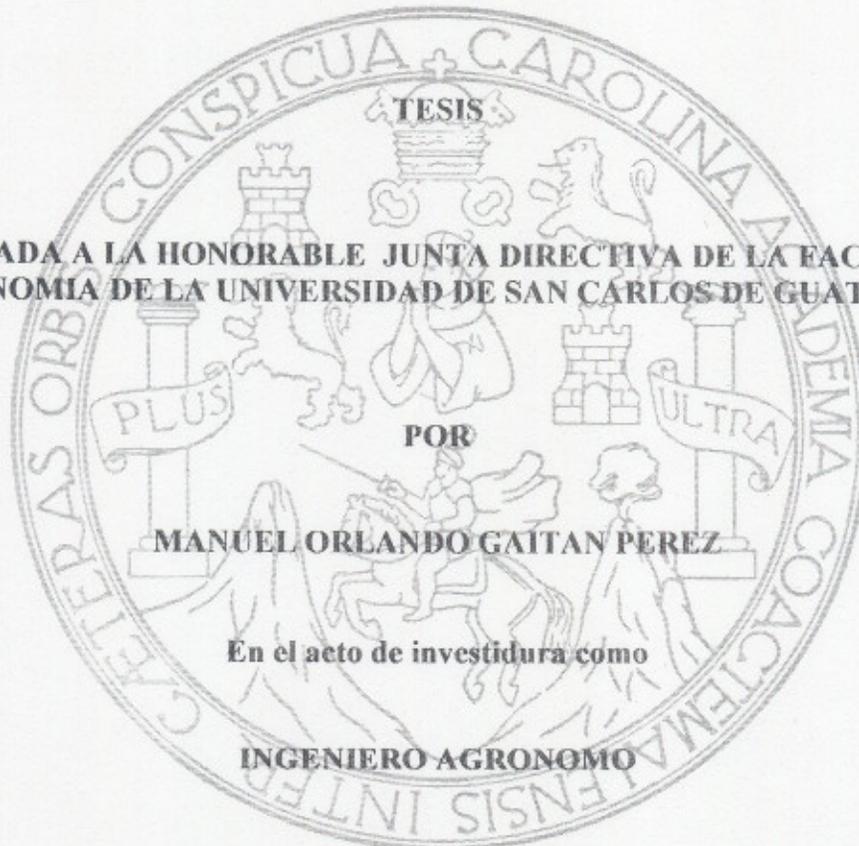


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS**

**COMPORTAMIENTO DE LA ZARZAPARRILLA (*Smilax aristolochiaefolia* Miller) AL  
CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION.**

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



**En el acto de investidura como**

**INGENIERO AGRONOMO**

**EN**

**SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA**

**EN EL GRADO ACADEMICO DE**

**LICENCIADO**

**Guatemala, marzo de 1999.**

**PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central**

$\frac{17}{01}$   
T(1763)

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA**

**RECTOR**

**Ing. Agr. EFRAIN MEDINA GUERRA**

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA**

**DECANO  
VOCAL I  
VOCAL II  
VOCAL III  
VOCAL IV  
VOCAL V  
SECRETARIO**

**Ing. Agr. José Rolando Lara Alecio  
Ing. Agr. Juan José Castillo Mont  
Ing. Agr. William Roberto Escobar López  
Ing. Agr. Alejandro Arnoldo Hernández Figueroa  
Br. Oscar Javier Guevara Pineda  
Br. José Domingo Mendoza Cipriano  
Ing. Agr. Guillermo Edilberto Méndez Beteta**

1/01  
(1963)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA

RECTOR  
Ing. Agr. EFRAIN MEDINA GUERRA

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

Ing. Agr. José Rolando Lara Alvarado  
Ing. Agr. Juan José Castillo Mont  
Ing. Agr. William Roberto Escobar López  
Ing. Agr. Alejandro Arceles Hernández Figueroa  
Dr. Oscar Javier Guzmán Pineda  
Dr. José Domingo Méndez Cárdenas  
Ing. Agr. Guillermo Edilberto Méndez Betts

SECRETARIO  
VOCAL V  
VOCAL IV  
VOCAL III  
VOCAL II  
VOCAL I  
DECANO

Guatemala, febrero de 1999.

Honorable Junta Directiva  
Honorable Tribunal Examinador  
Facultad de Agronomía

Distinguidos miembros:

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

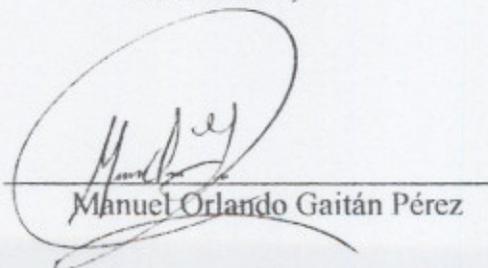
**COMPORTAMIENTO DE LA ZARZAPARRILLA (*Smilax aristolochiaefolia* Miller.)  
AL CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION.**

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

En espera de su aprobación, me despido de ustedes.

Atentamente,

f)



Manuel Orlando Gaitán Pérez



## **ACTO QUE DEDICO**

**A**

**DIOS:**

Por haberme dado el don maravilloso de la vida y la oportunidad de realizar uno de mis ideales. Hoy doy una pequeña muestra de ello, porque la vida nos depara nuevas aspiraciones.

**MIS PADRES:**

**Manuel Gaitán y Olimpia Pérez**

Como una muestra de agradecimiento a su amor, especialmente a mi madre por sus esfuerzos, apoyo moral y económico.

**MI ESPOSA:**

**Ingrid Maribel de Gaitán**

Por su amor, comprensión y apoyo en todo momento.

**A Melissa y Michell**

Como un ejemplo de lucha y aspiración.

**MIS HERMANOS:**

**Rosa María, Juan Luis y  
Carlos Enrique.**

Con cariño.

**MIS SOBRINOS:**

Por ser una bendición.

**MIS TIOS Y PRIMOS:**

En especial a Miriam Marisol y Mayra Lorena, por ser un ejemplo de superación.

**A MIS AMIGOS:**

En especial a Ronald Molina, Erick Maquiz, Marwin Santos, Eduardo Paz por su amistad.

**A MIS COMPAÑEROS:**

Ricardo Calderón, Erick Mota, Miguel López, Angel Reyes, Ezequiel López, Miguel Colindres, Hugo Solórzano Juan C. Salazar, Marvin Garzona, Tony Camo.



## **TESIS QUE DEDICO**

A:

Escuela Nacional Pedro José de Betancourt, San Miguel Petapa, Guatemala.

Escuela Normal Central Para Varones, Guatemala Ciudad.

Colegio Centro de Estudios de Computación. C.E.C., Guatemala Ciudad.

Universidad de San Carlos de Guatemala.

Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Mis compañeros y amigos Universitarios.



## AGRADECIMIENTOS

SINCEROS AGRADECIMIENTOS A:

Ing. Agr. M. Sc. Domingo Amador Pérez por su asesoría y apoyo en la realización del presente trabajo de tesis.

ZENECA PANAMERICANA, especialmente al Dr. Laureano Figueroa por su ayuda y apoyo en la ejecución de esta investigación.

Mis amigos Ing. Agr. Orestes Cerna, Ing. Agr. Marcial Guzman, Ing. Agr. Carlos López, Ing. Agr. Antonio Vásquez, Ing. Agr. Efrain Mendoza, Ing. Agr. Carlos Cajas, Ing. Agr. Maynor Gonzáles, Ing. Agr. Francisco Gonzáles, Ing. Química Gilda Aide Gonzáles, Licda. Ingrid Maribel de Gaitán, Lic. Adolfo Cifuentes.

A la familia Gonzáles Muñoz, por su apoyo incondicional.

Y aquellas personas que de una u otra manera colaboraron con la realización de la presente tesis.



	<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
	INDICE GENERAL.....	i
	INDICE DE FIGURAS.....	v
	INDICE DE CUADROS.....	vi
1	RESUMEN.....	viii
2	INTRODUCCION.....	1
3	DEFINICION DEL PROBLEMA.....	2
4	MARCO TEORICO.....	3
4.1	Marco conceptual.....	3
4.1.1	Aspectos generales sobre biotecnología.....	3
4.1.2	Cultivo de tejidos.....	3
4.1.2.A	Importancia del cultivo de tejidos.....	4
4.1.2.B	Estado actual del cultivo de tejidos.....	4
4.1.3	Inducción de callo.....	4
4.1.3.A	Tipos de callos.....	5
4.1.3.B	Utilización del callo.....	5
4.1.3.C	Factores que influyen en el crecimiento de los callos.....	5
4.1.4	Medio de cultivo.....	5
4.1.4.A	Sales inorgánicas.....	6
4.1.4.B	Vitaminas.....	7
4.1.4.C	Azúcares.....	7
4.1.4.D	Compuestos indefinidos y aminoácidos.....	7
4.1.4.E	Reguladores del crecimiento.....	7
4.1.4.F	Uso de algunas auxinas en cultivo de tejidos.....	8
4.1.5	Otros componentes del medio de cultivo.....	8
4.1.5.A	El ph.....	9
4.1.6	Tejido vegetal como factor de crecimiento de callo.....	9
4.1.6.A	Tipo de planta.....	9
4.1.6.B	Parte de la planta.....	9
4.1.6.C	Edad de la planta.....	9
4.1.6.D	Tamaño y forma del explante.....	9
4.1.6.E	Condiciones de incubación.....	10
4.1.6.F	Iniciación del cultivo.....	10
4.1.7	Suspensión celular.....	10
4.1.7.A	Definición de un cultivo celular.....	10
4.1.7.B	Características de un cultivo de células.....	10
4.1.7.C	Usos del cultivo de células.....	11
4.1.7.D	Obtención de un cultivo de células.....	11
4.1.7.E	Definición de la friabilidad del callo y su importancia en el cultivo de células.....	11

4.1.7.F	Crecimiento de células en suspensión.....	11
4.1.7.G	Morfología de las células que crecen en suspensión.....	12
4.1.7.H	Medición del crecimiento celular en un cultivo.....	12
4.1.7.I	Aplicación del cultivo de células.....	13
4.1.8	Obtención de metabolitos secundarios por cultivo de tejidos.....	13
4.1.9	Optimización de los medios de cultivo.....	15
4.1.10	Adición de precursores.....	18
4.1.11	Selección de líneas de alto rendimiento.....	18
4.1.11.A	Mutación.....	18
4.1.11.B	Diferenciación.....	19
4.1.11.C	Congelamiento.....	19
4.1.11.D	Ciclo de crecimiento.....	19
4.1.11.E	Inmovilización de células.....	20
4.1.11.F	Biotransformación.....	20
4.1.11.G	Permeabilización.....	21
4.1.12	Micropropagación.....	21
4.1.13	Substancias activas de las plantas medicinales.....	22
4.1.13.A	Alcaloides.....	23
4.1.13.B	Glucósidos.....	24
4.1.13.C	Saponinas.....	24
4.1.13.D	Principios amargos.....	25
4.1.13.E	Taninos.....	25
4.1.13.F	Las sustancias aromáticas.....	26
4.1.13.G	Los aceites esenciales (esenciales naturales) y los terpenos.....	26
4.1.13.H	Los aceites grasos.....	27
4.1.13.I	Las glucoquininas (insulinas vegetales).....	27
4.1.13.J	Los mucílagos.....	28
4.1.13.K	Las hormonas vegetales (fitohormonas).....	28
4.1.13.L	Los antisépticos vegetales.....	28
4.2	Marco referencial.....	29
4.2.1	Descripción de la familia Smilacaceae.....	29
4.2.2	Descripción del género <i>Smilax</i> .....	29
4.2.3	Descripción de la especie <i>S. aristolochiaefolia</i> Miller.....	30
4.2.4	Clasificación botánica.....	31
4.2.5	Origen.....	31
4.2.6	Identificación de la especie.....	31
4.2.7	Exploración y recolección del género <i>Smilax</i> en Guatemala.....	32
4.2.8	Aprovechamiento industria de <i>Smilax</i> en Guatemala.....	32
4.2.9	Fitoquímica y actividad biológica del género <i>Smilax</i> en Mesoamérica.....	33
4.2.10	Usos de la zarzaparrilla en la medicina tradicional.....	33
4.2.11	Compuestos biológicamente activos de la zarzaparrilla.....	35
4.2.11.A	Las saponinas esteroides.....	35
4.2.11.B	Las saponinas en la industria alimenticia.....	36
4.2.11.C	Las saponinas como drogas.....	37

4.2.11.D	Consecuencias fisiológicas y nutricionales de las saponinas.....	38
4.2.12	Algunos estudios en la utilización de células en suspensión.....	38
5	OBJETIVOS.....	40
6	HIPOTESIS.....	41
7	METODOLOGIA.....	42
7.1	Laboratorio experimental en donde se realizó la investigación .....	42
7.2	Material vegetal .....	42
7.3	Desarrollo de la investigación.....	42
7.3.1	Fase I: Multiplicación del material vegetal.....	43
7.3.2	Procedimientos generales realizados en la investigación.....	43
7.3.2.A	Medio basal.....	43
7.3.2.B	pH. ....	43
7.3.2.C	Esterilización del equipo y cristalería.....	43
7.3.2.D	Desinfección del material vegetal.....	43
7.3.2.E	Proceso de siembra de explantes.....	44
7.3.2.F	Incubación de los cultivos.....	44
7.4	Fase II: Inducción de callo.....	44
7.4.1	Finalidad de la inducción de callo.....	44
7.4.2	Diseño experimental.....	44
7.4.3	Tratamientos.....	45
7.4.4	Unidad experimental.....	45
7.4.5	Variable evaluada.....	45
7.4.6	Análisis de la información.....	46
7.4.7	Manejo del experimento.....	46
7.4.7.A	Preparación de medios de cultivo.....	46
7.4.7.B	Siembra de explantes para la inducción de callo.....	47
7.4.7.C	Condiciones de incubación.....	47
7.5	Fase III: Establecimiento del cultivo de células en suspensión.....	47
7.5.1	Diseño experimental .....	47
7.5.2	Tratamientos .....	48
7.5.3	Unidad experimental.....	48
7.5.4	Estudio de la cinética de la multiplicación celular en suspensión.....	48
7.5.5	Variables de respuestas evaluadas.....	49
7.5.6	Forma de medir las variables evaluadas.....	49
7.5.6.A	Número de células por ml .....	49
7.5.6.B	Volumen de sedimentación de células por unidad de volumen.....	49
7.5.7	Análisis de la información.....	50
7.5.8	Manejo del experimento.....	51
7.5.8.A	Preparación de medios .....	51
7.5.8.B	Procedimiento de siembra.....	51

7.5.8.C	Condiciones de incubación.....	51
7.5.8.D	Elaboración de la curva que describe el crecimiento celular de la zarzaparrilla ( <i>Smilax aristolochiaefolia</i> Miller) .....	51
8	RESULTADOS.....	53
8.1	Fase de inducción de callo.....	53
8.2	Fase de cultivo de células en suspensión .....	55
8.2.1	Número de células por mililitro.....	56
8.2.2	Comportamiento gráfico de la multiplicación celular.....	57
8.2.3	Volumen de sedimentación por unidad de volumen.....	60
9	CONCLUSIONES.....	63
10	RECOMENDACIONES.....	64
11	BIBLIOGRAFIA.....	65
12	APENDICE.....	68

## INDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1.	Efecto de las auxinas y citocininas en la multiplicación del número de callos friables ..... 54
FIGURA 2.	Efecto de las auxinas y citocininas sobre la multiplicación celular, <i>in vitro</i> de zarzaparrilla ..... 57
FIGURA 3.	Efecto de las auxinas y citocininas en la multiplicación de células, en cultivos en suspensión ..... 60
FIGURA 4.	Morfología de <i>Smilax aristolochiaefolia</i> Miller. a) hoja con zarcillos; b) flor masculina; c) flor femenina; d) rama con fruto ..... 70
FIGURA 5.	Resumen gráfico del comportamiento de la multiplicación celular en el tiempo de incubación ..... 74

## INDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
CUADRO 1. Concentraciones de auxinas (ANA) y citocininas (BAP), utilizadas en el medio de cultivo .....	45
CUADRO 2. Concentraciones de auxinas (ANA) y citocininas (BAP), para establecer el cultivo de células en suspensión.....	48
CUADRO 3. Respuesta a la inducción de callo, medias obtenidas por el análisis de varianza para el número de callos friables formados .	55
CUADRO 4. Comportamiento de multiplicación celular de la zarzaparrilla en los cultivos en suspensión .....	56
CUADRO 5. Modelos matemáticos generados para establecer la curva del crecimiento celular, basado en el número de células en suspensión.....	59
CUADRO 6. Comportamiento de la multiplicación celular de la zarzaparrilla en cultivos en suspensión .....	60
CUADRO 7 Modelos matemáticos generados para establecer la curva del crecimiento celular, basados en el porcentaje de células en suspensión.....	62
CUADRO 8 Composición del medio Murashige y Skoog .....	69
CUADRO 9A Número de callos friables de los tratamientos a las 8 semanas de cultivo.....	71
CUADRO 10A Número de células a los 2 días de cultivo .....	71
CUADRO 11A Número de células a los 7 días de cultivo .....	71
CUADRO 12A Número de células a los 12 días de cultivo.....	71
CUADRO 13A Número de células a los 17 días de cultivo.....	72
CUADRO 14A Número de células a los 22 días de cultivo.....	72
CUADRO 15A Porcentaje de células a los 2 días de cultivo .....	72
CUADRO 16A Porcentaje de células a los 7 días de cultivo.....	72
CUADRO 17A Porcentaje de células a los 12 días de cultivo.....	73
CUADRO 18A Porcentaje de células a los 17 días de cultivo.....	73
CUADRO 19A Porcentaje de células a los 22 días de cultivo.....	73
CUADRO 20A Resumen del análisis de varianza efectuado al número de callos friables formados.....	75
CUADRO 21A Resumen del análisis de varianza efectuado al número de células a los 2 días de cultivo .....	75
CUADRO 22A Resumen del análisis de varianza efectuado al número de células a los 7 días de cultivo .....	76
CUADRO 23A Resumen del análisis de varianza efectuado al número de células a los 12 días de cultivo .....	76
CUADRO 24A Resumen del análisis de varianza efectuado al número de células a los 17 días de cultivo .....	77

	<b>Página</b>
CUADRO 25A Resumen del análisis de varianza efectuado al número de células a los 22 días de cultivo .....	77
CUADRO 26A Resumen del análisis de varianza efectuado al porcentaje de células a los 2 días de cultivo.....	78
CUADRO 27A Resumen del análisis de varianza efectuado al porcentaje de células a los 7 días de cultivo.....	78
CUADRO 28A Resumen del análisis de varianza efectuado al porcentaje de células a los 12 días de cultivo.....	79
CUADRO 29A Resumen del análisis de varianza efectuado al porcentaje de células a los 17 días de cultivo.....	79
CUADRO 30A Resumen del análisis de varianza efectuado al porcentaje de células a los 22 días de cultivo.....	80



## **Comportamiento de la zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller) al cultivo de células en suspensión**

### **Response of zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller) to suspension cell culture**

#### **1. RESUMEN**

En el presente trabajo se investigó la respuesta de la zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller), a la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos vegetales, en la inducción de callo y cultivo de células en suspensión. El cultivo de células en suspensión es una técnica utilizada en cultivos vegetales, la cual consiste de un conjunto de células aisladas, así como de pequeños agregados celulares distribuidos en un medio líquido en constante movimiento. Este sistema de cultivo de células vegetales en suspensión, tiene su importancia ya que a través de ello se pueden establecer estudios que sirvan como base, para el mejoramiento de la zarzaparrilla; así como para la obtención de metabolitos secundarios, fuente de fármacos.

Por facilidades de manejo, el estudio se dividió en las siguientes fases: a) Evaluación del explante hoja con pecíolo, y diferentes combinaciones de auxinas y citocininas para la inducción de callo y b) Evaluación de tres concentraciones de auxinas y citocininas combinadas, así como de un testigo absoluto, donde no se aplicó ninguna auxina ni citocinina, para establecer suspensiones celulares.

Se logró establecer el efecto de seis combinaciones de auxina y citocinina; ácido naftalenacético (ANA) y bencil amino purina (BAP) más un testigo absoluto, donde no se aplicaron reguladores, esto se realizó con el propósito de inducir a la formación de callo, utilizando el medio basal Murashige y Skoog (MS), el explante evaluado fue hoja con pecíolo. Los tratamientos se incubaron durante un período de ocho semanas en obscuridad, a una temperatura de 27 grados centígrados. En la inducción de callo el mejor tratamiento fue el que tenía la combinación de regulador de crecimiento 3.0:3.0 ANA/BAP en mg/l; seguido de otros tres tratamientos con las siguientes combinaciones 3.0:0.5, 3.0:1.0, y 5.0:1.0 ANA/BAP en mg/l, respectivamente. El número de callos friables que resultó de estos cuatro tratamientos, presentó buena esponjosidad y ausencia de raíces, por lo que fueron utilizados en la fase de suspensión celular.

En la fase de suspensión celular el objetivo fue estudiar la cinética del crecimiento celular de la zarzaparrilla, (*Smilax aristolochiaefolia* Miller), con el fin de conocer el efecto que tienen las células en la multiplicación celular; el medio basal utilizado fue el de Murashige y Skoog líquido, en constante movimiento. El movimiento del tejido utilizado en relación al medio nutritivo facilitó el intercambio gaseoso, removiendo cualquier polaridad del tejido debido a la gravedad y eliminando los gradientes de

nutrientes dentro del medio y en la superficie de las células, esto dio origen a la suspensión de células. La auxina utilizada fue el ácido naftalenacético (ANA) y la citocinina fue bencil-amino purina (BAP), en tres diferentes combinaciones, siendo estas: 1.0:0.5, 2.0:1.0 y 3.0:3.0 de ANA y BAP en mg/l; además se utilizó un medio sin auxinas y citocininas, que fue el testigo absoluto. Las suspensiones celulares se incubaron durante 22 días en obscuridad, en agitación constante a 100 revoluciones por minuto y a una temperatura de 21°C.

En la suspensión celular todos los tratamientos resultaron ser estadísticamente similares al final del período de incubación, siendo el tratamiento testigo el que mayor multiplicación celular presentó, seguido del tratamiento 1.0:0.5 de ANA y BAP en mg/l.

El comportamiento similar de los tratamientos tiene mucha importancia ya que se puede llegar a establecer un cultivo de células de zarzaparrilla sin utilizar reguladores del crecimiento.

Al iniciar el período de incubación de las células en suspensión de la zarzaparrilla, se tuvo poco incremento en el número de células por mililitro (día 2 al 7), considerándose que las células estaban en fase de adaptación al medio, luego al transcurrir el tiempo de incubación (día 7 al 17) se mostró un incremento rápido y acelerado, manifestándose una fase exponencial y lineal con una división celular continua y muy activa. Después se multiplicó proporcionalmente el número de células en el tiempo transcurrido. Por último se observó una fase estacionaria (día 17 al 22) con una ligera disminución del número de células, reduciéndose de esta manera la división celular. También se pudo observar que las auxinas reducen el tiempo de adaptación de las células al medio de cultivo, debido a que las auxinas son estimuladoras del crecimiento celular (división y aumento del tamaño del volumen).

Los resultados obtenidos anteriormente, pueden ser utilizados en la evaluación de las combinaciones de reguladores de crecimiento que van de 3.0 a 5.0 en mg/l de ANA y de 1.0 a 3.0 en mg/l de BAP, en la inducción de callo así como también establecer protocolos que contemplen la propagación masiva de la zarzaparrilla.

## 2. INTRODUCCION

La zarzaparrilla es una planta arbustiva y trepadora, perteneciente a la clase monocotiledonea, forma parte de la familia Smilacaceae y del género *Smilax*.(6)

Se tiene evidencia de que la planta era utilizada con fines medicinales por los indígenas de la Región Mesoamericana desde la Epoca Prehispánica (21). Por sus propiedades antirreumática, antiséptica y antiprurítica fue incluida en la farmacopea Británica en 1864 (30), y en la farmacopea de los Estados Unidos en 1942 (25).

Sin embargo, a nivel nacional es una de las plantas que se le conoce poco en cuanto a su potencialidad y uso. Los principales usos que se le han dado a la planta en otros países son: como tonificante sanguíneo, para combatir la lepra, contra enfermedades venéreas, para contrarrestar problemas de obesidad, artritis y reumatismo y contra problemas del hígado, herpes y deficiencia renal. En la actualidad la aplicación más importante es en la industria farmacéutica, para facilitar la absorción de otros fármacos(9,25).

Se utiliza además como saborizante en confitería y en la elaboración de almibares, como agente espumante en bebidas y como texturizante en postres derivados de la leche (24). La inclusión en farmacopeas como compuestos activos de zarzaparrilla *Smilax aristolochaefolia* se atribuyen a su contenido de saponinas, las cuales son glicósidos conformados por un núcleo esteroidal al cual se unen diversos azúcares (31,33).

Los compuestos activos incluyen: Alcaloides, antibióticos, aceites volátiles, resinas, taninos, glicósidos cardiacos, esteroides y saponinas. La importancia económica de los compuestos activos es que juega papeles ecológicos y fisiológicos en las plantas, y que además pueden ser utilizados con fines farmacológicos.

El cultivo de células en suspensión de zarzaparrilla *Smilax aristolochaefolia* estuvo constituida por un conjunto de células aisladas, así como de pequeños agregados celulares distribuidos en un medio de cultivo líquido en constante movimiento. La técnica desarrollada en el presente trabajo consistió en que callos de zarzaparrilla (*Smilax aristolochaefolia* Miller) fueron suspendidos en un medio nutritivo líquido y sujeto a una serie de manipulaciones, se aseguró la producción de células creciendo en forma activa; estos consistieron en células individuales y agregados muy pequeños.

El presente trabajo genera información básica, en el campo de cultivo de tejidos *in vitro* y con ello poder implementar estudios sobre embriogénesis, crecimiento y diferenciación, organogénesis, estudios del ciclo celular, genética, nutrición, bioquímica y metabolismo, así como para la obtención de compuestos activos, que pueden ser aprovechados por la industria farmacológica.

### 3. DEFINICION DEL PROBLEMA

La zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller), es una planta que se ha utilizado en la medicina tradicional. En Guatemala aún no existen investigaciones sobre su uso y manejo, así como de la respuesta de técnicas modernas que contribuyan a su mejoramiento y propagación. Conforme el hombre va transformando la naturaleza, reconoce que algunas veces provoca consecuencias no deseables, las que se expresan en pérdidas de recursos naturales. Se sabe que la zarzaparrilla ha mostrado baja capacidad de germinación (62%), su propagación por medios asexuales como el caso de esquejes, presenta resultados poco satisfactorios (16).

Según Cáceres y Girón (5,14), la parte vegetal más utilizable de la zarzaparrilla es el rizoma; en Guatemala esta planta está siendo extraída en forma desmedida en su totalidad y siendo exportada como materia prima a otros países; se sabe que durante los años de 1992 a 1995 se exportaron 957 toneladas hacia mercados de Asia, Canadá, Estados Unidos y Europa. Y que para el año de 1996 y parte de 1997 se exportaron para España 15 toneladas. La zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller), tiene la particularidad de crecer en bosques subtropicales y si se toma en cuenta que en Guatemala, se pierde un promedio de 90,000 hectáreas de bosque al año y que actualmente la cobertura boscosa es de 33,900 Km<sup>2</sup> cifra que representa el 31% del territorio (5,14).

Y aun algo más alarmante, es que en el país no se tiene un cultivo sistemático de zarzaparrilla y que solo existen algunos datos de investigaciones preliminares sobre su domesticación.

Por todo lo anterior a este paso en unos pocos años si no se toman las medidas necesarias será una planta extinta. Debido a que los especímenes que se consumen y exportan se extraen de bosques sin ningún control.

Es por ello que se deben desarrollar estudios que generen información tecnológica de su propagación, preservación, protección y mejoramiento de la zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller), y con ello poder conocer aspectos básicos y formas de aprovechamiento, en forma integral de sus bondades.

## 4. MARCO TEORICO

### 4.1 Marco conceptual

#### 4.1.1 Aspectos generales sobre biotecnología

Según Villalobos(35) entre los avances y desarrollos más recientes de la ciencia, la biotecnología ha logrado los de mayor importancia, principalmente en la medicina y agronomía. En la agronomía en los métodos modernos de la biotecnología han contribuido al incremento de la producción, al mejorar la calidad de los productos y se preve en un corto plazo avances significativos en la resistencia a plagas y enfermedades y factores ambientales adversos. La biotecnología se define como: "Cualquier técnica que utiliza organismos vivos o partes de los mismos para mejorar plantas o animales, modificar productos o desarrollar microorganismos para aplicaciones científicas" , manifiesta Villalobos (35).

#### 4.1.2 Cultivo de tejidos

Efferson (10) indica que algunos de los nuevos métodos que tiene la biotecnología aceleran miles de veces la tasa de las mutaciones naturales, por lo que causan variaciones para poder seleccionar o aceleran los cambios graduales que tienen lugar entre generaciones en las plantas. Esto se logra dándole oportunidad de formación de una planta completa a células individuales o células de la reproducción sexual. Las mutaciones que parecen prometedoras pueden identificarse en un año o dos en lugar de esperar cien años o más para que tengan lugar en forma natural o de tener que pasar por el largo y laborioso proceso de cruzar seleccionar y purificar por medio de técnicas convencionales. Por medio del cultivo de tejidos se pueden obtener variedades en corto tiempo en comparación con los métodos tradicionales.

Según Efferson (10) el cultivo de tejidos es la técnica que más promete resultados inmediatos en la producción de variedades mejoradas de plantas, comprende el uso de técnicas que involucran la evaluación de células vegetales individuales en vez de plantas obtenidas por semilla a diferencia de los animales las células vegetales no sexuales de muchas especies pueden estimularse mediante tratamientos de tal forma de que de ellas se pueden originar plantas enteras, este fenómeno se conoce como totipotencia. En cultivo de tejidos se utilizan técnicas variadas, algunas de ellas permiten aprovechar la variación somaclonal. En este proceso se pueden obtener células vegetales individuales, manipularse por diversos medios y obtener la regeneración de plantas; las plantas originadas a partir de células individuales se desarrollan y llegan a producir semilla, la deiscencia de estas semillas puede ser utilizada para seleccionar por productividad, resistencia a enfermedades y otras características;

al comparar las plantas que pueden obtenerse de las células de una planta tienen muchas diferencias en comparación con la planta original, no se conoce claramente las razones para las variaciones entre la planta madre y su descendencia, pero este método permite seleccionar tipos mejorados entre las plantas regeneradas por cultivo de tejidos.

#### 4.1.2.A Importancia del cultivo de tejidos

Para Villalobos (35) y Aguilar (1) el cultivo de tejidos combina las técnicas corrientes de fitomejoramiento con los nuevos métodos biotecnológicos y ofrece la oportunidad de reducir el tiempo requerido para la producción de variedades mejoradas. En la mayoría de los cultivos de importancia económica se necesita de siete a diez años, después del cruzamiento, para saber si se ha obtenido una variedad mejorada, mientras en cultivo de tejidos las mutaciones que parecen prometedoras pueden identificarse en un año o dos. Esto ofrece la ventaja de la reducción del tiempo y volumen de siembra en campo requeridos por los métodos convencionales.

La opinión de Efferson (10) es que el cultivo de tejidos no reemplaza completamente a los métodos convencionales, pues las grandes variaciones tienen lugar en el cruzamiento sexual, en tanto existe menos variación entre las células de una planta o variedad individual, no obstante es un buen método de complementario en un programa de mejoramiento.

#### 4.1.2.B. Estado actual del cultivo de tejidos

Según Aguilar (1) y Siriwardana (27) en el presente muchos investigadores estudian el cultivo masivo de células en forma industrial para la producción de plantas útiles, en esto varias compañías farmacéuticas y compañías, que se dedican a la agronomía han obtenido buenos resultados, además las técnicas del cultivo de células están siendo aplicadas a diversos campos como genética, Morfogenénesis, Fisiología, Bioquímica, Horticultura, Fitopatología, y en la agricultura en general en un futuro no muy lejano estas técnicas serán utilizadas más frecuentemente y en los más variados campos de las ciencias.

#### 4.1.3 Inducción de Callo

Villalobos (35), define el callo como un tejido obtenido por medio de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular, presentando esta célula una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido. Estudios microscópicos han demostrado que los tejidos de tipos callosos generalmente son heterogéneos en su composición

celular, es decir un mismo callo puede presentar varios tipos celulares.

#### **4.1.3.A Tipos de Callos**

Hurtado y Merino (18), opinan que una masa celular puede presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según su apariencia externa, textura y composición celular. Algunos callos son masas celulares compactas y duras con células íntimamente unidas, mientras otras masas celulares forman tejidos esponjosos con una gran cantidad de espacios intercelulares. El callo está generalmente constituido por una alta proporción de células en las que las vacuolas son predominantes similares a las células del parenquima.

#### **4.1.3.B Utilización del callo**

Villalobos (35), dice que una de las características más importantes del callo desde el punto funcional es que a partir de células desorganizadas se tiene el potencial de desarrollar raíces, brotes y embriones dependiendo de la adición de auxinas y citoquininas en el medio, de tal manera que el callo tiene potencial de formación de raíces (rizogénesis), formación de yemas (caulogénesis) y el proceso de desarrollo de un embrión completo y funcional a partir de una célula.

#### **4.1.3.C Factores que influyen en el crecimiento de los callos**

Para Vásquez (34) y Villalobos (35) dentro de los factores que influyen en el crecimiento del callo tenemos: medio de cultivo (sales minerales, vitaminas, carbohidratos, pH, reguladores del crecimiento y aditivos orgánicos), clase de tejidos y condiciones de incubación (luz y temperatura).

#### **4.1.4 Medio de cultivo**

Hurtado y Merino (18) y Villalobos (35) indican que el éxito del cultivo de tejido de plantas está influenciado por la composición química de los medios de cultivo. Se ha determinado que utilizando las sustancias químicas necesarias y las condiciones apropiadas de nutrientes así como su forma química adecuada se ha establecido cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales.

Villalobos (35) indica que para el crecimiento adecuado de las plantas se necesita que las mismas tomen del suelo cantidades importantes de macronutrientes como los son: las sales de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio, cobre, molibdeno y cobalto. Un medio de cultivo contiene estos elementos y carbohidratos,

carbohidratos, normalmente sacarosa, este último compuesto sirve para reemplazar al carbono que la planta normalmente fija por medio de la fotosíntesis. Se sabe también que se obtienen mejores resultados al incluir compuestos orgánicos en pequeñas cantidades tales como vitaminas, aminoácidos y reguladores del crecimiento.

Aguilar (1) ha dividido los componentes del medio de cultivo en las siguientes categorías:

- Sales inorgánicas (macronutrientes y micronutrientes)
- Fuente de energía y de carbono para metabolismo, generalmente en un azúcar.
- Reguladores del crecimiento.
- Complejos orgánicos (vitaminas y fuente de nitrógeno reducido).
- Gelificante.
- Otros compuestos como leche de coco por ejemplo:

#### 4.1.4.A Sales inorgánicas

- a. **Macronutrientes:** Estos son importantes en el crecimiento y desarrollo celular, un medio de cultivo consta de los siguientes macronutrientes:
  - Nitrógeno se adiciona en grandes cantidades en forma de nitrato o iones de amonio o combinando ambas formas.
  - Magnesio y azufre se adicionan normalmente en forma de sulfato de magnesio.
  - Fósforo se adiciona en cualquiera de las formas siguientes: Fosfato ácido de potasio.
- b. Potasio se agrega en cualquiera de las formas siguientes: cloruro de potasio, nitrato de potasio, fosfato ácido de potasio.
- c. Calcio se adicionan en cualquiera de las siguientes formas: cloruro de calcio dihidratado, nitrato de calcio.
- d. **Micronutrientes** Aguilar (1) y Villalobos (35) mencionan que estos son necesarios ya que son componentes de las proteínas de las células vegetales y tienen importancia a nivel fisiológico y metabólico.
- e. Hierro se añade en forma de quelatos de hierro, puesto que de la forma sulfato precipita y no es disponible a las células.
  - Manganeso importante en la actividad fotosintética ya que cuando este elemento no se encuentra presente disminuye la actividad fotosintética.
  - Zinc y cobre son requeridos para la oxidación e hidroxidación de compuestos fenólicos.
  - Cobalto es metal componente de la vitamina B12.
  - Boro necesario para el mantenimiento de la actividad meristemática.

#### 4.1.4.B Vitaminas

Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades, las más usadas son:

Tiamina, conocida como vitamina B1, se añade como tiamina ácida de cloro (tiamina HCL) en cantidades que varían de 0.1 a 0.3 mg/l esta es realmente la única vitamina esencial para el crecimiento de las células vegetales. Vitamina E, esta ayuda en la formación de callos que provienen de embriones.

#### 4.1.4.C Azúcares

Aguiar (1) indica que la mayoría de los cultivos *in vitro* son heterotrofos y requieren de una fuente de carbohidratos para obtener la energía necesaria para su crecimiento y desarrollo. La sacarosa es la principal fuente de azúcares como la glucosa ya que una disminución en la concentración en el medio favorece la restauración de la capacidad organogénica de los cultivos, al aumentar su concentración en el medio actúan como regulador osmótico y al disminuirla se limita la fuente artificial de carbono.

#### 4.1.4.D Compuestos indefinidos y aminoácidos

Villalobos (35) ha encontrado que existen numerosos complejos nutritivos como el hidrolizado de caseína (fuente de nitrógeno), el agua de coco por su alto contenido de citocininas, el extracto de malta y el extracto de levadura que se usan en los medios de cultivo, sin embargo, existen problemas sobre el crecimiento en cuanto a la variación que provocan. Los aminoácidos proveen a las células vegetales de nitrógeno inmediatamente disponible y su absorción puede ser mucho más rápida que la del nitrógeno inorgánico del mismo medio de cultivo, pero su presencia no sustituye a este último. Algunos aminoácidos de uso frecuente son arginina, el ácido glutámico, el ácido aspártico y la tirocina.

#### 4.1.4.E Reguladores del crecimiento

Hurtado y Merino (18) y Weaver (37) reportan que las auxinas actúan de modo diverso en el crecimiento por alargamiento celular, como es incrementando el contenido osmótico de las células y la permeabilidad de la membrana al agua, reduciendo la presión, de la pared y aumentando la síntesis de ácido ribonucleico (ARN), enzimas y aún de la misma pared y aumentando en la plasticidad de la pared celular, que trae como consecuencia

membrana al agua, reduciendo la presión, de la pared y aumentando la síntesis de ácido ribonucleico (ARN), enzimas y aún de la misma pared y aumentando en la plasticidad de la pared celular, que trae como consecuencia su extensión y con ello un crecimiento por alargamiento. Villalobos (35) reporta que las auxinas, ácido indolebutírico (AIB) y el ácido indolacético (AIA) son usadas en rango que varía de 0.1 a 10 mg/l, el ácido naftalenacético (ANA), ácido paraclorofenoxiacético y ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) se usan en rangos de 0.001 a 10 mg/l. La actividad auxínica en células cultivadas se considera de la manera siguiente: 2,4-D tienen mayor actividad que ANA, el cual a su vez tienen mayor actividad que AIB, que su actividad es mayor que AIA.

Según Hurtado y Merino (18) las citocininas también promueven la división celular y la organización de callos, se utiliza principalmente la Benciladenina (BA), Kinetina, Zeatina y Bencil Amino Purina (BAP).

#### 4.1.4.F Uso de algunas auxinas en cultivo de tejidos

Hurtado y Thorpe (18,32) indican que los reguladores del crecimiento más usados en la iniciación y mantenimiento del cultivo de callo son ácido indol 3 acético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4-D diclorofenoxiacético, en concentraciones desde 0.1 a 10.0 mg/l; para cada especie e incluso para cada cultivar existen fitohormonas y una concentración balanceada para la inducción y mantenimiento del cultivo. El máximo tamaño del callo se alcanza de 3 a 8 semanas, a cada 2 o 6 semanas se deben transferir a medio fresco para evitar su debilitamiento en el crecimiento y lograr su supervivencia. La multiplicación y crecimiento celular son acelerados, provocando el consumo de nutrientes del medio, así mismo el agua se evapora dejando al medio deshidratado.

Vásquez (34) ha encontrado que cuando se utiliza ácido naftalenacético (ANA) como única fuente de auxina para inducir la formación de callo en anteras es posible rediferenciar plantas en el mismo medio de la inducción, este tratamiento ofrece la ventaja de evitar la transferencia de los callos a un nuevo medio sin auxina para inducir la rediferenciación de órganos y plantas. Lo anterior se explica posiblemente por una menor actividad auxínica del ácido naftalenacético inhibiendo en menor grado y menos irreversiblemente la capacidad organogénica de las células del callo.

#### 4.1.5 Otros componentes del medio de cultivo

Aguilar (1) y Villalobos (35) reconocen que existen otros componentes de los medios de cultivo, que son importantes como por ejemplo el agua, el agente gelificador si es medio sólido y el pH.

#### 4.1.5.A El pH

Aguilar (1) opina que el pH debe oscilar entre 5.6 y 5.8 este tiene influencia en el condicionamiento de que sales permanecen solubles en el medio y además influye en la asimilación de los nutrientes del medio.

#### 4.1.6 Tejido vegetal apropiado para el crecimiento de callo

Los aspectos más importantes del tejido vegetal que deben ser tomados en cuenta para la inducción y crecimiento del callo, son:

##### 4.1.6.A Tipo de planta

Villalobos (35) reconoce que el tipo de plantas es determinante para el éxito del cultivo *in vitro*, los tejidos gimnospermas son más difíciles de cultivar que los angiospermas; dentro de los angiospermas el material derivado de las dicotiledoneas puede ser cultivado con mayor facilidad que las monocotiledoneas.

##### 4.1.6.B Parte de la planta

Según Vásquez (34) se puede iniciar cultivo de callo a partir de órgano vegetal (hoja, raíz, polén, embriones y semillas o cualquiera de sus partes). Sin embargo, Villalobos (35) recomienda comparar sistemáticamente varias partes del vegetal antes de decidirse por alguno de ellos.

##### 4.1.6.C Edad de la planta

Vásquez (34) dice que la edad de la planta es muy importante por estar asociada con el estado fisiológico de la planta aunque debe tomarse en cuenta también la sanidad de la planta es recomendable utilizar plantas jóvenes y con crecimiento activo aunque se puede obtener buen resultado con las plantas adultas.

##### 4.1.6.D Tamaño y forma del explante

Para Vásquez (34) y Villalobos (35) el tamaño y forma del explante no son importantes, aunque explantes muy pequeños pueden tener baja respuesta, siendo recomendable utilizar fragmentos de tejidos de 5 a 10 mm. por lado pues con ello se incrementa la posibilidad del éxito del cultivo.

#### 4.1.6.E Condiciones de incubación

Villalobos (35) considera que los cultivos se deben incubar bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad.

#### 4.1.6.F Iniciación del cultivo

Vásquez (34) indica que la iniciación de un cultivo de callos ocurre cuando el explante estéril se pone en contacto con un medio de cultivo que induzca y mantenga su crecimiento y una división celular continua. Por sí mismos los vegetales tienen un potencial endógeno para la formación de callo, en su medio natural al sufrir una lesión esta es reparada por los tejidos, las especies presentan variación en la capacidad de respuesta, la misma que se refleja en la respuesta *in vitro* a la inducción de callo, encontrándose tejidos para los cuales la inducción de callo es requisito previo el suplemento de auxina, un regulador del crecimiento. Otros tejidos requieren solo una citocinina o un suplemento tanto de auxina como de citocinina o bien necesitan complejos naturales en el medio. Por lo general el callo toma de 3 a 8 semanas para alcanzar el tamaño suficiente para efectuar un subcultivo, la falta de transferencia causa debilitamiento y muerte del tejido, esto es debido a que el crecimiento y la división celular son acelerados, lo que provoca el consumo de los nutrientes del medio, además debido a la evaporación del medio sólido hay deshidratación y la acumulación de metabolitos puede llegar a ser tan alta que pueden provocar toxicidad en el tejido.

#### 4.1.7 Suspensión celular

##### 4.1.7.A Definición de un cultivo Celular

Hurtado y Merino (18) definen el cultivo de células en suspensión como "conjunto de células aisladas así como de pequeños agregados celulares distribuidos en un medio líquido en constante agitación. El cultivo de células en suspensión fue ideado con base en métodos microbiológicos".

##### 4.1.7.B Características de un cultivo de células

Hurtado y Merino (18), Villalobos (35) y Thorpe (32) coinciden en que el cultivo de células en suspensión es "un medio líquido en donde existe un constante movimiento del medio utilizando agitación o burbujeo de

unidades pequeñas de células aisladas que ayuda al intercambio de nutrientes y gases. Los cultivos en suspensión tienen una tasa de crecimiento mayor que el cultivo de callos debido a un mayor intercambio de nutrientes y gases.

#### **4.1.7.C Usos del cultivo de células**

Hurtado y Merino (18) indican en relación al cultivo en suspensión "este sistema es utilizado con éxito para llevar a cabo estudios sobre embriogénesis, crecimiento, diferenciación, organogénesis, ciclo celular, genética, nutrición y metabolismo.

#### **4.1.7.D Obtención de un cultivo de células**

Villalobos (35) ha logrado cultivo de células cuando se inocula callo en medio líquido y se mantiene una agitación continua, las células se separan del tejido formando una suspensión constituida por células individuales o por pequeños agregados celulares. El establecimiento de los cultivos en suspensión dependen en gran medida del grado de disgregabilidad (friabilidad) del callo. Generalmente la friabilidad del callo puede aumentarse con altas concentraciones de auxinas en el medio de cultivo. En ciertas condiciones aparecen zonas o regiones disgregables en callos compactos que pueden ser utilizados también para el establecimiento posterior de las suspensiones. La suspensión también puede iniciarse de explantes primarios de tejidos diferenciados pero el establecimiento es más lento y existe alto riesgo de contaminación.

#### **4.1.7.E Definición de la friabilidad del callo y su importancia en el cultivo de células.**

En cuanto al término friable Hurtado y Merino (18) indican que el término se emplea para describir la capacidad de separación de las células, es decir, que estas se disgregan fácilmente después de una división celular, por consiguiente un cultivo que presenta un alto porcentaje de células tanto aisladas como en pequeños agregados formará una buena suspensión.

#### **4.1.7.F Crecimiento de células en suspensión**

Dodds y Roberts (8) y Hurtado y Merino (18) opinan que un cultivo de células en suspensión pasa por varias fases antes de llegar a agotar los nutrientes del medio y por lo tanto ya no crecen a menos que se practique un subcultivo, las fases son las siguientes:

- a. Fase de reposo: el inoculo no presenta ninguna señal de división celular, ya que únicamente se esta adaptando a las nuevas condiciones nutricionales.
- b. Fase exponencial: en esta fase se activa la división celular y en poco tiempo crece en forma acelerada la cantidad de células.
- c. Fase lineal: en esta fase la población de células crece proporcionalmente al tiempo de manera que este crecimiento se comporta gráficamente como una recta.
- d. Fase estacionaria: en esta fase la velocidad de crecimiento es igual a cero a causa de agotamiento de los nutrientes o al menos uno de ellos en esta fase las células han alcanzado su máxima densidad celular permanecen viables pero no se dividen aunque si no se subcultivan pueden morir.

La mayoría de los cultivos en suspensión alcanzan su máxima densidad celular entre los 18 y 25 días aunque puede existir cultivos extremadamente activos que pueden alcanzar entre 6 y 9 días su máxima densidad.

#### 4.1.7.G Morfología de las células que crecen en suspensión

Hurtado y Merino (18) han encontrado que los cultivos de células en suspensión generalmente son heterogéneos, así como su tamaño dependen de la especie vegetal de la cual se ha derivado el cultivo, de la edad del tejido en cultivo, de la composición del medio y de las condiciones de incubación. En la mayoría de los cultivos el 60% de las células pueden estar aisladas o formar agregados de varias células, en un mismo cultivo existe una variedad de formas de células y de tamaños, las dimensiones varían de 20 a 40 micras de diámetro y de 30 a 200 micras de longitud, las células presentan una pared celular delgada de 0.2 a 0.6 micras, no especializada que rodea el protoplasto.

#### 4.1.7.H Medición del crecimiento celular en un cultivo

Hurtado y Merino (18) indican que "para medir el crecimiento de las células, este puede expresarse de manera cualitativa pues conforme las células se multiplican se observará un aumento en la turbidez del medio de cultivo de tal forma que un cultivo con baja densidad celular será claro, con el color normal del medio de cultivo. Sin embargo, el crecimiento también se puede expresar cuantitativamente mediante la determinación periódica de parámetros específicos de crecimiento, los parámetros más usados son:

- a. El peso fresco y seco de las células cultivadas.
- b. El número de células por unidad de volumen cuantificadas con ayuda de un hematocímetro.
- c. El volumen total ocupado por las células en una alícuota del cultivo, las células se compactan mediante

centrifugación y el volumen de esta se expresa en un porcentaje del volumen de la alicuota.

#### 4.1.7.1 Aplicación del cultivo de células

Villalobos (35) ha encontrado la aplicación de la metodología del cultivo de células, pues se forman células separadas o bien agregados celulares, que se pueden transferir a un medio sólido donde se pueden aislar células mutantes y estas pueden formar callosidades que pueden a su vez regenerar tejidos, órganos o plantas completas en presencia de reguladores del crecimiento. La metodología del cultivo también es favorable para hacer crecer en el cultivo hongos que causan enfermedades y luego regenerar las células que hayan resistido el ataque con la seguridad de la planta regenerada será resistente al ataque del hongo, aunque es necesario crear metodología para lograr establecer un cultivo de células en suspensión.

#### 4.1.8 Obtención de metabolitos secundarios por cultivo de tejidos

Según Lozoya (20), la industria farmacéutica nació del conocimiento empírico que la gente tenía del uso de las plantas para el tratamiento de las enfermedades. A principios del siglo XX la mayor parte de los medicamentos provenían de las plantas, aún en la actualidad aproximadamente el 25% de todos los principios activos utilizados en las industrias farmacéuticas provienen de ellas.

Lozoya (20), indica que el uso de plantas para la extracción de principios activos actualmente, se debe a que para algunos de ellos aún no existe la síntesis química, o ésta es incosteable. Ahora bien no solo las vías de síntesis presentan problemas propios. El caso de la quinina que se extrae de la corteza del árbol *Cinchona officinalis* y *C. ledgeriana* es un ejemplo de esto ya que es necesario esperar aproximadamente 21 años para que la planta llegue a la edad adecuada para su explotación. Existen otros ejemplos de sobre- explotación como la *Dioscorea compósita*. Un tercer ejemplo es un bajo contenido de los metabolitos farmacológicamente activos, lo que dificulta su extracción y por lo tanto eleva el costo del producto final.

Finalmente para Lozoya (20), existe una serie de problemas a nivel de la industrialización del producto, como por ejemplo que el suministro de materia prima pueda ser errático debido a calamidades naturales. Las plantas deben ser mantenidas fisiológicamente activas durante el transporte y almacenamiento para asegurar altos rendimientos de los metabolitos deseados, lo que se dificulta si las plantas son cultivadas en regiones alejadas. Un problema adicional es la domesticación de las plantas silvestres: generalmente cuando éstas son domesticadas el contenido de metabolitos secundarios disminuye y aun cuando se ha intentado el fitomejoramiento el incremento en el rendimiento no se ha logrado más que en algunos casos.

Lozoya (20), manifiesta que a todos estos problemas se viene a sumar el de la heterogenidad natural de las

plantas, lo que provoca una variación en el contenido de los productos de interés, lo cual hace que la operación en su conjunto sea insuficiente.

Según Lozoya (20), desde hace algunos años se han buscado alternativas a los problemas anteriormente expuestos y entre las más viables se ha encontrado la del uso del cultivo de tejidos vegetales. El cultivo de tejidos vegetales puede proveer de un suministro continuo y homogéneo de materia prima en un estadio fisiológico uniforme, debido a las condiciones controladas utilizadas para su crecimiento. Por otro lado, pueden ser manipulados más fácilmente que las plantas en el campo.

Para poder ser útil dice Lozoya (20) como fuente industrial alterna de compuestos secundarios, un cultivo de células deberá satisfacer varios requerimientos. Un buen rendimiento de producto final es esencial. Además su velocidad de acumulación en la célula o liberación al medio deberá ser más rápida que su velocidad de degradación. Las células deberán ser genéticamente estables de tal manera que produzcan una cantidad constante del producto. La producción deberá ser costeable.

Claramente para que los cultivos de células sean atractivos como una alternativa a las plantas completas, el rendimiento en producto expresado por unidad de tejido deberá por lo menos ser de la misma magnitud opina Lozoya (20). Hasta ahora hay pocas especies que producen compuestos secundarios en cantidades que se aproximen o excedan los de las plantas completas. Todos estos hechos indican que el cultivo de tejidos vegetales tiene un gran potencial industrial.

La explotación de tal potencial aún no se ha realizado dice Lozoya (20). Existen aún problemas que han impedido el uso comerciales de los cultivos de tejidos vegetales para la producción de metabolitos secundarios. Los problemas clave son: crecimiento lento, inestabilidad genética, agregación celular, control de la diferenciación celular, su incapacidad para crecer autotróficamente y factores morfológicos.

Según Lozoya (20), las células vegetales crecen muy lentamente, con velocidades máximas en tiempos de duplicación de aproximadamente 20 horas. Estas velocidades tan lentas hacen que los cultivos de células a gran escala sean de difícil explotación en el laboratorio y que se necesitan precauciones extremas para evitar la contaminación. Por otro lado, los cultivos de células deben de ser transferidos a intervalos de 1 a 2 semanas. Otro problema a considerar es que aun cuando el cultivo primario produzca el compuesto de interés, esta capacidad de síntesis se puede perder en las transferencias subsecuentes o que los compuestos cambien químicamente.

Los estudios básicos sobre las respuestas de las células en cultivo a los cambios ambientales. Son implicados y difíciles por la tendencia de las células a formar agregados de tamaño macroscópico, lo que provoca variabilidad celular. La heterogeneidad celular provocada por dicho fenómeno en los cultivos en suspensión puede introducir ambigüedades en las medidas experimentales. Además estos agregados, celulares hacen que la ejecución física de cultivos continuos a escala de laboratorio sea difícil manifiesta Lozoya (20).

Según Lozoya (20), la tendencia de los grupos de investigación en la obtención de productos a partir de

cultivo de tejidos vegetales es la de optimizar las velocidades de crecimiento, modificando los medios de cultivo y las condiciones ambientales como luz, temperatura, velocidad de agitación, magnitud del ciclo del crecimiento y la atmósfera en la cual crecen los cultivos. Se entiende que al mismo tiempo se afecta la agregación celular y la formación de los productos secundarios. Para obtener mayores velocidades de crecimiento, las células deberán ser cultivadas como células desdiferenciadas. Sin embargo, tales cultivos invariablemente muestran bajos rendimientos de metabolitos secundarios.

Para Lozoya (20), los reguladores del crecimiento indispensables para el crecimiento y mantenimiento de los cultivos, pueden modificar la concentración de los productos secundarios a los cultivos. Otro aspecto del crecimiento de los cultivos es que generalmente tales tejidos no son normalmente fotosintéticos por lo que se les debe suministrar una fuente de carbono exógena. La contraposición con las desventajas mencionadas, y recientes permiten pronosticar un futuro promisorio para la aplicación industrial de cultivo de tejidos vegetales. Los principales intentos han sido para incrementar la productividad de los cultivos, los cuales en general pueden aplicarse a diferentes especies.

#### 4.1.9 Optimización de los medios de cultivo

Lozoya opina (20), que los principales problemas para el empleo de las especies vegetales cultivadas *in vitro* en la producción de plantas a nivel industrial es su lento crecimiento.

Indica Lozoya (20), que en los sistemas microbianos, el crecimiento y la síntesis de productos secundarios son procesos mutuamente excluyentes y una situación similar parece suceder en los sistemas vegetales, en los que la acumulación de metabolitos ocurre durante la fase estacionaria. Ejemplos de tal situación han sido publicados en la producción de antraquinonas por cultivos de *Gallium molugo* y alcaloides en *Catharantus roseus*. Más aún se ha observado que condiciones nutricionales o físicas que restringen el crecimiento producen, un aumento en el nivel de metabolitos.

Según Lozoya (20), se ha sugerido que en los cultivos de Solanaceae es indispensable un cierto grado de rediferenciación para la producción de alcaloides del tropano. Esto sugiere que es necesario definir un compromiso entre velocidad de producción de biomasa y la acumulación de productos, o separar ambas fases aunque esto represente un mayor número de pasos en el proceso. La división del cultivo en dos fases, una de mantenimiento (crecimiento rápido) y otra de producción empleando medios de cultivo, parece ser estrategia importante para lograr una mayor producción de metabolitos específicos como lo demuestra el incremento del 400% en la producción de shikonina por cultivos de *Lythospermum erythrorhizon*.

Pese a lo anterior, Lozoya (20), considera que esta separación entre crecimiento y acumulación se debe a la variedad de condiciones experimentales empleadas con células que se encuentran en un mismo estado

fisiológico y que por lo tanto, no es una característica propia de las células. Cuando se analizó el crecimiento y producción de alcaloides condiciones idénticas pero iniciados con inóculos provenientes de diferentes fases de crecimiento. Encontraron que la acumulación de serpentina es proporcional a la acumulación de biomasa en todas las etapas del cultivo.

Las técnicas básicas para la inducción y mantenimiento de callos y células en suspensión, han sufrido modificaciones dice Lozoya (20), específicamente dirigidas a resolver los problemas de producción de biomasa e incremento de la productividad.

Para Lozoya (20), prácticamente todos los factores físicos y químicos que constituyen el medio de cultivo afectan, de una u otra forma, la velocidad de crecimiento y/o acumulación de metabolitos.

Factores nutricionales. La cantidad de nutrientes en el medio de cultivo tiene una influencia directa sobre la velocidad de crecimiento. En general las concentraciones elevadas de macronutrientes como nitrato, potasio, amonio y fosfato permiten un crecimiento acelerado estimulando al mismo tiempo la acumulación de metabolitos. Este efecto ha sido observado en la producción de alcaloides por *Catharanthus roseus* y de nicotina en cultivos de tabaco dice Lozoya (20). Sin embargo, para Lozoya (20) la calidad de los nutrientes presentes ejercen también una influencia sobre la producción de metabolitos específicos. El crecimiento de cultivos de *Catharanthus roseus* es sostenido adecuadamente por varios tipos de medios, pero es en MS en donde ocurre mayor acumulación de alcaloides, y la sustitución del nitrógeno inorgánico por nitrógeno orgánico como peptona o extracto de levaduras incrementa grandemente su producción.

En microorganismos, bajos niveles intracelulares de fosfatos producen una baja carga energética que resulta en la desrepresión de las enzimas del metabolismo secundario dice Lozoya (20), y en las células vegetales, son características de cultivos seniles por lo que no es sorprendente que el agotamiento de éste ion sea lo que inflencie más dramáticamente la biosíntesis de metabolitos secundarios.

Dice Lozoya (20), que la fuente de carbón, principalmente sacarosa y glucosa, es también fundamental para mantener el crecimiento celular, sin embargo, en algunas ocasiones su adición incrementa la acumulación de metabolitos. Este efecto es probablemente debido a factores osmóticos. Por ejemplo, a una relación de C/N de 35 se obtiene una producción máxima de fenoles.

Opina Lozoya (20), que la mayoría de los cultivos celulares se desarrollan a un pH inicial de 5 a 6, el cual cambia durante el curso de la reacción. Estos cambios pueden afectar gravemente la acumulación de metabolitos, como lo demuestra la conversión de triptófano a una variedad de metabolitos indólicos. A un pH constante de 6.3 la cantidad de triptofol producido dobla a la del cultivo cuando el pH decae a 4.8 la síntesis se inhibe totalmente.

Factores ambientales. Cambios en la luz que normalmente afectan el desarrollo de las plantas *in vitro* afectan también el de las células cultivadas pudiendo estimular o inhibir la biosíntesis de algún metabolito dice Lozoya (20).

La aireación, ya sea por un flujo controlado de gases, o por agitación mecánica es indispensable para el incremento en biomasa y afecta también la acumulación de metabolitos. (20)

Existen pocos datos sobre el efecto de la temperatura en la síntesis de metabolitos secundarios. La temperatura óptima para el crecimiento de callos de *Peganum* es de 30 grados centígrados pero la producción óptima de alcaloides ocurre a 25 grados centígrados con un rápido decaimiento a temperaturas superiores. El contenido de ácidos grasos de las células cultivadas *in vitro* aumenta grandemente a temperaturas subóptimas para el crecimiento dice Lozoya (20). Al igual que la producción de alcaloides en *C. roseous* se incrementa a 16 grados centígrados. Estos datos son congruentes con el hecho de que la acumulación de metabolitos ocurre principalmente en fases de lento o nulo crecimiento.

En general dice Lozoya (20), parece ser que algunos productos secundarios se sintetizan como respuesta a una condición de estrés, si esta respuesta es general o particular a alguna condición, es un problema en el que nos encontramos trabajando en nuestro grupo.

Los reguladores del crecimiento, generalmente inducen la formación de metabolitos secundarios *in vivo* e *in vitro*. La cantidad y calidad de las auxinas presentes al principio y durante el desarrollo del cultivo tiene un marcado efecto sobre el metabolismo primario y secundario. La calidad y proporciones de reguladores deben ser verificadas, no sólo por su efecto sobre el crecimiento, sino también sobre la biosíntesis, la cinética no ejerce ningún efecto sobre el crecimiento de callos de *Datura tatula* pero, a elevadas concentraciones, inhibe la biosíntesis de alcaloides.

Otro grupo de compuestos que regulan el metabolismo celular y que pueden tener un efecto importante sobre la producción de metabolitos secundarios son las poliaminas dice Lozoya (20). Se observó que cuando se añade sacarosa y espermidina a cultivos celulares de rosa en fase estacionaria se previene la senescencia y se incrementa la cantidad y variedad de los fenoles acumulados de las células. Este tratamiento podría aumentar la vida de cultivos maduros en fase de producción. La adición de carbón activado induce la síntesis de compuestos como benzoquinona en cultivos de *Lithospermum erythrorhizon*.

Para Lozoya (20), la infección por microorganismos patógenos induce la producción de una gran cantidad de metabolitos secundarios *in vivo*; de la misma forma, la adición de extractos microbianos, denominados "elicitors" induce la síntesis de alcaloides, flavonoides y coumarinas. Se añadieron muestras pasadas por autoclave de *Verticillium dahlia*, *Fusarium moniliforme* a cultivos de *Gosypium arboreum*, *Papaver somniferum* y *Cephalotaxus harringtonia* produciéndose, respectivamente, incrementos 19, 92 y 106 veces superiores a los controles.

#### 4.1.10 Adición de precursores

Según Lozoya (20), existen numerosos trabajos que indican que la adición de ciertos precursores de una vía puede incrementar el rendimiento, sin embargo, en muchos casos no es así, por lo que deben tenerse en cuenta factores como la permeabilidad de la membrana, la compartimentalización del precursor añadido y su velocidad de degradación.

#### 4.1.11 Selección de líneas de alto rendimiento

Para Lozoya (20), uno de los avances más importantes en este campo ha sido el caso para la ajimalicina obtenida a partir de líneas sobreproductoras de *C. roseus* seleccionadas por clonación y líneas de tabaco con sobre-producción de nicotina.

##### 4.1.11.A Mutación

Lozoya (20) manifiesta que se ha descrito un sólo trabajo, en una patente japonesa, en el cual se señala la obtención de una mutante por tratamiento con nitrosoguanidina o de luz ultravioleta y con una alta producción de saponina a partir de células en cultivo de *Panax ginseng*. Sin embargo, ahora se tiene alrededor de 23 líneas que producen o sobreproducen el compuesto en cuestión. La obtención de estas mutantes es uno de los caminos más promisorios para incrementar el rendimiento de los productos secundarios de cultivo de tejidos vegetales.

Eventualmente, las técnicas para transferir genes, podrán ser aplicadas en la creación de líneas sobreproductoras de metabolitos específicos. Las enzimas que desvían a los metabolitos primarios hacia las vías metabólicas secundarias, por ejemplo, son puntos importantes de regulación en la acumulación de productos de estas últimas y constituyen blancos específicos en la manipulación de la expresión dice Lozoya (20).

Recientemente, según Lozoya (20), se publicaron resultados preliminares de experimentos sobre modificación genética tendientes a aumentar el rendimiento de quinalizina en cultivos de *Lupinus*, lo que podría lograrse introduciendo genes que expresen constitutivamente una lisina decarboxilasa bacteriana.

Probablemente una de las más grandes aplicaciones que puede derivarse de la fusión somática, es la obtención de líneas celulares sobreproductoras de metabolitos secundarios. Si tales líneas van a ser cultivadas en fermentadores, la falta de rediferenciación no es un impedimento para su aplicación y lo único que se requiere son métodos de selección adecuados. Los resultados obtenidos con algunos híbridos somáticos de *Nicotiana tabacum*; son muy sugestivos del potencial de la fusión somática en esta área biotecnológica dice Lozoya (20).

#### 4.1.11.B Diferenciación

Para, Lozoya (20) hasta ahora siempre se ha manejado la idea de que la expresión de los productos secundarios es un reflejo de cierto grado de diferenciación celular, por ello algunos grupos han enfocado sus esfuerzos a la obtención de cultivos con cierto grado de diferenciación. Estos niveles de diferenciación pueden ser: morfológicas por ejemplo raíces o tallos; celular, como el desarrollo de cloroplastos y vacuolas y diferenciación química, nivel en el que pueden obtenerse otros compuestos que no son producidos por las plantas. Los cultivos de raíces y tallos han permitido la obtención en fermentadores de laboratorio de compuestos tales como glucósidos cardíacos y vindolina, con resultados que permiten suponer que en un futuro puedan incrementarse. Hasta la fecha se han descubierto varios compuestos que no existían en la planta madre, tales como harmina en cultivo de tejidos de *Phaseolus*, lactonas sesquiterpénicas en *Andrographis* y derivados de la putrecina en tabaco.

Otra alternativa es el empleo de líneas tumorales derivadas de cepas mutantes *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes* que forman tumores organogénicos fácilmente cultivables. Estos tumores pueden producir buenos rendimientos de ciertas sustancias. Dice Lozoya (20) que investigaciones realizadas indican que las raíces formadas en cultivos de *Nicotiana tabacum*, *Hyoscyamus muticus* y *H. niger* transformados con *A. rhizogenes* crecen a velocidades semejantes a las de cultivos en suspensión y producen niveles de alcaloides semejantes a los de la planta madre en medio de White carente de hormonas.

Según Lozoya (20), en un trabajo con cultivos de *C. roseus*, se ha conseguido de dos a cuatro alcaloides deméricos en cultivos con clorofila comparados con cultivos blancos.

#### 4.1.11.C Congelamiento

Para Lozoya (20), el rápido mejoramiento de las técnicas de preservación permitirán almacenar líneas celulares de cultivo de tejidos vegetales con alto rendimiento, de las cuales periódicamente pueda recuperarse la línea que haya perdido su capacidad biosintética o se haya desestabilizado genéticamente.

#### 4.1.11.D Ciclo de crecimiento

Opina Lozoya (20), que este es un factor muy importante a considerar ya que los productos secundarios pueden acumularse durante una fase específica del ciclo de crecimiento de un cultivo, por lo que habrá que determinar dicho período para obtener el mayor rendimiento del producto secundario deseado y mantener el

cultivo lo más cerca posible a dicho punto.

#### 4.1.11.E Inmovilización de células

La inmovilización de células es una de las técnicas biotecnológicas más importante para la bioconversión de sustancias por microorganismos. La utilización de esta técnica data de 1966 cuando Mosbach y Mosbach suspendieron células del líquen *Umbicaria pustulata* en un gel de poliacrilamida. Desde entonces se han empleado una variedad de sustratos que incluyen DEAE sephadex, dextrán, carboximetil celulosa, lana metálica, ECTEOLA celulosa, colágena, etc., y más geles de alginato, agarosa y carragenina. El estudio de involización de células vegetales es más reciente y fue motivado por el interés de emplear estas células como reactores biológicos dice Lozoya (20).

Para Lozoya (20), las razones para inmovilizar células pueden ser resumidas en los siguientes puntos: 1) las células en suspensión se encuentran en un ambiente muy diferente al natural y sufren severos cambios en su metabolismo. 2) Las células inmovilizadas tienden a crecer más lentamente y a diferenciarse, condiciones que, como se mencionó anteriormente conducen a la acumulación de metabolitos secundarios. 3) poder cambiar con facilidad la composición química del medio de cultivo y colectar los productos secretados sin tener que manipular físicamente las células.

Según Lozoya (20), la viabilidad de las células inmovilizadas en espera de alquinato agarosa o carragenina ha sido estudiada por varios métodos, que revelan que este proceso no afecta o mejora las condiciones metabólicas de las células. El análisis del pH celular por resonancia magnética nuclear de fósforo 31 no mostró diferencias entre células de *Catharanthus roseus* cultivadas en suspensión o inmovilizadas en agarosa o alginato.

#### 4.1.11.F Biotransformación

El cultivo de tejidos vegetales tiene un gran potencial para la transformación de muchos compuestos orgánicos. Entre los principales estudios de biotransformación por cultivo de tejidos vegetales se tienen los esteroides, terpenoides y alcaloides manifiesta Lozoya (20). Si bien existen algunos artículos de biotransformaciones, aún no existe comercialización de estos productos. Es de esperarse que los estudios de biotransformación por cultivo de tejidos vegetales contribuirá en un futuro muy cercano, como una alternativa, a la industrialización de cultivo de tejidos vegetales para llevar a cabo la síntesis de fármacos, alimentos y otros productos de interés comercial.

#### 4.1.11.G Permeabilización

Opina Lozoya (20), que contrariamente a lo que sucede en las células animales, la mayoría de las células vegetales no secretan sustancias al medio de cultivo si no que tienden a almacenarlas en vacuolas. Esto es un gran inconveniente cuando lo que se desea una producción continua y barata pues implica de procesos de extracción y purificación, además de que la biomasa debe ser continuamente regenerada. Para fines comerciales lo ideal sería que las células secretaran sus productos al medio de cultivo de donde pudieran ser recuperados sin necesidad de destruir la biomasa.

Para Lozoya (20), la permeabilización celular puede ser inducida por tratamiento químico. El dimetil sulfoxido (DMSO) al 10% ha sido empleado durante 30 minutos para inducir la liberación de ajimalicina de células inmovilizadas de *Catharanthus roseus*. Después del tratamiento la misma biomasa puede ser empleada para producir más ajimalicina y el proceso puede ser repetido varias veces. Este método no es sin embargo, aplicable a todo tipo de células y procesos; la liberación de alcaloides intracelulares de células de *Cinchona ledgeriana* requiere concentraciones de DMSO superiores al 20% que dañan irreversiblemente a las células.

Según Lozoya (20), no todos los metabolitos son almacenados intracelularmente. Existen algunos casos de liberación espontánea. Cultivos en suspensión de *Tahlictum minus* secretan cantidades de berberina superiores (10% del peso seco) a los producidos por las raíces de la planta madre (0.01% del peso seco), las concentraciones son tan altas que el alcaloide se cristaliza como nitrato o cloruro dependiendo de la composición del medio.

Dice Lozoya (20) que otros investigadores han propuesto una estrategia que ofrece las mejores posibilidades de obtener líneas celulares con alto rendimiento. La estrategia propuesta es la siguiente:

1. Selección de plantas con alto rendimiento en el metabolismo deseado.
2. Establecimiento de una (s) línea (s) celular a partir de la planta seleccionada.
3. Desarrollo de un medio óptimo de crecimiento, sin consideración de la producción de metabolitos secundarios.
4. Desarrollo de condiciones para inducir la síntesis de los productos secundarios.
5. Selección clonal de las líneas celulares con alto rendimiento.
6. Desarrollo de un medio óptimo para la producción de los metabolitos secundarios.

#### 4.1.12 Micropropagación

Aunque en este trabajo se ha discutido únicamente el empleo de células cultivadas *in vitro* dice Lozoya (20), no debemos olvidar otra forma en que el cultivo de tejidos vegetales puede contribuir a la obtención de metabolitos importantes, la selección y micropropagación en gran escala de plantas sobreproductoras que son la

fuente natural de ciertos compuestos. Esta alternativa es particularmente importante para los países del tercer mundo que se verán seriamente afectados por el desarrollo biotecnológico a nivel mundial.

#### 4.1.13 Substancias activas de las plantas medicinales

Opina Wren (38), que tras la serie de transformaciones tecnológicas que convierten a la planta medicinal en droga vegetal, esta contiene ciertas substancias que en su mayor parte actúan sobre el organismo humano. La fitoquímica, o química botánica, es la encargada del estudio de esas substancias activas, de su estructura, de su distribución en planta, de sus modificaciones y procesos de transformación experimentados a lo largo de la vida de la planta, de la preparación del remedio vegetal y de su posterior almacenamiento. La fitoquímica tiene una relación directa con la farmacología, que estudia los efectos producidos por las substancias medicinales en el organismo humano, el camino y la velocidad de su acción, su absorción, su eliminación y, por último las indicaciones de tal o cual substancia medicinal; es decir, su empleo contra una u otra enfermedad. La farmacología, a su vez, mantiene una estrecha colaboración con la medicina clínica.

Según Wren (38), existen dos tipos de substancias activas en las plantas medicinales: Los productos del metabolismo primario (sacáridos principalmente), que son substancias formadas en todas las plantas verdes gracias a la fotosíntesis y que les resultan indispensables para vivir; el segundo tipo de substancias está compuesto por productos del metabolismo secundario; es decir resultantes de procesos originados principalmente por la asimilación del nitrógeno. Estos productos parecen a veces inútiles para la planta, pero sus efectos terapéuticos son por el contrario destacables. Se trata, por ejemplo, de aceites esenciales (o esencias naturales), resinas y alcaloides tales como los del cornezuelo o del opio.

Normalmente indica Wren (38), que estas substancias no se encuentran en las plantas en estado puro, sino en forma de complejos cuyos distintos componentes se complementan y se refuerzan en su acción sobre el organismo. Sin embargo, incluso cuando sólo hay una substancia activa en la planta, ésta produce en el organismo humano un efecto más beneficioso que la misma substancia obtenida por quimiosíntesis.

Para Wren (38), esta propiedad es de gran interés para la fitoterapia, el tratamiento por medio de plantas o de substancias de origen vegetal. La substancia activa no es únicamente un compuesto químico, sino que presenta además un equilibrio fisiológico, resulta más asimilable por el organismo y carece de efectos nocivos. Esa es la gran ventaja de la medicina natural.

Como ejemplo se puede citar el opio. Látex seco de la cabeza de adormidera, que contiene, junto a multitud de substancias, un gran número de importantes alcaloides. Por separado, cada alcaloide actúa de forma totalmente distinta a la del opio en su conjunto, y produce en el organismo efectos específicos, típicos y originales (efectos farmacológicos). Lo mismo ocurre con los glucósidos de la digital.

Opina Wren (38), que toda una serie de métodos modernos permiten hoy día detectar la presencia de distintas sustancias en los vegetales. En primer lugar está el estudio microscópico, basado en la estructura anatómica y morfológica del vegetal (atlas microscópico de las drogas vegetales). Después tenemos los métodos físicos, tales como la microsублиmación, que consiste en calentar una pequeña cantidad de droga y fijar en un vidrio las emanaciones producidas, las cuales se analizan posteriormente por métodos químicos. Ciertas sustancias pueden ser detectadas por su fluorescencia a la luz de una lámpara de mercurio.

Finalmente enfatiza Wren (38), que hay técnicas específicas de la química cualitativa y cuantitativa que permiten descubrir la presencia de tal o cual sustancia. Esos métodos, que se describen en artículos especializados, responden a las normas establecidas en el ámbito nacional y a las exigencias propias de la calidad de las plantas medicinales.

Para Wren (38), la naturaleza química de la droga queda determinada por su contenido; serán sustancias de los siguientes grupos principales: alcaloides, glucósidos, saponinas, principios amargos, taninos, sustancias aromáticas, aceites esenciales y terpenos, aceites grasos, glucoquininas, mucilaginas, hormonas y antisépticos vegetales, por sólo citar las más importantes.

#### 4.1.13.A Alcaloides

Los alcaloides son compuestos nitrogenados complejos, de naturaleza básica, que provocan en general potentes efectos fisiológicos. Se trata en su mayor parte, de venenos vegetales muy activos, dotados de una acción específica dice Wren (38).

Para Wren (38), normalmente la medicina los emplea en estado puro, y su auténtico valor sólo se asegura en las manos del médico. Según su composición química y, sobre todo, por su estructura molecular, se pueden dividir los alcaloides en numerosos grupos. En la parte descriptiva de esta obra encontraremos plantas que contienen:

- a. Fenilaminas, capscicina del pimiento, colquicina del colquico;
- b. Alcaloides isoquinoleicos: morfina, etilmorfina, codeína y papaverina, contenidos en el opio de la adormidera; y alcaloides indólicos: ergometrina, ergotamina, ergotoxina, del cornezuelo de los cereales;
- c. Alcaloides quinoleicos: pedúnculo foliado de la ruda.
- d. Alcaloides piridínicos y piperídicos: ricina del ricino, trigonelina de la alholva, cicutina (fuerte veneno) de la cicuta.
- e. Alcaloides derivados del tropano: ecopolamina y atropina de la belladona.
- f. Alcaloides esteroides: raíz del eléboro, duclamara o aconitina, por ejemplo.

#### 4.1.13.B Glucósidos

Los glucósidos son productos del metabolismo secundario de las plantas dice Wren (38). Están formados por dos partes. La primera contiene un azúcar por ejemplo la glucosa, y es casi siempre inactiva; pero mantienen un efecto favorable sobre la solubilidad del glucósido y su absorción, así como sobre su transporte a uno u otro órgano. La segunda parte es la que determina el efecto terapéutico; es la más activa, denominada aglucón. Según su composición química se distinguen diversos grupos de glucósidos:

- a) Tioglucósidos: Contienen azufre ligado orgánicamente, y son característicos, por ejemplo de la familia de las brasicáceas. En ellas están acompañados por una enzima, la mirosina, cuya acción los descompone en glucosa e isozulfocianatos o senevoles (rábano rústicano, semilla de la mostaza blanca o negra, semilla de la capuchina).
- b) Glucósidos derivados del ácido cianhídrico, formados por un compuesto cianhídrico ligado a un azúcar. La acción enzimática los descompone, a menudo en la saliva humana, en ácido cianhído libre, que es un veneno, (almendras amargas, flor de saúco negro y de la endrina, hojas del cerezo y del guindo).
- c) Glucósidos antraquinónicos, que suelen pigmentos cristalinos bastante frágiles. Desarrollan una acción laxante unas 6 a 8 horas después de su absorción (rizoma del ruibarbo, corteza de la cabronera).
- d) Cardioglucósidos (glucósido de la digital) que son sustancias muy importantes que, en dosis ínfimas, regulan la actividad cardiaca. Según su estructura química se dividen en cardenólidos (digital, adonis, lirio de los valles) y butadiholes (raíz del eléboro).
- e) Los glucósidos fenólicos pertenecen a un grupo de sustancias de efectos, y a menudo también de aroma, muy característicos. Por este motivo se les coloca a veces en sustancias aromáticas (derivados salicílicos de la corteza del sauce, de la hulmaria y de las llemas del álamo; arbutina y metilarburina, de las hojas de la gayuba, del arándano, del brezo).

#### 4.1.13.C Saponinas

Según Wren (38), las saponinas son muy frecuentes en las plantas medicinales. Desde el punto de vista químico también se caracterizan por la presencia de un radical glúcido (glucosa, lactosa) junto a un radical aglucón. Su propiedad física es la fuerte reducción de la tensión superficial del agua. Todas las saponinas son muy espumantes y resultan unos excelentes emulsivos. Tienen otra propiedad característica: producir la hemólisis de los globulos rojos (eritrocitos), es decir, liberar su hemoglobina, lo que explica el efecto tóxico de algunas de ellas, que las hace inutilizables.

Para Wren (38), las saponinas irritan las mucosas, producen un relajamiento intestinal, incrementan las

secreciones mucosas bronquiales (son expectorantes): flor del gordolobo, raíz del regaliz y de la saponaria.

Son empleadas como diuréticos y desinfectantes de las vías urinarias (pedúnculo foliado de la hemaria, hoja del abedul, raíz de la gaultheria), originaria de la China, de Corea y de las regiones más orientales de la Unión Soviética, es también rica en saponinas.

#### 4.1.13.D Principios amargos

Indica Wren (38), que estas sustancias tienen gusto amargo, excitan las células del gusto, estimulan el apetito y aumentan la secreción de jugos gástricos. La farmacología agrupa bajo el nombre de principios amargos sustancias vegetales terpénicas susceptibles de liberar camuzaleno, así como glucósidos de diversas estructuras bioquímicas. El primer grupo incluye, por ejemplo, los jugos amargos del ajeno y del cardo santo. El segundo grupo, que es el más corriente, contiene los jugos de las gencianáceas (genciana, trébol acuático), de las centaureas, etc.

#### 4.1.13.E Taninos

Para Wren (38), estas sustancias, cuya composición química es variable tienen un carácter común: su capacidad de coagular las albúminas, los metales pesados y los alcaloides. Son hidrosolubles. Su interés medicinal radica principalmente en su carácter astringente: su propiedad de coagular las albúminas de las mucosas y de los tejidos, creando así una capa de coagulación aislante y protectora, que produce la irritación y el dolor, y tienen las pequeñas hemorragias.

Indica Wren (38), que las decocciones y demás preparados a base de drogas ricas en taninos, se emplean, sobre todo exteriormente contra las inflamaciones de la cavidad bucal, los catarros, la bronquitis, las hemorragias locales, las quemaduras y los sabañones, las heridas, las inflamaciones de la piel, las hemorroides y la excesiva transpiración.

Según Wren (38), en uso interno, son útiles contra el enfriamiento intestinal, la diarrea y las afecciones de la vesícula, y como antídoto (contra veneno) en caso de envenenamiento por alcaloides vegetales.

El ácido tánico, extraído de las agallas del roble, es utilizado frecuentemente en farmacia. También se emplea la corteza del roble, tanto la de verano como la del invierno, las hojas del nogal, las hojas y frutos del arándano, las hojas del frambueso y de la zarza, las sumidades de la agrimonia, la raíz de la tormentila, de la bistorta y de la pimpinela, etc. indica Wren (38).

#### 4.1.13.F Las sustancias aromáticas

Para Wren (38), en este grupo se incluyen un cierto número de sustancias frecuentes en las drogas vegetales, de composición y actuación a menudo muy variadas pueden acompañar en la planta a otras sustancias activas. En este grupo en donde encontramos principalmente los glucósidos fenólicos, de los que ya hemos hablado anteriormente, así como los derivados del fenilpropano, como las cumarinas, con su característico perfume. Los pedúnculos foliados de meliloto y la asperilla olorosa son ricas en cumarina.

Según Wren (38), las hidroxycumarinas también presentan un interés farmacéutico. La esculina contenida en la corteza del castaño de indias posee los mismos efectos que la vitamina P: aumenta la resistencia de los vasos sanguíneos y presenta por ello el interés para el tratamiento de las hemorroides y de las varices lo mismo ocurre con la rutina. Además absorbe los rayos ultra violeta (filtros solares, cremas protectoras).

Manifiesta Wren (38), que un segundo grupo de sustancias aromáticas se halla formado por los productos de condensación de moléculas de ácido acético (acetogeninas). A este grupo es al que pertenece los flavonoides, sustancias fenólicas de las que la más importante, desde el punto de vista terapéutico, es la rutina, que al igual que la esculina, actúa muy favorablemente sobre las paredes de los capilares. La rutina se obtienen de la ruda, pero sobre del alforfón y de la sófora.

Para Wren (38), las hojas y las flores del espinillo albar, así como las bayas de esa misma planta, constituyen unas de las drogas más utilizadas entre las que contienen flavonoides.

Según Wren (38), la flor de tilo es otro remedio que goza de gran popularidad. También hay que citar el pedúnculo foliado del hipérico, la siempre viva, la antenaria. El cardo mariano, rico en importantes sustancias del grupo flavoligininas, eficaces contra las enfermedades del hígado y las hepatitis, es estudiado desde hace algún tiempo con especial detenimiento. Las sustancias activas del cañamo, las naftoquinonas de las hojas del nogal, los compuestos contenidos en la drosera, forman también parte del grupo de las sustancias aromáticas.

#### 4.1.13.G Los aceites esenciales (esenciales naturales) y los terpenos

Indica Wren (38), que los aceites esenciales son líquidos volátiles, refringentes, ópticamente activos, próximos a los aceites, con olor especialmente característico. Se forman como subproducto del metabolismo secundario de un número de plantas.

Para Wren (38), el contenido de esencias en los vegetales alcanza un gran máximo con tiempo estable, cálido y soleado. Ese será, pues, el mejor momento para su recolección. Por otra parte, estos aceites se acumulan en determinados tejidos, en el interior de células o en depósitos de esencias, debajo de la epidermis de los pelos, de las glándulas o en los espacios intercelulares. El control microscópico de la calidad de los aceites esenciales

nos enseña que estas células adoptan formaciones características. Se extraen de plantas o desecadas mediante destilación al vapor de agua; por pura o simple extracción o por medio de otras técnicas: presión, absorción por grasas en perfumería, etc.

Opina Wren (38), que desde el punto de vista químico se trata de mezclas extremadamente complejas. La medicina recurre con frecuencia a sustancias extraídas de aceites esenciales (mentol, alcanfor). La utilización farmacéutica de los aceites esenciales se basa en sus propiedades fisiológicas: su olor y su sabor (corrigentia); su efecto irritante sobre la piel y las mucosas (derivantia); sus propiedades desinfectantes y su acción bactericida. Las esencias de anís, de hinojo, etc. (*Oleum anisi*, *Oleum foeniculi*) son a menudo empleadas como expectorantes, ya que se eliminan por los pulmones y por lo tanto, desinfectan directamente las vías respiratorias al mismo tiempo que liberan las mucosidades. También se les incorpora a los gargarismos, inhalaciones y gotas nasales. Su absorción favorece los procesos digestivos, ya que actúan como estomacales, colagogas y carminativas. La mayor parte de las plantas con esencias son empleadas como aromáticas (alcaravea, hinojo, anís, mejorana, tomillo, serpol, orégano).

Según Wren (38), entre la multitud de esencias naturales presentes en la composición de numerosos curativos, citaremos al menos las del anís (*Oleum anisi*), del hinojo (*Oleum foeniculi*), del espliego (*Oleum levandulae*), de la menta piperita (*Oleum menthae piperitae*) y el mentol que de ella se extrae, del tomillo y su timol, así como su carvacrol, que es un excelente desinfectante.

Para Wren (38), los aceites esenciales se componen sobre todo de terpenos, productos volátiles que a menudo están mezclados con otras sustancias. El llantén encierra un alto contenido de terpeno.

#### 4.1.13.H Los aceites grasos

Dice Wren (38), que se trata de aceites líquidos a la temperatura ambiente. El frío los perturba y los solidifica. Son insolubles en agua, pero muy solubles en disolventes orgánicos como el cloroformo y la acetona. Entre los aceites no secantes se puede citar el aceite de oliva y el de almendra; entre los semisecantes, y el de cacahuete, el de girasol y el de colza. El aceite de linaza y el de adormidera son secantes. El aceite de ricino es muy laxante. Los aceites grasos se utilizan normalmente para la fabricación de remedios y con fines alimentarios e industriales.

#### 4.1.13.I Las glucoquininas (insulinas vegetales)

Para Wren (38), se trata de sustancias que actúan sobre la glucemia; también se les llama fitoinsulinas. Aparecen en los siguientes vegetales: vaina de alubia sin semillas (*Fructus phaseoli sine semine*), sumidades de

galega (*Herba galegae*), hojas de arándano. Estas plantas, desecadas, entran en la composición de tisanas antidiabéticas, utilizadas en el tratamiento complementario de la diabetes.

#### 4.1.13.J Los mucilagos

Según Wren (38), son mezclas amorfas de polisacáridos que, en presencia del agua, componen sistemas coloides altamente viscosos. Con agua fría los mucilagos se hinchan formando geles. En el agua caliente se disuelven transformándose en soluciones coloidales que, al enfriarse, también se gelifican. Estas sustancias, en las plantas actúan como depósitos sobre todo por su capacidad de retención de agua. En las infusiones y decocciones los mucilagos de las plantas medicinales actúan reduciendo la irritación, tanto física como química. Ejercen pues una acción favorable contra las inflamaciones de las mucosas, especialmente contra las de las vías respiratorias y digestivas, atenúan los dolores de las contusiones, la aligeran la piel en la aplicación de cataplasmas. Al reducir el peristaltismo intestinal, su efecto de absorción actúa favorablemente sobre la diarrea. Se les emplea mucho como emulsificantes (carragentos extraídos de algas marinas).

Para Wren (38), las plantas mucilaginosas se emplean solas o mezcladas en infusiones. Se trata, por ejemplo, de la cetraria, la hoja y la raíz del malvavisco, la flor y la hoja de malva, la flor de la alcea, la hoja y la flor del tusílogo, la semilla de alhova, la semilla del lino, etc. También se incluyen en este grupo las pectinas. En efecto, se trata igualmente de polisacáridos que forman geles, lo mismo que los musilagos. Las pectinas están presentes en numerosos frutos, siendo especialmente abundantes en los jugos de frutas y hortalizas: manzanas, pepino, zanahoria, etc. Las pectinas se emplean en las curas con frutas y en el tratamiento de la diarrea.

#### 4.1.13.K Las hormonas vegetales (fitohormonas)

Para Wren (38), son sustancias de composición química muy compleja. Se trata casi siempre de biocatalizadores que actúan sobre el crecimiento y los intercambios metabólicos (bioestimulantes). Se encuentran, por ejemplo, en el lúpulo, anís, salvia, serbal, malvavisco, bolsa de pastor, avena y zanahoria.

#### 4.1.13.L Los antisépticos vegetales

Según Wren (38), se trata de sustancias antibióticas producidas por los vegetales superiores, que ejercen una acción antimicrobiana de amplio espectro. Casi siempre son inestables y volátiles. Actúan incluso en aerosol por vía respiratoria. Los hay en el ajo, cebolla, mostaza, rábano rústicano, saúco, enebro, pino, llantén, etc. Su estudio continúa aún en nuestros días.

## 4.2 Marco referencial

### 4.2.1 Descripción de la familia Smilacaceae

Para Calderón (6), la familia Smilacaceae comprende por lo general plantas arbustivas y trepadoras, a veces herbáceas o erectas, rizomatosas, frecuentemente provistas de zarcillos y/o espinas. Presenta hojas alternas o en ocasiones opuestas, con peciolo que suelen ser envainantes y articuladas en las láminas foliares. Estas a menudo son coriáceas con 3 a 5 nervaduras principales, las cuales son paralelas entre sí, presentando además nerviación secundaria reticulada. Las inflorescencias se presentan en forma de umbrelas axilares simples, o bien, en racimos o espigas de umbrelas.

Según Calderón (6), las flores son unisexuales, raras veces son hermafroditas y por lo común son pequeñas. El perianto lo constituyen 6 segmentos libres con frecuencia son petaloideas. Las flores masculinas presentan 6 estambres a veces en número mayor o menor. Las anteras se conforman de dos lóculos pero con frecuencia confluentes aparentando uno solo. El ovario es rudimentario y puede estar presente o ausente. Las flores femeninas se componen de un ovario supero, trilocular, con 1 ó 2 óvulos. Las flores pueden o no incluir un estilo corto tres estigmas o uno trilobado, presentan estaminoides. El fruto es carnoso con 1 a 3 semillas de embrión pequeño y endospermo óseo.

### 4.2.2 Descripción del género *Smilax*

Según Calderón (6) se reconocen cuatro géneros de zarzaparrilla de los cuales tres son de pocas especies que los conforman y de área restringida a Australia: *Heterosmilax* con quince especies, *Rhipogonum* con siete y *Pseudosmilax* con dos. Mientras que *Smilax* tiene amplia distribución en ambos hemisferios y reúne unas 200 a 350 especies, primordialmente en zonas tropicales y subtropicales extendiéndose en algunos casos a regiones templadas. El género *Smilax* comprende plantas dioicas, herbáceas o más comúnmente arbustivas trepadoras y con frecuencia de varios metros de largo. Están provistas de rizomas o de tubérculos carnosos o leñosos. Los tallos y hojas a menudo presentan espinas aplanadas o cilíndricas, curvadas o rectas, en ocasiones acompañadas también de espinas asciculares, rígidas, largas o finas. Estas pueden presentarse en gran número que pueden dar la impresión de pubescencia alta y rígida. Las ramas son floríferas con 1 ó 2 catafilos en la base. Las hojas son alternas, presentando peciolo persistentes en forma de una vaina estipular cuyo extremo apical se prolonga en zarcillo. La planta posee flores axilares en forma solitaria o en umbeladas sobre ramillas cortas axilares. Las flores masculinas típicas presentan 6 estambres, pero este número puede variar. Las flores femeninas con frecuencia son

un poco más pequeñas que las masculinas, presentan 3 estilos cortos, con 3, 6 ó 12 estambres abortivos y un óvulo en cada lóculo. Los frutos son carnosos, por lo común son globosos o subglobosos. Las semillas son lisas, duras, con abundante endospermo óseo. Los tallos flexibles y resistentes de algunas especies se usan para la manufactura de cuerdas y canastos. Las porciones subterráneas de muchas especies suelen utilizarse como fuentes de alimentos y saborizantes, pero sobre todo contienen sustancias con propiedades medicinales reconocidas en forma tradicional. Las especies de *Smilax* son semejantes entre sí y por lo general se distinguen una de la otra en pocos rasgos. Esta situación complica su identificación en particular porque son plantas dioicas, las flores al igual que los frutos son efímeros, los tallos y las hojas de la porción basal de la planta son distintas de los de las porciones distales.

#### 4.2.3 Descripción de la especie *S. aristolochiaefolia* Miller

Según Calderón (6), esta especie fue descrita desde 1768, se le conocía como *S. medica* Schld. & Cham. y durante mucho tiempo se le consideró como una de las principales fuentes de la zarzaparrilla medicinal a nivel comercial.

Indica Calderón (6) que un grupo conformado por plantas arbustivas y trepadoras, con rizoma delgado, el cual se encuentra cubierto de una corteza de color púrpura o blanquecina. El tallo es glabro representando forma obtusa cuadrangular en la porción inferior; presenta color verde-amarillento claro, es estriado, desde liso a arrugado y provisto de espinas aplanadas. Las espinas a su vez son ligeramente curvadas de hasta 1.3 cm de largo. Los peciolos son de hasta 5 cm de longitud, los cuales son espinosos o inermes, provistos de vainas estipulares y zarcillos fuertes y largos en la parte inferior de la planta. Las láminas foliares son ovadas u oblongas hasta de 28 cm de largo y 14 cm de ancho, aunque por lo general mucho más pequeñas. Tienen el ápice desde redondeado a agudo, la base es cordada con borde liso. La lámina posee de 5 a 7 nervaduras principales evidentes, con frecuencia provistos de espinas pequeñas especialmente sobre la nervadura media. Las láminas foliares de la parte superior de la planta tienen dimensiones menores, son más delgadas y con la base ligeramente cordada a obtusa. Los pedúnculos de las umbelas masculinas son algo aplanados, con una longitud de hasta 3.5 cm de largo. Las umbelas son axilares y se representan en forma solitaria o racimosas sobre ramillas cortas. El receptáculo floral tiene de 2 a 2.5 mm de ancho. Los segmentos del perianto son oblongos teniendo dimensiones de 4 mm de largo y de 1 a 1.5 mm de ancho. Las anteras tienen de 1.5 a 2 mm de largo. Los pedúnculos fructíferos tienen hasta 4 cm de largo. El fruto maduro es globoso, de color rojo y de 5 a 8 mm de diámetro.

#### 4.2.4 Clasificación botánica

<b>Reino:</b>	<b>Vegetal</b>
<b>Subreino:</b>	<b>Embryobionta</b>
<b>División:</b>	<b>Magnoliophyta</b>
<b>Clase:</b>	<b>Liliopsida</b>
<b>Subclase:</b>	<b>Lilidae</b>
<b>Familia:</b>	<b>Smilacaceae</b>
<b>Genero:</b>	<b>Smilax</b>
<b>Especie:</b>	<b>Aristolochiaefolia</b>

*Smilax aristolochiaefolia* Miller.

#### 4.2.5 Origen: Nativa de México y Centro América.

**Distribución geográfica:** reporta Standley (29), que más de 200 especies, están distribuidas a lo ancho de ambos hemisferios, con más abundancia en las regiones tropicales. Adicionalmente muchas especies se encuentran en el sur de América Central y son muy abundantes. Algunas de las especies son de importancia porque han sido un recurso de la droga de zarzaparrilla. También este genero de plantas esta ampliamente dispersado en Guatemala y son algunas muy abundantes. En la costa norte de nombre "Cuculmeca" son usadas algunas especies como de uso común. Según Standley (29), Tejada reporta el nombre "Quix" para el uso de algunas especies en Huehuetenango, Petén, (Uaxactún); probablemente extendida entre Alta Verapaz, sur de México, Honduras y Belice. El nombre "Escoca" es reportado de Honduras y Belice, probablemente Maya. Esta especie se cree que es una de las más importantes por ser un recurso comercial de zarzaparrilla.

#### 4.2.6 Identificación de la especie

Para Amador (3) la técnica de análisis de conglomerados permite distinguir claramente las especies de plantas. Es evidente que el sistema de marcadores RAPD's constituye una técnica de apoyo a la taxonomía clásica especialmente en los casos de difícil identificación como el de la zarzaparrilla. La utilización del sistemas de marcadores RAPD's permitió describir la relación existente entre los individuos de una misma especie y entre especies. Para la identidad taxonómica según Amador (3) de la zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller), se recurrió a la técnica de marcadores moleculares RAPD's. Esto debido a que la zarzaparrilla tiene una taxonomía compleja cuando la identificación se basa únicamente en caracteres morfológicos externos. Utilizando 14 oligonucleótidos iniciadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y hasta 8 individuos de una

misma especie, se logró detectar hasta 8 fragmentos RAPD's en un mismo individuo con un sólo iniciador. Se hicieron análisis de conglomerados con el programa SAS tomando en cuenta los fragmentos de los 14 oligos al mismo tiempo comparando dos métodos: el que utiliza la proporción de fragmentos no compartidos. En forma interesante, los dos métodos dieron resultados similares. Y los dendogramas o árboles filogenéticos permitieron distinguir claramente dos especies y mostraron la estrecha relación entre los individuos de una misma especie. Por lo que la información fue congruente con la clasificación convencional ya establecida de la zarzaparrilla. Fue evidente que el uso de un número grande de iniciadores y una muestra que representa la variabilidad de una misma especie contribuye a una mayor congruencia entre la información obtenida y la esperada.

#### 4.2.7 Exploración y recolección del género *Smilax* en Guatemala

En los años 1991 a 1992 se realizó una exploración y recolección del género *Smilax* a nivel nacional. De este trabajo se obtuvieron 17 recolectas diferentes especies. Durante la recolección se notó que era relativamente difícil localizar lugares donde se encontrarán plantas de zarzaparrilla. En entrevistas con personas del lugar, se dejó entrever la gran erosión genética que existe de este género, debido a que es una planta que ha sido utilizada para medicinas desde tiempos de la colonia y porque la parte utilizable son las raíces engrosadas. Por ello cuando se aprovecha la planta es cortada completamente, y no se le da ningún manejo agronómico, únicamente se hace extracción del bosque. Adicionalmente los bosques donde crecen son utilizados de una manera irracional, por lo que en varias localidades donde se recolectó, la vegetación es secundaria en estados tempranos de sucesión e incluso se ha encontrado especies de *Smilax* creciendo en matorrales. En algunas localidades se hizo una estimación de su densidad y se encontró que está entre 3 y 10 plantas por hectárea, lo cual puede ser prueba de lo apuntado existentes antes era mayor que el actual. Por otra parte se noto que existe una baja o nula repoblación natural (16).

#### 4.2.8 Aprovechamiento industrial de *Smilax* en Guatemala

Guatemala, al igual que el resto de países de Latinoamérica ha sido un proveedor de materia prima de esta y de otras muchas plantas medicinales; y si se tuviera un cultivo o manejo sistematizado de zarzaparrilla se podría obtener un volumen que podría ser rentable para la industrialización aunque sea a pequeña escala y que podría tener un valor agregado importante. El precio de rizoma puede llegar a alcanzar un valor de US\$3.00/kg en la ciudad de Guatemala, mientras que un producto terminado alcanza un promedio de US\$5.00 y un producto con materia prima llevada del país puede alcanzar hasta US\$15.00 a US\$ 20.00 según Cáceres (5).

#### 4.2.9 Fitoquímica y actividad biológica del género *Smilax* en Mesoamérica

Morton (22), en su atlas de plantas medicinales de Mesoamérica, incluye a *Smilax a.* Miller como especie utilizada con fines medicinales de esta región.

Además es importante anotar que Stahl y Schild (28), describen el estudio, en cromatografía en capa fina de *S. Aristolochiaefolia* Miller. Identificada como zarzaparrilla, e indica un contenido de 2-4% de saponinas que en el estudio de cromatografía de capa fina [gel de sílice F<sub>254</sub>; n-BuOH/HOAc/H<sub>2</sub>O (40:10:50)].

A pesar de que como lo indica Evans (11), la zarzaparrilla gozó de cierta reputación en el tratamiento de la sífilis, el reumatismo y ciertas enfermedades de la piel, su uso principal es como vehículo o coadyuvante en preparaciones farmacéuticas y bebidas no alcohólicas y las geninas se utilizan en la síntesis parcial de cortisona y otros esteroides. Por lo tanto, su estudio fitoquímico debe apuntar, preferentemente, hacia la determinación de saponinas esteroideas y en la liberación de las correspondientes geninas para su uso en semisíntesis.

Farnsworth (12), desde su punto de vista incluye a *Smilax a.* como una especie que ofrece bondades etnomédicas, biológicas y químicas.

Jartetzky (19), reporta que en Alemania, extractos acuosos, tanto de la raíz seca como de la madera presentaron actividad diurética en ratas, a dosis de 5%.

Por otro lado indica Schimmer (26), que no se demostró actividad mutagénica.

Según Ahsan (2), no se promovió la recuperación en fracturas en los extractos hidroalcohólicos.

#### 4.2.10 Usos de la zarzaparrilla en la medicina tradicional

Rafatullah (25) reporta que las raíces y los rizomas de la planta de zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller. y *S. regelii* Killip & Morton) han sido utilizados en la medicina tradicional. Los usos han sido diversos: como tónico, antirreumático, diurético y para el tratamiento de enfermedades de la piel y el hígado.

Según Rafatullah (25), la zarzaparrilla gozó en otro tiempo de gran reputación en el tratamiento de la sífilis, del reumatismo y de ciertas dolencias de la piel. Pese a que su modo de acción es un tanto oscuro, puede estimular la absorción de otros fármacos. Es muy utilizada como vehículo y se usan grandes cantidades en la fabricación de bebidas no alcohólicas.

La planta fue introducida en Europa indica Rafatullah (25), por los españoles en los inicios del siglo dieciséis. Fue incluida en la farmacopea británica en 1864 y registrada con actividad antirreumática, antiséptica y antiprurítica. En la farmacopea de los Estados Unidos, los principios activos fueron registrados en 1942. En la medicina indú y grecoárabe los principios activos son todavía utilizados para el tratamiento de enfermedades del hígado, inflamación y deficiencia renal.

Manifiesta Trease y Evans (31) que las plantas producen numerosas raíces de unos 3 m de longitud unidas a un rizoma corto. Para cosechar las raíces se procede a cortarlas, pero dejando en el terreno la parte suficiente para que la planta prosiga su desarrollo y poder tener un nuevo ciclo de cosecha. A veces, el rizoma se recolecta junto con las raíces. Después de desecarlo al sol se hata en haces y éstos se reúnen en manojos. Los manojos están hechos con largas raíces, con o sin fragmentos de rizomas y tallos aéreos.

Las variedades comerciales difieren unas de otras en color, presencia de estrias y rugosidad; en la presencia o ausencia de rizomas y tallos aéreos; en las proporciones relativas de la corteza, leño y médula observadas en el corte transversal. El extracto de principios activos es casi inodoro, pero su sabor es algo dulzaino y acre, refieren Trease y Evans (31).

Según Amador (3), después de visitar diferentes mercados populares y distintas tiendas de ventas de productos naturales de algunos pueblos pequeños y ciudades grandes de México, han podido encontrar la zarzaparrilla en diferentes presentaciones que se ofrecen al comprador. Así, se puede adquirir en pequeños trocitos de raíz, rizoma o tallo en bolsas plásticas y con indicaciones de uso. En los últimos años ha aparecido en el mercado presentaciones para preparar té o extractos liofilizados contenidos en cápsulas. Las principales indicaciones de uso que puede encontrar son: para contrarestar problemas de reumatismo, obesidad, herpes e hígado; con actividad sudorífica, depurativa diurética y desintoxicante y tonificante sanguíneo.

Para Amador (3), la raíz de zarzaparrilla también se usa en la preparación de bebidas refrescantes sin contenido de alcohol. El principal ejemplo que se puede citar es la cerveza de raíz que tradicionalmente en algunos lugares como Jalapa, Veracruz se sigue preparando a partir de las raíces mencionadas, pero en la mayoría de regiones se elabora a base de saborizantes sintéticos.

Reporta Trease y Evans (31), que al sur de los Estados Unidos el extracto de zarzaparrilla es mezclada con ginseng, gengibre y sasafrás con la cual se elabora la bebida denominada "root booster" a la que se atribuye propiedades estimulantes de la actividad sexual.

Para Trease y Evans (31), la determinación botánica exacta de las numerosas variedades que se han importado en Europa y en los Estados Unidos desde hace mucho tiempo, constituye un problema que entraña cierta dificultad. Se ha realizado un considerable trabajo fitoquímico de las zarzaparrillas sin la adecuada identificación botánica de las muestras. Las diversas especies contienen una o más saponinas esteroidales. Se conocen dos geninas isoméricas: esmilagenina (nombre derivado de *Smilax*) y sarsasapogenina. El heterósido cristalino sarsaponina fue aislado primeramente en 1913 a partir de una muestra de zarzaparrilla de Jamaica. Por hidrólisis se obtuvo la sarsasapogenina y dos moléculas de glucosa y una de ramnosa. Las geninas se utilizan en la síntesis parcial de cortizona y otros esteroides.

#### 4.2.10 Compuestos biológicamente activos de la zarzaparrilla

Según Tschesche (33), la zarzaparrilla contiene varios compuestos como el sarsaparrillósido. Por hidrólisis de este compuesto se derivan las saponinas: parrillina, desglucodesramnoparrillina, desglucoparrillina y asparragósido.

Para Price (24), las saponinas son glicósidos que se encuentran principalmente en plantas, forman espuma jabonosa cuando son agitadas en agua y está característica que da el nombre al grupo de compuestos (del latín sapo, jabón). Esta propiedad es compartida por otras especies de compuestos relacionados estructuralmente, por ejemplo los glicósidos cardíacos. La particularidad de causar espumosis ha sido usada desde hace un siglo para identificar la presencia de saponinas en plantas y extractos de plantas. De manera similar otras características por ejemplo, actividad hemolítica, propiedades ligadas al colesterol y amargor caracterizan a tipos particulares de saponinas pero no compartidas por todos sus miembros.

Según Price, Trease y Evans (24,31), se establece que las saponinas son compuestos anfífilos en los que los azúcares (pentosas, hexosas o ácidos urónicos) están unidos a un grupo no polar (la sapogenina o aglicona) que puede ser un esteroide o un triterpeno. Los azúcares son monosacáridos galactosa, arabinosa, ramnosa, glucosa, xilosa o ácido glucurónico. La dificultad de separar las mezclas complejas y obtener materiales puros es uno de los problemas principales en el estudio de las propiedades de las saponinas. La naturaleza anfífilica de las saponinas domina sus propiedades físicas en solución. Son fuertemente activos superficialmente, formando espumas estables y actuando como agentes emulsificantes. Tienen una fuerte actividad hemolítica y parecen formar micelas de la misma forma que los detergentes. Esas propiedades físicas son aprovechadas en muchos de los usos tecnológicos de las saponinas tales como en champúes y bebidas carbonatadas. Las saponinas tienen elevado peso molecular y su aislamiento en estado puro presenta ciertas dificultades. Como glicósidos que son, se hidrolizan por ácidos, dando una genina (sapogenina) y diversos azúcares y ácidos urónicos relacionados. Según la estructura de la genina o sapogenina, se conocen dos grupos de saponinas; el tipo esteroides y los triterpenoides pentacíclicos. Ambos presentan un enlace heterosilícico en el carbono 3 y tienen un origen biogénico común, vía ácido mevalónico y unidades isoprenoides.

##### 4.2.11.A Las saponinas esteroides

Para Price, Trease y Evans (24,31), están menos distribuidas en la naturaleza que las saponinas triterpenoides pentacíclicas. Los estudios fitoquímicos han demostrado su presencia en muchas familias monocotiledóneas, especialmente en las familias Smilacaceae (por ejemplo, *Smilax* spp.), Dioscoreaceae (*Dioscorea* spp.), Amaryllidaceae (*Agave* spp.) y Liliaceae (*Yucca* y *Trillium* spp.) Entre las dicotiledóneas, la

presencia de diosgenina en la *Trigonella foenum - graecum* (Leguminosae) y alcaloides esteroidicos en *Solanum* (Solanaceae), despierta gran interés a nivel comercial. Algunas especies de *Strophanatus* (Apocynaceae) y *Digitalis* (Scrophulariaceae) contiene tanto saponinas esteroides como heterósidos cardíacos.

Para Trease y Evans (31), las saponinas esteroides son de gran interés e importancia por su relación con compuestos como las hormonas sexuales, cortisona, esteroides diuréticos, vitamina D y heterósidos cardíacos. Algunas son utilizadas como materia prima para la síntesis de dichos compuestos. La diosgenina es la principal sapogenina empleada por la industria, pero la mayoría de las dioscóreas, de las que se aísla, contienen una mezcla de sapogeninas en forma glucosídica.

Reporta Calderón (6) que la zarzaparrilla (*S. regelii* Killip y Morton y *S. aristolochiaefolia* Miller.) poseen de 1.8 a 2.4% de saponinas esteroidales. Dichos compuestos tienen un índice hemolítico de 3,500 a 4,200. Aunque la síntesis total de algunos esteroides medicinales se realiza a escala industrial, hay también una gran demanda de productos naturales que han de servir como sustancias de partida para la síntesis parcial. Constantemente se vienen realizando esfuerzos para descubrir nuevos cultivares de plantas de alto rendimiento para asegurar un regular suministro de materia prima mediante el cultivo de plantas con características de buena calidad.

Para Calderón (6), la diferencia de las saponinas esteroides, las triterpenoides pentacíclicas son raras en las monocotiledóneas. Abundan en muchas familias de las dicotiledóneas, especialmente en *Quillaia saponaria* (Rosaceae), *Glycyrrhiza glabra* (Fabaceae), *Polygala senega* var. *Latifolia* Torr. Gray (poligalaceae) y *Bupleurum falcatum* (Umbeliferae).

#### 4.2.11.B Las saponinas en la industria alimenticia

Según Price (24), solamente cerca de 28 saponinas vegetales son usadas en los alimentos humanos. Las más comúnmente ingeridas son las saponinas de la soya, garbanzo, cacahuate y espinaca. Aunque las saponinas tienen actividad antibiótica y son tóxicos en humanos e insectos, parece que no tienen efecto tóxico en humanos permaneciendo en el tracto gastrointestinal. Las saponinas en régimen alimenticio, aisladas o como plantas alimenticias conteniendo saponinas, bajan los niveles de colesterol en diversas especies de mamíferos, por lo que son probablemente importantes en los alimentos dietéticos para reducir el riesgo de enfermedades del corazón.

Opina Price (24), que entre las principales fuentes vegetales usadas como alimentos en humanos están *Glycine max*, *Phaseolus* spp., *Lens culinaris*, *Cicer arietinum*, *Avena sativa*, *Solanum* spp., *Thea sinensis* L. (*Camellia sinensis*), *Arachis hypogaea*, *Spinacea oleracea*, *Cucurbita* spp., *Beta vulgaris*, *Dioscorea* spp., *Rubus* spp. y *Fragaria* spp.. Entre las fuentes vegetales alimenticias para animales están: *Medicago sativa*, *Helianthus annuus*, *Aesculus hippocastaneum*, *Cyamopsis tetragonobola* L. y *Lupinus* spp.

Price (24), dice que entre las especies vegetales más usadas como saborizantes y tónicos, son: *Trigonella foenum graecum*, *Glycyrrhiza glabra*, *Quillaia saponaria*, *Saponaria officinalis*, *Yucca schottii*, *Gypsophila trichotoma*, *Smilax aristolochiaefolia*, *Chenopodium quinoa* y *Panax spp.* Las raíces y los estolones secados de orozuz o raíz dulce (*Glycyrrhiza glabra*) son usadas como condimento y saborizante, aunque la confitería saborizada con orozuz es generalmente zaborizada con aceite de anís (*Pimpinella anisum*). La mayor parte del orozuz es usado por la industria de tabaco o para la preparación de pastas, extractos y almibares. Una porción de ácido poliglucurónico y el ácido glicirrético conforman una saponina 50 veces más dulce que el azúcar. Una patente japonesa que describe la purificación del ácido glucirrínico para propósitos edulcorantes fue generado a mediados de la década de los 80.

Por otro lado dice Duke (9), que la corteza de quillaia (*Quillaia saponaria*) contiene saponinas en 10% y ha sido usado como una fuente comercial de saponinas, también como un agente espumante en bebidas y confitería, dulces cocinados y postres derivados de la leche. Así también los extractos de zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia*) son usados para propósitos saborizantes en cervezas de raíz, confitería, etc. Las concentraciones promedio aproximado en ppm de saponinas de *Quillaia* usadas en productos alimenticios en los Estados Unidos son: en bebidas 95, helados y nieves 0-12, confitería 18, almibares 6-8.

#### 4.2.11.C Las saponinas como drogas

Para Wagner (36), las saponinas son derivados de los triterpenos, con un pequeño número de esteroides. Residuos de azúcar pueden unirse por la vía de un solo grupo OH o un anillo del grupo -OH y un grupo carboxil (saponinas bis-desmósidos). Las saponinas triterpenos poseen en su sistema un anillo de oleanano, o raramente un ursano como sistema. Muchos son ácidos, presentando uno o dos grupos carboxilos y aglicona y/o azúcar; otros contienen grupos de oxígeno, presentandose en las saponinas como OH, CH<sub>2</sub>OH o -CHO. El grupo carbohidrato usualmente contiene de 1-6 unidades monosacaridas entre las más comunes están: la glucosa, galactosa, ramnosa, fucosa, ácido xyloglucoronico y ácido galacturonico. Por otro lado las saponinas esteroides son más epirostanoles. Furostanoles son derivados usualmente cubiertos entre espirostanoles durante procedimientos de aislamiento; estas saponinas no tienen grupos carboxilos, las saponinas esteroides poseen pocas unidades de azúcar que las saponinas triterpenos. En contraste a los monodesmosidos, los bis-desmosidos furostanos glicósidos no tienen actividad hemolítica.

Según Wagner (36) en un estudio de cromatografía, realizado en zarzaparrilla se encontró de 1.8-2.4% de saponinas esteroides constituido por parrillina, paraglina y otros. Para *Smilax spp.* (*S. regelli* Killip), las agliconas son sarsapogeninas (= parigenina) y este es isómero, esmilagenina.

#### 4.2.11.D Consecuencias fisiológicas y nutricionales de las saponinas

Para Price (24), el uso de extractos tóxicos de plantas ricas en saponinas para envenenar peces y su uso como detergentes naturales antes de la llegada de las alternativas sintéticas son dos usos mejor conocidos. La complejidad de los efectos que esos compuestos pueden ejercer sobre los sistemas biológicos ha empezado a recibir investigación sistemática en los últimos años. Hay abundantes evidencias de que las saponinas interactúan con los esteroides en el tracto gastrointestinal en una forma que puede suministrar beneficios a los humanos. Así también se investiga en los campos de la actividad antitumoral. Entre las saponinas antitumorígenas está el ácido glicirrético, aglicona de la glicirricina aislado de la raíz dulce (*Glycyrrhiza glabra* L.). Parece ser que dicha saponina constituye uno de los agentes más promisorios en la inhibición de la promoción de tumores inducidos con 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Por otro lado, la acción primaria de las saponinas membranolíticas sobre las células es causar un aumento general en la permeabilidad de la membrana del plasma. Basado en este principio, se condujo con éxito la inhibición del crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani*.

Según Duke (9), también se ha estudiado la actividad fungitóxica significativa bajo condiciones experimentales. Se han utilizado las avenacinas, mostrando la inhibición del crecimiento de *Gaeumannomyces graminis*. Este es un hongo muy destructivo en las gramíneas, especialmente en trigo. Se demostró que las camelidinas inhiben la germinación de las conidias de *Gloesporium theae-sinesis* con dosis de 250 ppm, de *Pyricularia oryzae* y de *Cochliobolus miyabeanus* con 100 ppm. Dichos hongos producen graves enfermedades en plantaciones de arroz y té. Por otro lado, las saponinas de espárrago han mostrado tener principios molusquicidas potentes cuando han sido probado contra caracoles transmisores de la esquistosomiasis.

Para Price (24), finalmente, las saponinas tienen la interesante propiedad de alterar la sensibilidad al sabor dulce en los humanos. El efecto es una supresión selectiva de percepción del sabor dulce (de breve duración) que parece ser debido a una interacción directa entre las saponinas y las membranas receptoras sensoriales. Dicha propiedad ha sido mostrada con la saponina aislada del árbol de jujuba (*Ziziphus jujube*), la zizifina. También se investiga el metabolismo de las saponinas por la flora intestinal humana.

#### 4.2.12 Algunos estudios en la utilización de células en suspensión

Baez, Sánchez y Castillo (4), indican en sus estudios en caña de azúcar (*Saccharum* Sp.) que el número y tipo (embriogénica y no embriogénica) de células son parámetros muy importantes para evaluar el crecimiento de suspensiones de células vegetales y determinar la mejor suspensión en la regeneración de plantas por embriogénesis somática.

Castillo (7) indica, que el cultivo de suspensiones celulares embriogénicas se ha convertido no solo en una fuente de estudios bioquímicos fisiológicos y genéticos, sino además es una fuente de obtención de embriones somáticos con vista a la propagación clonal de plantas élites o mejoradas mediante ingeniería genética y como primer paso para el desarrollo del sistema de la semilla artificial.

Herman (15) encontró que al utilizar embriones somáticos en medio de cultivo líquidos ofrece numerosas ventajas para la multiplicación masiva de plantas de café (*Coffea arabica* cv catimor) en comparación con los métodos de propagación *in vitro* empleadas hasta el momento. En la multiplicación a gran escala es necesario el paso a los medios líquidos, debido a las ventajas que ofrece el cultivo en suspensión como lo son: los altos coeficientes de multiplicación que se alcanzan en corto tiempo, la automatización del proceso de biorreactores y la reducción de los costos de producción. En los últimos años se ha incrementado el cultivo de células en suspensión y la embriogénesis somática en medios líquidos, lográndose incluso la multiplicación de suspensiones embriogénicas en un biorreactor de 3 litros.

Según Hidrobo (17), en un análisis de tipo histológico y bioquímico, a partir del cambio de medio embriogénico en muestras de callos de papa (*Solanum tuberosum* L.), detectando cambios en la composición celular de las mismas, así como en los patrones de isoenzimas peroxidadas y esterases y que en lo posterior pudieran servir de índices para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo General

Estudiar la respuesta de la zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller) al cultivo de células en suspensión.

### Objetivos Específicos

1. Establecer el procedimiento del cultivo de células en suspensión de la zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller).
2. Conocer el comportamiento de la multiplicación celular de la zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller),

7. METODOLOGIA

7.1. Laboratorio experimental en donde se realizó la investigación

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Secretaría de Medio Ambiente y Mejoramiento de Plantas de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad de Guatemala, ubicada en el tercer nivel del edificio 7-8, Ciudad Universitaria zona 12, Ciudad de Guatemala.

6. HIPOTESIS

7.2. Material Vegetal

1. El tejido de la zarzaparrilla puesto en cultivos en suspensión tiene la capacidad de multiplicación de células.
2. La multiplicación celular en suspensión de la zarzaparrilla, presenta el comportamiento típico de los cultivos celulares vegetales.

uno principal es como fármacos. (25)

7.3. Desarrollo de la investigación

Para facilitar el desarrollo de la investigación se dividió en las siguientes fases:

Fase I: Multiplicación del material vegetal.

Fase II: Inoculación de cultivos.

## 7. METODOLOGIA

### 7.1 Laboratorio experimental en donde se realizó la investigación

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Subárea de Manejo y Mejoramiento de Plantas de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, ubicado en el tercer nivel del edificio T-8, Ciudad Universitaria zona 12, Ciudad de Guatemala.

### 7.2 Material Vegetal

La planta de zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller) fue la que se utilizó en el presente estudio. Esta especie tiene las siguientes características: Es una planta arbustiva y trepadora, constituida por un rizoma de donde se generan raíces. El rizoma se ramifica abundantemente y forma tallos prolongados subterráneos que pueden alcanzar varios metros de longitud con numerosos nudos en cada uno de los cuales nace una hoja membranosa, de forma largamente triangular que por su base abraza casi toda la anchura del rizoma. De los mismos nudos en que se origina las hojas, el tallo produce también algunos zarcillos delgados con los cuales la planta se adhiere a todo lo que contacta. Es una planta dioica, sus flores son pequeñas de 6 pétalos de color crema, las flores masculinas con 6 estambres y las femeninas con el pistilo ovoide. El fruto es una baya redonda, sostenida por un corto pedúnculo de color rojo o más o menos oscuro, o bien negro cuando el fruto está lo suficientemente maduro. Todas las bayas originadas de la umbela floral forman un racimo a modo de un racimo de uvas. Sólo las plantas hembras producen frutos, dentro de cada fruto se encuentran 3 semillas de consistencia muy dura si llegan a madurar. Esta especie tiene una distribución geográfica en México, Guatemala y Belice. En general habita en regiones tropicales y subtropicales húmedos, con climas cálidos y semicálidos húmedos con lluvias todo el año. Su suelo principalmente es de origen volcánico con acumulación de arcilla en el subsuelo, su uso principal es como fármacos. (22)

### 7.3 Desarrollo de la investigación

Para facilidades de manejo, la investigación se dividió en las siguientes fases:

Fase I: Multiplicación del material vegetal.

Fase II: Inducción de callo.

Fase III: Establecimiento de cultivo de células en suspensión.

### 7.3.1. Fase I: Multiplicación del material vegetal

Se hizo necesario multiplicar el material vegetal de zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller), ya que las plantas con que se contaba al inicio estaban cultivadas en macetas provenientes de invernadero, su multiplicación se logró mediante la utilización de la técnica de cultivo *in vitro* y con ello se tuvo la disponibilidad suficiente de material vegetal de zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller).

### 7.3.2 Procedimientos generales realizados en la investigación

#### 7.3.2.A Medio basal

Se utilizó el medio MS desarrollado por Murashige y Skoog (24), por considerarse el más apropiado y que además es uno de los medios que ha sido utilizado en otros estudios. La composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (se presenta en el cuadro 8A).

#### 7.3.2.B pH.

El pH de los medios osciló entre 5.7 y 5.8 para que no tuviera efecto negativo de sales que permanecen solubles en el medio y para que hubiera una mejor asimilación de los nutrientes en el medio, esto fue tomado en base a estudios previos.

#### 7.3.2.C Esterilización del equipo y cristalería

La esterilización de todo el equipo y cristalería utilizada se realizó a través del autoclave, a una presión de 15 libras y una temperatura de 121 grados centígrados, por un tiempo de 20 o 30 minutos.

#### 7.3.2.D Desinfección del material vegetal

Se hizo necesario aplicar la práctica de desinfección del material vegetal y con ello asegurarse que este fuera libre de microorganismos contaminantes, lo anterior se realizó de la siguiente manera:

Se cortó el material vegetal proveniente de macetas en pequeños segmentos, se lavó durante cinco veces

con agua y jabón líquido luego se colocó el material vegetal en etanol al 70% durante dos minutos, luego de transcurrido el tiempo se trasladó a un beacker de 1000 ml que contenía hipoclorito de sodio al 20% durante 20 minutos. Inmediatamente de transcurrido el tiempo necesario se enjuagó el material vegetal con agua esterilizada dentro de la campana de flujo laminar.

#### **7.3.2.E Proceso de Siembra de explantes**

Este procedimiento estuvo restringido a la cámara de flujo laminar. Fue allí donde se sembraron los explantes de yemas, punto de retoño, nudos de tallo y hojas para lograr su multiplicación.

#### **7.3.2.F Incubación de los cultivos**

Las condiciones de incubación para la multiplicación del material vegetal fueron las siguientes: en obscuridad y dentro de la incubadora a una temperatura de 26 grados centígrados, durante tres semanas, luego en el cuarto de crecimiento con luz artificial con fotoperíodo de 16 horas y temperatura de 21 grados centígrados, durante veinte semanas.

### **7.4 Fase II: Inducción de callo**

#### **7.4.1 Finalidad de la inducción de callo**

El propósito de esta fase se hizo necesario, ya que el establecimiento del cultivo de células en suspensión requiere el uso de callos friables, según antecedentes de estudios previos, los cuales dieron origen a la suspensión de células esperada, que correspondió a la fase III.

#### **7.4.2 Diseño experimental**

La investigación se realizó bajo condiciones homogéneas de humedad, temperatura y luz dadas por la incubadora del laboratorio, razón por la cual se utilizó el diseño estadístico completamente al azar, con seis tratamientos, un testigo absoluto y diez repeticiones.

### 7.4.3 Tratamientos

Los tratamientos que se evaluaron en el estudio para establecer la inducción de callo, se presentan en el cuadro siguiente:

**Cuadro 1 Concentraciones de auxinas (ANA) y citocininas (BAP) utilizadas en el medio de cultivo basal MS (23)**

Número de Tratamientos	Tratamientos		Observaciones
	ANA (mg/l)	BAP (mg/l)	
1	0.0	0.0	Testigo
2	3.0	0.5	
3	3.0	1.0	
4	3.0	3.0	
5	5.0	0.5	
6	5.0	1.0	
7	5.0	3.0	

**Referencia:**

**ANA: Acido Naftalenacético**

**BAP: Bencil Amino Purina**

### 7.4.4 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo constituida por un frasco de cultivo de 125 ml de capacidad, donde se agregaron 25 ml de medio y se colocaron cuatro explantes por frasco. Estos explantes consistieron en hojas con peciolo. Se hicieron observaciones y conteo del número de callos friables en estas unidades experimentales; producto de esto se eliminó tres tratamientos (0:0, 5.0:0.5, y 5.0:3.0 de ANA:BAP en mg/l), por no producir suficientes callos para utilizar en la siguiente fase del estudio. Por lo que únicamente cuatro tratamientos (3.0:0.5, 3.0:1.0, 3.0:3.0 y 5.0:1.0 de ANA:BAP en mg/l), respondieron en mejor forma a la inducción de callo friable, los cuales fueron los que se utilizaron para el establecimiento del cultivo de células en suspensión fase III.

### 7.4.5 Variable evaluada

Se determinó el número de callos friables producidos por los explantes, esto se realizó en completa asepsia dentro de la campana flujo laminar.

### 7.4.6 Análisis de la información

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar si existía efecto del número de callos friables producidos por los explantes. El modelo que se utilizó para este análisis es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

donde:

$Y_{ij}$  = Número de callos friables por explante.

$\mu$  = Media general

$T_i$  = Efecto del la  $ij$ -ésima combinación hormonal

$E_{ij}$  = Error experimental asociado a la  $ij$ -ésima unidad experimental.

También se realizó la prueba múltiple de medias (Tukey 5%), para encontrar las diferencias estadísticas entre el número de callos friables producidos por los diferentes tratamientos.

### 7.4.7 Manejo del experimento

#### 7.4.7.A Preparación de medios de cultivo

La composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (23), (se presenta en el cuadro 8A), los reguladores del crecimiento y la misma preparación de los medios se realizaron en soluciones de concentración conocida (soluciones stock).

El procedimiento utilizado fue el siguiente: en un beacker de capacidad de 1000 ml se colocó 200 ml de agua destilada, luego se agregaron todas las soluciones de los componentes del medio de cultivo, posteriormente la sucrosa, agitando el medio hasta que se disolvió completamente y luego se aforó con agua destilada a 1000 ml. Después de ello se compartió en siete partes este volumen aplicando a cada uno dos niveles de auxina (ANA) y citocinina (BAP), respectivamente (ver cuadro 1). A cada uno de los recipientes se les determinó el pH, el cual se ajustó a un rango entre 5.7 y 5.8 con ácido clorhídrico 0.01 N ó con hidróxido de sodio 0.01 N. También se aplicó 2 gramos de phytigel por cada 1000 ml de medio. El medio fue calentado para facilitar la disolución del phytigel en el microondas, durante 12 minutos y posteriormente se esterilizó el medio de cultivo en el autoclave a 121 grados centígrados y a una presión de 15 p.s.i. por 30 minutos.

#### 7.4.7.B Siembra de explantes para la inducción de callo

Se realizó dentro de la campana de flujo laminar, utilizando el explante hoja con peciolo. Cada unidad experimental estuvo constituida por un frasco de cultivo conteniendo 25 ml de medio, colocando en cada una de ellos cuatro explantes por unidad experimental, cada tratamiento y sus repeticiones fueron debidamente identificados, luego se transfirieron a la incubadora del laboratorio.

#### 7.4.7.C Condiciones de incubación

Todos los tratamientos y sus repeticiones se trasladaron a la incubadora del laboratorio para la inducción de callo bajo las siguientes condiciones: a una temperatura de 26 grados centígrados, durante ocho semanas hasta que se hizo aparente la formación de callo.

### 7.5 Fase III: Establecimiento del cultivo de células en suspensión

El propósito de esta fase fue estudiar el comportamiento celular de la zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller), para que con ello se pueda llegar a la obtención de compuestos activos.

Para un establecimiento según Szabados (29), el mejor inóculo para la iniciación de cultivos celulares es sin duda un callo friable con un alto ritmo de división celular. Los cultivos celulares consistieron en pequeños agregados celulares distribuidos en el medio MS (Murashige y Skoog) en fase líquida en constante movimiento. El movimiento del tejido en relación al medio nutritivo facilitó el intercambio gaseoso, removiendo cualquier polaridad del tejido debido a la gravedad y eliminando los gradientes de nutrientes dentro del medio y en la superficie de las células.

La técnica desarrollada en esta práctica consistió en que callos de zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller) fueron suspendidos en un medio de cultivo líquido y sujetos a una serie de manipulaciones, para asegurar la producción de células creciendo en forma activa.

#### 7.5.1 Diseño experimental

Debido a que esta fase de la investigación también se desarrolló bajo condiciones homogéneas de humedad, luz y temperatura dadas por el cuarto de crecimiento, el diseño experimental utilizado fue el completamente al azar con tres tratamientos (provenientes de la fase II) un testigo absoluto y diez repeticiones.

## 7.5.2 Tratamientos

Para establecer el tratamiento más adecuado para el cultivo de células en suspensión se procedió a seleccionar los cuatro mejores tratamientos que después de ocho semanas de cultivo, presentaron callos friables o esponjosos, provenientes de la fase II, de esta manera pasaron a esta etapa la cual consistió de un subcultivo en fase líquida. En el cuadro 2 se presentan los tratamientos evaluados en el cultivo de células en suspensión.

**Cuadro 2 Concentraciones de auxinas (ANA) y citocininas (BAP) para establecer el cultivo de células en suspensión**

Número de Tratamientos	Tratamientos		Observaciones
	ANA (mg/l)	BAP (mg/l)	
1	0.0	0.0	Testigo
2	3.0	0.5	
3	2.0	1.0	
4	3.0	3.0	

**Referencia:**

**ANA: Acido Naftalenacético**

**BAP: Bencil Amino Purina**

## 7.5.3 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo constituida por un erlenmeyer de 250 ml de capacidad conteniendo 50 ml de medio de cultivo en fase líquida, y de 1.0 a 1.5 gramos de callo friable. De los cuatro tratamientos y diez repeticiones resultaron las 40 unidades experimentales utilizadas.

## 7.5.4 Estudio de la cinética de la multiplicación celular en suspensión

El propósito de estudiar la cinética de la multiplicación celular fue el comprender el comportamiento que las células de zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller), mostraron al transcurrir el tiempo de incubación. Los tratamientos que en la inducción de callo (fase II) presentaron mayor número de callos friables o esponjosos fueron los que se utilizaron como fuente de células y con ello se pudo determinar el comportamiento de los eventos involucrados en el proceso; es decir, las fases definidas del crecimiento celular siendo éstas: de retraso, exponencial, lineal, de desaceleración y estacionaria.

### 7.5.5 Variables de respuestas evaluadas

Las variables que se evaluaron para el establecimiento del cultivo de células en suspensión de zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller) fueron las siguientes:

- Número de células por ml
- Volumen de sedimentación de células por unidad de volumen

### 7.5.6 Forma de medir las variables evaluadas

#### 7.5.6.A Número de células por ml

1. En la campana de flujo laminar se tomaron muestras de un centímetro cúbico de cada unidad experimental, esto se realizó con una pipeta de un centímetro cúbico esterilizada, esta muestra fue colocada en un tubo de ensayo debidamente identificado.
2. De la muestra obtenida se colocó una gota en la cámara de Newbauer o hematocímetro, la cual tiene una capacidad de 0.01 microlitros y con la ayuda de un microscopio se realizó el conteo del número de células en el volumen conocido y se extrapoló para un centímetro cúbico mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Número células por ml} = \frac{P}{0.01 \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1000 \text{ ml}}$$

donde P es el promedio del número de células contadas por campo; se realizaron 5 muestreos con un intervalo de tiempo de 5 días entre cada uno.

#### 7.5.6.B Volumen de sedimentación de células por unidad de volumen

1. En la campana de flujo laminar se tomaron muestras de 5 centímetros cúbicos de cada unidad experimental, esto se realizó utilizando una pipeta de 5 centímetros cúbicos esterilizada, esta muestra fue colocada en un tubo de ensayo debidamente identificado.
2. La muestra obtenida fue centrifugada a 2000 revoluciones por minuto durante 5 minutos, se registró el volumen que ocuparon las células que sedimentaron. Se calculó el porcentaje que representaba el volumen total. Lo anterior fue realizado durante 5 muestreos con un intervalo de tiempo de 5 días entre cada uno.

### 7.5.7 Análisis de la información

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar si existía efecto del número de células por mililitro. El modelo que se utilizó para este análisis es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

donde:

$Y_{ij}$  = Número de células por ml de cultivo

$\mu$  = media general

$T_i$  = Efecto del  $ij$ -ésimo tratamiento

$E_{ij}$  = Error experimental asociado a la  $ij$ -ésima unidad experimental.

También se realizó un análisis de varianza para el volumen de sedimentación de células por unidad de volumen; el modelo que se utilizó es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

donde:

$Y_{ij}$  = Volumen de sedimentación de células por unidad de Volumen

$\mu$  = media general

$T_i$  = Efecto del  $ij$ -ésimo tratamiento

$E_{ij}$  = Error experimental asociado a la  $ij$ -ésima unidad experimental.

Además se realizaron pruebas múltiples de medias (Tuckey 5%), para encontrar las diferencias estadísticas entre el número de células por mililitro de cada tratamiento así como para encontrar diferencias estadísticas entre el volumen de sedimentación de células por unidad de volumen producido por cada tratamiento.

## **7.5.8 Manejo del experimento**

### **7.5.8.A Preparación de medios**

Este procedimiento fue similar al que se utilizó para la preparación de medios, en la fase de inducción de callo del presente trabajo, con las diferencias siguientes: se preparó cultivo en fase líquida y por lo tanto no se le agregó agar (phytagel), se esterilizó en el autoclave directamente en los erlenmeyers, por supuesto conteniendo las auxinas (ANA) y citocininas (BAP) en su respectiva concentración.

### **7.5.8.B Procedimiento de siembra**

Los callos fueron segmentados y disgregados en una caja petri con la ayuda de un bisturí, posteriormente con una pinza la masa callosa fue colocada dentro de los erlenmeyers que contenía el medio de cultivo líquido previamente preparado, estos se taparon con papel aluminio para lograr un buen aislamiento de contaminante. Este proceso se realizó en completa asepsia dentro de la campana de flujo laminar.

### **7.5.8.C Condiciones de incubación**

Los erlenmeyers que contenían las células fueron forrados en su exterior con papel aluminio con el propósito de incubarlos en obscuridad en el cuarto de crecimiento a 21 grados centígrados, en constante agitación a 100 revoluciones por minuto durante 22 días.

### **7.5.8.D Elaboración de la curva que describe el crecimiento celular de la zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller)**

El propósito de la elaboración de la curva de crecimiento celular de la zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller), fue comprender el paso de las células en suspensión por varias fases antes de llegar al decrecimiento, ya sea por causa del agotamiento de nutrientes del medio o bien por la presencia de algún metabolito tóxico y con ello poder determinar la cantidad inicial así como la cantidad final de células a través del

tiempo de incubación.

Para la elaboración de la curva típica del crecimiento se procedió de la siguiente manera: se tomaron 5 muestreos por cada tratamiento, cada muestreo fue realizado en un intervalo de cinco días determinándose así el comportamiento del número de células por mililitro de cada tratamiento, mediante el uso de siete modelos matemáticos utilizados como base y eligiéndose el que mejor se ajustó, se procedió a la elaboración de la curva de crecimiento celular de la zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Fase de inducción de callo:

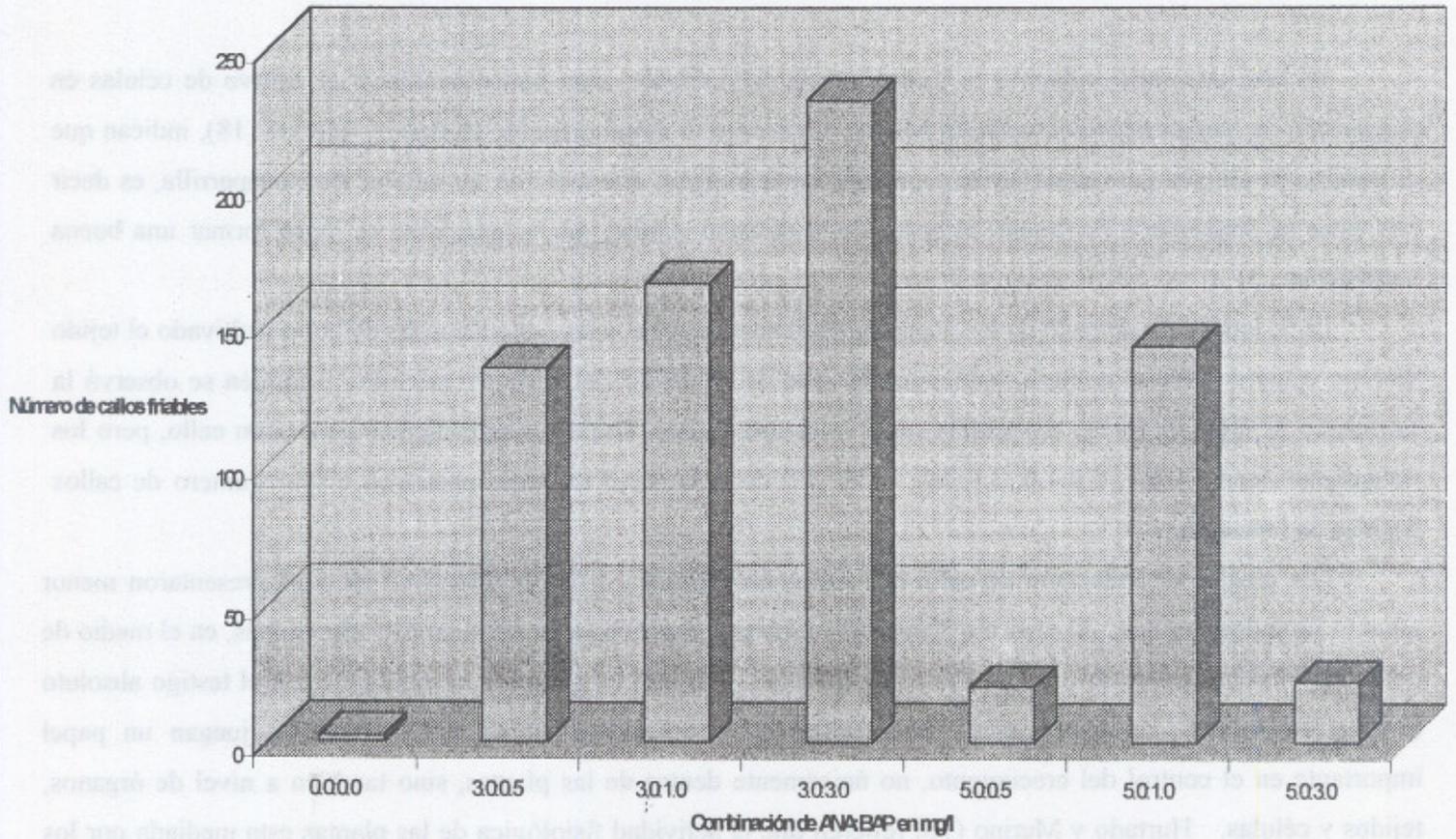
Se hizo necesario inducir a la formación de callo friable, para poder establecer el cultivo de células en suspensión de *Smilax aristolochiaefolia* Miller. En cuanto al término friable Hurtado y Merino (18), indican que el término se emplea para describir la capacidad de separación que tuvieron las células de zarzaparrilla, es decir que estas se disgregaron fácilmente después de la división celular, por consiguiente se logró formar una buena suspensión.

En la inducción de callo de los siete tratamientos iniciales, a las ocho semanas de haber cultivado el tejido de hoja empezó a ser aparente la inducción de callo de alrededor del corte del pecíolo. También se observó la formación de callo en forma esporádica sobre la lamina foliar. Todos los tratamientos generaron callo, pero los tratamientos con 3.0:0.5, 3.0:1.0, 3.0:3.0, y 5.0:1.0 de ANA:BAP en mg/l mostraron mayor número de callos friables en formación.

Los medios de inducción de callo que contenían 5.0:0.5 y 5.0:3.0 ANA:BAP en mg/l presentaron menor número de callos friables. Al respecto Thorpe (32) sostiene que el balance de auxinas y citocininas, en el medio de cultivo determina la formación y proliferación de callo. Los seis tratamientos comparados con el testigo absoluto (0.0:0.0 ANA:BAP) mostraron una clara evidencia, que los reguladores del crecimiento juegan un papel importante en el control del crecimiento, no únicamente dentro de las plantas, sino también a nivel de órganos, tejidos y células. Hurtado y Merino (18) refieren que la actividad fisiológica de las plantas esta mediada por los reguladores del crecimiento.

Los siete tratamientos evaluados, respondieron a la inducción de callos friables pero los siguientes cuatro tratamientos 3.0:3.0, 3.0:1.0, 5.0:1.0 y 3.0:0.5 ANA:BAP en mg/l; lo hicieron con un mayor número de callos producidos con respecto a los otros tres tratamientos 5.0:0.5, 5.0:3.0; y el testigo 0.0:0.0 ANA:BAP en mg/l. Por lo tanto el número de callos producidos fue superado por los cuatro tratamientos antes mencionados, en el cuadro 4 se presentan los tratamientos de acuerdo a las medias obtenidas en la producción de callo friable.

Después de someter los datos de número de callo inducido, a un análisis de varianza se encontró diferencia significativa del número de callos producidos por cada tratamiento. En el apéndice se muestra el resumen del análisis de varianza.



**Figura 1** Efecto de las auxinas y citocininas en la producción del número de callos friables.

**CUADRO 3 Respuesta a la inducción de callo, medias obtenidas por el análisis de varianza para el número de callos friables formados.**

Tratamientos		Medias del número de callos friables formados	Tukey 0.05%
ANA mg/l	BAP mg/l		
3.0	3.0	22.6	A
3.0	1.0	15.3	B
5.0	1.0	14.2	B
3.0	0.5	13.4	B
5.0	0.5	2.6	C
5.0	3.0	2.2	C
0.0	0.0	0.2	C

Según la prueba de Tukey (5%), el tratamiento superior estadísticamente con relación a la formación de callos friables; fue la combinación ANA:BAP de 3.0:3.0 en mg/l, los tratamientos 3.0:1.0, 5.0:1.0, y 3.0:0.5, se encuentran por debajo del tratamiento 3.0:3.0 con una diferencia significativa de 7.3, 8.4 y 9.2 callos por ml respectivamente. En cuanto a los tratamientos 5.0:0.5, 5.0:3.0, y 0:0 ANA:BAP en mg/l (testigo), la inducción de callo se comportó, muy por debajo en relación al tratamiento 3.0:3.0 y a la vez por debajo de los tratamientos 3.0:1.0, 5.0:1.0 y 3.0:0.5 ANA:BAP en mg/l.

## 8.2 Fase de cultivo de células en suspensión

Para Villalobos (35), el establecimiento de los cultivos en suspensión depende en gran medida del grado de disgregabilidad (friabilidad o esponjosidad) del callo y mediante una agitación continua, que las células se separan del tejido, formando la suspensión constituida por células de zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller). Se pudo haber utilizado explantes primarios de tejidos diferenciados de zarzaparrilla (*S. aristolochiaefolia* Miller), para el establecimiento de la suspensión celular, pero como lo manifiesta Villalobos (35), que hubiese sido más lento y con un alto riesgo de contaminación.

### 8.2.1 Número de células por mililitro

El cultivo de suspensiones celulares a partir de los callos friables formados a las ocho semanas después de sembrarse; fueron los que se utilizaron para encontrar el efecto de la cantidad inicial de células en los tratamientos sobre la cantidad final, mediante el ANDEVA realizado se encontraron diferencias entre los tratamientos, evidenciándose que los 4 tratamientos se comportaron estadísticamente iguales como se observa en el cuadro siguiente.

**CUADRO 4 Comportamiento de multiplicación celular de la zarzaparrilla en los cultivos en suspensión.**

Tratamientos		Número de células/ml		Medias del número de células	
ANA mg/l	BAP mg/l	Inicial	Final	Inicial	Final
1.0	0.5	190000	1110000	19000	111000
2.0	1.0	200000	1090000	20000	109000
3.0	3.0	220000	1100000	22000	110000
0.0	0.0	160000	1160000	16000	116000

El comportamiento similar de los tratamientos tiene mucha importancia, ya que se puede llegar a establecer un cultivo de células de zarzaparrilla sin utilizar reguladores del crecimiento, además se puede decir que el no aplicar regulador del crecimiento supera en el contenido del número de células a los tratamientos en los cuales se utilizan reguladores con las características fuertes de auxina y citocinina como el ANA y el BAP respectivamente. Weaver (37), reporta que se debe considerar que estos compuestos son poco estables en la luz y por lo tanto es muy posible que dichos reguladores se hayan desintegrado rápidamente. En consecuencia esta puede ser la razón del por qué el testigo (0.0:0.0) ANA:BAP en mg/l superó a los otros tratamientos. En el apéndice se muestra el análisis de varianza.

Hurtado y Merino (18), reportan que no es necesario utilizar reguladores del crecimiento en las suspensiones celulares, porque de esta forma también se obtienen resultados satisfactorios, ya que se supone que las células crecen en forma natural.

Durante el crecimiento de las suspensiones celulares existen fases que son reconocibles, que se pretenden describir; en el día 2 al día 7 se tuvo poco incremento en el número de células por mililitro, aquí se consideró que las células estaban en fase de adaptación a las condiciones del medio; luego del día 7 al 17 se mostró un incremento rápido y considerable, donde se dice que las células entraron a la fase exponencial y lineal, es aquí donde se evidencia la división celular continua y muy activa, provocando que en pocos días la cantidad de células

crezca en forma exponencial, luego el número de células crece proporcionalmente al tiempo transcurrido observándose la fase lineal; se manifestó una última fase, del día 17 al 22 en el tiempo transcurrido; en la cual se tuvo una ligera disminución del número de células y es aquí donde se dice que las células en suspensión entraron a una fase estacionaria, fase en la cual la división celular se reduce en este caso producida por agotamiento de algún nutriente en el medio o la acumulación de algún desecho celular que en cantidades altas se vuelve tóxico, o lo que se considera más probable la ocurrencia de las dos causas.

Para tener una mejor comprensión del comportamiento de los tratamientos en el crecimiento celular obsérvese la figura 2.

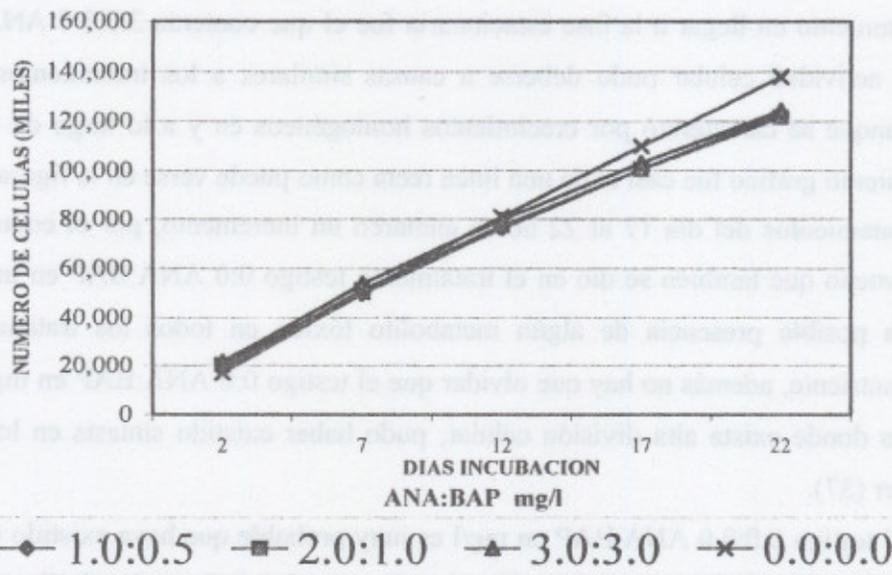


Figura 2 Efecto de las auxinas y citocininas sobre la multiplicación celular, *in vitro* de zarzaparrilla.

### 8.2.2 Comportamiento gráfico de la multiplicación celular

En base a la curva teórica del crecimiento de una suspensión celular es necesario discutir como afectan los reguladores del crecimiento tipo auxina y citocinina, ya que según Hurtado y Merino (18) ambos compuesto promueven la división celular.

Se observó que las auxinas reducen el tiempo de adaptación de las células al medio de cultivo, esto se debe a que las auxinas son estimuladoras del crecimiento celular (división y aumento de tamaño del volumen).

Al parecer el tratamiento 3.0:3.0 ANA:BAP en mg/l es el más efectivo en estimular la temprana división celular, porque de los cuatro tratamientos es el que presentó un mayor incremento en la fase de reposo (del día 2

al día 7). Sin embargo, el tratamiento testigo 0.0:0.0 ANA:BAP también fue efectivo a partir del día 7 reflejando el aumento en el número de células logrado por este tratamiento entre el día 7 al 22.

Los tratamientos 1.0:0.5, y 2.0:1.0 ANA:BAP en mg/l mostraron una división celular temprana, muy por encima del tratamiento testigo 0.0:0.0 ANA:BAP en mg/l, pero al transcurrir los días 7, 12, 17 y 22, los superó el tratamiento 3.0:3.0 y aún por debajo los superó el tratamiento testigo 0.0:0.0. Estos últimos dos tratamientos (3.0:3.0, 0:0, ANA:BAP en mg/l) se caracterizaron por crecer con rapidez en todas las fases del día 2 al 22 la explicación a esta actividad celular sucedida a los tratamientos 1.0:0.5 y 2.0:1.0 ANA:BAP en mg/l es que pudo haberse provocado alguna acumulación de productos tóxicos o agotamiento de algún nutriente en el medio, el cual pudo haber provocado una baja actividad celular.

El segundo tratamiento en llegar a la fase estacionaria fue el que contenía 3.0:3.0 ANA:BAP en mg/l, el estacionamiento de la actividad celular pudo deberse a causas similares a los tratamientos 1.0:0.5 y 2.0:1.0 ANA:BAP en mg/l; aunque se caracterizó por crecimientos homogéneos en y a lo largo de todo el período de cultivo. Su comportamiento gráfico fue casi el de una línea recta como puede verse en la figura 2.

En todos los tratamientos del día 17 al 22 no se enmarcó un incremento, por el contrario el número de células se redujo, fenómeno que también se dio en el tratamiento testigo 0:0 ANA:BAP en mg/l, este fenómeno refuerza la idea de la posible presencia de algún metabolito tóxico en todos los tratamientos, o bien del agotamiento de algún nutriente, además no hay que olvidar que el testigo 0:0 ANA:BAP en mg/l estuvo en forma natural y que en zonas donde exista alta división celular, pudo haber existido síntesis en los tejidos vegetales como lo reporta Weaver (37).

Por lo que en el testigo 0.0:0.0 ANA:BAP en mg/l es muy probable que haya existido presencia del algún compuesto natural, proveniente de la fase de inducción de callo. La figura 5 en el apéndice muestra el resumen gráfico de la multiplicación celular en el tiempo de incubación.

Para Dodds y Roberts (8) y Hurtado y Merino (18), la mayoría de los cultivos en suspensión, alcanzan su máxima división celular entre los 18 y 25 días; aunque pueden existir cultivos extremadamente activos que alcanzan su máxima densidad celular entre los 6 y 9 días.

En todos los cultivos de células establecidas fue posible observar una gran diversidad de células en tamaño lo cual puede ser indicio de lo mutagénico que resulta la aplicación de auxinas y citocininas a los medios utilizados, esta técnica tal como la ha reportado Eferson (10). Esto puede deberse a la alta cantidad de divisiones celulares en forma continúa lo que sin duda alguna aumenta la probabilidad que se de una mutación, la cual puede llegar hasta la alteración del número cromosómico completo fenómeno conocido como poliploidía.

En el cuadro 6 se presentan los modelos de crecimiento celular para el número de células que fueron evaluados para cada tratamiento. Puede observarse que para cada tratamiento, el modelo matemático que se ajustó fue el logarítmico; considerando para el efecto sus diferentes estimadores; es decir coeficientes de

determinación ( $R^2$ ) altos (que varían entre 0.9690 a 0.9859), lo cual indica que la mayor variabilidad de los datos es explicada por el modelo. Además, se tienen coeficientes de variación (CV) y cuadrado medio del error (CME) bajos lo que indica un adecuado ajuste.

**CUADRO 5 Modelos matemáticos generados para establecer la curva del crecimiento celular, basado en el número de células en suspensión.**

MODELO CUADRATICO				
TRATAMIENTOS		C.M.E	C.V	$R^2$
ANA mg/l	BAP mg/l			
1	0.5	127857142.86	15.28	0.96
2	1	74457142.86	11.63	0.98
3	3	135914285.71	15.14	0.96
0	0	77028571.43	11.14	0.98
MODELO RAIZ CUADRADA				
TRATAMIENTOS		C.M.E	C.V	$R^2$
ANA mg/l	BAP mg/l			
1	0.5	188867136.93	18.57	0.95
2	1	125951899.43	15.13	0.96
3	3	224638593.98	19.46	0.93
0	0	153501421.89	15.72	0.96
MODELO SEMILOGARITMICO				
TRATAMIENTOS		C.M.E	C.V	$R^2$
ANA mg/l	BAP mg/l			
1	0.5	224593380.66	20.25	0.90
2	1	146513281.50	16.31	0.93
3	3	212739535.80	18.94	0.91
0	0	154175215.98	15.76	0.94
MODELO LINEAL				
TRATAMIENTOS		C.M.E	C.V	$R^2$
ANA mg/l	BAP mg/l			
1	0.5	173833333.33	17.82	0.93
2	1	150233333.33	16.52	0.93
3	3	235466666.67	19.93	0.90
0	0	231566666.67	19.31	0.91
MODELO GEOMETRICO				
TRATAMIENTOS		C.M.E	C.V	$R^2$
ANA mg/l	BAP mg/l			
1	0.5	0.09706	2.83	0.87
2	1	0.09841	2.84	0.86
3	3	0.09776	2.82	0.85
0	0	0.17476	3.77	0.82
MODELO GAMA				
TRATAMIENTOS		C.M.E	C.V	$R^2$
ANA mg/l	BAP mg/l			
1	0.5	0.02439	1.42	0.98
2	1	0.01293	1.03	0.99
3	3	0.03050	1.57	0.97
0	0	0.01000	0.90	0.10
MODELO LOGARITMICO				
TRATAMIENTOS		C.M.E	C.V	$R^2$
ANA mg/l	BAP mg/l			
1	0.5	0.01627	1.16	0.98
2	1	0.00972	0.89	0.99
3	3	0.02066	1.30	0.97
0	0	0.01707	1.18	0.98

**Referencia:** C.M.E. Coeficiente medio del error, C.V. Coeficiente de variación,  $R^2$ :coeficiente de determinación

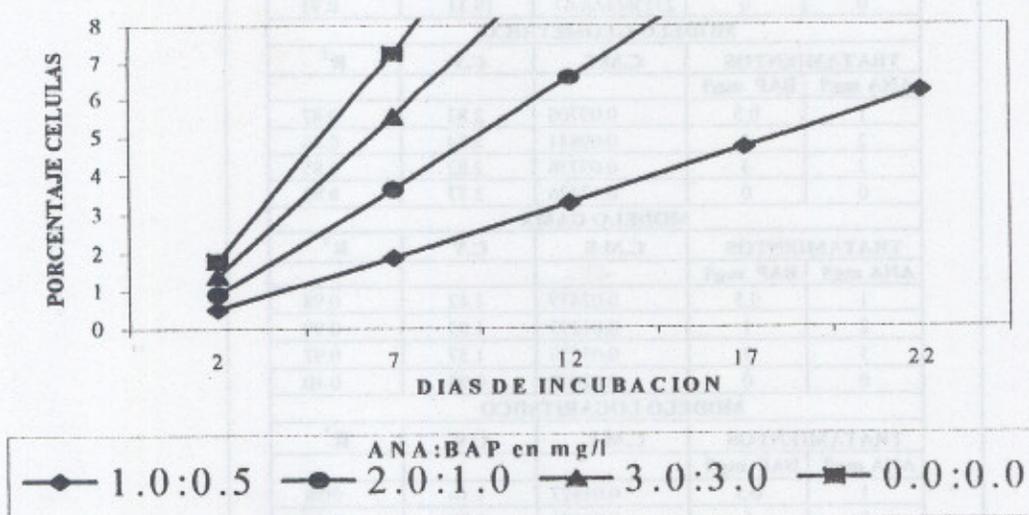
Otro parámetro cuantitativo que se utilizó para determinar el crecimiento celular fue el volumen total ocupado por las células (PCV) en una alícuota conocida del cultivo según lo describe Hurtado y Merino (18), tomándose alícuotas conocidas periódicamente, a partir de cultivos en suspensión; para encontrar el efecto del porcentaje inicial de células en los tratamientos sobre el porcentaje final, mediante el análisis de varianza. Posteriormente se les aplicó la prueba de Tukey (5%), con el propósito de encontrar diferencias entre los tratamientos como se observa en el cuadro 6.

**Cuadro 6 Comportamiento de la multiplicación celular de la zarzaparrilla en cultivos en suspensión.**

Tratamientos		Porcentaje de células/5 ml		Medias del porcentaje de células	
ANA mg/l	BAP mg/l	Inicial	Final	Inicial	Final
1.0	0.5	4.5	49.5	0.45	4.95
2.0	1.0	3.6	50.5	0.36	5.05
3.0	3.0	4.3	51.0	0.43	5.00
0.0	0.0	3.3	51.1	0.33	5.11

El comportamiento similar de los diferentes tratamientos evaluados indica que no se necesita utilizar reguladores del crecimiento para incrementar el porcentaje de células en cultivos de suspensiones celulares de zarzaparrilla; ya que el no aplicar reguladores del crecimiento superó el contenido del porcentaje de células comparado con los tratamientos en los cuales si se utilizó reguladores de crecimiento; y por la misma razón que Weaver (37) considera que estos compuestos son poco estable en la luz y por lo tanto es muy posible que dicho reguladores se hayan desintegrado rápidamente.

Es por ello que el testigo (0.0:0.0) ANA:BAP en mg/l superó a los otros 3 tratamientos 1.0:0.5, 2.0:1.0, 3.0:3.0 ANA:BAP en mg/l, en el porcentaje final de células. En el apéndice se muestra el resumen del análisis de varianza.



**Figura 3 Efecto de las auxinas y citocininas en la multiplicación de células, en cultivos en suspensión de zarzaparrilla.**

El volumen del paquete de células (PCV); como se le conoce se incrementó rápidamente también a partir de los 2 días de cultivo como muestra la figura 4, después de ese tiempo ocurren incrementos acelerados en el volumen del paquete de células expresado en porcentaje, los cuales se mantiene hasta los 17 días, así se duplicó el porcentaje de células de la suspensión manifestado en una forma logarítmica en un tiempo de 3-5 días.

Para comprobar el comportamiento del volumen del paquete de células expresado en porcentaje (PCV), fue necesario evaluar siete modelos matemáticos, y el que mejor se adaptó al comportamiento fue el modelo logarítmico. En el cuadro 8 se presentan los modelos de crecimiento en porcentaje de células que fueron evaluados para cada tratamiento. Puede observarse que para cada tratamiento, el modelo matemático que se ajustó fue el logarítmico; considerando para el efecto sus diferentes estimadores; es decir coeficientes de determinación ( $R^2$ ) altos (que varían entre 0.9890 a 0.9993), lo cual indica que la mayor variabilidad de los datos es explicada por el modelo. Además, se tienen coeficientes de variación (CV) y cuadrado medio del error (CME) bajos lo que indica un adecuado ajuste del modelo matemático.

MODELO LOGARÍTMICO			
TRATAMIENTO	CME	CV	R <sup>2</sup>
1	0.0000	0.0000	0.9993
2	0.0000	0.0000	0.9890
3	0.0000	0.0000	0.9993
4	0.0000	0.0000	0.9993
5	0.0000	0.0000	0.9993
6	0.0000	0.0000	0.9993
7	0.0000	0.0000	0.9993
MODELO GOMPERTZ			
TRATAMIENTO	CME	CV	R <sup>2</sup>
1	0.0000	0.0000	0.9993
2	0.0000	0.0000	0.9890
3	0.0000	0.0000	0.9993
4	0.0000	0.0000	0.9993
5	0.0000	0.0000	0.9993
6	0.0000	0.0000	0.9993
7	0.0000	0.0000	0.9993
MODELO GAMA			
TRATAMIENTO	CME	CV	R <sup>2</sup>
1	0.0000	0.0000	0.9993
2	0.0000	0.0000	0.9890
3	0.0000	0.0000	0.9993
4	0.0000	0.0000	0.9993
5	0.0000	0.0000	0.9993
6	0.0000	0.0000	0.9993
7	0.0000	0.0000	0.9993
MODELO LOGARÍTMICO			
TRATAMIENTO	CME	CV	R <sup>2</sup>
1	0.0000	0.0000	0.9993
2	0.0000	0.0000	0.9890
3	0.0000	0.0000	0.9993
4	0.0000	0.0000	0.9993
5	0.0000	0.0000	0.9993
6	0.0000	0.0000	0.9993
7	0.0000	0.0000	0.9993

**CUADRO 7 Modelos matemáticos generados para establecer la curva del crecimiento celular, basados en el porcentaje de células en suspensión.**

MODELO CUADRATICO				
TRATAMIENTOS		C.M.E	C.V	R <sup>2</sup>
ANA mg/l	BAP mg/l			
1	0.5	0.09522	7.83	0.98
2	1	0.00481	1.69	0.10
3	3	0.04810	1.67	0.10
0	0	0.02888	4.16	0.10
MODELO RAIZ CUADRADA				
TRATAMIENTOS		C.M.E	C.V	R <sup>2</sup>
ANA mg/l	BAP mg/l			
1	0.5	0.16167	10.21	0.97
2	1	0.00372	1.49	0.10
3	3	0.03440	4.47	0.10
0	0	0.07508	6.71	0.99
MODELO SEMILOGARITMICO				
TRATAMIENTOS		C.M.E	C.V	R <sup>2</sup>
ANA mg/l	BAP mg/l			
1	0.5	0.15947	10.14	0.44
2	1	0.25210	12.24	0.92
3	3	0.19288	10.58	0.93
0	0	0.15219	9.54	0.95
MODELO LINEAL				
TRATAMIENTOS		C.M.E	C.V	R <sup>2</sup>
ANA mg/l	BAP mg/l			
1	0.5	0.36761	15.39	0.86
2	1	0.59102	18.74	0.80
3	3	0.47772	16.64	0.83
0	0	0.40164	15.51	0.86
MODELO GEOMETRICO				
TRATAMIENTOS		C.M.E	C.V	R <sup>2</sup>
ANA mg/l	BAP mg/l			
1	0.5	0.03879	14.96	0.84
2	1	0.06646	19.06	0.76
3	3	0.04932	16.19	0.79
0	0	0.04355	15.43	0.82
MODELO GAMA				
TRATAMIENTOS		C.M.E	C.V	R <sup>2</sup>
ANA mg/l	BAP mg/l			
1	0.5	0.01533	9.41	0.94
2	1	0.03207	13.24	0.88
3	3	0.02192	10.79	0.91
0	0	0.01761	9.81	0.93
MODELO LOGARITMICO				
TRATAMIENTOS		C.M.E	C.V	R <sup>2</sup>
ANA mg/l	BAP mg/l			
1	0.5	0.00532	5.54	0.99
2	1	0.00018	0.98	0.10
3	3	0.00034	1.35	0.10
0	0	0.00156	2.92	0.10

Referencia: C.M.E. Coeficiente medio del error, C.V. Coeficiente de variación, R<sup>2</sup>:coeficiente de determinación

## 9. CONCLUSIONES

De los objetivos planteados y la metodología de trabajo para el efecto en el presente estudio, se puede resaltar las siguientes conclusiones:

1. Con la aplicación de diferentes combinaciones de auxinas y citocininas en concentraciones medias es posible obtener respuesta adecuada a la inducción de callo, cuando tejido foliar con peciolo de zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller), es cultivado en el medio nutritivo.
2. Inoculando las células no diferenciadas en la fase anterior en cultivos líquidos bajo agitación se promueve la división celular sin necesidad de utilizar reguladores del crecimiento.
3. La máxima división celular, de la zarzaparrilla se presenta entre los primeros doce días de cultivo.

## 10. RECOMENDACIONES

1. Para obtener una buena formación de callo, se deben utilizar concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) de 3 a 5 mg/l y de bencil amino purina (BAP) de 1 a 3 mg/l utilizando la hoja de zarzaparrilla *Smilax aristolochiaefolia* Miller, como explante.
2. Para inducir la formación de callo es necesario evaluar otras concentraciones de auxinas como citocininas y con ello poder establecer un balance adecuado de ambos reguladores del crecimiento.
3. Para el cultivo de células en suspensión se deben realizar subcultivos a partir del día 17 y con ello poder evitar que los medios se agoten o contaminen; o bien que las células en suspensión se mueran.
4. Aprovechar los cultivos celulares de zarzaparrilla *Smilax aristolochiaefolia* Miller, a partir del día 7 al 17, ya que estos presentan su máxima actividad celular y por ende la concentración de vacuolas, lugar donde se localizan los metabolitos secundarios.
5. Este es un modelo que debe de ser aprovechado, para investigar la regeneración de plantas de *Smilax aristolochiaefolia* Miller, partiendo de callos o bien agregados celulares, para hacer un aporte significativo en la mejora genética de la zarzaparrilla *Smilax aristolochiaefolia* Miller.

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. AGUILAR, M.E. 1988. Cultivo de tejidos en café, cacao y plátano. Turrialba, Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 60 p.
2. AHSAN, S.K. 1989. Studies on some herbal drugs used in fracture healing. Alemania, Pharmazie. p.235-239
3. AMADOR, P.D. 1995. Micropropagación y análisis de la relación taxonómica de dos especies de zarzaparrilla (*Smilax* sp), utilizando marcadores RAPD's. Tesis Mag. Sc. Irapuato, Guanajuato, México, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. 119 p.
4. BAEZ, E.; SANCHEZ, M.; CASTILLO, R. 1998. Sistema automatizado para el conteo y clasificación de células en suspensiones celulares de caña de azúcar. La Habana, Cuba, UNICA. 37 p.
5. CACERES, A. 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala, Editorial. Universitaria. 420 p.
6. CALDERON, G.; RZEDOWSKI, J.R. 1994. Familia Smilacaceae En: Flora del Bajío y de regiones adyacentes. 1994. Ed: Rzedowski J. y Calderón G. México, Continental. v. 26, 748 p.
7. CASTILLO, R. 1998. Establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas en variedades comerciales de caña de azúcar. La Habana, Cuba, UNICA. 62-72 p.
8. DODDS J. ; ROBERTS, L. 1985. Experiments in plant tissue culture. New York, EE.UU, Cambridge University Press. 224 p.
9. DUKE, J. 1985. Handbook of medicinal herbs. Boca Ratón, Florida, EE.UU; CRC Press. 446 p.
10. EFFERSON, N.J. 1987. Biotecnología la nueva revolución verde. Agricultura de las Américas (EE.UU.) 3(36):20-25.
11. EVANS, W.C. 1989. Tratado de Farmacognosía. México, Interamericana. p.488- 489 .
12. FARNSWORTH, N.R. 1997. Natural products alert data base; the board of Trustees of the University of Illinois. Chicago, Illinois, EE.UU. 545 p.
13. GENEFLOW, V. 1992. Biodiversidad y recursos fitogenéticos. Trad. Javier Fernández. Ed. Ruth Raymond. Roma, Italia, Stanford. 20 p.
14. GIRON, L.M. 1996. Situación de la industria fitofarmacéutica en Guatemala. En Reunión de Coordinación Internacional, Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos. (1., 1996, Antigua, Guatemala). Memorias. Guatemala, CYTED. p.149-155
15. HERMAN, E.B. 1995. Recent aduan in plant tissue culture, III regeneration and micropropagation, Techniques Systems and Media. Taiwan, Agritech Consultants, Shrub Oak. 173 p.

16 THORPE, T.A. 1981. Plant tissue culture methods and applications in agriculture. New York, EE.UU., Academic Press. 300 p.

17 TSCHESCHKE, R.; LUDKE, G.; WULF, G. 1969. *Sarcosandra* y otros géneros de la familia *Ericaceae*. Cultivo de tejidos y regeneración de plantas. *Revista de Biología y Geología* (EE.UU.) no. 10:123-126.

18 VASQUEZ, J. 1983. Cultivo de tejidos en arroz (*Oryza sativa* L.) inducción de callos y regeneración de plantas. *Arroz (Col)* no. 32:26-30.

19 HURTADO, S.M.; MERINO, M.E. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, *Revista de Biología y Geología* (Col) no. 32:26-30.

20 VILLALOBOS, V.M. 1986. Fundamentos teóricos y prácticos de cultivos de tejidos vegetales. *Revista de Biología y Geología* (Col) no. 32:26-30.

21 LOZOYA, H. 1990. Fundamentos teórico-práctico del cultivo de tejidos vegetales. *Revista de Biología y Geología* (Col) no. 32:26-30.

22 WAGNER, H.; BACHT, S.; ZYANISKA, E.M. 1988. *Plant tissue culture*. Ed. por Thomas A. Scott. Berlin, Springer, 643 p.

23 MONARD, N. 1991. Primera y segunda y tercera y cuarta edición de la *Enciclopedia de la agricultura*. *Revista de Biología y Geología* (Col) no. 32:26-30.

24 WEAVER, R.J. 1976. *Regeneración del crecimiento de las plantas en la agricultura*. *Revista de Biología y Geología* (Col) no. 32:26-30.

25 WREN, R.C. 1988. *Enciclopedia de medicina herbolaria*. Ed. por Edwin Moller, México, *Revista de Biología y Geología* (Col) no. 32:26-30.

26 MURASHIGE, T.; SKOOG, G.; MORTON, J.F. 1962. A revised medium for rapid growth and high yield of tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* (EE.UU.) no. 15:473-497.

27 PRICE, J.; DYSON, J.T.; FENWICK, G.R. 1987. The chemistry and biological significance of secondary metabolites in foods and feedingstuffs. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, (EE.UU.) no. 26:27-135.

28 RAFATULLAH, S.; et al. 1991. Hepatoprotective and safety evaluation studies on sarsaparilla. *Journal of Pharmacology* (EE.UU.) no. 29:296-301.

29 SCHIMM, O. 1994. An evaluation of 55 commercial plant extracts in the Ames mutagenicity test. *Alimentaria, Pharmazie*, p.448-451.

30 SIRIWARDANA, S. 1981. Plant tissue culture, methods and applications in agriculture. New York, EE.UU., Academic Press. 300 p.

31 STAHL, B.; SHILD, W. 1981. *Biologie, drogenanalyse II inhalisstoffe und isolierwagen*. Alemania, *Pharmazentische*, p.165-169.

32 STANDLEY, P.C. 1952. Flora de Guatemala. Chicago, EE.UU., Chicago Natural History Museum, v.24, pte. 3, p.92-100.

33 SZABADOS, L. 1991. Suspensiones celulares, descripción, manipulación y aplicaciones. Ed. por William M. Roca; Luis A. Mroginski. Colombia, CIAT. 953 p.

34 TREASE, G.E.; EVANS, W.C. 1988. *Tratado de farmacognosia*. México, Nueva Editorial Interamericana. 790 p.

**12. APENDICE**



## Composición del medio Murashige y Skoog

Cuadro 8A Composición del medio Murashige y Skoog 1962. (23)

MS	COMPUESTO	g/l	Volumen de Solución Madre	Medio de Cultivo 1000 ml.
MACRO A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> KNO <sub>3</sub>	1.65 1.90		1.65 1.90
MACRO B 10X	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.1 0.425	250 ml	0.44g 0.17g
MACRO C 100X	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	9.25	250 ml	10 ml
MICRO E 5000 X	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0125 0.0125	100 ml	0.2 ml
MICRO F 100 X	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.215 0.155 0.5575	250 ml	10 ml
HIERRO G 100 X	Na <sub>2</sub> EDTA FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.9315 0.69	250 ml	10 ml
VITAMINAS H 1000 X	Acido Nicotínico pirodixina - HCL Tiamina - HCL glicina	0.05 0.05 0.01 0.20	100 ml	1 ml
MIOINOSITOL I	Mio- inositol	2.50	250 ml	10 ml
SACAROSA				30 gr
PHYTAGEL				2 gr

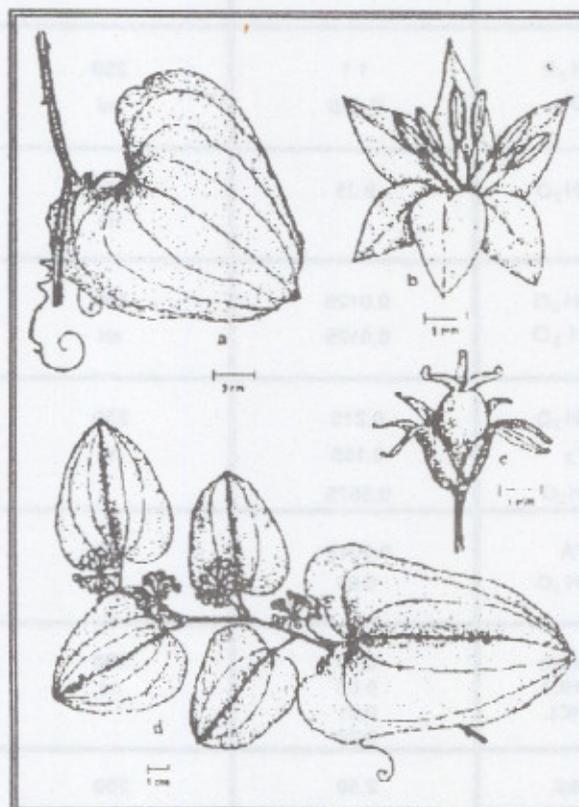


Figura 4 Morfología de *Smilax aristolochiaefolia* Miller. a) hoja con zarcillos; b) flor masculina; c) flor femenina; d) rama con fruto.

## APENDICE 2 INFORMACION GENERADA EN LA FASE DE INDUCCION DE CALLOS FRIABLES

**Cuadro 9A Número de callos friables de los tratamientos a las 8 semanas de cultivo.**

Explant	Tratamientos		Repeticiones									
	ANA mg/l	BAP mg/l	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
hoja+pecíolo	3.0	0.5	13	13	11	15	16	14	13	12	13	14
hoja+pecíolo	3.0	1.0	20	27	14	14	12	15	14	13	19	17
hoja+pecíolo	3.0	3.0	24	17	19	28	24	22	25	23	23	26
hoja+pecíolo	5.0	1.0	16	13	12	17	18	11	10	16	16	13
hoja+pecíolo	5.0	0.5	2	1	3	2	1	3	2	2	1	3
hoja+pecíolo	5.0	3.0	2	2	1	1	3	4	3	3	2	1
hoja+pecíolo	0.0	0.0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0

## APENDICE 3 INFORMACION GENERADA EN LA FASE DE SUSPENSION CELULAR

**Cuadro 10A Número de células a los 2 días de cultivo.**

Tratamientos		Repeticiones									
ANA mg/l	BAP mg/l	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.0	0.5	30,000	10,000	10,000	10,000	20,000	30,000	20,000	20,000	20,000	20,000
2.0	1.0	30,000	30,000	20,000	20,000	10,000	10,000	30,000	20,000	10,000	20,000
3.0	3.0	20,000	20,000	20,000	30,000	20,000	30,000	30,000	30,000	10,000	10,000
0.0	0.0	10,000	20,000	20,000	20,000	30,000	20,000	10,000	10,000	10,000	10,000

**Cuadro 11A Número de células a los 7 días de cultivo.**

Tratamientos		Repeticiones									
ANA mg/l	BAP mg/l	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.0	0.5	50,000	40,000	40,000	30,000	50,000	40,000	40,000	50,000	60,000	40,000
2.0	1.0	40,000	40,000	50,000	40,000	60,000	50,000	40,000	50,000	60,000	40,000
3.0	3.0	40,000	60,000	60,000	50,000	50,000	40,000	40,000	40,000	40,000	50,000
0.0	0.0	40,000	50,000	50,000	50,000	60,000	60,000	60,000	50,000	40,000	60,000

**Cuadro 12A Número de células a los 12 días de cultivo.**

Tratamientos		Repeticiones									
ANA mg/l	BAP mg/l	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.0	0.5	70,000	70,000	80,000	90,000	90,000	90,000	80,000	80,000	80,000	80,000
2.0	1.0	90,000	70,000	70,000	70,000	80,000	80,000	90,000	90,000	90,000	80,000
3.0	3.0	90,000	100,000	90,000	80,000	90,000	90,000	80,000	90,000	90,000	90,000
0.0	0.0	100,000	100,000	90,000	90,000	90,000	90,000	80,000	80,000	80,000	90,000

Cuadro 13A Número de células a los 17 días de cultivo.

Tratamientos		Repeticiones									
ANA mg/l	BAP mg/l	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.0	0.5	110,000	110,000	120,000	100,000	110,000	120,000	120,000	130,000	120,000	110,000
2.0	1.0	100,000	110,000	110,000	120,000	120,000	100,000	110,000	110,000	120,000	120,000
3.0	3.0	110,000	100,000	120,000	130,000	130,000	120,000	120,000	120,000	110,000	100,000
0.0	0.0	120,000	110,000	110,000	120,000	120,000	130,000	130,000	130,000	120,000	120,000

Cuadro 14A Número de células a los 22 días de cultivo.

Tratamientos		Repeticiones									
ANA mg/l	BAP mg/l	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.0	0.5	110,000	100,000	120,000	100,000	100,000	120,000	110,000	130,000	120,000	100,000
2.0	1.0	100,000	100,000	110,000	100,000	100,000	120,000	120,000	110,000	120,000	110,000
3.0	3.0	110,000	100,000	110,000	120,000	130,000	110,000	110,000	100,000	100,000	100,000
0.0	0.0	120,000	100,000	100,000	110,000	120,000	120,000	120,000	130,000	120,000	110,000

Cuadro 15A. Porcentaje de células a los 2 días de cultivo.

Tratamientos		Repeticiones									
ANA mg/l	BAP mg/l	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.0	0.5	0.4	0.6	0.6	0.4	0.2	0.5	0.5	0.6	0.4	0.3
2.0	1.0	0.4	0.5	0.5	0.3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.5	0.5
3.0	3.0	0.4	0.6	0.5	0.3	0.5	0.2	0.4	0.4	0.5	0.5
0.0	0.0	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2	0.4	0.6	0.5	0.2

Cuadro 16A Porcentaje de células a los 7 días de cultivo.

Tratamientos		Repeticiones									
ANA mg/l	BAP mg/l	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.0	0.5	2.0	2.5	3.0	2.0	1.9	1.7	1.0	1.6	3.0	2.6
2.0	1.0	2.8	3.0	2.0	0.9	2.3	2.0	2.0	2.0	2.0	1.7
3.0	3.0	2.0	2.0	2.0	2.5	2.9	2.0	3.0	2.2	2.2	1.5
0.0	0.0	3.0	2.7	2.0	2.0	2.5	1.5	2.0	1.1	2.0	3.0

Cuadro 17A Porcentaje de células a los 12 días de cultivo.

Tratamientos		Repeticiones									
ANA mg/l	BAP mg/l	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.0	0.5	3.5	3.7	3.2	3.6	3.6	3.7	3.8	3.9	3.6	3.8
2.0	1.0	4.2	3.5	4.0	4.5	4.5	5.0	4.3	4.4	4.0	4.2
3.0	3.0	4.0	4.4	4.5	4.4	4.0	3.8	3.7	3.8	4.0	4.5
0.0	0.0	3.3	3.9	3.6	4.0	4.2	3.2	4.9	4.0	4.2	4.3

Cuadro 18A Porcentaje de células a los 17 días de cultivo.

Tratamientos		Repeticiones									
ANA mg/l	BAP mg/l	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.0	0.5	5.0	4.8	5.0	5.1	5.5	5.4	5.0	4.8	4.6	5.2
2.0	1.0	5.5	5.0	5.1	5.0	5.2	4.8	5.3	5.2	5.0	4.8
3.0	3.0	4.8	4.9	5.2	5.1	5.4	5.5	5.6	5.2	4.8	5.2
0.0	0.0	4.8	5.0	5.2	5.2	5.4	5.0	5.2	5.4	5.2	5.0

Cuadro 19A Porcentaje de células a los 22 días de cultivo.

Tratamientos		Repeticiones									
ANA mg/l	BAP mg/l	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
1.0	0.5	5.0	4.8	5.0	5.0	5.5	5.2	5.0	4.8	4.0	5.2
2.0	1.0	5.5	5.0	5.0	5.0	5.1	4.8	5.3	5.0	5.0	4.8
3.0	3.0	4.8	4.8	5.1	5.1	5.2	5.4	5.6	5.2	4.8	5.1
0.0	0.0	4.6	5.0	5.2	5.2	5.4	4.9	5.2	5.4	5.2	5.0

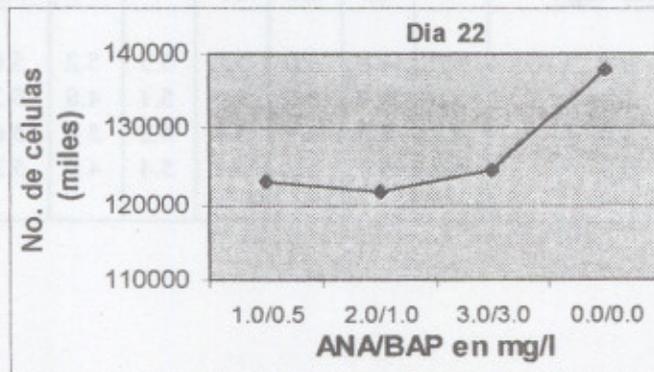
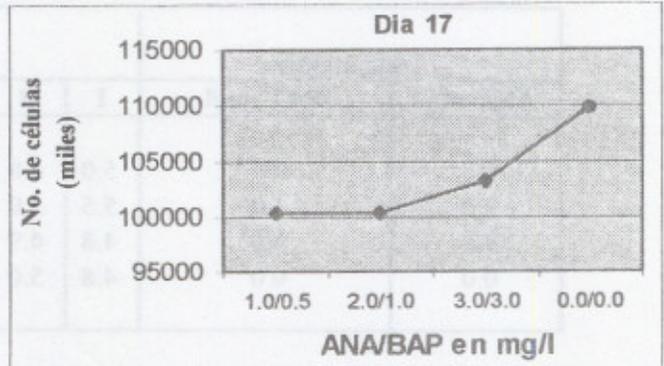
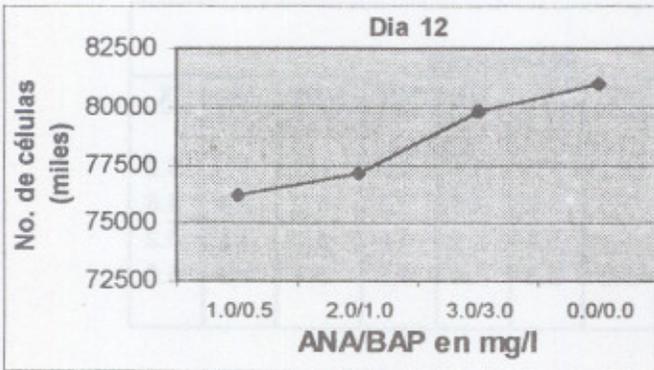
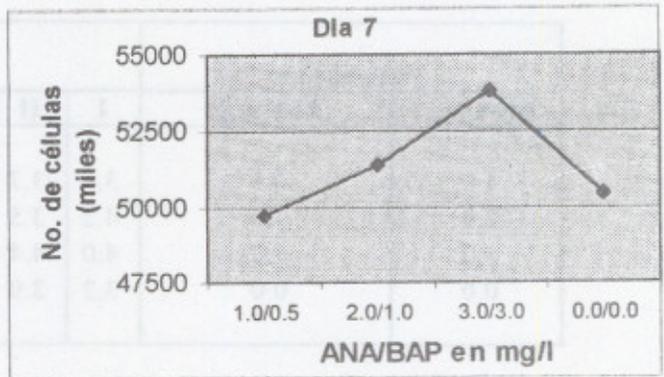
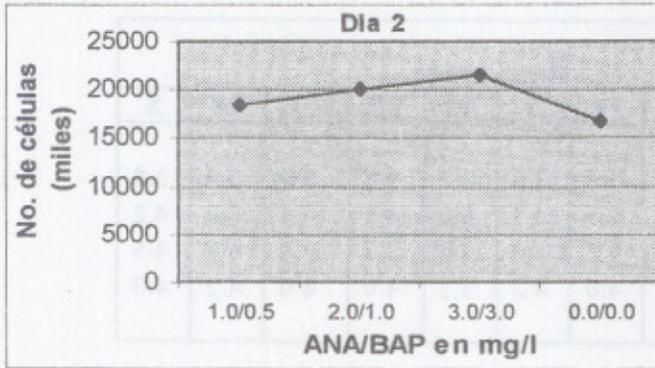


Figura 5 Resumen gráfico del comportamiento de la multiplicación celular en el tiempo de incubación.

### APÉNDICE 4 RESUMEN DE LOS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

**Cuadro 20A. Resumen del análisis de varianza efectuado al número de callos friables formados.**

F.V	G.L	S.C.	C.R.	F.C.	PROB. ERROR
Trat.	6	4276.54285	712.757143	171.32	0.0001
Error	63	262.10000	4.160317		
Total	69	4538.64285			
<b>R. Cuadrado</b>	<b>C.V.</b>	<b>Medía Número de callos</b>			
0.942251	20.2522	10.0714286			

**Cuadro 21A. Resumen del análisis de varianza efectuado al número de células a los 2 días de cultivo.**

F.V	G.L	S.C.	C.R.	F.C.	PROB. ERROR
Trat.	3	187500000.0	62500000.0	1.08	0.37313
Error	36	2090000000.0	58055555.6		
Total	39	2277500000.0			
<b>R. Cuadrado</b>	<b>C.V.</b>	<b>Medía Número de callos</b>			
0.082327	39.58140	19250.00			

**Cuadro 22A Resumen del análisis de varianza efectuado al número de células a los 7 días de cultivo.**

F.V	G.L	S.C.	C.R.	F.C.	PROB. ERROR
Trat.	3	340000000.00	113333333.3	1.77	0.1696
Error	36	2300000000.00	63888888.9		
Total	39	2,640,000,000.00			
<b>R. Cuadrado C.V. Media Número de callos</b>					
0.128788 16.65219 48000.00					

**Cuadro 23A Resumen del análisis de varianza efectuado al número de células a los 12 días de cultivo.**

F.V	G.L	S.C.	C.R.	F.C.	PROB. ERROR
Trat.	3	640000000.0	21333333.3	3.92	0.0161
Error	36	1960000000.0	54444444.4		
Total	39	2,600,000,000.00			
<b>R. Cuadrado C.V. Media Número de células</b>					
0.246154 8.680762 85000.00					

**Cuadro 24A Resumen del análisis de varianza efectuado al número de células a los 17 días de cultivo.**

F.V	G.L	S.C.	C.R.	F.C.	PROB. ERROR
Trat.	3	427500000.0	1425000000.0	2.04	0.1250
Error	36	2510000000.0	69722222.2		
Total	39	2937500000.0			
<b>R. Cuadrado</b>	<b>C.V.</b>	<b>Medía Número de células</b>			
0.145532	7.182781	116250.00			

**Cuadro 25A Resumen del análisis de varianza efectuado al número de células a los 22 días de cultivo.**

F.V	G.L	S.C.	C.R.	F.C.	PROB. ERROR
Trat.	3	9.3621	3.12072	411.52	0.0001
Error	36	2.73000	7.58334		
Total	39	12.0921			
<b>R. Cuadrado</b>	<b>C.V.</b>	<b>Medía Número de células</b>			
0.971666	10.39445	83777750.0			

**Cuadro 26A** Resumen del análisis de varianza efectuado al porcentaje de células a los 2 días de cultivo.

F.V	G.L	S.C.	C.R.	F.C.	PROB. ERROR
Trat.	3	0.09675000	0.03225000	1.84	0.1574
Error	36	0.63100000	0.01752778		
Total	39	0.72775000			
<b>R. Cuadrado C.V.      Medía Número de células</b>					
0.132944      33.73058      0.39250000					

**Cuadro 27A** Resumen del análisis de varianza efectuado al porcentaje de células a los 7 días de cultivo.

F.V	G.L	S.C.	C.R.	F.C.	PROB. ERROR
Trat.	3	0.14075000	0.04691667	0.14	0.9351
Error	36	12.01900000	0.33386111		
Total	39	12.15975000			
<b>R. Cuadrado C.V.      Medía Número de células</b>					
0.011575      26.84354      2.15250000					

**Cuadro 28A Resumen del análisis de varianza efectuado al porcentaje de células a los 12 días de cultivo.**

F.V	G.L	S.C.	C.R.	F.C.	PROB. ERROR
Trat.	3	1.84900000	0.61633333	5.28	0.0040
Error	36	4.20200000	0.11672222		
Total	39	6.05100000			
<b>R. Cuadrado C.V. Media Número de células</b>					
	0.305569	8.616553	3.96500000		

**Cuadro 29A Resumen del análisis de varianza efectuado al porcentaje de células a los 17 días de cultivo.**

F.V	G.L	S.C.	C.R.	F.C.	PROB. ERROR
Trat.	3	0.09800000	0.03266667	0.55	0.6514
Error	36	2.13800000	0.59388890		
Total	39	2.23600000			
<b>R. Cuadrado C.V. Media Número de células</b>					
	0.043828	4.769048	5.11000000		

**Cuadro 30A. Resumen del análisis de varianza efectuado al porcentaje de células a los 22 días de cultivo.**

F.V	G.L	S.C.	C.R.	F.C.	PROB. ERROR
Trat.	3	0.16075000	0.05335833	0.65	0.5870
Error	36	2.95900000	0.08219444		
Total	39	3.11975000			
<b>R. Cuadrado C.V.      Medía Número de células</b>					
0.051527      5.674334      5.05250000					

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS  
DE GUATEMALA



Ref. Sem.009-99

FACULTAD DE AGRONOMIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
AGRONOMICAS

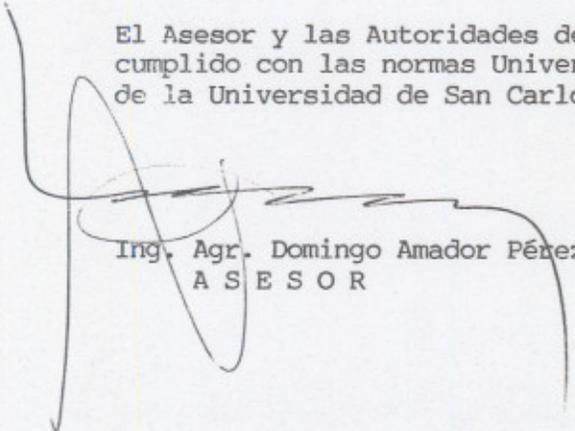
LA TESIS TITULADA: "COMPORTAMIENTO DE LA ZARZAPARRILLA (*Smilax aristolochiaefolia* Miller) AL CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION".

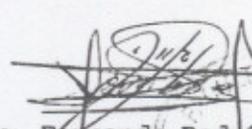
DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: MANUEL ORLANDO GAITAN PEREZ

CARNET No: 8913639

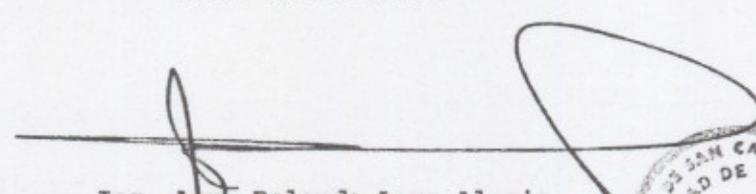
HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Edgar O. Franco Rivera  
Ing. Agr. Edwin E. Cano Morales

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. Domingo Amador Pérez  
A S E S O R

  
Ing. Agr. Bernardo Rodríguez B.  
DIRECTOR DEL IIAACIEN

I M P R I M A S E

  
Ing. Agr. Rolando Lara Alecio  
D E C A N O



cc:Control Académico  
Archivo  
FR/prr.

APARTADO POSTAL 1545 § 01091 GUATEMALA, C. A.  
TELEFONO 476-9794 § FAX (502) 476-9770  
E-mail: [lia@usac.edu.gt](mailto:lia@usac.edu.gt) § <http://www.usac.edu.gt/facultades/agronomia.htm>

