

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

RESPUESTA DE LA PLANTA MEDICINAL ZARZAPARRILLA *Smilax moranensis* Martens & Galiotti AL CULTIVO DE TEJIDOS *in vitro*

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



MARIO ABIGAIL HERNANDEZ TECU

En el acto de investidura como

INGENIERO AGRONOMO

EN

**SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA
EN EL GRADO ACADEMICO DE
LICENCIADO**

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2000

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

RECTOR

ING. AGR. EFRAIN MEDINA GERRA

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO

Ing. Agr. EDGAR OSWALDO FRANCO RIVERA

VOCAL PRIMERO

Ing. Agr. WALTER ESTUARDO GARCIA TELLO

VOCAL SEGUNDO

Ing. Agr. WILLIAM ROBERTO ESCOBAR LOPEZ

VOCAL TECERO

Ing. Agr. ALEJANDRO ARNOLDO HERNANDEZ

VOCAL CUARTO

Br. JACOBO BOLVITO RAMOS

VOCAL QUINTO

Br. JOSE B. SANDOVAL ARRIAZA

SECRETARIO

Ing. Agr. EDIL RENE RODRIGUEZ QUEZADA

Guatemala, noviembre de 2000.

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

Señores miembros:

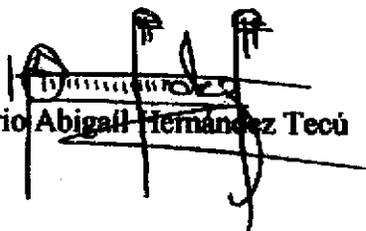
De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

RESPUESTA DE LA PLANTA MEDICINAL ZARZAPARRILLA *Smilax moranensis* Martens & Galiotti AL CULTIVO DE TEJIDOS *in vitro*.

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

Esperando que el presente trabajo de investigación llene los requisitos para su aprobación, me suscribo.

Atentamente,


Mario Abigail Hernández Tecú

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS

Con mi oración de infinitas gracias por todo lo que me ha dado.

MIS PADRES

**VICTOR ALEJANDRO HERNANDEZ R.
ROSALIA TECU DE HERNANDEZ**

Con muestras de mi más grande admiración y cariño, pues son verdaderamente especiales en mi vida.

MIS HERMANOS

Víctor Gerardo, Manuel Trinidad, Gloria Marina, Luis Felipe, Blanca Noemí y Rosa Liliana

Por la unión fraternal que siempre nos ha caracterizado

MIS SOBRINOS:

Jorge Eduardo, Víctor Armando, Norma Mariana, Luis Gerardo, Daniel, Manuel Alejandro, Alejandra, Nancy Liliana y Luis Mario.

Especialmente al pequeñín Mario Alejandro

MI FAMILIA Y AMIGOS EN GENERAL

TESIS QUE DEDICO

A:

MI PAIS, GUATEMALA

RABINAL, BAJA VERAPAZ

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

AGRADECIMIENTOS

SINCEROS AGRADECIMIENTOS A:

Ing. Agr. M. Sc. DOMINGO AMADOR PEREZ

Por su orientación, apoyo y asesoría para la realización del presente trabajo de tesis.

Personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

A todas aquellas personas que de una u otra forma hicieron posible la realización de esta investigación.

CONTENIDO

i

	Página
INDICE DE CUADROS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
1. INTRODUCCION	1
2. DEFINICION DEL PROBLEMA	3
3. MARCO TEORICO	4
3.1 MARCO CONCEPTUAL	4
3.1.1 Las plantas medicinales	4
3.1.1.A Historia de las plantas medicinales	4
3.1.1.B Sustancias activas en las plantas medicinales	6
3.1.1.B.a Algunos grupos de sustancias activas	6
3.1.2 Diversidad de la flora medicinal de Guatemala	10
3.1.3 Comercialización de las plantas medicinales	12
3.1.3.A Peligro de extinción de las especies	13
3.1.4 Domesticación de plantas medicinales	13
3.1.4.A Biotecnología. El cultivo de tejidos vegetales, una alternativa en la propagación de plantas medicinales	14
3.1.4.A.a Cultivo de tejidos	16
3.1.4.A.a.i Explante	16
3.1.4.A.a.ii. Métodos asépticos	16
3.1.4.A.a.iii. Medio de cultivo	17
3.1.4.A.b. Establecimiento de cultivos <i>in vitro</i>	17
3.1.4.A.c. Micropropagación	18
3.1.4.A.c.i. Micropropagación por brotes axilares	18
3.1.4.A.c.ii. Micropropagación por brotes adventicios y embriogenésis somática	19
3.1.4.A.c.iii Micropropagación por formación de órganos de almacenamiento	20
3.1.4.A.c.iv. Micropropagación por microinjerto	20
3.1.4.A.d. El cultivo de tejidos para la obtención de plantas libres de patógenos	21
3.1.4.A.e. El cultivo de tejidos para el mejoramiento genético de las plantas	21
3.1.4.A.e.i. Cultivo de embriones y óvulos	21
3.1.4.A.e.ii. Cultivo de anteras	22
3.1.4.A.e.iii. Variación somaclonal	22
3.1.4.A.e.iv. Cultivo y fusión de protoplastos	23
3.1.4.A.e.v. Ingeniería genética	24
3.2 MARCO REFERENCIAL	25
3.2.1 Descripción general de la zarzaparrilla (<i>Smilax spp.</i>)	25
3.2.1.A Descripción del género <i>Smilax</i>	26
3.2.1.A.a Descripción de la especie <i>Smilax moranensis</i> Martens & Galiotti	28

3.2.1.A.b Clasificación botánica	29
3.2.2 Usos medicinales de la zarzaparrilla	29
3.2.3 Compuestos biológicamente activos de la zarzaparrilla	30
3.2.4 Comercialización de la zarzaparrilla	31
4. OBJETIVOS	33
5. HIPOTESIS	34
6. MATERIALES Y METODOS	35
6.1. METODOS GENERALES	35
6.1.1. Area experimental	35
6.1.2. Medio basal	35
6.1.3 Elaboración de los medios de cultivo	35
6.1.3.A. Esterilización de los medios de cultivo	35
6.1.4. Selección del material experimental	36
6.1.4.A. Siembra del tejido en el medio de cultivo	36
6.1.4.A.a. Incubación de los cultivos	36
6.1.4.B. Subcultivos	36
6.2. Fases de la investigación	37
6.2.1. Fase I. Inducción de callos y regeneración de brotes	37
6.2.1.A. Tratamientos	37
6.2.1.B. Unidad experimental	38
6.2.1.C Variables evaluadas	38
6.2.1.C.a. Número total de callos inducidos por tratamiento	39
6.2.1.C.b. Número promedio de callos inducidos por explante	39
6.2.1.C.c. Número total de brotes regenerados por tratamiento	39
6.2.1.C.d. Número promedio de brotes regenerados por explante	39
6.2.1.D Manejo del experimento	40
6.2.2. Fase II. Regeneración de brotes y plántulas	40
6.2.2.A. Unidad experimental	40
6.2.2.B Variables evaluadas	40
6.2.2.B.a. Número total de callos inducidos por tratamiento	40
6.2.2.B.b. Número promedio de callos inducidos por explante	41
6.2.2.B.c. Número total de brotes regenerados por tratamiento	41
6.2.2.B.d. Número promedio de brotes regenerados por explante	41
6.2.2.B.e. Número total de plántulas regeneradas	41
6.2.2.B.f. Número total de hojas formadas por tratamiento	41
6.2.2.B.g. Número promedio de hojas formadas por plántula	42
6.2.2.C. Manejo del experimento	42
7. RESULTADOS Y DISCUSION	43
7.1. Fase I. Inducción de callos y regeneración de brotes	43
7.1.1. Iniciación del cultivo de tejidos	43
7.1.1.A. Número total de callos inducidos por tratamiento	44
7.1.1.B. Número promedio de callos inducidos por explante	45
7.1.1.C. Número total de brotes regenerados por tratamiento	45
7.1.1.D. Número promedio de brotes regenerados por explante	46
7.1.2. Primer subcultivo	47
7.1.2.A. Número total de callos inducidos por tratamiento	48
7.1.2.B. Número promedio de callos inducidos por explante	48
7.1.2.C. Número total de brotes regenerados por tratamiento	48
7.1.2.D. Número promedio de brotes regenerados por explante	49
7.2. Fase II. Regeneración de brotes y plántulas	50

7.2.1. Segundo subcultivo	50
7.2.1.A. Número total de callos inducidos y brotes regenerados por tratamiento	51
7.2.1.B. Número promedio de callos inducidos y brotes regenerados por explante	52
7.2.1.C. Número total de plántulas producidas	53
7.2.1.D. Número total de hojas formadas por tratamiento	55
7.2.1.E. Número promedio de hojas formadas por plántula	55
7.2.2. Tercer subcultivo	56
7.2.2.A. Número total de brotes regenerados por tratamiento	56
7.2.2.B. Número promedio de brotes regenerados por explante	57
7.2.2.C. Número total de plántulas producidas por tratamiento	57
7.2.2.D. Número total de hojas formadas por tratamiento	58
7.2.2.E. Número promedio de hojas formadas por plántula	59
8. CONCLUSIONES	61
9. RECOMENDACIONES	62
10 BIBLIOGRAFIA	63
11. APENDICE	66

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Tratamientos evaluados, medios de cultivo (medio basal MS y sus respectivas combinaciones de reguladores del crecimiento), para inducir callos y regenerar brotes y plántulas en zarzaparrilla <i>Smilax moranensis</i> Martens & Galiotti.	38
2	Efecto de la concentración de reguladores del crecimiento en la inducción de callos y regeneración de brotes de <i>S. moranensis</i> Martens & Galiotti, después de 11 semanas de cultivo.	43
3	Efecto de la concentración de reguladores del crecimiento en la inducción de callos y regeneración de brotes, de zarzaparrilla, después de 15 semanas de cultivo.	47
4	Efecto de la concentración de reguladores del crecimiento en la inducción de callos y regeneración de brotes de <i>S. moranensis</i> Martens & Galiotti, a las 21 semanas de cultivo.	51
5	Efecto de la concentración de reguladores del crecimiento en la regeneración de plántulas y formación de hojas <i>S. moranensis</i> Martens & Galiotti, a las 21 semanas de cultivo.	53
6	Efecto final de la concentración de reguladores del crecimiento en el total de brotes, plántulas y hojas regeneradas por tratamiento, en <i>S. moranensis</i> Martens & Galiotti, a las 28 semanas de cultivo.	56
7A	Composición del medio basal Murashige y Skoog (1962), utilizado en la inducción de callos y regeneración de brotes y plántulas de <i>S. moranensis</i> M & G.	67
8A	Procedimiento para la elaboración de soluciones concentradas para la preparación del medio MS.	68

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Aplicación de la biotecnología en la domesticación de plantas	15
2	Planta de zarzaparrilla.	27
3	Efecto de la concentración de auxinas y citocininas en la producción de callos y brotes de zarzaparrilla a las 11 semanas de cultivo.	47
4	Efecto de la concentración de auxinas y citocininas en la producción de callos y brotes de zarzaparrilla a las 15 semanas de cultivo.	50
5	Efecto de la concentración de ANA y BAP en la producción de callos y brotes de zarzaparrilla a las 21 semanas de cultivo.	52
6	Efecto de la concentración de ANA + BAP, en el número de plántulas de zarzaparrilla, regeneradas por tratamiento a las 21 semanas de cultivo.	54
7	Efecto final de la concentración de auxinas y citocininas en la producción de brotes de zarzaparrilla.	57
8	Efecto final de la concentración de auxinas y citocininas en la producción de plántulas de zarzaparrilla.	59
9A	Producción de callos de zarzaparrilla a través del tiempo.	69
10A	Producción de brotes de zarzaparrilla a través del tiempo.	70
11A	Producción de plántulas de zarzaparrilla a través del tiempo	71

RESPUESTA DE LA PLANTA MEDICINAL ZARZAPARRILLA *Smilax moranensis* Martens & Galiotti AL CULTIVO DE TEJIDOS IN VITRO

RESPONSE OF THE MEDICINAL PLANT ZARZAPARRILLA *Smilax moranensis* Martens & Galiotti, AT TISSUE CULTURE IN VITRO

RESUMEN

La zarzaparrilla, pertenece al género *Smilax* y a la familia *Smilacaceae*, comprende por lo general plantas arbustivas y trepadoras, a veces herbáceas o erectas, que presentan rizomas o tubérculos carnosos, frecuentemente provistas de zarcillos y/o espinos. Es considerada como medicinal, por que se le atribuyen las siguientes propiedades: estimulante y sudorífico, antirreumático, además de poseer propiedades contra enfermedades generales y contra algunas afecciones cutáneas. Esta especie es extraída de los bosques sin ningún control, tomando en cuenta que no se cultiva sistemáticamente y que no existen en el país cultivos intensivos, ni planes técnicos que garanticen su manejo sostenido y su conservación genética, se condena a estas plantas a desaparecer (1, 21, 24, 10). La técnica de cultivo de tejidos *in vitro*, consiste esencialmente en el aislamiento de un explante, que se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas, la interacción de los distintos factores que intervienen en este proceso, determina las respuestas que se obtengan *in vitro*.

En el presente estudio se investigó la respuesta de la zarzaparrilla *Smilax moranensis* Martens & Galiotti, al cultivo de tejidos *in vitro*, a partir de un explante de hoja con peciolo, un medio nutritivo (Murashige y Skoog) y seis combinaciones de auxinas y citocininas, más un testigo absoluto (MS sin adición de reguladores del crecimiento), con el propósito de generar conocimientos y tecnología que puedan contribuir a la propagación y conservación de dichas plantas. La auxina utilizada fue el ácido naftalanacético -ANA-, en niveles de 3.0 y 5.0 mg/lit., y la citocinina fue la bencilaminopurina -BAP- en dosis de 0.5, 1.0 y 3.0 mg/lit.

Para facilidades de manejo, el estudio se dividió en las siguientes fases: Fase I; inducción de callos y regeneración de brotes; que incluyó la etapa de iniciación de los cultivos y el primer subcultivo realizado, y fase II; regeneración de brotes y plántulas, que incluyó el segundo y tercer subcultivos. Los siete tratamientos evaluados en ambas fases, estuvieron entonces conformados por el medio nutritivo basal de Murashige y Skoog y las concentraciones de 3.0/0.5, 3.0/1.0, 3.0/3.0, 5.0/0.5, 5.0/1.0 y 5.0/3.0 mg/lt., de ANA/BAP, respectivamente, incluyendo el testigo (0.0/0.0 mg/lt de ANA/BAP). Realizando una evaluación puramente descriptiva, con base a valores absolutos, porcentajes y medias obtenidas de callos, brotes y plántulas que se formaron en el transcurso de la investigación

Se estableció que las respuestas obtenidas con los tratamientos estudiados, fue una secuencia de eventos iniciados con la formación en primer lugar de masas celulares amorfas (callos), brotes y finalmente plántulas.

Al final del experimento y con base a los resultados obtenidos, se pudo establecer que con la aplicación de diferentes combinaciones de auxinas y citocininas como el ANA y el BAP, es posible obtener respuesta con la técnica de cultivo *in vitro* de tejido foliar de plantas de zarzaparrilla, siendo los mejores tratamientos en la obtención de callos, aquellos medios de inducción que contenían 3.0/0.5; 5.0/1.0 y 3.0/1.0 mg/lt de ANA + BAP. En la regeneración de brotes se pudo observar que los tratamientos más efectivos fueron aquellos que incluían combinaciones de concentraciones bajas de ANA y BAP, representados por 3.0/0.5; 3.0/1.0; y 3.0/3.0 mg/lt.

Finalmente los tratamientos que se destacaron por su producción de plántulas, también contenían concentraciones bajas de auxinas y citocininas y fueron los medios de inducción con 3.0/0.5 y 3.0/1.0 mg/lt, de ANA + BAP.

El propósito de la investigación fue generar información básica que podría servir como un primer acercamiento a las diversas técnicas para la propagación masiva de especies potenciales de plantas medicinales, amenazadas por la desaparición de sus hábitats naturales y por problemas en su germinación natural.

I. INTRODUCCION

Las plantas medicinales, han sido a través de la historia de la humanidad grandes aliadas en la prevención y tratamiento de enfermedades y dolencias, que afectan al hombre, por lo que son consideradas valiosas. Sin embargo, se ha establecido que son relativamente pocas las que se cultivan, pues la mayor parte de la producción de estas plantas se obtiene de especies que crecen en forma natural en diversas partes del mundo y especialmente en los trópicos (13).

Numerosas plantas consideradas medicinales, están amenazadas por la pérdida de su diversidad genética debido a la destrucción de su medio natural. A medida que se extinguen esos recursos vegetales, las comunidades locales pierden material del cual se extraen o podrían extraerse en un futuro, nuevos productos fitofarmacéuticos (10).

Las zarzaparrillas, son plantas que poseen valiosas y numerosas propiedades medicinales, por lo que son recolectadas y extraídas de los bosques, para cubrir las crecientes demandas de mercados nacionales y extranjeros que en su intento de abastecerse de materias primas para la elaboración de medicamentos, estimulan el aprovechamiento desmesurado de este recurso natural, sin la consiguiente repoblación o sustitución. Esto aunado al hecho de que se aprovechan los mejores ejemplares de estas especies, además de que no existen planes técnicos que garanticen el manejo sostenible de las poblaciones silvestres y por ende su conservación genética, coloca a estas plantas en serio peligro de desaparecer (5, 21, 10).

Por otro lado, también existen estudios, que demuestran la dificultad que presentan las diversas especies de zarzaparrilla que hay en Guatemala, para su propagación utilizando los métodos convencionales, lo que planteó la necesidad e importancia de evaluar técnicas alternativas a la reproducción sexual y asexual, como el cultivo de tejidos *in vitro* de al menos una especie de zarzaparrilla como la *Smilax moranensis* Martens & Galiotti, la cual posee numerosas y valiosas propiedades medicinales, con el propósito de generar información que permita la conservación y propagación de estas y otras especies de plantas medicinales amenazadas por la extinción.

El cultivo de tejidos *in vitro* de explantes de hoja con peciolo de la zarzaparrilla *Smilax moranensis* Martens & Galiotti, a partir del medio basal desarrollado por Murashige y Skoog, y seis combinaciones de la auxina ácido naftalanacético -ANA- y la citocinina bencilaminopurina -BAP-, permitió establecer la respuesta, la cual estuvo representada por la formación de callos, brotes y plántulas .

Es necesario aclarar, sin embargo, que la información generada es fundamental, y debe considerarse como un primer acercamiento para el conocimiento o establecimiento de un modelo a seguir para la propagación masiva y la conservación de las especies de zarzaparrillas de Guatemala.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La zarzaparrilla (*Smilax moranensis* Martens & Galiotti), es una planta que en Guatemala se ha utilizado en la medicina tradicional. En nuestro país, hasta ahora no existen investigaciones sobre su uso y manejo, así como estudios que establezcan la respuesta a técnicas modernas de propagación que contribuyan a su mejoramiento y producción, pues a medida que la población humana va en aumento, se somete a las áreas naturales y sus componentes a fuertes presiones que dan como resultado consecuencias no deseables y la pérdida de valiosos recursos, como esta planta medicinal, por lo cual es necesario el desarrollo de alternativas de propagación que coadyuven en su conservación (10, 24).

Se tiene evidencias de que las diferentes especies de zarzaparrilla han demostrado baja capacidad de germinación natural (62%), así como su reproducción a través de estructuras asexuales resulta poco satisfactoria (24).

De la planta de zarzaparrilla, se aprovecha exclusivamente el rizoma, el resto es desechado, por lo cual se colectan del bosque los mejores ejemplares, para ser exportados a los países donde serán utilizados como fuente de materia prima para la elaboración de productos medicinales terminados. Se tienen datos sobre las exportaciones realizadas con destino a Europa, Asia, Canadá y Estados Unidos, por un total de 957 toneladas en los años 1992 a 1995. Así mismo, durante el año 1996 y parte de 1997 se enviaron a España 15 toneladas (9, 10).

A la zarzaparrilla, se le atribuyen las siguientes propiedades medicinales: estimulante y sudorífico, antiartrítico, además de poseer propiedades contra enfermedades generales y contra algunas afecciones cutáneas (1, 21, 24). Esta especie crece en los bosques subtropicales y si se toma en consideración que la tasa de deforestación en la región Mesoamericana a llegado a ser una de las más altas en el mundo, y particularmente en Guatemala en donde se pierde en promedio 90,000 hectáreas de bosque al año (10), con la circunstancia agravante de que no se han desarrollado tecnologías específicas para el cultivo de estas plantas, situación que amenaza seriamente la conservación de dicha especie.

Por todo lo anterior es urgente desarrollar estudios que generen información tecnológica, no sólo sobre sistemas de propagación, sino también sobre mejoramiento de las características genéticas para maximizar el aprovechamiento de las diversas especies de *Smilax* que hay en nuestro país.

3. MARCO TEORICO

3.1 MARCO CONCEPTUAL

3.1.1 Las plantas medicinales.

Según Muñoz (19), las plantas medicinales son aquellos vegetales que elaboran unos productos llamados principios activos que son sustancias que ejercen una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida.

Sin embargo se ha establecido que son relativamente pocas las plantas medicinales cultivadas. La mayor parte de la producción de drogas se obtiene de plantas espontáneas que crecen en diversas partes del mundo y especialmente en los trópicos. Estas plantas medicinales son recolectadas y preparadas de forma rudimentaria para su embarque y se envían a los centros comerciales de Europa y América. La manipulación del material bruto, según Hill (13), se lleva a cabo sobre todo en los Estados Unidos, que además, producen varias drogas, ya sea de plantas silvestres o cultivadas; entre ellas cabe mencionar el ginseng, la cáscara sagrada, el cáñamo y el sello de oro. Otras especies como la belladona, el beleño y el santónico, se cultivan durante el período de escasez.

El valor medicinal de todas estas plantas se debe a la presencia en sus tejidos de alguna o varias sustancias químicas que producen una acción fisiológica concreta sobre el cuerpo humano. Entre ellas las más importantes son los alcaloides, los glucósidos, los aceites esenciales, los aceites grasos, las resinas, los mucilagos, las gomas. Algunas de tales sustancias son venenos poderosos, de manera que la preparación y administración de tales drogas debiera dejarse por entero en manos de expertos farmacólogos o médicos (13).

3.1.1.A Historia de las plantas medicinales.

Desde los tiempos más remotos la humanidad se ha servido de las plantas en su intento de curar las enfermedades y aliviar el sufrimiento físico. Todos los pueblos primitivos han llegado a adquirir algún conocimiento sobre las plantas medicinales, fruto de sucesivas experiencias acertadas o no. Estos primeros intentos de ejercer la medicina se basan en teorías y supersticiones (13, 25).

Las antiguas civilizaciones sintieron gran interés por las plantas que proporcionaban drogas. En China hacia los años 5,000 a 4,000 antes de J.C. ya estaban en uso muchas de ellas. Los asirios, los babilonios y los antiguos hebreos estaban familiarizados con el uso de las drogas. Algunos de los papiros egipcios, que datan aproximadamente del 1,600 antes de J.C., indican los nombres de muchas plantas medicinales usadas en aquella época, entre ellas la mirra, el cáñamo, el opio, el áloe y la casia. Los griegos conocían ya gran parte de las plantas medicinales de nuestro tiempo, como lo demuestran los escritos de Aristóteles, Hipócrates, Pitágoras y Teofrasto. Pero incluso en este pueblo, de refinada civilización, los elementos sobrenaturales desempeñaban un gran papel. Sólo unas pocas personas eran consideradas capaces, debido algún poder especial, de distinguir las plantas útiles de las nocivas (25).

Los romanos se interesaron menos por las plantas medicinales; no obstante en el año 77 antes de J.C., Dioscórides escribió su gran tratado de materia médica que habla de la naturaleza y propiedades de todas las sustancias medicinales conocidas en aquel tiempo. Plinio y Galeno escribieron también sobre las plantas medicinales (13, 25).

Después de unos siglos se inició el período de los herbolarios y alquimistas; en los monasterios del norte de Europa se escribieron extensos compendios de información, verdadera o falsa, relativa a las plantas, concediendo especial interés a su valor medicinal y tradicional (1-).

En el nuevo mundo, el uso de las plantas medicinales entre los nativos de la América Precolombina, debe de datar de tiempo inmemorial si se considera el grado de civilización alcanzado por los pueblos que crearon culturas admirables como la maya, azteca, incaica, etc. Los cronistas de la conquista han dado cuenta de las tradiciones que le relataron los indios sobre el valor de algunas drogas vegetales. Los descubrimientos arqueológicos han revelado también algunas informaciones sobre las enfermedades, drogas y técnicas de curación conocidas antes de la llegada de los españoles. En algunas tumbas, se ha encontrado restos de plantas de valor terapéutico como la coca (4, 25).

A partir de estos principios rudimentarios el estudio de las drogas y de las plantas medicinales ha ido progresando; en la actualidad la farmacognosia y la farmacología son ramas esenciales de la medicina. Como prueba de la íntima relación que han guardado entre sí la botánica y la medicina, incluso en épocas bastantes recientes, puede señalarse que hasta el siglo pasado la mayoría de botánicos fueron también médicos o farmacéuticos (13).

3.1.1.B Sustancias activas de las plantas medicinales.

Según Pahlow (22), los principios activos de las plantas medicinales son sustancias que la planta ha sintetizado y almacenado en el curso de su crecimiento con ayuda del metabolismo. Sin embargo, no todos estos productos metabólicos tienen un valor medicinal directamente aprovechable.

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

Los principios activos no se distribuyen de una manera uniforme por toda la planta. Se encuentran preferentemente en las flores, las hojas o las raíces, y a veces en las semillas, en los frutos o en la corteza (22).

Existen dos tipos de sustancias activas en las plantas medicinales: los productos del metabolismo primario (sacáridos principalmente), que son sustancias formadas en todas las plantas verdes gracias a la fotosíntesis; el segundo tipo de sustancias está compuesto por productos del metabolismo secundario; es decir, resultantes de procesos originados principalmente por la asimilación del nitrógeno, se trata, por ejemplo, de aceites esenciales (o esencias naturales), resinas y alcaloides, tales como los del cornezuelo o del opio (31).

Normalmente estas sustancias 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 sustancia activa en la planta, ésta produce en el organismo humano un efecto más beneficioso que la misma sustancia obtenida por quimiosíntesis (20).

La sustancia 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 (31).

3.1.1.B.a Algunos grupos de sustancias activas

A. Alcaloides.

Los alcaloides constituyen un grupo muy heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas complejas, de naturaleza básica, que provocan en general potentes efectos fisiológicos en los animales. Se trata, en su mayor parte, de venenos vegetales muy activos, dotados de una acción muy específica. Por ejemplo: los alcaloides quinoléicos del pedúnculo foliado de la ruda (6, 31).

Los alcaloides aparecen en muy diversas familias de plantas, unos 256 en los hongos, algas y otros vegetales inferiores.

De las gimnospermas se han aislado unos ciento quince alcaloides, dentro de las angiospermas, las monocotiledóneas han aportado 448 alcaloides. En tanto que de las dicotiledóneas se han obtenido 3600 (7).

Normalmente la medicina los emplea en estado puro, y su auténtico valor sólo se asegura en las manos del médico (31).

B. Flavonoides y compuestos afines

Los flavonoides son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonado $C_6-C_3-C_6$. Se conocen unos 900 flavonoides naturales; se encuentran extensamente distribuidos entre las plantas, tanto libres o como glicósidos; estos últimos contribuyen a darle color a las flores frutos y hojas. Las agliconas son más frecuentes en los tejidos leñosos. Los flavonoides son sintetizados por numerosos grupos de plantas y con excepción de algunas flavonas localizadas en las alas de mariposas, probablemente por ingestión, se puede decir que no se les encuentra en animales (7).

C. Sesquiterpenlactonas

Las sesquiterpenlactonas se han encontrado principalmente en extractos de flores o partes aéreas de las compuestas, siendo lo suficientemente típicos para tener cierto valor quimiotaxonómico. También se han encontrado en algunas umbelíferas.

Son sustancias amargas, de farmacología poco estudiada, pero provenientes de plantas usualmente reportadas como medicinales, por lo que es probable que sean los agentes medicinales. Algunas sesquiterpenlactonas poseen acción citotóxica, otros son analgésicos o amibicidas (7).

D. Coumarinas

Las coumarinas constituyen un grupo muy importante de compuestos naturales; se les considera derivados de la lactona del ácido o-hidroxicinámico, usualmente llamada coumarina. La mayoría de las coumarinas conocidas (poco más de 115), se encuentran libres en las plantas. La más abundante es la umbeliferina. Las coumarinas se encuentran con frecuencia en los extractos de Leguminosas, Orchidaceae, Rutaceae y Umbelíferae, y en cualquiera de los órganos vegetales,

desde raíces hasta flores y frutos. Las coumarinas son sustancias fluorescentes, comúnmente fotosensibles (19).

Pese a su abundancia en la naturaleza y a su diversidad estructural, su papel fisiológico sólo se conoce parcialmente. Se ha encontrado que pueden ser anticoagulantes como el dicoumarol y la coumarina, espasmolíticas e hipercolesterémicas o inhibitorias del crecimiento vegetal (7).

E. Lignanos

Los lignanos pueden considerarse como dímeros oxigenados del fenilpropano (C_6-C_3). Se conocen poco más de 60 lignanos todos aislados de las fanerógamas. Muchos se han obtenido como glicósidos, y se han aislado en todos los órganos vegetales, algunos son tóxicos y otros inocuos. Todos son ópticamente activos. Los lignanos son sólidos incoloros, cuyos puntos de fusión van de 64° hasta cerca de $300^{\circ}C$ (7).

F. Esteroles y metilesteroles

Los esteroles son alcoholes sólidos con C_{27} a C_{29} átomos de origen animal (colesterol), aunque reportados en algas rojas (coprosterol) y vegetales (fitoesteroles). En los vegetales se pueden encontrar libres, como ésteres o como glicósidos. Se han encontrado en todos los órganos de las plantas principalmente en las semillas (7).

G. Quinonas

Las quinonas son dicetonas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles los que fácilmente se regeneran por oxidación. Se han aislado unas 300 quinonas. Por sus colores, amarillo a violeta, contribuyen a la pigmentación de numerosos vegetales y de algunos animales. Algunas como la vitamina K, la ubiquinona (coenzima Q) y las plastoquinonas intervienen en los fenómenos respiratorios, transportando electrones, por lo que se les encuentra en todos los seres vivos. Alrededor de la mitad de las quinonas conocidas se han encontrado en las angiospermas, otras tantas en hongos y vegetales unicelulares; pero casi no se han localizado quinonas en las monocotiledóneas. Por el sistema aromático que dan al reducirse, se les puede dividir en benzoquinonas, naftaquinonas, antraquinonas, y fenantraquinonas (7).

Entre las plantas usadas en el pasado para teñir fibras, la raíz de rubia (*Rubia tinctorum*) y las hojas de hena (*Lawsonia alba*) deben sus cualidades tintoreras a las quinonas. Las benzoquinonas se han encontrado con frecuencia en

hongos. Las plastoquinonas se encuentran en los mitocondrias. Las naftoquinonas colorean de amarillo a rojo diversos tejidos, incluyendo el interior de los erizos de mar. Las antraquinonas constituyen el grupo más numeroso de quinonas. Son frecuentes en las Rubiaceae, Rhamnaceae y Polygonaceae. Las cualidades tintoreras y purgantes de algunas plantas de estas familias se debe a sus quinonas. Las fenantraquinonas naturales son muy escasa, en ciertos hongos se han podido aislar algunas. (7).

H. Limonoides, meliacinas y simaroubalidanos.

Las rutáceas (140 géneros, 1300 especies), meliáceas (50 géneros, 800 especies) y simaroubáceas (32 géneros, 200 especies) son vegetales muy afines en los que se han encontrado tres tipos de terpenoides que se pueden considerar derivados biogénéticos de los triterpenos (20).

Según las familias arriba citadas, pueden dividirse en: limonoides, meliacinas, y los simaroubalidanos. Hay datos de actividad medicinal de los extractos de las plantas de que proceden. Todas estas sustancias son amargas (7).

I. Glicósidos cardiotónicos y azúcares

Los glicósidos cardiotónicos son sustancias amargas, derivadas de los esteroides, que actúan sobre el corazón. La porción del azúcar contiene 3-5 moléculas de monosacáridos, por lo general metilpentosas y desoxiazúcares muy especiales (19).

Los glicósidos cardiotónicos se han encontrado en plantas de familias muy diversas, apocinácea, asclepiadácea, liliácea, morácea, escrofulariácea, ranunculácea (7).

J. Saponinas.

Son glicósidos vegetales que junto con el agua dan una espuma permanente, que emulsionan el aceite en el agua y que poseen un efecto hemolítico, es decir, que extrae de los glóbulos rojos el colorante del mismo color (22).

Las saponinas son muy frecuentes en las plantas medicinales, su principal propiedad física es la fuerte reducción de la tensión superficial del agua. La célebre raíz del ginseng (*Panax ginseng*), originaria de China y Corea, es rica en saponinas, y de las raíces de la Zarzaparrilla mexicana se ha aislado sarsaponina; otras saponinas han sido aisladas en las hojas de agaves y hasta en las flores y semillas, como en la *Yucca schottii* o en los frutos de la *Sapindus saponaria* (7, 31).

Las saponinas influyen en las plantas medicinales de un modo decisivo sobre la resorción de otros principios activos vegetales, y es muy frecuente que pequeñas cantidades produzcan "grandes" resultados. Pero las saponinas no son del todo inofensivas, un exceso, podría provocar efectos perjudiciales al organismo (22).

K. Aceites esenciales o esencias vegetales

Los aceites esenciales o esencias vegetales son mezclas de un número variable de sustancias orgánicas olorosas; son líquidos volátiles, refrigerantes, ópticamente activos, próximos a los aceites, con olor especialmente característico. Se forman como subproducto del metabolismo secundario de un número de plantas (7, 31).

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 (7).

Los aceites esenciales son empleados en perfumería, en la industria alimenticia o como fuentes de materias primas. Respecto a su distribución, un aceite esencial puede localizarse en un determinado órgano vegetal, flores, hojas, frutos y hasta raíces o en toda la planta. Respecto al papel biológico desempeñado por las esencias en los vegetales se ha especulado mucho. Según algunos, intervienen como hormonas en la polinización, sirven de atrayentes de insectos poleníferos; regulan la transpiración. Son particularmente ricas en esencias las pináceas, lauráceas, mirtáceas, labiáceas, umbelíferas, rutáceas y compuestas (7).

3.1.2 Diversidad de la flora medicinal de Guatemala.

Aunque no existen en el país estudios específicos al respecto, se sabe que la diversidad genética de plantas medicinales en Guatemala es muy amplia y que ya se han iniciado actividades que tienden a una sistematización de la información existente (5).

Por otro lado Orellana, Perla y Herrera (21), afirman que en Guatemala existe un inventario nacional con alrededor de 1400 plantas medicinales reportadas. Dicha información fue recabada mediante encuestas etnobotánicas durante el período de 1976 a 1982 en la mayor parte de departamentos del país, con la participación del Instituto Indigenista Nacional (IIN), del Centro Mesoamericano de Estudios sobre Tecnología Apropriada (CEMAT), del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala (FAUSAC) y el Centro de Estudios Conservacionistas (CECON). El inventario incluye, además, la revisión parcial de documentos históricos

relacionados con la flora de Guatemala (21).

Por su lado Cáceres, Girón y Castillo (5), mencionan la importancia de algunas de las acciones que se han llevado a cabo en los últimos años en la detección, caracterización, recuperación, utilización e investigación de especies medicinales del país, como lo es el trabajo pionero en el tema de la sistematización de las plantas útiles con énfasis en aquellas de uso medicinal y alimenticio llevado a cabo por CEMAT durante los años 1976-89 cuyas acciones brindaron las bases para el establecimiento de un programa nacional de plantas medicinales (1989-95).

Así mismo, de gran importancia ha sido el estudio etnobotánico llevado a cabo con la población garífuna de Guatemala en el municipio de Livingston como parte de las acciones de CEMAT. También las encuestas llevadas a cabo por la Facultad de Agronomía y Escuela de Biología a través de la Dirección General de Investigación (DIGI) de la USAC en los departamentos de Huehuetenango y San Marcos, así como un estudio preliminar para la detección de la flora medicinal del Petén llevado a cabo por el Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE) (5).

Es importante también, destacar el trabajo que ha llevado a cabo la Comisión Nacional de Plantas Medicinales (CONAPLAMED) respecto a actividades multidisciplinarias de revalidación de las plantas medicinales en Guatemala a través de una coordinación interinstitucional (5, 10).

Otro proyecto realizado por CONAPLAMED, es el estudio sobre el desarrollo de agrotecnología y bases para la industrialización de plantas medicinales silvestres con potencial de exportación, ejecutado con el apoyo organizativo de la Gremial de Exportadores de Productos No Tradicionales (GEXPRONT) y el apoyo financiero de varias empresas interesadas, junto con la FAUSAC e ICTA (5).

El valor de la biodiversidad en la búsqueda de una flora farmacológicamente activa, ha sido objeto de varios estudios en el país, demostrando que por lo menos un 60% de la flora estudiada tiene la actividad terapéutica buscada (5).

Cáceres, Girón y Castillo (5), resaltan que la estrategia general para la conservación de la biodiversidad medicinal es primero hacer una determinación botánica de los especímenes de interés, luego el manejo de los bosques, la domesticación, cultivo y detección de mercados para los productos, actividades que son incipientes en nuestro país pero que es posible realizar aunque sea con los modestos recursos disponibles y que permitirá no solo garantizar la conservación de muchas de las especies útiles sino que también crear nuevas fuentes de trabajo y productos estratégicos con mayor valor agregado.

3.1.3 Comercialización de plantas medicinales.

En Guatemala se comercializan alrededor de 200 plantas medicinales. Su presentación es diversa y se venden en ventas ambulantes, mercados nacionales, laboratorios, droguerías, centros farmacéuticos, supermercados y clínicas. En el país funcionan ocho laboratorios que producen alrededor de 115 productos fitofarmacéuticos los cuales satisfacen únicamente el 5% de la demanda (21).

Entre las plantas que se comercializan en forma de tisanes encontramos a la zarzaparrilla (*Smilax spp.*).

Si bien no hay estadísticas formales sobre la comercialización de plantas medicinales para la exportación, Orellana, Perla y Herrera (21), proporcionan una lista recopilada por Girón (1993), para la Comisión Nacional de Plantas Medicinales (CONAPLAMED), que proporciona una idea aproximada.

Especie	Mercado	Producto
<i>Aloe vera</i>	USA, Alemania	filete fresco
<i>Aloe vera</i>	Canadá, Asia	polvo de hoja
<i>Aloe vera</i>	USA	concentrado
<i>Bixa orellana</i>	Europa	semilla
<i>Capsicum spp.</i>	USA, Europa	fruto
<i>Cinchona pubescens</i>	Europa	corteza
<i>Curcuma longa</i>	Europa	rizoma
<i>Cymbopogon citratus</i>	Europa	aceite
<i>Dioscorea spp.</i>	Europa	rizoma
<i>Elettaria cardamomun</i>	Europa, Canadá	semilla
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Centroamérica	corola
<i>Smilax spp.</i>	Europa	rizoma
<i>Zingiber spp.</i>	USA, Europa	rizoma
<i>Tagetes lucida</i>	Centroamérica	deshidratada
<i>Petiveria alliacea</i>	Europa	-----
<i>Valeriana edulis</i>	México	raíz seca

Según Girón, citada por Orellana, Perla y Herrera (21), al menos veinte plantas medicinales de Guatemala poseen potencial de exportación, mencionando entre ellas a la zarzaparrilla (*Smilax spp.*), en forma de extracto y sarsasapogenina a los mercados potenciales de Europa y USA. .

3.1.3.A Peligro de extinción de las especies.

Principalmente las especies silvestres nativas, se obtienen por medio de colectas en los bosques. Algunas de estas especies están sufriendo erosión genética acelerada; es decir, que están perdiendo su variabilidad, pues se colectan los mejores ejemplares permitiendo de esta manera la reducción o la eliminación del patrimonio genético de las poblaciones silvestres, principalmente como consecuencia de los altos volúmenes de extracción en sus ambientes naturales. Tal es el caso de *Tagetes lucida* (pericón), *Lippia dulcis* (orozús), y *Petiveria alliacea* (apazín) (21).

Orellana, Perla y Herrera (21), indican que aunque no existen datos de estudios específicos sobre peligro de extinción de algunas de estas especies, observaciones preliminares indican que aparentemente las zarzaparrillas (*Smilax spp.*), y dioscoreas (*Dioscoreas spp.*) podrían considerarse dentro de esta categoría.

El cultivo de plantas medicinales que hasta hoy existe en Guatemala se da en huertos familiares, huertos comerciales y cultivo en fincas (21).

3.1.4 Domesticación de plantas medicinales

El ser humano ha estado sobre la tierra aproximadamente dos millones de años. Durante 99% de este lapso ha vivido como recolector-cazador, hace dos mil años comenzó a domesticar plantas y animales y lleva algo menos de doscientos años en una sociedad industrial (Lee y Devore, 1968). Esta aseveración, en relación con las plantas medicinales, es concordante con las actividades que se han realizado alrededor de la domesticación de plantas. Una preocupación primordial del ser humano, es mantener su salud en buen estado, es evidente entonces, que el uso y manipuleo de las plantas medicinales se remonta al momento mismo del surgimiento del ser humano sobre la tierra. Esta situación se evidencia con el gran número de plantas medicinales empleadas por la sociedad en el mundo y su importancia en escritos religiosos de diferentes culturas (20).

De acuerdo con León (1992), citado por Ocampo (20), existen dos factores principales que determinan el proceso de domesticación:

- a.- La habilidad del hombre para escoger, manejar y conservar las especies útiles, la cual depende de la capacidad innata y del grado de cultura.
- b.- La riqueza de especies en un área determinada, que ofrezca un material amplio y variado donde el hombre pueda escoger los elementos que necesita.

La diferencia clave entre domesticación de plantas en forma genérica y plantas medicinales en específico es simple: las actividades de mejoramiento que conlleven hacia su domesticación deben considerar el mantener o promover la presencia de metabolitos secundarios básicos en la actividad biológica de la especie (19).

La Zarparrilla (*Smilax sp.*), liana propia del bosque tropical húmedo, de amplio uso por los grupos nativos de América como depurativo de la sangre, fue un importante recurso vegetal para la economía durante la colonia y aún en nuestros días. A pesar de la antigüedad de esta situación, no existe hoy día una tecnología apropiada para su manejo en condiciones naturales (20).

3.1.4.A Biotecnología. El cultivo de tejidos vegetales, una alternativa en la propagación de plantas medicinales.

El término biotecnología comprende un extenso grupo de tecnologías útiles con amplias y diversas aplicaciones en la industria y el comercio. En los términos más sencillos podría definirse como la aplicación de sistemas y organismos biológicos en procesos técnicos industriales, o como cualquier técnica que use organismos vivos o partes de estos para producir o modificar productos, mejorar plantas o animales o desarrollar microorganismos para usos específicos (Kingsbury 1988) (15, 17). La biotecnología, a través del cultivo de tejidos vegetales, abarca la investigación sobre la propagación vegetal, el desarrollo de nuevas variedades de plantas, la identificación y detección de organismos patógenos y la identificación y producción de productos naturales (por lo general metabolitos secundarios) a partir de células vegetales, es por ello que la biotecnología en el contexto agrícola, ofrece enormes posibilidades para el mejoramiento de las variedades vegetales y animales, el aumento en el rendimiento y el desarrollo de nuevos productos así como la conservación de plantas amenazadas por la extinción. (16)

La aplicación de la biotecnología a las plantas ha producido un conjunto de herramientas de gran potencial para el

beneficio de la agricultura, el manejo racional de los productos no maderables del bosque y el bosque en general. Los resultados de la aplicación de estas tecnologías están suministrando nuevos enfoques para superar los problemas de las plantas en ambientes difíciles, estreses bióticos por plagas y enfermedades y para controlar la extinción de plantas amenazadas por la extracción irracional (23).

La biotecnología, como elemento importante en la domesticación, tiene un inmenso potencial bajo el concepto de desarrollo sostenible a través de las siguientes actividades (Figura 1):

- Multiplicación masiva de genotipos selectos
- Producción de plantas libres de enfermedades
- Producción y uso de genotipos resistentes, lo que reduce la aplicación de agroquímicos
- Producción de combinaciones génicas a través de ingeniería genética
- Conservación e intercambio de germoplasma

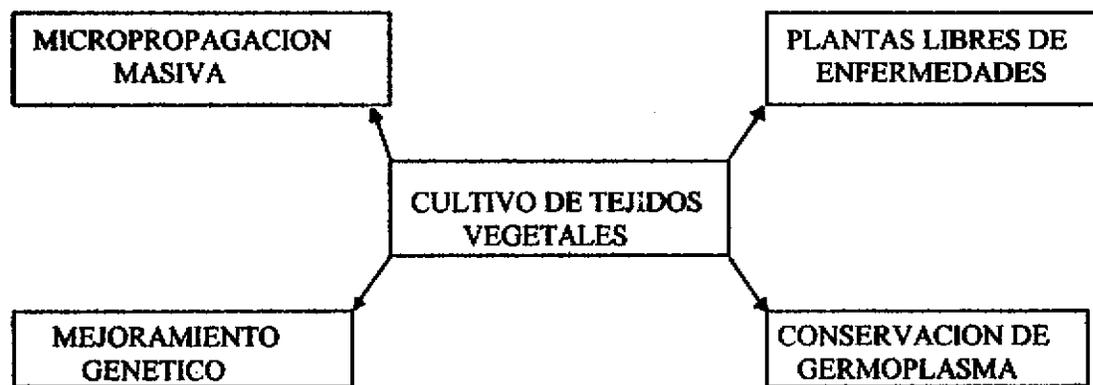


Figura 1. Aplicación de la biotecnología en la domesticación de plantas. Tomado de Palma e Hidalgo (1994) (23).

Palma e Hidalgo (23), exponen que la micropropagación o multiplicación masiva de plantas, ha sido la primera aplicación de la biotecnología a la agricultura, es por eso importante desarrollar metodologías para la propagación *in vitro* de plantas medicinales.

En el mejoramiento genético, la biotecnología ofrece alternativas muy novedosas que acortan los períodos de producción de material mejorado y aumentan la precisión de los procesos de mejoramiento. Para la conservación de germoplasma es una herramienta valiosa. La deforestación produce un deterioro genético extremo en las plantas y árboles

del bosque, lo que amenaza gran cantidad de especies y su variabilidad genética. Es fundamental desarrollar métodos de conservación de germoplasma, entre los que se encuentra la conservación *in vitro* (23).

3.1.4.A.a Cultivo de tejidos.

El cultivo de tejidos *in vitro*, consiste esencialmente, en el aislamiento de un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido, órgano), que se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. La interacción de los distintos factores que intervienen en el cultivo de tejidos (explante, normas de asepsia, medios de cultivo y condiciones ambientales), determinará las respuestas que se obtengan *in vitro*. El cultivo de tejidos se fundamenta en varios principios, pero quizá los más importantes son la totipotencialidad celular, propuesta por Haberlandt, 1902, y la hipótesis del balance hormonal, sugerida por Skoog *et al.*, (1957) (14, 30).

3.1.4.A.a.i. Explante.

La elección de un explante apropiado, constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos, lo cual está determinado principalmente por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. En relación con la especie vegetal utilizada, es importante tener en cuenta la variabilidad asociada con el genotipo de las plantas. Las respuestas de los explantes cultivados *in vitro* pueden variar notablemente con el estado de desarrollo y edad ontogénica de los mismos, por ejemplo: la propagación *in vitro* de la mayoría de las plantas leñosas, requiere de la utilización de explantes provenientes de materiales juveniles (Dodds, 1983). (14, 29).

3.1.4.A.a.ii. Métodos asépticos.

Las plantas normalmente se encuentran contaminadas por microorganismos, que no son patógenos bajo condiciones normales. Sin embargo cuando el tejido o el órgano es cultivado *in vitro*, el crecimiento de los microorganismos limita el desarrollo de las células y destruye tales cultivos, compitiendo con el explante por el medio de cultivo o modificando el mismo (2, 14).

Para tener éxito en el establecimiento de cultivo de tejidos, así como para la posterior incubación de los mismos es importante la estricta desinfección superficial de los explantes y esterilización de los medios de cultivo, trabajar en

ambientes adecuados, así como la manipulación de los explantes observando las normas asépticas básicas (14, 29, 30).

Comúnmente se utilizan diversos productos químicos para la desinfección del material vegetal, o superficies donde se trabajarán cultivo de tejidos, pero deben usarse preferentemente aquellos productos que sean fácilmente removidos para no provocar daño a los tejidos vegetales. También es recomendable emplear dos diferentes desinfectantes (12, 14).

Para la esterilización de los medios de cultivo y cristalería, se utiliza con mucha frecuencia el calor. Se puede usar en forma de llama directa, de calor húmedo (vapor), o de calor seco (aire caliente). Cuando se utiliza el calor húmedo, puede ser en forma de vapor abierto o de vapor bajo presión. (2, 14, 30).

3.1.4.A.a.iii Medio de cultivo

Muchas veces el éxito o fracaso del cultivo de tejidos de plantas está determinado por la composición química del medio de cultivo seleccionado y otros factores ambientales.

Un medio de cultivo es una mezcla de determinadas sustancias con o sin gelificación sobre el cual o dentro del cual crecen los tejidos o explantes, este debe poseer los componentes nutritivos básicos y su soporte, que incluyen por lo general: nutrimentos minerales, vitaminas, carbono, agentes gelificantes y sustancias reguladoras del crecimiento. Hasta la presente época, han sido desarrollados diferentes medios de cultivo de acuerdo a la especie vegetal a cultivar y los objetivos perseguidos. Dentro de los más conocidos se pueden mencionar los medios de White (1935), de Gautheret (1937), el B5 de Gamborg *et al.*, (1968), el de Schenk y Hildebrandt (SH, 1972) y el de Murashige y Skoog (MS, 1962), que es uno de los medios más utilizados en la actualidad. En cuanto a los reguladores del crecimiento, las auxinas como el 2-4-D, ANA, AIA, y AIB, y las citocininas como: KIN, BAP, ZEA, así como las giberelinas como AG, son las más utilizadas en el establecimiento de cultivos *in vitro*. (2, 12, 14, 27, 30).

3.1.4.A.b. Establecimiento de cultivos *in vitro*

Para cultivar células, tejidos u órganos *in vitro*, se siguen una serie de principios básicos: inicialmente es necesario seleccionar y separar de la planta el material que se desea cultivar. El siguiente paso consistirá en eliminar los microorganismos que se encuentran contaminando el material vegetal. Por último, se debe proporcionar a las células, tejidos u órganos un medio ambiente apropiado a través de medios de cultivo sintéticos y condiciones de incubación adecuadas.

Las condiciones ambientales son importantes en el cultivo de tejidos, por lo general se usa en el establecimiento de los mismos una fuente luminosa con lámparas fluorescentes (tipo luz de día), y lámparas incandescentes que brindan entre 1000 y 4000 lux de iluminación. Para el ciclo de fotoperíodo/escotoperíodo de 16/8 horas. En general temperaturas entre 25 y 28°C son recomendables en el establecimiento de los cultivos de plantas. (14, 30).

Los cultivos *in vitro* pueden iniciarse prácticamente a partir de cualquier parte de la planta. Sin embargo, la fuente inicial de material vegetal puede ser determinante para el éxito en el establecimiento de los cultivos. (12, 30).

3.1.4.A.c. Micropropagación

Micropropagación, es referirse al proceso a través del cual, se colocan en un medio de cultivo explantes de tejidos, órganos u otras estructuras de tejidos vegetales, haciéndolo asépticamente para lograr la propagación masiva de plantas bajo condiciones *in vitro* (14).

Los pasos que conlleva la micropropagación (Murashige, 1974) pueden definirse de la manera siguiente:

- a) Selección, desinfección y siembra del explante en un medio de cultivo.
- b) Multiplicación de brotes.
- c) Transplante a un medio de enraizamiento, y finalmente transferencia al campo definitivo. (14).

3.1.4.A.c.i. Micropropagación por brotes axilares.

La micropropagación por brotes axilares puede hacerse utilizando ápices del tallo o nudos con una o varias yemas axilares. Los ápices que se usan generalmente son de dos centímetros de largo y los nudos pueden ser de ápices terminales o laterales, con parte del tallo incorporado. Los explantes de mayor tamaño son fácil de manipular y tienen mayores posibilidades de sobrevivencia, pero también resulta más difícil su descontaminación por el tamaño del explante (12).

La ventaja de éste método de propagación, es la estabilidad genética que muestran los individuos regenerados ya que estos provienen de una multiplicación clonal. (12).

3.1.4.A.c.ii Micropropagación por brotes adventicios; morfogénesis, naturaleza e inducción en cultivo *in vitro*, y embriogénesis somática.

La habilidad de algunas especies de plantas de desarrollar meristemas secundarios y brotes adventicios ha sido explorada en micropropagación. Los brotes adventicios surgen directamente del tejido del explante, lo que se conoce como organogénesis *de novo* (6, 12).

Los órganos nuevos tales como brotes y raíces pueden ser inducidos para desarrollarse sobre tejidos de plantas cultivadas. Tales órganos se dice que son adventicios. La creación de la forma nueva y organización, cuando previamente se carecía se llama morfogénesis u organogénesis. Los tejidos y órganos que tienen la capacidad para morfogénesis/organogénesis se dice que son morfogénicos (morfogenéticos) u organogénicos (organogenéticos). Hasta cierto punto ha sido posible obtener formación *de novo* (adventicio) de:

a) brotes (caulogénesis) y raíces (rizogénesis) en forma separada: la formación de hojas en forma adventicia *in vitro* generalmente denota la presencia de un meristemo de brote. Algunas veces las hojas se presentan sin la formación de brote aparente: las opiniones son divididas en si tales hojas pueden surgir *de novo*, o si un meristemo brote pudo estar presente primero y debilitó después su desarrollo (30, 32).

b) embriones que son similares estructuralmente a los embriones encontrados en semillas verdaderas. Tales embriones a menudo desarrollan una región equivalente al suspensor de los embriones cigóticos y, a diferencia de las yemas de brote y raíz, tienen un polo de brote y otro de raíz. Para distinguirlos de los embriones cigóticos o de semilla, los embriones producidos de células o tejidos del cuerpo de la planta se llaman embriones somáticos (o embrioides) y el proceso conduciendo a su principio es llamado embriogénesis. La palabra "embrioides" ha sido especialmente usada cuando no ha estado claro si las estructuras parecidas a embriones vistas en los cultivos fueron verdaderamente el equivalente somático de los embriones cigóticos. La embriogénesis somática es ahora un evento ampliamente observado y documentado que el embrión somático ha sido el término preferido (11, 30, 32).

c) flores, primordios de flores o partes del perianto, la formación de flores o partes florales es poco común ocurriendo solamente bajo circunstancias especiales y no es relevante para la propagación de plantas.

La caulogénesis, rizogénesis y embriogénesis son importantes en la multiplicación de plantas. Las plantas nuevas son rara vez obtenidas en cultivo por la unión de brotes y raíces formados en forma independiente en callos; esto es porque las uniones vasculares entre los dos tienden a ser no confiables. La regeneración de plántulas es por tanto mejor llevada

a cabo a partir de brotes adventicios que después son enraizados, o de embriones somáticos. Los brotes, raíces o embriones somáticos surgen de células únicas, o grupos de células, que vienen inducidas por las condiciones de cultivo para volverse centros de división celular activa (meristemos morfogénicos) cada cual capaz de producir un órgano (27, 30).

La morfogénesis ha sido observada *in vitro* en numerosas plantas de varios géneros, pero no puede ser todavía inducida en forma general. Aun dentro de especies únicas, las variedades pueden ser recalcitrantes (6, 27).

Los embriones somáticos pueden ser inducidos directamente del explante, sin que tenga lugar la formación previa del callo. Estos pueden formarse directamente de grupos de células o células individuales dentro del explante original. (26, 30).

Por otro lado los embriones somáticos pueden ocurrir por vía indirecta, es decir, a través de una proliferación celular, que conlleva a la formación de callo a partir de un explante adecuado. Los callos son obtenidos cuando el explante es sembrado en un medio de cultivo conteniendo relativamente altos niveles de auxinas con o sin citocininas. Los callos pueden ser multiplicados y un cultivo de suspensión puede ser obtenido a través del subcultivo de callos en un medio líquido de la misma composición. Cuando las auxinas son reducidas o eliminadas del medio, se pueden formar brotes o embriones (14, 29).

Los embriones somáticos pueden ser transferidos a un medio de cultivo donde pueden germinar y crecer hasta llegar a un estado de planta completa normal. (14, 29, 32).

3.1.4.A.c.iii. Micropropagación por formación de órganos de almacenamiento.

Muchos cultivos y plantas ornamentales son normalmente propagados y conservados en forma de órganos de almacenamiento. Este tipo de órganos pueden ser también producidos *in vitro*, y proveer una forma de micropropagación, como los microtubérculos y los bulbillos (14, 29).

3.1.4.A.c.iv. Micropropagación por microinjerto.

La técnica consiste en utilizar yemas de la planta seleccionada, desinfectada e injertarla sobre un patrón proveniente de semilla y que ha sido germinado *in vitro*. Este procedimiento puede ser utilizado para multiplicar plantas libres de patógenos. (14).

3.1.4.A.d. El cultivo de tejidos para la obtención de plantas libres de patógenos.

El desarrollo de ápices *in vitro* ha contribuido significativamente al conocimiento y aplicación práctica en tres aspectos: a) morfogénesis; b) multiplicación masiva de clones y c) obtención, conservación y establecimiento de plantas libres de patógenos.

El cultivo de meristemas es actualmente utilizado para la eliminación de enfermedades en las plantas, las cuales generalmente mantienen la integridad genética de las plantas que les dieron origen (14, 30).

La termoterapia (tratamiento por calor), temperaturas entre 33 y 40°C (constante o alternadamente) de los materiales parentales por un determinado tiempo, seguido por el cultivo de los meristemas apicales, es considerado como un procedimiento que incrementa el número de meristemas que pueden ser regenerados a plántulas y el número de plantas libres de virus (14, 29).

La quimioterapia (tratamiento con productos químicos), no es considerada como un proceso de eliminación de virus en plantas infectadas, sin embargo, un producto conocido como ribavirín, que es un ribosida sintético, a mostrado incrementar la frecuencia de producción de progenie libre de virus (Hansen y Lane, 1985) (14). Otras sustancias antiviral incluyen análogos de la purina y pirimidina, aminoácidos, reguladores del crecimiento, antibióticos y otras sustancias. La quimioterapia podría causar fitotoxicidad cuando su aplicación es concentrada, además de ser un método caro. (14).

Villalobos, citando a Losaya Saldaña (30), recomienda, sin embargo, que considerando que muchos patógenos, algunos virus inclusive, se pueden eliminar sin necesidad de acudir al cultivo de tejidos, usar esta técnica, sólo cuando otras alternativas hayan sido agotadas.

3.1.4.A.e. El cultivo de tejidos para el mejoramiento genético de las plantas.

3.1.4.A.e.i. Cultivo de embriones y óvulos.

López Peralta, citado por Villalobos (30), afirma que el cultivo *in vitro* de embriones facilita el estudio de los factores que regulan el crecimiento de los órganos de una planta y de los aspectos metabólicos y bioquímicos de la germinación.

En la práctica, el cultivo de embriones se ha aplicado en la obtención de plantas a partir de híbridos no viables y al estudio de la interacción huésped-patógeno, además de la reducción del ciclo de desarrollo de nuevas variedades.

Otra de las aplicaciones del cultivo de embriones es el rescate de material de propagación en los frutales deciduos, cuyas semillas son generalmente de baja viabilidad o donde ocurre aborto de embriones. También es utilizado para romper la dormancia en semillas, acortando el ciclo de cultivo o crecimiento en meses o incluso años (Randolph, 1945) (32). Esto también puede utilizarse cuando semillas importantes pierden su viabilidad durante el almacenamiento y presentan una pobre germinación (Biggs *et al*). 1986) (14, 32)

Dependiendo del estado de desarrollo, los embriones pueden cultivarse maduros y completamente diferenciados, o bien embriones inmaduros en fase de división temprana o proembriones (30).

3.1.4.A.e.ii. Cultivo de anteras.

Mediante esta técnica las anteras inmaduras que contienen polen en una etapa específica de desarrollo, se colocan en medios en donde el polen inmaduro se divide para formar embriones o callos. Transferidos estos a medios de regeneración, se forman plantas. En la mayoría de los casos se producen plantas haploides estériles, pero en algunas especies ocurre una duplicación espontánea de los cromosomas en las etapas de desarrollo del callo y de regeneración de la planta (27).

Como fuente de anteras se utilizan botones florales completamente cerrados. La superficie externa de los botones es desinfectada, enseguida se retiran los sépalos y pétalos, y los estambres se transfieren a una caja de petri estéril. Una de las anteras se secciona para verificar el estado de desarrollo de los granos de polen y en caso de que sea el apropiado, se eliminan cuidadosamente los filamentos de los estambres, y las anteras se transfieren a un medio de cultivo semisólido o líquido (27, 29).

Durante el período de incubación, las anteras se abren por la presión ejercida por el crecimiento de los embriones o del tejido calloso originado en los granos de polen. Los embriones se desarrollan y forman plántulas que emergen de las anteras. Al alcanzar un tamaño de 3-5 cms., se deben transferir individualmente a un medio de cultivo que favorezca su desarrollo, para posteriormente trasladarlas al suelo (14, 27, 30).

3.1.4.A.e.iii. Variación somaclonal.

La variación somaclonal, es la variación originada en cultivos de células de tejidos *in vitro*. Estas variaciones se manifiestan como mutaciones heredables a las progenies de las plantas regeneradas. Los somaclonas son individuos

regenerados *in vitro*, que han pasado por una fase de callosidad (masa de células no organizada), entre el tejido y la planta regenerada (6).

La variación somaclonal, resulta tanto de las diferencias genéticas que preexisten en las células somáticas del explante, como de efectos inducidos por los componentes del medio de cultivo. Por consiguiente, la variación somaclonal se puede usar, con mucha frecuencia, para recuperar la variación genética natural de una variedad (18).

La variación somaclonal es muy útil para incorporar nuevas características a una variedad, o para modificar las que esta tiene, en efecto, la variabilidad genética inherente al somacultivo permite mejorar significativamente el valor agronómico de una especie cultivada. Es además importante, donde la uniformidad de las plantas obtenidas del cultivo de tejidos, sea esencial, como en la micropropagación; es importante, en tercer lugar para la conservación del germoplasma *in vitro*; y es necesaria, finalmente, para controlar el mecanismo que genera esa misma variación (8).

3.1.4.A.e.iv. Cultivo y fusión de protoplastos.

Debido a la ausencia de pared celular en las células vegetales, los protoplastos son adecuados para manipulaciones genéticas, que no serían posible con plantas o células intactas. La liberación de protoplastos se realiza por diferentes métodos, tanto mecánicos como químicos, siendo el más utilizado, posiblemente la digestión de la pared celular por enzimas (14).

Las células vegetales tienen la capacidad de desarrollar su potencial morfogenético para convertirse en plantas completas. De igual manera los protoplastos en cultivo regeneran una pared celular a su alrededor y sufren repetidas divisiones hasta formar un callo y mediante manipulaciones *in vitro* puede inducirse la diferenciación de una planta a partir del callo (29, 30).

Uno de los usos más importantes del cultivo de protoplastos, es la hibridación somática, en el caso de especies incompatibles, y en los casos en que los métodos tradicionales de fitomejoramiento sean limitados.

La fusión de protoplastos, es una alternativa para la incorporación de características favorables entre genotipos diferentes y puede ocurrir espontáneamente durante la degradación de la pared. Esta fusión parece deberse a la presencia de los plasmodesmos, los cuales se expanden y finalmente se colapsan, produciendo la fusión (30).

La fusión de protoplastos, es conocida también, como hibridación somática y tiene importancia en los siguientes

aspectos del mejoramiento genético de plantas: producción de híbridos somáticos anfídiploides y fértiles de especies sexualmente incompatibles, producción de líneas heterocigóticas dentro de una especie que normalmente sólo se propaga por vía vegetativa, la transferencia de sólo una parte de la información nuclear, de una especie a otra, y la transferencia de información genética citoplásmica de una línea o especie a otra (14, 30).

3.1.4.A.e.v. Ingeniería genética.

Consiste en la manipulación y transferencia de genes en plantas, con el objetivo de transferir nuevas o mejores características a dichas plantas. Esta técnica puede estar orientada a diferentes fines, por ejemplo, resistencia a plagas de insectos, resistencia a virus, resistencia a herbicidas, mejorar el contenido nutricional o mejorar las condiciones fisiológicas de las plantas. La ingeniería genética, en sus avances más recientes en la transformación de las plantas, ha conducido a la inserción de genes de una especie a otra (Beachy R, 1988) (3).

3.2. MARCO REFERENCIAL.

3.2.1 Descripción general de la zarzaparrilla

Las plantas de zarzaparrilla (*Smilax spp.*), también conocidas en Guatemala, con los nombres vernáculos de zarzaparrilla y bejuco de la vida en Santa Rosa, Jalapa y Quetzaltenango; zarzaparrilla, curlo, y corona de Cristo en Sacatepéquez; zarzaparrilla y diente de chucho en San Marcos y Alta Verapaz; palo de la vida, en Suchitepéquez; uña de gato en algunos lugares de Alta Verapaz y Suchitepéquez; zarzaparrilla en Sololá; quix en Huehuetenango; sinaca en Izabal y cuculmeca roja en Petén, pertenecen a la familia Smilacaceae, que comprenden por lo general plantas arbustivas y trepadoras, a veces herbáceas o erectas, rizomatosas, frecuentemente provistas de zarcillos y/o espinos (24).

La zarzaparrilla es una planta perenne, que trepa como un bejuco hasta la copa de los árboles o alargándose menos en lugares descubiertos, formando una maraña difícil de atravesar porque se ase a cuanto halla a su alcance por medio de zarcillos (Figura 2). Su porción subterránea esta constituida por un rizoma de donde se generan raíces (1, 24).

La planta en su parte aérea tiene ramas delgadas, angulosas, más o menos espinosas que crece en zigzag. Las hojas se hallan esparcidas a lo largo del tallo y son coriáceas de forma extremadamente variada, por lo general con la base acorazonada, a veces muy anchas, otras veces estrechas y prolongadas (1).

Las flores son unisexuales, raras veces son hermafroditas y por lo común son pequeñas. Las flores masculinas presentan 6 estambres a veces en número mayor o menor. Las flores femeninas se componen de un ovario sépero, trilocular con 1 o 2 óvulos. El ovario es rudimentario y puede estar presente o ausente. El fruto es carnoso con 1 a 3 semillas de embrión pequeño y endospermo óseo (1).

En Guatemala la planta de zarzaparrilla es extraída o recolectada en las zonas de crecimiento natural de las especies, es por ello que observaciones preliminares indican que aparentemente las zarzaparrillas (*Smilax spp.*) se encuentran amenazadas o en peligro de extinción, y en ello concuerdan Orellana, Perla y Herrera (21); y Cáceres, Girón y Castillo (5).

Se considera que posee propiedades antimicrobianas, tónicas, depurativas, febrífugas y antimaláricas. Se ha podido demostrar sus propiedades antifúngicas. (Orellana, Perla y Herrera 1994) (21).

En nuestro país la zarzaparrilla, es comercializada en forma de extracto líquido, pomada, tintura, deshidratada en bolsa, tisana, y cápsulas. En la actualidad se comercializan sus rizomas hacia Europa y posee gran potencial para la exportación a mercados de Europa y USA. Es por ello que se consideran a las zarzaparrillas, junto a

otras plantas, como plantas medicinales prioritarias de Guatemala (21).

Cáceres, Girón y Castillo (5), indican que son plantas de interés comercial a nivel nacional, regional e internacional.

3.2.1.A Descripción del género *Smilax*.

En cuanto a la clasificación en la sistemática actual en uso, la zarzaparrilla pertenece a la familia *Smilacaceae*; dentro de la cual se reconocen 4 géneros de los cuales 3 comprenden pocas especies y de área geográfica restringida a Australia: *Heterosmilax* con 15 especies, *Rhipogonum* con 7 y *Pseudosmilax* con 2 (1).

Mientras que el cuarto género *Smilax*, tiene una amplia distribución en ambos hemisferios y reúne entre 200 y 350 especies, primordialmente en zonas tropicales y subtropicales extendiéndose en algunos casos a regiones templadas (Heywood 1979).

El género *Smilax* comprende plantas dióicas, 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 erectas, en ocasiones acompañadas también de espinas aciculares, rígidas, largas o finas. Las ramas son floríferas con 1 ó 2 catáfilos en la base. Las hojas son alternas, presentando peciolo persistentes en forma de una vaina estipular cuyo extremo apical se prolonga en zarcillo (1, 10).

Font, 1982, citado por Amador (1), menciona que las flores son pequeñas, de seis pétalos, de color crema, las masculinas con seis estambres y las femeninas con el pistilo ovoide. El fruto es una baya redondeada, sostenida por un corto pedúnculo de las dimensiones de un garbanzo, de color rojo más o menos oscuro, o bien negro cuando el fruto está bien maduro. Todas las bayas originadas de una umbela floral forman un racimo a modo de un racimo de avas. Con tres semillas por fruto, de consistencia muy dura si llegan a madurar. Como es de notarse por lo mencionado anteriormente solo las plantas hembras, las que tienen flores femeninas, producen frutos.

Este género está representado por 13 especies en nuestro país, según lo reporta la flora de Guatemala, consultada por Herrera, Perla y Moreno (21).



Fig. 2 Planta de zarzaparrila. Font (1982) (1).

Las especies de *Smilax* se semejan entre sí y por lo general se distinguen una de la otra en pocos rasgos. Esta situación complica su identificación, en particular por que son plantas dióicas, las flores al igual que los frutos son efímeros, los tallos y las hojas de la porción basal de la planta son distintos de los de las porciones distales (1).

3.2.1.A.a Descripción de la especie *Smilax moranensis* Martens & Galiotti.

Conocida como zarzaparrilla blanca, es una planta trepadora, hasta de 10 m o más de longitud. Posee tallo glabro en cuya porción inferior se encuentran espinas rectas aplanadas y negruzcas, a menudo entremezcladas con otras más cortas y delgadas de color claro y cilíndricas (1, 10).

Los peciolo tienen de 6 a 15 mm de largo. Presentan zarcillos, con frecuencia se encuentran saliendo de los nudos de las ramas floríferas, además de los de las hojas grandes. Las láminas foliares son ovadas, triangular-ovadas a lanceoladas. Las láminas de la parte inferior de la planta tienen hasta 10 cm de largo y hasta 6 cm de ancho, las de la parte superior, de 5 a 7 cm de largo por 2 a 3 cm de ancho con ápice agudo o acuminado. Poseen 5 ó 7 nervaduras principales, presentando nervaduras secundarias reticuladas (1, 10).

Los pedúnculos de las umbelas masculinas son aplanados y de 1 a 2.5 cm de largo. Las umbelas son solitarias, con 10 a 20 flores, de receptáculo cóncavo de unos 3 mm de ancho. Los segmentos del perianto son lanceolados con dimensiones de 5 a 6.5 mm de largo y de 1 a 1.5 mm de ancho. Las anteras tienen alrededor de 2 mm de largo.

Los pedúnculos de las umbelas femeninas son aplanados de 5 a 8 mm de largo. Los segmentos del perianto son lanceolados con dimensiones de 3 a 4 mm de largo hasta 1 mm de ancho. La flor presenta 3 estaminodios. El pedúnculo fructífero tiene hasta 1.5 cm de largo. El fruto es globoso, de color negro en la madurez y tiene de 4 a 6 mm de diámetro (1).

S. moranensis por lo general se encuentra en cañadas húmedas y sombrías de bosques de abeto, pino, encino y bosques mesófilos de montaña. La planta es muy conocida y utilizada en medicina tradicional. (Calderón y Rzedowski, 1994) (1).

3.2.1.A.b Clasificación botánica

Reino:	Vegetal
Subreino:	Embryobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Subclase:	Lilidae
Orden:	Liliales
Familia:	Smilacaceae
Género:	Smilax
Especie:	Moranensis

Smilax moranensis (Martens & Galiotti) (21).

3.2.2 Usos medicinales de la zarzaparrilla.

Se tiene evidencias que la planta de zarzaparrilla era utilizada con fines medicinales por los mexicas, aztecas, zapotecas, mayas y totonacas, aunque no se conoce con precisión las dolencias que curaban con dichas especies. Los españoles encargados de los registros sobre la herbolaria indígena pronto observaron que se hallaban frente a las zarzaparrillas de América, cuyo uso medicinal creían conocer con exactitud (1).

La planta fue introducida en Europa 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 (Rafatullah 1991; Trease y Evans 1988). En la farmacopea de los Estados Unidos, los principios activos de la planta fueron registrados en 1942. En la medicina indú y greco-árabe los principios activos son todavía utilizados para tratamiento de enfermedades del hígado, inflamación y deficiencia renal. (Rafatullah *et al*, 1991) (1).

Las raíces y los rizomas de estas plantas han tenido diversos usos en la medicina tradicional como: tónica, antirreumático, diurético y para el tratamiento de enfermedades de la piel y el hígado (Rafatullah 1991; James 1985) (1).

Duke, mencionado por Amador (1), también expone los usos que tradicionalmente se han dado a la zarzaparrilla que entre otros son como tonificante sanguíneo, para combatir el cáncer, la lepra, la gonorrea, la sífilis, la fiebre y el

reumatismo. Así también para contrarrestar problemas de obesidad, herpes y del hígado. En la actualidad la aplicación más importante de la zarzaparrilla es en la industria farmacéutica donde se utiliza para facilitar la absorción de otros fármacos. La zarzaparrilla gozó en otro tiempo de gran reputación en el tratamiento de la sífilis, del reumatismo y de ciertas dolencias de la piel. (James 1985; Trease y Evans 1988) (1, 10).

El género *Smilax*, posee algunas especies de valor tanto comercial como medicinal que son fuente de la droga (producto) llamado sarsaparilla, que se le atribuyen las siguientes propiedades medicinales: estimulante y sudorífico, se le consideró un gran remedio favorito para las enfermedades generales. Actualmente es empleada contra reumatismos, enfermedades escrufulosas y algunas afecciones cutáneas (24, 28).

Además de los usos medicinales de las zarzaparrillas, también, algunos compuestos presentes en la planta se emplea en la industria alimenticia como saborizantes en confitería y en la elaboración de almibares y por sus propiedades fisicoquímicas se utilizan como agente espumante en bebidas y como texturizante para dar consistencia a postres derivados de la leche (Prince *et al.* 1987) (1, 28)

Duke, citado por Amador (1), también menciona que los extractos de raíces son utilizados en México y el sur de los Estados Unidos en la preparación de bebidas refrescantes sin contenido de alcohol. Además en esta última región el extracto de zarzaparrilla es mezclado con ginseng, jengibre y safrán para elaborar una bebida denominada "root booster" a la que se le atribuyen propiedades afrodisíacas.

3.2.3 Compuestos biológicamente activos de la zarzaparrilla.

La raíz de zarzaparrilla, en sus diversas especies, contiene saponinas o glicósidos saponínicos con importancia medicinal en la época moderna. Dichos compuestos guardan estrecha relación con los esteroides a partir de los cuales se obtiene la cortisona (1).

La zarzaparrilla contiene varios compuestos bioactivos como el sarsaparillosido. Por hidrólisis de este compuesto se derivan las saponinas: parrillina, desglucodesramnoparrillina, desglucoparrillina y asparagósido A, principalmente contenidas en la raíz de la planta. Las propiedades bioactivas de la zarzaparrilla se atribuyen a su contenido de saponinas. (1, 28).

Amador (1), citando a Oakenfull y a Duke, expone que las saponinas son glicósidos que se encuentran principalmente en las plantas. Forman espuma jabonosa cuando son agitadas en agua, característica que da el nombre al grupo de compuestos (del latín sapo, jabón). De manera similar otras características, por ejemplo actividad hemolítica, propiedades ligadas al colesterol y astringencia caracterizan a tipos particulares de saponinas, pero no compartida por todos sus miembros. La zarzaparrilla es considerada una fuente importante de este tipo de compuestos para la industria farmacéutica actual.

3.2.4. Comercialización de la zarzaparrilla

Por más de 400 años, desde la época colonial, la zarzaparrilla ha sido extraída y comercializada, al igual que ha ocurrido con otras tantas especies tropicales valiosas, pero la información sobre estadísticas de producción y su impacto en la economía es escasa y a veces fragmentada (Ocampo 1994). A nivel mundial existe un creciente interés por el uso de las plantas medicinales - tanto en los países desarrollados, en donde una gran cantidad de medicamentos son elaborados a partir de la identificación de ingredientes activos obtenidos de material vegetal sacado directamente de los bosques tropicales - como en los países en desarrollo, cuyas condiciones económicas hacen de la medicina natural una alternativa importante y en algunos casos la única opción accesible en muchas comunidades (1, 10)

Si bien Guatemala, al igual que el resto de países de Latinoamérica, ha sido proveedor de materia prima, no hay mucha información sobre la comercialización de la zarzaparrilla en el país. A nivel de estadísticas, se trabaja con datos poco confiables, que se presentan en forma desagregada. Los datos más actualizados indican que entre 1992 y 1995 se exportaron 957 toneladas de plantas medicinales a mercados de Asia, Canadá, Estados Unidos y Europa (9, 10).

Además entre 1996 y 1997, se exportaron a España unas 15 toneladas de *Smilax spp.*, donde son utilizadas por las industrias farmacéuticas para la elaboración de productos terminados, lo cual pone en peligro este género; especialmente, si se tiene en cuenta que es una planta de la que se aprovecha el rizoma, que no se cultiva sistemáticamente y que no existen en el país cultivos extensivos (10, 24). Existe poca información sobre el comercio de esta raíz, sin embargo, en nuestro país, la zarzaparrilla se comercializa en forma de extracto líquido, pomada, tintura, deshidratada en bolsa, tisana, cápsulas y raíz seca (10, 21).

Según Duke, citado por Ocampo (20), México es el mayor productor de raíces secas de zarzaparrilla, seguido por

Honduras y Costa Rica. Estados Unidos importa alrededor de 72 toneladas de México y 3 toneladas de Honduras y Jamaica anualmente. La especie, se identifica como una planta medicinal, aunque también tiene importancia económica en el campo industrial y presenta gran potencial para la exportación en forma de extracto de zarzapogenina a otros mercados internacionales.

Los especímenes que se consumen y exportan se extraen de los bosques sin ningún control técnico. A nivel internacional, principalmente en los mercados europeos la raíz seca cortada alcanzó en 1991 un precio máximo de US\$ 12/kg. El precio de rizoma puede alcanzar US\$ 3/kg en la ciudad de Guatemala, mientras que un producto terminado alcanza un promedio US\$ 5 y un producto con materia prima llevada del país puede costar unos US\$ 10 en el extranjero y ese mismo producto en el país puede alcanzar hasta US\$ 15 - 20 (10).

4. OBJETIVOS

4.1 General:

Determinar la respuesta de la zarzaparrilla *Smilax moranensis* Martens & Galiotti, al cultivo de tejidos *in vitro*, utilizando tejido foliar y diferentes combinaciones de ácido naftalanacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP).

4.2 Específicos:

4.2.1 Estudiar la respuesta de la zarzaparrilla a la inducción de callos y formación de brotes.

4.2.2 Estudiar la respuesta de la zarzaparrilla a la regeneración de plántulas.

5. HIPOTESIS

5.1 El cultivo de tejidos *in vitro* de la zarzaparrilla (*Smilax moranensis* Martens & Galiotti), producirá la inducción de callos y la regeneración de brotes en al menos una de las combinaciones de reguladores del crecimiento utilizadas.

5.2 La zarzaparrilla (*S. moranensis* Martens & Galiotti), regenerará plántulas a partir del cultivo *in vitro* del tejido foliar en al menos una de las combinaciones de reguladores del crecimiento utilizadas.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. METODOS GENERALES

6.1.1 Area experimental

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. El laboratorio está ubicado en el salón C-16, tercer nivel del edificio T8, en la ciudad universitaria, zona 12 de la ciudad de Guatemala.

6.1.2 Medio basal

En todas las etapas que se realizaron en este trabajo, se utilizó el medio nutritivo basal, descrito por Murashige y Skoog (1962) que denominaremos MS, por considerarse el más apropiado, además de ser el que más se ha usado en diversos estudios (1, 23, 30). La composición del medio MS, se presenta en el apéndice 8A

6.1.3 Elaboración de los medios de cultivo.

Para la obtención de los medios de cultivo, se prepararon antes las soluciones madre de concentración conocida. Se tomó como base la preparación de un litro del medio, agregando los ingredientes correspondientes para el MS, y las combinaciones de reguladores del crecimiento correspondientes (cuadro 1). Utilizando también 30 gr/lt., de sacarosa como fuente de carbono y 8 gr/lt., de agar como agente gelificante.

Las soluciones madre de concentración conocida, sirvieron de base, para la preparación del medio MS, a utilizarse en las distintas fases de la investigación, con sus respectivas combinaciones hormonales, ajustándose el pH entre 5.7 y 5.8, con HCl y NaOH al 0.1N y 1.0N.

6.1.3.A. Esterilización de los medios de cultivo

Luego de preparados los medios de cultivo con sus combinaciones hormonales (cuadro 1), se depositaron en frascos de vidrio de 120 ml de capacidad, aproximadamente 25 ml del medio, esterilizándose inmediatamente en el autoclave durante 20 minutos a 121 grados centígrados y 15 libras de presión.

6.1.4 Selección del material experimental

El material utilizado para la micropropagación *in vitro* fueron hojas enteras con su respectivo peciolo de plantas de zarzaparrilla *Smilax moranensis* Martens & Galiotti provenientes de macetas. Fue necesario desinfectar el material vegetal para asegurarse que éste fuera libre de microorganismos contaminantes, para lo cual se procedió de la siguiente manera:

Se cortaron las hojas incluyendo el peciolo, se lavaron cinco veces con agua y jabón líquido, luego se colocó este material vegetal en etanol al 70% volumen/volumen, durante dos minutos, posteriormente se trasladó a un beaker de 100 ml, que contenía hipoclorito de sodio al 20% v/v, durante 20 minutos y finalmente dentro de la cámara de flujo laminar se enjuagó el material vegetal con agua destilada esterilizada.

6.1.4.A Siembra del tejido en el medio de cultivo

La siembra del tejido en el medio de cultivo se realizó en la cámara de flujo laminar, la cual fue desinfectada con anterioridad a cada sesión de trabajo, para lo cual se utilizó alcohol etílico al 70% v/v. Para la manipulación del tejido en la campana de flujo laminar se utilizaron frascos y cajas de petri previamente esterilizadas, así como agua destilada estéril. También se utilizó instrumental como hazas, pinzas, y bisturíes que eran flameados en el mechero cada vez que eran utilizados en la manipulación de los explantes.

6.1.4.A.a Incubación de los cultivos

Las siembras en los medios de cultivo se mantuvieron en el área de incubación. En la etapa de iniciación de los cultivos, los explantes permanecieron dentro de la incubadora bajo condiciones de total oscuridad y con una temperatura media de 25 grados centígrados. Posteriormente los recipientes de vidrio que contenían el material vegetal utilizado para los tres subcultivos realizados en este estudio, se depositaron sobre los anaqueles del cuarto de crecimiento del laboratorio y fueron sometidos a una fuente de luz blanca fluorescente de 1000 a 3000 lux de intensidad aproximadamente y también a una temperatura media de 25 grados centígrados y un fotoperíodo de 16 horas de luz.

6.1.4.B Subcultivos

Con el fin de darle continuidad al proceso iniciado con la siembra de los explantes de hoja con peciolo de

zarparrilla, y observar el desarrollo satisfactorio de los mismos, se realizó en la fase I, un subcultivo, después de la semana once y en la fase II, se establecieron dos subcultivos después de las semanas quince y veintiuno.

6.2 Fases de la investigación

Para facilidades de manejo de la investigación, el estudio se desarrolló en dos fases las cuales fueron: Fase I, que persiguió básicamente la inducción de callos y la regeneración de brotes, para lo cual se subdividió en dos etapas llamadas: iniciación de los cultivos y primer subcultivo y la fase II, que buscaba principalmente la regeneración de brotes y plántulas que también se dividió en dos etapas que fueron: segundo y tercer subcultivos.

6.2.1 Fase I. Inducción de callos y regeneración de brotes

En la primera etapa de la investigación llamada iniciación de los cultivos, se procedió a la siembra de explantes de hoja con peciolo de zarzaparrilla, en el medio basal de Murashige y Skoog, complementado con las respectivas combinaciones de reguladores del crecimiento (ver cuadro 1), en los frascos de vidrio de 120 mm de capacidad, conteniendo cada uno aproximadamente 25 mm del medio de cultivo. Esta etapa se desarrollo bajo condiciones homogéneas de luz, temperatura y humedad dadas por la incubadora. En la segunda etapa o primer subcultivo, los explantes que presentaron algún tipo de respuesta en el paso anterior fueron subcultivados y se depositaron en el cuarto de crecimiento del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala bajo condiciones homogéneas de luz y temperatura.

6.2.1.A Tratamientos

Para estimular la inducción de callos y la regeneración de brotes, a partir de explantes de hoja con peciolo de *S. Moranensis* M & G, se utilizaron durante la fase I de esta investigación siete tratamientos, tanto en la etapa de iniciación de los cultivos, como también para el primer subcultivo.

Los tratamientos evaluados consistieron en seis combinaciones de reguladores del crecimiento que fueron, la auxina ácido naftalanacético -ANA-, y la citocinina bencilaminopurina -BAP-, un medio basal (MS), y un explante (hoja con peciolo), además del respectivo testigo (medio basal MS sin aplicación de reguladores del crecimiento), cuadro 1.

Los tratamientos que se sometieron a evaluación fueron:

Cuadro 1. Tratamientos, medios de cultivo (medio basal MS y sus respectivas combinaciones de reguladores del crecimiento) para inducir callos y regenerar brotes y plántulas en *S. moranensis*, Martens & Galotti.

MEDIO BASAL	ANA mg/lt.	BAP mg/lt.	CONCENTRACIONES en mg/lt.	TRATAMIENTO
MS	0.0	0.0	0.0/0.0	Tratamiento 1 (testigo)
	3.0	0.5	3.0/0.5	Tratamiento 2
		1.0	3.0/1.0	Tratamiento 3
		3.0	3.0/3.0	Tratamiento 4
	5.0	0.5	5.0/0.5	Tratamiento 5
		1.0	5.0/1.0	Tratamiento 6
		3.0	5.0/3.0	Tratamiento 7

6.2.1.B Unidad experimental

Para la etapa de iniciación de los cultivos, estuvo constituida por un frasco de vidrio de 125 ml de capacidad, el cual contenía aproximadamente 25 ml del medio de cultivo correspondiente y un explante, se utilizaron 10 repeticiones, obteniéndose en total 70 unidades experimentales. Para el primer subcultivo, la unidad experimental consistió en un frasco con el medio de cultivo correspondiente (cuadro 1) y un explante con respuesta de la siembra anterior.

6.2.1.C Variables evaluadas

Las variables evaluadas en este estudio fueron:

6.2.1.C.a. Número total de callos inducidos por tratamiento:

Se registró, el número total de masas celulares amorfas (callos), inducidas por tratamiento. Este dato fue tomado al momento del primer subcultivo - semana once -, hasta el final del segundo subcultivo -semana veintiuno -.

6.2.1.C.b. Número promedio de callos inducidos por explante:

También, se registró el número de explantes que presentaron callos en todos los tratamientos, desde el momento del primer subcultivo, hasta el final del segundo subcultivo, para luego hacer una relación entre el número total de callos inducidos y el número de explantes que reportaron respuesta al formar callos, obteniéndose así, el número promedio de callos formados por explante.

6.2.1.C.c. Número total de brotes regenerados por tratamiento:

Para determinar la respuesta de los explantes a las diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento, se tomaron los datos del número total de brotes regenerados en cada uno de los diferentes tratamientos evaluados, desde el inicio del primer subcultivo, y al final de cada subcultivo respectivo, hasta terminar el experimento, que se extendió, hasta la semana veintiocho.

6.2.1.C.d. Número promedio de brotes regenerados por explante:

Se registró el número de explantes, que presentaron respuesta al regenerar brotes, luego, se procedió a hacer la relación entre el número total de brotes regenerados, dividido el número de explantes que presentaban brotes, para obtener el número promedio de brotes por explante. Esto también se realizó, desde el momento del primer subcultivo, hasta el final del experimento.

6.2.1.D Manejo del experimento

Se realizó la siembra de explantes de hoja con peciolo de *Smilax moranensis* Martens & Galiotti en el medio basal de Murashige y Skoog (cuadro 8A), complementado con las respectivas combinaciones de reguladores del crecimiento (ver cuadro 1) en frascos de vidrio de 125 mililitros de capacidad, con 25 ml, del medio, depositando en cada frasco un explante, utilizando un total de diez repeticiones por tratamiento, proporcionando oscuridad total y condiciones

homogéneas de temperatura, para estimular la inducción de callos y la regeneración de brotes en la etapa de iniciación de los cultivos, luego de esta etapa, los explantes que obtuvieron respuesta fueron subcultivados, y depositados sobre los anaques del cuarto de crecimiento del laboratorio de cultivo de tejidos bajo condiciones controladas de luz y temperatura.

A los valores de las variables evaluadas, se les aplicó un análisis descriptivo con base a valores absolutos, porcentajes y medias obtenidas. Con los resultados finales de cada etapa, se elaboraron cuadros y figuras y con el uso de software se generaron diagramas, para una mejor ilustración de las respuestas presentadas.

6.2.2 Fase II. Regeneración de brotes y plántulas

Se continuó evaluando los seis tratamientos originales comparados con el testigo absoluto (cuadro 1). Esta fase estuvo conformada también por dos subcultivos uno después de la semana quince y el otro después de la semana veintiuno, en los cuales fueron subcultivados los explantes provenientes de la fase I. Se continuó observando semanalmente el proceso de formación de callos, brotes y plántulas de zarzaparrilla, y se tomaron datos al término de la semana veintiano y veintiocho.

6.2.2.A Unidad experimental

La unidad experimental consistió en un frasco de vidrio 125 ml de capacidad, con 25 ml del medio de cultivo correspondiente, con sus respectivas combinaciones hormonales de ANA/BAP, en el cual se depositó un explante proveniente de la fase I. El número de repeticiones dependió de la disponibilidad del material proveniente del cultivo *in vitro* de las etapas anteriores.

6.2.2.B Variables evaluadas

Las variables evaluadas en esta fase fueron:

6.2.2.B.a. Número total de callos inducidos por tratamiento

Al finalizar el segundo subcultivo -semana veintiuno después del cultivo-, se registró, el número total de callos formados, debido a que algunos de los tratamientos evaluados, presentaban un importante número de **masas celulares**

amorfos durante el segundo subcultivo.

6.2.2.B.b. Número promedio de callos inducidos por explante

Se tomaron datos del número total de explantes que mostraban respuesta, luego se relacionaron con el número total de callos obtenidos y se estableció el número promedio de callos inducidos por explante, este dato sólo fue tomado al final del segundo subcultivo.

6.2.2.B.c. Número total de brotes regenerados por tratamiento

Para establecer la respuesta de los explantes subcultivados, a la regeneración de brotes, utilizando diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento, se registró, el número total de brotes regenerados, después del segundo y tercer subcultivos, los cuales formaban parte de la fase II, de esta investigación.

6.2.2.B.d. Número promedio de brotes regenerados por explante

Con el número de explantes con respuesta, y el total de brotes formados por cada tratamiento, se estableció el promedio de brotes producidos por explante en las dos etapas.

6.2.2.B.e. Número total de plántulas regeneradas

En forma visual, se estableció, el número total de plántulas regeneradas por tratamiento, este dato se tomó desde el segundo subcultivo, pues fue en esta etapa en que se principio a observar la formación de plántulas en algunos de los tratamientos estudiados, hasta el final del experimento.

6.2.2.B.f. Número total de hojas formadas por tratamiento

Se registró el número total de hojas producidas por las plántulas en cada tratamiento, pues este dato es una relación directa del número total de plántulas formadas en cada uno de ellos.

6.2.2.B.g. Número promedio de hojas formadas por plántula

Para establecer este dato, se relacionó el número total de hojas formadas, con el número total de plántulas regeneradas en cada tratamiento, durante la fase II, los datos fueron registrados al final de las semanas veintiuno y veintiocho.

6.2.2.C Manejo del experimento

Se subcultivaron los explantes que presentaron respuesta en el cultivo *in vitro* de la fase I y se distribuyó un explante por cada frasco que contenía el medio de cultivo respectivo, luego, se ubicaron en el cuarto de crecimiento del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, bajo condiciones de luz y temperatura controladas hasta las semanas veintiuno y veintiocho, al término de las cuales se realizó la toma de datos correspondientes.

Se realizaron observaciones semanales del proceso de formación de brotes y plántulas y cuando fueron completamente visibles, se realizaron conteos en forma visual, del número de callos, brotes y plántulas formados en cada unidad experimental. También se empleó un análisis descriptivo con base a valores absolutos, porcentajes y medias y se construyeron cuadros, figuras y diagramas para la presentación de los resultados.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

Durante el transcurso de la investigación se realizaron continuamente observaciones, visualizándose diferentes respuestas a medida que transcurría el tiempo, desde la formación de tejido no diferenciado hasta la regeneración de plántulas.

A continuación se describen los resultados producidos en cuatro etapas importantes del proceso de formación, desarrollo y crecimiento de callos, brotes y plántulas provenientes de explantes de hoja con peciolo de *Smilax moranensis* Martens & Galiotti.

7.1. Fase I. Inducción de callos y regeneración de brotes

7.1.1. Iniciación del cultivo de tejidos

Los explantes de hoja con peciolo de zarzaparrilla cultivados en recipientes de vidrio de 125 mililitros de capacidad, conteniendo 25 mililitros del medio basal de Murashige & Skoog, complementado con la auxina ácido naftalanacético -ANA- en niveles de 3.0 y 5.0 mg/lt., y la citocinina bencilaminopurina -BAP- en niveles de 0.5, 1.0 y 3.0 mg/lt., que permanecieron 11 semanas en condiciones de total oscuridad dentro de la incubadora formaron callos de consistencia compacta y brotes de apariencia etiolada.

Cuadro 2. Efecto de la concentración de reguladores del crecimiento en la inducción de callos y regeneración de brotes de *S. moranensis* Martens & Galiotti, después de 11 semanas de cultivo.

ANA mg/lt.	BAP mg/lt.	Explantes con callos	Explantes con brotes	Total de callos inducidos	Total de brotes regenerados	Promedio de callos por explante	Promedio de brotes por explante
0.0	0.0	0	4	0	6	0	1.5
3.0	0.5	14	7	17	10	1.21	1.43
	1.0	9	5	28	15	3.11	3.0
	3.0	7	7	13	7	1.86	1.0
5.0	0.5	15	7	31	8	2.07	1.14
	1.0	7	5	39	8	5.57	1.6
	3.0	8	4	12	7	1.5	1.75

7.1.1.A. Número total de callos inducidos por tratamiento

Al final de esta etapa todos los tratamientos evaluados formaron callos, no así, los explantes del tratamiento testigo, pero se destacaron en la formación de callos los que incluían las combinaciones hormonales de 5.0/1.0; 5.0/0.5 y 3.0/1.0 mg/lt., de ANA + BAP, respectivamente, es decir que se obtuvo mayor cantidad de callos por tratamiento en ese orden.

También se formaron callos, pero en menor cantidad con los tratamientos que contenían 3.0/0.5; 3.0/3.0; y 5.0/3.0 mg/lt., de ANA y BAP, y finalmente sin formar callos, pero sí algunos brotes el tratamiento testigo (cuadro 2). A ese respecto Villalobos (30), afirma que el balance de auxinas y citocininas en el medio de cultivo determina la formación y proliferación de masas celulares amorfas sin una organización ni especialización definida que reciben comúnmente el nombre de callos.

La consistencia de estos callos fue compacta, presentando coloración generalmente blanca, aunque en algunos casos se presentaron de un color café claro.

Gaitán (9), por su lado, estudiando la formación de callos en *Smilax aristolochiaefolia* Miller, para un cultivo en suspensión, encontró que los tratamientos que incluían 3.0/0.5; 3.0/1.0; 3.0/3.0 y 5.0/1.0, mostraron el mayor número de callos en formación.

En el explante utilizado de hoja con peciolo, a las 6 semanas de cultivo comenzó a ser visible la formación de protuberancias en forma de pequeñas agallas sobre las hojas, en el haz y el envés. También se pudo observar como indicio de respuesta, la expansión o hinchamiento del tejido alrededor del corte y sobre el área del peciolo, debido al efecto de la auxina en la división celular, lo que promovió el crecimiento y proliferación de masa celulares amorfas.

La lámina foliar comenzó a arrugarse o a plegarse sobre si misma, muchas veces arqueándose en el medio de cultivo y presentando protuberancias que eran el indicio más notable de la formación de callos sobre la hoja

Algunos explantes en todos los tratamientos permanecieron verdes, es decir, vivos durante toda la fase de cultivo, sin embargo, no presentaron algún tipo de respuesta visible, otros en cambio, degeneraron primero a un color amarillo, luego a un color pardusco y finalmente a un color negro, lo que evidenciaba su muerte, esto podía observarse en un mismo frasco de cultivo, es decir, en un mismo frasco se observaron explantes vivos -verdes- pero sin respuesta visible, y explantes con

respuesta o explantes muertos o en proceso de necrosis. Además se formaron callos de consistencia friable de colores más bien oscuros o parduscos. En relación al término friable Litz y Jarret, mencionados por Roca (27) indican que el término se emplea para describir la fácil disgregación o separación de las células que conforman un callo.

En la figura 3, se muestran los resultados anteriormente descritos, realizando una comparación gráfica en cuanto al número de total de callos inducidos durante la iniciación del cultivo, por las diferentes concentraciones de ANA y BAP evaluadas, estableciéndose que el tratamiento 6 (5.0 mg/lt de ANA + 1.0 mg/lt de BAP) presentó el mayor número de callos en formación. En esa misma gráfica, se muestra también que el tratamiento 3 (3.0 mg/lt de ANA + 1.0 mg/lt de BAP) logró la formación del mayor número de brotes.

7.1.1.B. Número promedio de callos inducidos por explante

En forma general, se pudo observar la inducción de callos y formación de brotes dentro de un mismo explante, es decir, que ambas estructuras podían ocurrir dentro de una misma hoja.

En ese sentido, con el tratamiento 5, se obtuvo el 75% de explantes que presentaron respuesta al formar callos (15 en total), y el tratamiento 2, al final de esta etapa, presentó 70% de explantes que también formaron callos (14 en total). En los restantes tratamientos se observó menos del 50% de los explantes que mostraron respuesta al formar callos del total cultivado.

En cuanto a los mejores promedios de callos inducidos por explante, estos se obtuvieron con los tratamientos que incluían las combinaciones hormonales de 5.0/1.0; 3.0/1.0 y 5.0/0.5 mg/lt de ANA/BAP, en su orden respectivo, obteniéndose estos resultados, de la relación del número total de callos producidos y el número de explantes que presentaron respuesta al formar callos en cada tratamiento evaluado (cuadro 2).

7.1.1.C. Número total de brotes regenerados por tratamiento

Para los explantes de hoja con peciolo con presencia de tejido calloso, se pudo observar que dicho tejido calloso, con el paso del tiempo sufrió un proceso de diferenciación, dando origen a diferentes brotes, esto se pudo observar en mejor forma en los tratamientos constituidos por el medio MS y las combinaciones hormonales 3.0/1.0 y 3.0/0.5 mg/lt de ANA/BAP respectivamente, que presentaron hasta el final de esta etapa 15 y 10 brotes regenerados.

El tratamiento testigo -MS sin adición de reguladores- no mostró formación de callos, pero si de brotes, lo cual sugiere que no todos los brotes fueron regenerados por un callo intermedio, es decir tuvo lugar la organogénesis (cuadro 2), a través de la cual se pueden obtener brotes adventicios que surgen directamente del tejido del explante, como lo aseguran Hartman (12) y Villalobos, *et al.* (30).

Lo anterior plantea la posibilidad de la existencia con anticipación de un meristemo de brote en los explantes que mostraron respuesta en el tratamiento testigo.

Los brotes que se formaron al finalizar esta etapa de cultivo, se mostraron sin coloración alguna, es decir, presentaban características típicas de etiolación, debido a que permanecieron dentro de la incubadora, además, se mostraron débiles y frágiles en su aspecto físico.

Amador (1), estudiando la respuesta del cultivo de brotes apicales de zarzaparrilla a la aplicación de reguladores del crecimiento, después de 12 semanas observó que el mejor tratamiento en la regeneración de brotes fue el que incluyó 1.0 mg/lit., de ANA + 0.5 mg/lit., de BAP. Comparándolo con el mejor tratamiento obtenido en el presente estudio en la regeneración de brotes a las 11 semanas, el cual incluyó 3.0 mg/lit., de ANA + 1.0 mg/lit., de BAP, demuestra que las respuestas pueden variar dentro de un mismo género de plantas, inclusive, aun dentro de especies únicas, las variedades pueden presentar respuestas completamente diferentes (6, 27).

7.1.1.D. Número promedio de brotes regenerados por explante

Al final de esta etapa -semana once-, los tratamientos con las combinaciones hormonales que incluyeron 3.0/1.0; 5.0/3.0 y 5.0/1.0 mg/lit de ANA + BAP, presentaron los mejores promedios en el número de brotes regenerados por explante.

Se observó en todos los tratamientos evaluados que los explantes no sobrepasaron el 50% en su respuesta al formar brotes, pues los tratamientos 2, 4 y 5 que fueron los mejores, presentaron en los tres casos un 35% de respuesta en cuanto al número de explantes que formaron brotes del total cultivado.

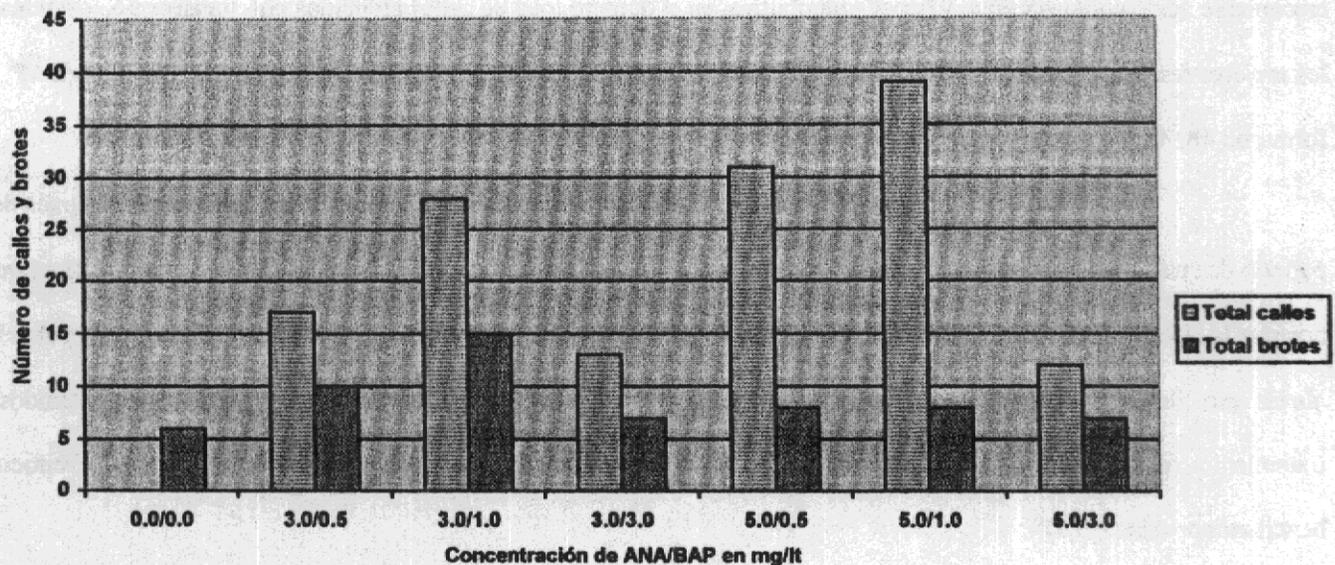


Figura 3. Efecto de la concentración de auxinas y citocininas en la producción de callos y brotes de zarzaparrilla a las 11 semanas de cultivo

7.1.2. Primer subcultivo

Cuadro 3. Efecto de la concentración de reguladores del crecimiento en la inducción de callos y regeneración de brotes de *S. moranensis* Martens & Galiotti después de 15 semanas de cultivo.

ANA mg/l	BAP mg/l	Callos inducidos	Brotes regenerados	Explantos con respuesta	Promedio de callos por explante	Promedio de brotes por explante
0.0	0.0	4	6	4	1.0	1.5
3.0	0.5	31	24	15	2.07	1.6
	1.0	48	7	8	6.0	0.86
	3.0	20	9	15	1.33	0.6
	5.0	5	11	7	0.71	1.57
5.0	0.5	22	6	14	1.57	0.43
	1.0	43	17	11	3.91	1.55
	3.0	5	11	7	0.71	1.57

7.1.2.A. Número total de callos inducidos por tratamiento

Al final de este subcultivo -semana 15-, se observó el efecto de la concentración de los reguladores del crecimiento ácido naftalanacético y bencilaminopurina, en el número total de callos inducidos por tratamiento, presentando los mejores resultados, aquellos que incluían las concentraciones de 3.0/1.0; 5.0/1.0 y 3.0/0.5 mg/lt., de ANA/BAP, que formaron 48, 43 y 31 callos respectivamente.

En el cuadro 3, se resumen los datos del número total de callos inducidos por tratamiento después de un período de cultivo de 15 semanas, comparando estos resultados con los obtenidos en la etapa anterior (cuadro 2), se puede apreciar la diferencia en cuanto a la respuesta esperada, ya que a medida que transcurría el tiempo y después del subcultivo de las estructuras existentes en otros frascos, conteniendo los mismos medios de cultivo, el número de callos obtenidos por tratamiento resultó mayor, sin embargo, los mejores en ambas etapas incluían niveles bajos de la citocinina bencilaminopurina -BAP-.

7.1.2.B. Número promedio de callos inducidos por explante

Con los datos presentados en el cuadro 3, para el número de explantes con respuesta y el número total de callos inducidos por tratamiento, se estableció la respuesta del efecto de la concentración de las hormonas del crecimiento evaluadas, en el número promedio de callos formados por explante, hasta la semana 15.

Hasta el final de esta etapa los tres mejores tratamientos para esta variable estudiada, fueron los que incluyeron 3.0/1.0; 5.0/1.0 y 3.0/0.5 mg/lt., de ANA + BAP respectivamente, que formaron en promedio 6, 4 y 2 callos por explante, en ese orden.

En relación al número de explantes o estructuras que fueron subcultivados después de la semana 11 y los explantes que sobrevivieron y presentaron respuesta al final de esta etapa, se obtuvo con los tratamientos 4, 1 y 3 el 75, 66.67 y 55.56% de los explantes que reportaron algún tipo de respuesta del total cultivado, los restantes cuatro tratamientos no sobrepasaron el 50% en su respuesta al final de la semana 15.

7.1.2.C. Número total de brotes regenerados por tratamiento

Con las estructuras subcultivadas para estimular la formación de brotes, se pudo observar en el caso de las masas de células o callos, que sufrían cambios en su forma física, comenzando a crecer, producto de divisiones

celulares consecutivas, dando con este proceso de diferenciación origen a diversos brotes, es de hacer notar sin embargo, que en el proceso también se formaron brotes vía organogénesis, es decir, sin el paso previo por la etapa de callo.

Los datos del cuadro 3, fueron tomados al final del primer subcultivo y el mejor tratamiento hasta este período incluyó la combinación hormonal de 3.0/0.5 mg/lit., de ANA y BAP, con 24 brotes, seguido del tratamiento conformado por 5.0/1.0 mg/lit., de ANA + BAP con 17 brotes y posteriormente el que incluía 5.0/3.0 mg/lit., de ANA/BAP con 11 brotes formados.

Es de hacer ver que después de la onceava semana de cultivo, los explantes que presentaron algún tipo de respuesta fueron subcultivados y trasladados al cuarto de crecimiento del laboratorio, bajo condiciones de luz y temperatura controladas, lo que se manifestó en la aparición, aproximadamente a una semana del traslado, del pigmento clorofílico en los brotes regenerados en este subcultivo, a diferencia de los brotes formados en la primera etapa que presentaban características de etiolación, debido a la ausencia de luz en la iniciación de los cultivos.

Los datos del cuadro 3, muestran que para los parámetros evaluados (número total de callos inducidos y número total de brotes regenerados por tratamiento, el testigo (T1), el cual no incluía hormonas del crecimiento, si presentó respuesta, pero ésta resultó ser la más baja de todos los tratamientos estudiados.

La figura 4, representa la respuesta obtenida con los diferentes tratamientos a las 15 semanas de iniciado el cultivo, observándose que la relación 3.0/1.0 mg/lit., de ANA + BAP (T3), mostró una evidente superioridad en cuanto al número total de callos inducidos en esta etapa. Así también se puede apreciar que la respuesta para el número total de brotes regenerados fue mayor con la relación 3.0/0.5 mg/lit., de ANA + BAP (T2).

7.1.2.D. Número promedio de brotes regenerados por explante

Hasta el final del primer subcultivo, los mejores promedios de brotes regenerados por explante, en cada tratamiento fueron los que incluían las combinaciones de 3.0/0.5; 5.0/3.0 y 5.0/1.0 mg/lit., de ANA/BAP (cuadro 3), esto era de esperarse, puesto que los mejores tratamientos en la regeneración de brotes fueron los que incluían también 3.0/0.5; 5.0/1.0 y 5.0/3.0 mg/lit., de ANA + BAP, ya que el número promedio de brotes regenerados por explante es una relación proporcional del número total de brotes formados y el número de explantes que presentaron respuesta en cada tratamiento dado.

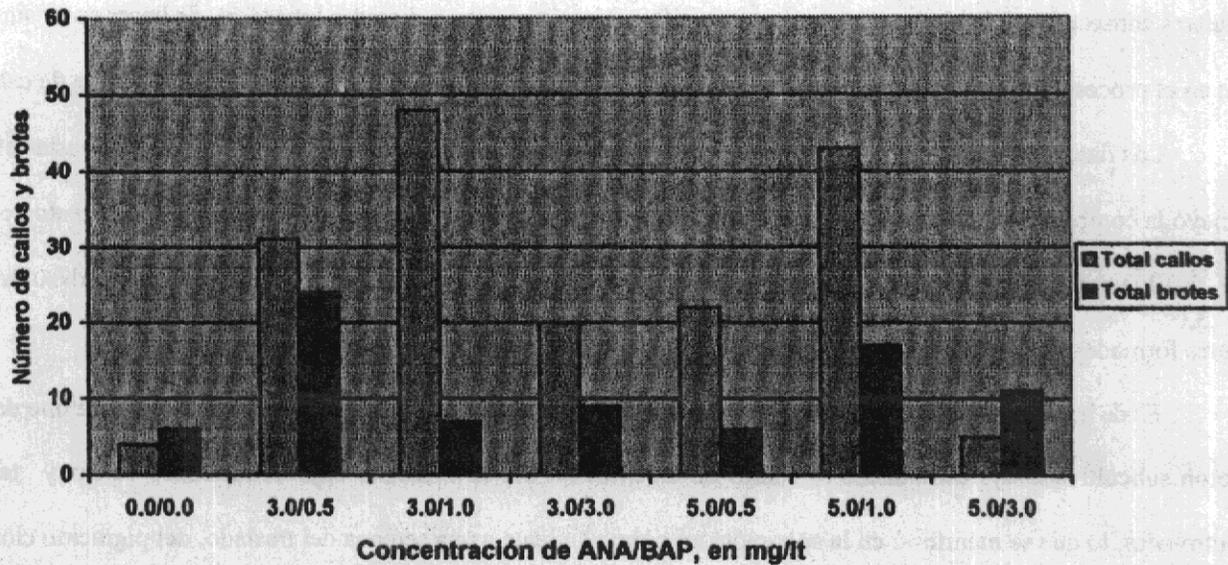


Figura 4. Efecto de la concentración de auxinas y citocininas en la producción de callos y brotes de zaparrilla a las 15 semanas de cultivo

7.2. Fase II. Regeneración de brotes y plántulas

7.2.1. Segundo subcultivo.

A las 11 semanas de cultivo aproximadamente y aun en condiciones de oscuridad completa, se originaron los primeros brotes que presentaban apariencia etiolada, en esa etapa de cultivo, los tratamientos conformados por el medio de cultivo MS suplementados con 3.0/1.0 y 3.0/0.5 mg/l. de ANA/BAP se destacaron, pues mostraron el mayor número de brotes regenerados en ese orden. En ese sentido, Usui *et al.*, (29) afirman que los tejidos sometidos a un proceso de diferenciación, pueden ser capaces de desarrollar tejido meristemático para luego formar brotes adventicios y desarrollar posteriormente tallos, por otro lado, estos brotes también pueden formarse por vía indirecta, es decir, a través de un proceso que primero estimula la proliferación celular, que conlleva a la formación de callos que podrán dar origen a plántulas, las cuales pueden ser transferidas a otro medio de cultivo para desarrollarse y crecer hasta un estado de planta normal Dublin (14).

Cuadro 4. Efecto de la concentración de ANA/BAP, en la inducción de callos y regeneración de brotes de zarzaparrilla a las 21 semanas de cultivo.

ANA mg/lt.	BAP mg/lt.	Explantos con respuesta	Total callos inducidos	Callos por explante (promedio)	Total de brotes regenerados	Brotes por explante (promedio)
0.0	0.0	3	4	1.33	5	1.67
3.0	0.5	16	86	5.38	97	6.06
	1.0	12	47	3.92	43	3.58
	3.0	18	28	1.56	31	1.72
5.0	0.5	11	31	2.82	25	2.27
	1.0	14	68	4.86	39	2.78
	3.0	8	23	2.56	14	1.75

7.2.1.A. Número total de callos inducidos y número total de brotes regenerados por tratamiento

En el cuadro 4, se resumen los datos del número total de callos inducidos y del número total de brotes regenerados al finalizar la etapa del segundo subcultivo, que comprendió hasta la semana 21. Se puede observar que el medio MS, complementado con 3.0/0.5 mg/lt., de ANA y BAP (T2), se destacó tanto en el número de callos inducidos, así como de brotes regenerados, presentando 86 callos y 97 brotes de *S. Moranensis* Martens & Galiotti, otros tratamientos que se destacaron, fueron los conformados por el medio MS más ANA y BAP en dosis de 5.0/1.0 y 3.0/1.0 mg/lt., con 68 y 47 callos formados respectivamente.

En cuanto a la regeneración de brotes, el segundo mejor tratamiento se logró con las combinaciones hormonales de 3.0/1.0 mg/lt., de ANA y BAP con 43 brotes, seguido de 5.0/1.0 mg/lt., de ANA/BAP que presentó 39 brotes.

Es de hacer notar, que inclusive el tratamiento testigo mostró formación de callos y brotes, sin embargo, esta respuesta fue la más baja que se obtuvo de todos los tratamientos evaluados.

Con las estructuras subcultivadas para estimular la inducción de callos y la regeneración de brotes, se observó que a medida que transcurría el tiempo, la cantidad de callos y brotes formados por tratamiento era mayor en cada uno de ellos, lo que suponía que a mayor número de callos, se obtendría mayor número de brotes, y por ende mayor cantidad de

plántulas formadas, como se confirmó en la etapa final del estudio figuras 9A., 10A y 11A.

Dentro de esta etapa, podemos apreciar en el cuadro 4, que todos los tratamientos presentaban tanto callos como brotes y algunos de ellos, poseían cantidades bastante importantes de dichas estructuras, sin embargo, también se pudo observar al finalizar la etapa que existía fuerte competencia por nutrientes y algunos brotes comenzaron a morir debido a la poca humedad y a la falta de nutrientes en el medio, por lo que se decidió realizar el tercer subcultivo.

7.2.1.B. Número promedio de callos inducidos y número promedio de brotes regenerados por explante

La figura 5, muestra los efectos de la concentración de ANA y BAP en los promedios, logrados en el número de callos y brotes, para una mejor apreciación de la diferencia en la respuesta esperada, obteniéndose la mejor con la relación 3.0/0.5 mg/lit de ANA/BAP, tanto en el número promedio de callos inducidos como en el número promedio de brotes formados por explante después de 21 semanas de cultivo. Luego el segundo y el tercer mejor tratamiento para el número promedio de callos formados por explante se dio con las combinaciones de 5.0/1.0 y 3.0/1.0 mg/lit de ANA + BAP.

En cuanto al número promedio de brotes formados por explante los tratamientos que ocuparon el segundo y tercer lugar respectivamente fueron con las combinaciones de 3.0/1.0 y 5.0/1.0 mg/lit de ANA + BAP.

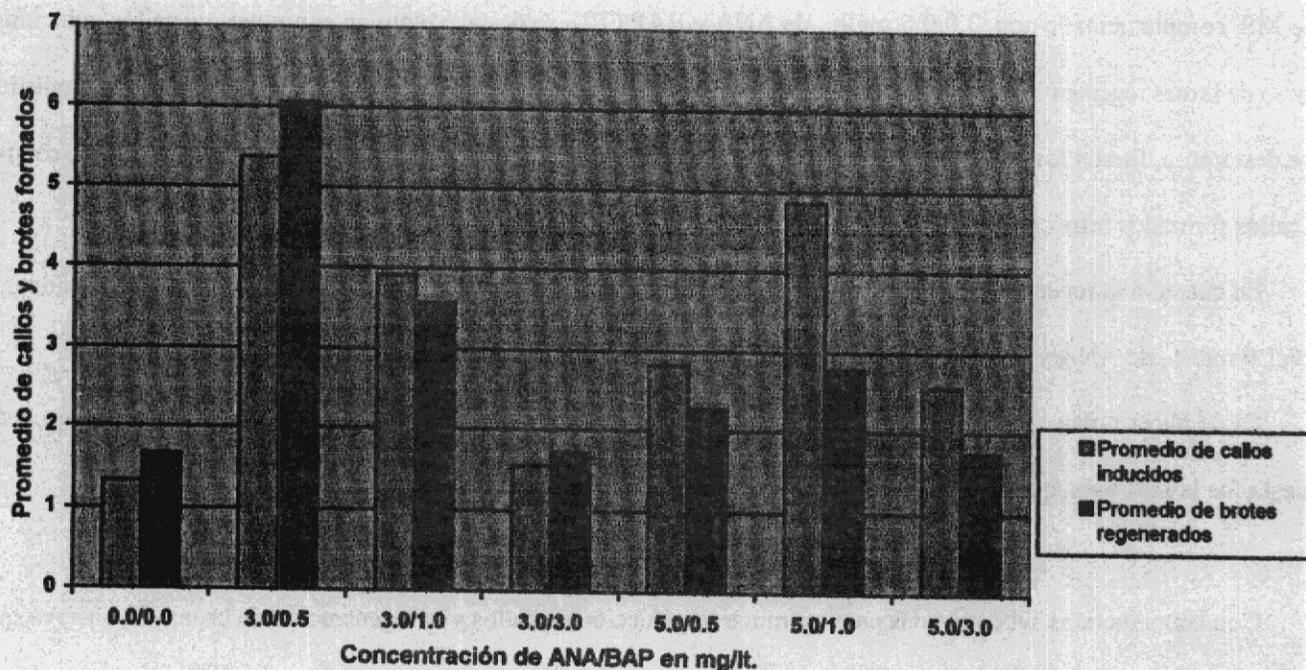


Figura 5. Efecto de la concentración de ANA + BAP, en el número promedio de callos y número promedio de brotes de zarzaparrilla las 21 semanas de cultivo

Cuadro 5. Efecto de la concentración de reguladores del crecimiento en la regeneración de plántulas y formación de hojas de *S. moranensis* Martens & Galiotti a las 21 semanas de cultivo

ANA mg/lt.	BAP mg/lt.	Plántulas regeneradas por tratamiento	Hojas formadas por tratamiento	Promedio de hojas formadas por plántula
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3.0	0.5	19 ^{*AD}	27	1.42
	1.0	5.0	8.0	1.60
	3.0	1.0	2.0	2.0
5.0	0.5	5.0	7.0	1.40
	1.0	2.0 ^{*PG}	5.0	2.5
	3.0	0.0	0.0	0.0

* Estos tratamientos mostraban presencia de raíces

△ Raíces abundantes

∩ Pocas raíces

◻ Raíces delgadas y largas

◻ Raíces gruesas y cortas

7.2.1.C. Número total de plántulas producidas

Por otro lado en el cuadro 5, se muestran los resultados del mismo experimento, pero ahora analizando los datos de regeneración de plántulas que ya eran visibles en ésta etapa de cultivo, observándose que el tratamiento con una dosis baja de ANA y BAP, representado por 3.0/0.5 mg/lt., fue muy superior a los restantes tratamientos en cuanto a la regeneración de plántulas y hojas, presentando 19 plántulas y 27 hojas, colocándose luego sucesivamente los tratamientos con las dosis de 3.0/1.0, 5.0/0.5, 5.0/1.0 y 3.0/3.0 mg/lt., de ANA + BAP, que presentaron 5, 5, 2, 1 plántulas y 8, 7, 5 y 2 hojas respectivamente. Por otro lado el tratamiento con dosis de 5.0/3.0 mg/lt. de ANA/BAP y el testigo (T1) no presentaron plántula ni hoja alguna al término de esta etapa. Cuadro 5.

En la figura 6, se muestran gráficamente los datos de plántulas regeneradas después de un período de cultivo de 21 semanas, observándose que el tratamiento constituido por 3.0/0.5 mg/lt. de ANA/BAP presentó los mejores resultados, regenerándose hasta esta fecha un total de 19 plántulas, seguido de los tratamientos con las combinaciones hormonales de 3.0/1.0 y 5.0/0.5 mg/lt., de ANA/BAP con 5 plántulas cada una. Los tratamientos constituidos por las combinaciones

hormonales de 5.0/1.0 y 3.0/3.0 mg/lt. de ANA/BAP, obtuvieron 2 y 1 plántulas respectivamente.

El tratamiento con 5.0/3.0 mg/lt de ANA/BAP y el testigo -0.0/0.0 mg/lt. de ANA/BAP-, no mostraron regeneración de plántulas hasta el final del segundo subcultivo. Los tratamientos con dosis bajas de BAP, lograron mejores resultados comparados con los que incluían dosis más altas en el presente estudio.

Las plántulas lucían vigorosas en todos los tratamientos donde se formaron, lo cual evidenciaba el grado de desarrollo de las mismas.

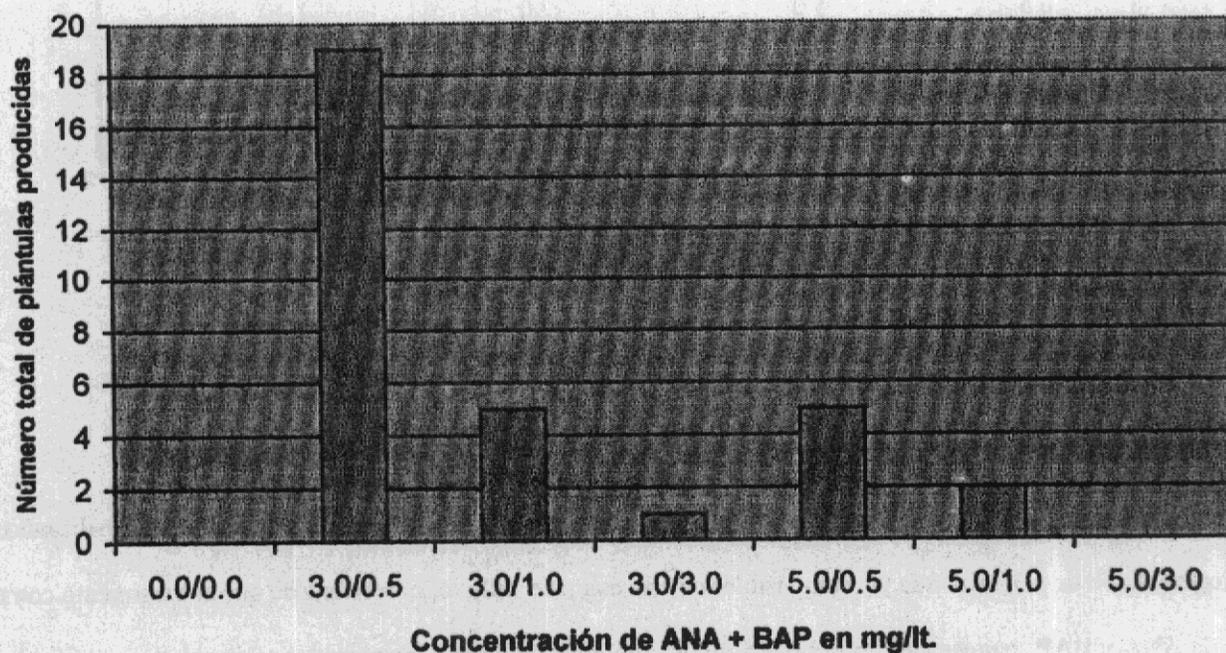


Figura 6. Número de plántulas de zarzaparrilla regeneradas por tratamiento a las 21 semanas de cultivo

También se pudo observar, que en esta etapa y en condiciones de luz controlada en el cuarto de crecimiento que las plántulas de los tratamientos con 3.0 mg/lt de ANA + 0.5 mg/lt de BAP y 5.0 mg/lt de ANA + 1.0 mg/lt., de BAP, mostraron la formación de raíces, observándose raíces abundantes y delgadas en el tratamiento con el medio nutritivo MS suplementado con 3.0/0.5 mg/lt. de ANA/BAP y pocas pero gruesas raíces en el tratamiento con el medio nutritivo MS suplementado con 5.0/1.0 mg/lt. de ANA/BAP, que posiblemente se deba que al igual que el número de plántulas por tratamiento y el promedio de hojas por plántula, el número y vigor de las raíces regeneradas está fuertemente condicionada

por la competencia por nutrientes dentro del medio de cultivo, es decir que a mayor número de plántulas, hojas y raíces se presenta mayor competencia por nutrientes, como se evidencia claramente en el promedio de hojas por planta donde el tratamiento con 5.0/1.0 mg/lt. de ANA/BAP con promedio de 2.5 hojas por plántula con apenas 2 plantas regeneradas, contrasta con el tratamiento 3.0/0.5 mg/lt., de ANA/BAP con promedio de 1.42 hojas por planta, habiendo regenerado este tratamiento 19 plántulas.

7.2.1.D. Número total de hojas formadas por tratamiento

Por otro lado, en cuanto al número total de hojas formadas por tratamiento, el más eficiente fue el conformado por las combinaciones hormonales de 3.0/0.5 mg/lt. de ANA/BAP, obteniéndose 27 hojas, seguido de los que incluyeron las combinaciones de 3.0/1.0 y 5.0/0.5 mg/lt., de ANA/BAP, que presentaron 8 y 7 hojas respectivamente, mientras que con los tratamientos conformados por 5.0/1.0 y 3.0/3.0 mg/lt. de ANA/BAP, obtuvieron 5 y 2 hojas en ese orden. Las hojas así formadas mostraron aspecto vigoroso y poseían un color verde tierno, sin embargo, próximo al final de esta etapa, algunas hojas comenzaron a adquirir síntomas de necrosis, presentando colores más bien amarillos y posteriormente se secaron, debido también, a la escasez de humedad y nutrientes en los medios sintéticos, originado posiblemente de la presencia de un buen número de brotes en desarrollo.

7.2.1.E. Número promedio de hojas formadas por plántula

En contraste al número de hojas formadas por tratamiento, influenciado por el número de plantas en total, donde los mejores resultados, se obtuvieron con dos tratamientos que contenían niveles bajos de ANA y BAP, 3.0/0.5 y 3.0/1.0 mg/lt., de ANA/BAP, respectivamente, el mejor promedio de hojas por plántula se obtuvo con aquel tratamiento con un nivel alto de ANA y bajo de BAP, 5.0/1.0 mg/lt., de ANA/BAP, como se muestra en el cuadro 5, donde se observa que el tratamiento con 5.0/1.0 mg/lt. de ANA/BAP, regeneró 2 plántulas con un total de 5 hojas en conjunto, dando un promedio de 2.5 hojas por plántula, lo que lo coloca como el mejor tratamiento en la regeneración de hojas por plántula, los tratamientos con 3.0/3.0, 3.0/1.0, 3.0/0.5 y 5.0/0.5, regeneraron 2, 8, 27 y 7 hojas obteniéndose promedios de 2.0, 1.60, 1.42 y 1.40 hojas por plántula respectivamente.

7.2.2. Tercer subcultivo.

Cuadro 6. Efecto final de la concentración de reguladores del crecimiento en el total de brotes inducidos, plántulas y hojas regeneradas por tratamiento de *S. moranensis* Martens & Galiotti a las 28 semanas de cultivo.

ANA mg/lt	BAP mg/lt	Explantos con respuesta	Total brotes regenerados por tratamiento	Promedio de brotes regenerados por explante	Total plántulas formadas por tratamiento	Total hojas formadas por tratamiento	Promedio de hojas formadas por plántula
0.0	0.0	0	0	0	0	0	0.00
3.0	0.5	19	233	12.26	30*AD	88	2.93
	1.0	14	87	6.21	10*PG	34	3.4
	3.0	12	55	4.58	4*PD	16	4
5.0	0.5	8	10	1.25	3	13	4.33
	1.0	9	52	5.78	4*PG	13	3.25
	3.0	7	10	1.43	2	7	3.5

* Estos tratamientos mostraban presencia de raíces

A Raíces abundantes

† Pocas raíces

◊ Raíces delgadas y largas

○ Raíces gruesas y cortas

7.2.2.A. Número total de brotes regenerados por tratamiento

En el cuadro 6 y la figura 7, se muestran las respuestas obtenidas finalmente a las 28 semanas de cultivo, en la producción de brotes de zarzaparrilla, destacando la relación de 3.0 mg/lt de ANA + 0.5 mg/lt de BAP, con lo cual se notó la tendencia que a mayor tiempo de cultivo – a mayor número de subcultivos realizados-, las concentraciones bajas de ANA y BAP, presentaban los mejores resultados en este experimento. Sólo se reporta el número total de brotes, no así, el número total de callos por cuanto en este período de cultivo era ya bastante difícil establecer el número de callos existentes debido a que dentro de los frascos se presentaba el explante como una masa informe.

Resalta el hecho de que todos los tratamientos a excepción del testigo mostraban en esta etapa la presencia de gran número de brotes, y podría explicarse el hecho, debido a la constante actividad celular desarrollada por las plántulas y tejidos en cuanto a su división celular, dando origen a nuevos brotes o retoños continuamente, todo esto posible por la existencia

de nutrientes, humedad y hormonas del crecimiento dentro del medio de cultivo, mostrando así, el potencial de la planta de zarzaparrilla *Smilax moranensis* Martens & Gallioti, para regenerar plantas a partir de explantes de hoja con peciolo.

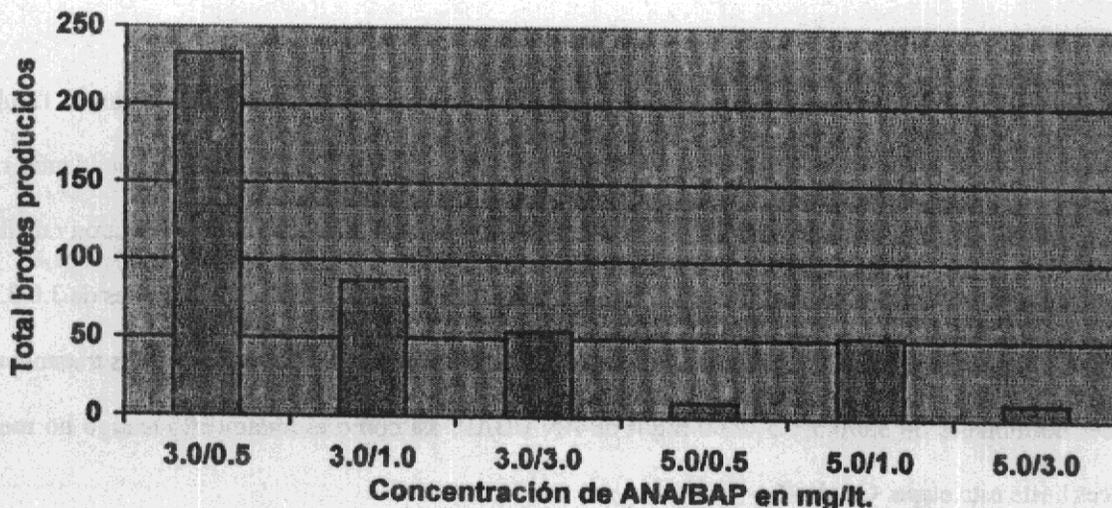


Figura 7. Efecto final de la concentración de auxinas y citocininas, en la producción de brotes de zarzaparrilla.

7.2.2.B. Número promedio de brotes regenerados por explante

El mejor promedio de brotes formados por explante se obtuvo con el tratamiento 2 que incluyó 3.0 mg/lit., de la auxina ácido naftalanacético más 0.5 mg/lit., de la citocinina bencilaminopurina que en promedio formó 12.26 brotes por explante que resulto ser aproximadamente el doble del promedio obtenido con el tratamiento 3, que incluyó 3.0/1.0 mg/lit., de ANA/BAP, el cual fue el segundo mejor tratamiento y que produjo en promedio 6.21 brotes regenerados por explante.

7.2.2.C. Número total de plántulas producidas por tratamiento

En el cuadro 6, se resumen los datos de brotes, plántulas y hojas regeneradas por tratamiento después de un período de cultivo de 28 semanas, que representaron el final de la presente investigación.

El tratamiento más eficiente en la regeneración de plántulas fue con la combinación hormonal de 3.0/0.5 mg/lit de ANA/BAP con 30 plántulas, seguido de los tratamientos con las combinaciones hormonales de 3.0/1.0, 3.0/3.0, 5.0/1.0,

5.0/0.5 y 5.0/3.0 mg/lit de ANA/BAP, que presentaron 10, 4, 4, 3 y 2 plántulas respectivamente, (figura 8). Se puede apreciar con estos datos que los dos mejores tratamientos para esta variable incluían la misma dosis de ANA (3.0 mg/lit), y dosis bajas de BAP, como lo son 0.5 y 1.0 mg/lit.

Es de hacer notar que las plántulas lucían vigorosas en todos los tratamientos donde se originaron. También es importante resaltar que para el tratamiento con 3.0/0.5 mg/lit de ANA/BAP las plántulas presentaban abundantes raicillas pero de delgada constitución y los tratamientos con 3.0/1.0 y 5.0/1.0 mg/lit de ANA/BAP también presentaron raicillas pero estas eran cortas en número reducido y de vigor fuerte o gruesas. En el tratamiento con las combinaciones de 3.0/3.0 mg/lit de ANA y BAP, también se pudieron observar raicillas en poca cantidad y muy delgadas. Finalmente los tratamientos con las combinaciones hormonales de 5.0/0.5 y 5.0/3.0 mg/lit de ANA/BAP, así como el tratamiento testigo no mostraron presencia de raíces hasta esta etapa. Cuadro 6.

Con material vegetal proveniente del segundo subcultivo, se realizó el tercer subcultivo, con el objetivo de darle continuidad al proceso iniciado con la siembra original de tejido foliar de *S. morznensis* Martens & Galotti, hasta obtener plántulas completas. Para mostrar todo el potencial desarrollado por los tratamientos, se decidió evaluar finalmente los resultados hasta la semana 28, mostrándose hasta esta etapa un potencial de respuesta para el número de plántulas de zarzaparrilla que el tratamiento 2 (3.0 mg/lit de ANA + 0.5 mg/lit de BAP), presentó el mayor número de plántulas regeneradas (30 en total). Es de hacer notar el hecho de que todos los tratamientos evaluados, hasta el final de esta etapa, mostraron respuesta en cuanto al número de plántulas generadas a excepción del tratamiento testigo (MS sin adición de reguladores del crecimiento) figura 8.

7.2.2.D. Número total de hojas formadas por tratamiento

El tratamiento constituido por 3.0/0.5 mg/lit de ANA/BAP, resultó el más eficiente en la regeneración de hojas con 88 en total, seguido por los que incluían las combinaciones hormonales de 3.0/1.0, 3.0/3.0, 5.0/0.5, 5.0/1.0 y 5.0/3.0 mg/lit., de ANA + BAP., con 34, 16, 13, 13 y 7 hojas respectivamente. Observándose que todos los tratamientos evaluados formaron hojas, no así, el testigo. Las hojas formadas tenían aspecto vigoroso y con tonalidades que cubrían del verde tierno al verde fuerte de acuerdo al tiempo que tenían de haberse formado y a la ubicación de la hoja en la plántula; esto

junto al número de hojas formadas evidenciaron el grado de desarrollo que alcanzaron las plántulas producidas en esta etapa, este dato fue una relación directamente proporcional al número total de plántulas formadas.

7.2.2.E. Número promedio de hojas formadas por plántula

De la relación entre el número total de hojas regeneradas y el número de plántulas obtenidas en cada Tratamiento, se obtuvo el número promedio de hojas formadas por plántula, estableciéndose que el tratamiento con 5.0/0.5 mg/lit de ANA + BAP presentó el mayor número promedio de hojas por plántula, seguido de los tratamientos con las combinaciones de reguladores del crecimiento con 3.0/3.0; 5.0/3.0; 3.0/1.0; 5.0/1.0; 3.0/0.5 mg/lit de ANA + BAP.

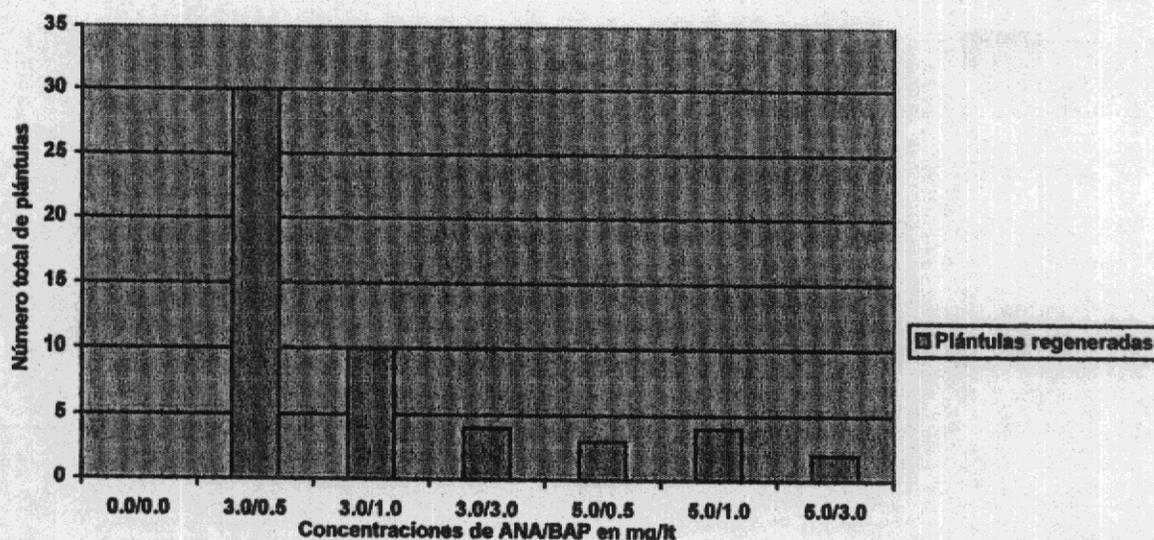


Figura 8. Efecto final de las auxinas y citocininas en la producción de plántulas de zarzaparrilla

Al final los seis tratamientos evaluados junto al testigo absoluto (0.0 mg/lit de ANA + 0.0 mg/lit de BAP), mostraron claras evidencias en las respuestas obtenidas, con relación a que los reguladores del crecimiento juegan un importante papel en el control del crecimiento en las plantas a nivel de órganos, tejidos y células, y que específicamente las auxinas y las citocininas intervienen y se complementan en numerosos fenómenos fisiológicos de las plantas y tejidos estimulando la división y el crecimiento celular, lo que promueve la formación de callos, yemas y brotes para dar así origen, por vía directa o indirecta a la regeneración de plantas completas a partir del cultivo *in vitro* de tejidos u órganos como lo afirma

Villalobos (30), que las actividades fisiológicas de las plantas se ven influenciadas marcadamente por las hormonas del crecimiento.

8. CONCLUSIONES

1. Con la aplicación de diferentes combinaciones de auxinas y citocininas, es posible obtener respuesta con la inducción de callos y regeneración de brotes y plántulas, en el cultivo *in vitro* de explantes de hoja con peciolo de zarzaparrilla (*Smilax moranensis* Martens & Galiotti).
2. Dicha respuesta fue diferente a medida que transcurría el tiempo de cultivo, es decir que a mayor tiempo de cultivo, realizando subcultivos, se pudo observar mayor número de callos, brotes y plántulas obtenidas de zarzaparrilla.
3. Todos los tratamientos evaluados en la investigación, formaron callos, brotes y plántulas, pero se destacaron, en la producción de callos al final del experimento los que contenían dosis de 3.0/0.5 y 5.0/1.0 mg/lit de ácido naftalanacético más bencilaminopurina que fueron los tratamientos 2 y 6 respectivamente.
4. En la regeneración de brotes y plántulas los mejores tratamientos al final de la investigación fueron los tratamientos 2 y 3, que contenían 3.0/0.5 mg/lit, de ácido naftalanacético/bencilaminopurina y 3.0/1.0 mg/lit ácido naftalanacético/bencilaminopurina respectivamente.

9. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda utilizar concentraciones de 3.0 y 5.0 mg/lit de ácido naftalanacético -ANA- y de 0.5 y 1.0 mg/lit de bencilaminopurina -BAP- para obtener un proceso satisfactorio en la inducción de callos, con el cultivo *in vitro* de explantes de hoja con peciolo de la Zarzaparrilla *Smilax moranensis* Martens & Galiotti.
2. Para lograr un proceso satisfactorio en la formación de brotes y plántulas, en el cultivo *in vitro* de explantes de hoja con peciolo de zarzaparrilla, se sugiere agregar concentraciones de 3.0 mg/lit de la auxina ácido naftalanacético y de 0.5 y 1.0 mg/lit de la citocinina bencilaminopurina.
3. Se recomienda sustentar los resultados obtenidos en esta investigación ya que podría ser utilizada como un modelo para la regeneración de callos, brotes y plántulas con base a los mejores tratamientos reportados y ser tomada como guía para la búsqueda de otros métodos o técnicas que persigan el objetivo de generar información para la conservación de las especies de plantas medicinales como las zarzaparrillas amenazadas por la extinción.

10. BIBLIOGRAFIA

1. AMADOR P, D. 1995. Micropropagación y análisis de la relación taxonómica de dos especies de zarzaparrilla (*Smilax* spp.), utilizando marcadores RAPDs. Tesis Mag. Sc. Irapuato, Guanajuato, México, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. 119 p.
2. _____. P, D. 1996. Manual de Laboratorio; Curso intensivo de técnicas de cultivos vegetales. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 33 p.
3. BEACHY, R.N. 1988. Genetic engineering for virus protection in plants: current result and future prospect. In: Plant biotechnology. Ed. T.J. Mabry. University of Texas. P. 39-45.
4. CARDENAS, M. 1969. Manual de plantas económicas de Bolivia. Cochabamba, Bolivia, Icthus. p 225-236.
5. CONGRESO NACIONAL SOBRE LA BIODIVERSIDAD DE GUATEMALA. (1., 1995, GUATEMALA, C.A.). 1995. In: Diversidad de la flora medicinal de Guatemala. Armando Cáceres; Lidia Girón; Juan J. Castillo. Guatemala, C. A., FAUSAC. p. 2-11.
6. CURSO DE CULTIVO DE TEJIDOS. (2., 1987, TURRIALBA, COSTA RICA.). 1987. In: Reproducción asexual en el género *Coffea*, mediante embriogénesis somática; (Memoria). Ed. por Marc Berthouly y Nidia Guzmán. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 124 p.
7. DOMINGUEZ, X. A. 1985. Métodos de investigación fitoquímica. México D.F., México, Limusa. p 20-38.
8. EVANS, D.A., et. al. 1983. Handbook of plant cell culture. Macmillan, New York, USA. v. 1.
9. GAITAN PEREZ, M.O. 1999. Comportamiento de la zarzaparrilla (*Smilax aristolochiaefolia* Miller) al cultivo de células en suspensión. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 80 p.
10. GIRON, L.M. 1998. Plantas medicinales del género *Smilax* en Centroamérica; aprovechamiento industrial de *Smilax* experiencia en Guatemala. Ed. Gabriel Robles, Roger Villalobos. In: Proyecto conservación para el desarrollo de América Central. I especies nativas; colección diversidad biológica y desarrollo sustentable. Turrialba, Costa Rica, CATIE-CYTED. p. 157 - 160.
11. HARO VERA, A. DE. 1979. Atlas de biología. 16 ed. Barcelona, España, Jover. s.p.
12. HARTMAN, H.T.; KESTER, D. F. 1982. Propagación de plantas; principios y prácticas. Trad. por Antonio María Ambrosio. México, Continental. p. 406-424.
13. HILL, A.F. 1965. Botánica económica; plantas útiles y productos vegetales. Trad. Emma Gifre. Barcelona, España, Omega. p. 364-387.
14. ICTA; JOCV. 1996. Memoria del 1er. Simposio Nacional Sobre Cultivo de Tejidos Vegetales. ICTA. Guatemala, C.A. p. 129.
15. IICA. C. R. 1993. Agricultura, biotecnología y propiedad intelectual. Ed por. Fernando Suarez de Castro. Programa II; Generación y transferencia de tecnología. San José, Costa Rica. Serie de Publicaciones Misceláneas. p. 11-12.

16. _____ 1993. Requerimientos técnicos para la investigación y el desarrollo en agrobiotecnologías. Programa II; Generación y transferencia de tecnología. San José, Costa Rica. Serie de Publicaciones Misceláneas. p. 13-14.
17. _____ 1998. La nueva biotecnología en agricultura y salud. Ed. por Yvette Castro; Marcelle Banuet; Michael Snarskis. San José, Costa Rica. p. 16-17.
18. LARKING, KP. J.; SCROWCROFT, W.R. 1981. Somaclonal variation, a novel source of variability cell cultures for plant improvement. Theoretical and applied genetics. p. 198 -210.
19. MUÑOZ, L.B. 1987. Plantas aromáticas y medicinales; estudio, cultivo y procesado. Madrid, España. Mundi-Prensa. 365 p.
20. OCAMPO, R.A. 1994. La domesticación de plantas medicinales. Ed. por Rafael A. Ocampo. In: Domesticación de plantas medicinales en Centro América. I especies nativas; colección diversidad biológica y desarrollo sustentable. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 13-21.
21. ORELLANA, A.; PERLA, H.; HERRERA, M. 1994. Estado de la domesticación de las plantas medicinales en Centro América; diagnóstico de Guatemala. Ed. por Rafael A. Ocampo. In: Domesticación de plantas medicinales en Centro América. I especies nativas, colección diversidad biológica y desarrollo sustentable. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 13-21.
22. PAHLOW, M. 1985. El gran libro de las plantas medicinales; la salud a través de la fuerza curativa de la naturaleza. Trad. por J. Tola y Julia Herrera. 6 ed. León, España, Everest. p. 265-405.
23. PALMA, T.; HIDALGO, M. 1994. Elementos metodológicos para la domesticación de plantas medicinales; biotecnología elemento importante en la domesticación de plantas medicinales. Ed. por Rafael A. Ocampo. In: Domesticación de plantas medicinales en Centro América. I especies nativas; colección diversidad biológica y desarrollo sustentable. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 99-107.
24. PROYECTO DE PLANTAS MEDICINALES; GEXPRONT. (Gua.). 1993. Desarrollo agrotecnológico de cinco especies medicinales silvestres, con potencial de exportación, *Smilax* spp.; *Pipturus* *alliaceus* L.; *Neurolepis lobata* R. Br. y *Tagetes lucida* Cav. Guatemala. 66 p.
25. READER'S DIGEST. (Mex.). 1989. Plantas medicinales; virtudes insospechadas de plantas conocidas. México, Monte Alban. 430 p.
26. ROCA CANET, C.E. 1996. Respuesta de dos diferentes tipos de explantes de zapote (*Pouteria sapota* L. Cronquist) a diferentes medios de cultivo *in vitro*. Tesis In. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 83 p.
27. ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical. p. 970.
28. ROQUE, J.M. 1941. Flora medicoguatemalteca; apuntes para la materia médica de la república de Guatemala. Guatemala, Tipografía Nacional. Tomo I, p. 169-171.
29. USUI, K.; OKABE, K.; VICTORES P, R.; RAMIREZ, A.E. 1996. Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales. Guatemala, ICTA-JOCV. 166 p.
30. VILLALOBOS A., V.M.; ROSELL, CADMO H. 1991. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Roma, Italia, FAO. 112 p.

31. VOLAK, J.; STODOLA, J. 1989. Plantas medicinales. Trad. Susacta, S.A. 2 ed. Praga, Checoslovaquia, STPN Martin. 319.
32. ZIMMERMAN J, LYNN. 1993. The plant cell. American Society of Plant Physiologists. Department of Biological, University of Maryland, Baltimore County. Baltimore Maryland. EE.UU. s.p.



V. B.

Miniam De La Roca

11. APENDICE

Cuadro 7A. Composición del medio de cultivo basal de Murashige y Skoog -MS- (1962), usado en la inducción de callos y regeneración de brotes y plántulas de zarzaparrilla *Smilax moranensis* Martens & Galiotti.

COMPONENTES	mg/lt.
<u>MACROELEMENTOS</u>	
NH ₄ NO ₃	1650.00
KNO ₃	1900.00
CaCl ₂ .2H ₂ O	440.00
KH ₂ PO ₄	170.00
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.00
<u>MICROELEMENTOS</u>	
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10.60
H ₃ BO ₃	6.20
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30
<u>HIERRO</u>	
Na ₂ EDTA	37.30
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80
<u>VITAMINAS</u>	
ACIDO NICOTINICO	0.50
PIRIDOXINA-HCl	0.50
THIAMINA-HCl	0.10
GLICINA	2.00
<u>FUENTE DE CARBONO</u>	
SUCROSA	3.0%
<u>COMPUESTO ORGANICO</u>	
MYO-INOSITOL	100.00
<u>AGENTE SOLIDIFICANTE</u>	
AGAR	0.80%
pH	5.7 - 5.8

Cuadro 8 A. Procedimiento para la preparación de soluciones concentradas de concentración conocida para el medio basal MS.

MS	COMPUESTO	mg/lt.	CANT. REQUERIDA Diferentes volúmenes
MACRO A 1X	NH ₄ NO ₃	1650.00	
	KNO ₃	1900.00	
MACRO B 10X	CaCl ₂ .2H ₂ O	440.00	250
	KH ₂ PO ₄	170.00	ml
MACRO C 10X	MgSO ₄ .7H ₂ O	370.00	250 ml
MICRO A 1000X	KI	0.83	250
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	ml
MICRO B 500X	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	100
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	ml
MICRO C 100X	ZnSO ₄ .7H ₂ O	10.60	250
	H ₃ BO ₃	6.20	ml
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22.30	
SOLUCION HIERRO 100X	Na ₂ EDTA	37.30	250
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80	ml
SOLUCION VITAMINAS 1000X	ACIDO NICOTINICO	0.50	
	PIRIDOXINA-HCl	0.50	100
	THIAMINA-HCl	0.10	ml
	GLICINA	2.00	
	SUCROSA	3.0%	
INOSITOL 100X	MYO-INOSITOL	100.00	250 ml
	AGAR	0.80%	
	pH	5.7 - 5.8	

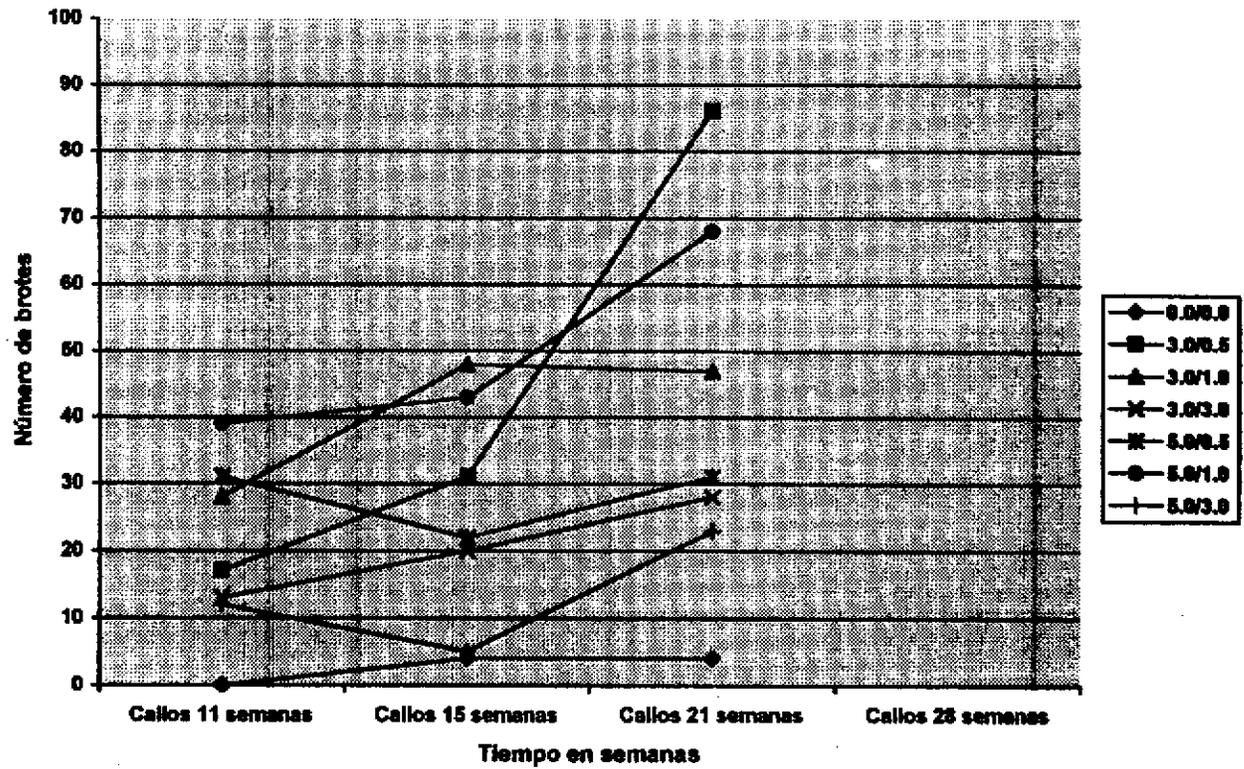


Figura 9A. Producción de callos de zarzaparrilla a través del tiempo

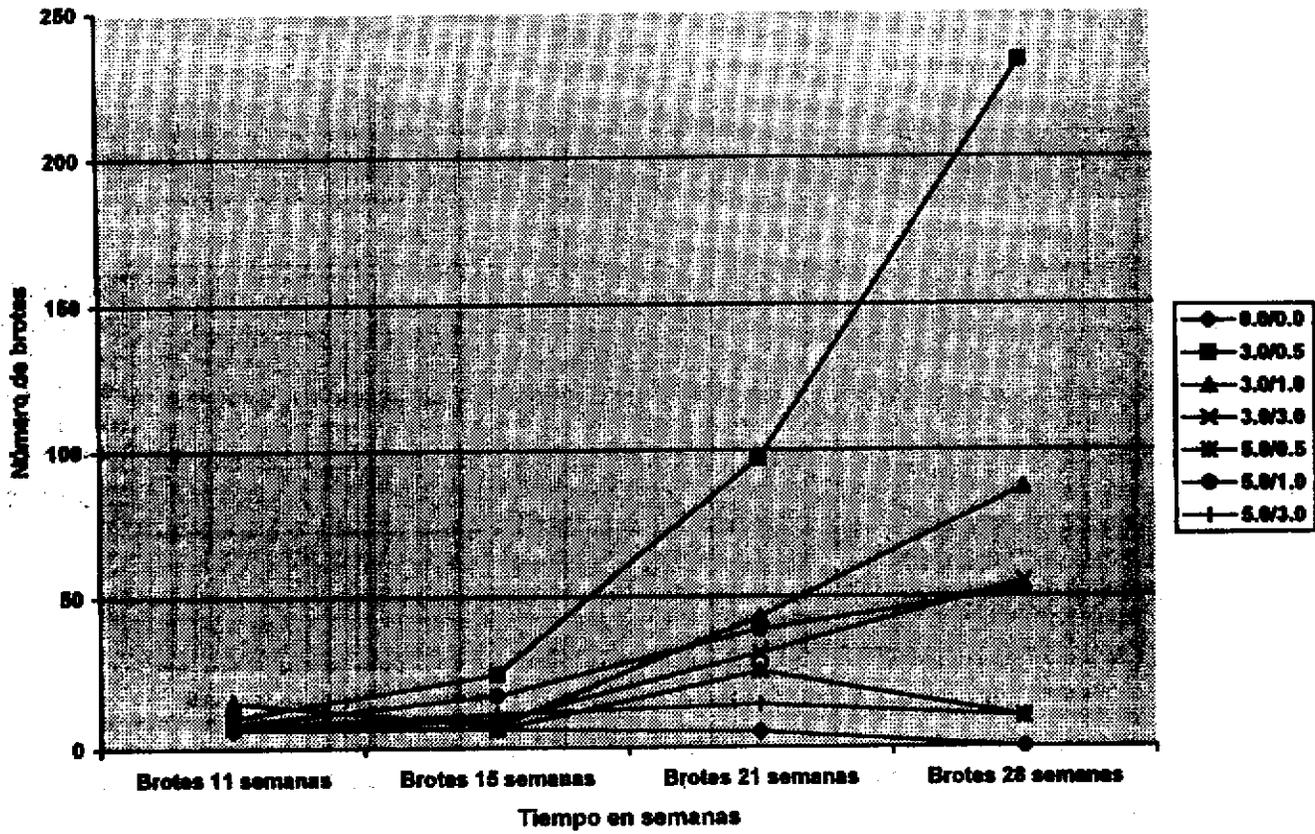


Figura 10A. Producción de brotes de zarzaparrilla a través del tiempo

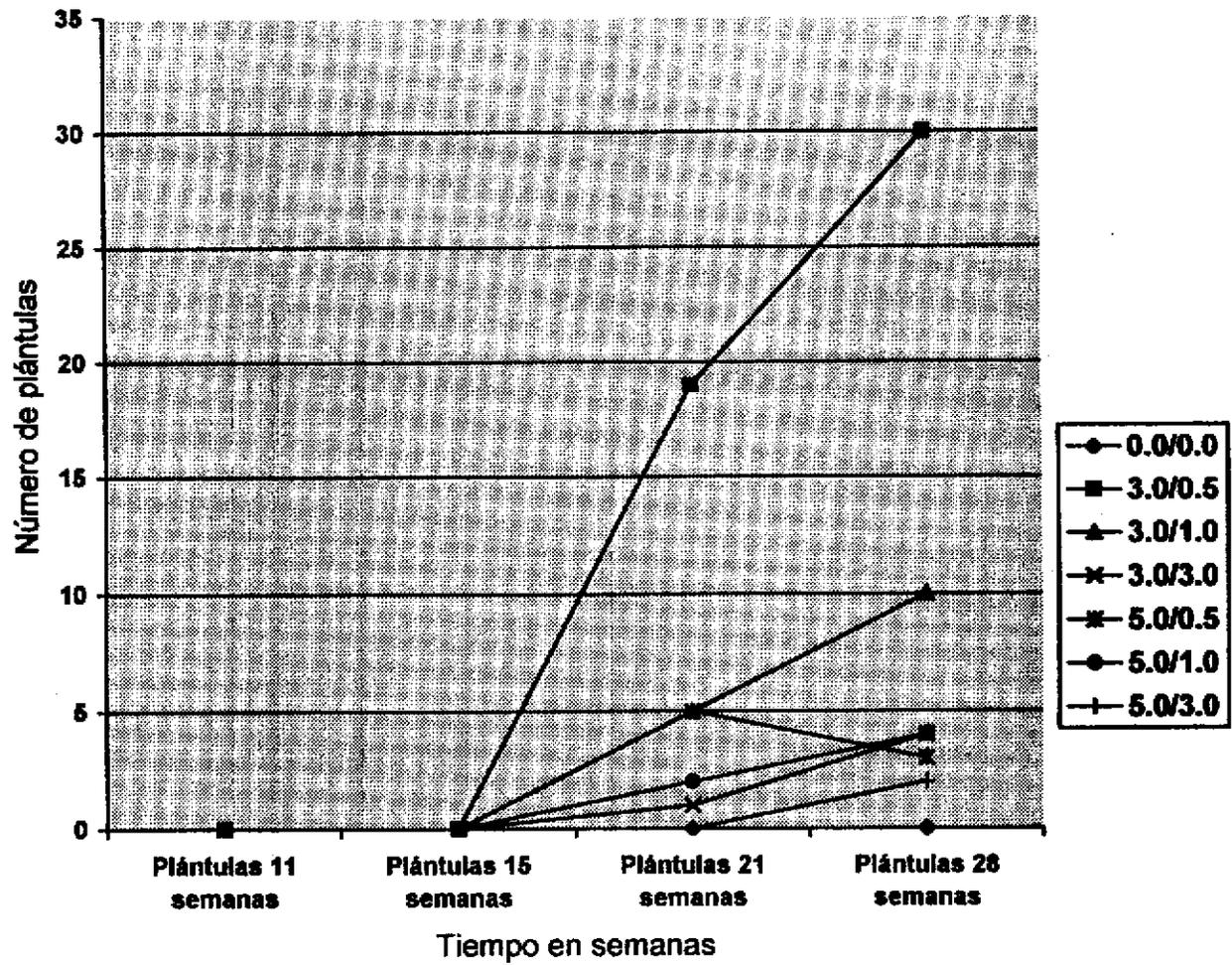


Figura 11A. Producción de plántulas de zarzaparrilla a través del tiempo.



FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGRONOMICAS

LA TESIS TITULADA: "RESPUESTA DE LA PLANTA MEDICINAL ZARZAPARRILLA Smilax moranensis Martens & Galiotti) AL CULTIVO DE TEJIDOS IN VITRO"

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: MARIO ABIGAIL HERNANDEZ TECU

CARNET No: 8615320

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Gustavo A. Alvarez Valenzuela
Ing. Agr. José Humberto Calderón Díaz

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. M.Sc. Domingo Amador Pérez
A S E S O R

Ing. Agr. Edgar Amílcar Martínez Tambito
DIRECTOR a.i. IIA.

IMPRIMASE

Ing. Agr. M.Sc. Edgar Osvaldo Franco Rivera
D E C A N O

cc:Control Académico
IIA.
Archivo
EM/pcr.

APARTADO POSTAL 1545 § 01091 GUATEMALA, C.A.
TEL/FAX (502) 476-9794
e-mail: iiusac.edu.gt § <http://www.usac.edu.gt/facultades/agronomia.htm>