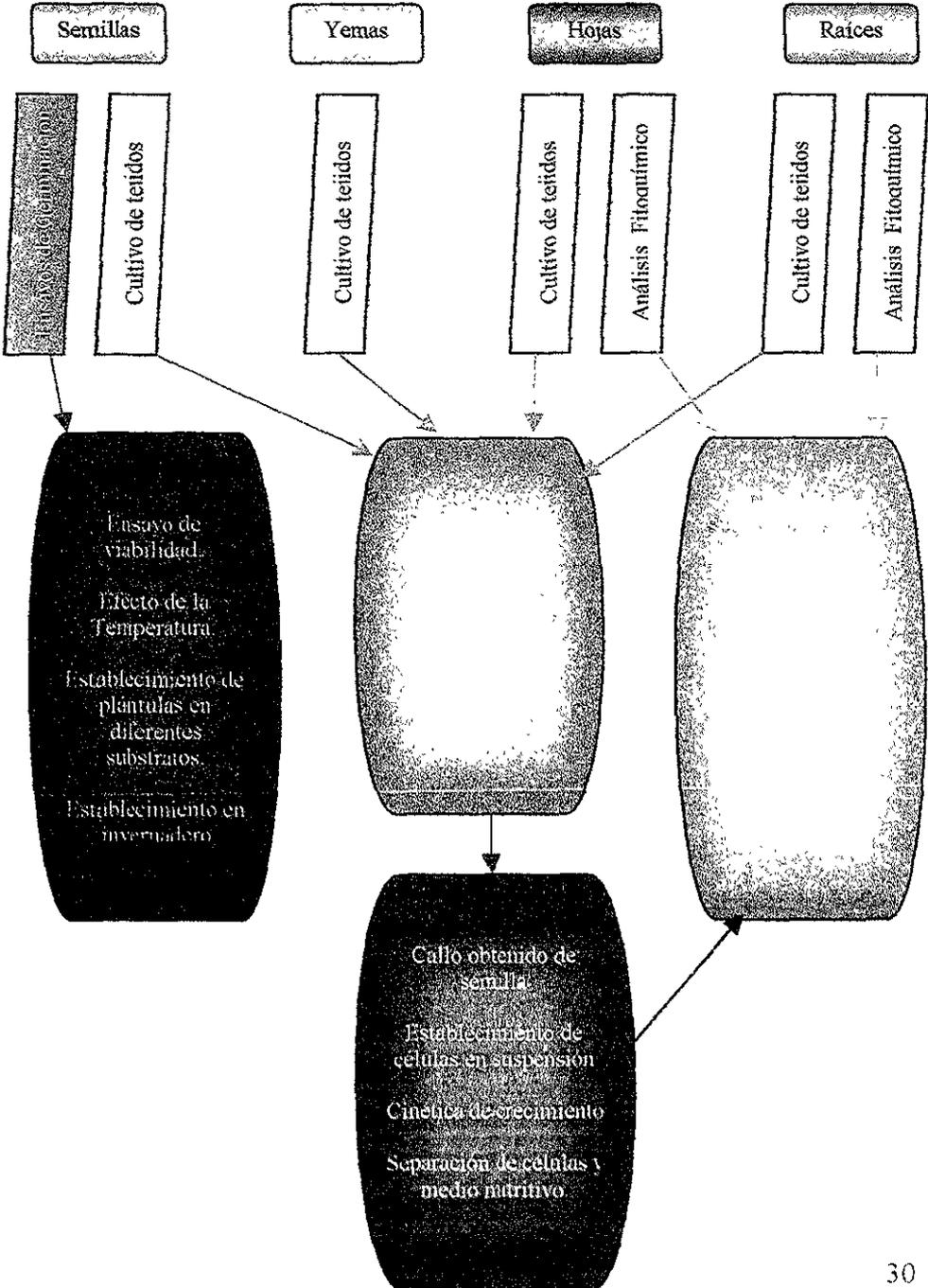
3.2 MÉTODOS

A fin de cumplir los objetivos de la presente investigación, el trabajo experimental se dividió en tres rubros, como se observa en el diagrama No. 1, los que fueron:

- 1) Cultivo de Tejidos Vegetales
- 2) Ensayos de germinación *in vivo*
- 3) Análisis Químico

DIAGRAMA No. 1

MATERIAL BIOLÓGICO



3.2.1 DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

ASPECTOS GENERALES

Los cultivos *in vitro* se llevaron a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Así mismo, las plántulas se mantuvieron en el invernadero de la misma Facultad, el cual tiene temperatura controlada de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C.

PREPARACIÓN DE MEDIOS NUTRITIVOS

Los diferentes medios nutritivos se prepararon a partir de soluciones concentradas de macro y micronutrientes de los medios MS (Murashige y Skoog, 1962), H (Heller, 1953) y WPM (Woody Plant Medium, Lloyd y Mc Cown, 1981) de acuerdo a las formulaciones que se describen en el Anexo I. Los diferentes medios fueron adicionados con vitaminas, aminoácidos y fitoreguladores, ácido ascórbico (20 mg l^{-1}) como antioxidante y sacarosa 30 g l^{-1} como fuente de carbón. El pH se ajustó a 5.7 con NaOH y/o HCl (0.01, 0.1 y 1N) y al final se adicionó gellan gum® (2.5 g l^{-1}) como agente gelificante.

Se vertieron 20 ml de medio nutritivo en frascos "gerber"®, previamente esterilizados, (durante 30 minutos a 121° C y a una presión de 1.2 bares).

Cuando se requirió de adicionar un bactericida, se utilizó claforán® (cefotaxima), el medio nutritivo se preparó de la misma manera pero antes de verterlo en los frascos, se esterilizó de la manera convencional en un matraz Erlenmeyer. Ya esterilizado el medio nutritivo y cuando alcanzó una temperatura aproximada de 40° C, bajo la campana de flujo laminar se adicionó la cefotaxima a una concentración de 0.2 mg ml^{-1} , posteriormente, se vertieron 20 ml a cada frasco esterilizado.

MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN DE LOS EXPLANTES

Las diferencias entre los métodos de esterilización que se aplicaron a los explantes, consistieron esencialmente en una variación en los tiempos de exposición y concentración de los agentes desinfectantes (en los pasos 2 y 4), en todos los métodos se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- 1.- Lavado con detergente comercial y agua corriente, durante 30 minutos
- 2.- Exposición a una solución al 10 % (v/v) de blanqueador comercial "cloralex"® (6% de cloro activo) más "microdyn"® (solución bactericida de plata coloidal 33%) 15 gotas/250 ml y Tween 20, 5 gotas/ 250 ml como agente surfactante para incrementar la capacidad de humectación del tejido; la exposición a la solución se realizó en agitación constante para evitar la formación de burbujas que impidieran el contacto de la solución con el tejido.
- 3.- Realización de tres enjuagues con agua desionizada esterilizada, 3 a 4 minutos cada uno.
- 4.- Exposición a una solución de un fungicida ("captán"®), bajo agitación constante.
- 5.- Realización de tres enjuagues con agua desionizada esterilizada, 3 a 4 minutos cada enjuague.
- 6.- Exposición a una solución de un bactericida 1 g l^{-1} de estreptomina en agitación constante a diferentes concentraciones.
- 7.- Realización de tres enjuagues con agua destilada esterilizada, 3 a 4 minutos cada uno.
- 8.- Exposición a una solución de antioxidantes de ácido ascórbico más ácido cítrico 3 mg l^{-1} de cada uno, bajo agitación constante.

Los métodos particulares se describen a continuación.

Método A

Paso 2. Tiempo de exposición a la solución de "cloralex" ®, 10 minutos.

Paso 4. Exposición a una solución de "captán"® al 0.04 %, durante 10 minutos.

Método B

Paso 2. Tiempo de exposición a la solución de "cloralex" ®, 10 minutos.

Paso 4. Exposición a una solución de "captán"® al 0.4%, 10 minutos.

Método C

Paso 2. Tiempo de exposición a la solución de "cloralex" ®, 10 minutos.

Paso 4. Se aumentó la concentración del fungicida al 0.5 %, 10 minutos.

Método D

Paso 2. Tiempo de exposición a la solución de "cloralex" ®, 20 minutos.

Paso 4. Concentración de la solución fungicida 0.5%, exposición 10 minutos.

Método E

1.- Fragmentos de 10 a 20 cm de el extremo distal de las raíces se frotaron con los dedos en una solución de detergente casero y se enjuagaron con agua corriente, durante 30 minutos.

2.- Se expusieron a una solución de "captán"® 0.3% y Agrimicina 0.1% durante 5 horas.

3.- Se realizaron tres enjuagues con agua desionizada esterilizada, de 3 a 4 minutos cada uno.

4.- Se expusieron a una solución al 10 % (v/v) de blanqueador comercial "cloralex"® más 15 gotas de "microdyn"® y cinco gotas de Tween 20 en 250 ml de agua desionizada esterilizada, durante 25 minutos.

5.- Se enjuagaron tres veces con agua desionizada esterilizada, durante tres a cuatro minutos cada vez.

6.- Exposición a una solución de antioxidantes de ácido ascórbico más ácido cítrico 3 mg l^{-1} de cada uno, bajo agitación, en la cual el tejido permaneció a temperatura ambiente, hasta realizar la siembra (1 hora).

Método F

En este caso se varió en la etapa 4 la concentración de la solución y el tiempo de exposición con respecto al método D, la solución de hipoclorito de sodio, se preparó al 20 % y el tiempo de exposición fue de 1 hora bajo agitación constante.

Método G

En este caso a diferencia del método E, se incrementó el tiempo de exposición en la solución de hipoclorito de sodio a 2 horas.

CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Se ensayaron dos condiciones de incubación; una bajo iluminación fluorescente blanca, con una intensidad lumínica de 29 $\mu E m^{-2} seg^{-1}$, con un fotoperiodo de 16 horas luz por 8 horas de oscuridad, la segunda condición implicó oscuridad total. En los dos casos se mantuvo una temperatura constante de $25 \pm 2^\circ C$.

3.2.1.1 CULTIVO DE RAÍCES

OBTENCIÓN DE EXPLANTES

Una vez que el material estuvo en condiciones asépticas, a los fragmentos de raíces se les eliminó la epidermis y la médula, de la corteza radical se obtuvieron segmentos de 0.25 cm^2 que se sembraron manteniendo la polaridad del explante.

MEDIOS DE CULTIVO

Todas las cantidades que están referidas en los cuadros son utilizadas para la preparación de un litro de medio nutritivo.

□ Recolecta 1

Una vez en el laboratorio, las raíces de la primera recolecta se desinfectaron siguiendo el método de esterilización A, basándose en el origen y el tipo de material. En todos los ensayos las raíces se desinfectaron y posteriormente fueron fragmentadas para su siembra.

El medio de cultivo que se utilizó para la siembra de las raíces de esta recolecta fue el M1, las cantidades de fitorreguladores y mezcla de vitaminas, se citan en el cuadro No. 3. Se sembraron cinco explantes por frasco y todos los cultivos se incubaron en condiciones de oscuridad.

CUADRO No. 3 COMPOSICIÓN DEL MEDIO NUTRITIVO M1

	Medio Nutritivo	ANA	BAP	Cóctel 4
M1	MS	1.5 mg	2.0 mg	10 ml

Cóctel 4.- mezcla de aminoácidos y vitaminas, ver Anexo II

□ Recolecta 2

Las raíces obtenidas en la segunda recolecta se sometieron a los métodos de esterilización B, C y D, para evitar la contaminación por hongos, la oxidación y la muerte del tejido; se modificaron los tiempos de exposición y la concentración de los agentes desinfectantes.

Además de variar los métodos de esterilización, también se realizaron cambios en los medios de cultivo, variando las vitaminas y reguladores de crecimiento del medio nutritivo como se muestra en el cuadro No. 4.

CUADRO No. 4 COMPOSICIÓN DE MEDIOS NUTRITIVOS

	Medio	Cóctel 20	Vit. MS*	Glicina	Adenina	2,4-D	MCP	Claforán
M2	MS	--	10 ml	0.01 mg	--	3 mg	--	0.2 mg
M3	MS	10 ml	--	--	0.1 mg	3 mg	--	0.2 mg
M4	MS	--	10 ml	0.01 mg	--	--	3 mg	0.2 mg
M5	MS	10 ml	--	--	0.1 mg	--	3 mg	0.2 mg

Cóctel 20.- mezcla de aminoácidos y vitaminas, más urea ver Anexo II

* Vitaminas del medio Murashige y Skoog (1962).- ver Anexo II

Con el objeto de probar el efecto de las vitaminas y fitorreguladores, se sembró material de cada método de esterilización, en cada uno de los 4 diferentes medios nutritivos. El ensayo comprendió un total de 12 tratamientos con 6 repeticiones para cada tratamiento con 3 explantes por frasco. Las condiciones de incubación fueron de obscuridad.

□ Recolecta 3

De las plantas jóvenes que fueron recolectadas la raíz de una de ellas se utilizó como fuente de explantes para iniciar el cultivo *in vitro*. Tomando en cuenta los problemas de contaminación que se presentaron con los otros materiales obtenidos del campo, se aplicaron tres métodos de asepsia (E, F y G) más severos, incrementando las concentraciones y tiempo de exposición a los desinfectantes.

Con este material se probaron cuatro variaciones en la composición de vitaminas y fitorreguladores del medio de cultivo MS como se muestra en el cuadro No. 5. Las condiciones de incubación fueron también de obscuridad total y a la temperatura antes mencionada.

CUADRO No. 5 COMPOSICIÓN DE MEDIOS NUTRITIVOS

	Cóctel 20	Vitaminas MS	Glicina	Adenina	2,4-D	MCP
M6		10 ml	0.01 mg		3.0 mg	
M7	10 ml			0.1 mg	3.0 mg	
M8		10 ml	0.01 mg			3.0 mg
M9	10 ml			0.1 mg		3.0 mg

2.1.2 CULTIVO DE YEMAS

Se obtuvieron yemas en campo solamente durante la primera recolecta, por lo que para realizar otros ensayos *in vitro*, se utilizaron las yemas apicales de plantas de 15 m de altura que se mantuvieron en condiciones de invernadero.

El método de esterilización H se aplicó a las yemas obtenidas de plantas que crecieron en condiciones de invernadero y consistió de los siguientes pasos:

Método H

- 1.- Se expusieron a una solución de detergente y se enjuagaron con agua corriente durante 30 minutos.
- 2.- Se remojaron en una solución de etanol al 70 % durante 1 minuto.
- 3.- Se enjuagaron tres veces durante cuatro minutos con agua desionizada esterilizada.
- 4.- A continuación se remojaron en una solución al 10 % de blanqueador comercial "cloralex"® más 15/250 ml gotas de "microdyn"®, y 5/250 ml, gotas de Tween 20, durante 10 minutos bajo agitación constante.
- 5.- Se repitió el paso 3.
- 6.- Se expusieron en una solución de "captán"® al 0.04%, durante 10 minutos bajo agitación constante.
- 7.- Se enjuagaron cuatro veces con agua desionizada esterilizada, 4 minutos cada una de las veces.

OBTENCIÓN DE EXPLANTES

En condiciones asépticas con auxilio de instrumental, las yemas provenientes del campo y de invernadero se esterilizaron siguiendo el método A y el método H respectivamente, se les eliminó la mayor cantidad de primordios foliares y se obtuvieron los ápices meristemáticos (meristemas apicales de aproximadamente 5 mm) los cuales se sembraron guardando la polaridad del explante. En el caso del material de campo se sembraron tres y cuatro explantes en cada frasco de medio y un explante en cada tubo en el caso del material de invernadero.

MEDIOS DE CULTIVO

Para las yemas obtenidas del campo en la primera recolecta, se utilizó el medio nutritivo M1, descrito en el cuadro No. 3, mientras que con las yemas provenientes de las plantas germinadas en condiciones de invernadero se realizaron dos ensayos.

Ensayo 1

Una vez esterilizado el material, se sembraron 3 explantes en seis medios nutritivos diferentes en los cuales se modificaron las concentraciones de fitorreguladores, como se indica en el cuadro No. 6.

CUADRO No. 6 COMPOSICIÓN DE MEDIOS NUTRITIVOS

	Medio	ANA	BAP	Vit. MS	Glicina	Adenina	Cóctel 20
M10	H	2.0 mg	1.0 mg	10 ml	0.01 mg	—	—
M11	H	1.0 mg	0.5 mg	--	—	0.1 mg	10 ml
M12	WPM	2.0 mg	1.0 mg	10 ml	0.01 mg	—	--
M13	WPM	1.0 mg	0.5 mg	—	—	0.1 mg	10 ml
M14	MS	2.0 mg	1.0 mg	10 ml	0.01 mg	—	--
M15	MS	1.0 mg	0.5 mg	—	—	0.1 mg	10 ml

Una vez sembrados los ápices, se adicionó sobre el medio de crecimiento un mililitro de una solución de ácido ascórbico (100 mg l^{-1}) y de ácido giberélico (AG_3) (0.002 mg l^{-1}) previamente esterilizados, para evitar la oxidación y estimular el desarrollo del

ejido. Las condiciones de incubación fueron con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad y temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$. A los cuatro subcultivos (de 21 días cada uno), se registraron las respuestas.

Ensayo 2

Se sembraron tres yemas en medio M1, preparado como se menciona en el cuadro No. 3, en las mismas condiciones de incubación usadas en el primer ensayo.

Después de tres subcultivos (de 21 días cada uno) en medio M1, los explantes se cambiaron a medio nutritivo Heller, adicionado con vitaminas del medio nutritivo MS, más 5 mg l^{-1} de BAP y 1 mg l^{-1} de AIA.

OBSERVACIONES

Un aspecto limitante para estos ensayos, fue la cantidad de yemas que se obtuvieron de las plantas recolectadas en el campo. Por otro lado, tampoco se pudieron obtener en el invernadero una mayor cantidad de yemas debido al lento crecimiento de la especie en estas condiciones.

3.2.1.3 CULTIVO DE HOJAS

Para lograr establecer el cultivo *in vitro* se exploró con otro explante, diferente a la raíz y del cual se pudiera obtener callo, por lo que se intentó el cultivo de hojas.

Las hojas que se utilizaron para la preparación de los explantes se obtuvieron de material silvestre obtenido de campo en la tercera recolecta, así como también de individuos que crecieron en condiciones de invernadero. El material se esterilizó, utilizando el método H en el primer caso, mientras que en el segundo se disminuyó la

concentración y el tiempo de exposición a la solución de hipoclorito (paso 4) a 7 % durante 7 minutos, respectivamente.

OBTENCIÓN DE EXPLANTES

Una vez que las hojas estuvieron desinfectadas, se eliminó el borde de la hoja y se cortaron segmentos de 1 cm², la mitad de los explantes se sembró con el envés en contacto con el medio nutritivo y la otra mitad con el haz en contacto con el medio, algunos se sembraron con la nervadura principal y otros sin esta nervadura.

MEDIOS DE CULTIVO

Para el cultivo de hojas de la recolecta 3 se utilizaron 4 diferentes medios nutritivos que consistieron en medio nutritivo MS con variación en las auxinas, como se indica en el cuadro No. 7.

CUADRO No. 7 COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS NUTRITIVOS

	Medio	ANA	AIB	BAP	Cóctel. 20	Adenina	Vit. MS	Glicina
M16	MS	2.0 mg	--	2.5 mg	10 ml	0.1 mg	--	--
M17	MS	--	2.0 mg	2.5mg	10 ml	0.1 mg	--	--
M18	MS	2.0 mg	--	2.5 mg	--	--	10 ml	0.01 mg
M19	MS		2.0 mg	2.5 mg	--	--	10 ml	0.01 mg

Cóctel 20 y Vit. MS, mezcla de vitaminas y aminoácidos más urea, ver Anexo II.

En el caso del material obtenido en condiciones de invernadero, se probaron los medios 10 al 15 del cuadro No. 6.

Se realizó otro ensayo utilizando medio nutritivo Heller, con Dicamba como auxina, y modificando los aminoácidos y los complementos vitamínicos de acuerdo al cuadro No. 8.

CUADRO No. 8 COMPOSICIÓN DE MEDIOS NUTRITIVOS

	Medio	Dicamba	Cóctel 20	Adenina	Vit. MS	Glicina
M20	Heller	3.0 mg	—	—	10 ml	0.01 mg
M21	Heller	3.0 mg	10 ml	0.1 mg	—	—

3.2.1.4 CULTIVO DE SEMILLAS

Dos lotes de 50 semillas cada uno colectadas durante la segunda recolecta, en la localidad # 1, se embebieron durante 48 horas; el primer lote en agua destilada y el segundo en peróxido de hidrógeno al 3 %. Posteriormente, se eliminó manualmente la testa y se esterilizaron de la siguiente manera:

- 1.- Se expusieron las semillas a la solución de cloro comercial al 10 %, durante 10 minutos.
- 2.- Se realizaron tres enjuagues con agua desionizada estéril, de cuatro minutos cada uno.
- 3.- Se expusieron a una solución de "captán"® al 0.04%, durante 20 minutos.
- 4.- Se enjuagaron cuatro veces con agua desionizada estéril, durante 4 minutos.

MEDIOS DE CULTIVO

Las semillas se sembraron completas en el medio nutritivo M1 (véase cuadro No. 3), tres semillas en cada frasco.

Las condiciones de incubación, fueron: para la mitad de cada lote (25 semillas = 8 frascos), bajo condiciones de fotoperiodo, mientras que la otra mitad se mantuvo en condiciones de obscuridad. Se realizaron subcultivos cada 21 días.

Buscando la producción de brotes, en el sexto subcultivo (después de 126 días), la mitad de cada uno de los diferentes lotes, se cambió a medio de crecimiento M22 con una variación de la auxina y en la concentración de citocinina (cuadro No. 9)

A los 147 días, se pusieron nuevamente todos los callos en el medio original (M1), realizando los subcultivos cada 3 semanas para incrementar la masa celular.

CUADRO No. 9 COMPOSICIÓN DE MEDIOS NUTRITIVOS PARA CULTIVO DE SEMILLAS

	Medio	BAP	ANA	2,4-D	Cóctel 4
M1	MS	2.0 mg	1.5 mg	---	10 ml
M22	MS	5.0 mg	---	2.0 mg	10 ml

3.2.1.5 ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN

Para el establecimiento de las células en suspensión, se procedió a separar los diferentes tipos de callos que se obtuvieron de la inducción a partir de semilla, se eliminó el tejido oxidado y se realizaron cortes de aproximadamente 1 mm². Se establecieron los cultivos madre inoculando 10 matraces, conteniendo 20 ml de medio nutritivo líquido M1 (véase cuadro No. 3), sin agente gelificante con 2 g de callo seleccionado.

Los cultivos líquidos se incubaron bajo agitación constante a 100 rpm y temperatura de 25 ± 2° C y en condiciones de obscuridad durante 7 días, transcurrido este tiempo, los cultivos madre se filtraron con auxilio de gasas esterilizadas y la suspensión obtenida se aforó a 30 ml con medio nutritivo MS fresco. A este cultivo de células en suspensión se le denominó "primera generación". Al callo que no se logró disgregar (tejido madre) nuevamente se le adicionó medio nutritivo (20 ml) y se repitió el proceso de incubación. Todos los cultivos se sometieron a las mismas condiciones de crecimiento.

El tejido madre nuevamente se filtró a la semana de cultivo obteniendo la "segunda generación" de cultivo de células en suspensión, este proceso fue repetido sucesivamente hasta obtener 6 generaciones. Los cultivos de células en suspensión se

subcultivaron cada 7 días, adicionando en cada subcultivo 20 ml de medio nutritivo fresco.

DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS EN SUSPENSIÓN

De los 10 cultivos de células en suspensión que se obtuvieron, se eligieron tres por similitud de coloración, que después del primer subcultivo se mezclaron para obtener un cultivo homogéneo, el cual se dividió en seis partes iguales, para la determinación de la cinética de crecimiento.

Se determinó la cinética de crecimiento de la primera y segunda generación de los cultivos en suspensión

Para la cuantificación del crecimiento celular (después del primer subcultivo), los cultivos en suspensión fueron evaluados a través de su cinética de crecimiento midiendo el peso fresco y seco, los cuales fueron registrados a intervalos de 24 horas durante seis días.

El peso fresco fue determinado tomando alícuotas de 3 ml del cultivo (para cada una de las seis repeticiones), la suspensión fue filtrada al vacío hasta eliminar completamente el medio nutritivo líquido, para lo cual fue utilizado un matraz de filtración (kitasato) y un embudo Buchner usando un papel filtro Whatman Núm. 45 (seco de peso conocido). El peso fresco se determinó por diferencia de peso.

El peso seco se determinó cuando las muestras de peso fresco, se secaron en una estufa a 27° C, durante siete días, o hasta alcanzar peso constante.

Se calculó la relación peso fresco (PF)/peso seco(PS) y la Tasa Relativa de Crecimiento (TRC), la que equivale a la velocidad promedio de crecimiento por unidad de masa inicial y por unidad de tiempo usando la ecuación descrita por Causton y Venus, 1981 (citados por Alvarado Gómez, 1990):

$$TRC = \text{Ln } C_2 - \text{Ln } C_1 / t_2 - t_1$$

Donde Ln = logaritmo natural, C_2 = peso o número de células en el último muestreo, C_1 = peso o número de células en el primer muestreo y $t_2 - t_1$, es el intervalo en días entre los dos muestreos.

Se calculó el tiempo de duplicación o de generación (TD), que es el tiempo promedio transcurrido entre dos divisiones consecutivas de una célula, o el tiempo (en días) requerido para que una población duplique su número (Richards, 1969, citado por Alvarado Gómez, 1990), se expresó en días y se determinó con la ecuación:

$$TD = \text{Ln } 2 / TRC$$

También se calculó el número de duplicaciones (ND), que es el número de veces que el material se duplicó durante los seis días del periodo de estudio:

$$ND = \text{Ln } C_2 - \text{Ln } C_1 / \text{Ln } 2$$

3.2.2 ENSAYOS DE GERMINACIÓN *in vivo*

DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN

Ensayo preliminar

Para determinar si la testa de las semillas fue un factor importante en la germinación de las mismas se realizó el siguiente ensayo:

Se pusieron a germinar 40 semillas, de éstas, 20 se escarificaron mientras que a un número igual no se les eliminó la testa, para ambos casos un lote de 10 semillas se colocó sobre papel filtro humedecido con agua destilada esterilizada como sustrato, dentro de una caja de Petri. Las otras 10 se colocaron en macetas conteniendo como sustrato inerte germinasa, que se compone de pericarpos de frutos de coco.

ENSAYO PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA GERMINACIÓN

Para determinar la temperatura de germinación óptima, tres lotes de cincuenta semillas cada uno se embebieron en agua destilada durante 48 horas, se eliminó la testa manualmente y se colocaron 10 semillas dentro de cada caja de Petri con papel filtro Whatman No. 2 humedecido con 10 ml de agua destilada esterilizada como sustrato y se incubaron en la obscuridad total y diferente temperatura:

- a) El lote 1, a temperatura ambiente (20-26° C).
- b) El lote 2, a temperatura constante de 25° C
- c) El lote 3, a temperatura constante de 30 °C.

Posteriormente se calculó el porcentaje de germinación para cada lote.

ESTABLECIMIENTO DE PLÁNTULAS EN DIFERENTES SUBSTRATOS

Las plántulas que se obtuvieron de los ensayos de germinación se utilizaron para determinar el efecto del sustrato sobre el desarrollo de las mismas, para ello se experimentó con los siguientes sustratos previamente esterilizados en vapor durante 1 hora, a 1.2 bares:

- a) Agrolita
- b) Mezcla de tierra de hoja - agrolita 1:3
- c) Mezcla de agrolita- germinasa 1:3

CONDICIONES DE INVERNADERO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE PLÁNTULAS

Una vez conocida la temperatura óptima de germinación, se sembraron individualmente 45 plántulas en vasos de unicel utilizando como substrato mezcla de agrolita- germinasa (1:3), se cubrieron con vasos de plástico transparente para guardar la humedad, se pusieron en el invernadero a una temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$, con riego cada tercer día y se evaluaron durante seis semanas.

3.2.3 DEL ANÁLISIS FITOQUÍMICO

El análisis fitoquímico se orientó a la extracción e identificación de friedelina, tanto del material obtenido de campo, como del obtenido *in vitro*. La técnica de extracción empleada fue la reportada por Mata y colaboradores en 1990 y la identificación se llevó a cabo mediante técnicas cromatográficas por comparación con una muestra patrón de friedelina.

MATERIAL OBTENIDO DEL CAMPO

El material obtenido del campo (hojas, tallo y raíz), se secó en una cámara de temperatura constante a 30°C y se molió finamente para llevar a cabo la extracción de acuerdo a Mata y col. (1990), que consistió en una maceración en frío con hexano (3 veces/24 horas). Los extractos obtenidos se llevaron a sequedad a presión reducida, para calcular los rendimientos de cada una de las partes del vegetal utilizadas. El extracto de raíz posteriormente se trató con hexano caliente, obteniéndose un residuo

insoluble de color naranja, en el que los mencionados autores reportan la presencia de friedelina.

Los extractos obtenidos de las diferentes partes vegetales se compararon por cromatografía en capa fina con una muestra de friedelina como estándar para identificar la presencia de este compuesto.

Por otra parte, se realizó un perfil cromatográfico de diferentes concentraciones de friedelina, para determinar la sensibilidad de la cromatografía en capa fina.

MATERIAL OBTENIDO DEL CULTIVO DE TEJIDOS

El material vegetal obtenido en condiciones *in vitro* (callos y células en suspensión), se secó en una cámara a temperatura constante a 30° C y los medios nutritivos en donde crecieron se liofilizaron, para posteriormente realizar las extracciones hexánicas de la misma manera que para el material obtenido del campo.

Se determinaron los perfiles cromatográficos en capa delgada de cada uno de los extractos, comparándolos con friedelina como estándar. Debido a que no se observó la presencia de friedelina por medio de esta técnica y considerando que el compuesto se encuentra en bajas concentraciones, se optó por utilizar como método de identificación a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).

DETERMINACIÓN DE FRIEDELINA POR CLAR

Se prepararon soluciones de 0.1 mgml^{-1} de los siguientes extractos:

- ❖ a) raíces
- ❖ b) callos obtenidos de semilla
- ❖ c) medios nutritivos de los callos
- ❖ d) células en suspensión obtenidas de la primera generación

Además se preparó una solución de 0.01 mgml^{-1} de friedelina, con la cual se optimizaron las condiciones para la cromatografía líquida de alta resolución. De estas soluciones se realizaron diluciones 1/100 para aplicarse en el cromatógrafo. Se utilizó una columna de fase reversa y un sistema isocrático de elución cloroformo:metanol 80:20.

La identificación de friedelina en los diferentes extractos, se realizó por comparación de los tiempos de retención.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

En las dos diferentes localidades en las que se realizaron las recolecciones, se observó que el número de individuos de la especie era muy reducido. Esta observación fue corroborada y explicada por algunas personas que viven en la región y se debe a que en época de sequía, venden la corteza de la raíz en el mercado a un precio aproximado de 8 pesos por kilogramo.

Además es importante señalar que las localidades en donde se realizaron las recolecciones, presentaron gran perturbación en la vegetación, debida principalmente a las actividades agrícolas.

Del material vegetal que se utilizó para el cultivo de tejidos se observó que, una vez recolectado, fue muy sensible al cambio de humedad, aún cuando se tomaron precauciones para evitar el marchitamiento.

4.2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

4.2.1 CULTIVO DE RAÍCES

MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN

Se presentó contaminación por bacterias y hongos en los ensayos realizados con las raíces obtenidas de las primeras dos recolectas, la cual fue evidente a los cinco y siete días después de la siembra, como se observa en el cuadro No. 10.

CUADRO No. 10 RESULTADOS DE LOS MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN APLICADOS A LAS RAÍCES RECOLECTADAS EN EL CAMPO

Recolecta	Método de esterilización	Observaciones
1	A	Contaminación total por hongos y bacterias.
2	B, C y D	Contaminación total por hongos y bacterias
3	E	Contaminación total
	F	40 % de contaminación por hongos
	G	10 % de contaminación por hongos

De las cuatro variaciones que se realizaron en el método de esterilización que se aplicaron a las raíces recolectadas en las dos primeras salidas, se observó que la concentración y los tiempos de exposición a los agentes desinfectantes no fueron suficientes para lograr una asepsia completa.

De los tres métodos que se probaron con el material de la tercera recolecta, se observó que:

El método E tampoco arrojó buenos resultados, observándose contaminación total por hongos en los cultivos de este material.

El material vegetal que se desinfectó con el método F, presentó un 40 % de contaminación por hongos, sin embargo el material restante (60%) que no presentó contaminación, tampoco mostró respuesta alguna, aún después de un subcultivo (42 días).

De las raíces que se desinfectaron con el método G, solamente un 10 % presentó contaminación por hongos, en este caso los explantes restantes (90%) tampoco respondieron a la formación de callo.

Un factor determinante en estos resultados fue el origen del material, ya que la cantidad de microorganismos que se encuentran presentes en el suelo es muy amplia y diversa, lo que dificulta la eliminación de los mismos. Además de que las raíces de plantas creciendo en suelo son difíciles para iniciar los cultivos, debido a que se encuentran muy contaminadas (George y Sherrington, 1984).

Así mismo la sensibilidad de los explantes provenientes de diferentes partes de una planta a las soluciones desinfectantes puede variar. Finalmente es posible que los métodos de esterilización que evitaron la invasión de microorganismos, hayan sido también muy agresivos para el tejido, imposibilitando cualquier respuesta en virtud de que probablemente causaron la muerte tisular.

MEDIOS DE CULTIVO

Los diferentes ensayos utilizando variaciones en los medios nutritivos tenían como finalidad, determinar si las vitaminas y/o aminoácidos así como los diferentes reguladores de crecimiento que se adicionaron a los medios, provocaban una mejor respuesta en crecimiento de los explantes.

Los problemas de contaminación no permitieron llevar a cabo esta observación, debido a que no se superó la etapa de desinfección y establecimiento *in vitro* de los explantes, por lo que no fue posible evaluar el efecto de los diferentes medios de cultivo ensayados en los explantes inoculados.

4.2.2 CULTIVO DE YEMAS

MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN

a Material obtenido del campo -Recolecta 1-

En los ensayos realizados con las yemas provenientes del campo se obtuvieron resultados negativos, observándose contaminación por hongos y bacterias después de la siembra de los explantes y debido a que se contó solamente con 7 yemas no se pudieron probar variaciones en el método de esterilización.

Cabe señalar que, la apariencia de las yemas no fue muy vigorosa después del traslado del campo, debido a la falta de humedad por lo que esto también pudo haber influido en la respuesta, George y Sherrington (1984) mencionan que el tipo de explante, el tamaño, la edad y la manera en la cual es cultivado pueden afectar de un modo u otro el cultivo *in vitro*.

b Material de invernadero

El método de esterilización H que se utilizó para estas yemas, mostró resultados positivos, no se observó contaminación en las siembras realizadas con estos explantes.

El origen del explante y la manipulación inmediata del órgano, hicieron posible que el método de asepsia utilizado, eliminara la contaminación ocasionada por hongos y bacterias y permitiera la respuesta del explante a los diferentes medios nutritivos.

MEDIOS DE CULTIVO

Material de invernadero -Ensayo 1-

Las respuestas morfogénicas que se observaron a partir de las yemas sembradas en los seis diferentes medios, al cuarto subcultivo (84 días), se presentan en la cuadro No. 11.

CUADRO NO. 11 RESPUESTAS DE LOS ÁPICES A DIFERENTES MEDIOS NUTRITIVOS

	Medio	Observaciones
M10	Heller	No hubo respuesta
M11	Heller	Crecimiento lento, con oxidación
M12	WPM	Formación de callo blanquecino
M13	WPM	Formación de callo anaranjado
M14	MS	Oxidación, formación incipiente de callo oscuro
M15	MS	Formación de callo oscuro y en un frasco la formación de un brote adventicio.

Las observaciones corresponden al 100 % de los cultivos que se sembraron en cada uno de los diferentes medios.

En estos ensayos se aprecia que en cinco de los seis medios nutritivos ocurrió la formación de callo.

La proporción de auxina: citocinina en los medios nutritivos fue de 2:1, aunque se agregó en diferentes concentraciones la proporción es la misma, lo cual implicaría que la relación de auxina: citocinina endógenas es muy parecida a la suministrada ya que ésta es la proporción que genera la formación de callo.

De los medios probados, se observó la formación de un brote en medio MS (M15), con concentraciones bajas de ANA y BAP (Fig. 3). En el medio nutritivo WPM se observó una diferencia en cuanto a coloración del callo y empleando el medio nutritivo Heller no se obtuvieron buenos resultados.

CUADRO No. 12 COMPOSICIÓN IÓNICA DE MACRONUTRIENTES, DE TRES DIFERENTES MEDIOS

Compuesto	Medio MS	Medio Heller	Medio WPM
NO ³⁻	39.4	7.1	9.7
H ₂ PO ₄ ⁻	1.3	0.9	1.3
SO ₄ ²⁻	3.0	2.0	14.4
Cl ⁻	6.0	11.1	1.3
K ⁺	20.0	10.1	12.6
Ca ²⁺	6.0	1.0	6.0
Mg ²⁺	3.0	—	3.0
Na ⁺	—	8.0	—
NH ₄ ⁺	20.6	—	5.0
N Total	60.0	7.1	14.7
NH ₄ ⁺ por N Total	0.34	—	0.34
Σ I ⁺	49.6	21.1	26.6
N/Σ I	0.60	0.17	0.28
H ₂ PO ₄ ⁻ / Σ I	0.013	0.022	0.023
K ⁺ /Σ I	0.20	0.24	0.24
Concentración Iónica Total	93.3	39.6	41.5

Como se observa en el cuadro No. 12, el medio MS es el que presenta mayor concentración de potasio, magnesio y nitrógeno total, tanto en forma de nitratos como en forma de amonio, así como la mayor concentración iónica total que puede ser comparada con la presión osmótica.

El medio Heller es el que presenta mayor concentración de cloro y la concentración de nitrógeno total es la más baja de los tres medios, así como también la menor concentración iónica total, lo cual puede facilitar el transporte de las sustancias del medio hacia las células del explante, así como también de las sustancias tóxicas.

Este medio contiene como única fuente de nitrógeno, al nitrato de sodio. Se ha demostrado que los nitratos son la fuente más importante de nitrógeno para las plantas cultivadas *in vitro*, pero también se ha mencionado que es necesaria la presencia de nitrógeno en su forma reducida, es decir en forma de iones de amonio y que estos iones juegan un papel importante como reguladores en los cultivos. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que, la enzima nitrato reductasa, responsable del metabolismo del

nitrógeno, se activa en presencia de estos compuestos. Así mismo, la presencia de nitrógeno en su forma reducida es benéfica para la formación de pared celular y para la síntesis de factores endógenos para la división celular (George y Sherrington, 1988). El medio Heller al carecer de sales de amonio, puede producir una disminución en la actividad de las enzimas nitrato y nitrato reductasa, ocasionando una acumulación de nitritos en el medio, los cuales son tóxicos para las plantas. El medio Heller no contiene molibdeno, elemento presente en varias enzimas como por ejemplo la nitrato reductasa. Al utilizar un medio deficiente en molibdeno la actividad de esta enzima disminuye acumulándose niveles tóxicos de nitratos (Uribe, 1998).

El medio WPM tiene la mayor concentración de sulfatos, una concentración de nitrógeno de la cuarta parte de la que presenta el medio MS y una concentración iónica total mayor al medio Heller, pero menor al medio MS.

Aunque no es contundente, la información que arrojan los resultados indican que fue el medio MS el que dio los mejores resultados, pudiendo ser la concentración de nitrógeno uno de los factores necesarios para el cultivo *in vitro* de esta especie.

Material de invernadero -Ensayo 2-

Se inició el cultivo en medio nutritivo M1 y aunque en el ensayo anterior el medio Heller no fue el óptimo, se utilizó a partir del tercer subcultivo, debido a que es un medio en el cual se han obtenido buenos resultados en especies maderables por su baja fuerza iónica (George y Sherrington, 1988 y Bonga 1992, citados por Uribe, 1998), pero en este ensayo se incrementó la concentración de citocinina de 2 mg l^{-1} a 5 mg l^{-1} para favorecer la formación de brotes, ya que se había observado en el ensayo 1, la formación de callos en todos los explantes.

En este ensayo se observó la formación de un brote adventicio a los 3 meses, de aproximadamente 1 cm de altura, coloración verde. Sin embargo, el tiempo de respuesta del explante fue muy lento ya que a los ocho meses del subcultivo el brote creció solamente 4 centímetros (Fig. 3).

Figura 3. Brote adventicio obtenido en medio MS



4.2.3 CULTIVO DE HOJAS

MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN

- Material obtenido de campo -Recolecta 3-

Los métodos de esterilización que se aplicaron a las hojas que se recolectaron en el campo no proporcionaron buenos resultados, ya que se presentó contaminación debido a hongos y bacterias en los cultivos.

En este caso las hojas presentaron una apariencia vigorosa, pero la cantidad y variedad de microorganismos que se encontraban en ellas fueron excesivas para el método de esterilización que se aplicó.

□ Material de invernadero

El método de esterilización aplicado a este material fue efectivo, en este caso la asepsia se pudo realizar, debido a que las condiciones controladas de invernadero evitaban que la planta permaneciera en contacto con grandes cantidades de microorganismos, por lo que al aplicar un método de esterilización general, se pudieron eliminar (lámina 1: Fotos 2 y 3).

Por otro lado un factor determinante para la respuesta *in vitro*, fue la edad del tejido, se utilizaron como explantes las hojas más jóvenes de las plantas, que presentaban un tamaño de aproximadamente 15 cm de altura.

La edad de cualquier parte de tejido puede ser medida mediante su fase de crecimiento, algunas veces llamada "edad fisiológica". En este sentido una parte de tejido puede considerarse como "joven" o "vieja" dependiendo de si es derivada de una planta en una fase de crecimiento juvenil o adulta, respectivamente. Explantes de tejidos jóvenes sometidos a división celular, generalmente forman callo más fácilmente que los de partes más viejas de la planta y hay una mayor oportunidad de que el callo sea capaz de la organogénesis. En árboles maderables y arbustos, cultivos de todos tipos son establecidos más fácilmente cuando se utilizan como explantes retoños en fase juvenil (George y Sherrington, 1984).

MEDIOS DE CULTIVO

Recolecta 3

De los medios que se probaron con este material, no se pudieron hacer observaciones, debido a que en todos los frascos se presentó contaminación por hongos y bacterias.

Material de invernadero

La respuesta en los diferentes medios nutritivos fue muy parecida variando principalmente el tiempo de respuesta (entre 2 y 3 días) siendo los medios M 12 (WPM ANA 2.0 mg l^{-1} , BAP 1.0 mg l^{-1} , glicina 0.01 mg l^{-1} y vitaminas MS 10 ml) y el M 13 (WPM ANA 1.0 mg l^{-1} , BAP 0.5 mg l^{-1} , adenina 0.01 mg l^{-1} y cóctel 20, 10 ml) los medios en los cuales, los explantes respondieron más rápidamente.

De este ensayo se observó que la formación de callo ocurrió a los 10 días de haber realizado la siembra, este callo que en una primera etapa fue de color blanquecino, posteriormente presentó un cambio de coloración al verde probablemente por la presencia de clorofila y su actividad fotosintética (lámina 1: Fotos 4 y 5). Algunos explantes presentaron la formación de pequeños agregados celulares de color anaranjado, posiblemente debido a la acumulación de pigmentos.

Las características de los callos obtenidos en este ensayo se encuentran en el cuadro No. 13.

CUADRO No. 13 RESPUESTAS MORFOGENÉTICAS DE HOJAS COLECTADAS EN CAMPO Y EN INVERNADERO DE PLANTAS DE *Hippocratea excelsa* CULTIVADAS *in vitro*.

Medio	T	%	Características
M10 (H)	10	85	Incipiente formación de callo, de coloración anaranjada creciendo sobre todo el explante.
M11 (H)	10	92	Semejante al M 10, con agregados celulares más grandes.
M12 (WPM)	10	100	Abundante formación de callo compacto de coloración blanquecina con algunos agregados color naranja, creciendo sobre toda la superficie del explante
M13 (WPM)	10	95	Abundante formación de callo compacto de color verdoso con algunos agregados de color blanco, creciendo en todo el explante y en mayor cantidad en los bordes, crecimiento más vigoroso que el anterior.
M14 (MS)	10	96	Abundante formación de callo disgregable de color verdoso con agregados compactos de color blanco.
M15 (MS)	10	87	Formación media de callo verdoso, creciendo sobre todo el explante, agregados blancos en los bordes que posteriormente se ponen verdosos
M20 (H)	10	40	Formación incipiente de callo pardo creciendo sobre todo el explante, aunque más abundante en los bordes, callo hiperhidratado
M21 (H)	10	52	Formación incipiente de callo pardo creciendo sobre todo el explante, aunque más abundante en los bordes, callo hiperhidratado

T.- Tiempo de respuesta en días, %.- Porcentaje de explantes con respuesta morfogénica.

4.2.4 CULTIVO DE SEMILLAS

MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN

El método que se aplicó a estos explantes fue exitoso, ya que no se observó contaminación alguna en los cultivos.

MEDIOS DE CULTIVO

A los catorce días después de su siembra en medio M1, se observó una coloración amarillenta en las semillas. A la siguiente semana (21 días) se observó un hinchamiento de las mismas, debido a la actividad metabólica, después de tres días (24 días), se observó sobre el cotiledón el crecimiento amorfo de células indiferenciadas (callo) que se mantuvo en condiciones de cultivo, este tejido fue subcultivado cada tres semanas, el

tejido que se obtuvo no fue homogéneo, se observó una diferencia de coloración entre los callos, así como también un patrón de coloración en los mismos que a continuación se describe: cuando en la semilla se presentó el inicio del crecimiento, parte del cotiledón tomó un color verde oscuro y posteriormente se dio la formación del primer callo color pardo muy oscuro, Lámina 1: Fotos 7 y 8), en segundo lugar se originó la formación de un callo que presentó coloración blanquecina (Lámina 1: Fotos: 8 y 9) con algunos agregados color naranja, posteriormente la coloración del callo se tornó muy oscura pudiendo ser parda o negra (Lámina 1: Foto 6). Los callos que fueron incubados en condiciones de luz presentaron una coloración verde claro.

Tran Thanh Van, en 1981 (citado en Robledo Paz, 1987) observó que existe un oscurecimiento del medio de cultivo así como de los cotiledones y que es una de las principales dificultades para el cultivo *in vitro* de plantas leñosas y que este fenómeno se debe comúnmente a la secreción de polifenoles y de productos de oxidación. Aunque también puede haber un incremento en lignina, suberina y cutina, que a menudo modifica tanto la composición del medio, como la absorción de metabolitos.

La formación de callos se obtuvo a partir de la semana 4 después de haber realizado la siembra, en las dos condiciones de incubación (luz y oscuridad).

El tipo de tejido que constituye al explante, influye en su capacidad morfogénica, por ejemplo los cotiledones están formados básicamente de células parenquimatosas, las cuales poseen una alta plasticidad fisiológica y pueden ser capaces de llevar a cabo una actividad meristemática (Esau, 1977, citado en Robledo Paz, 1987).

El crecimiento de callo se presentó en casi todas las semillas que se pusieron a germinar, tanto las expuestas a H_2O_2 , como las tratadas con H_2O , la única diferencia fueron los tiempos de respuesta inicial, ya que las semillas tratadas con peróxido de

hidrógeno respondieron a las dos semanas, mientras que las semillas no tratadas con peróxido de hidrogeno respondieron a las cuatro semanas después de la siembra.

El peróxido de hidrógeno es uno de los agentes esterilizantes más utilizado para las semillas, algunas ventajas de este compuestos son: que no deja residuos tóxicos y que algunas veces estimula la germinación de la semilla (Pitel y Wang, 1985, citados por Bonga 1992). Al parecer el peróxido de hidrógeno acelera la respiración durante la fase anterior a la movilización de sustancias de reserva. Existen algunos mecanismos que pueden explicar esta activación; por ejemplo se puede considerar que hay una destrucción directa del peróxido por acción de la catalasa, lo que provoca la liberación de oxígeno molecular el cual a su vez incrementa la tasa de respiración y facilita la oxidación de sustancias grasas (James, 1953; Chance y Williams, 1956, citados por Robledo Paz, 1987).

Los subcultivos se realizaron cada 21 días en medio nutritivo fresco, se efectuaron siete subcultivos eliminando la mayor cantidad de tejido madre (semilla), con la finalidad de obtener solamente el callo.

Las observaciones que se desprendieron de los subcultivos que se realizaron con los callos obtenidos de las semillas son las siguientes:

- ◆ Primer subcultivo (21 días), formación sobre el cotiledón de pequeños agregados celulares oscuros y de apariencia disgregable (callos).
- ◆ Segundo subcultivo (42 días), proliferación del callo, aparición de pequeñas y delgadas raíces en la superficie algunos callos cultivados en condiciones de obscuridad.
- ◆ Tercer subcultivo (63 días), se observaron callos de diferentes coloraciones que fueron del verde intenso al verde claro en los cultivos con fotoperiodo, y varios tonos de café, blanco y negro, incrementándose la cantidad de raíces, en los callos

cultivados en obscuridad. Las raíces fueron transferidas junto con el callo al siguiente subcultivo.

- ◆ Cuarto subcultivo (84 días), se observó un incremento en la masa celular, formación de callo de color blanco sobre los callos que están completamente oscuros, las raíces que se habían obtenido en subcultivos anteriores empezaron a mostrar signos de oxidación y necrosamiento.
- ◆ Quinto subcultivo (105 días), se observó un pequeño incremento en la masa celular, que presentó coloración verde en los callos expuestos a fotoperiodo, mientras que las raíces que se encuentran en los callos sometidos a obscuridad mostraron crecimiento lento y posteriormente oxidación.

Después de 126 días, el callo obtenido se transfirió a un medio adicionado con 2 mg l^{-1} de 2,4-D y 5 mg l^{-1} de BAP, para promover su proliferación, pero no se observó una respuesta favorable debido a que se presentó una mayor oxidación y el tejido se hiperhidrató, ésto pudo haberse debido al cambio de la auxina ANA por la 2,4-D y el incremento de su concentración, así como una mayor concentración de las citocininas. El 2,4-D es químicamente más estable y más resistente a la AIA oxidasa y menos susceptible a la conjugación con aminoácidos, por lo que su degradación es más lenta, manteniendo sus niveles en el cultivo por más tiempo. Las auxinas provocan el relajamiento de la pared celular, permitiéndole ceder presión, ocasionando que la presión potencial disminuya y por lo tanto entre más agua por ósmosis, debido al potencial hídrico negativo interno. El volumen celular se incrementa y la pared es extendida. La acción de las auxinas en el relajamiento de la pared celular es dual, existe un efecto inicial en la elasticidad y un efecto secundario en la plasticidad. De estos dos efectos el último es el más importante, ya que el alargamiento celular está relacionado directamente con el efecto de plasticidad en la pared celular. Cuando se promueve el alargamiento celular por exposición a una auxina y luego ésta se retira del medio, la rigidez de la pared celular revierte a la célula a su estado original (Moore, 1989).

Varios factores se han enlistado como responsables de la hiperhidratación, muchos de ellos sólo actúan para inducirla cuando otras condiciones del cultivo no son óptimas. Por ejemplo la bencilaminopurina induce la hiperhidratación cuando los cultivos están estresados por otros factores, estos se pueden considerar bajo las siguientes categorías: el medio de cultivo (consistencia, nivel y tipo de citocininas, concentración y composición de sales, presencia de ciertos minerales en abundancia), contenedor (material y forma de cierre, que puede afectar el intercambio de gas e influye en las concentraciones de vapor de agua, CO₂ y etileno, volumen en el espacio libre del contenedor), ambiente (temperatura, intensidad y calidad luminosa, movimiento del aire y humedad relativa), explante (variedad de la especie, tiempo de los subcultivos, colocación en el medio) (Ziv, 1991).

A los 11 meses de subcultivos se observaron callos con las características que se presentan en el cuadro No. 14.

CUADRO No. 14 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS CALLOS OBTENIDOS A PARTIR DE SEMILLAS GERMINADAS IN VITRO DE *Hippocratea excelsa*.

% Del total de callo obtenido	Coloración del callo	Características Morfológicas
50	Pardo	Tejido compacto y duro, fue el tipo de callo más abundante, algunos formaron raíces en obscuridad (rizogénesis)
15	Negro	Agregados celulares pequeños, se disgregan fácilmente, poco abundantes
15	Blanco	Tejido compacto y duro, más duro que el pardo, este tipo de tejido se formó sobre el tejido negro o sobre el tejido pardo, algunos formaron raíces en obscuridad (rizogénesis)
20	Verde	Tejido compacto y duro, se formó solamente en condiciones de luz

En cultivos que crecieron en condiciones de obscuridad, se observó la formación de raíces adventicias. En cultivos que crecieron en condiciones de fotoperiodo se observó en algunos callos coloración verde del tejido, estas dos respuestas hacen evidente la influencia de las condiciones de incubación en los procesos de diferenciación celular.

4.2.5 CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN

ESTABLECIMIENTO

Los cultivos en suspensión presentaron variaciones en la coloración, las características originales del tejido madre inoculado (callo) se muestran en el cuadro No. 15.

CUADRO No. 15 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL TEJIDO MADRE INOCULADO PARA LA OBTENCIÓN DE LOS CULTIVOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN

Número de matraz	Tipo de callo (tejido madre)
1	Color verde y disgregable
2	Color verde y disgregable
3	Color pardo y disgregable
4	Color pardo y compacto
5	Color pardo y disgregable
6	Color pardo y disgregable
7	Color blanco y compacto
8	Color blanco y pardo y compacto
9	Color pardo y compacto
10	Color negro y disgregable

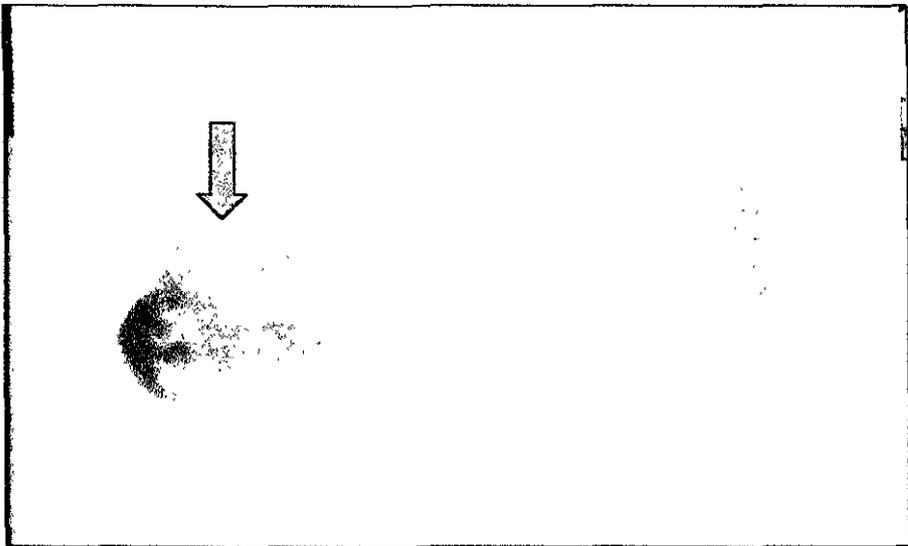
De los 10 cultivos que se establecieron en la primera generación, nueve presentaron una coloración muy oscura y una densidad celular alta, el cultivo número 7 presentó una densidad muy baja debido a la falta de disgregación celular posiblemente por el tipo de callo inoculado (compacto).

Los cultivos celulares 3, 5 y 6 presentaron una coloración azul (lámina 1:Fotos 10, 12 y 16)y se eligieron para obtener su cinética de crecimiento, por la semejanza en densidad y coloración, además de que provenían del mismo tipo de callo (pardo y disgregable)

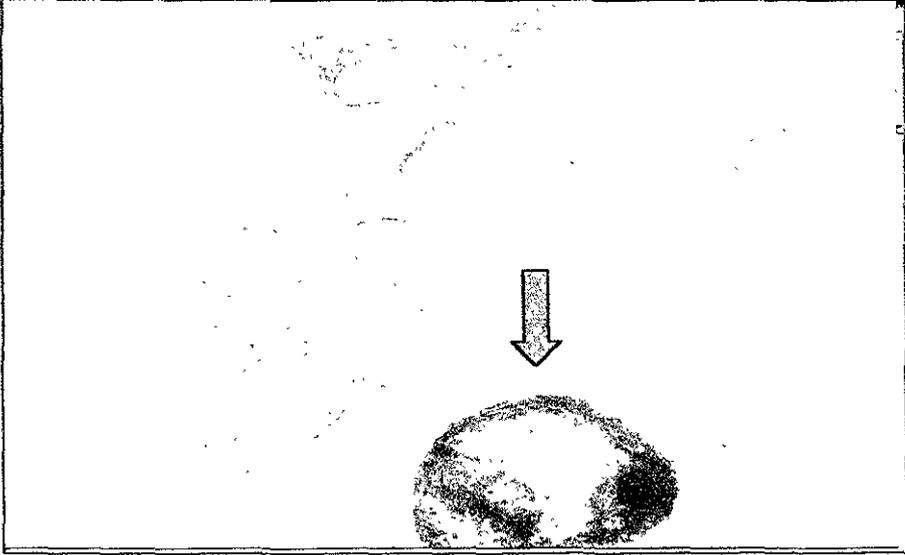
Algunas suspensiones después de varios subcultivos presentaron un incremento excesivo en la tasa de reproducción, observándose cultivos muy densos y de diferentes coloraciones, que fueron azul, café y negro (Lámina 1: Fotos 10-16), al observarlas en un microscopio óptico mostraron las siguientes características (Lámina 1: Fotos 17 y 18).

Células pequeñas y redondas, parecidas a células parenquimatosas con grandes vacuolas, rodeadas de una pared celular delgada, la mayoría aisladas y aproximadamente el 30 % formando pequeñas agrupaciones, se apreció la acumulación de "pigmentos" en algunas células (Fotografía 1 y 2).

Fotografía 1. Acumulación de pigmentos en células en suspensión vistas en el microscopio óptico (40X)



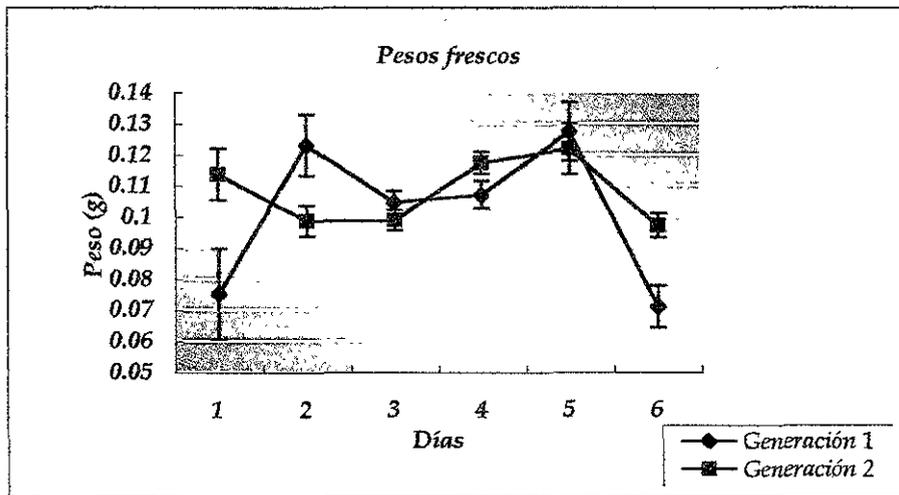
Fotografía 2 Acercamiento de una célula en suspensión, con acumulación de pigmentos vista en el microscopio óptico (40X)



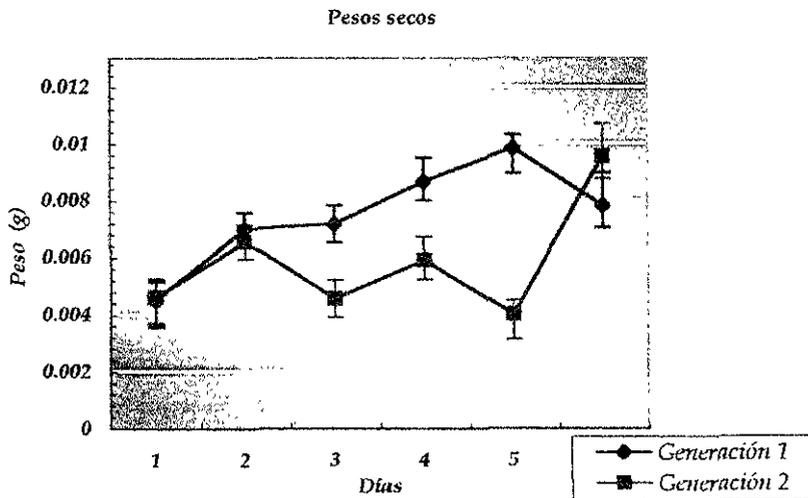
DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Con los resultados obtenidos de las mediciones de peso fresco y peso seco de los cultivos de células en suspensión, se obtuvieron las gráficas 1 y 2.

Gráfica 1. Relación de pesos frescos de la generación 1 y 2, durante los 6 días de muestreo



Gráfica 2. Relación de pesos secos de la generación 1 y 2, durante los 6 días de muestreo



Generación 1

En la gráfica de peso fresco se observan, dos incrementos en los días 2 y 5, posiblemente debido a dos ciclos celulares que se dan como resultado del cambio de medio sólido a medio líquido. Se observó en los datos obtenidos de peso fresco una fase de reposo (no cambio) entre los días 3 y 4; y una fuerte disminución entre los días 5 y 6 que puede explicarse por la disminución de nutrientes en el medio.

En la gráfica de peso seco, observamos que también en el día 5 se encontró un incremento en el peso y una disminución del mismo entre los días 5 y 6, al igual que en la gráfica de peso fresco, sin embargo la fase de reposo se observó entre los días 2 y 3, de aquí se puede decir que aunque el peso seco se mantenga constante, hay una disminución en el peso fresco debida a una pérdida de agua de la célula y es entre los días 3 y 4 cuando hay un incremento real en materia seca.

Los resultados que se obtuvieron con respecto a la relación peso fresco/peso seco para cada uno de los 6 días del muestreo son:

CUADRO No. 16.- RELACIÓN PESO FRESCO/PESO SECO DE LOS CULTIVOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE LA GENERACIÓN 1

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
PF/PS	16.72	20.26	16.93	14.33	14.95	10.45

PESO FRESCO

Incremento en crecimiento	0.0788
TRC	0.0168
TD (días)	41.324
ND	0.1747

PESO SECO

Incremento en crecimiento	0.7407
TRC	0.1108
TD (días)	6.2558
ND	0.7996

Generación 2

Como se observa en la gráfica 1 el peso fresco inicial fue mayor que el que se registró en las células de la generación 1, pero no representa una diferencia real en peso seco, por lo que se deduce un incremento de agua solamente. Entre los días 1 y 2 se presentó una disminución de peso fresco y un aumento en el peso seco por lo que se puede inferir en este lapso un aumento de biomasa por el crecimiento y la división de las células y una pérdida de agua. Entre los días 2 y 3 el peso fresco se mantiene constante pero se observó una disminución en el peso seco probablemente por muerte celular y degradación de las mismas, entre los días 3 y 4 se incrementó tanto el peso fresco como el peso seco y entre los días 4 y 5 se registró el mismo comportamiento que el descrito para los días 2 y 3. En el día 6 el incremento de materia seca y la disminución en el peso fresco fue evidente, para esta generación el día 6 no representó una limitante para la formación de biomasa incrementándose apreciablemente en el peso seco.

En esta generación, se observó que cuando el peso fresco se mantiene constante, el peso seco disminuye, y que cuando el peso fresco disminuye, el peso seco se incrementa.

En la gráfica de peso fresco se observó una mayor variación en la generación 1, que en la generación 2, pero al comparar este comportamiento con el que se obtuvo de la gráfica de peso seco se observó que la generación 1 se mantiene más constante encontrándose un incremento paulatino de biomasa hasta el día 5 y un decremento para el día 6, por otro lado la generación 2 mostró mayor variación en el peso seco, con un incremento de biomasa para el día 6.

Los resultados que se obtuvieron con respecto a la relación peso fresco/peso seco para cada uno de los 6 días del muestreo fueron:

CUADRO No. 17 RELACIÓN PESO FRESCO/PESO SECO DE LOS CULTIVOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE LA GENERACIÓN 2

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
PF/PS	24.70	15.04	21.68	19.91	30.44	10.16

PESO FRESCO

Incremento en crecimiento	- 0.145
TRC	-0.0314
TD (días)	-22.0747
ND	-0.2262

PESO SECO

Incremento en crecimiento	1.0772
TRC	0.1462
TD (días)	4.7411
ND	1.0546

La eficiencia del crecimiento puede calcularse más fácil, rápido y preciso con el peso seco, ya que esta variable estima los dos componentes del crecimiento: la división y el alargamiento celular, el peso fresco no es muy recomendable para estimar el crecimiento porque es afectado por el contenido de agua inter e intracelular.

El Número de Duplicaciones (ND) es el número de veces que el material se duplica durante el periodo de estudio, y la Tasa de Duplicación (TD) es la rapidez con que se duplica.

Comparando la generación 1 con respecto a la generación 2, observamos en los pesos secos que la Tasa Relativa de Crecimiento (TRC) es mayor en la generación 2 (0.1462) que en la 1 (0.1108), la TD es menor en la generación 2 (4.7411) que en la 1 (6.2558) y el ND también es mayor en la generación 2 (1.0546) con respecto a la generación 1 (0.7996). Con estos datos se puede suponer que la adecuación de las células, al pasar de un medio sólido a un medio líquido, juega un papel importante en la Tasa de Duplicación y la generación 2 se encuentra más adaptada a esta condición, ya que se registró una Tasa de 4.74 días, mientras que en la generación 1 fue de 6.26.

La relación peso fresco/peso seco, también nos indica en la generación 2 un mayor movimiento de agua debido a la división celular.

3 ENSAYOS DE GERMINACIÓN *in vivo*

PORCENTAJE DE GERMINACIÓN

Ensayo preliminar

Del lote de semillas escarificadas el 100% germinó a los 10 días en promedio (a los 8 días en las cajas de Petri y a los 11 días en la germinasa) y las no escarificadas el 5% germinaron a los 14 días en promedio, a los 13 días en las cajas de Petri y a los 16 en el substrato inerte, observándose en este último una ligera contaminación por hongos en 5 de las 10 semillas, las mejores condiciones de germinación se presentaron en los ensayos en los que la semilla fue escarificada. Cuando se utilizaron semillas no escarificadas, se observó una mayor contaminación. Al utilizar un substrato inerte (germinasa), se redujo considerablemente el porcentaje de germinación y se aumentó el tiempo de la misma.

Las cuarenta plántulas obtenidas se sembraron en germinasa y se colocaron en el invernadero, el establecimiento de estas plántulas no fue del todo exitoso, ya que solamente una plántula logró mantenerse viva, la principal causa fue la falta de humedad, ya que las plántulas en los primeros 30 días después del trasplante, fueron muy sensibles a la falta de agua, mostrando síntomas de marchitamiento muy rápidos, pero no descartamos en ese momento la importancia del substrato. En esta primera etapa del establecimiento el riego se realizó cada tres días, pero al observar los síntomas de marchitamiento de las plantas se cambió a riego diario. El principal inconveniente de realizar el riego diario fue la contaminación por hongos.

De estos resultados observamos la necesidad de tener un sustrato que permitiera un buen drenado, ya que si existe un exceso de humedad el ataque de hongos se hace inminente. El sustrato al mismo tiempo debe permitir los máximos niveles de humedad que impidan el marchitamiento de las plántulas.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA GERMINACIÓN

El porcentaje de germinación fue calculado para cada una de las tres diferentes temperaturas y los resultados los encontramos en el cuadro No. 18.

CUADRO No. 18 PORCENTAJES DE GERMINACIÓN EN TRES DIFERENTES TEMPERATURAS

	Temperatura °C	Semillas germinadas	Porcentaje de germinación	Tiempo promedio de germinación (días)
Lote 1	Ambiente	42	84	9.4
Lote 2	25	38	76	8.8
Lote 3	30	39	78	7.1

La principal diferencia observada fue en el tiempo de germinación, que fue menor en el lote con temperatura de 30° C en promedio registrándose a los 7 días, en comparación del lote con temperatura ambiente que es de 9 días. Los porcentajes de germinación fueron semejantes en los tres diferentes lotes (entre 76 y 84%).

ESTABLECIMIENTO DE PLÁNTULAS EN DIFERENTES SUBSTRATOS

Las plántulas obtenidas a partir del ensayo anterior, se utilizaron para probar tres diferentes sustratos. Los resultados del efecto del sustrato en el establecimiento de plántulas en condiciones de invernadero se muestran en el cuadro No. 19.

CUADRO No 19 NÚMERO DE PLÁNTULAS QUE LOGRARON ESTABLECERSE EN DIFERENTES SUBSTRATOS

Substrato	Observaciones
Agrolita	8 sobrevivientes, plántulas con apariencia clorótica, hojas pequeñas y tallos delgados
Tierra : agrolita 1:3	4 sobrevivientes, plántulas con hojas verdes y tallos más gruesos
Agrolita : germinasa 1:3	12 sobrevivientes, plántulas con hojas grandes, verdes y tallos gruesos

agrolita.- material inerte constituido por silicatos, mejorador de la textura del suelo

Como se observa en el cuadro el sustrato más compacto (mezcla de tierra: agrolita 1:3) se contaminó con hongos que atacaron también a las semillas aún cuando se aplicó fungicida para contrarrestar el ataque, las plántulas presentaron una apariencia sana con hojas verdes y tallos gruesos. Cuando el sustrato fue muy poroso (agrolita) se marchitaron los ápices, debido a que el agua de riego se drenó muy rápidamente, resultando deficiente la cantidad de agua disponible para la plántula, además de que con este sustrato presentaron una apariencia poco vigorosa, ya que sus tallos fueron delgados, las hojas fueron más pequeñas y la coloración de la plántula era clorótica.

El mejor resultado se obtuvo con la mezcla de agrolita: germinasa 1:3 ya que se observó, que este sustrato retenía la cantidad de agua necesaria para el establecimiento de las plántulas a las condiciones de invernadero y aunque hubo ataque por hongos, éstos se pudieron contrarrestar con la aplicación de fungicida, las plántulas que germinaron en este sustrato fueron vigorosas con tallos gruesos, erectos y hojas con una coloración verde intenso.

CONDICIONES DE INVERNADERO PARA EL ESTABLECIMIENTO DE PLÁNTULAS

Una de las principales limitantes para el establecimiento de la plántula es la cantidad de humedad relativa disponible. Las plántulas requieren de una humedad muy alta, tanto en el sustrato como en el ambiente. Para lograr establecerse en condiciones de invernadero, y obtener esta condición se colocaron vasos de plástico sobre las macetas, lo que produjo un aumento de temperatura y por consecuencia se favoreció el ataque por hongos, motivo por el cual se aplicó un fungicida para detener el ataque. Cabe mencionar que cuando no se coloca esta cubierta, no se realiza el establecimiento de la plántula en el sustrato. Los riegos se realizaron cada tercer día.

Cuando la planta tuvo sus primeras hojas verdaderas, algunas presentaron clorosis, posiblemente por la presencia del vaso de plástico que disminuyó el paso de luz hacia la planta. Pero cuando se eliminaba esta protección, las plantas se vieron afectadas por el cambio drástico de humedad y murieron, por lo que fue necesario hacer pequeños orificios al vaso protector gradualmente hasta eliminarlo completamente, para que la planta se fuera adecuando al cambio de humedad. Posteriormente, se colocaron las macetas a la sombra de otras plantas para simular las condiciones de su hábitat natural y observamos que las plantas en estas condiciones de crecimiento se mostraron más vigorosas.

Otro factor importante para el establecimiento, es el tipo de luz que requiere la plántula, se observó que se presentó un crecimiento más vigoroso cuando se expuso a luz indirecta, esta condición de luz corresponde a la que se encuentra en su ambiente de origen.

ANÁLISIS FITOQUÍMICO

MATERIAL OBTENIDO DE CAMPO

Recolecta 2

De la recolecta de material biológico realizada en el mes de marzo se tomaron 100 g de material para extraerlo con hexano. El extracto obtenido proporcionó 0.8411 g de residuo, el cual se analizó por cromatografía en capa fina.

El residuo fue tratado con hexano caliente y posteriormente filtrado, se obtuvo un polvo color naranja (51 mg), Mata y col. 1990, reportan que en esta fracción se presenta a friedelina, razón por la cual posteriormente se realizó una cromatografía en capa fina de este polvo, observándose efectivamente la presencia de este compuesto.

Recolecta 3

De este material (hojas jóvenes y maduras, tallos y raíces de un mismo individuo), se obtuvieron los extractos hexánicos de los cuales se calcularon los rendimientos para cada estructura, cuadro No. 20.

TABLA No. 20 RENDIMIENTOS DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICOS DE DIFERENTES
ÓRGANOS DE *Hippocratea excelsa*

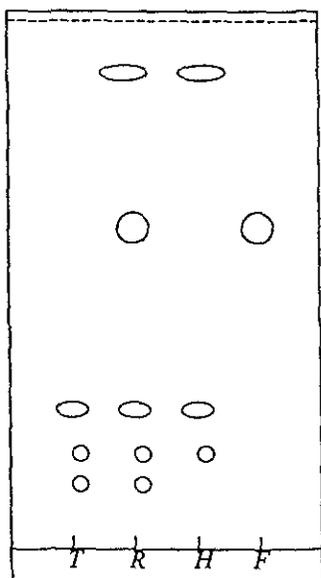
Órgano	Peso del extracto en gramos	%
Raíz	1.4541	1.45
Tallo	0.6696	0.67
Hoja	1.0337	1.12

Se observó que la raíz presentó el mayor rendimiento del extracto, seguida de la hoja y es del tallo el órgano del que se obtuvo el menor rendimiento. El perfil cromatográfico en capa fina de los extractos de las raíces, tallos y hojas utilizando la

friedelina como estándar determinó que solamente en la raíz está presente dicho metabolito (Fig. 1).

Fig. 1 Perfil cromatográfico de hojas, tallos y raíces con friedelina como estándar

□

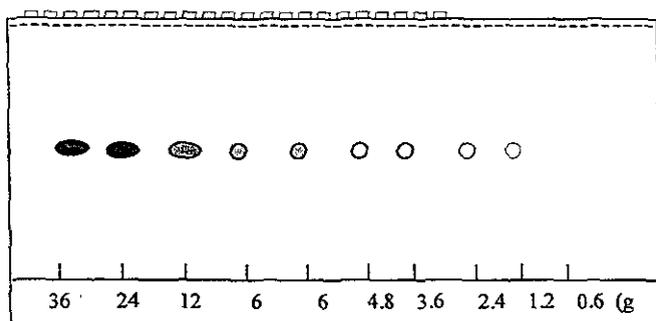


Sistema de Elución Hexano: AcOEt 9:1

T= Tallo
R= Raíz
H= Hoja
F= Friedelina

Del perfil cromatográfico que se realizó para determinar la sensibilidad de la cromatografía en capa fina, se determinó que la concentración más baja de friedelina que puede ser detectada por esta técnica es de 1.2 μg , (Fig.2).

Figura 2. Perfil cromatográfico de diferentes concentraciones de friedelina



Sistema de Elución
Hexano:AcOEt 9:1

MATERIAL OBTENIDO DEL CULTIVO DE TEJIDOS

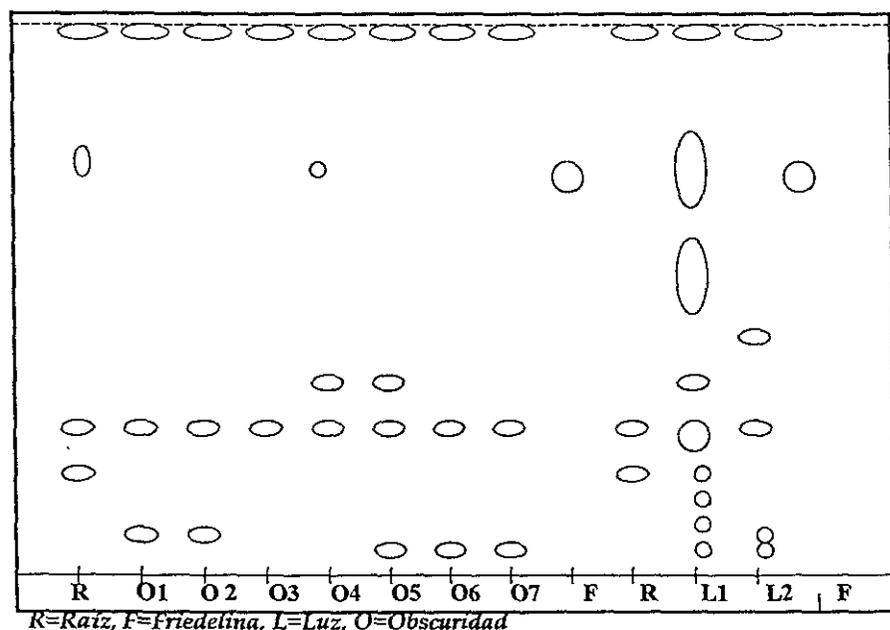
Por otra parte, se llevó a cabo la liofilización de los medios en los que crecieron los callos, así como también de algunos de éstos últimos, para realizar las extracciones y determinar la presencia del compuesto de interés en los mismos.

Se obtuvieron los perfiles cromatográficos de todas las extracciones realizadas, y se utilizó friedelina como estándar.

Del cromatograma obtenido de los extractos de callos y medios nutritivos, se pudo observar lo siguiente:

- El perfil cromatográfico de los medios nutritivos y de los callos fue semejante, en el sistema de eluyente utilizado (Hexano: Acetato de etilo 9:1).
- El perfil cromatográfico de los medios nutritivos y callos presenta una gran similitud con el perfil cromatográfico de la raíz Fig 3, la numeración corresponde a los diferentes subcultivos.

Fig. 3 Perfil cromatográfico de medios nutritivos, callos y raíces.



R=Raíz, F=Friedelina, L=Luz, O=Oscuridad

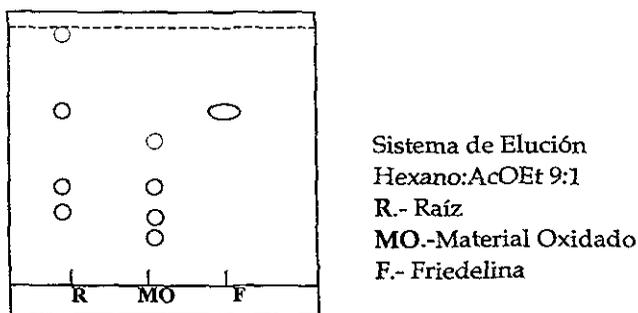
1, 3, 5 y 7=callos de los subcultivos 1-4 respectivamente

2, 4 y 6 = medios nutritivos de los subcultivos 1-3 respectivamente

La presencia de friedelina es dudosa en los medios y callos posiblemente debido a la concentración a la que se encuentra en los extractos, por lo que se hizo necesario utilizar un método de detección más sensible como lo es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), así como poner a punto las condiciones de corrimiento de la friedelina.

Del material de desecho del subcultivo de semillas (material oxidado principalmente) se realizó también una extracción hexánica obteniéndose un aceite (1.0248 g) al cual se determinó su perfil cromatográfico con el fin de establecer similitud con el extracto de raíz Fig. 4.

Fig. 4 Perfil cromatográfico de raíz, material oxidado y friedelina



DETERMINACIÓN DE FRIEDELINA POR CLAR

El tiempo de retención para la friedelina en el Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, fue de 3.40 minutos, observándose el mismo pico, en los cromatogramas de los extractos de: raíz, callos obtenidos de semillas, células en suspensión de la primera generación y medios nutritivos del callo. De acuerdo a estos resultados la síntesis de friedelina se presenta desde que las células se encuentran indiferenciadas y que las células la secretan al medio.

Por lo que parecería que las células no requieren de la diferenciación morfológica para iniciar la síntesis de friedelina, por otra parte hay que tomar en cuenta que si bien la célula no presenta una real diferenciación celular, si podemos observar ciertos cambios que podrían ser bioquímicos y tal vez formen parte del proceso de diferenciación.

La pregunta que surge entonces es: ¿estos cambios se mantienen y transfieren a las generaciones celulares que se derivan de estas células?, ya que cuando se obtienen los cultivos celulares en suspensión, ya no encontramos esta "diferenciación" y sin embargo pudimos detectar friedelina en estos cultivos.

ESTA FASE NO SALE
DE LA FASE DE CULTIVO

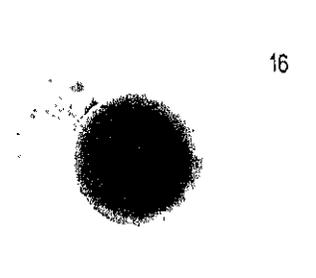
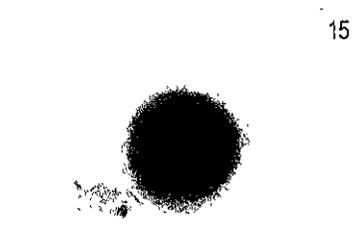
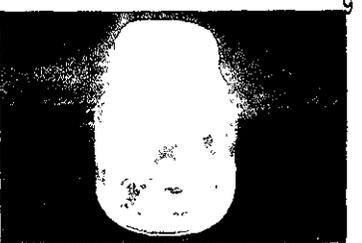
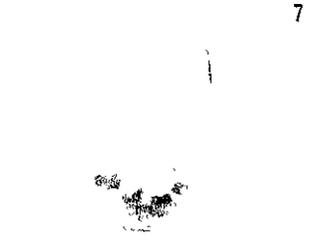
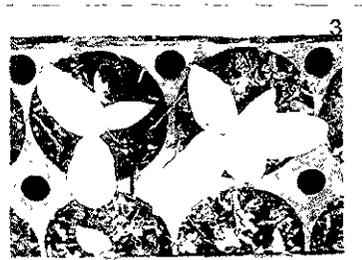
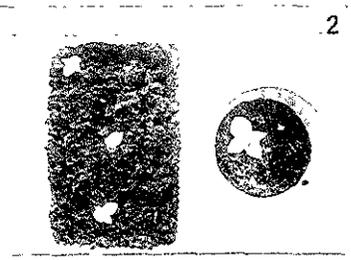
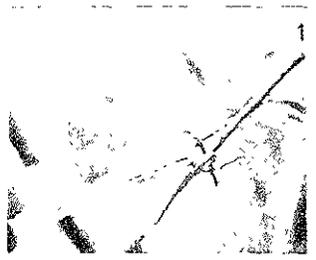
En un gran número de estudios ha sido demostrado que la formación de productos secundarios así como su sitio de almacenaje pueden estar restringidos a ciertas etapas de desarrollo de la planta, órganos específicos, tejidos, o células especializadas. En las plantas es generalmente aceptado que existe una fuerte correlación entre la expresión del metabolismo secundario y la diferenciación citológica morfológica (Luckner, 1971; Bohm, 1977, citados por Wiermann, 1981). El metabolismo secundario es considerado un aspecto del proceso de desarrollo. Sin embargo resultados obtenidos de experimentos con cultivos celulares han mostrado que no es necesaria una diferenciación morfológica específica para la formación de productos secundarios (Wiermann, 1981).

Por otra parte sería interesante analizar por qué el compuesto se secreta al medio nutritivo, esta situación pudiera ser de gran utilidad, si se presentara este fenómeno en la síntesis de todos los metabolitos secundarios, ya que podríamos obtener los compuestos de interés, sin tener que sacrificar los cultivos celulares.

Wierman (1981) menciona dos principios que determinan la acumulación de compuestos secundarios:

(1) En algunos tejidos vegetales, cada célula es potencialmente capaz de sintetizar y acumular estos productos, (2) en otros tejidos existen células que se especializan en el almacenamiento de productos secundarios, en tales células, conocidas como ideoblastos, la acumulación se correlaciona con una diferenciación morfológica específica. Se han visto ejemplos en la acumulación de alcaloides, en células distintas a las que acumulan estos compuestos, así también como en la excreción de terpenoides y flavonoides por células glandulares específicas.

Es posible que al no presentar células especializadas para el almacenaje de la friedelina, las células secretan este compuesto al medio nutritivo.



5. CONCLUSIONES

Del material biológico que se recolectó en el campo para el cultivo de tejidos, se puede decir que las yemas y las semillas son los más favorables para la obtención de las respuestas morfogénicas. En las demás estructuras se sugiere como alternativa viable el establecimiento de plántulas en condiciones de invernadero para obtener explantes de hojas y yemas y realizar los ensayos pertinentes para solucionar los problemas de contaminación que se presentaron al tratar de establecerlas *in vitro*.

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Se obtuvieron callos a partir de: semillas, hojas jóvenes y yemas, por lo que se puede concluir que el proceso de desinfección para estas estructuras fue satisfactorio y los medios de cultivo empleados promovieron la formación de callo.

El medio nutritivo en el que se lograron los mejores resultados para la obtención de callo, fue el medio MS, mientras que el mejor explante para la obtención de callo fue la semilla escarificada.

Se obtuvieron cuatro diferentes tipos de callo, siendo el más abundante el que presentó una coloración café-parda.

La densidad celular de los cultivos de células en suspensión, aumentó considerablemente, en comparación con la del callo obtenido de medios nutritivos sólidos.

Los índices de crecimiento de los cultivos de células en suspensión, indican que la adecuación al medio líquido, repercute notablemente en la tasa de duplicación de las

plántulas, pasando de 6.26 días en la primera generación a 4.74 días en la segunda generación.

ENSAYOS DE GERMINACIÓN *in vivo*

Las mejores condiciones para la germinación de las semillas fueron: la scarificación manual, una alta humedad atmosférica y temperatura de 30 (C.

El mejor sustrato para el establecimiento de las plántulas, fue la mezcla de agrolita: germinasa: 1:3.

Las mejores condiciones ambientales para el establecimiento de las plántulas, fueron de umbría y de riego diario, así como con la aplicación de fungicida para la eliminación de hongos.

ANÁLISIS FITOQUÍMICO

El perfil cromatográfico de raíz, hojas y tallos de la especie recolectada en el campo, indica la presencia de friedelina solamente en la raíz.

La técnica de cromatografía en capa fina, presentó limitaciones en la detección de la concentración (hasta 1.2 µg), que se encuentra reportada para el compuesto dentro de la planta.

La identificación de friedelina se realizó por medio de una Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), comparando los tiempos de retención observados en los extractos analizados, contra el tiempo de retención de la friedelina.

Las muestras en las que se detectó la presencia de friedelina fueron los extractos hexánicos de: callos provenientes de semilla, medios nutritivos en donde crecieron estos

allos, las células en suspensión obtenidas en la primera generación, así como también la acción insoluble del extracto de raíz de la especie recolectada en el campo.

.1 RECOMENDACIONES

Evidentemente, el cultivo de tejidos nos proporciona muchas ventajas en el estudio de plantas que tienen una problemática de establecimiento o permanencia en sus ambientes naturales, por ser especies con valor comercial. Pero también presenta una serie de problemas (contaminación, manejo de reguladores de crecimiento, elección de medios nutritivos óptimos, condiciones de incubación), que no son fáciles de resolver para el establecimiento de los cultivos *in vitro*.

De este estudio y de los citados anteriormente, se observa que la producción de compuestos de interés farmacológico mediante el cultivo de tejidos vegetales, es posible.

El incremento en la producción de metabolitos secundarios, a través de la incorporación de precursores al medio nutritivo, o de la inducción de algún tipo de estrés biótico o abiótico, es una línea de investigación que se ve muy prometedora y factible.

Para la propagación de esta especie por cultivo de tejidos es necesario realizar más ensayos o trabajos que estén encaminados a su micropropagación por lo que la presente investigación propone algunas metodologías que pudieran aplicarse y lograr este objetivo en futuras investigaciones. En tanto se alcanza esta meta, su propagación *in vivo* a través de semillas es una buena alternativa.

Para estudios posteriores de cultivos de células en suspensión, se sugiere, utilizar cultivos que se encuentren adecuados totalmente al medio líquido, ya que se observó que cuando las células en suspensión de *Hippocratea excelsa* se mantuvieron en

condiciones de crecimiento en la 4ª y 5ª semanas, la densidad celular se incrementó considerablemente, lo que permitiría el incremento de la producción del compuesto a través de la generación de un estrés.

ANEXO I
MEDIOS NUTRITIVOS

Medio Murashige & Skoog (1962).

Compuesto	mg l ⁻¹
<u>Macronutrientes</u>	
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
<u>Micronutrientes</u>	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.3
<u>Vitaminas</u>	
Mio-inositol	100
Tiamina	0.1
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5
Composición Iónica de Macronutrientes	meq/l⁻¹
NO ₃ ⁻	39.4
H ₂ PO ₄ ⁻	1.3
SO ₄ ²⁻	3.0
Cl ⁻	6.0
K ⁺	20.0
Ca ²⁺	6.0
Mg ²⁺	3.0
NH ₄ ⁺	20.6
N Total	60.0
NH ₄ ⁺ por N Total	0.34
Σ I ⁺	49.6
N/Σ I	0.60
H ₂ PO ₄ ⁻ / Σ I	0.013
K ⁺ / Σ I	0.20
Concentración Iónica Total	93.3

Medio Heller (1953)

Compuesto mg l⁻¹

Macronutrientes

NaNO ₃	600
CaCl ₂ ·2H ₂ O	75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250
KCl	750
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	125

Micronutrientes

MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	14.0
H ₃ BO ₃	1.0
KI	0.01
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.03
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.0
AlCl ₃	0.03
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.03

Vitaminas

Tiamina 1.0

Composición Iónica de Macronutrientes meq/l⁻¹

NO ₃ ⁻	7.1
H ₂ PO ₄ ⁻	0.9
SO ₄ ²⁻	2.0
Cl ⁻	11.1
K ⁺	10.1
Ca ²⁺	1.0
Na ⁺	8.0
N Total	7.1
Σ I ⁺	21.1
N/Σ I	0.17
H ₂ PO ₄ ⁻ / Σ I	0.022
K ⁺ / Σ I	0.24
Concentración Iónica Total	39.6

Medio Lloyd & McCown (1981)

Compuestomg l⁻¹

Macronutrientes

NH ₄ NO ₃	400
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	556
CaCl ₂ ·2H ₂ O	96
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
K ₂ SO ₄	990

Micronutrientes

MnSO ₄ ·H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.3
<u>Gly & AA 2 mg/l</u>	

Vitaminas

Mio-inositol	100
Tiamina	0.1
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5

Composición Iónica de Macronutrientes meq/l⁻¹

NO ₃ ⁻	9.7
H ₂ PO ₄ ⁻	1.3
SO ₄ ²⁻	14.4
Cl ⁻	1.3
K ⁺	12.6
Ca ²⁺	6.0
Mg ²⁺	3.0
NH ₄ ⁺	5.0
N Total	14.7
NH ₄ ⁺ por N Total	0.34
Σ I ⁺	26.6
N/Σ I	0.28
H ₂ PO ₄ ⁻ / Σ I	0.023
K ⁺ / Σ I	0.24
Concentración Iónica Total	41.5

ANEXO II
COMPOSICIÓN DE VITAMINAS MS Y CÓCTELES 4 Y 20.

Compuesto	Vitamina MS	Cóctel 4	Cóctel 20
	g/100 ml	g/100 ml	mg/100 ml
Myo-inositol	1.0	1.0	14.5
Ácido nicotínico	0.01	0.005	0.15
Piridoxina	0.01	0.005	0.15
Tiamina	0.02	0.010	0.3
L-asparagina			1.0
L-arginina			1.0
L-ác. aspártico			0.75
Glicina			2.3
Glutamina			6.0
Ac. glutámico			0.75
Biotina			0.1
Ac. fólico			0.1
Riboflavina			0.01
Urea			4.5

BIBLIOGRAFÍA

- Alferman A. W., Petersen M. 1995. Natural product formation by plant cell biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 43: 199-205.
- Alvarado Gómez O. G. 1990. Caracterización *in vitro* de la tolerancia de *Chenopodium quinoa* Willd. a la salinidad (NaCl). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas Centro de Genética Montecillo, México.
- Alvarenga N. L., Velázquez C. A., Gómez R., Canela N. J., Bazzochi I. L. & Ferro E. A. 1999. A new antibiotic nortriterpene quinone methide from *Maytenus catingarum*. *J. Nat. Prod.* 62:750-751.
- Avilla J., Teixido A., Velázquez C., Alvarenga N., Ferro E. & Canela R. 2000. Insecticidal activity of *Maytenus* species (Celastraceae) Nortriterpene quinone methides against codling moth, *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Agric. Food Chem.* 48:88-92.
- Brahma R., Sukumar E., Kundu A.B., & Patra A. 1990. A triterpenoid from *Pristimera brahamii*. *Phytochemistry* 29(6): 2027-2029.
- Bonga J.M. & Aderkas P.V. 1992. *In vitro* Culture of Trees. Forestry Sciences, , volumen 8, Kluwer Academic Publishers. London.
- Calzada F., Mata R., López R., Linares E., Bye R., Barreto V.M. & Rio F. 1991. Friedelanes and triterpenoid quinone methides from *Hippocratea excelsa*. *Planta Medica* 57(2):194-195.
- Calzada F. & Mata R. 1995. Hippocrateine III, A sesquiterpene alkaloid from *Hippocratea excelsa*. *Phytochemistry* 40 2:583-585.
- Corsino J., Bolzani V. S., Pereira A. M., Franca S. C., & Furlan M. 1998. Bioactive sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*. *Phytochemistry* 48 (1):137-140.
- Cronquist A. 1981. *An Integral System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University. 1262p.
- Chávez H., Valdivia E., Estévez-Braun, A. & Ravelo, A. G. 1998. Structure of new bioactive triterpenes related to 22-(β -hidroxi-tingenona. *Tetrahedron* 54:13579-13590.

- Chávez H., Callo N., Estévez-Braun A., Ravelo A.G. & González A. G. 1999a. Sesquiterpene polyol esters from the leaves of *Maytenus macrocarpa*. *J. Nat. Prod.* 62:1576-1577.
- Chávez H., Estévez-Braun A., Ravelo A. G., & González A. G. 1999b. New phenolic and quinone-methide triterpenes from *Maytenus amazonica*. *J. Nat. Prod.* 62:434-436.
- Dhawan B.N., Patnaik G. K., Rastogi R. P., Sing K.K., Tandon J.S. 1977. Screening of Indian Plants for Biological activity. VI. *Indian J. Exp. Biol.* 15: 208-219.
- Dicosmo F. (Towers G. 1988. *Stress and Secondary Metabolism in Cultures Plant Cells*. Chapter five 97-175.
- Duan H., Kawazoe K. & Takaishi Y. 1997. Sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium hypoglaucum*. *Phytochemistry* 45 (3):617-621.
- Duan H. & Takaishi Y. 1998. Structures of sesquiterpene polyol alkaloids from *Tripterygium hypoglaucum*. *Phytochemistry* 49 (7):2185-2189.
- Duan H. & Takaishi Y. 1999. Sesquiterpene evoninate alkaloids from *Tripterygium hypoglaucum*. *Phytochemistry* 52:1735-1738.
- Enasksha R.M. W. & Arteca R N. 1993. Taxus callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and taxol production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 35:181-193.
- Figueroa J. N., Ráz B., & Séquin U. 1998. Novel quinone methides from *Salacia kraussii* with *in vitro* antimalarial activity. *J. Nat. Prod.* 61:718-723.
- Fonseca R. M. 1995. No. 3 Hippocrateaceae en Flora de Guerrero. Editores Diego-Pérez N y Fonseca R. M. Facultad de Ciencias, UNAM, Las Prensas de Ciencias. México. 12 p.
- Fujita R., Duan H. & Takaishi Y. 2000. Terpenoids from *Tripterygium hypoglaucum*. *Phytochemistry* 53:715-722.
- George E.F., & Sherrington P.D. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture Handbook and Directory of Commercial laboratories*. Exegetics Limited. 690 p.
- González A.G., Bazzochi Y., Ravelo A.G., Luis G. J. & Domínguez X.A. 1989. Triterpenos de *Hippocratea celastroides* (Celastraceae). *Rev. Latin. Quím.* 20(1):17.

- González A. G., Jiménez I. A., Ravelo A. G., Coll J, González J. A. & Llori J. 1997. Antifeedant activity of sesquiterpenes from Celastraceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 25 (6): 513-519.
- Hatano K., Kamura K.& Nishiota I. 1988. Clonal multiplication of *Aconitum carmichaeli* by Tip Tissue Culture and alkaloid contents of clonally propagated plant. *Planta Medica* 152-155.
- Heinrich M., Kuhnt M., Wright C. W., Rimpler H., Phillipson J. O. & Narhuist D. C. 1992. Parasitological and Microbiological Evaluation of Mixe Indean medicinal Plants (México). *J. Ethnopharmacology* 36 (1):81-85.
- Heller R. 1953. Recherches sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Biol. Veg.* 14:1-223.
- Hussein G., Nakamura N., Meselhy M. R. & Hattori M. 1999. Phenolics from *Maytenus senegalensis*. *Phytochemistry* 50:689-694.
- Kuo Y. H., & Kuo L. M. Y. 1997. Antitumour and anti-Aidas triterpenes from *Celastrus hindsii*. *Phytochemistry* 44 (7):1275-1281.
- Li W., Li B., Chen Y. 1999. Sesquiterpene alkaloids from *Tripterygium hypoglaucom*. *Phytochemistry*. 50 1091-1093.
- Lloyd G. & Mc.Cown B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Prog. Int. Plant. Prop. Soc.* 30:421-427.
- López Cedeño R. 1989. Estudio Fitoquímico preliminar de la *Hippocratea excelsa*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química UNAM, México D.F.
- Lozoya L. X. 1986. Plantas medicinales y Medicina en México: la existencia de un conflicto cultural subyacente. La herbolaria en México. Cuadernos de Extensión Académica 36, Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación de Difusión Cultural.
- Mata R., Calzada F., Díaz E. & Toscano R. 1990. Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine XV. Sesquiterpene evoninoate alkaloids from *Hippocratea excelsa*. *J. Nat. Prod.* 53(5):1212-1219.
- Moore T.C.1989. *Biochemistry and Physiology of Plant Hormones*. Springer-Verlag. New York Inc. USA. 330 pp.

- Murashige T., & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- Nakano K., Oose Y., Masuda Y., Kamada H. & Takaishi Y. 1997a. A diterpenoid and triterpenes from tissue cultures of *Tripterygium wilfordii*. *Phytochemistry* 45 (2):293-296.
- Nakano K., Oose Y. & Takaishi Y. 1997b. A novel epoxy-triterpene and nortriterpene from callus cultures of *Tripterygium wilfordii*. *Phytochemistry* 46 (7):1179-1182.
- Nakano K., Yoshida Ch., Furukawa W., Takaishi Y. & Shishido K. 1998. Terpenoids in transformed root culture of *Tripterygium wilfordii*. *Phytochemistry* 49 (6):1821-1824.
- NAPRALERT. (1997) NATURAL PRODUCTS ALERT(Database by the Board of Trustees Program for Collaborative Research in the Pharmaceutical Sciences. Dept. of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy. College of Pharmacy of the University of Illinois at Chicago, U.S.A. 833 South Wood St. Chicago, Ill. 60612 U. S. A.
- Palacios J., Mata R., López R., Linares E. & Bye R. 1989. Notes on economic plants. *Econ. Bot.* 43 4:508-509.
- Pérez R. M., Pérez S., Zavala M. A. & Salazar M. 1995. Anti-Inflammatory activity of the bark of *Hippocratea excelsa*. *J. Ethnopharmacology* 47(2):85-90.
- Pistelli L., Venturi R., Marsili A. & Morelli I. 1998. Alkaloids and coumarins from *Gymnosporia senegalensis* var. *spinosa* (Celastraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 26:677-679.
- Popoca J., Aguilar A., Alonso D. & Villarreal M. L. 1998. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 59 173-177
- Rech S.B., Batista C. V. F., Schripsema J., Verpoorte R. & Henriques A.T. 1998. Cell cultures of *Rauwolfia sellowii*: growth and alkaloid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 61-63.
- Robledo Paz A. 1987. Diferenciación de brotes adventicios en cotiledones de *Pinus maximartinezzi*, Rzedowski cultivados *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM. México D.F.
- Rout G.R., Samantaray S., Das P. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances.* 18:91-120.
- Rzedowski J, 1984. Vegetación de México. Limusa. México. 397 p.

nchez S.R., 1991. Evaluación de la actividad antiúlceroza de *Mentha potegium* (culche) y *Hemiangium excelsum* (Cancerina) en rata Wistar. Tesis de Licenciatura, NEP Zaragoza, UNAM, México D.F.

mola L.K. & Nieminen S. 1988. Tropane alkaloids from *Atropa belladonna*, Part II: Interaction of origin, age, and environment in alkaloid production of callus cultures. *J. Nat. Prod.* 51(2):234-242.

rdjan J. & Cornelis D. G. 1995. The production of pyrethrins by *In Vitro* systems. *Critical Reviews in Biotechnology* 15 (2):125-138.

rauch M. M. 1989. Historia de la biotecnología. *Ciencia y Desarrollo*. México. 24 (1):19-32.

reet H. 1974. *Tissue Culture and Plant Science*. Academic Press, London. England. 202 p.

akumar E., Bhima R.R., & Kundu A.B. 1990. A friedelane triol from the roots of *Pristimera grahamii*. *Phytochemistry* 29(9):3044-3046.

akumar R., Hamsaveni G., Bhima R. & Kundu A.B. 1991. Pharmacological investigations on *Pristimera grahamii* leaves. *Fitoterapia* 27(5):429-433.

akaishi Y., Wariishi N., Tateishi H., Kawazoe K., Nakano K., Ono Y., Tokuda H., Ishino H., & Iwashima A. 1997. Triterpenoid inhibitors of interleukin-1 secretion and tumour-promotion from *Tripterygium wilfordii* var. *regelii*. *Phytochemistry* 45 (5):969-974.

horpe T. A. 1978. *Frontiers of plant tissue Culture*. International Association for Plant Tissue Culture. University of Calgary Alberta Canada.

ribe F. L. 1998. Influencia de distintos antioxidantes sobre brotación y crecimiento *in vitro* en ceiba (*Ceiba pentandra*). Tesis Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México D.F.

ilegas J. H., Lancas F. M., Wauters J. N., & Angenot L. 1998. Characterization of adulteration of "Espinheira Santa" (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*, Celastraceae). Hydroalcoholic extracts with *Sorocea bomplandii* (Moraceae) by High-performance thin layer chromatography. *Phytochem. Anal.* 9:263-266

ilegas W., Sanommiya M., Rastrelli L., & Pizza C. 1999. Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion. *J. Agric. Food Chem.* 47:403-406.

Whitmer S., Verpoorte R & Canel C. 1998. Influence of auxins alkaloid accumulation by a transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 53: 135-141.

Wiermann R. 1981. Secondary Plant products and cell and Tissue Differentiation, *The Biochemistry of Plants*, Vol. 7 Academic Press, Inc 85-111.

Ziv M. 1991 Vitrification: Morfological and Physiological disorders of *in vitro* plants. In Deberg P.C. & Zimmerman R. H. (eds). *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands pp 45-69.