

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

RESPUESTA DE LA ESPECIE TRES PUNTAS (Neurolaena lobata L.)
A LA PROPAGACION IN VITRO

TESIS
PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR
ROY WALTER VILLACINDA MALDONADO

En el acto de investidura como
INGENIERO AGRONOMO

EN
SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA
EN EL GRADO ACHEMICO DE

LICENCIADO

Guatemala, abril de 1994

10/1/00

10/1/00

DC
01
(148)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Dr. ALFONSO FUENTES SORIA

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO	Ing. Agr. Efraín Medina Guerra
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr. Maynor Estrada Rosales
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
VOCAL TERCERO	Ing. Agr. Carlos Motta de Paz
VOCAL CUARTO	P. Agr. Milton Sandoval Guerra
VOCAL QUINTO	Br. Juan Gerardo De León
SECRETARIO	Ing. Agr. Marco Romilio Estrada

11/11

11/11

Guatemala, 26 de abril de 1994

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señores miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a consideración de ustedes, el trabajo de tesis titulado:

"RESPUESTA DE LA ESPECIE TRES PUNTAS (Neurolaena lobata L.)
A LA PROPAGACION IN VITRO"

Presentado como requisito previo a optar el Título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciado.

Atentamente,



Roy Walter Villacinda Maldonado

100

100

ACTO QUE DEDICO

A DIOS: Todopoderoso, por permitirme conocer parte de lo que es naturaleza.

A MIS PADRES: Edelia Esperanza Maldonado y Pablo Julián Villacinda.
Que con amor y sacrificios me han guiado y formado por el camino de la vida.

A LA MEMORIA DE: Mis abuelos: Gregoria Delfina, Matilde Florentín y Francisco Rogelio; mi Tío Victor Manuel Maldonado.

A: Mi familia en general.

10/1/70

10/1/70

PROCEEDINGS OF THE BOARD OF DIRECTORS
OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
AT BERKELEY
OCTOBER 1, 1970

TESIS QUE DEDICO

A MIS HERMANOS: Astrid Violeta y Julio Francisco.
Por su apoyo y comprensión.

A MI ABUELA: Juana Bánaca.

A MIS SOBRINOS: Sandra Gabriela, Wendy Fabiola, Vivian
Esperanza, Estefany Eunice y Juan Pablo.

A MIS CUÑADOS: Luis Emilio y Blanca Estela.

A: Mis Tías y Tíos en general.

Guatemala

San Marcos

Mis centros de estudios: Naciones Unidas e Instituto
Normal Mixto de Occidente.

La Universidad de San Carlos de Guatemala.

La Facultad de Agronomía.

Mis amigos con los que convivimos en los cursos de
Sistemas de Cultivos.

Los impulsores del cultivo de tejidos en Guatemala.

Mis amigos en general.

11

12

AGRADECIMIENTO

A: Mi asesor Ing. Agr. Hector Ramazzinni, por su orientación científica e involucramiento incondicional en el transcurso del presente trabajo.

El Ing. Agr. Ruperto Fuentes y el Sr. Reginaldo Soma por el apoyo técnico y moral en el transcurso de la investigación.

El Ing. Agr. Fernando Rodriguez, por su orientación científica.

Los ingenieros Agrónomos Domingo Amador y José Calderón, por la asesoría en el inicio de la investigación.

El Ing. Agr. Eduardo Pretzanzin, por su amabilidad en la revisión del documento.

El Sr. Pablo Moreno, por proporcionarme información referente al tema.

La familia Morales Bolaños e Ing. Agr. Ernesto Yac, por su amabilidad y Hospitalidad para poder redactar el informe final.

Mi Tío Alberto Fuentes y Sra. Lidia de Fuentes.

El Sr. Felipe Esqueque, por su participación en la colecta del material vegetal.

Las personas relacionadas con la subárea de manejo y mejoramiento de plantas de la Facultad de Agronomía.

Quienes de diferente manera participaron en mi formación académica y en la realización del presente trabajo.

10/1/10

10/1/10

10/1/10

CONTENIDO

	PAGINA
CONTENIDO	vii
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE CUADROS	x
RESUMEN	xii
1. INTRODUCCION	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3. MARCO TEORICO	5
3.1 Marco conceptual	5
3.1.1 Las plantas medicinales	5
3.1.1.1 Los principios activos	5
3.1.1.2 El uso de la medicina tradicional	7
3.1.1.3 El uso de las plantas medicinales	8
3.1.1.4 Mejora de las plantas medicinales	10
3.1.2 El cultivo de tejidos	11
3.1.2.1 El cultivo de meristemas	13
3.1.2.2 El cultivo de callos	14
3.1.2.3 Medios de cultivo	17
3.1.3 Los reguladores del crecimiento	17
3.1.3.1 Tipos básicos	18
3.1.4 Compuestos suplementarios del medio de cultivo	21
3.1.4.1 El agua de coco (AC)	21
3.1.5 La oxidación en el cultivo de tejidos	22
3.2 MARCO REFERENCIAL	24
3.2.1 Algunas investigaciones en cultivo de tejidos	24

1

100

100

100

3.2.2	Tres Puntas (<i>Neurolaena lobata</i> L.)	26
3.2.2.1	Descripción general	26
3.2.2.2	Características botánicas	26
3.2.2.3	Distribución geográfica	27
3.2.4.4	Propiedades toxicológicas	30
3.2.5.5	Usos medicinales	30
3.2.2.6	Actividad hipoglicemiante	31
3.2.2.7	Pruebas de propagación de la especie	33
4.	OBJETIVOS	40
5.	METODOLOGIA	41
5.1	Localización del área experimental	41
5.2	Material vegetal	41
5.3	Desarrollo de la investigación	41
5.3.1	Fase 1. Colecta del material	41
5.3.2	Fase 2. Etapa de laboratorio	42
5.3.2.1	Cultivo de meristemos	42
5.3.2.2	Cultivo de callos	45
5.4	Evaluación de la investigación	49
5.4.1	Cultivo de meristemos	49
5.4.1.1	Tratamientos	49
5.4.1.2	Variables consideradas	51
5.4.2	Cultivo de callos	51
5.4.2.1	tratamientos	51
5.4.2.2	Variables consideradas	53
5.4.3	Análisis de la información	53
6.	RESULTADOS Y DISCUSION	54
6.1	Cultivo de meristemos	54

100

100

8.1.1	Tipos de respuesta	54
8.1.1.1	Oxidación y muerte de meristemas	55
8.1.1.2	Oxidación y formación de callo	58
8.1.1.3	Crecimiento y formación de callo	57
8.1.2	La oxidación del meristemo	60
8.1.3	Métodos de desinfección	62
8.2	Resultados del cultivo de callos	85
8.2.1	Primer ensayo: Respuesta del cultivo en el medio MS, con 0.5 mg/L. de ácido giberélico, BAP, ANA y AIB a diferentes concentraciones	85
8.2.1.1	Características cuantitativas y Regeneración de plantas	85
8.2.1.2	Características cualitativas	70
8.2.2	Segundo ensayo: Respuesta del cultivo en el medio MS, GA3, BAP y AIA a diferentes dosis.	
8.2.2.1	Características cuantitativas	72
8.2.2.2	Características cualitativas	75
8.2.3	Tercer ensayo: Respuesta del cultivo en el medio MS, KIN, AC, BAP y ANA, diferentes dosis.	77
8.2.3.1	Características cuantitativas	77
8.2.3.2	Características cualitativas	80
8.3	Análisis comparativo entre ensayos	82
8.3.1	Regeneración de plantas	82
8.3.2	Comportamiento cuantitativo y cualitativo	82
8.3.2.1	Comportamiento cuantitativo	82
8.3.2.2	Comportamiento cualitativo	84
7.	CONCLUSIONES	88
8.	RECOMENDACIONES	88
9.	BIBLIOGRAFIA	89
10.	APENDICE	92

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1	49

1 Proceso del cultivo de meristemas y el cultivo de a partir de la inducción de callo.

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PAGINA
1	23
2	35
3	38
4	38
5	38
6	38
7	43
8A	93
9	47

1 Pruebas de germinación de 3 poblaciones de Neurolaena lobata L., en tres sustratos (1992).

2 Pruebas de germinación a nivel de laboratorio, semillas sin pretratamiento, en cinco poblaciones de Neurolaena lobata L.(1993).

3 Pruebas de germinación a nivel de laboratorio, semillas con pretratamiento, en cinco poblaciones de Neurolaena lobata L. (1993).

4 Pruebas de germinación en invernadero de cinco poblaciones de Neurolaena lobata L.(1993).

5 Propagación de Neurolaena lobata L. material colectado en la Unión, Zacapa, (1993).

6 Propagación de Neurolaena lobata L., segunda colecta, en la Unión, Zacapa.

7 Niveles de reguladores del crecimiento en mg/L., adicionados al medio MS, para el cultivo de meristemas.

8A Medio de cultivo (MS) (1982).

9 Reguladores del crecimiento en mg/L. y suplementos adicionados al medio MS para el cultivo de callos, en tres ensayos diferentes.

10	Combinaciones de niveles de los reguladores del crecimiento en mg/L. en el cultivo de meristemas.	50
11	Reguladores del crecimiento y concentraciones evaluados en tres ensayos diferentes, para el cultivo de callos.	52
12	Respuesta del cultivo de meristemas a la propagación <i>in vitro</i> .	59
13	Compuestos antioxidantes utilizados en el medio MS, en el cultivo de meristemas.	62
14	Métodos utilizados en el proceso de desinfección de explantes.	64
15	Respuesta del cultivo de callos a la regeneración de plantas en el medio MS, suplementado y diferentes concentraciones de BAP, ANA y un tratamiento con AIB, en mg/L.	69
16	Comportamiento cualitativo en cuanto a color y consistencia de los callos evaluados en el medio MS, suplementado y diferentes combinaciones de BAP, AIA y AIB.	71
17	Respuesta del cultivo de callos a la propagación en el medio MS y diferentes combinaciones de BAP y AIA.	74
18	comportamiento cualitativo en cuanto a color y consistencia de los callos evaluados en el medio MS y diferentes combinaciones de BAP, AIA y AIB en mg/L.	76
19	Respuesta del cultivo de callos a la regeneración de plantas en el medio MS, suplementado con KIN y AC y diferentes combinaciones de BAP, ANA y un tratamiento con AIB.	79
20	comportamiento cualitativo del color y la consistencia de los callos evaluados en el medio MS, suplementado con KIN y AC y diferentes combinaciones de BAP y ANA.	81
21	Respuesta cuantitativa y cualitativa del cultivo de callos, bajo 3 condiciones diferentes de medio de cultivo.	85



RESPUESTA DE LA ESPECIE TRES PUNTAS (Neurolaena lobata L.)
A LA PROPAGACION IN VITRO.

RESPONCE OF "TRES PUNTAS" (Neurolaena lobata L.)
TO IN VITRO PROPAGATION

RESUMEN

Las plantas medicinales constituyen una fuente importante en la salud del hombre, especialmente para aquellas personas que tienen poca oportunidad de contar con servicios médicos.

A pesar de ello la investigación en Guatemala sobre plantas medicinales que produzca información referente a alternativas que permitan mayor eficiencia en la propagación ha sido poca.

La especie Tres Puntas (Neurolaena lobata L.) cuenta con propiedades: Antimaláricas e hipoglicemiantes, comprobadas a través de la investigación, además se le atribuyen la de ser antidiabética, antifebrífuga y antiespasmódica (1,16,19). Investigaciones sobre propagación convencional indican bajo porcentaje de germinación y dificultad a la propagación por medios asexuales.

La presente investigación es de carácter básico, y pretendió conocer la respuesta de la especie al cultivo *in vitro*. Para lo cual se utilizaron las técnicas de propagación siguientes: El cultivo de meristemas y el cultivo a través de la inducción de callo.

La información obtenida se analizó de manera descriptiva debido a la naturaleza de la investigación.

Los resultados del cultivo de meristemas muestran una tendencia a la formación de plantas, al ser tratados previo al cultivo con una solución de carbón activado, al reducir éste el grado de oxidación del explante.

Los resultados del cultivo de callos muestran que éstos, en el

medio (MS) suplementado con 0.50 mg/L de ácido giberélico, 0.50 mg/L de Bencil aminopurina y 0.050 mg/L de ácido naftalenacético responden en el 100% a la regeneración de plantas. Medios de cultivo en los cuales a las anteriores características, la concentración de ácido naftalenacético se sustituye por 0.50 mg/L, inducen regeneración de plantas en el 44%. Estos medios de cultivo indujeron la formación de brotes a 0.50 mg/L de bencil aminopurina, sin embargo la respuesta obtenida en el primero sugiere mejor balance auxina:citocinina.

De manera similar el medio (MS), suplementado con 0.50 mg/L de ácido giberélico y 5.0 mg/L de ácido indolbutírico induce regeneración de plantas en el 33% de los callos cultivados.

La formación de raíces, se observó en el 100% de los brotes originados en cada tratamiento, al ser transferidos éstos a un medio de cultivo (MS) suplementado con 2 mg/L de ácido indolbutírico.

1. INTRODUCCION

En Guatemala, Las plantas constituyen un factor importante por ser de las principales fuentes de medicamento para el hombre, especialmente para quienes viven alejados de los centros urbanos en donde pocas veces tienen oportunidad de contar con servicios médicos.

A pesar de ello la investigación en Guatemala sobre plantas medicinales, ha sido escasa, especialmente lo referente a: La obtención de plantas de mejor calidad, mejor eficiencia de propagación, reducción del tiempo de resultados y el mantenimiento de clones que conserven su patron genético. La investigación que ha realizado la Universidad de San Carlos de Guatemala en éste campo ha sido principalmente de tipo farmacológico, microbiológico y fitoquímico (21).

La técnica del cultivo de tejidos permite: El manejo de cultivos libres de microorganismos, el control de factores intrínsecos y ambientales que influyen en el desarrollo de las plantas, características que mejoran los resultados de propagación.

Bajo las circunstancias mencionadas, se planteó la alternativa con el concepto de cultivo de tejidos la propagación de la especie Tres Puntas (*Neuroleena lobata* L.), en la cual, algunas investigaciones han indicado bajo porcentaje de germinación y dificultad a la propagación por métodos asexuales.

El estudio evaluó la respuesta de la especie a la propagación in vitro al generar la formación de raíces y ápice foliar y las técnicas utilizadas fueron: El cultivo de meristemas y el cultivo a través de la inducción de callo.

En ambos cultivos el medio basal utilizado fue el sugerido por Murashigue y Skoog (MS) (1962), el cual fue suplementado con diferentes

combinaciones de reguladores del crecimiento.

Haciendo uso de éstas técnicas se pretendió encontrar las concentraciones de reguladores del crecimiento y métodos de manejo del material vegetal que favorezcan e induzcan la regeneración de plantas.

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En nuestro medio la utilización de plantas con propiedades medicinales es una práctica común, pues éstas ofrecen una alternativa para el restablecimiento de la salud al alcance de toda la población. En muchos lugares ésta es la única alternativa inclusive.

La especie Tres puntas (*Neurolaena lobata* L.) posee entre sus propiedades medicinales el hecho de ser antimalárica e hipoglicemiante, se le atribuyen además la de antidiabética, antifebrífuga y antiespasmódica (1,18,19).

De acuerdo a investigaciones ésta ha mostrado baja capacidad de germinación, su propagación por medios asexuales como el caso de esquejes no es también satisfactoria.

Dadas las anteriores circunstancias se hizo necesario el evaluar técnicas modernas de mejoramiento y propagación alternativas como lo es el caso del cultivo de tejidos, con el objeto de determinar si la especie responde a dicha técnica específicamente al cultivo de meristemas y cultivo a través de la inducción de callos, al generar la formación de raíces y/o apice foliar.

Las características medicinales que posee la especie son de mucho valor para la salud del hombre, por lo cual debe contarse no solo con alternativas que permitan su propagación, sino que además conserven su calidad.

En la investigación se utilizó como medio de cultivo el sugerido por Murashige y Skoog (MS), pues éste se reporta como más adecuado para diferentes especies debido a las cantidades de macronutrientes indispensables para el desarrollo y crecimiento (27).

En el cultivo de meristemas se hace uso de diferentes compuestos y métodos de manejo del material vegetal.

El cultivo de callos se evaluó en tres ensayos, los suplementos y reguladores del crecimiento adicionados en cada uno, marcaron las diferencias.

3. MARCO TEORICO

3.1 MARCO CONCEPTUAL

3.1.1 LAS PLANTAS MEDICINALES

Muñoz y Granda (10,17) definen a las plantas medicinales, como aquellos vegetales que elaboran unos productos llamados principios activos, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida; es decir, que tiendan a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad. Constituyen la septima parte de las especies existentes, muchas de ellas cultivadas.

Las propiedades terapéuticas de las plantas medicinales es por todos conocidas, ya sea para su utilización o preparación de infusiones o para los laboratorios farmacéuticos (22).

3.1.1.1 LOS PRINCIPIOS ACTIVOS EN LA PLANTA MEDICINAL

Pahlow (20) los define como sustancias que la planta ha sintetizado y almacenado en el curso de su crecimiento con ayuda del metabolismo, sin embargo, no todos éstos productos metabólicos tienen un valor medicinal directamente aprovechable.

Casi siempre en una misma planta existen varios componentes medicinalmente activos, de los cuales uno de ellos, el principal, determina las aplicaciones que tendra la especie en cuestión.

Los principios activos no se distribuyen de una manera uniforme en la planta. Se encuentran preferentemente en las flores, las hojas o las raíces y a veces en las semillas, en los frutos o en la corteza (20).

A. Los alcaloides

Son sustancias muy activas, en cierta medida venenos medicinales. Por ejemplo la atropina que es la toxina de la belladona; la morfina, que lo es de la adormidera, o la colchicina del cólquico (20).

Los alcaloides de la adormidera se encuentran en el fruto; la quinina se localiza en la corteza de la planta; la semilla concentra los alcaloides del café (17).

B. Los taninos

Son compuestos fenólicos, bastante diferentes, que colorean de marrón rojizo los órganos que los contienen. Se utiliza como reactivo químico y en medicina como astringente y como contraveneno (17).

C. Aceite esencial

Componentes vegetales volátiles, de olor intenso. Las plantas medicinales con aceite esencial combaten a los agentes patógenos, a las bacterias y, posiblemente incluso a los virus (20).

D. Principios amargos

Estimulan intensamente la secreción de jugos gástricos y desarrollan una acción tónica general. Se les utiliza cuando hay falta de apetito o es necesario mejorar la digestión (20).

E. Flavonoides

Su acción es sobre la rotura anormal de los capilares (fragilidad de los vasos sanguíneos), en trastornos cardíacos y circulatorios, acción antiespasmódica (20).

F. Heterósidos

Son compuestos formados por la asociación de un glúcido y de un cuerpo activo no azucarado, llamado genina. se supone que las geninas son productos de excreción: por ello serían perjudiciales para la

planta; su acción con un glúcido permite al vegetal neutralizarlos formando compuestos no tóxicos. Muchos de los heterósidos tienen utilización en medicina: La digitalina es un potente cardiotónico y el salicosido es el precursor de la aspirina (17).

G. Glucósidos

Estos por hidrólisis (desdoblamiento con absorción de agua), se desintegran en un azúcar y un no azúcar, el llamado aglicon (20).

H. Saponinas

Son glucósidos vegetales que junto con el agua dan una espuma permanente, que emulsionan el aceite en el agua y que poseen un efecto hemolítico, es decir que extrae de los globulos rojos el colorante del mismo color (20).

I. Vitaminas, minerales y elementos vestigiales

El organismo los necesita para construir las sustancias del esqueleto (tejido conjuntivo, huesos y dientes) y las estructuras celulares, para proporcionar los elementos básicos de las enzimas corporales (fermentos) y las hormonas, para activar los procesos metabólicos y para influir sobre el metabolismo de los líquidos (20).

3.1.1.2 EL USO DE LA MEDICINA TRADICIONAL

Los usos de la medicina tradicional son grandes, las fuentes de medicamento son diversas, utilizándose desde animales como: Abejas, avispas, avispones, hormigas, lombrices, cangrejos, culebras, lechuzas; plantas, como ejemplos: arroz, albahaca, apio, acelga, coco, cacao y café y algunas sustancias y minerales como vinagre y carbón.

3.1.1.3 EL USO DE LAS PLANTAS MEDICINALES

Ocampo y Sabev (19,28) dicen que el uso de las plantas, a excepción de las venenosas, no perjudica el organismo, más bien lo benefician purificándolo y curándolo.

Ocampo (19) afirma que todas las dolencias son curables por medio de las plantas; sin embargo, muchas curas aún no han sido descubiertas. Las plantas son más adecuadas para el cuerpo humano que los productos químicos.

Vander, citado por Sabev (28) asevera que los remedios químicos son, en mayor o menor grado lesivos. El medicamento no solo ataca el microbio, sino también perjudica los órganos del cuerpo. Puede también suceder que el medicamento destruya los tejidos del cuerpo, mientras que el microbio sobrevive.

Granda (10) anota que se mencionan 21,000 nombres de plantas medicinales incluidos en el inventario mundial de plantas medicinales realizado por la organización mundial de la salud.

En los últimos años, el uso de las plantas medicinales como sustituto de las drogas sintéticas se ha incrementado, lo que ha determinado que actualmente el cultivo y la atención fitosanitaria de muchas especies muy cotizadas y otras que aún no lo son, sean objeto de estudio y de atenciones especiales con vista a obtener un producto de alta calidad.

Las hierbas ricas en sustancias calcáreas sirven para dar resistencia al tejido óseo y fortificar los vasos sanguíneos. El hierro contenido en muchas plantas que es fácilmente absorbido por el organismo, tiene la función de evitar y combatir la anemia, ejemplo la cuculmea o raíz de chino (*Smilax* sp.)

Las plantas amargas sirven para excitar el apetito, regular las funciones gástricas y favorecer la digestión, ejemplo, Tres puntas o Gavilana (*Neurolana lobata* L.), Hombre grande (*Quassia amara*) (19).

En Cuba, como parte de los estudios fitoquímicos que se realizan en las especies de Solanaceae, se realizó el estudio de las hojas de *Cestrum diurnum* L. y *Cestrum nocturnum* L., en las que se identificó la presencia de una saponina esteroidal: Tigogenina. En *C. nocturnum* fue detectada la presencia de otra saponina esteroidal: Yucagenina.

Los compuestos esteroidales constituyen una valiosa fuente de materia prima para la industria farmacéutica, ya que son precursores de las hormonas sexuales: Estrógenos, progesterona y andrógenos, así como de hormonas adrenocorticales.

Numerosas han sido las especies estudiadas como posibles fuentes de esteroides entre las que se destacan las pertenecientes a los géneros *Dioscorea* L. (Dioscoreaceae); *Costus* L. (Zingiberaceae), y principalmente las del género *Solanum* L. (Solanaceae) (5).

A nivel mundial existen dos grandes tendencias en los estudios etnobotánicos y de medicina tradicional en lo referente a la utilización de plantas medicinales estas son:

- a. El estudio y empleo de las plantas medicinales como alternativa de solución en la terapéutica.
- b. La evaluación farmacológica y fitoquímica de las plantas medicinales de uso popular en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos o que puedan servir de precursores en las síntesis de otras sustancias de interés para la industria farmacéutica (10).

Ocampo (19) señala que a pesar de las tradiciones populares, desde el siglo pasado, el progreso de la química y su injerencia en la farmacopea, ha desplazado injustamente el uso de las plantas medicinales. Pero creemos firmemente que el hombre debe "curarse en salud" como menciona el refrán, y que debemos aprovechar los remedios que nos brinda la naturaleza y que la ciencia debe seguir investigando las propiedades terapéuticas de las plantas, para beneficio de la humanidad, del campesino que vive alejado de los centros urbanos y donde pocas veces tiene la oportunidad de contar con los servicios médicos; ya que en ellas se encierra la posibilidad de curar numerosas enfermedades.

3.1.1.4 SELECCION Y MEJORA DE LAS PLANTAS MEDICINALES

La selección de éstas plantas y la mejora de su cultivo, es mas compleja que la practicada para otros vegetales, pues no solamente se persigue que tengan un buen porte y desarrollo, que sean resistentes a condiciones climáticas y edáficas adversas, a plagas y enfermedades, sino que den un elevado rendimiento en principios activos de buena calidad, principal criterio de selección y mejora perseguido. Para lograr ésta mejora puede actuarse sobre las condiciones exteriores de la planta cultivada, sus factores extrínsecos o sobre los factores intrínsecos de la propia planta, es decir, sobre el patrimonio hereditario del vegetal, que se modifica por la selección, natural o artificial.

Seleccionando la planta madre, se reproduce asexualmente para conservar sus caracteres genéticos, por métodos convencionales o "in vitro", en casos especiales. Si la planta seleccionada se reproduce sexualmente, habrá que controlar la planta que nazca de esa semilla,

pues ésta pudiera estar hibridada o contener factores genéticos, poco deseables, ausentes en la planta de procedencia (17).

3.1.2. EL CULTIVO DE TEJIDOS

Aún cuando es difícil determinar un punto de partida en el origen del cultivo de tejidos, importantes antecedentes se remontan a 1860-1861, años en que Sacko y Knops, descubrieron que las sustancias más importantes absorbidas por las plantas eran los compuestos orgánicos. El resultado de éstas observaciones fue la elaboración de una sustancia nutritiva (solucion de Knops) empleada hasta la fecha y que históricamente se usó como componente básico de los medios de cultivo (3).

Hurtado, Perea, Roca y thorpe (12,23,27,29) indican que la técnica de cultivo de tejidos "in vitro", se basa en el cultivo de explantes de planta en medios sintéticos con condiciones controladas, con el objeto de proveer al explante un ambiente similar al que tendría en condiciones naturales. El cultivo de tejidos "in vitro", se desarrolló a partir de la explicación del fenómeno de TOTIPOTENCIA.

Hartman y Hurtado (11,12) definen la totipotencia de una célula como la capacidad de desarrollar a un individuo completo, basado en que toda célula contiene la información genética necesaria para reconstruir todas las partes de la planta y sus funciones.

Roca (27) resume las posibilidades de aplicación de el cultivo de tejidos así: a. Estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines. b. Bioconversión y producción de compuestos útiles. c. Incremento a la variabilidad genética. d. Obtención de plantas libres de patógenos. e. Propagación de plantas. y f. Conservación e intercambio de germoplasma.

Según Hurtado y Perea (12,23) la técnica de cultivos "in vitro" a desarrollado las metodologías siguientes: El cultivo de protoplastos, transferencia de genes, cultivo de ploides, regeneración de embriones, cultivo de granos de polen, cultivo de endospermo, primordios florales, meristemas apicales y laterales, embriones, cotiledón, hipocótilo, tallo, hojas, raíz, inflorescencia y pétalos.

Mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales podemos estudiar diferentes fenómenos morfogénéticos que nos ayuden a entender cuáles son los factores fundamentales que intervienen en la morfogénesis y diferenciación de partes aisladas de la planta, que están fuera de las influencias correlativas del resto de la misma (12).

Las ventajas que ofrece el cultivo de tejidos "in vitro" (23,27) pueden resumirse en las siguientes:

- a. Menor tiempo en la obtención de resultados.
- b. Mejores características de las plantas propagadas
- c. Comercialización rápida de una nueva variedad.
- d. Obtención masiva de clones.
- e. Propagación de plantas cuyas condiciones normales de multiplicación son largas y difíciles.
- f. Previsión en la planificación de las siembras.
- g. Ausencia de infecciones y factores climáticos adversos.

Las desventajas están basadas en los altos costos de mantenimiento e instalación de laboratorio, la necesidad de tener mano de obra calificada (32).

Perez (23) distingue para el cultivo de tejidos, dos tipos de explantes:

- a. Explantes organizados: Meristemas, ápices caulinares, yemas, embrión, óvulo, antera.
- b. Explantes no organizados: segmentos del órgano que lo conforman.

3.1.2.1. EL CULTIVO DE MERISTEMOS

Cronquist (6) define al meristemo como un tejido caracterizado por la división celular. La división celular se efectúa principalmente por células especializadas para dicha función. Los tejidos meristemáticos pueden ser apicales, laterales o intercalares.

Ball, citado por Hurtado (12) en 1980 probó el cultivo de meristemas apicales de Lupinus albus L. en un medio que contenía aminoácidos, leche de coco, ácido giberélico y vitaminas, observando sólo una pequeña elongación del meristemo.

Al repetir el experimento, dejó algunos primordios de hoja al meristemo y obtuvo plantas completas. con base a estos resultados Ball concluyo que: a. El meristemo apical exhibe una dependencia hormonal y nutricional por el tallo subyacente y primordios de hoja y b. El meristemo apical de angiospermas sufre una diferenciación bioquímica que le impide producir ciertas sustancias esenciales para el crecimiento y mantenimiento de un meristemo determinado.

Murashige (1974) citado por Hurtado (12) asegura que si se cultivan en un medio adecuado, los meristemas pueden regenerar plántulas completas más rápidamente que los tejidos de otras fuentes; las plantas regeneradas usualmente retienen las características genéticas de los

progenitores, lo que se debe a la naturaleza diploide de las células meristemática.

Para Vuylsteke (30) los ápices pueden ser obtenidos de toda parte de la planta que contenga un meristemo. La respuesta al desarrollo y supervivencia del explante en el cultivo no difiere entre los renuevos apicales obtenidos del vástago madre, chupones o brote lateral. Aparentemente la fisiología y edad ontogenética de los renuevos no influye en el comportamiento de los explantes en el cultivo. No hay algún reporte sobre el efecto en el funcionamiento del cultivo de la estación en que los explantes son obtenidos. Sin embargo brotes y pequeños chupones son los preferidos como fuente de material debido a su gran facilidad de manejo y porque hay menos daño del material madre durante su remoción.

Las plantas madres debieran estar libres de enfermedades y ser de crecimiento vigoroso.

Cabe recordar que la relación auxina-citocinina "in vitro" es indispensable para la morfogénesis de los meristemas y que las investigaciones actuales se centran en encontrar la concentración óptima, tanto de la auxina como de la citocinina, tomando en cuenta las variaciones de respuesta interespecífica que presentan los vegetales (12).

3.1.2.2 EL CULTIVO DE CALLOS

Perea (23), define a un callo como una masa amorfa de células parenquimáticas dispuestas de manera libre y provenientes de la proliferación celular del explante cultivado.

El establecimiento de cultivos de callos seguidos de organogénesis o embriogénesis ha sido realizado en numerosas especies de plantas.

Para Roca (27) en términos generales en los cultivos de callos se inducen proliferaciones mas o menos aleatorias, a partir de explantes tomados de varias partes de plantas, para formar brotes y raíces.

Perea (23) considera que la proliferación de un fragmento de planta para la regeneración de callo puede estar influenciada por la especie, planta, el cultivo , su estado de desarrollo y masa del explante (tamaño y forma). En el explante: Edad procedencia y períodos de lluvia o sequía.

En algunos casos el problema de la inducción de la morfogénesis es tal que, a pesar de la adición o manipulación de auxinas, citocininas, u otros componentes del medio de cultivo o del medio ambiente externo, los investigadores son incapaces de estimular la división celular o de obtener un verdadero callo. Sin embargo en plantas de mayor respuesta, en las cuales no hay problemas para inducir y mantener el crecimiento del callo, se puede tratar de manipular la relación citocininas:auxinas, con lo que frecuentemente se inducen brotes o raíces (27).

Perea y Roca (23,27) indican que actualmente se conocen un gran número de especies en las cuales se puede fomentar la proliferación aleatoria de callos en los explantes mediante la adición de una o varias citocininas y auxinas al medio básico; en consecuencia, se pueden inducir la formación de brotes y raíces ajustando la relación auxinas:citocininas exógenas. Sin embargo éste procedimiento no es de ninguna manera universalmente efectivo; por ejemplo en sistemas que normalmente no tienen una capacidad para la formación de yemas, las citocininas no inducen la diferenciación de las yemas y el crecimiento de novo.

De acuerdo a Hurtado y Thorpe (12,29) los reguladores del crecimiento mas usados en la iniciación y mantenimiento del cultivo del callo son: ácido indol-3acético (AIA), ácido naftalen acético (ANA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Para cada especie e incluso para cada cultivar existen fitohormonas y una concentración balanceada para la inducción y mantenimiento del cultivo.

Cuando la proporción A-C (auxina-citocinina) es relativamente alta, existe diferenciación de las células hacia primordios radicales. Una alta concentración de citocininas con respecto a las auxinas causa la formación de brotes. Por lo tanto si provocamos pequeños cambios en la proporción de C-A puede obtenerse el inicio de meristemas tanto radicales como apicales, pudiendo controlarse así la morfogénesis "in vitro" de gran cantidad de tejidos.

Perea (23) menciona que la formación de células se inicia generalmente cerca de la herida del explante por un escaso porcentaje de células. Algunas veces la proliferación de células se generan a partir de cambium o de tejido del parénquima.

Hurtado y Perea (12,23) indican que la textura del callo varía de acuerdo a la planta, algunos son duros y compactos, otros frágiles y friables.

El color también varía determinado por factores nutricionales y ambientales, pueden presentarse blancos, cremas, verdes, amarillos o pigmentados.

Hurtado (12) establece cuatro períodos que ocurren a nivel celular:

- a. Inducción, las células comienzan su crecimiento.
- b. Proliferación
- c. Inducción, obtención de meristemas apicales y radicales
- d. Envejecimiento.

3.1.2.3 MEDIOS DE CULTIVO

Roca y Han, mencionados por Calderón (3) indican evidencias que sugieren que la variación en la respuesta al cultivo de tejidos según el genotipo utilizado depende de la forma como se haga el cultivo.

Perea y Roca (23,27) mencionan que para los cultivos vegetales se hace necesario la adición al medio de sustancias minerales: Los macroelementos (C,H,O,P,K,N,S,Ca, y Mg) y los microelementos (B,Zn,Mn,Cu,Mo,Fe,Cl), todos deben estar presentes en estado de iones.

Perea y Roca (23,27), reportan como fórmulas de sales minerales que se utilizan corrientemente en el cultivo de tejidos: El de Murashige y Skoog; Schenk e Hildebrandt, BS de Gamborg y White.

Hurtado (12) señala al medio MS como el mas adecuado para el cultivo de muchas especies, debido a las cantidades de macronutrientes indispensables para el crecimiento y desarrollo.

Para Perea y Roca (23,27) en forma general un medio de cultivo debe estar compuesto de: Sales inorgánicas, vitaminas, fuentes de energía y carbono, fuentes de nitrógeno, fitohormonas, materiales de soporte y suplementos como: a. Naturales: agua de coco, pulpa de banano, emulsión de pescado. b. Aminoácidos como alanina, glutamina, asparagina. c. caseína hidrolizada d. compuestos polifenólicos y otros.

3.1.3 LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO

Hurtado (12) menciona que el crecimiento en las plantas es un proceso dinámico, complejo y que ésta rigurosamente controlado, en el que los reguladores del crecimiento vegetal (RCV) juegan un papel principal en el control del crecimiento, no únicamente dentro de las

plantas como un universo, sino también a nivel de órgano, tejido y célula (Wareing y Phillips, 1973), pues actualmente se reconoce que la mayor parte (sino la totalidad) de la actividad fisiológica de las plantas está mediada por los reguladores del crecimiento (Devlin, 1980), los cuales son sustancias mensajeras, la mayoría de las veces activas en muy pequeñas cantidades.

3.1.3.1. TIPOS BASICOS

Hurtado (12) indica que actualmente se reconocen cinco tipos básicos de sistemas químicos de reguladores del crecimiento vegetal (Leopold y Kriedemann, 1975), divididos en tres grupos principales:

- a. Promotores del crecimiento: auxinas, citocininas y giberelinas
- b. Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico.
- c. Etileno.

Hurtado y Roca (12,27) consideran que las sustancias reguladoras del crecimiento mas usadas son generalmente los del tipo de las auxinas y citocininas.

A. Auxinas

Según Hurtado y Roca (12,27) las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común, la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos.

Las auxinas que mas se utilizan son: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), ácido 3-indolacético (AIA) y ácido 3-indolbutírico (AIB) y de las citocininas: N 6 furfural aminopurina (KIN o CINETINA), N 6 bencil aminopurina (BA) y zeatina (ZEA).

Roca (27) refiere que en algunos casos, la adición de una de las auxinas al medio basal puede ser suficiente para iniciar y sostener el crecimiento. Sin embargo para algunos investigadores (Mahlberg, 1959), ocasionalmente ha sido útil el uso simultáneo de 2,4-D y ANA, por ejemplo, para el crecimiento de cultivos de Euphorbia marginata, además se puede obtener un efecto sinérgico entre la auxina y los factores del crecimiento como los encontrados en el agua de coco (AC).

Hurtado (12) menciona que las auxinas participan ampliamente en la organización de los procesos vegetales, incluyendo la regulación de los fenómenos de diferenciación, los cuales son estimulados o inhibidos según la concentración auxínica presente en la célula o estructura vegetal.

Las auxinas son un factor esencial en la promoción del crecimiento de las raíces, debido a que, en general, el AIA puede incrementar significativamente la elongación de segmentos aislados de raíces (12).

a. El ácido β -naftalenacético (ANA). Weaver (31), indica que es una auxina excelente utilizada con frecuencia en la promoción de raíces.

De acuerdo a Roca (27) en el cultivo de tejidos el ANA, generalmente se utiliza en concentraciones de 1 a 10 mg/l, con un punto óptimo cerca de 2 mg/l.

b. El ácido 3-indolacético (AIA). Roca (27), lo incluye entre las auxinas llamadas naturales, el AIA, indica, se utiliza en concentraciones que varían de 0.001 a 10 mg/l, con un punto óptimo alrededor de 0.1 a 1 mg/l.

c. El ácido 3-indolbutírico. Perea y Roca (23,27), la describen como una auxina sintética, ampliamente disponible de uso común.

B. Citocininas

Hurtado, Perea y Roca (12,23,27) dan el nombre genérico de citocininas a aquellas sustancias químicas que pueden estimular principalmente la división celular o citocinésis.

La inducción "in vitro" de órganos por las citocininas está encaminada a la formación de yemas, las cuales son obtenidas con base en una proporción citocinínica alta con respecto a las auxinas. En el cultivo, éstas yemas no se inhiben recíprocamente en su desarrollo, debido a que se anula la dominancia apical, hecho que puede extrapolarse a las plantas intactas, pues las citocininas aplicadas exógenamente en general activan el crecimiento de las yemas laterales (12).

Hurtado (12) indica que la concentración de citocininas usada varia de 0.03 a 30 mg/l.

Perea (23) menciona que en cultivos "in vitro", las citocininas han permitido grandes progresos especialmente en microropagación por su función de proliferación celular mediante la división celular y la diferenciación de los explantes.

Roca (27) menciona entre las citocininas mas importantes, a la KIN que ha recibido mucha atención como sustancia reguladora del crecimiento, ésta es una sustancia sintética.

La Bencil aminopurina (BAP), se utiliza actualmente talvez más que la Kinetina (KIN) o la ZEA. Es un compuesto muy activo y se encuentra disponible fácilmente.

La ZEA y la BAP se utilizan generalmente a niveles similares.

C. Giberelinas

Weaver (31) menciona que se han encontrado al presente más de 20 giberelinas diferentes en plantas, hongos, o en ambos, todas ellas

caracterizadas por poseer en su estructura un esqueleto gibano y por estimular la división y/o el crecimiento celular. Estos numerosos tipos han sido ordenados en forma numérica, siendo la más conocida la giberelina 3 (GA3) o ácido gibérelico.

Hurtado, Roca y Weaver (12,27,31) indican que las giberelinas presentan un espectro de actividad biológica muy variado, con un papel regulatorio principal en el crecimiento, pues pueden producir una elongación extraordinaria del tallo en enanos genéticos, fenómeno que puede ser atribuible a la estimulación de la división y al alargamiento celular.

Según Hurtado (12) los datos analíticos indican que las giberelinas incrementan la producción de auxinas. Este hecho por si solo no explica los diferentes efectos de las giberelinas, por lo que lo mas probable es que éstas activen una multiplicidad de eventos bioquímicos, incluyendo la conversión de triptofano a auxinas.

Roca (27) indica que las concentraciones usadas varían de 0.01 a 1 mg/l. Con un punto óptimo alrededor de 0.1 mg/l. En la mayoría de cultivos, los niveles de giberelinas superiores de 1.00 mg/l son tóxicos.

3.1.4 COMPUESTOS SUPLEMENTARIOS DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

3.1.4.1 EL AGUA DE COCO (AC)

Roca (27) refiere como un paso importante en el desarrollo de las técnicas actuales para estimular la división celular de explantes, fue la observación de que el AC a niveles relativamente bajos (5%-10% v/v), podía interactuar con las auxinas y promover el crecimiento, en situaciones en que por sí sola era ineficiente.

El AC, tiene buena capacidad de amortiguación (buffer), es rica en

magnesio y fosfato, azúcar al rededor de 2.5%, se encuentra en ella también nitrógeno no protéico soluble en forma de aminoácidos.

3.1.5 LA OXIDACION EN EL CULTIVO DE TEJIDOS

Vuylsteke (30) indica que el ennegrecimiento del explante es causado por la oxidación de compuestos fenólicos, en la herida del tejido. Estos compuestos son exudados dentro del medio, son atrapados por el agar y acumulados, formando una área negra al rededor del explante. Esta puede interferir con la absorción de nutrientes, resultando una inhibición del crecimiento.

Bidwell (2) menciona que la compresión o tensión parecen tener poco efecto, doblar la hoja tiene más y el cortarla o fracturarla parece estimular al máximo la respiración.

El herir o romper los tejidos estimula mucho la respiración por tres razones. La primera es la rápida oxidación de los compuestos fenólicos que tiene lugar cuando la organización, que mantiene a éstos substratos separados de sus oxidasas, se rompe. La segunda, son los procesos normales de glicólisis y catabolismo oxidativo que aumentan conforme la disrupción de la célula o células causa una mucho mayor accesibilidad de los substratos a la maquinaria enzimática de la respiración. Tercero, la consecuencia general de la herida es la reversión de ciertas células al estado meristemático, seguido por la formación de callo y la "curación" o reparación de la herida. Tales células y tejidos en activo crecimiento tienen tasas respiratorias muy superiores a los tejidos maduros o en descanso.

La tasa de respiración por célula o por unidad de proteína de algunos componentes de tejidos, como tallos (es decir, las células de

compañía del floema, del cambium o del parenquima), puede ser muy alta.

Se conocen varias enzimas que oxidan a los fenoles dando quinonas. Dos de la más importantes son la monofenol oxidasa (tirosinasa) y la polifenol oxidasa (catecol oxidasa). Estas enzimas participan en la característica "reacción traumática" de las plantas y contribuyen a la respiración traumática convirtiendo los fenoles liberados en la herida a quinonas. El color café en la herida, (por ejemplo cuando a un tubérculo de papa o una manzana se le hace un corte o se golpea) es un resultado de dicha reacción. Es evidente, por la rápida reacción que ocurre al herir, que tanto la enzima como su substrato, los cuales parecen ser solubles, deben haber estado apartados uno del otro en la célula normal, aprisionados en diferentes compartimentos celulares.

Las labores siguientes son necesarias para mantener vivo el material en el cultivo (30):

a. Pretratamiento de los explantes con un antioxidante por inmersión en una solución estéril de cysteina, ácido ascórbico o ácido cítrico (solos o en combinación), antes de la inoculación en el medio.

b. Incluir antioxidantes en el medio de cultivo. La adición de carbón activado tiene también el propósito de prevenir el ennegrecimiento, como en el caso del cultivo de *M. balbisiana*.

c. Transferir frecuentemente los cultivos a un medio fresco. Cuando el ennegrecimiento es severo, el cultivo podría ser transferido semanalmente, si éste viene en menor grado la transferencia puede ser cada 3 o 4 semanas.

Se ha observado ocasionalmente que el ennegrecimiento se incrementa cuando niveles de citocinina son aumentados para estimular la proliferación del brote.

3.2 MARCO REFERENCIAL

3.2.1 ALGUNAS INVESTIGACIONES EN CULTIVO DE TEJIDOS

Díaz (1985) (7) en Cuba evaluó la respuesta de Orthosiphon stamineus a la formación de callos, con el objeto de aplicar el cultivo de tejidos como método de mejoramiento genético en ésta especie medicinal.

Fragmentos de hojas fueron situados sobre el medio Murashige y Skoog (MS) suplementados con cinco concentraciones de la auxina ácido 2,4 diclorofenoxiacético. Al evaluar el desarrollo de los callos Díaz, concluyo que: Las mejores concentraciones fueron las de 2 y 5 ng/l de 2,4-D, las que no presentaron diferencias significativas.

Fuentes (1988) (9) también en Cuba, evaluó la tolerancia de la salinidad "in vitro" mediante el ensayo de cloruro de trifenil tetrazolio, en 25 especies medicinales. De cada especie fueron tomados fragmentos de tejidos jóvenes de la raíz, tallo y hojas y colocadas inmediatamente y por 24 horas en soluciones acuosas de diferentes concentraciones de cloruro de sodio a 0.00; 0.25; 0.50; 0.75; 1.00 y 1.50 M. Transcurridas 24 horas, los fragmentos extraídos de la solución salina fueron colocados en 5 ml. de una solución al 0.1% de cloruro de trifenil tetrazolio (CTT) por 24 horas, según la técnica recomendada por Veeramah et al. (1988), Lima et al. (1984) y Fuentes et al. (1980), para comprobar la viabilidad de tejidos vegetales. Los resultados que obtuvo fueron:

El 40% de las especies evaluadas no toleró concentraciones de cloruro de sodio de 0.25 M; el 24% resultó tolerante a concentraciones entre 0.25 y 0.50 M, y el resto (36%) toleró concentraciones entre 0.75 y 1.50 M.

Tres especies toleraron altas concentraciones de cloruro de sodio hasta 1.50 M.

Díaz (1986) (7) en Cuba, aplicó el cultivo "in vitro" para la multiplicación acelerada de Digitalis lanata. Para inducir la brotación masiva "in vitro" se utilizaron las hormonas vegetales y concentraciones de éstas, recomendadas por Erdei et al. (1981), las que fueron adicionadas sobre el medio de cultivo MS. Para el enraizamiento de los brotes se aplicó el medio sugerido por Erdei et al. (1981); se situó un brote por cada tubo de ensayo, los que contenían entre 12 y 15 ml. de medio.

De ésta investigación Díaz concluye que: El medio de cultivo de Murashige y Skoog suplementado con ácido-3-acético y 6 bencilaminopurina a concentraciones de 0.1 y 1.0 mg/L. respectivamente, permite la obtención de nuevos explantes por cada brote cultivado "in vitro" durante 60 días. El enraizamiento de los brotes es efectivo en mas del 85% al cultivarse éstos en el medio de Murashige y Skoog con la quinta parte de las fuentes de nitrógeno y suplementado con ácido indol-3-butírico a concentraciones entre 0.5 y 1.0 mg/L. de medio.

Zuñiga (1990) (32) realizó investigación de carácter básico en papa (Solanum tuberosum), para producir plantas libres de los virus X, Y y S, a partir del cultivo de meristemas y del tratamiento de termoterapia antes de la extracción de meristemas a plantas enfermas cultivadas "in vitro".

De su investigación Zuñiga concluye que: Según el análisis estadístico las proporciones en las metodologías empleadas son iguales.

Que según lo observado el tratamiento de 10 ppm de BAP induce el

mayor número de tubérculos y que existe un efecto directamente proporcional en función del número y la dosis de BAP.

3.2.2 TRES PUNTAS (*Neurolaena lobata* L.)

3.2.2.1 DESCRIPCION GENERAL

Tres puntas (*Neurolaena lobata* L.) también conocida como mano de lagarto (Guatemala), Quina, Gavilana-Capitana (Costa Rica), victoriana, etc. es una hierba o arbusto comunmente con tallos erectos, de 1-4 m. de alto, por lo general escasamente ramificada, que pertenece a la familia Compositae. Se desarrolla desde el nivel del mar hasta los 1,450 m. (16,18,19).

El ciclo biológico de ésta especie es de 1 año aproximadamente. Por su hábito puede considerarse una semiperenne, pues al año de llegar a su plena madurez, fructificación, las hojas caen, permitiendo el desarrollo de nuevos brotes vegetativos, para continuar creciendo el año que sigue (26).

En Guatemala, la época de floración y fructificación en su habitat natural (según poblaciones exploradas y colectadas), es desde el mes de diciembre hasta abril. Siendo los meses de enero y febrero los de mayor floración, para su fructificación en los meses de marzo y abril (26).

3.2.2.2 CARACTERISTICAS BOTANICAS

Flores: Posee flores pequeñas, con corolas amarillas a naranja-amarillo, alrededor de 4 mm. de longitud.
Flores agrupadas en una inflorescencia corimbosa, las cabezuelas son numerosas, pediceladas y discoides.

Tallo: Tallos erectos, estriados, sulcados, densamente pubescentes cuando jóvenes.

Hojas: Hojas alternas, diversamente lobadas, la inferiores hasta 30 cms. de largo y las superiores mucho mas pequeñas. Usualmente staminadas, lanceoladas u oblongas, corto pecioladas o casi sésiles, casi glabras en el envés, agudas o cuneadas a la base, a menudo contractadas y decurrentes en el peciolo, los márgenes dentados o serrados, escabrosos-hirsutulosas en el haz, densamente corto-pilosas en el envés y a menudo velutinoso.

Semilla: Es un aquenio negro, esencialmente glabros, alrededor de 1.5 mm. de longitud (16,18,19).

3.2.2.3 DISTRIBUCION GEOGRAFICA

La planta es nativa de algunos lugares de Yucatan, norte de Colombia y Venezuela; también del éste de la India (16).

Se desarrolla en un rango que va desde el nivel del mar hasta una elevación de 1,450 m. Se encuentra distribuida en el Sur de México; Belice a El Salvador; en las partes bajas de ambas vertientes, pacífico y Atlántico en Costa Rica; Panamá; El Caribe, Norte y Noroeste de América del sur. En Guatemala se encuentra en matorrales húmedos o algunas veces en bosques de encino, comunmente en crecimiento secundario, a menudo en terrenos cultivados, en terrenos zarzozos a lo largo de márgenes de ríos o arroyos, en lugares abiertos ó a orillas de caminos.

Se encuentra en los departamentos de Alta Verapaz, Chiquimula, Escuintla, Izabal, El Petén, El Progreso, Quetzaltenango, Retalhuleu, San Marcos, Santa Rosa y Suchitepequez (18,19).

Se ha localizado en los lugares siguientes (26):

En Alta Verapaz, en el lugar de Cubilhuitz, se le conoce como mano de lagarto o tres puntas. Son plantas arbustivas, con una altura promedio de 2-4 m., se encuentran ubicadas en matorrales, cercanos a riachuelos en laderas abiertas, formando parte de la vegetación secundaria. La altura en donde fueron localizadas es de 230 msnm. La zona de vida es: Bosque muy húmedo subtropical cálido.

En el mismo departamento, En Chajmaic, se le conoce como mano de lagarto o tres puntas. Son arbustos medianos con una altura aproximada de 1-2 m. Se encuentran a lo largo de la orilla de la carretera, en laderas, forman parte de la vegetación secundaria, limitados por bosques de latifoliadas, a una altura de 200-500 msnm. La zona de vida es: Bosque muy húmedo subtropical cálido.

En Suchitepequez, en la localidad de Chicacao, se conoce como tres puntas o mano de lagarto. Son plantas arbustivas, de una altura de 1-3 m. Se localizan en áreas descubiertas de ladera de montaña, forman parte de la vegetación secundaria, limitada por cultivo de café, el lugar presenta una altura de 1,000 a 1,000 msnm. La zona de vida corresponde a: Bosque muy húmedo subtropical.

En Quetzaltenango, en la localidad de Rio de Naranjo, se le conoce como arnica. Las plantas son arbustos medianos, de 1-2 m. de alto, se encuentran en áreas de laderas descubiertas, en las orillas de las carreteras, cercanas a arroyos, limitadas por bosque de latifoliadas, la altura del lugar es de 900-500 msnm. La zona de vida es: bosque muy

húmedo subtropical cálido.

En San Marcos, en la localidad de La Reforma, se le conoce como arnica. Son arbustos medianos con alturas de 1-3 m. localizadas en montaña de latifoliadas, a una altura de 1,100 msnm. La zona de vida es: Bosque muy húmedo subtropical cálido.

En Escuintla, en la localidad de El Rodeo, se le conoce como tres puntas. Estas son arbustos con altura de 3-4 m., se encuentran en matorrales cercanos a riachuelos, forman parte de la vegetación secundaria, a una altura de 700 msnm. La zona de vida corresponde a: Bosque muy húmedo subtropical cálido.

En Zacapa, en la localidad llamada La Unión, se le conoce como mano de lagarto y tres puntas. Estas son arbustos, presentan una altura de 1-3 m., ubicadas en áreas descubiertas de ladera de montaña, forman parte de la vegetación secundaria, la altura en el lugar es de 880 msnm. La zona de vida es: Bosque húmedo subtropical templado.

En Petén, en el lugar conocido como El ceibal de la localidad de Sayaxché, se le conoce como mano de lagarto. Son plantas herbáceas, con alturas de 1 m., se encuentran en campos abiertos, limitadas por bosque denso, la altura en el lugar es de 130 msnm. La zona de vida es: Bosque muy húmedo subtropical cálido.

En el mismo departamento, en la localidad de San Miguel La Palotada, las plantas se hubican en áreas descubiertas. La zona de vida corresponde a: Bosque húmedo subtropical cálido.

En Izabal, en la localidad de Morales, le llaman comúnmente tres puntas. Son arbustos de 1-2 m. de altura, se encuentran en áreas descubiertas de laderas, forman parte de la vegetación secundaria. La zona de vida corresponde a: Bosque muy húmedo subtropical cálido.

3.2.2.4 PROPIEDADES TOXICOLÓGICAS

los extractos de las hojas y los tallos tienen una actividad insecticida, contiene un derivado de Thymol (18).

Manchand y blount (15) reportan los germacronolideos sesquiterpenoides, neurolenins A [4] y B [5], siendo aislados de Neurolaena lobata L.

Kupchan, citado por Manchand (15), agrega que un número de sesquiterpenoides poseyendo la mitad α -metileno-butirilactona, son conocidos por exhibir significancia citotóxicos y, así como secundario un grupo α -B insaturado es también presente, habiendo actividad antitumor en vivo.

3.2.2.5 USOS MEDICINALES

A la especie Tres puntas se le atribuyen propiedades antimaláricas e hipoglicemiantes, virtudes que han sido comprobadas a través de la investigación; además se le atribuyen: La de ser antidiabética, antifébrifuga, antidiarreica y antiespasmódica (12,18,19).

Morton y Ocampo (18,19) mencionan como usos los siguientes:

En cocimiento se ha empleado como amebicida, además contra la calentura y en el tratamiento de las diarreas, acompañadas de dolor de estómago.

En cataplasma, en Venezuela lo mencionan como contraveneno de las serpientes, de la planta fresca que se coloca sobre la herida.

En maceración se utiliza como antidiarréico.

Los tallos frescos y flores son muy comunes en los mercados de América Central. En Panamá y Costa Rica la decocción es muy usada para remedios de diabétes, malaria y otras fiebres. En Honduras también es

usada como remedio en contra de la malaria. En Guatemala ésta tiene los mismos usos además de ser usada para aliviar los cólicos.

En Belice la planta es más usada para los dolores de estomago.

Además de ser utilizada para el tratamiento de las úlceras.

Mahabir et al. (14) indica que Neurolaena lobata L. es una planta que constituye un popular remedio de la gente para el tratamiento de diabétes en muchos países de Centro América y la región Caribeña. Los nativos la preparan como decocción hecha de las hojas frescas. En Panamá los indios Cunas, la usan para dolores estomacales y contra la malaria.

Morton (1977) citado por Mahabir et al. (14), menciona que la decocción es amarga la cual es usada para la diabétes y contra la malaria. También menciona que otros usos que la gente de países Caribeños le da es el de usarla en contra de fiebres.

3.2.2.6 ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE

Sanchez et al. citado por Manchand (15), en trabajos farmacológicos preliminares sobre las hojas de Neurolaena lobata L., reporta que usando el método O-toluideno para determinación de glucosa, mostraron ligera actividad hipoglicemiante.

De estudios sobre ratones hormoglicémicos, para evaluar la actividad hipoglicemiante, un estudio fue conducido sobre la variación de niveles de glucosa de la sangre después de la administración de extractos etanólicos de plantas a ratones albinos suizos de ambos sexos, pesando 26.8 , los animales fueron ayunados 12 horas previo a cada experimento, pero agua les fue administrada livianamente.

Una suspensión del extracto de planta fue administrada oralmente y

muestras de sangre fueron extraídas desde la cavidad orbital a la 1, 2, 4, y 24 horas.

Todas las dosis indicadas fueron dadas como miligramos de extractos de planta seca por kilogramo de peso corporal.

Simultáneamente estudios fueron realizados en ratones hiperglicémicos, monohidrato aloxánico (sigma) fue administrado intraperitonealmente a un grupo de 12 ratones, pesando 39.6 gramos, en dosis de 150 mg/L. de peso corporal. Las concentraciones de glucosa fueron determinadas 48 hrs. más tarde y fueron aproximadamente 317.5 mg/100 ml. Los extractos etanólicos fueron luego administrados oralmente y, al mismo tiempo, una prueba control fue llevada fuera usando solamente 1% de solución pectina.

En base a los resultados se concluyó que:

Los niveles de extractos etanólicos de Neurolena lobata L. poseen actividad hipoglicemiante ambos en los normo e hiperglicémicos animales bajo estudio.

Cuando una dosis de 500 mg/Kg. fue administrada, se nota una significancia descendente estadísticamente de glucosa sanguínea que fue observada a la 1, 2 y 4 Hrs. Los efectos son más pronunciados a intervalos de 4 hrs., y los niveles de glucosa sanguínea retornaron a valores de control a las 24 horas.

Los extractos etanólicos a dosis de 250 mg/Kg. administrados a ratones aloxánicos diabéticos dieron una significancia estadísticamente descendente de nivel de glucosa sanguínea producida por los extractos de plantas, solamente a las 4 Hrs.

3.2.2.7 PRUEBAS PARA LA PROPAGACION DE LA ESPECIE

En la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos (26), se realizaron pruebas de germinación de semillas y de propagación de esquejes en Tres Puntas (Neurolaena lobata L), los resultados se muestran a continuación:

La prueba de germinación se realizó con un lote de 1,400 aquenios procedentes de Cubilhuitz , Cobán, Alta verapaz, colocándose sobre bandejas en el germinador a 27 grados centígrados, el resultado obtenido fue de 0% de germinación.

Posterior a ella se realizaron pruebas (1992), incluyendo a 3 poblaciones, siendo éstas: Cubilhuitz, Chajmaic, Alta Verapaz; El Rodeo, Escuintla. Se utilizaron 100 aquenios por población. Los resultados se muestran en el cuadro 1.

CUADRO 1 Pruebas de germinación de 3 poblaciones de Neurolaena lobata L. en tres sustratos (1992).

	Cubilhuitz	Chajmaic	El Rodeo
arena	0%	0%	5%
broza	0%	0%	7%
suelo	25%	17%	51%

FUENTE: GEXPRONT-FAUSAC-ICTA, (1992).

En 1993, se realizaron pruebas (realizadas por el autor) en 5 poblaciones de Neurolaena lobata L., siendo éstas: 1. Coatepeque, Quetzaltenango. 2. Chajmaic, Alta Verapaz. 3. Morales, Izabal. 4. La unión, Zacapa. 5. El Rodeo, Escuintla.

Las pruebas, se realizaron bajo dos condiciones:

- A. A nivel de laboratorio
- B. A nivel de invernadero.

A. A nivel de laboratorio**a. Sin pretratamiento de semillas (aquenios)****Descripción:**

Se utilizaron 600 aquenios por población, se incluyeron 3 repeticiones, cada repetición constó de 200 aquenios. 30 días después se realizó la última lectura, ésta es la que se presenta en el cuadro 2.

Procedimiento:

- a. Los aquenios fueron limpiados y escogidos con la utilización de diafanoscopio.
- b. Se seleccionaron aquenios en los que se observaron buenas características.
- c. Sobre papel filtro, dentro de cajas petri autoclaveadas, fueron depositados 200 aquenios.
- d. Fueron asperjadas ligeramente con una solución de Captan al 0.5%.
- e. Se adicionó agua sin cubrir el aquenio.

Condiciones:

Las diferentes cajas conteniendo los aquenios, fueron puestas al germinador a 27 grados centígrados.

Los resultados se muestran en el cuadro 2.

CUADRO 2 Pruebas de germinación a nivel de laboratorio, sin pretratamiento, en cinco poblaciones de *Neuroclausa lobata* L. Germinación en porcentaje.

población	No.	semillas germinadas/repetición			total	%
		R1	R2	R3		
coatepeque	600	2	6	4	12	2
Chajmaic	600	2	2	2	6	1
Morales	600	0	2	4	6	1
La Unión	600	0	2	2	4	0.70
El Rodeo	600	4	2	0	6	1
TOTAL					34	
MEDIA						1.13

FUENTE: Pruebas realizadas por el autor (1993).

b. Pretratamiento de semillas (aquenios)

Descripción:

Se utilizaron 600 aquenios por población, distribuidas en 3 repeticiones y 200 aquenios por repetición.

Procedimiento:

1. Los aquenios fueron escogidos con la utilización de diafanoscopio.
2. Se seleccionaron aquenios en los que se observaron buenas características.
3. Los aquenios fueron depositados en frascos que contenían agua esteril, luego introducidos al horno a 35 grados centígrados durante 48 horas.
3. Sobre papel filtro dentro de cajas petrí autoclaveados, fueron depositados 200 aquenios (repetición).
4. Fueron asperjados ligeramente con una solución de captan al 0.5%.

5. Por último se adicionó a cada caja petri conteniendo los aquenios, 200 mg/L. de una solución de ácido giberélico.

Condiciones:

Las diferentes cajas conteniendo los aquenios fueron puestas al germinador a 27 grados centígrados.

30 días después se realizó la última lectura, ésta se muestra en el cuadro 3.

CUADRO 3. Prueba de germinación de 5 poblaciones de *Neurospora lobata* L. Semillas con pretratamiento.

población	No.	semillas germinadas/repetición			TOTAL	%
		R1	R2	R3		
Coatepeque	600	5	6	5	16	6.7
chajmaic	600	4	7	1	12	2
Morales	600	3	4	1	8	1.3
La Unión	600	6	6	2	14	2.3
El rodeo	600	4	4	7	15	2.5
TOTAL					65	
MEDIA						3.0

FUENTE: Pruebas realizadas por el autor, (1993).

B. A nivel de invernadero

Descripción:

Para ésta prueba se utilizaron 500 aquenios por población, el sustrato consistió en: a. parte baja, 10 cm. aproximadamente de una mezcla suelo arena a una relación 3:1. b. parte en contacto con la semilla 10 cm. aproximadamente de un suelo franco arcilloso. Tierra cernida fue espolvoreada sobre la superficie en contacto con la

aquenio, pero sin llegar a cubrirlo. La estructura física que contenía el sustrato fue una cama de cemento con drenaje, con tablas a los lados, la cual fue forrada con nylon transparente a una altura aproximada de 1 mt. del sustrato. La superficie total donde se depositaron las semillas de las cinco poblaciones fue de 1.00 x 0.70 mt.

Procedimiento:

- a. Se seleccionaron aquenios en los que se observaron buenas características.
- b. Al suelo se le agregó volatón granulado y fue desinfectado con captan al 0.5%.
- c. Las semillas fueron depositadas en el sustrato, delimitándose el área para cada población.
- d. Luego se les suministró riego. Este fue suministrado cada dos días.
- e. Periódicamente se realizó limpieza de la superficie, eliminando las plantas ajenas a la especie.
- f. 30 días después se realizó la última lectura, esta es la que se reporta.

En el cuadro 4 se presentan los resultados de éstas pruebas.

CUADRO 4 Pruebas de germinación en invernadero, en cinco poblaciones de *Neurolaena lobata* L.

Población	No. semillas	semillas germinadas	%
Coatepeque	500	83	16.6
Chajmaic	500	98	19.6
Morales	500	75	15.0
La Unión	500	195	39.0
El Rodeo	500	167	33.4
TOTAL	500	618	24.7
MEDIA	500		

FUENTE: Pruebas realizadas por el autor, (1993).

Pruebas de propagación de esquejes fueron realizadas en el invernadero de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos (1992) (26), utilizándose cajas de madera con sustrato de arena y broza en proporción 3:1, obteniéndose los siguientes resultados:

CUADRO 5. Propagación de *Neurolaena lobata* L. material colectado en la Unión, Zacapa.

esqueje	No.	Longitud (cm.)	Diámetro (cm.)	sobrevivencia.	%
herbáceo	41	36.0	0.6	3	7.32
semiherbáceo	27	36.5	1.1	3	11.1

FUENTE: GEXPRONT, informe técnico (1992).

CUADRO 6. Propagación de *N. lobata*, segunda colecta en la Unión, Zacapa.

esqueje	No.	Long. (cm.)	Diám. (cm.)	sobrevivencia	%
heráceo	51	35.5	0.6	1	1.96
semiherbáceo	17	36.0	1.2	3	17.65
leñoso	7	31.5	2.3	3	42.86

FUENTE: GEXPRONT, informe técnico, (1993).

Perrone (24) indica que en Guatemala, las plantas medicinales cuyas características medicinales ya han sido convalidadas y que interesan como posibles fuente de cultivo y comercialización son el Pericón (Tagetes lucida), la Zarzaparilla (Smilax lundei), el Apazin o Zorillo (Petiveria alliacea), Tres puntas (Neurolaena lobata) y Orozuz (Lipia dulcis). A este trabajo de caracterización y convalidación se aplican, Facultad de Agronomía (FAUSAC), Instituto de ciencia y Tecnología Agrícola (ICTA) y Comisión Nacional para el Aprovechamiento de Plantas Medicinales (CONAPLAMED); sus esfuerzos van encaminados a: La validación científica, el desarrollo agronómico y el desarrollo industrial.

La ventaja de las plantas medicinales autóctonas radica en su alto grado de competitividad en el mercado exterior. Sin embargo, no están éstas plantas suficientemente acreditadas científicamente.

3.2.3 OTRAS ESPECIES DEL GENERO NEUROLAENA

- a. Neurolaena cobanensis Greenm. (1,904), reportada en el departamento de Alta Verapaz, en montañas boscosas, densas, húmedas y mixtas, de 1,300 a 1,600 msnm.
- b. N. intermedia Rydb. (1927), reportada en Alta Verapaz, en bosque mixtos húmedos, de 1,200 a 1,350 msnm.
- c. N. macrophyla Greenm. (1,903), reportada en Chiapas (México) y en los departamentos de Quetzaltenango, San Marcos y Suchitepequez, en bosques mixtos, densos, húmedos o en matorrales densos, de 900 a 1,500 msnm.
- d. N. schippii B. (1935), reportada para Belice y a 730 msnm (18).

4. OBJETIVO

Evaluar la respuesta de la especie Tres puntas (Neurolaena lobata L.) a la propagación in vitro.

5. METODOLOGIA

5.1 LOCALIZACION DEL AREA EXPERIMENTAL

La investigación se realizó en las instalaciones del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Facultad de Agronomía, ubicado en el edificio T-8, de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

5.2 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado fue la especie Neurolaena lobata L., la cual es conocida comunmente en Guatemala como Tres puntas o mano de lagarto.

La planta, es una hierba o arbusto, las ramas son poco densas, comunmente con tallo erecto, de 3-4 metros de alto, sus flores son pequeñas amarillas a naranja-amarillas, agrupadas en una inflorescencia corimbosa, las hojas son alternas, con un sabor amargo fuerte. los margenes dentados o serrados y las láminas son marcadamente trilobadas, la semilla es un aquenio negro.

El material utilizado fueron los ápices laterales de la planta en estado de madurez.

5.3 DESARROLLO DE LA INVESTIGACION

5.3.1 FASE 1. COLECTA DEL MATERIAL

El material vegetal fue colectado en terrenos de la finca el Montijo, de la localidad de El Rodeo, localizada a aproximadamente 10 Kms. de la cabecera departamental de Escuintla. Las plantas fueron encontradas entre matorrales cercanas a una fuente de agua, limitadas por cultivo de caña, la altura en el lugar es de 700 msnm. y corresponde

a una zona de vida: Bosque muy húmedo subtropical cálido.

Se seleccionaron las plantas más tiernas, verdes y sanas.

El material fue asperjado envuelto en papel toalla, fué cubierto en bolsas de nylons y transportado en hielera.

5.3.2 FASE 2. ETAPA DE LABORATORIO

Para preservar el material, el que presentó daño fué desechado, las ramas en buen estado fueron cubiertas en papel toalla, asperjadas con agua destilada y envueltas en bolsas de nylon, luego fueron puestas al refrigerador. En estas condiciones el material permaneció en buen estado, conservando su calidad hasta un máximo de 10 días.

El estudio comprendió la preparación del medio de cultivo MS, suplementado con diferentes reguladores del crecimiento, el cual se utilizó en el cultivo de explantes bajo las técnicas de propagación siguientes:

- A. El cultivo de meristemas
- B. El cultivo a través de la inducción de callo.

5.3.2.1 CULTIVO DE MERISTEMOS

Se utilizó como medio basal el medio Murashige y Skoog (MS), suplementado con 0.50 mg/L. de ácido giberélico (GA₃) y diferentes concentraciones de bencil aminopurina (BAP) , ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) las cuales se muestran en el cuadro 7.

CUADRO 7. Niveles de reguladores del crecimiento en mg/L. adicionados a el medio MS, para el cultivo de meristemos.

NIVEL	BAP	ANA	AIB
1	0.50	0.025	
2	1.00	0.050	
3	3.00	0.10	
4	5.00	0.20	
5	7.00	0.50	
6			5.00

A. Preparación del medio de cultivo

Los componentes del medio de cultivo se prepararon con soluciones madres (solución Stock) en las concentraciones descritas por Murashigue y Skoog (MS), para macroelementos, microelementos, myo-inositol, vitaminas y soluciones de hierro, las cuales se presntan en el apendice en el cuadro 8"A". De las soluciones madres se extrajeron los volúmenes deseados para la elaboración de la mezcla, a la cual se adicionó 0.50 mg/L. de ácido giberélico. Esta solución fue separada en 26 recipientes a los cuales se les agregó los reguladores en igual número de combinaciones. Cada recipiente fué nuevamente separado en tres frascos conteniendo 25 mililitros de medio. Estas fueron estabilizadas a un pH de 5.6.

Estos medios se esterilizaron en autoclave a 15 libras por pulgada cuadrada (psi) a 121 grados centígrados durante 15 minutos.

B. Extracción, desinfección e inoculación de meristemos

- a. Del material vegetal colectado, se procedió a eliminar todas las hojas, dejando solamente en el tallo las yemas

- (meristemas cubiertos), los cuales fueron lavados con detergente.
- b. De los tallos fueron extraídas las yemas laterales dejando cierta porción de tallo, manteniendo el cuidado de no lastimar el meristemo. Estos fueron depositadas en agua destilada autoclaveada.
 - c. Luego fueron transferidas a un beaker conteniendo 200 mg/L. de bicloruro de mercurio, a los 15 segundos fueron lavadas con agua destilada estéril.
 - d. Posteriormente se introdujeron en alcohol etílico al 70% durante 15 segundos, y lavadas nuevamente con agua destilada estéril.
 - e. Los ápices fueron transferidos a una solución de hipoclorito de sodio al 0.23% (5% comercial) y carbón activado, más 2 gotas de Tween 20, por un tiempo de 15 minutos.
 - f. Luego fueron transferidos a una solución que contenía 1000 mg/L. de carbón activado autoclaveado, con el objeto de evitar la oxidación del tejido.
 - g. Transcurridos los 15 minutos, los ápices fueron transferidos a la cámara de flujo laminar, en donde fueron lavados con agua destilada estéril por 4 veces consecutivas, para eliminar residuos de alcohol y cloro.
 - h. Se procedió a disectar las yemas utilizando bisturí, se quitaron las tres primeras hojas que cubrían el meristemo, eliminando también parte del tallo, los inóculos se dejaron de aproximadamente 3 mm. de longitud y fueron sembrados 3 en cada frasco con medio de cultivo.

La cámara de flujo laminar fue encendida una hora antes de cada sesión de trabajo y la superficie se desinfectó con alcohol etílico al 70%, las cajas petrí, papel, pinzas, bisturíes fueron autoclaveados, las dos última se flamearon en mechero cada vez que se extrajo una yema para disectarla.

C. Condiciones de cultivo

Las siembras en los medios de cultivo se mantuvieron en el cuarto de incubación, con un fotoperíodo de 18 horas luz y 8 horas de oscuridad, la fuente de luz fueron lámparas fluorescentes de luz blanca de 10,000 lux de intensidad. La temperatura media del cuarto fue de 24 grados centígrados con una máxima de 27 grados centígrados. Los frascos se mantuvieron separados a una distancia de aproximadamente 3 cm., para permitir la mayor incidencia de luz.

5.3.2.2 CULTIVO DE CALLOS

A. Medio de inducción de callo

Para la inducción de callo en los explantes se utilizó como medio basal el medio MS suplementado con 5.0 mg/L de ácido naftalenacético y 0.50 mg/L. de N 8 furfuril aminopurina, pues diferentes pruebas indicaron a éste medio como más adecuado.

Se utilizaron como explantes para la inducción de callo, secciones de hojas meristemáticas (porción del meristemo sin tallo), procedentes del campo.

B. Medios de cultivo para la regeneración de plantas

Para evaluar el comportamiento y la respuesta a la regeneración de plantas, se evaluaron los callos en 3 ensayos diferentes.

1. Primer ensayo: Evaluación de la respuesta al cultivo de callos en el medio MS y la adición de 0.5 mg/L. de ácido geberélico (GA₃) y diferentes combinaciones de bencil aminopurina (BAP) , ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB).

2. Segundo ensayo: Evaluación de la respuesta al cultivo de callos en el medio MS, la adición de 0.50 mg/L. de ácido giberélico (GA₃) y diferentes combinaciones de bencil aminopurina (BAP), ácido indolacético (AIA) y ácido indol butírico.

3. Tercer ensayo: Evaluación de la respuesta al cultivo de callos en el medio MS, la adición de 0.50 mg/L. de N6 furfuril aminopurina (KIN), 10% de agua de coco (AC) y diferentes combinaciones de bencil aminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol butírico.

El agua de coco fue filtrada y autoclaveada junto con los demás compuestos del medio de cultivo.

El cuadro 9, muestra los reguladores y niveles utilizados en cada ensayo.

CUADRO 9. Reguladores del crecimiento en mg/L. y suplementos adicionados al medio MS, para el cultivo de callos de *Neuroleena lobata* L. en tres ensayos diferentes.

	ANA	BAP	AIB	AIA	GA ₃	KIN	AC
ENSAYO 1	0.025	0.50	-	-	0.50	-	-
	0.050	1.00	-	-	0.50	-	-
	0.10	3.00	-	-	0.50	-	-
	0.20	5.00	-	-	0.50	-	-
	0.50	7.00	-	-	0.50	-	-
	-	-	5.00	-	0.50	-	-
ENSAYO 2	-	0.50	-	0.025	0.50	-	-
	-	1.00	-	0.050	0.50	-	-
	-	3.00	-	0.10	0.50	-	-
	-	5.00	-	0.20	0.50	-	-
	-	7.00	-	0.50	0.50	-	-
	-	-	5.00	-	0.50	-	-
ENSAYO 3	0.025	0.50	-	-	-	0.50	10%
	0.050	1.00	-	-	-	0.50	10%
	0.10	3.00	-	-	-	0.50	10%
	0.20	5.00	-	-	-	0.50	10%
	0.50	7.00	-	-	-	0.50	10%
	-	-	5.00	-	-	0.50	10%

C. Manejo del experimento

a. Preparación del medio de cultivo

La metodología para la preparación del medio de cultivo para la regeneración de plantas fue la misma que se describe en la parte correspondiente para el caso de meristemos (sección 5.3.2.1), la diferencia fue dada por los suplementos y reguladores del crecimiento utilizados, en cada ensayo.

b. transferencia de los callos a medios de regeneración

De los medios de cultivo que contenían los callos inducidos, se extrajeron secciones de aproximadamente 5 milímetros cuadrados, los cuales fueron introducidos a los medios de regeneración, en grupos de tres por frasco, en total fueron 78 frascos.

c. Condiciones de cultivo

Las condiciones en cuanto a luz y temperatura fueron las mismas que se describen en la sección correspondiente para el caso de meristemas.

d. Inducción de raíces

Las plantas obtenidas a partir del cultivo de callos fueron transferidas luego de transcurridos 80 días al medio de cultivo (MS), en los que se evaluaron concentraciones a: 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 5.0 mg/L de ácido indolbutírico.

e. Aclimatación

Las plantas con una altura aproximada de cinco centímetros, se les aclimató de la manera siguiente:

Se utilizó un invernadero casero, el cual consistió en una mesa de aproximadamente 1 metro cuadrado con una altura de 0.75 mts., cubierto con nylon, el sustrato utilizado fué una mezcla de arena y suelo en proporción 3:1. Las plantas se extrajeron de los medios de cultivo, se lavaron con agua potable para eliminar restos del medio de cultivo, que pudiera favorecer el apareamiento de microorganismos. Luego se hizo un lavado con 0.5% de benlate (Benomyl). Posteriormente fueron sembradas y se les aplicó riego. Cinco días después se procedió a quitar la mitad

de nylon, 3 días después se dejaron completamente descubiertas.

En la figura 1 se observa en forma general las fases realizadas durante la investigación.

COLECTA DEL MATERIAL
(localidad el Rodeo, Escuintla)

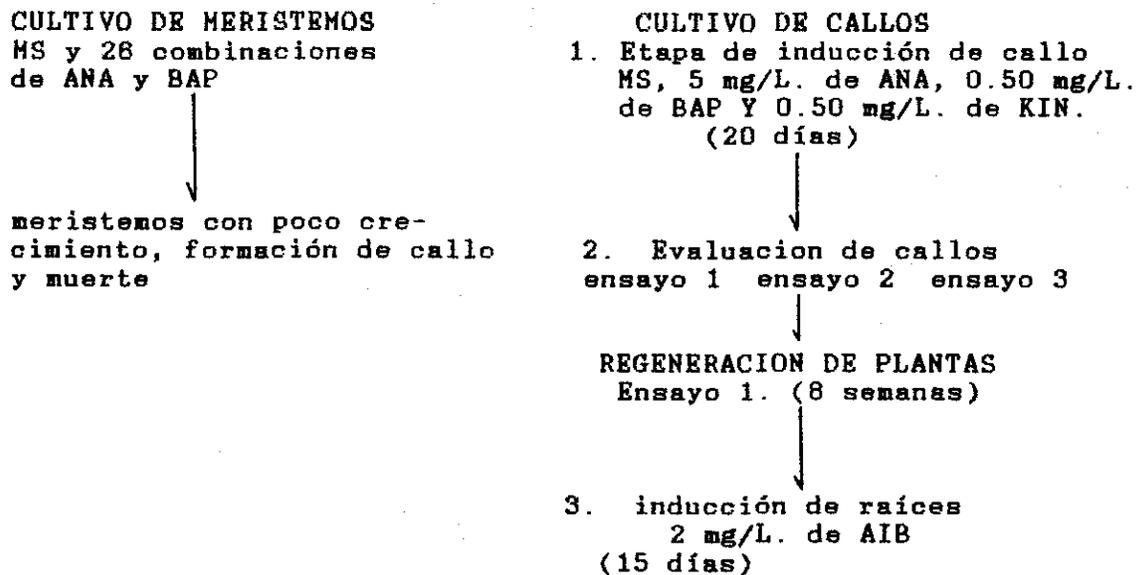


FIGURA 1. Proceso en el cultivo de meristemos y el cultivo a partir de la inducción de callo.

5.4 EVALUACION DE LA INVESTIGACION

5.4.1 CULTIVO DE MERISTEMOS

5.4.1.1 TRATAMIENTOS

El estudio constó de 26 tratamientos, las combinaciones de los niveles y reguladores del crecimiento, dieron origen a los diversos tratamientos, éstos se muestran en el cuadro 10.

CUADRO 10. Combinaciones de niveles de los reguladores del crecimiento en mg/L., en el cultivo de meristemas.

trat.	BAP	ANA
a	0.50	0.025
b	0.50	0.050
c	0.50	0.10
d	0,50	0.20
e	0.50	0.50
f	1.00	0.025
g	1.00	0.050
h	1.00	0.10
i	100	0.20
j	1.00	0.50
k	3.00	0.025
l	3.00	0.050
m	3.00	0.10
n	3.00	0.20
ñ	3.00	0.50
o	5.00	0.025
p	5.00	0.050
q	5.00	0.10
r	5.00	0.20
s	5.00	0.50
t	7.00	0.025
u	7.00	0.050
v	7.00	0.10
w	7.00	0.20
x	7.00	0.50
y	Solo incluyo 5.00 de AIB	

5.4.1.2 VARIABLES CONSIDERADAS

1. Oxidación rápida y muerte de meristemas
2. Oxidación de meristemas y formación de callos
3. Crecimiento inicial y posterior formación de callo

5.4.2 CULTIVO DE CALLOS

5.4.2.1 TRATAMIENTOS

El estudio abarcó 3 ensayos, la diferencia entre éstos la constituyeron los complementos, y reguladores del crecimiento utilizados en el medio basal MS, ya que para el ensayo 1 se utilizó bencil aminopurina, ácido naftalenacético Y ácido indolbutírico, a diferentes concentraciones; el ensayo 2 se utilizó bencil aminopurina, ácido indolacético y ácido indolbutírico, a diferentes concentraciones, en ambos se adicionó 0.50 mg/L. de ácido giberélico; el ensayo 3 se evaluó con bencil aminopurina, ácido naftalenacético y ácido indolbutírico, a diferentes concentraciones, pero se suplementó con 0.50 mg/L. de KIN y 10% de AC. Cada ensayo considero 26 diferentes combinaciones de los reguladores del crecimiento. Estos se muestran en el cuadro 11.

CUADRO 11. Reguladores del crecimiento y concentraciones en mg/L. en el cultivo de callos, utilizados en tres ensayos.

T	BAP (en 1,2,3)	ANA (en 1,3)	AIA (en 2)
A	0.50	0.025	0.025
B	0.50	0.050	0.050
C	0.50	0.10	0.10
D	0.50	0.20	0.20
E	0.50	0.50	0.50
F	1.0	0.025	0.025
G	1.0	0.050	0.050
H	1.0	0.10	0.10
I	1.0	0.20	0.20
J	1.0	0.50	0.50
K	3.0	0.025	0.025
L	3.0	0.050	0.050
M	3.0	0.10	0.10
N	3.0	0.20	0.20
ñ	3.0	0.50	0.50
O	5.0	0.025	0.025
P	5.0	0.050	0.050
Q	5.0	0.10	0.10
R	5.0	0.20	0.20
S	5.0	0.50	0.50
T	7.0	0.025	0.025
U	7.0	0.050	0.050
V	7.0	0.10	0.10
W	7.0	0.20	0.20
X	7.0	0.50	0.50
Y	5.00 AIB (en 1,2,3)		

NOTA: Números entre paréntesis indican el ensayo en donde el regulador se utilizó.

5.4.2.2 VARIABLES CONSIDERADAS

1. Peso fresco
2. Callos con crecimiento.
3. callos que formaron puntos verdes
4. Número de puntos verdes.
5. Color y textura
6. callos que formaron planta (regeneración).

5.4.3 ANALISIS DE LA INFORMACION

Debido a las características en que se llevo a cabo la investigación, y a la diversidad de respuesta que presentaron los explantes y callos en los diferentes medios de cultivo, el análisis de la información se realizó de una manera descriptiva, tomando en cuenta porcentajes y medias las cuales fueron obtenidas en base a los datos que se presentan en los diferentes cuadros.

Para el cultivo de meristemas se analizó:

1. Las respuestas de los meristemas al cultivo.
2. Compuestos antioxidantes utilizados
3. Métodos de desinfección.

Para el caso del cultivo de callos se analizó:

1. Ensayo por separado considerando las diversas variables
2. Se realizó un análisis comparativo de las variables en los tres ensayos considerados.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 CULTIVO DE MERISTEMOS

Los resultados obtenidos muestran que la respuesta de la especie a la inducción de plantas a través de éste cultivo está condicionada por la oxidación del explante.

Existieron ciertos factores que limitaron el crecimiento del meristemo, en algunos se observó la formación de callo, situaciones atribuidas a la oxidación del material vegetal.

6.1.1 TIPOS DE RESPUESTA

Estas se han clasificado en las siguientes:

Respuesta A: Oxidación temprana y muerte del meristemo: Aquellos que murieron en el inicio, luego de ser inoculados en el medio de cultivo, a consecuencia de la severa oxidación del tejido, observada en el 70.5% de los explantes.

Respuesta B: Oxidación y formación de callo: Aquellos tratamientos en los que el explante no mostró crecimiento del meristemo, existió oxidación, pero algunas porciones del tejido formaron callo, ésta representó el 21.3%.

Respuesta C: Crecimiento inicial y posterior formación de callo: En aquellos tratamientos en los cuales el meristemo tuvo crecimiento inicial y formación de hojas verdaderas, pero, al cabo de 20 días estas hojas se curbaron hacia el medio de cultivo (epinastia), y formaron callo, se observó en el 8.2% de los explantes.

De de los tratamientos que indujeron la formación de callo, el que contenía 0.50 mg/l de BAP y 0.050 mg/l de ANA logró mayor peso fresco

siendo el promedio 2.50 gramos, mientras el que contenía 5.0 mg/l de BAP y 0.20 mg/l de ANA, formo menor peso, el promedio fue de 1.17 gramos.

Las anteriores diferencias se deben al hecho de que la proliferación celular esta en función de los niveles y el balance de concentraciones de los reguladores del crecimiento en el medio de cultivo.

En éstos callos de manera general se notó mayor formación de consistencia friable.

6.1.1.1 OXIDACION TEMPRANA Y MUERTE DEL MERISTEMO

Esta respuesta se presentó en el 70.5% de los explantes cultivados.

La muerte de los meristemos en los diferentes tratamientos se debe a efectos por degradación del tejido debido a la oxidación y la constante liberación de compuestos al medio de cultivo. Este fenómeno es un efecto fisiológico y químico bastante severo, al grado de que algunos meristemos a los 30 minutos de haber sido sembrados mostraron degradación del tejido tornandose de color negro.

No existe correlación significativa entre la degradación del tejido por oxidación a causa de los elementos del medio de cultivo (MS) y los reguladores del crecimiento, porque ésta ocurrió generalmente de manera temprana.

Los meristemos que no mostraron oxidación de forma inmediata permanecieron de color verde, hasta aproximadamente 24 horas, posteriormente empezaron a tornarse de color café en la parte basal en contacto con el medio manteniendose la parte aérea verde, la cual termino degradandose.

Otros presentaron también los mismos efectos, pero en este caso fue la parte aérea la que mostró primero el efecto.

Todos ellos, expelieron al rededor en la base del explante los compuestos producto de la degradación del tejido y en casos mas severos en todo el medio.

Los meristemas luego de transcurridos 5 o 7 dias mostraron una coloración negra y se observaron completamente deshidratados.

La oxidación del explante, siendo severa no permitió que los meristemas absorvieran los nutrientes necesarios, para el crecimiento y adaptación posterior.

8.1.1.2 OXIDACION DEL MERISTEMO Y FORMACION DE CALLO

A. Oxidación de los explantes

Los explantes que tuvieron ésta respuesta representaron el 21.3% del total de tratamientos.

En éstos a pesar de que la tendencia general fue la degradación rápida del tejido existió formación de callo. Esta situación se debió al hecho de que porciones del tejido, normalmente las mas cubiertas y cercanas al medio de cultivo permanecieron vivas y puesto que el medio contenia ANA, se estimuló la formación de callo.

B. Crecimiento del callo

La constante proliferación de la masa celular, permitió que ésta alcanzara un peso fresco promedio de 1.35 gramos, el peso alcanzado fue relativamente poco, lo cual se debe a que fueron solo pequeñas porciones de tejido las que le dieron origen, pues como indica Perea (23), la proliferación del callo está también en función del tamaño y forma del explante.

Perea (23) menciona además que la formación de celulas se inicia cerca de la herida del explante. Estas partes en éste caso fueron las

más afectadas, pues en ellas se notó el inicio de la oxidación del tejido, liberando los compuestos del fenómeno al medio de cultivo dificultando la iniciación y proliferación celular.

Los callos formados mostraron una consistencia friable y poco peso, no obstante contar el medio de cultivo con un estimulador de la inducción de callo como lo es el ANA las concentraciones fueron relativamente bajas, y no permitieron mayor formación, esto lo indican Hurtado y Thorpe (12,29), quienes afirman que el ANA, es uno de los reguladores del crecimiento mas usados en la iniciación y mantenimiento del callo cuando se usan concentraciones que van de 0.1 a 10 mg/l, y presentando una concentración balanceada para cada especie en particular. Además el hecho de contar el medio con BAP a concentraciones mayores dio una relacion auxina-citocinina inadecuada para formar un callo con mejores características.

6.1.1.3 CRECIMIENTO INICIAL Y FORMACION DE CALLO

A. Oxidación

Esta se observó en el 8.2% de los explantes.

Representó aquellos meristemas que luego de ser inculados en el medio de cultivo, permanecieron mostrando signos de sobrevivencia, hasta un término aproximado de 20 dias, los cuales se mantuvieron verdes. La oxidación en éste caso se dió de manera lenta y menos severa, lo cual permitió el desarrollo del tejido.

Es posible que éstos explantes llevaran relativamente menores porciones de tallo al momento de ser inoculados, lo cual favoreció la anterior situación, ya que componentes de tejidos como tallos tienen tasas de respiración muy altas como lo indica Bidwell (2).

B. Crecimiento

Estos mostraron una tendencia a la formación de plantas. Algunos alcanzaron una altura aproximada de 4 centímetros. Luego cesó su crecimiento, las hojas que lograron crecimiento mostraron una tendencia a la deformación de los bordes y se doblaron al centro en la parte del haz de la hoja y sobre el medio medio de cultivo (epinastia), lo que dio origen a la formación de callo.

Si se observan, los tratamientos que dieron este tipo de respuesta (cuadro 12), se nota que las dosis de BAP fueron mayores que las de ANA, lo cual explica el crecimiento inicial del meristemo, ya que siendo mayor la concentración de BAP se esperaría tal situación, lo cual indican Hurtado y Weaver (12,31) al afirmar que una alta concentración de citocininas con respecto a la auxina causa la formación de brotes. La posterior inhibición del crecimiento del meristemo puede tener su explicación a la presencia de compuestos fenólicos oxidados en el medio de cultivo, que interfieren en la absorción de nutrientes como lo asevera Vuylsteke (30).

Luego de formado el callo, el poco crecimiento y características desarrolladas estuvieron determinadas por los reguladores del crecimiento, las concentraciones disponibles y el grado de oxidación del tejido.

El peso promedio fue de 2.46 gramos. Este es relativamente mayor si se compara con el obtenido por los meristemas de los tratamientos que se presentan en la columna de respuesta B (cuadro 12), lo cual se debe a que existió más tejido vivo en contacto con el medio de cultivo.

El cuadro 12 muestra las diferentes respuestas del meristemo al cultivo de tejidos.

6.1.2 LA OXIDACION DEL MERISTEMO

6.1.2.1 LA OXIDACION DEL MATERIAL VEGETAL

La oxidación del tejido es un fenómeno que empieza a manifestarse desde las fases presiembra del inóculo al medio de cultivo.

En la recolección se observó degradación del material en las partes en donde éste fue separado de la planta.

En el almacenamiento a (5 grados centígrados), no existió degradación en los primeros 10 días, luego de ese período los tallos y sobre todo las hojas se tornaron de color negro, muriéndose por lo tanto también las partes apicales.

En el proceso de desinfección del material vegetal , cuando los ápices meristemáticos fueron separados del tallo (disección), se empezó a notar ya el proceso de liberación de compuestos productos de la oxidación y la posterior degradación severa del tejido.

Este fenómeno es evidente, por la rápida reacción que ocurre al herir, pues como lo indica Bidwell (2), al herir se produce la rápida oxidación de los compuestos fenólicos que tiene lugar cuando la organización que mantiene a éstos substratos y las oxidasas (enzimas) (los cuales parecen ser solubles), apartados uno del otro en la célula normal, aprisionados en diferentes compartimentos celulares, se rompe (respiración traumática).

6.1.2.2 APLICACION DE ANTIOXIDANTES

En el inicio de la investigación, se considero en primer término la manera de evitar tal fenómeno adicionando los siguientes antioxidantes al medio de cultivo: ácido cítrico, ácido ascórbico, carbón activado y cisteina. La mayoría de ellos utilizados entre los rangos de concentraciones recomendadas por Vuylsteke (30).

La oxidación del tejido solo se reduce en parte con la adición al medio de cultivo de antioxidantes.

En el medio de cultivo donde se adicionó carbón activado, se notó el porcentaje mas bajo de oxidación de los meristemas, siendo del 75%.

Cuando se adicionó ácido cítrico, la oxidación fué del 90%.

En el caso de ácido ascórbico, fué también del 90% y en la combinación se observó el 87%, la cual como se nota no fué significativamente diferente a la utilización de uno solo.

Cuando al medio de cultivo se adicionó cisteína, se observó más la oxidación del meristemo, la cual fue del 100%; los efectos fueron contrarios a lo esperado, pues ésta aceleró el proceso de manera severa al sumergir los meristemas en la solución, degradando el tejido en menos de 30 minutos, aún cuando éstos no habian sido trasladados al medio de cultivo.

El cuadro 13, muestra los antioxidantes utilizados, dosis método y porcentajes de respuesta de los explantes al fenómeno. 75 meristemas fueron evaluados en cada compuesto.

CUADRO 13 Compuestos antioxidantes utilizados en el medio MS para el cultivo de meristemos.

ANTIOXIDANTE	DOSIS mg/L	APLICACION	OXIDACION DE EXPLANTES	%
carbón activado	1000	al medio	lenta (10 días)	75
ácido cítrico + ácido ascórbico	60 + 60	al medio	temprana (2 días)	87
ácido cítrico	5 20 60 200	al medio	temprana (2 días)	90
ácido ascórbico	5 20 60	al medio	temprana (2 días)	90
cisteína	40 60	A.al medio B.inmersión (2-4 seg.) C.inmersión (5 minutos)	A,B=temprana C=rápida (30 minutos)	100

6.1.3 METODOS DE DESINFECCION

La contaminación en el explante fué también un factor crítico, la cual limitó el estudio de los meristemos al cultivo y condicionó la respuesta al crecimiento.

Se observó que los compuestos utilizados en el proceso de desinfección aceleraron la oxidación del tejido, debido a ésto se consideraron diversos métodos de desinfección, los cuales tuvieron como objetivo reducir la oxidación de los inóculos, pero al mismo tiempo obtener el mínimo índice de contaminación.

El método 7 (cuadro 14), que consideró bicloruro de mercurio a 200 mg/l por 15 segundos, alcohol etílico al 70% por 15 segundos,

hipoclorito de sodio al 0.53% por 15 minutos y carbón activado a 1000 mg/l autoclaveado utilizado en hipoclorito de sodio y luego en agua esteril, fué el mejor en cuanto a la relación oxidación-contaminación. La oxidación fue de 85%, pero en los explantes no existió contaminación.

En el método en el cual se utilizó 70% de alcohol etílico por un minuto y 0.23% de hipoclorito de sodio por 20 minutos, se notó el 78% de oxidación y 23% de contaminación.

El método que consideró la aplicación de 0.53% de hipoclorito de sodio por 15 minutos, presentó el 100% de oxidación y una contaminación de los meristemas del 62%.

El método en el cual se aplicó 0.28% de hipoclorito de sodio por 20 minutos permitió el nivel mas bajo de oxidación siendo este del 45%, pero la contaminación en este fue de 88%.

El método en el cual se utilizó 0.28% de hipoclorito de sodio por 20 minutos y 1000 mg/L. de carbón activado, permitió una oxidación del 45%, con éste se minimizó el efecto al momento de realizar la desinfección, pero permitió una contaminación del 88%. La reducción de la oxidación puede atribuirse al efecto del carbón activado.

En el método que consideró 70% de alcohol etílico por 15 segundos y 0.53% de hipoclorito de sodio, se observó los porcentajes mas altos en cuanto a la relación oxidación-contaminación, alcanzando el 94 y 97% respectivamente.

La oxidación de los explantes fué menos severa cuando a éstos se aplicó carbón activado.

De acuerdo a lo anterior, los compuestos desinfectantes, las concentraciones y los tiempos utilizados influyen sobre la aceleración de la oxidación del tejido, pero la degradación por

éste fenómeno es sobre todo inherente a las características intrínsecas del tejido.

El cuadro 14 muestra los métodos utilizados en el proceso de desinfección, la relación de éstos con el fenómeno oxidativo y la contaminación presente de acuerdo a las diferentes variantes.

CUADRO 14 Métodos utilizados en el proceso de desinfección de explantes.

M	BM mg/L	AE %	HS %	CA mg/L	No. ex- plan- te.	Oxidación		Contaminación	
						No.	%	No.	%
1	-	-	-	-	180	117	65	180	100
2	-	-	0.53 (15m)	-	180	180	100	112	62
3	-	70 (1m)	0.26 (20m)	-	234	183	78	54	23
4	-	70 (15s)	0.26 (15m)	-	180	126	70	144	80
5	-	-	0.26 (20m)	1000	180	81	45	123	68
6	-	70 (30s)	(0.53) (15m)	1000	234	119	51	153	65
7	200 (15 s)	70 (15s)	0.53 (15m)	1000	234	128	60	00	00
8	-	70 (5s)	0.53 (20m)	-	234	220	94	227	97
9	200 (5s)	70 (15s)	-	-	234	140	85	192	82
10	-	70 (5s)	0.23 (15m)	-	234	164	70	210	90

REFERENCIAS: BM= Bicloruro de mercurio AE=alcohol etílico;
HS= hipoclorito de sodio; CA=carbón activado;
M= Método

NOTA: Entre paréntesis tiempos de exposición (m=minutos;
s=segundos).

6.2. RESULTADOS DEL CULTIVO DE CALLOS

Los resultados obtenidos muestran que existe respuesta favorable de la especie a la propagación in vitro, utilizando como técnica la inducción de callo.

Estos indican que si hay respuesta a la regeneración de plantas (organogénesis) y a la formación de raíces (rizogénesis), pero al mismo tiempo muestran la especificidad de la masa celular a la organización del tejido en función del medio de cultivo, suplementos, reguladores del crecimiento y concentraciones.

6.2.1 PRIMER ENSAYO: Evaluación de la respuesta del cultivo de callos en el medio MS, suplementado con 0.50 mg/L. de ácido giberélico, bencil aminopurina y ácido naftalenacético a diferentes concentraciones y un tratamiento con ácido indolbutírico.

6.2.1.1 CARACTERISTICAS CUANTITATIVAS Y REGENERACION

A. Formación de plantas

De acuerdo a los resultados (cuadro 15) éste permitió la regeneración de plantas. Fueron tres tratamientos los que respondieron siendo éstos:

- A. El medio que contenía a 0.50 mg/l de BAP y 0.050 mg/L. de ANA
- B. El medio al que se suministró 0.50 mg/l de BAP y a 0.50 mg/L. de ANA
- C. El medio al que se adicionó 5 mg/l. de AIB.

En éstos tratamientos ninguna de las plantas que se formaron fue

albina y todas presentaron respuesta a la formación de raíces.

De acuerdo a los resultados, el mejor tratamiento fue el el que contenía 0.50 mg/l de BAP y 0,050 mg/l de ANA, porque indujo el mayor numero de plantas, la formación de brotes se observó en el 100% de los callos bajo cultivo.

Los callos del tratamiento que contenia 0.50 mg/L. de bencil aminorpurina y 0.50 mg/L. de ácido naftalenacético presento el 44.4% para la regeneración de plantas. La respuesta fue favorable a la regeneración, sin embargo el número de plantas fue relativamente menor en comparación con el tratamiento anterior.

En éstos tratamientos los primeros brotes se observaron luego de 6 semanas del aparecimiento de puntos verdes.

En el tratamiento que contenia 5.0 mg/L. de AIB, la regeneración se observó en el 33.3% de los callos cultivados. En éste las plantas tuvieron un crecimiento lento en comparación con las plantas formadas en los tratamientos anteriores.

Hay que hacer notar que la regeneración en los tratamientos anteriores (a exepción del tratamiento de 5.0 mg/L de AIB), se presentó cuando la BAP se adicionó a concentraciones que no sobrepasaron de 0.50 mg/L.; arriba de éstas no se obtuvo respuestas a brotación y el número de puntos verdes fue bajo en la mayoría de los casos. Esta hecho sugiere mejor balance auxina:citocinina en el primero, lo cual permitió alto número de puntos verdes y mayor formación de brotes, situación que refieren Hurtado y Thorpe (12,19).

Luego al transferir los brotes a un medio de cultivo (MS), suplementado con 2.0 mg/L de ácido indolbutírico la formación de raíces fue del 100% en cada tratamiento.

B. Peso fresco

La variable peso fresco de los callos, no indica relación directa del peso logrado a la formación de brotes, ya que si bien es cierto los tratamientos que regeneraron, el que contenía 0.50 mg/L. de bencil amino purina y 0.050 mg/L. de ácido naftalenacético y el tratamiento, que contenía 5.0 mg/L. de ácido indolbutírico, obtuvieron un peso promedio similar de 8.57 y 8.42 gramos respectivamente, pero, la respuesta fue sustancialmente diferente (cuadro 15). En el caso del tratamiento que contenía 0.50 mg/L. de bencil aminopurina y 0.50 mg/L. de ácido naftalenacético, obtuvo un peso promedio de 2.85 gramos bastante inferior a los anteriores, pero la regeneración fue mejor que el tratamiento con mayor peso promedio.

El tratamiento que contenía 0.50 mg/L. de BAP y 0.025 mg/l de ANA, alcanzó menor peso, siendo este de 1.25 gramos. El tratamiento con dosis de 5.0 mg/L. de bencil aminopurina y 0.10 mg/L. de ácido naftalenacético, alcanzó el mayor peso siendo de 12.5 gramos. Se nota la diferencia existente lo cual puede ser atribuido a que: A pesar de que ambos tratamientos contenían dosis altas de BAP, al segundo tratamiento se le adicionó una dosis mayor de ANA, lo que influyó en el crecimiento del callo. En éstos puede notarse también la diferencia en cuanto a la formación de puntos verdes, pues los callos del primer tratamiento formaron mas puntos verdes que el segundo. Se notó además (a excepción de la dosis de 7 mg/L. de BAP) que a mayor dosis de BAP mayor crecimiento del callo, pero, el balance auxina-citocinina es determinante en éste aspecto.

De manera general se observó en éste experimento que el crecimiento en el total de callos fue del 93.8%.

C. Puntos verdes

El estudio indica (cuadro 15) que callos que obtuvieron menor crecimiento lograron formar número alto de puntos verdes, como es el caso, del tratamiento que contenía 0.50 mg/L. de BAP y 0.0250 mg/l de ANA, el cual formó 27 puntos verdes, sin embargo el peso alcanzado fue solamente 1.25 gr. La mayoría de tratamientos alcanzaron pesos mayores que este tratamiento, pero, la formación de puntos verdes no fue necesariamente más alta.

El medio de cultivo que contenía 0.50 mg/L de BAP y 0.050 mg/L de ANA, en el 100% de los callos regeneraron, indujo 51 puntos verdes, el mayor en número.

El tratamientos que contenía 5.00 mg/L de BAP y 0.20 mg/L de ANA, el cual logró formar 21 puntos verdes, uno de los más altos, logró uno de los mayores pesos, siendo éste de 12.1 g.

El cuadro 15 muestra los anteriores resultados.

CUADRO 15 Respuesta del cultivo de callos a la regeneración de plantas en el medio MS suplementado y diferentes concentraciones de BAP, ANA y AIB en mg/L.

BAP ANA	CRECIMIENTO			CALLOS CON PUNTOS VERDES			CALLOS REGENERADOS			PLANTAS ENRAIZADAS	
	No.	%	PESO (grs)	PV	No.	%	No.	%	PR	No.	%
0.5.0.02	9	100	1.25	27	9	100	-	-	-	-	-
0.5.0.05	9	100	6.57	51	9	100	9	100	36	36	100
0.5.0.1	9	100	5.13	2	2	22	-	-	-	-	-
0.5.0.2	9	100	6.40	1	1	11	-	-	-	-	-
0.5.0.5	9	100	2.65	15	5	55	4	44	8	8	100
1.0.0.02	9	100	1.48	7	4	44	-	-	-	-	-
1.0.0.05	8	66.	2.85	8	5	55	-	-	-	-	-
1.0.0.10	3	100	8.10	5	2	22	-	-	-	-	-
1.0.0.20	9	33.	8.25	4	2	22	-	-	-	-	-
1.0.0.50	9	100	4.78	4	2	22	-	-	-	-	-
3.0.0.02	9	100	9.90	0	0	0	-	-	-	-	-
3.0.0.05	9	100	9.80	0	0	0	-	-	-	-	-
3.0.0.10	9	100	8.15	2	2	22	-	-	-	-	-
3.0.0.20	9	100	4.48	1	1	11	-	-	-	-	-
3.0.0.50	9	100	9.85	0	0	0	-	-	-	-	-
5.0.0.02	9	100	1.80	10	3	33	-	-	-	-	-
5.0.0.05	9	100	7.65	8	4	44	-	-	-	-	-
5.0.0.1	9	100	12.5	9	4	44	-	-	-	-	-
5.0.0.2	9	100	12.1	21	7	77	-	-	-	-	-
5.0.0.5	6	66.	5.32	0	0	0	-	-	-	-	-
7.0.0.02	6	66.	3.08	3	2	22	-	-	-	-	-
7.0.0.05	9	100	8.38	5	3	33	-	-	-	-	-
7.0.0.1	9	100	8.70	14	5	55	-	-	-	-	-
7.0.0.2	9	100	5.10	0	0	0	-	-	-	-	-
7.0.0.5	9	100	6.48	0	0	0	-	-	-	-	-
AIB 5.0	9	100	6.42	8	4	44	3	33	5	5	100
TOTAL	219	93.6	166	205	76	32	17	7.2	49	49	
MEDIA			6.4								

REFERENCIAS: PV=puntos verdes; P.R=Plantas regeneradas

8.2.1.2 CARACTERISTICAS CUANTITATIVAS

A. Color y consistencia

Se observó que el 47.4% de los callos presentaron color amarillo, el 44.8% fue de color verde y el 7.7% crema.

Los callos que regeneraron presentaron diferencias en cuanto a color y consistencia.

El tratamiento que contenía 0.50 mg/L de BAP y 0.050 mg/L de ANA, presentó mayor número de callos de color verde con consistencia dura.

El tratamiento al que se le adicionó 0.50 mg/L de BAP y 0.50 mg/L de ANA, formó callos color verde con consistencia dura.

El tratamiento que solo contó con la adición de 5.0 mg/L de AIB formó callos amarillos con consistencia dura.

Las características cualitativas en cuanto a color y consistencia de los callos y las frecuencias que definieron el comportamiento para los tratamientos con respuesta a la regeneración y de manera general para todo el ensayo se muestran en el cuadro 18.

CUADRO 16 Comportamiento (frecuencia) del color y consistencia en callos evaluados en el medio MS y diferentes combinaciones de BAP, ANA y AIB.

	BAP, ANA	COLOR			CONSISTENCIA	
		AMARILLO	CREMA	VERDE	FRIABLE	DURA
a	0.50,0,025	-	-	9	6	3
b	0.50, 0.050	3	-	6	-	9
c	0.50,0.10	3	-	6	3	6
d	0.50, 0.20	3	-	6	6	3
e	0.50. 0.50	3	-	6	3	6
f	1.00, 0.025	3	-	6	9	-
g	1.00, 0.050	-	3	6	3	6
h	1.00, 0.10	6	3	-	-	9
i	1.00, 0.20	3	6	-	-	9
j	1.00, 0.50	9	-	-	-	9
k	3.00, 0.025	3	-	6	9	-
l	3.00, 0.050	3	-	6	9	-
m	3.00, 0.10	-	-	9	3	6
n	3.00, 0.20	-	-	9	-	9
ñ	3.00, 0.50	9	-	-	-	9
o	5.00, 0.025	-	-	9	9	-
p	5.00, 0.050	3	-	6	6	3
q	5.00, 0.10	9	-	-	6	3
r	5.00, 0.20	6	-	3	3	6
s	5.00, 0.50	6	3	-	-	9
t	7.00, 0.025	3	3	3	6	3
u	7.00, 0.050	3	-	6	6	3
v	7.00, 0.10	6	-	3	-	9
w	7.00, 0.20	9	-	-	-	9
x	7.00, 0.50	9	-	-	-	9
y	AIB 5.00	9	-	-	-	9
	TOTAL	111	18	105	87	147
	%	47.4	7.7	44.8	37.1	62.8

NOTA: 9 callos fueron evaluados por tratamiento.

6.2.2 SEGUNDO ENSAYO. Evaluación de la respuesta del cultivo de callos en el medio MS, con la adición de 0.50 mg/L. de ácido giberélico, y diferentes concentraciones de Bencil aminopurina, ácido indolacético y ácido indolbutírico.

6.2.2.1 CARACTERISTICAS CUANTITATIVAS

A. Número de Puntos verdes

Bajo estas condiciones de cultivo existe respuesta de los callos a la formación de puntos verdes.

Se notó que a los medios de cultivo a los que se suministró 1.00 mg/L. de BAP y 0.10 mg/L. de AIA y 3.00 mg/L. de BAP y 0.20 mg/L. de AIA presentaron el mayor número de puntos verdes siendo para estos de 32 y 24 respectivamente. Además éstos presentaron los porcentajes más altos para el total de callos que indujeron ésta característica, siendo del orden de 100 y 88.8% respectivamente.

Los tratamientos que contenían 3.0 mg/L. y 0.10 mg/L.; 5.0 mg/L y 0.10 mg/L. ; 7.00 mg/L. y 0.20 mg/L. de BAP y AIA respectivamente, tuvieron menos respuesta, ya que a pesar de que presentaron 100% para el crecimiento del callo, no existió en ellos uno solo que indujera la formación de puntos verdes. De igual forma el tratamiento que contenía 5.00 mg/L. de AIB no indujo ésta característica.

De manera general medios de cultivo con dosis de 5.0 y 7.0 mg/L de BAP y sus respectivas combinaciones de AIA, indujeron bajo número de puntos verdes.

Es preciso hacer notar que la mayor formación de puntos verdes, se obtuvieron en los medios que contenían concentraciones de 1.00 y 3.00 mg/l de BAP y dosis menores de 0.20 de AIA. Tratamientos con dosis mayores de AIA indujeron menor número.

B. Crecimiento

El medio de cultivo que indujo mayor número de puntos verdes, 1.0 mg/L de BAP y 0.10 mg/L de AIA, formó un peso de 2.45 gramos, el cual fue uno de los mas bajos entre los tratamientos.

Contrariamente el medio de cultivo al que se le adicionó 3.0 mg/L de BAP y 0.20 mg/L de AIA, que también formó alto número de puntos verdes, logró un peso de 9.02 gramos, uno de los mayores. Dosis mayores tanto de BAP como de AIA suministradas a éste último pudieron haber influido en el crecimiento.

De manera general y tomando en consideración todo el ensayo, se observó que el crecimiento del callo fue de 96.15%, el cual es alto debido a que en la mayoría de tratamientos se obtuvo el 100% para esta variable, con excepción de los tratamientos contenían 0.50 mg/L. y 0.050 mg/L.; 1.00 mg/L. de y 0.50 mg/L. de BAP y AIA respectivamente y al tratamiento al que solo se le adicionó 5.0 mg/L. de AIB, los cuales presentaron el 66.7% en el crecimiento, como se puede ver en cuadro 17.

CUADRO 17 Respuesta del cultivo de callos a la propagación en el medio MS y combinaciones de BAP, AIA Y AIB (mg/L.)

	COMBINACION BAP, ANA	CRECIMIENTO			CALLOS CON PUNTOS VERDES		
		No.	%	PESO (grs.)	No.	%	PV
A	0.50, 0.025	9	100	7.28	2	22.2	4
B	0.50, 0.050	6	66.6	11.83	5	55.5	11
C	0.50, 0.10	9	100	7.30	3	33.3	6
D	0.50, 0.20	9	100	4.60	2	22.2	4
E	0.50, 0.50	9	100	9.73	4	44.4	6
F	1.00, 0.025	9	100	4.57	9	100	13
G	1.00, 0.050	9	100	6.83	3	33.3	5
H	1.00, 0.10	9	100	2.45	9	100	32
I	1.00, 0.20	9	100	7.36	7	77.7	10
J	1.00, 0.50	6	66.6	5.08	2	22.2	2
K	3.00, 0.025	9	100	5.22	6	66.6	12
L	3.000,0.050	9	100	7.93	3	33.3	7
M	3.00, 0.10	9	100	8.72	0	0	0
N	3.00, 0.20	9	100	9.02	8	88.8	24
Ñ	3.00,0.50	9	100	8.62	2	22.2	2
O	5.00, 0.025	9	100	2.22	2	22.2	4
P	5.00,0.050	9	100	8.42	3	33.3	3
Q	5.00,0.10	9	100	7.62	0	0	0
R	5.00,0.20	9	100	8.43	1	11.1	2
S	5.00,0.50	9	100	3.95	1	11.0	2
T	7.00,0.025	9	100	8.33	2	22.2	2
U	7.00,0.050	9	100	8.20	2	22.2	3
V	7.00,0.10	9	100	6.45	3	33.3	3
W	7.00, 0.20	9	100	5.20	0	0	0
X	7.00, 0.50	9	100	10.70	2	22.2	2
Y	AIB 5.00	6	66.6	8.00	0	0	0
	TOTALES	225	96.2	186.0	81	34.62	159
	MEDIA	8.65		7.16	3.11	3.11	

REFERENCIA: PV= puntos verdes; NOTA: 9 callos/tratamiento.

6.2.2.2 CARACTERISTICAS CUALITATIVAS

El ensayo mostró diferentes manifestaciones de los callos para el color y la consistencia.

A. Color y consistencia

De manera general, los medios de cultivo formaron el 70.5% de callos con color amarillo. Solamente en dos tratamientos a los que se adicionó 1.00 mg/L y 0.10 mg/L; 3.00 mg/L y 0.50 mg/L de BAP y AIA respectivamente, no se observó éste color.

El color verde se presentó en el 25.8% y crema en el 3.8%.

La consistencia friable se observó mayormente, 78.2% y solamente el 21.8% fueron friables.

Los callos del tratamiento que contenía 1.0 mg/L. de BAP y 0.10 mg/L. de AIA, que formaron mayor número de puntos verdes, presentaron color verde y con mayor frecuencia consistencia dura. El tratamiento al que se adicionó 3.0 mg/L. de BAP y 0.20 mg/L. de AIA, que también formó un número alto de puntos verdes, presentó con mayor frecuencia el color amarillo, además consistencia dura. Las características del primero son atribuidas al mejor balance auxina:citocinina.

Las combinaciones en los tratamientos que contenían 3.00 mg/L. y 0.10 mg/L; 5.00 mg/L. y 0.10 mg/l; 7.00 mg/L y 0.20 mg/L. de BAP y AIA respectivamente y el tratamiento al que se le adicionó 5.00 mg/L de AIB, presentaron mayor frecuencia la formación de callos color amarillo y consistencia friable, características consideradas desfavorables para la organización del tejido, pues ninguno indujo la formación de puntos verdes.

Las condiciones del cultivo permitieron observar las características que se presentan en el cuadro 18.

CUADRO 18 Comportamiento (frecuencia) en cuanto a color y consistencia de los callos evaluados en el medio MS y diferentes combinaciones de BAP, AIA y AIB en mg/L.

	BAP ANA	COLOR			CONSISTENCIA	
		amarillo	crema	verde	friable	dura
a	0.50,0.025	9	-	-	9	-
b	0.50,0.050	6	3	-	9	-
c	0.50,0.10	3	-	6	9	-
d	0.50,0.20	3	-	6	6	3
e	0.50,0.50	9	-	-	9	-
f	1.00,0.025	9	-	-	6	3
g	1.00,0.050	3	-	6	9	-
h	1.00,0.10	-	-	9	3	6
i	1.00,0.20	6	-	3	3	6
j	1.00,0.50	6	3	-	6	3
k	3.00,0.025	6	-	3	9	-
l	3.00,0.050	6	-	3	9	-
m	3.00,0.10	9	-	-	6	3
n	3.00,0.20	6	-	3	-	9
ñ	3.00,0.50	-	-	9	6	3
o	5.00,0.025	9	-	-	9	-
p	5.00,0.050	9	-	-	6	3
q	5.00,0.10	9	-	3	6	3
r	5.00,0.20	6	-	-	9	-
s	5.00,0.50	6	-	3	9	-
t	7.00,0.025	9	-	-	6	3
u	7.00,0.050	6	-	3	3	6
v	7.00,0.10	9	-	-	9	-
w	7.00,0.20	6	-	3	9	-
x	7.00,0.50	9	-	-	9	-
y	AIB 5.00	6	3	-	9	-
	totales	165	9	60	83	51
	%	70.5	3.85	25.64	78.21	21.79

NOTA: 9 callos fueron evaluados por tratamiento.

verdes respectivamente. En éstos el 100% de callos inoculados formaron esa característica. Estas respuestas se presentaron cuando se adicionaron concentraciones no mayores de 1.00 mg/L de BAP y en dosis no mayores de 0.10 mg/L de ANA, las características observadas no son proporcionales al peso alcanzado (cuadro 18).

Los tratamientos que contenían 5.0 mg/L. y 0.025 mg/L.; 3.0 mg/L. y 0.50 mg/L.; 5.0 mg/L. y 0.10 mg/L.; 7.0 mg/L. y 0.050 mg/L.; 7.0 mg/L. y 0.10 mg/L. de BAP y ANA respectivamente y el tratamiento, 5.00 mg/L. de AIB, no presentaron un solo callo que indujera la formación de puntos verdes, aunque el peso alcanzado en la mayoría de éstos fue relativamente alto. Estas respuestas desfavorables a la formación de puntos verdes se dieron a concentraciones mayores de 1.00 mg/L de BAP y en la mayoría de concentraciones de AIA.

B. Crecimiento

En general en el presente ensayo, se observó que el total de callos con crecimiento fueron 186, lo cual representa el 79.48%. Del total de tratamientos, 23 lograron un crecimiento del callo no menor del 66.6% y

solamente 3 obtuvieron el 33.3%, éste bajo porcentaje se observó en tratamientos cuya concentración de BAP fue mayor de 3.00 mg/L.

El mayor peso fresco fue de 6.53 gramos en el tratamiento al que se le adicionó 3.00 mg/L de BAP y 0.50 mg/L de ANA, sin embargo en éste no existió formación de puntos verdes.

El menor peso fresco se obtuvo en los callos del tratamiento que contenía 3.00 mg/L de BAP y 0.05 mg/L de ANA, el cual solo alcanzó 1.53 gramos.

Es posible que la adición de KIN y AC al medio de cultivo hayan condicionado las diferentes respuestas, permitiendo en algunos casos el crecimiento de la masa celular, pues como menciona Roca (27) el AC favorece la división celular de los callos en sinergismo con la auxina presente, sin embargo, la organización celular no fue favorecida al ser suministrados en los volúmenes recomendados, lo cual influyó también en la formación de callos normalmente con consistencia friable.

En el cuadro 19 se presentan los resultados obtenidos bajo éstas condiciones.

CUADRO 19 Respuesta del cultivo de callos a la propagación en el medio MS suplementado con KIN, AC y combinaciones de BAP, ANA y AIB en mg/L.

	COMBINACION BAP ANA	CRECIMIENTO			CALLOS CON PUNTOS VERDES		
		No.	%	PESO (grs)	No.	%	PV
a	0.50,0.025	9	100	5.67	9	100	30
b	0.50,0.050	9	100	3.97	5	55.5	11
c	0.50,0.10	9	100	3.80	9	100	20
d	0.50,0.20	9	100	6.26	4	44.4	6
e	0.50,0.50	9	100	5.13	3	33.3	8
f	1.00,0.025	6	66.6	3.80	2	22.2	8
g	1.00,0.050	9	100	5.43	9	100	46
h	1.00,0.10	3	33.3	2.37	3	33.3	10
i	1.00,0.20	9	100	3.87	3	33.3	6
j	1.00,0.50	6	66.6	3.37	3	33.3	6
k	3.00,0.025	6	66.6	3.67	2	22.2	3
l	3.00,0.050	3	33.3	1.53	0	0	0
m	3.00,0.10	6	66.6	3.67	2	22.2	3
n	3.00,0.20	9	100	2.75	2	22.2	5
ñ	3.00,0.50	9	100	6.53	0	0	0
o	5.00,0.025	9	100	2.40	1	11.1	2
p	5.00,0.050	9	100	4.63	2	22.2	3
q	5.00,0.10	9	100	4.80	3	33.3	5
r	5.00,0.20	3	33.3	4.50	0	0	0
s	5.00,0.50	6	66.6	2.70	2	22.2	4
t	7.00,0.025	6	66.6	2.77	2	22.2	4
u	7.00,0.050	9	100	4.00	0	0	0
v	7.00,0.10	6	66.6	4.02	0	0	0
w	7.00,0.20	6	66.6	3.47	2	22.2	4
x	7.00,0.50	6	66.6	2.93	3	33.3	5
y	AIB 5.00	6	66.6	4.63	0	0	0
	TOTALES	186	78.5	102.67	71	30.34	187
	MEDIA	7.15		3.95	2.73	2.73	

REFERENCIA: FV=puntos verdes

NOTA: 9 callos fueron evaluados por tratamiento.

6.2.3.2 CARACTERISTICAS CUALITATIVAS

A. Color y consistencia

De manera general el ensayo presentó mayor frecuencia para la consistencia friable, 80.77% y en cuanto al color, el verde fue el dominante, 58.4%.

Existió también formación de callos color crema, 54 en total, distribuidos en 14 tratamientos, que representaron el 23.1%, ésto puede considerarse alto si se compara con los obtenidos en los ensayos anteriores; característica que no se presentó en tratamientos que contenían 0.50 mg/L de BAP y entre sus combinaciones respectivas de ANA.

En el ensayo se notó que el tratamiento que contenía 1.0 mg/L. de BAP y 0.05 mg/L. de ANA, y que presentó el mayor número de puntos verdes, mostró mayor frecuencia el color verde, y en cuanto a la consistencia mayor formación de callos duros.

Los medios de cultivo que contenían 0.50 mg/L. de BAP y 0.10 mg/L. de ANA, que también indujeron alto número de puntos verdes, el total de callos presentaron color verde, sin embargo, en todos la consistencia fue friable.

Los callos del tratamiento a los que se adicionó 0.50 mg/L. de BAP y 0.10 mg/L. de ANA, los cuales el 100% formaron puntos verdes, mostraron mayor frecuencia el color amarillo, y consistencia dura.

Lo anterior y considerando el total de tratamientos indica, que, concentraciones menores o mayores a 1.00 mg/L de BAP en combinación con dosis fuera del rango de 0.025-0.10 mg/L de ANA, inducen normalmente callos con consistencia friable, características no deseadas por el bajo número de puntos verdes que son formados.

En el cuadro 20 se presenta éste comportamiento.

CUADRO 20 Comportamiento (frecuencia) en cuanto a color y consistencia de callos evaluados en el medio MS suplementado con KIN, AC y diferentes combinaciones de BAP, ANA y AIB en mg/L.

	BAP	ANA	COLOR			CONSISTENCIA	
			AMARILLO	CREMA	VERDE	FRIABLE	DURA
A	0.50,	0.025	-	-	9	9	-
B	0.50,	0.050	-	-	9	6	3
C	0.50,	0.10	6	-	3	3	6
D	0.50,	0.20	-	-	9	6	3
E	0.50,	0.50	-	-	9	6	3
F	1.00,	0.025	3	3	3	6	3
G	1.00,	0.050	3	-	6	3	6
H	1.00,	0.10	-	6	3	9	-
I	1.00,	0.20	-	-	9	6	3
J	1.00,	0.50	-	3	6	9	-
K	3.00,	0.025	3	3	3	6	3
L	3.00,	0.050	-	9	-	9	-
M	3.00,	0.10	-	3	6	9	-
N	3.00,	0.20	9	-	-	9	-
ñ	3.00,	0.50	-	-	9	9	-
O	5.00,	0.025	-	-	9	9	-
P	5.00,	0.050	9	-	-	9	-
Q	5.00,	0.10	-	-	9	6	3
R	5.00,	0.20	-	6	3	9	-
S	5.00,	0.50	3	3	3	6	3
T	7.00,	0.025	-	3	6	6	3
U	7.00,	0.050	3	3	3	6	3
V	7.00,	0.10	-	3	6	9	-
W	7.00,	0.20	-	3	6	9	-
X	7.00,	0.50	3	3	3	6	3
Y	AIB	5.00	6	3	-	9	-
	TOTALES		48	54	132	189	45
	%		20.51	23.08	56.41	80.77	19.23

NOTA: 9 callos fueron evaluados por tratamiento.

8.3 ANALISIS COMPARATIVO ENTRE ENSAYOS

8.3.1 REGENERACION DE PLANTAS

El ensayo 1, presentó respuesta a la regeneración de plantas. Ninguna de las plantas formadas fue albina y todas respondieron a la formación de raíces.

En el segundo y tercer ensayo, no existió respuesta a la regeneración de plantas, pero, si a la formación de puntos verdes.

Las características anteriores se deben a la especificidad de respuesta de la masa celular a la organización en función de suplementos y reguladores del crecimiento presentes y al balance existente, lo cual indujo formación de plantas en el primer ensayo, no así en el segundo en donde la función auxínica del ANA fué sustituida por AIA. En cuanto al tercer ensayo las características fueron condicionadas a la adición al medio de cultivo de KIN y AC.

8.3.2 COMPORTAMIENTO CUANTITATIVO Y CUALITATIVO ENTRE CULTIVOS

8.3.2.1 COMPORTAMIENTO CUANTITATIVO

A. Crecimiento del callo

Los ensayos 1 y 2 presentaron similitudes, ya que de 234 callos inoculados, en el primero se obtuvo el 93.8%, en el segundo 98.2%. Las medias en base al total de tratamientos por ensayo son de 8.5 y 8.7 respectivamente.

En general se notó que tanto el ANA adicionada en el primer ensayo 1, como el AIA en el segundo, cumplieron de manera similar las funciones del inicio y sostenimiento del crecimiento celular, además, como lo indica Roca (27), muestra el hecho de que para este caso en particular la presencia de una sola auxina adicionada al medio basal puede ser

suficiente para realizar esas funciones.

Esta aseveración es tomada en base a la similitud y alto grado de crecimiento observado en ambos.

En el tercer ensayo, se obtuvo el menor porcentaje de crecimiento, 79.5%.

B. Peso fresco

El peso fresco total más alto se alcanzó en el segundo ensayo el cual fue de 186.1 gramos, la media por ensayo fue de 7.2 gramos.

En el primer ensayo se obtuvo un peso de 188 gramos, el promedio fue de 6.4 gramos.

El menor peso se obtuvo en el tercero 102.7 gramos, a pesar de ello el apareamiento del número de puntos verdes no fue el menor. La media del ensayo fue de 3.9 gramos.

C. Puntos verdes

Se observó que los callos del primer ensayo presentaron mayor número de puntos verdes 205 en total, el tercero 187 y el segundo 159. Al relacionar éste parámetro con el peso fresco se nota que no existe relación directa a la formación de puntos verdes, pues en el primero el peso obtenido no fue necesariamente el mayor. Además el segundo ensayo logró mayor peso, pero el número de puntos verdes fue menor. Las características que presentó el segundo ensayo pudieron estar condicionadas a la acción auxínica que le confirió el AIA, ya que por analogía con el ensayo anterior se notan características menos apropiadas para la organización celular, las cuales se evidencian por la menor formación de puntos verdes y la formación de consistencia friable.

En el tercer ensayo a pesar de que el número de puntos verdes no

fué el más bajo, en los callos no hubo organización celular, solamente incremento del callo.

8.3.2.2 COMPORTAMIENTO CUALITATIVO

A. Color

En los callos del primero y segundo ensayos se observó como color predominante el amarillo 47.4 y 70.5% respectivamente. Mientras que para el tercero lo fue el verde 58.4%.

El color crema se observó en los 3 ensayos, siendo más frecuente en el tercero 23%.

En el cuadro 20 se presentan los totales y porcentajes de las respuestas cualitativas en los diversos ensayos.

B. Consistencia

Los callos en los que se obtuvo mayor número de puntos verdes, mostraron generalmente consistencia dura.

La consistencia dura se observó mayormente en el primer ensayo 62.8%, el segundo y tercero presentaron 21.7 y 19.2% respectivamente.

La consistencia friable fué más frecuente en el tercero y segundo 80.7 y 78.2% respectivamente, características condicionadas a los suplementos en el medio de cultivo; mientras que en el primero fue solamente 37.1%.

El cuadro 21 resume éstas características para los 3 ensayos evaluados. Este presenta los totales y sus porcentajes correspondientes de las variables cuantificadas.

CUADRO 21 Respuesta cuantitativa y cualitativa del cultivo de callos, bajo 3 condiciones de medios de cultivo.

VARIABLE	ENSAYO 1			ENSAYO 2			ENSAYO 3		
	No.	%	M.	No.	%	M	No.	%	M
callos inoculados	234	100	-	234	100	-	234	100	-
Callos con crecimiento	218	93.2	8.5	225	96.2	8.6	186	79	7
peso (g.)	186	-	6.4	186	-	7.1	102	-	3.6
Puntos verdes	205	-	-	159	-	-	187	-	-
callos con puntos verdes	76	32.4	-	81	34.6	-	71	30	-
Callos regenerados	17	7.26	-	-	-	-	-	-	-
Plantas regeneradas	49	-	-	-	-	-	-	-	-
Plantas verdes	49	-	-	-	-	-	-	-	-
Plantas albinas	0	-	-	-	-	-	-	-	-
Plantas formadas	49	100	-	-	-	-	-	-	-
callos amarillos	11	47.4	-	165	70.5	-	48	20.5	-
callos crema	18	7.69	-	9	3.85	-	54	23.0	-
callos verdes	105	44.8	-	60	25.6	-	132	56.4	-
callos friables	87	37.1	-	183	78.2	-	189	80.7	-
callos duros	147	62.8	-	51	21.7	-	45	19.2	-

REFERENCIA: M. = media

7. CONCLUSIONES

1. La especie Tres Puntas (*Neuroleena lobata* L.), responde a la propagación "in vitro" al regenerar plantas (organogénesis) y formar raíces (rizogénesis) a través de la técnica del cultivo de callos. Bajo éstas condiciones no existe formación de plantas albinas.
2. Callos cultivados en el medio MS, suplementados con 0.50 mg/L de ácido giberélico, 0.50 mg/L de bencil aminopurina y 0.050 mg/L de ácido naftalenacético, responden en el 100% a la regeneración de plantas. Medios de cultivo con las características anteriores, pero, con concentraciones de 0.50 mg/L de ácido naftalenacético, inducen regeneración de plantas en el 44%.
3. La adición de 5.0 mg/L de ácido indolbutírico y 0.50 mg/L de ácido giberélico al medio (MS), induce regeneración de plantas en el 33.3% de los callos cultivados.
4. La inducción de raíces en los brotes es del 100% en un término aproximado de 15 días, al transferir éstos a un medio de cultivo (MS), suplementado con 2.0 mg/L de ácido indolbutírico.
5. Los medios de cultivo suplementados con 0.50 mg/L de ácido giberélico y diferentes concentraciones de bencil aminopurina y ácido indolacético, estimulan mayor peso e inducen puntos verdes en mayor número de callos.

6. Al suplementar el medio de cultivo con 0.05 mg/L de kinetina, 10% de agua de coco, bencil aminopurina y ácido naftalenacético se favorece la formación de callos color verde.

7. El crecimiento del meristemo es condicionado por la oxidación del explante. Sin embargo existe una tendencia a la formación de plantas, cuando los explantes son tratados, previo al cultivo, con una solución de carbón activado, al reducir éste el grado de oxidación del mismo.

8. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios similares con otras poblaciones de Tres puntas (*Neurolaena lobata* L.), que evalúen medios de cultivo y combinaciones de reguladores del crecimiento, para determinar si hay respuesta favorable de los meristemos a la propagación en otras condiciones.
2. Realizar investigaciones para conocer los mecanismos que determinan la rápida oxidación del meristemo, la cual es determinante en el desarrollo de cultivos in vitro, con el objeto de desarrollar métodos de manejo y técnicas de cultivo que favorezcan la propagación.
3. Para la regeneración de plantas a través del cultivo de callos en la especie Tres puntas (*Neurolaena lobata* L.), se recomienda utilizar el medio MS, suplementado con 0.50 mg/L. de ácido giberélico, 0.50 mg/L de bencil aminopurina y 0.050 mg/L. de ácido naftalenacético.
4. Evaluar otros compuestos y maneras de aplicación, que puedan ser utilizados en el proceso de desinfección del material vegetal, con el objeto de determinar un método que permita el control de la oxidación del explante en ésta fase de cultivo.

9. BIBLIOGRAFIA

1. AGUILAR, J.I. 1986. Relación de unos aspectos de la flora útil de Guatemala. 2 ed. Guatemala, Tipografía Nacional. 180 p.
2. BIDWELL, R. 1990. Fisiología vegetal. México, D.F., A.G.T Editores. 784 p.
3. CALDERON, D.J. 1990. Evaluación de la respuesta de cinco variedades de trigo (Triticum aestivum L.) a la inducción de callo y regeneración de plantas en diferentes medios de cultivo a partir del cultivo de anteras. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 53p.
4. CALVENTI, I.B. 1985. Aspectos químicos y usos nativos de plantas en la medicina folklórica dominicana. Santo Domingo, Republica Dominicana, Centro de Investigaciones y de Biología marina. 95 p.
5. COLL, F. et al. 1985. Estudios fitoquímicos en el género Cestrum. Plantas Medicinales (Cuba) 5:7-14.
6. CRONQUIST, A. 1987. Introducción a la botánica. 2 ed. México, Continental. 848 p.
7. DIAZ, L. 1988. Obtención de callos en Orthosiphon stamineus. Plantas Medicinales (Cuba) 8:75-80.
8. ----- 1990. Aplicación del cultivo in vitro para la multiplicación acelerada de Digitalis lanata en Cuba. Plantas Medicinales (cuba) 10:55-60.
9. FUENTES, V.R. 1988. Tamizaje de tolerancia a la salinidad en 25 especies de plantas medicinales. Plantas Medicinales (Cuba) 8:79-85.
10. GRANDA, M.M. 1985. Reporte sobre la introducción de plantas medicinales exóticas III. Plantas Medicinales (Cuba) 5:53-97.
11. HARTMAN, H.T.; KESTER, D.E. 1987. Propagación de plantas; principios y prácticas. México, continental. 780 p.
12. HURTADO, M. et al. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 232 p.
13. KERR, K.M.; MABRY, T.J.; YOSER, S. 1980. 6-hydroxy-and-6-methoxyflavonoides from Neuroleena lobata and Neuroleena macrocephala. Austin, Texas, EE.UU., University of Texas, Department of Botany. p. 791-794.

14. MAHABIR, P.G.; NIKA, G.S. 1984. Hypoglycemic activity of Neurolaena lobata (L.) R. Br. Short Communication. (EE.UU.). 5p.
15. MANCHAND, P.; BLOUNT, J.F. 1978. Stereostructures of neurolenins A & B, novel germacranolide sesquiterpenes from Neurolaena lobata (L.) R. Br. J. Org. Chem. (EE.UU.) 43:4352-4354.
16. MORTON, J.F. 1985. Atlas of medicinal plants of Middle América, Bahamas to Yucatan. Illinois, EE.UU, Charles C. Thomas Publisher. 520p.
17. MUNOZ, L.B. 1987. Plantas aromáticas y medicinales; estudio, cultivo y procesado. Madrid, Mundi-Prensa. 385p.
18. NASH, D.L.; Williams, L.O. 1976. Flora of Guatemala. Chicago, EE.UU., Field Museum of Natural History. Fieldiana: Botany. v.24, pte. 12, p. 270-273.
19. OCAMPO, S.R.; MAFFIOLI, A. 1985. El uso de algunas plantas medicinales en Costa Rica. San José, Costa Rica, Trejos. Volumen 1. 180p.
20. PAHLOW, M. 1985. El gran libro de las plantas medicinales: la salud mediante las fuerzs curativas de la naturaleza. León, España, Everest. 465 p.
21. PASCUAL, L.F. 1991. Colecta y descripción de los recursos fitogenéticos de uso medicinal en el municipio de San Pedro Ayampuc, departamento de Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 107p.
22. PELICANO, E.A. et al. 1987. Plantas medicinales. Brasil, Ministerio de Agricultura. 32p.
23. PEREA, D.; NAVARRO, A.W. 1988. Técnicas in vitro para la producción y mejoramiento de plantas. Costa Rica, Universidad Nacional de Heredia. 105 p.
24. PERRONE, M. 1992. Plantas medicinales. Una alternativa agrícola y económica. Prensa Libre, Guatemala (Gua.); abril 10; 80 p.
25. POMPA, G. s.f. Medicamentos indígenas; colección de medicamentos indígenas y sus aplcaciones extraidos de los reinos vegetal, mineral y animal. México, s.e. 311 p.
26. PROYECTO DE PLANTAS MEDICINALES; GEXPRONT (Gua). 1992. Desarrollo agrotecnológico de cinco especies medicinales silvestres con potencial de exportación, Smilax sp. Petiveria alliacea y Neurolaena lobata L. Guatemala. 88 p.

27. ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, CIAT. 970 p.
28. SABEV, I.A. 1989. Como vivir sano; manual de higiene y autoterapia indispensable para los hogares. Quito, Renuevo. 421 p.
29. THORPE, T.A. 1987. Plant tissue culture and aplicaciones in agriculture. New York, Academic Press. 177 p.
30. VUYLSTEKE, D.R. 1989. Shot-tip culture for de propagation, conservation and exchange of musa germplasm. Roma, International Board for Plant Genetic Resources. 58 p.
31. WEAVER, R.J. 1989. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. México, Trillas. 622 p.
32. ZUNIGA, C.B. 1990. Producción de plantas de papa (solanum tuberosum Vr. Loman) libres de los virus X, Y y S a través del cultivo de meristemas y el uso de termoterapia aplicada a plantas enfermas con éstos virus. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 70p.



No. Bo. *Rolando Barrios.*

10. **APENDICE**

CUADRO 8 A Medio de cultivo Murashigue y Skoog (MS) (1982).

solu- ción Stock	sales	concen- tración sol Stock Gr/L	volúmen que debe utilizarse en el medio ml/L	concen- tración final ngr/L
I	NH ₄ NO ₃ KNO ₃	82.5 95.0	20	1.650.0 1.900.0
II	MgSO ₄ .7H ₂ O MnSO ₄ .4H ₂ O ZnSO ₄ .7H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O	37.0 2.23 1.058 0.0025	10	370.0 22.3 10.6 0.025
III	CaCl ₂ .2H ₂ O KI COCl ₂ .6H ₂ O	44.0 0.083 0.0025	10	440.0 0.83 0.025
IV	KH ₂ PO ₄ H ₃ BO ₃ NaMoO ₄ .2H ₂ O	17.0 0.62 0.025	10	170.0 6.2 0.25
V	FeSO ₄ .7H ₂ O Na ₂ EDTA	2.784 3.724	10	27.85 37.25
vitami- nas	ácido nicotínico Piridoxina tiamina	100 100 100	0.5 0.5 0.1	0.5 0.5 0.1
MIOINO- SITOL				100.0
SACAROSA				30.000.0
AGAR				8.00

11/18

11/18



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
 FACULTAD DE AGRONOMIA
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
 AGRONOMICAS

Ref. Sem.014-94

LA TESIS TITULADA: "RESPUESTA DE LA ESPECIE TRES PUNTAS (Neurolaena lobata L.)
 A LA PROPAGACION IN VITRO".

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: ROY WALTER VILLACINDA MALDONADO

CARNET No: 80-13776

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Francisco Vásquez
 Ing. Agr. Fernando Rodríguez
 Ing. Agr. Eduardo Pretzanzin

El Asesor y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las normas universitarias y reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. Héctor Ramazzinni
 ASESOR



Ing. Agr. Rolando Lara Alecio
 DIRECTOR DEL IIA

IMPRIMASE

Ing. Agr. Errain Medina Guerra
 DECANO



c.c. Control Académico
 Archivo
 /pcc.

APARTADO POSTAL 1545 - 01901 GUATEMALA, C. A.
 TELEFONO 769794 - FAX (5022) 769770

