



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Departamento de Fitotecnia

Instituto de Horticultura

“RESPUESTAS MORFOGÉNICAS *IN VITRO* Y CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y MOLECULAR DE YOLOXÓCHITL (*Magnolia mexicana*)”

T E S I S

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Horticultura

P R E S E N T A:

M en C. Jessica Miriam Medrano Hernández

Director:

Dr. José Luís Rodríguez de la O

Asesores:

Dr. Benito Reyes Trejo

Dra. Margarita Gisela Peña Ortega



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



Chapingo, Estado de México, junio 2017.

“Respuestas Morfogénicas *in vitro* y Caracterización Fitoquímica y Molecular de Yoloxóchitl (*Magnolia mexicana*)”

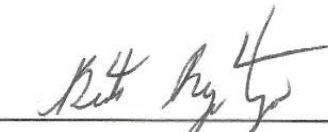
Tesis realizada por la M en C. Jessica Miriam Medrano Hernández bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Director:


Dr. José Luis Rodríguez de la O

Asesor:


Dr. Benito Reyes Trejo

Asesor:


Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

Lector externo:


Dra. Diana Guerra Ramírez

Contenido

LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xii
DEDICATORIA	xiii
AGRADECIMIENTOS	xiv
DATOS BIOGRÁFICOS.....	xvii
RESUMEN GENERAL	xviii
GENERAL ABSTRACT	xix
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. Hipótesis.....	3
1.2. Objetivos.....	3
1.2.1. Objetivo general	3
1.2.2. Objetivos específicos	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Clasificación botánica de <i>Magnolia mexicana</i> DC.	4
2.2. Sinónimos	5
2.3. Descripción	5
2.4. Distribución	7
2.5. Hábitat	7
2.6. Fenología.....	7
2.7. Usos e importancia	8
2.8. Estudios realizados.....	8
2.8.1. Cultivo <i>in vitro</i> de células y de tejidos.....	9

2.8.2. Marcadores moleculares	10
2.8.3. Fitoquímica y capacidad antioxidante	12
2.9. Literatura citada	13
3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE ISSRs DE <i>Magnolia mexicana</i> DC., DE DOS REGIONES DE ZONGOLICA, VERACRUZ, MÉXICO	17
3.1. Resumen	17
3.2. Abstract.....	18
3.3. Introducción	19
3.4. Materiales y métodos.....	20
3.4.1. Material vegetal	20
3.4.2. Extracción y purificación de ADN genómico.....	20
3.4.3. Obtención de patrones ISSR.....	21
3.4.4. Análisis estadístico.....	21
3.5. Resultados y discusión	22
3.6. Conclusiones	27
3.7. Agradecimientos	27
3.8. Referencias.....	28
4. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO <i>in vitro</i> DEL ÁRBOL YOLOXÓCHITL (<i>Magnolia mexicana</i> DC.).....	31
4.1. Resumen	31
4.2. Abstract.....	32
4.3. Introducción	33
4.4. Materiales y métodos.....	35

4.4.1. Colecta de material vegetal.....	35
4.4.2. Preparación de material vegetal.....	35
4.4.3. Prueba de viabilidad de semillas.....	36
4.4.4. Evaluación de la germinación <i>in vitro</i> de embriones cigóticos y segmentos de semilla.	37
4.4.5. Evaluación del crecimiento de callos a partir de nervaduras centrales de hojas y embriones de <i>M. mexicana</i>	38
4.4.6. Análisis estadístico.....	38
4.5. Resultados y discusión	39
4.5.1. Prueba de viabilidad.....	39
4.5.2. Evaluación de la germinación <i>in vitro</i> de embriones cigóticos y segmentos de semilla.	40
4.5.3. Evaluación de la respuesta morfogénica de embriones y explantes de nervadura de hojas en <i>M. mexicana</i>	43
4.6. Conclusiones	48
4.7. Referencias.....	48
5. ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y PROPIEDADES ANTIOXIDANTES, DE EXTRACTOS DE YOLOXÓCHITL (<i>Magnolia mexicana</i> DC.)	51
5.1. Resumen	51
5.2. Abstract.....	52
5.3. Introducción	53
5.4. Materiales y métodos.....	55
5.4.1. Material vegetal.....	55
5.4.2. Preparación de extractos para fitoquímica.....	55

5.4.3.	Separación de extractos.....	56
5.4.4.	Elucidación estructural	57
5.4.5.	Extractos para pruebas de capacidad antioxidante.....	57
5.4.6.	Pruebas de capacidad antioxidante	58
5.4.7.	Análisis estadístico.....	60
5.5.	Resultados y discusión	60
5.5.1.	Análisis de extracto de hojas.....	60
5.5.2.	Análisis de la extracción ácido-base de flores.....	61
5.5.3.	Propiedades antioxidantes de <i>M. mexicana</i>	65
5.6.	Conclusión	68
5.7.	Agradecimientos	68
5.8.	Referencias.....	68
6.	COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Magnolia mexicana</i> DC., EN COLECTAS DEL ESTADO DE PUEBLA, MÉXICO	72
6.1.	Resumen	72
6.2.	Abstract.....	73
6.3.	Introducción	74
6.4.	Materiales y métodos.....	75
6.4.1.	Material vegetal	75
6.4.2.	Extracción y análisis de aceites esenciales.....	75
6.4.3.	Separación cromatográfica	76
6.4.4.	Análisis de los datos.....	76
6.5.	Resultados y discusión	77

6.6. Conclusiones	81
6.7. Agradecimientos	82
6.8. Referencias.....	82
CONCLUSIONES GENERALES	85

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Compuestos aislados en <i>M. mexicana</i> hasta 1975	9
Cuadro 2. Iniciadores ISSRs utilizados en dos poblaciones de <i>M. mexicana</i> ...	22
Cuadro 3. Análisis molecular de varianza (AMOVA) de dos poblaciones de <i>M. mexicana</i> procedentes de Zongolica, Ver.	25
Cuadro 4. Índice de diversidad de Shannon-Weaver en dos poblaciones de <i>M. mexicana</i> procedentes de Zongolica, Ver.	26
Cuadro 5. Concentraciones de reguladores utilizados en el experimento con embriones aislados y con segmentos de semillas de <i>M. mexicana</i> para evaluar germinación <i>in vitro</i>	38
Cuadro 6. Concentraciones de reguladores utilizados en el experimento con embriones aislados o segmentos de semillas de <i>M. mexicana</i>	38
Cuadro 7. Porcentaje de viabilidad en semillas y con respecto a embriones aislados.	39
Cuadro 8. Porcentaje de respuesta encontrada en segmentos de semillas de <i>M. mexicana</i>	40
Cuadro 9. Respuestas obtenidas en embriones de <i>M. mexicana</i> a los 30, 60 y 90 días.	42
Cuadro 10. Respuesta a los tratamientos con diferentes concentraciones de 2,4 D y BA de los embriones de <i>M. mexicana</i>	44
Cuadro 11. Respuesta callogénica en explantes de nervadura central de hojas con diferentes concentraciones de 2,4 D y BA.	46
Cuadro 12. Fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante de hojas y flores de <i>M. mexicana</i>	65
Cuadro 13. Peso promedio y porcentaje obtenido de la extracción de aceites esenciales.	77

Cuadro 14. Compuestos obtenidos por GC-MS para tres localidades de Puebla. México.....	78
Cuadro 15. Porcentaje de los compuestos mayoritarios de cada una de las accesiones de <i>M. mexicana</i>	80
Cuadro 16. Resultados del análisis de aceite esencial refrigerado y extraído después de congelar o liofilizar pétalos de <i>M. mexicana</i>	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de <i>Magnolia mexicana</i> DC, Edo. Puebla, México.....	5
Figura 2. Flor, fruto, semillas y embrión de <i>M. mexicana</i>	6
Figura 3. Área de distribución de <i>M. mexicana</i>	7
Figura 4. Dendrograma construido por el método de varianza mínima de Ward y las distancias de Jaccard ($\sqrt{(1-S)}$) entre materiales de <i>M. mexicana</i> procedentes de Zongolica, Veracruz, México.....	23
Figura 5. I) Análisis de coordenadas principales y II) Árbol de recorrido mínimo de 13 muestras de <i>Magnolia mexicana</i> de dos procedencias geográficas.	24
Figura 6. Tipos de explantes utilizados para experimentos en cultivo <i>in vitro</i> ...	36
Figura 7. Coloración positiva en rojo intenso para la prueba de viabilidad con tetrazolio.	40
Figura 8. Prueba de germinación de segmentos de semillas de <i>M. mexicana</i> . 41	
Figura 9. Respuestas obtenidas <i>in vitro</i> de germinación de embriones.....	42
Figura 10. Crecimiento de callos en embriones aislados de <i>M. mexicana</i>	45
Figura 11. Callos obtenidos en las nervaduras de hojas. A) T _{H2} a los 60 nótese la presencia de células vivas. B) T _{H3} 90 días.....	46
Figura 12. Acercamiento de la formación callosa en explantes de nervadura de hoja, no se observó formación preembrionaria o embrionaria A) 60 días, B) 120 días. Microfotografías 40x.....	47
Figura 13. Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ 400 MHz) de β-Sitosterol en CDCl ₃	63
Figura 14. Espectro ¹ H-RMN (CDCl ₃ 400 MHz) de la mezcla de alcaloides obtenidos del extracto de <i>M. mexicana</i>	64
Figura 15. Pruebas DPPH y ABTS para extractos polares de hojas y flores de <i>M. mexicana</i> . Las columnas con las mismas letras son estadísticamente iguales con la prueba Tukey (P≤0. 05).....	66

Figura 16. CI_{50} en la prueba de DPPH de extractos polares obtenidos de hojas y flores de *M. mexicana*. Prueba t para muestras independientes ($P \leq 0.05$)..... 67

ABREVIATURAS

ABTS	2,2-azino-bis,3-etil benzotiazolin-sulfónico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
BA	6-bencialaminopurina
2,4 D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AG	Ácido giberélico
ACoorP	Análisis de coordenadas principales
AMOVA	Análisis de la varianza molecular
AMR	Árboles de mínimo recorrido
BMM	Bosque mesófilo de montaña
CH	Caseína hidrolizada
CFT	Contenido de fenoles totales
CCD	Cromatografía en capa delgada
CC	Cromatografía en columna
d.a.p	Diámetro a la altura del pecho
MBD	Matriz básica de datos
PVP	Polivinilpirrolidona
RPM	Revoluciones por minuto
UMA	Unidad de manejo ambiental
WP	Woody plant medium

A todos los que amo



AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca (Número: 351391) otorgada a la autora para la realización de la presente tesis.

A la **Universidad Autónoma Chapingo**

Al jurado revisor de esta tesis

Dr. José Luís Rodríguez de la O
Dr. Benito Reyes Trejo
Dra. Gisela Margarita Peña Ortega
Dra. Diana Guerra Ramírez

Al Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales y Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido del Departamento de Fitotecnia de la UACH

Al Laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Preparatoria Agrícola de la UACH.

Al personal técnico y administrativo del Departamento de Fitotecnia y Coordinación de Posgrado de Horticultura.

Al Herbario JES del área de Biología de la Universidad Autónoma Chapingo y a su coordinador **M.C. Antonio Cortés Jiménez** por la identificación botánica del material vegetal.

Al Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, al **Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez**, por las facilidades para tomar asesoría dentro de las instalaciones del Instituto.

Al **M. en C. Everardo Tapia Mendoza**, **M. en C. Lucía del Carmen Márquez Alonso** y **M. en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz** del Instituto de Química UNAM, por su asesoría y orientación técnica sobre GC-MS, LC-MS.

Por su asesoría y apoyo técnico en marcadores moleculares:

M. en C. María Elisa Alvarado Cano
Q.F.B. Ricardo Gaspar Hernández

Por su asesoría y apoyo técnico en cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

Tec. Lab. Gisela de la Rosa García

Al **Dr. Jorge L. Leyva Vázquez** por su revisión del “General Abstract”.

Por su asesoría en técnicas cromatográficas preparativas y analíticas.

Dra. Matilde Villa García
Dr. Holber Zuleta Prada
Ing. José María Cunill Flores

Por su apoyo y orientación

M en C. Oscar Daniel Barrera Sánchez
M en C. Juan Vásquez Sánchez
M en C. Edgar López López
M en C. Araceli Gastelum Osorio
M en C. Marcela Betancourt Olvera
M en C. Alba Gisela Fajardo Ayala

Especialmente, por contribuir a mi formación y por su valiosa asesoría técnica, académica y en campo; así como haber aceptado ser la lectora externa de la presente tesis a la **Dra. Diana Guerra Ramírez**.

Muy especialmente a las personas y familias que contribuyeron o auxiliaron en la búsqueda del material de *M. mexicana* en sus comunidades, sin cuya disponibilidad este trabajo no se hubiese realizado:

Ing. Antonio Vázquez Lemus y la **Sra Gudelia Cano Amayo** de la UMA-Yolóxochitl en Zongolica, Veracruz.

En Puebla, al **Señor artesano Elías Nicolás Galindo** y su esposa, a su hija Ivett y su esposo Roque, y a la señora **Manuela Bonilla Hernández** y al joven **Romaldo Hernández Bonilla** deseo que su valioso tesoro dure muchas generaciones más en su familia

“Yoloxóchitl árbol que enamora al corazón a través del sabor”

Romaldo Hernández Bonilla

DATOS BIOGRÁFICOS

Nombre: Jessica Miriam Medrano Hernández

Lugar de nacimiento: Texcoco, Estado de México

Profesión: Bióloga

Cédula profesional: 7672070

Desarrollo académico:

Escuela Preparatoria Oficial No 100. Periodo: 2001-2004

Licenciatura en Biología Experimental. Periodo: 2004-2008

Maestría en Biología Experimental. Periodo: 2008-2012

RESUMEN GENERAL

Respuestas Morfogénicas *in vitro* y Caracterización Fitoquímica y Molecular de Yoloxóchitl (*Magnolia mexicana*)

El yoloxóchitl (*Magnolia mexicana* DC.) es una especie endémica de México catalogada como amenazada con conocidas propiedades medicinales. Este trabajo efectuó la caracterización fitoquímica y molecular, así como el establecimiento *in vitro* de yoloxóchitl. El análisis molecular se llevó a cabo con marcadores tipo ISSRs. Para el cultivo *in vitro* de explantes de hojas y embriones se probaron diferentes tratamientos de 2, 4 D y BA. Por separación cromatográfica del extracto metanólico de hojas y extracción ácido-base de flores se evaluó la presencia de compuestos de interés. Por medio de GC-MS se separó y analizó la composición química del aceite esencial de flores de *M. mexicana*. Las propiedades antioxidantes se determinaron con los ensayos DPPH, ABTS, contenido de flavonoides y fenoles totales. El análisis con ISSR demostró poca variabilidad entre poblaciones (9.12) y los índices de Diversidad de Shannon-Weaver (0.47 y 0.41) indicaron que aún no existe alteración en la estructura genética de yoloxóchitl en las poblaciones analizadas. Se consiguió establecer masas callosas a partir de hojas y embriones con un tratamiento de 2,4 D (1 mg L^{-1}) y BA (0.3 mg L^{-1}), no se pudieron obtener embriones somáticos a partir de estos. Una fracción de la separación ácido-base del extracto metanólico de flores mostró por ^1H -RMN la presencia de dos moléculas no reportadas para esta especie: 5-metoxi-2-metil indolina y 6-metoxi 2-metil indolina; la similitud estructural de ambas impidió la purificación de la mezcla. El análisis de la capacidad antioxidante determinó mayor capacidad antioxidante en flores que en hojas en todas las pruebas (Cl_{50} : $42.91 \pm 4.47 \mu\text{g mL}^{-1}$, fenoles totales: $111.26 \text{ mg EAG g}_{\text{bs}}^{-1}$ y flavonoides: $50.87 \pm 1.37 \text{ mgEC g}_{\text{bs}}^{-1}$). El análisis del aceite esencial encontró como principales compuestos al elixeno (27.9 %) y germacreno (20.7 %). El trabajo desarrollado aporta nueva información sobre *M. mexicana* y destaca la importancia de esta especie.

Palabras clave: Antioxidantes, callogénesis, alcaloides, aceite esencial

Tesis Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Jessica Miriam Medrano Hernández
Director de Tesis: Dr. José Luis Rodríguez de la O

GENERAL ABSTRACT

***In vitro* Morphogenic Responses and Phytochemical and Molecular Characterization of YOLOXOCHITL (*Magnolia mexicana* DC.)**

Yoloxóchitl or “heart’s flower” (*Magnolia mexicana* DC.) is a Mexican endemic species; this species is threatened due to habitat loss. *Magnolia mexicana* has recalcitrant seed with no tolerance to storage at low temperatures and a little germination index, therefore it is difficult to multiply. The present study carried out the phytochemical and molecular characterizations, as well as *in vitro* culture of *M. mexicana*. Molecular analysis by ISSR showed little variability between populations (9.12) and Shannon-Weaver Index (0.47 and 0.41) indicated that the genetic structure of *M. mexicana* has not been altered in the studied populations analyzed. The *in vitro* culture of *M. mexicana* callous masses from leaves and embryos were established treating materials with 2.4 D 1 mg L⁻¹ and BA 0.3 mg L⁻¹; however somatic embryos from callus were not established. Phytochemical analysis by ¹H-NMR showed the presence of two molecules not reported previously for this species: 5-methoxy-2-methyl indoline and 6-methoxy 2-methyl indoline, the mixture could not purify due to its structural similarity. All analysis showed a greater antioxidant capacity on flowers than on leaves in all samples (IC 50: 42.91 ± 4.47 µg mL⁻¹, total phenols: 111.26 mg EAG g_{bs}⁻¹ and flavonoids: 50.87 ± 1.37 mgEC g_{bs}⁻¹); the literature review showed similar antioxidant capacity on other known medicinal plants. Flowers essential oil was analyzed by GC-MS; the main compounds present in all analyzed samples were: elixene (27.9 %) and germacrene (20.7 %). This study provides new information about *M. Mexicana*, that was not reported before and contributing to its importance as a valuable genetic resource.

Thesis Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Jessica Miriam Medrano Hernández
Advisor: Dr. José Luis Rodríguez de la O

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Magnolia mexicana DC. comúnmente conocida como flor de corazón (Morelos, México); jolmaste (Chiapas); magnolia (Distrito Federal, Morelos) o yoloxóchitl (Veracruz) (Hernández, 1980), es una especie silvestre, pero suele fomentarse en huertos familiares o parques con fin ornamental. Fernando Altamirano y José Ramírez la incluyeron en su lista de árboles y arbustos propicios para repoblar bosques de la República Mexicana (Olvera y Lindig-Cisneros, 2005). La madera es usada para construcción y como cercas vivas, son árboles de sombra para cultivo de café (Avendaño y Acosta, 2000), pero su principal aprovechamiento durante siglos ha sido en la medicina tradicional mexicana encontrándose descrita en el Códice de la Cruz Badiano de plantas medicinales donde se mencionada su efecto descongestionante (de Micheli-Serra e Izaguirre-Ávila, 2014). Varios bioensayos experimentales realizados en la primera mitad del siglo XX han validado este conocimiento en especial el relacionado con las funciones cardiaca y vascular (Waizel, 2002).

Magnolia mexicana habita en México en selvas altas perennifolias y bosque mesófilo de montaña (Palacios, 2006), hábitat que actualmente está seriamente amenazado, calculándose que aproximadamente el 50 % de la superficie original del bosque ha sido reemplazada por otros tipos de cobertura. La fragmentación y alteración del hábitat por actividades humanas o climáticas es el fenómeno al que se le atribuye la pérdida de biodiversidad (CONABIO, 2010; Nora, Albaladejo, González, Robledo y Aparicio, 2011). Por lo que fue incluida en la lista de la NOM-059-SEMARNAT-2010 como especie amenazada (SEMARNAT, 2010),

Aunado a lo anterior existen problemáticas de conservación y multiplicación de esta especie. Las semillas de *M. mexicana* son de naturaleza recalcitrante a intermedia (Osuna, 1997), ya que resisten porcentajes de deshidratación menores a 10 % pero son intolerantes al frío lo que dificulta el resguardo de su material genético en un banco de germoplasma. La presencia de embriones rudimentarios que siguen desarrollándose después de que las semillas son

liberadas por el fruto y con un porcentaje de germinación menor al 15 % hacen que *M. mexicana* sea una especie de difícil propagación (Osuna, 1997; Gómez-Maqueo, 2011) por lo que es necesario buscar alternativas para su conservación y rescate.

En otras especies con igual problemática se han reportado buenos resultados en la propagación por manejo de tejidos *in vitro*. Esta herramienta potencializa la producción y sanidad en las plantas obtenidas, así como la generación de semillas criogénicas para su conservación (Celestino, Hernández, Careros, López & Toribio, 2005). El rescate de embriones cigóticos y la geminación *in vitro* de semillas prometen resultados alentadores para la conservación de germoplasma valioso (Fay, 1992; Attree & Fowke, 1993). Otras herramientas biotecnológicas, como los marcadores moleculares ISSR, permiten evaluar la diversidad genética entre y dentro de poblaciones naturales proporcionando información que permite generar estrategias de conservación y programas de mejoramiento (González, 2003).

Además de la importancia biológica intrínseca de un árbol como *M. mexicana* se destacan los usos y aprovechamiento que posee como planta medicinal y su potencial como productor de metabolitos biológicamente activos para la farmacognosia y fitoterapia. Como es bien sabido, desde tiempos ancestrales la cultura etnobotánica mundial ha buscado en las plantas una fuente de estructuras químicas que sirvan como base para el desarrollo de fármacos (Schlaepfer y Mendoza-Espinoza, 2010).

Por lo anterior el presente trabajo desarrolló la caracterización fitoquímica y molecular, así como el cultivo *in vitro* de *M. mexicana* por medio de técnicas biotecnológicas con la finalidad de generar nuevo conocimiento sobre esta especie.

1.1. Hipótesis

1. Las poblaciones de *M. mexicana* han sufrido fragmentación por la reducción de su hábitat por lo que en un análisis de marcadores moleculares tipo ISSR se encontrará poca diversidad genética entre poblaciones.
2. El establecimiento de condiciones de cultivo apropiadas para embriones y hojas de *M. mexicana* promoverá su crecimiento y multiplicación eficientemente comparado con las condiciones silvestres.
3. Las plantas medicinales como *M. mexicana* contienen una variedad de compuestos con efecto biológico la separación e identificación por cromatografía y el estudio de la capacidad antioxidante revelarán las propiedades benéficas y la presencia de moléculas bioactivas.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Describir el establecimiento de cultivo *in vitro*, caracterización molecular y composición química de *M. mexicana* por medio de biotecnología, cromatografía y estudios espectroscópicos, con la finalidad de respaldar su importancia ecológica y propiedades benéficas.

1.2.2. Objetivos específicos

Comparar los niveles de polimorfismo poblacional de *M. mexicana* con marcadores ISSRs para determinar su estructura genética.

Establecer el crecimiento de explantes de *M. mexicana in vitro* variando la composición del medio de cultivo y los reguladores de crecimiento para promover las respuestas morfogénicas que permitan una multiplicación eficiente.

Analizar por métodos cromatográficos y espectroscópicos algunos metabolitos secundarios presentes en flores y hojas de *M. mexicana* para identificarlos y relacionarlos con sus propiedades benéficas.

Determinar las propiedades antioxidantes *in vitro* en flores y hojas, aplicando métodos colorimétricos para determinar los beneficios potenciales de su consumo.

Identificar la composición química de los aceites esenciales de las flores de *M. mexicana* por GC-MS para identificar sus principales componentes.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Clasificación botánica de *Magnolia mexicana* DC.

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Magnoliidae

Orden: Magnoliales

Familia: Magnoliaceae

Subfamilia: Magnolioideae

Género: *Magnolia*

Especie: *Magnolia mexicana* (GBIF, 2017)

Sinónimo *Talauma mexicana* (DC.) G. Don. Figlar y Nooteboom (2004) basados en investigación de ADN y estudios morfológicos propusieron una nueva clasificación. La subfamilia Magnolioideae de Magnoliaceae solo contiene un género, *Magnolia*. Considerando la variabilidad contenida en *Magnolia*, éste fue subdividido en tres subgéneros: 1) *Magnolia* con 8 secciones y 7 subsecciones; 2) *Yuliania*; y 3) *Gynopodium*. Así, desde 2004, *Magnolia mexicana* quedo contenida en la sección Talauma del género *Magnolia*.

2.2. Sinónimos

- *Magnolia macrocarpa* (Zucc.) A. Vázquez & De Castro
- *Talauma macrocarpa* Zucc.
- *Talauma mexicana* (DC.) G. Don (GBIF, 2017)

2.3. Descripción

Magnolia mexicana DC., un árbol que mide entre 3 m a 20 m de altura, diámetro de hasta 1.3 m (d.a.p); corteza verde grisácea o pardo oscura, lisa a ligeramente fisurada, con cicatrices de hojas, con abundantes lenticelas suberificadas y protuberantes de 0.4 – 4 mm de longitud y cicatrices circulares en cada nudo (Figura 1).



Figura 1. Árbol de *Magnolia mexicana* DC, Edo. Puebla, México.

Hojas: color verde claro y brillante al haz, el envés verde amarillo, oblongas o elípticas, de 8 – 23 cm de longitud, con 2 líneas de cicatrices a lo largo por 4 – 12.7 cm de ancho, coriáceas, glabras, el margen entero, el ápice agudo a obtuso, la base aguda; con olor fragante al estrujarlas; nerviación reticulada; pecíolo, grisáceo, lanceoladas, de 2-5 cm de longitud, el ápice agudo, con escaso indumento seríceo.

Flores: terminales; solitarias, de 3 -4 cm de longitud, tres sépalos blancos, oblongos u obovados, de 4-10 cm de largo por 3 – 7 de ancho, carnosos, el ápice truncado, la base atenuada; pétalos 6 en series de 3 los de primera serie obovados, de 8- 10 cm de largo por 5-7 cm de ancho, los 6 con la base atenuada y ápice redondeado; estambres numerosos, arreglados en espiral sobre el eje floral, laminares, amarillos, de 1.3 – 1.5 cm de largo, el eje floral de 0.5 – 1cm de longitud, pistilos numerosos, ovarios unidos en la base de 0.7 – 1.3 cm de longitud, el estilo recto, de 1 cm de longitud (Figura 2, A y B).

Fruto y semillas: un multifolículo de forma ovoide, de color pardo verdoso, de 10-15 cm de largo, ligeramente pubescente, cada folículo es leñoso; semillas un o dos péndulas de un funículo corto; redondeadas, de 7 – 12 mm de largo, con una sarcotesta de color rojo; embrión recto y pequeño, cotiledones de forma redondeada (Figura 2, C, D, E y F).

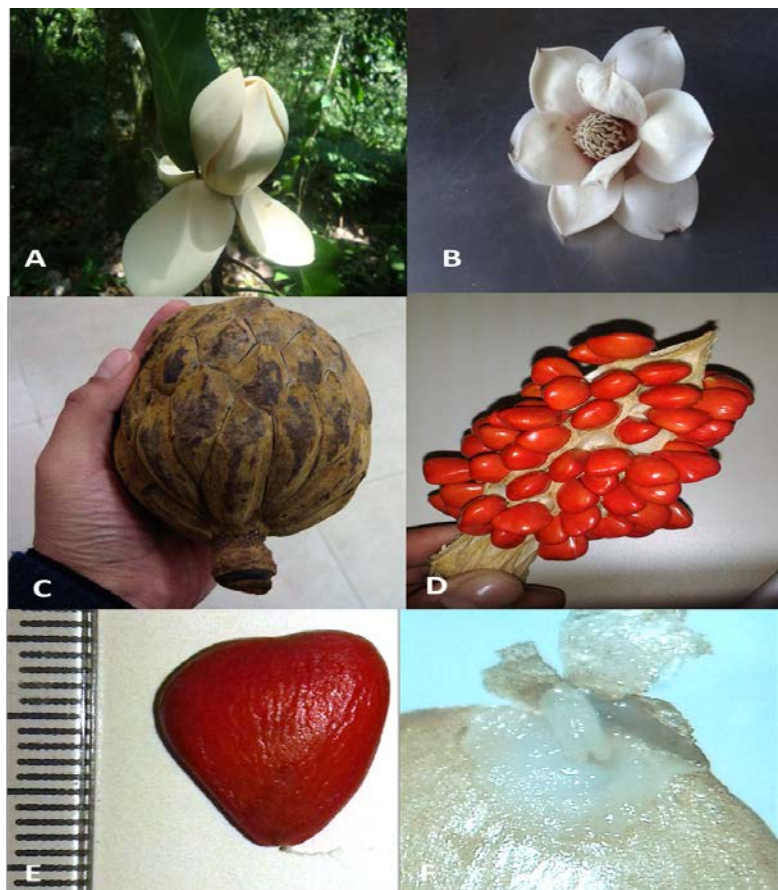


Figura 2. Flor, fruto, semillas y embrión de *M. mexicana*

2.4. Distribución

Anteriormente se encontraba distribuida en el centro-sur de México y parte de Centroamérica como Guatemala y Honduras. Actualmente su hábitat se ha fragmentado y alterado por actividades antropogénicas y por incendios forestales (Hernández, 1980; Palacios, 2006). Trabajos recientes la han reportado principalmente distribuida en el centro de México en estados como Morelos, Puebla, Veracruz y norte de Oaxaca (Figura 3) (Vázquez, Gómez, López, Espinosa, y Sahagún, 2013).

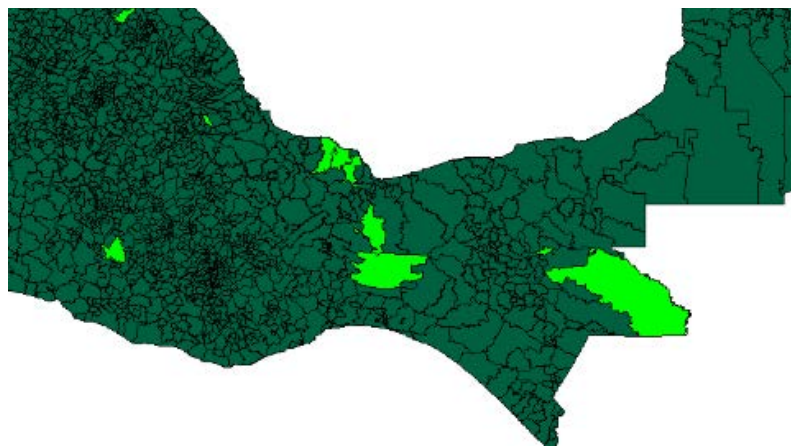


Figura 3. Área de distribución de *M. mexicana*. Tomado de Palacios (2006)

2.5. Hábitat

Magnolia mexicana DC. es una especie que habita en México en selvas altas perennifolias y bosque mesófilo de montaña de lauráceas, principalmente en la vertiente del Golfo y una franja en la vertiente del Pacífico. Habita en sobresuelos de origen calizo relativamente antiguos o en suelos derivados de materiales metamórficos, microclimas cálido y subcálido húmedos, desde 450 a 1500 msnm, (Palacios, 2006).

2.6. Fenología

Árbol perennifolio, florece de marzo a junio y fructifica de mayo a febrero (Palacios, 2006).

2.7. Usos e importancia

Las especies de la familia *Magnoliaceae* se considera primitiva debido a que sus sépalos y pétalos no están claramente diferenciados por lo que son de gran interés para estudios de evolución, biogeográficos, taxonómicos y ecológicos. Por otro lado, su número y distribución ayudan a determinar la salud de los ecosistemas donde se encuentra (Cicuzza, Newton, & Oldfield, 2007).

La madera es localmente usada para la construcción y los árboles se utilizan cercas vivas y como sombra para cultivo de café (Avendaño y Acosta, 2000). Su principal aprovechamiento durante siglos ha sido en la medicina tradicional mexicana. Reportada en el Códice de la Cruz Badiano de plantas medicinales donde es mencionada con efecto descongestionante (de Micheli-Serra e Izaguirre-Ávila, 2014). Estudios históricos indican el empleo de yoloxóchitl como cardiotónico, para el control de los desórdenes o enfermedades cardiacas y en la curación de enfermedades de los sistemas nervioso y cardiovascular, además se reporta como antiespasmódico, antiepiléptico, antipirético, diurético, contra la parálisis y para promover la fertilidad. Los estudios etnofarmacológicos y diversos bioensayos experimentales realizados a partir de 1927 han tratado de comprobar sus propiedades terapéuticas, los mejores resultados son los relacionados con las funciones cardiaca y vascular (Waizel, 2002). Recientemente se reportaron efectos significativos en la relajación de anillos de tráquea de ratas, sugiriendo su capacidad terapéutica en enfermedades como el asma (Sánchez-Recillas *et al.*, 2014).

2.8. Estudios realizados

La mayoría de los trabajos fitoquímicos y farmacológicos sobre esta especie fueron realizados antes del año 1975. De acuerdo con Waizel (2002) los estudios farmacológicos en humanos y animales probaron la acción estimulante de la flor, hojas y corteza sobre las funciones cardiacas y presión arterial, justificando la necesidad de retomar el estudio de esta especie con recursos modernos. En el Cuadro 1 se muestran los compuestos identificados, algunos de los cuales no han podido ser nuevamente aislados (p. ej. aztequina y talaumina).

La actividad de *M. mexicana* se ha comprobado en diversos estudios farmacológicos que se refieren principalmente a la acción de esta planta sobre las enfermedades cardíacas, y sus efectos han sido comparados con los de la digital (*Digitalis purpurea*) (de Micheli-Serra, 2000). Tiene efecto significativo en la relajación de anillos de tráquea de ratas, sugiriendo su posible capacidad terapéutica en enfermedades como el asma (Sánchez-Recillas *et al.*, 2014).

Cuadro 1. Compuestos aislados en *M. mexicana* hasta 1975

Autor y año	Parte de la planta	Compuesto
Herrera A. 1891; Armendáriz E., 1894	Flores	Un aceite esencial, una resina, el flavonoide quercetina y taninos
Río de la Loza y Miranda F. 1984	Semilla y Corteza	Un glucósido y un alcaloide.
Guerra, 1938; Escobar, 1941	Hojas	Aztequina y la talaumina [†]
Sodi-Pallares y Martínez-Garza, 1947	Flores y Hojas (extracto dicloroetileno)	p-hidroxibenzofenona, ácido trimésico y quercitol
Collera <i>et al.</i> , 1963	Corteza	Aceite aromático y β -sitosterol, costunolida No encontraron alcaloides
Kametani <i>et al.</i> , (1975)	Flores y hojas	No detectaron aztequina. Reportan un alcaloide: liriodenina y una lactona sesquiterpénica

[†] Del alcaloide aztequina se duda de su existencia, del alcaloide talaumina se duda de la estructura propuesta. Tomado de Waizel, 2002.

2.8.1. Cultivo *in vitro* de células y de tejidos

El cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro* se refiere al conjunto de técnicas y procedimientos usados para hacer crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos en un medio artificial de composición química definida incubado en condiciones ambientales controladas (Street, 1973). Las aplicaciones de la técnica de cultivo *in vitro* son: producción masiva de plantas elite genéticamente homogéneas (Calva & Pérez, 2005); mejoramiento genético de cultivares mediante variación somaclonal inducida o esporádica *in vitro* (Gutiérrez, Santacruz, Cabrera & Rodríguez, 2003), producción *in vitro* de tejidos o células productoras de metabolitos secundarios bioactivos de interés (Roca & Mroginski, 1991; Zabala, Velásquez, Cardona, Flórez, & Vallejo, 2009), producción de plantas

transgénicas (Calva & Pérez, 2005); rescate de embriones, formación de semilla sintética para crio-conservación (Bewley, 1997).

Las condiciones del cultivo se controlan para inducir el desarrollo del explante (tejido de hojas, ápice, raíz, etc.) hacia la formación de una masa celular amorfa denominada callo o hacia la diferenciación en un tejido organizado que producirá órganos (organogénesis) o embriones (embriogénesis) (Calva y Pérez, 2005); la morfogénesis, se define como el origen y los cambios en la estructura y organización de un organismo durante su desarrollo, esto ocurre en la organogénesis o en la embriogénesis *in vitro*. La organogénesis consiste en la formación *de novo* de órganos (raíces y/o brotes adventicios). La embriogénesis somática es la capacidad de ciertas células vegetales para formar embriones, estos embriones somáticos germinan y dan origen a individuos completos con el fenotipo de la planta donante de la célula inicial (Celestino *et al.*, 2005).

La inducción de la formación de un callo en condiciones controladas implica la reprogramación de las células que pertenecen a un tejido diferenciado para regresar a un estado des-diferenciado y con alta capacidad proliferativa, de igual manera establecer la diferenciación de los tejidos a partir de una masa callosa para formar brotes o raíces, son los puntos clave en la técnica de cultivo *in vitro*. La proporción de las hormonas vegetales, auxinas y la citocininas, es crítica para promover la desdiferenciación y posterior rediferenciación de los explantes *in vitro*. En *Arabidopsis* un medio rico en auxinas promueve la formación de callos mientras que el posterior sub-cultivo en medio alto en auxinas o citocininas permite la formación de raíces o brotes, respectivamente (Iwase *et al.*, 2011). Esta teoría es la que se emplea ampliamente en cultivo *in vitro* para regenerar y multiplicar tejidos y plantas.

2.8.2. Marcadores moleculares

Un marcador es un elemento morfológico, bioquímico o genómico que puede ser empleado por la biotecnología como distintivo de un individuo o grupo de individuos. Un marcador genético molecular o de ADN es un locus marcador que debe ser polimórfico, de tal manera que señale una diferencia fenotípica y/o algún

locus próximo (ligado) que controle algún carácter de interés (tamaño, peso, color, etc.) (Álvarez, 2011). Algunas de sus características son: que pueden señalar tanto regiones codificantes del genoma como no-codificantes, se manifiestan de manera constante a lo largo de la vida del organismo y presentan insensibilidad a la influencia de factores ambientales, detectan mayor variabilidad que los marcadores morfológicos y dependen en menor medida del observador que realiza el análisis (Azofeifa-Delgado, 2006).

Las Inter Secuencias Simples Repetidas o ISSRs (por sus siglas del inglés Inter-Simple Sequence Repeat), son un tipo de marcador genético que permite cuantificar los niveles de variación presentes en las regiones microsatélite dispersas en el genoma nuclear. Los micro satélites son secuencias de ADN constituidas por repeticiones de nucleótidos de 1 a 6 pares de bases tándem de motivos como citocina-timina (CT_n) o citocina-adenina (CA_n); este tipo de secuencias se han encontrado tanto en genomas eucariontes como en procariontes, se distribuyen en regiones codificantes y no codificantes y se caracterizan por ser altamente polimórficos en cuanto a su longitud. Los ISSRs amplifican fragmentos que se ubican entre las repeticiones de los microsatélites; los iniciadores para ISSR suelen ser de 16 a 25 pares de bases, solo se utiliza un iniciador por reacción y esta ocurre cuando dos secuencias repetidas se encuentran en orientación invertida y a una distancia que permita que el ADN polimerasa amplifique el fragmento completo (Cornejo, Serrato, Rendón, & Rocha, 2014).

Los marcadores ISSR son una técnica que ofrece detectar una alta variación polimórfica en las secuencias de ADN, por lo que han sido utilizados para la identificación de individuos, distinción de variedades intraespecíficas, identificación de paternidad y maternidad, mapeo genético, evaluación de diversidad y subdivisión genética en poblaciones, reconstrucciones filogenéticas, entre otras (Álvarez, 2011)

2.8.3. Fitoquímica y capacidad antioxidante

El metabolismo secundario consiste en una serie de procesos bioquímicos de síntesis de compuestos orgánicos, con funciones específicas tales como comunicación intra e interespecífica, defensa contra radiación, congelación, ataque de depredadores etc. Existen cientos de diferentes tipos de moléculas dentro del reino vegetal derivadas de este tipo de metabolismo y por consiguiente presentan una vasta complejidad química. Ejemplos de ellos son los pigmentos (flavonoides, cumarinas, taninos); terpenos (como el mentol y alcanfor), alcaloides (nicotina, cocaína) etc. (Sepúlveda, Porta-Ducoin, & Rocha, 2003).

Los metabolitos secundarios producidos por las plantas son compuestos que participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, la síntesis de éstos se realiza en respuesta a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros, b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003). Por otro lado, muchos metabolitos secundarios son capaces de atrapar radicales libres por lo que proporcionan efectos benéficos a los seres humanos que consumen alimentos de origen vegetal (Oliveira y Velázquez & Bermúdez, 2005).

Se ha demostrado que este tipo de compuestos antioxidantes retardan o previenen el proceso de oxidación de estructuras celulares al colisionar con un radical libre lo estabilizan protegiendo al metabolismo celular de su ataque (Venereo-Gutiérrez, 2002). En la búsqueda de compuestos naturales con actividad antioxidante se han encontrado diversos compuestos fenólicos, ácido ascórbico y compuestos nitrogenados como péptidos, aminoácidos, aminas y alcaloides (Valentão *et al.*, 2002). Los metabolitos secundarios sintetizados por las plantas con características antioxidantes son de variadas formas químicas, entre ellos están los compuestos fenólicos, como los flavonoles, chalconas, flavonas, flavanonas, taninos, estilbenos, curcuminoides, ácidos fenólicos, coumarinas, lignanos, etcétera, (Huang, Cai, & Zhang, 2010).

2.9. Literatura citada

- Álvarez, G. M. (2011). La selección asistida por marcadores (MAS, "Marker-assisted selection") en el mejoramiento genético del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Cultivos Tropicales*, 32(2), 154–171.
- Attree, S. M., & Fowke, L. C. (1993). Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35(1), 1–35. <https://doi.org/10.1007/BF00043936>
- Avendaño, R. S., & Acosta, R. I. (2000). Plantas utilizadas como cercas vivas en el estado de Veracruz. *Madera y Bosques* 6(1):55-71. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61760105>
- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–242. <https://doi.org/10.15517/am.v17i2.5163>
- Bewley, J. (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 9(7), 1055–1066.
- Calva, C. G., & Pérez, V. J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*, 6(11): 1607-7069. Recuperado a partir de <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a-1a.htm>
- Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López, V. D., & Toribio, M. (2005). La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Forest Systems*, 14(3), 345–357.
- Cicuzza, D., Newton, A., & Oldfield, S. (2007). Red List of the Magnoliaceae. Cambridge, UK: Fauna & Flora International. Recuperado a partir de https://www.bgci.org/plant-conservation/magnolia_red_list/
- Collera O, Walls F, García F, Flores SE, Herrán J. (1963). Estudio de las cortezas de *Talauma mexicana* Don. y de *Magnolia shadiana* (Magnoliaceae). Boletín Instituto de Química UNAM. XV: 38-40 https://uniquim.iquimica.unam.mx/boletin_electronico/15.html
- CONABIO. (2010). *El Bosque Mesófilo de Montaña en México: Amenazas y Oportunidades para su Conservación y Manejo Sostenible*. México D.F.: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Bio- diversidad. Capítulo II pag. 20-37. Recuperado a partir de http://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/pdf/BMM_parte%201.pdf
- Cornejo, R. A., Serrato, D. A., Rendón, A., & Rocha, M. M. G. (2014). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. México. D.F: (INECC -Semarnat). Recuperado a partir de www.inecc.gob.mx
- De Micheli-Serra, A. (2000). Digitalic therapy. Historical outline. *Gaceta Medica De México*, 136(5), 511–518.

- De Micheli-Serra, A. A., & Izaguirre-Ávila, R. (2014). On New Spain and Mexican medicinal botany in cardiology. *Revista De Investigación Clínica*, 66(2), 194-199
- Fay, M. F. (1992). Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 28(1), 1–4. <https://doi.org/10.1007/BF02632183>
- Figlar, R. B., & Nooteboom, H. P. (2004). Notes on Magnoliaceae IV. *Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 49(1), 87–100. <https://doi.org/10.3767/000651904X486214>
- GBIF. (2017). *Magnolia mexicana* DC. - Checklist View. Global Biodiversity Information Facility. Recuperado el 20 de marzo de 2017, a partir de <http://www.gbif.org/species/3152979>
- Gómez Maqueo, B. X. (2011). Germinación de semillas de *Talauma mexicana* deshidratadas en ambientes controlados. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de México, México. D.F. Recuperado a partir de <http://bibliotecacentral.unam.mx/tesis.html>
- González, E. G. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59(2–3), 377–388. <https://doi.org/10.3989/graeellsia.2003.v59.i2-3.253>
- Gutiérrez M. A., Santacruz R. F., Cabrera P. J. L., & Rodríguez G. B. (2003). Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. *e-Gnosis*, 1(4), 19.
- Hernández C. M. (1980). Flora de Veracruz Magnoliaceae [México]. *Instituto Nacional de Investigadores sobre Recursos Bióticos*, (14), 17.
- Huang, W.-Y., Cai, Y.-Z., & Zhang, Y. (2010). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 62(1), 1–20. <https://doi.org/10.1080/01635580903191585>
- Iwase, A., Mitsuda, N., Koyama, T., Hiratsu, K., Kojima, M., Arai, T., Ohme-Takagi, M. (2011). The AP2/ERF transcription Factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 21(6), 508–514. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.02.020>
- Kametani, T., Terasawa, H., Ihara, M., & Iriarte, J. (1975). Liriodenine from *Talauma mexicana*. *Phytochemistry*, 14(8), 1884–1885. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85326-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85326-X)
- Nora, S., Albaladejo, R. G., González, M. S. C., Robledo, A. J. J., & Aparicio, A. (2011). Movimiento de genes (polen y semillas) en poblaciones fragmentadas de plantas. *Ecosistemas*, 20(2–3). <https://doi.org/10.7818/re.2014.20-2-3.00>
- Oliveira, M. M. A., Velázquez, D., & Bermúdez, A. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y

- enfoques actuales. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 30(8), 453–459.
- Olvera, F. H. M., & Lindig-Cisneros, R. (2005). La lista de nombres vulgares y botánicos de árboles y arbustos propicios para repoblar los bosques de la República de Fernando Altamirano y José Ramírez a más de 110 años de su publicación. *Revista mexicana de biodiversidad*, 76(1), 11–35.
- Osuna, F. H. R. (1997). Estructura y respuesta germinativa de semillas de plantas medicinales: *Chiranthodendron pentadactylon* y *Talauma mexicana*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de México, México. D.F. Recuperado a partir de <http://bibliotecacentral.unam.mx/tesis.html>
- Palacios, E. (2006). Ficha técnica de Magnolia mexicana. Cuarenta y ocho especies de la flora de Chiapas incluidas en el PROY-NOM-059-ECOL-2000. México. D.F: Instituto de Historia Natural y Ecología. (p. 6). Recuperado a partir de <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichasnom/Talaumamexicana00.pdf>
- Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (Ed.) (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT.
- Sánchez-Recillas, A., Mantecón-Reyes, P., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., & Estrada-Soto, S. (2014). Tracheal relaxation of five medicinal plants used in Mexico for the treatment of several diseases. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(3), 179–183. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60017-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60017-1)
- Schlaepfer, L., & Mendoza-Espinoza, J. A. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41. Recuperado a partir de <http://pruebaredalyc.redalyc.org/articulo.oa?id=57916060003>
- SEMARNAT. (2010). Protección ambiental - Especies nativas de México de flora y fauna silvestres - Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo, NOM-059-SEMARNAT-2010 Norma Oficial Mexicana. Recuperado a partir de http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNA_T_2010.pdf
- Sepúlveda, J. G., Porta-Ducoing, H., & Rocha, S. M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 355–363.
- Street, H. E. (1973). *Plant Tissue and Cell Culture*. California: University of California Press. 520 pág. Recuperado a partir de: Google-Books-ID: WfsrKfUPHGkC
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Bastos, M. L. (2002). Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and

hypochlorous acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4989–4993.

- Vázquez, G. J. A., Gómez, D. H., López, C. A., Espinosa, J. J. A., & Sahagún, G. E. (2013). *Magnolia perezfarrerae* a new species and a key to Mexican species of *Magnolia* section *Talauma* subsection *Talauma* (Magnoliaceae). *Botanical Sciences*, 91(4), 417–425. <https://doi.org/10.17129/botsci.38>
- Venereo-Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126–133.
- Waizel, B. J. (2002). Uso tradicional e investigación científica de *Talauma mexicana* (D.C.) Don., o flor del corazón. *Revista Mexicana de Cardiología*, 13(1), 31–38.
- Zabala, M. A., Velásquez, M. J. A., Cardona, A. M. A., Flórez, J. M. R., & Vallejo, C. M. (2009). Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179915377015>

3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE ISSRs DE *Magnolia mexicana* DC., DE DOS REGIONES DE ZONGOLICA, VERACRUZ, MÉXICO

MOLECULAR CHARACTERIZATION THROUGH ISSRs OF *Magnolia mexicana* DC., FROM TWO REGIONS IN ZONGOLICA, VERACRUZ, MEXICO

3.1. Resumen

Magnolia mexicana DC., es una especie incluida en la lista de la NOM-059-SEMARNAT-2010 en la categoría de amenaza. Esta situación es atribuida a la fragmentación y destrucción de su hábitat. Una herramienta para conocer la variación genética de las poblaciones naturales son los marcadores moleculares. El objetivo de este estudio fue evaluar la variabilidad genética presente en dos colectas de *M. mexicana* ubicadas el municipio de Zongolica, Veracruz, México mediante marcadores moleculares tipo ISSR. Se utilizaron hojas jóvenes para la extracción de ADN y se amplificó por PCR con diez iniciadores ISSRs. Los resultados obtenidos mostraron un porcentaje de polimorfismo del 86 % y el análisis de agrupamiento fue capaz de separar las colectas por su procedencia geográfica. El AMOVA demostró que la mayor variabilidad molecular (90.88 %) se encuentra dentro de cada población mientras que el índice de diversidad de Shannon-Weaver fue de 0.47 y 0.41 para cada una de ellas. El presente estudio sugiere que las poblaciones de *M. mexicana* estudiadas no han sufrido cambios que alteren su estructura genética, por lo que el efecto de la fragmentación del hábitat de *M. mexicana* y la reducción de sus poblaciones aún no es evidente a nivel genético.

Palabras Clave: Especie amenazada, hábitat fragmentado, variabilidad genética, Índice de Shannon- Weaver

3.2. Abstract

Magnolia mexicana, was included in the list NOM-059-SEMARNAT-2010 as an endangered species. This situation is attributed to the fragmentation and destruction of its habitat. Molecular markers are valuable tools to estimate the genetic variability of natural populations. The objective of this study was to evaluate genetic variability present in collections of *M. mexicana* from Zongolica, Veracruz, México using ISSR molecular markers. Young leaves were used for DNA extraction and DNA samples were amplified by PCR using ten ISSR primers. Obtained results showed 86 % of total polymorphism and cluster analysis was effective separating collections according to their geographic origin. AMOVA showed that the greatest molecular variability (90.88 %) occurs within populations, while the Shannon-Weaver diversity index values were 0.47 and 0.41, respectively. Obtained results suggest that evaluated populations of *M. mexicana* do not show changes in their genetic structure attributable to fragmentation and reduction of *M. mexicana* habitat.

Keywords: Endangered species, fragmented habitat, genetic variability, Shannon Weaver Index

3.3. Introducción

Las especies de la familia Magnoliaceae son consideradas como primitivas debido a que los sépalos y pétalos no están claramente diferenciados, además están dispuestos en espiral y no en anillo como en las demás angiospermas. Esta característica es de gran interés para estudios de evolución, biogeográficos, taxonómicos y ecológicos (Cicuzza, Newton, & Oldfield, 2007). *Magnolia mexicana* DC. es una especie endémica de México encontrándose en selvas altas perennifolias y bosque mesófilo de montaña (Palacios, 2006). Su hábitat se encuentra seriamente amenazado calculándose que aproximadamente el 50 % de la superficie original del bosque mesófilo ha sido reemplazado por otros tipos de cobertura (CONABIO, 2010). Por esta razón *M. mexicana* fue incluida en la lista de la NOM-059-SEMARNAT-2010 en la categoría de especie amenazada (SEMARNAT, 2010). Actualmente podemos encontrar poblaciones viables en estados como Chiapas, Oaxaca, Veracruz y Puebla, algunas son remanentes asociados a cultivos, principalmente cafetales, donde son utilizadas como sombra (Palacios, 2006).

En especies vegetales amenazadas los estudios de genética de poblaciones son útiles para conocer la estructura genética poblacional, los niveles de variación y diferenciación genética, así como los efectos de los mecanismos microevolutivos. La selección natural, endogamia, deriva génica, mutación y flujo génico son influenciados por la dinámica demográfica poblacional causada por las tasas de natalidad, mortalidad y migración (Hamrick, Godt, & Sherman-Broyles, 1992). Para determinar estos niveles de variación genética entre organismos de una especie o entre diferentes niveles taxonómicos, se pueden utilizar diferentes métodos de caracterización (Morell, Peakall, Appels, Preston, & Lloyd, 1995). Las Inter secuencias simples repetidas o ISSRs (Inter-simple sequence repeat) son un tipo de marcador genético que permite medir los niveles de variación en las regiones inter-microsatélite dispersas en el genoma. Son marcadores semiarbitrarios por lo que amplifican a partir de un iniciador complementario a la región microsatélite (Cornejo, Serrato, Rendón, & Rocha, 2014). Estos

marcadores se han utilizado en especies como sorgo y plátano (Godwin, Aitken, & Smith, 1997), cafeto (Aga, Bekele, & Bryngelsson, 2005) o plantas catalogadas primitivas como las cicadas (Xiao, Ge, Gong, Hao, & Zheng, 2004). El objetivo de este estudio fue evaluar la variabilidad genética en colectas de *M. mexicana* provenientes de Amatitla y Zapotla, dos regiones del municipio de Zongolica, Veracruz México, mediante el uso de marcadores moleculares tipo ISSR.

3.4. Materiales y métodos

3.4.1. Material vegetal

La unidad de manejo ambiental de Yolojóchitl ubicada en el municipio de Zongolica, Veracruz, México proporcionó el material vegetal utilizado en este estudio. Las semillas fueron colectadas de dos localidades: Amatitla (18°39'34.77 N, 96°59'43.38 O) y Zapotla (18°38'46.72 N, 96°58'20.61 O) y germinadas en las instalaciones de la UMA por el Ing. Antonio Velázquez Lemus, se conformaron grupos de seis y siete ejemplares respectivamente y se utilizaron las hojas jóvenes en la extracción de ADN.

3.4.2. Extracción y purificación de ADN genómico

La extracción de ADN se llevó a cabo de acuerdo con el método reportado por Dellaporta, Wood, y Hicks (1983). Para tal objetivo se pesaron 0.3 g de material vegetal utilizando como amortiguador de extracción: Tris-HCl 100 mM, EDTA-Na₂ 50 mM, NaCl 500 mM, 2-Mercaptoetanol 10 mM, SDS 1.3 %, pH 8.0. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos, al sobrenadante se le adicionó isopropanol frío y se dejó precipitar el ADN por 60 minutos. Luego se agregó solución STE (Tris-HCl 50 mM, EDTA-Na₂ 10 mM, NaCl 100mM, pH 8.0) y ARNasa-A (10 mg mL⁻¹) incubándose a 37 °C por una hora. Se utilizó acetato de sodio 3 M con isopropanol frío para precipitar el ADN, el cual se centrifugó a 8000 rpm x 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El ADN se lavó con etanol 70 % y se dejó secar; para almacenarlo se disolvió en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA-Na₂ 1 mM, pH 8.0). El ADN así obtenido se mantuvo en refrigeración hasta su uso. La cantidad y pureza del ADN se midió en un

Nanodrop Thermo Scientific ® modelo LITE. Para determinar la calidad del ADN se realizó una electroforesis en agarosa que se tiñó con bromuro de etidio, las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador DigiDoc-it Imaging System (UVP®). Las imágenes obtenidas se documentaron mediante una cámara Kodak ® EDAS290.

3.4.3. Obtención de patrones ISSR

Se probaron 55 iniciadores ISSR (Sigma®) y se seleccionaron los 10 que produjeron el mayor número de bandas nítidas y con polimorfismo (Cuadro 2). La amplificación de los segmentos de ADN se llevó a cabo mediante PCR. La mezcla de reacción incluyó los reactivos siguientes: H₂O grado biología molecular, dNTPs (dGTP, dATP, dTTP, dCTP a una concentración 500 µM), amortiguador de PCR 10X, MgCl₂ 50 mM, iniciador 10 ng µL⁻¹, Taq ADN polimerasa 5 U µL⁻¹ y el ADN genómico obtenido de las muestras homogeneizado a una concentración de 10 ng µL⁻¹. La mezcla fue sometida a un ciclo inicial de desnaturalización de 8 minutos a 93 °C; 40 ciclos de 1 minuto a 93 °C, 1 min a la temperatura de alineamiento recomendada para cada iniciador (Cuadro 2) y 1 min a 72 °C, concluyendo con un ciclo de extensión final de 6 minutos a 72 °C. La separación de los productos amplificados se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE (40 mM Tris acetato, pH 7.6; 1 mM Na₂EDTA), el cual se tiñó con bromuro de etidio para visualizar las bandas en luz ultravioleta de un transiluminador DigiDoc-it Imaging System (UVP®). Las imágenes obtenidas se documentaron mediante una cámara Kodak ® EDAS290.

3.4.4. Análisis estadístico

Fueron cuantificadas las bandas producto de la amplificación asignándose el valor de 1 a la presencia y de 0 a la ausencia de cada banda, de esta manera se construyó una matriz básica de datos (MBD) para realizar los diferentes análisis. Para las similitudes genéticas se utilizó el coeficiente de Jaccard con transformación $\sqrt{1-S}$, el análisis de agrupamiento se realizó con el método de varianza mínima de Ward; adicionalmente se calculó el AMOVA y el Índice de Diversidad de Shannon-Weaver.

Para obtener una representación espacial de la distribución de las muestras de *M. mexicana* se llevó a cabo un análisis de coordenadas principales (ACoorP) y un árbol de mínimo recorrido (AMR) que son una representación geométrica de los resultados provenientes del análisis de agrupamiento. El AMR es sugerida para mejorar la interpretación de ACoorP al permitir considerar las deformaciones ocurridas en esta proyección (Balzarini *et al.*, 2008). Ambos análisis se hicieron usando el programa Infogen® (Universidad de Córdoba, Argentina).

Cuadro 2. Iniciadores ISSRs utilizados en dos poblaciones de *M. mexicana*

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Ta °C	BT	BP	% P
ISSR2	(CA) ₈ AAGCT	62	10	10	100.0
ISSR3	(GA) ₈ CTC	58	9	5	55.5
ISSR4	(AG) ₈ CTG	58	9	9	100.0
LOL9	(CAC) ₃ GC	38	10	9	90.0
MESL3	(TG) ₇ G	46	6	6	100.0
PI02	(CA) ₆ AGG	46	5	5	100.0
PI04	(CT) ₈ AGC	58	10	8	80.0
UBC840	(GA) ₈ CTT	56	5	4	80.0
UBC842	(GA) ₈ CTG	58	8	5	62.5
17898B	(CA) ₆ GT	42	9	9	100.0
			81	70	86.4

Ta: Temperatura de alineamiento, BT: Bandas totales, BP: Bandas polimórficas, % P: Porcentaje de polimorfismo.

3.5. Resultados y discusión

Uno de los objetivos del análisis con marcadores moleculares es la clasificación de los individuos, de manera que se puedan distinguir grupos homogéneos entre ellos, para tal fin se utilizan métodos jerárquicos de análisis de conglomerados (agrupamientos o *cluster* en inglés) (Balzarini *et al.*, 2008). El dendrograma obtenido para las muestras de *M. mexicana* reflejó mayoritariamente la procedencia geográfica de los materiales. En la Figura 4 se muestra un dendrograma en donde, a una altura de corte de 0.83, se distinguen claramente dos grupos, el primero formado por cinco ejemplares provenientes de Zapotla, mientras que el grupo II estuvo integrado por cinco de los seis ejemplares procedentes de Amatitla.

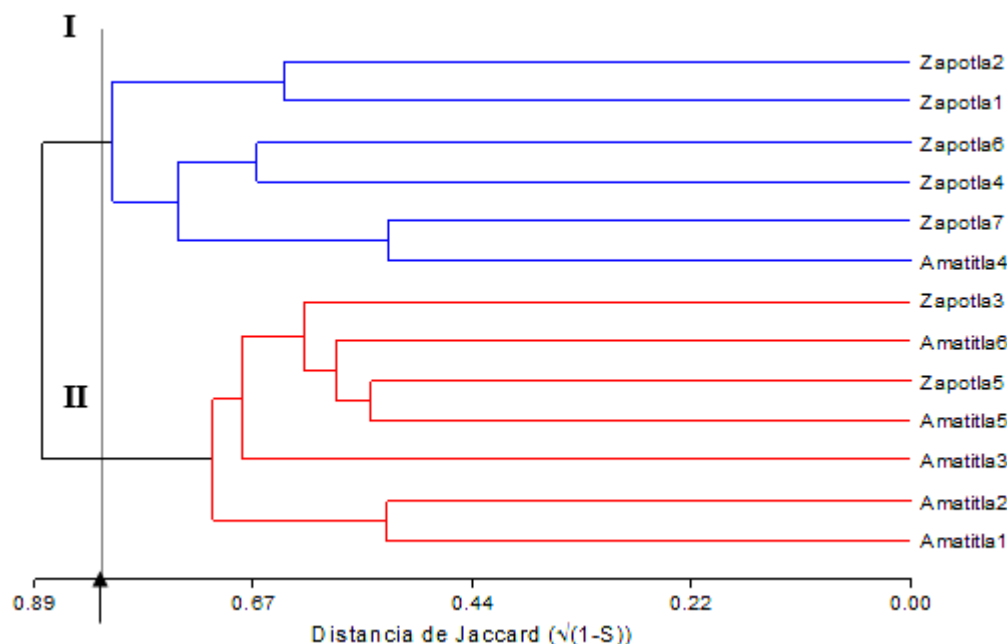


Figura 4. Dendrograma construido por el método de varianza mínima de Ward y las distancias de Jaccard ($\sqrt{1-S}$) entre materiales de *M. mexicana* procedentes de Zongolica, Veracruz, México.

El análisis AcooP muestra que todos los elementos provenientes de Amatitla pueden ser agrupados (círculo rojo, Figura 5. I) debido a su cercanía, mientras que fuera de este grupo se localizan los ejemplares de Zapotla. La misma tendencia se observa en el AMR (Figura 5. II) en el cual mediante líneas se conectan los elementos más cercanos entre sí correspondientes a los árboles de Amatitla. Es importante hacer notar que los análisis de agrupamiento los ACoop y ARM reflejan mejor la distribución de los ejemplares según la zona de colecta (Amatitla y Zapotla), mientras que en el dendrograma algunos ejemplares quedan mal agrupados.

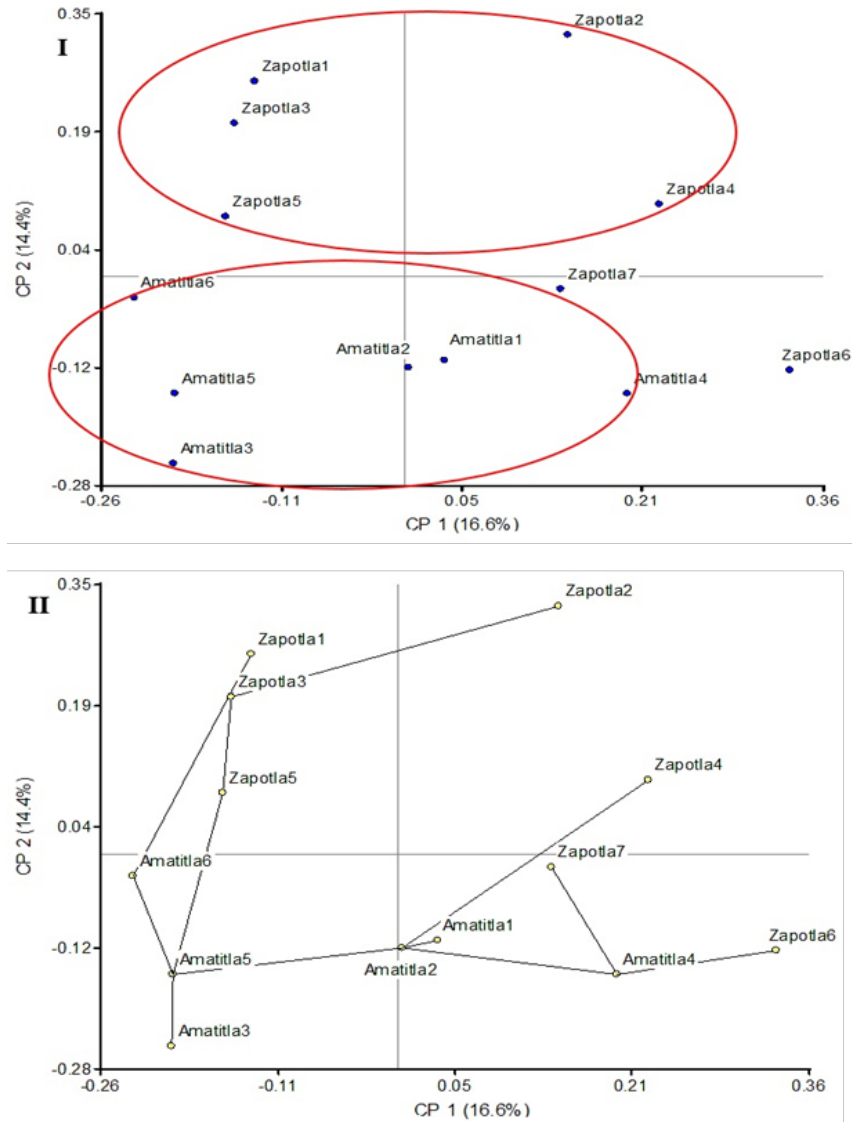


Figura 5. I) Análisis de coordenadas principales y II) Árbol de recorrido mínimo de 13 muestras de *Magnolia mexicana* de dos procedencias geográficas.

La técnica ISSR permite detectar una alta variación polimórfica en la secuencia de ADN (Cornejo *et al.*, 2014). Estos marcadores se han empleado con éxito para distinguir la variación, estructura y diferenciación genética de diferentes especies de árboles entre los que se encuentran: *Dendropanax arboreus* (L.) Decne. & Planch., en la zona de los Tuxtlas, México (Figueroa-Esquivel, Puebla-Olivares, Eguiarte, & Núñez-Farfán, 2010); *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng., en Brasil (Giustina *et al.*, 2014); *Swietenia macrophylla* King, en Costa Rica

(Céspedes, Gutiérrez, Holbrook, & Rocha, 2003); *Swietenia humilis* Zucc., en Centro América (White, Boshier, & Powell, 1999) entre muchas otras.

La fragmentación es un proceso de alteración de un hábitat en calidad y extensión que conduce a una pérdida de biodiversidad a nivel intraespecífico ocasionando deriva génica y endogamia, reduciendo con ello la variabilidad genética (Nora *et al.*, 2011). En el presente estudio el análisis AMOVA mostró que el 90.88 % de la variación genética es atribuible a diferencias individuales dentro de las dos poblaciones muestreadas (Cuadro 3); por lo tanto, el efecto de la fragmentación no es evidente a este nivel. En otros estudios previos usando ISSRs se ha reportado alta variabilidad genética dentro de poblaciones de *Magnolia wufengensis* L. (90.94 %) (Chen, Chen, He, & Ma, 2014) y *Magnolia officinalis* Rehder & E. H. (68.4 %) (Yu, Yang, Sun, & Liu, 2011). Los resultados del AMOVA obtenido en este estudio coinciden con la observación general de que las especies leñosas, perennes y exógenas mantienen la mayor parte de su variación dentro de las poblaciones (Hamrick *et al.*, 1992).

Cuadro 3. Análisis molecular de varianza (AMOVA) de dos poblaciones de *M. mexicana* procedentes de Zongolica, Ver.

F.V.	SC	gl	CM	p-valor	Comp.Var.	Porcentaje
Población	20.81	1	20.81	0.0300	1.27	9.12
Dentro de Población	138.88	11	12.63	0.0175	12.63	90.88
Total	159.69	12	13.31		13.89	100.00

El cálculo del índice de diversidad de Shannon-Weaver permite dimensionar la diversidad genética, considerando un valor de cero cuando sólo se presenta un alelo en la población y conforme aumenta el número de alelos incrementa su valor y con ello la diversidad genética (Pla, 2006). En el Cuadro 4 se presentan los índices de diversidad calculados para las poblaciones de *M. mexicana* muestreadas, los cuales fueron muy similares (0.47 y 0.41 para Amatitla y Zapotla, respectivamente). Se ha considerado que muestras de dos poblaciones diferentes siempre serán más diversas que la media de sus diversidades medida

por separado, excepto si ambas poblaciones son idénticas en su composición (Balzarini *et al.*, 2008). En este trabajo el valor medio del índice de diversidad fue de 0.44 mientras que la diversidad total fue de 0.42, lo que indica que las poblaciones muestreadas presentan igual diversidad genética. Los valores del índice de Shannon-Weaver obtenidos en el presente estudio son similares a los estimados en otras especies del género *Magnolia*. Así en *Magnolia officinalis* (Rehder & E. H. Wilson), Yu y colaboradores (2011) encontraron un valor de diversidad de 0.41 en poblaciones muestreadas en China, mientras que en México, colectas de *Magnolia sharpii* Miranda, mostraron un índice $I=0.56$ y en *Magnolia schiedeana* Schltdl., la diversidad encontrada fue de 0.5 (Newton *et al.*, 2008).

Cuadro 4. Índice de diversidad de Shannon-Weaver en dos poblaciones de *M. mexicana* procedentes de Zongolica, Ver.

Grupo	n	I	L _i	L _s	I _{boot}	EE _{boot}
Amatitla	6	0.47	0.39	0.41	0.40	0.03
Zapotla	7	0.41	0.40	0.41	0.40	0.03
Total	2	0.42	0.41	0.42	0.42	0.03

L_i: límite inferior, L_s: límite superior, I_{boot}: 500 ciclos de remuestreo (bootstrap) con intervalo de confianza de 0.95, EE_{boot}: error estándar del remuestreo.

El grado de diferenciación genética generalmente aumenta cuando se incrementa la distancia entre poblaciones (Pusadee, Jamjod, Chiang, Rerkasem, & Schaal, 2009). No obstante, Yu y col. (2011) en los estudios hechos a *M. officinalis* consideran otros factores que han contribuido a maximizar la variabilidad genética como son los relacionados con su característica ornamental, la intromisión humana debida al desplazamiento por pobladores y a lo altamente visibles para las aves que resultan las semillas rojas propias de estas especies. En *M. mexicana* se ha encontrado que los escarabajos del género *Cyclocephala* actúan como agentes polinizadores y dispersadores en la zona de Zongolica (Mora-Aguilar & Delgado, 2012). Algunos estudios demuestran que las tasas de polen inmigrante en poblaciones fragmentadas pueden ser elevadas, en especial si la polinización es entomófila, estimándose distancias de 21 m en *Centaurea*

corymbosa Pourr. (Hardy *et al.*, 2004) y hasta 88,6 km en higuera *Ficus sycomorus* L. (Ahmed, Compton, Butlin & Gilmartin, 2009).

Por otro lado, cabe destacar que las selvas altas perennifolias y los bosques mesófilos de montaña de zonas de Veracruz como Zongolica y los Tuxtlas, tienen relictos de áreas conservadas (Sandoval *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la reducción del hábitat y disminución de las poblaciones de *M. mexicana* aún no han reducido la variabilidad genética de las poblaciones naturales de manera importante. Sin embargo, es necesario realizar estudios en otras poblaciones de *M. mexicana* considerando un mayor número de localidades para tener una estimación más precisa de los cambios en la estructura y variación genética de esta especie en el Estado de Veracruz en particular y de México en general.

3.6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que las poblaciones de *M. mexicana* no han sufrido cambios que alteren su estructura genética, por lo que no hay evidencia a nivel genético de alteraciones debidas a la reducción de poblaciones y/o fragmentación del hábitat. Los niveles de diversidad genética de *Magnolia mexicana* encontrados en las poblaciones estudiadas son semejantes a los reportados en otras especies de árboles en bosques mesófilos de montaña, así como dentro de la familia Magnoliaceae. Los marcadores moleculares tipo ISSR demostraron su utilidad para evaluar la variabilidad genética presente en especies arbóreas como *M. mexicana*.

3.7. Agradecimientos

Se agradece la asesoría y apoyo técnico de la M en C. María Elisa Alvarado Cano y Q.F.B. Ricardo Gaspar Hernández del Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido Dep. Fitotecnia, UACH y por su apoyo al Ing. Antonio Vázquez Lemus de la UMA-Yoloxóchitl en Zongolica, Veracruz.

3.8. Referencias

- Aga, E., Bekele, E., Bryngelsson, T. (2005). Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea arabica* L.) populations from Ethiopia. *Genetica*. 124, 213-221.
- Ahmed, S., Compton, S. G., Butlin, R. K., & Gilmartin, P. M. (2009). Wind-borne insects mediate directional pollen transfer between desert fig trees. 160 kilometers apart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106 (48), 20342-20347. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902213106>
- Balzarini, M., González, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J., & Robledo, C. (2008). *InfoStat. Manual del Usuario*. Córdoba, Argentina: Editorial Brujas.
- Céspedes, M., Gutiérrez, M. V., Holbrook, N. M., & Rocha, O. (2003). Restoration of genetic diversity in the dry forest tree *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) after pasture abandonment in Costa Rica. *Molecular Ecology*, 12(12), 3201-3212.
- Chen, L., Chen, F., He, S., & Ma, L. (2014). High genetic diversity and small genetic variation among populations of *Magnolia wufengensis* (Magnoliaceae), revealed by ISSR and SRAP markers. *Electronic Journal of Biotechnology*. 17(6), 263-274 Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173332565003>
- Cicuzza, D., Newton, A., & Oldfield, S. (2007). *Red List of the Magnoliaceae*. Cambridge, UK: Fauna & Flora International. Recuperado a partir de https://www.bgci.org/plant-conservation/magnolia_red_list/
- CONABIO. (2010). *El Bosque Mesófilo de Montaña en México: Amenazas y Oportunidades para su Conservación y Manejo Sostenible*. México D.F., (20-30) México.: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Capítulo II pág. 20-37. Recuperado a partir de http://www.biodiversidad.gob.mx/ecosistemas/pdf/BMM_parte%201.pdf
- Cornejo, R. A., Serrato, D. A., Rendón, A., & Rocha, M. M. G. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. México. D.F.: INECC/SEMARNAT Recuperado a partir de http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/consultaPublicacion.html?id_public=710
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4), 19-21. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Figueroa-Esquível, E. M., Puebla-Olivares, F., Eguiarte, L. E., & Núñez-Farfán, J. (2010). Genetic structure of a bird-dispersed tropical tree (*Dendropanax arboreus*) in a fragmented landscape in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 81(3), 789-800. Recuperado 16 de enero de 2017, a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42518439019>

- Giustina, L. D., Luz, L. N., Vieira, F. S., Rossi, F. S., Soares-Lopes, C. R. A., Pereira, T. N. S., & Rossi, A. a. B. (2014). Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng (Malvaceae). *Genetics and Molecular Research: GMR*, 13(2), 3510-3519. <https://doi.org/10.4238/2014.February.14.5>
- Godwin, I. D., Aitken, E. A. B., & Smith, L. W. (1997). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18(9), 1524-1528. <https://doi.org/10.1002/elps.1150180906>
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., & Sherman-Broyles, S. L. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6(1-4), 95-124. <https://doi.org/10.1007/BF00120641>
- Hardy, O. J., González-Martínez, S. C., Colas, B., Fréville, H., Mignot, A., & Olivieri, I. (2004). Fine-scale genetic structure and gene dispersal in *centaurea corymbosa* (Asteraceae). II. Correlated paternity within and among sibships. *Genetics*, 168(3), 1601-1614. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.027714>
- Mora-Aguilar, E. F., & Delgado, L. (2012). A new species of *cyclocephala dejean* (coleoptera: scarabaeidae: dynastinae: cyclocephalini) from the cloud forests of southeastern mexico and description of the female of *cyclocephala berti* delgado. *The Coleopterists Bulletin*, 66(2), 139-142. <https://doi.org/10.1649/072.066.0209>
- Morell, M. K., Peakall, R., Appels, R., Preston, L. R., & Lloyd, H. L. (1995). DNA profiling techniques for plant variety identification. *Animal Production Science*. 35, 35(6, 6), 807, 807-819, 819. <https://doi.org/10.1071/EA9950807>, 10.1071/EA9950807
- Newton, A., Gow, J., Robertson, A., Williams, L. A., Ramírez, M. N., González, E. M., Ennos, R. (2008). Genetic variation in two rare endemic Mexican trees, *Magnolia sharpii* and *Magnolia schiedeana*. *Silvae Genetica*, 57(6), 348-356.
- Nora, S., Albaladejo, R. G., González-Martínez, S. C., Robledo-Arnuncio, J. J., y Aparicio, A. (2011). Movimiento de genes (polen y semillas) en poblaciones fragmentadas de plantas. *Revista Ecosistemas*, 20(2-3). <https://doi.org/10.7818/re.2014.20-2-3.00>
- Palacios, E. (2006). Cuarenta y ocho especies de la flora de Chiapas incluidas en el PROY-NOM-059-ECOL-2000. (No. W008). México. D.F: Instituto de Historia Natural y Ecología. 6 p. Recuperado a partir de <http://www.conabio.gob.mx>
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la riqueza. *Interciencia*, 31(8), 583-590.
- Pusadee, T., Jamjod, S., Chiang, Y.-C., Rerkasem, B., & Schaal, B. A. (2009). Genetic structure and isolation by distance in a landrace of Thai rice.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(33), 13880-13885.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0906720106>

- Sandoval, M., J. B., Ramírez, S., A.F., Sheseña H., I. M, Sormani, C., Ruiz de la Merced, F., Jarvio A., D., & Farid M., E. (2007). Evaluación del estado de conservación de los ecosistemas forestales de la región denominada Uxpanapa. (p.10-12) Veracruz: Dirección General de Desarrollo Forestal, Gobierno del Estado de Veracruz. Pronatura A.C. pág. 273.
- SEMARNAT. 2010. Protección ambiental - Especies nativas de México de flora y fauna silvestres - Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo, NOM-059-SEMARNAT-2010 Norma Oficial Mexicana (2010). Recuperado a partir de http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf
- White, G.M., Boshier, D.H., & Powell, W. (1999). Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* zucc. *Molecular Ecology*, 8(11), 1899-1909.
- Xiao, L., Ge, X., Gong, X., Hao, G., & Zheng, S. (2004). ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany*, 94(1), 133–138. <https://doi.org/10.1093/aob/mch119>
- Yu, H.-H., Yang, Z.-L., Sun, B., & Liu, R. (2011). Genetic diversity and relationship of endangered plant *Magnolia officinalis* (Magnoliaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(2), 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.12.003>

4. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *in vitro* DEL ÁRBOL YOLOXÓCHITL (*Magnolia mexicana* DC.)

ESTABLISHMENT OF IN VITRO CULTURE OF YOLOXOCHITL (*Magnolia mexicana* DC.)

4.1. Resumen

Magnolia mexicana DC. es una especie perteneciente al bosque mesófilo de montaña que en 2010 se catalogó en la NOM-059-SEMARNAT como especie amenazada, es comúnmente conocida como “flor de corazón” o “yoloxóchitl”, se ha utilizado ampliamente en la medicina tradicional para aliviar afecciones del corazón. El objetivo de este trabajo fue evaluar la organogénesis indirecta a partir de hojas y embriones y la germinación *in vitro* de *M. mexicana* para obtener el tratamiento óptimo, como técnica para la conservación y rescate de esta especie. El medio de cultivo básico fue el siguiente: sales WP, suplementadas con 1 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mioinositol, 4 % p/v de sacarosa, 100 mg L⁻¹ caseína hidrolizada, 100 mg L⁻¹ de L- cisteína, 100 mg. L⁻¹ de PVP, 0.7 % p/v de agar-agar, el pH fue ajustado a 5.7±0.1. Se cuantificaron los porcentajes de respuesta o germinación, así como calidad de callo obtenido. Todos los tratamientos desarrollaron con 85 % de callos en hojas y 93 % en embriones a los 30 días de cultivo. El tratamiento con 2.4 D 1 mg L⁻¹ y BA 0.3 mg L⁻¹ fue considerado el mejor tratamiento ya que produjo con 93.1 % de callos a los 90 días de cultivo. La adición de CH como factor de crecimiento resultó ser contraproducente, ya que sólo se logró la germinación de 58 % de las semillas sin la capacidad de generar radícula.

Palabras clave: Germinación *in vitro*, organogénesis indirecta, callos, embriones

Tesis Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Jessica Miriam Medrano Hernández

Director de Tesis: Dr. José Luis Rodríguez de la O

4.2. Abstract

Magnolia mexicana a common tree from mountains forest, since 2010 has been included in NOM-059-SEMARNAT as a threatened species. It is commonly known as "heart's flower" or "yoloxóchitl", ". *M. Mexicana* it has been widely used in traditional medicine to alleviate heart problems. The objective of this study was to establish a protocol to obtain indirect organogenesis from leaves and embryos; in addition, *in vitro* germination of *M. mexicana* was also attempted as a strategy to obtain the optimal treatment as a technique for the conservation and rescue of this species. The basic culture medium was: WP salts, supplemented with 1 mg L⁻¹ thiamine, 100 mg L⁻¹ myoinositol, 4 % w / v sucrose, 100 mg L⁻¹ hydrolyzed casein, 100 mg L⁻¹ L-cysteine, 100 mg. L⁻¹ of PVP, 0.7 % w / v agar-agar, the pH was adjusted to 5.7 + 0.1. Percentages of total response and germination were obtained and callus quality was also registered. All treatments developed callogenesis getting both leaves and embryos developed callogenesis in all treatments, with 85 % of callus from leaves and 93 % from embryos after 30 days of culture. The use of 2.4 D 1 mg L⁻¹ and BA 0.3 mg L⁻¹ was considered the best treatment for callus production getting 93.1 % after 90 days in medium culture. *M. mexicana* presents immature embryos; the addition of CH to the media as a growth factor was inefficient to solve this problem, since it produced 58 % of seed germination but plantlets were not able to produce radicle.

Index words: *In vitro* germination, indirect organogenesis, callus, embryos

4.3. Introducción

Magnolia mexicana es comúnmente conocida como flor de corazón o Yoloxóchitl en estados como Morelos, Puebla y Veracruz (Hernández, 1980). Su principal aprovechamiento durante siglos ha sido como medicina tradicional donde se encuentran numerosas referencias del empleo de yoloxóchitl como cardiotónico, para el control de los desórdenes o enfermedades cardíacas y en la curación de enfermedades de los sistemas nervioso y cardiovascular (Waizel, 2002). Debido a la especificidad de sus hábitats en selvas tropicales y bosques mesófilos, es una especie vulnerable a los cambios en el ecosistema donde habita (Palacios, 2006). Estos problemas han provocado que actualmente esta especie haya sido incluida en la lista de la NOM-059-SEMARNAT como especie amenazada (SEMARNAT, 2010). Las semillas de *M. mexicana* son de naturaleza recalcitrante a intermedia ya que resisten porcentajes de deshidratación menores a 10 % pero son intolerantes al frío, por lo que no podrían ser consideradas para el resguardo de su material genético en un banco de germoplasma. Los embriones continúan su desarrollo después de que las semillas son liberadas del fruto y su porcentaje de germinación es de 15 % (Gómez-Maqueo, 2011; Osuna, 1997) por lo anterior *M. mexicana* una especie de difícil propagación lo que es necesario buscar alternativas para su multiplicación que ayude a su conservación y rescate.

Las técnicas de cultivo *in vitro* son procedimientos usados para hacer crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*. El crecimiento se lleva a cabo en condiciones controladas y libres de microorganismos en un medio artificial de composición química definida (Street, 1973). Las aplicaciones de la técnica de cultivo *in vitro* permiten la producción masiva de plantas elite genéticamente homogéneas en material de elevado valor agronómico por ejemplo cultivos de café, mora, agave, etc. (Calva & Perez, 2005); constituye además una herramienta de trabajo en el mejoramiento genético de cultivares mediante variación somaclonal inducida o esporádica (Gutiérrez, Santacruz, Cabrera, & Rodríguez, 2003). Esta técnica se ha usado para la producción *in vitro* de tejidos

o células productoras de metabolitos bioactivos para conseguir un aumento significativo en su rendimiento (Roca & Mroginski, 1991; Zabala, Velásquez, Cardona, Flórez, & Vallejo, 2009), además es de importancia crucial en la producción de plantas transgénicas (Calva & Perez, 2005).

Para la conservación de germoplasma se puede recurrir a la micropropagación y geminación de plantas *in vitro*. La técnica de micropropagación puede ser de dos tipos: a) mediante organogénesis o embriogénesis indirectas donde es posible obtener brotes o embriones a partir de la generación de una masa celular indiferenciada (callo) o b) la organogénesis o embriogénesis directa donde se obtiene brotes o embriones sin la generación previa de callos. Estas respuestas pueden ser generadas utilizando tejidos como hojas, brotes axilares, yemas apicales y axilares o cultivo de nudos individuales (Roca & Mroginski, 1991). Particularmente la embriogénesis somática presenta la ventaja de la posibilidad de crioconservación del material obtenido mediante la fabricación de semilla sintética que puede ser almacenada a muy bajas temperaturas (Celestino, Hernández, Carneros, López-Vela, & Toribio, 2005). Adicionalmente, el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos o geminación *in vitro* pueden ayudar al rescate de semillas de *M. mexicana* que son los vectores que transportan la diversidad genética; esta técnica ayuda a superar la dormancia de semillas, disminuye el tiempo de germinación comparado con las condiciones naturales y aumenta la tasa de germinación al contar con condiciones controladas que eviten el ataque de microorganismos y hongos (Attree & Fowke, 1993; Fay, 1992).

Por todo lo anterior, contar con un protocolo eficiente de cultivo *in vitro* en *M. mexicana* ayudaría a establecer programas de regeneración y conservación de las poblaciones naturales de esta especie, así como a su conservación en bancos de germoplasma. Por lo que el objetivo de este trabajo fue establecer y evaluar respuestas del cultivo *in vitro* de *M. mexicana* como herramienta para su conservación.

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Colecta de material vegetal

El material vegetal fue proporcionado por la unidad de manejo Yolojóchitl a cargo del Ing. Antonio Vázquez Lemus ubicada en el municipio de Zongolica, Estado de Veracruz, México (18°39'34.77 N, 96°59'43.38 O). Los frutos maduros se colectaron en los meses de febrero y marzo de 2014- 2016. Árboles de un año de edad fueron trasladados a la Universidad Autónoma Chapingo en el Municipio de Texcoco, Edo. México, y mantenidos en invernaderos durante el desarrollo de los experimentos.

4.4.2. Preparación de material vegetal

Los árboles jóvenes fueron sometidos a riegos con bactericida y fungicida como tratamiento preventivo de una posible contaminación sistémica. Tres veces por semana, se aplicaron riegos alternados entre Promyl 5 % P.H ® (1 g L⁻¹) como fungicida y Agri-mycon 500 ® (1 g L⁻¹) como bactericida, el tratamiento duró tres semanas.

Desinfección de Hojas

Las hojas jóvenes del ápice de los árboles se cortaron y sólo se usó la nervadura central de la hoja cuyo diámetro fuera de 0.5 cm. El proceso de lavado y desinfección consistió en remojos subsecuentes con Promyl 5% P.H ® (100 mg L⁻¹) por 15 minutos, detergente comercial (1 g L⁻¹) por 5 min, agua corriente 3 min. Posteriormente en campana de flujo laminar se sumergió en etanol 70 % por 3 min, cloro comercial: agua estéril (1: 3) durante 15 minutos, y finalmente se hicieron enjuagues con agua estéril. Para la siembra cada segmento de nervadura se cortó transversalmente con un ancho aproximado de 3 mm.

Desinfección de Semillas

Los frutos fueron mantenidos en un lugar fresco y seco hasta que abrieron por sí solos, después de 3-5 días de la colecta, dejando las semillas expuestas. Se procesaron dentro de los primeros 45 días después de la colecta. Las semillas

se procesaron con una solución inicial de Promyl 5 % P.H ® (100 mg L⁻¹) por 15 min, posteriormente se lavaron con etanol 70 % por 3 min, seguido de un remojo en una solución de cloro comercial y agua en proporción 1:1 (v/v) por 20 min, finalmente se lavaron con abundante agua destilada estéril. Para permitir el ablandamiento de la sarcotesta y la hidratación del endospermo las semillas se mantuvieron en remojo con agua estéril mínimo 28 horas y máximo 72 horas. Pasado dicho tiempo se eliminó la sarcotesta por fricción y las semillas se lavaron con agua estéril, una vez limpias se realizó un proceso de lavado con detergente comercial por 15 min (1 g L⁻¹), etanol 70 % (3 min), una solución agua: cloro comercial (1:1 v/v) por 15 min, finalmente se lavaron con agua estéril y se secaron.

Para abrir la testa y sacar el embrión se utilizaron alicatas y pinzas para ayudar a abrir la testa de la semilla. Cuando las semillas están adecuadamente hidratadas el endospermo y la cutícula se reblandecen y se facilita extraer al embrión sin maltratarlo. Posteriormente se procedió a sembrar el embrión aislado o el segmento del extremo micropilar (Figura 6).

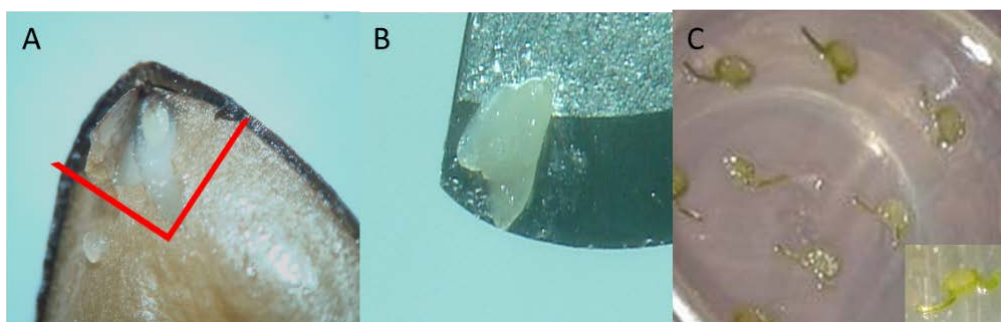


Figura 6. Tipos de explantes utilizados para experimentos en cultivo *in vitro*. A) Sección micropilar (rojo) diseccionada como explante para evaluar germinación, (esta sección contiene al embrión). B) Embriones aislados por completo. C) Explantes del corte transversal de nervadura de hoja entre 0.4 cm de diámetro y máximo 3 mm de alto.

4.4.3. Prueba de viabilidad de semillas

Tres lotes, de 40 semillas, se usaron para una prueba de viabilidad con sales de tetrazolio (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio). Las semillas colectadas y

almacenadas a temperatura ambiente, por no más de 45 días, fueron remojadas por 42 horas para permitir que iniciaran las reacciones metabólicas en el embrión. Posteriormente se removió la sarcotesta y se cortaron transversalmente de manera que solamente la parte que contenía al embrión (extremo micropilar) se sumergiera en la solución de tetrazolio al 0.2 % (p/v), durante 24 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, con ayuda de un microscopio estereoscópico, los embriones fueron separados del endospermo y se registró la coloración que adquirieron. Se consideraron embriones viables aquellos que presentaron coloración roja a rojo intensa en todo el embrión. Los resultados se expresaron en porcentaje de embriones positivos y se calculó la desviación estándar.

4.4.4. Evaluación de la germinación *in vitro* de embriones cigóticos y segmentos de semilla.

Los embriones cigóticos aislados o segmentos micropilares de la semilla se cultivaron en frascos de cristal y cajas Petri con 25 mL de medio de cultivo compuesto por sales de W.P (Lloyd & McCown, 1980) suplementadas con tiamina (1 mg L^{-1}), mioinositol (100 mg L^{-1}), sacarosa (4 % p/v), caseína hidrolizada (CH, 100 mg L^{-1}), L- cisteína (100 mg L^{-1}), polivinilpirrolidona (PVP, 100 mg. L^{-1}), agar-agar (0.7 % p/v). El pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1 . Posteriormente se suplementó con ácido giberélico (AG) en combinación con 6-bencialaminopurina (BA) como reguladores de crecimiento, las concentraciones utilizadas se muestran en el Cuadro 5. Los frascos fueron incubados a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ en completa oscuridad por 30 días, posteriormente fueron sometidos a un fotoperiodo de 16/8 horas y una intensidad lumínica de 1800 lux por el resto del experimento (60 días). La variable evaluada fue el porcentaje de desarrollo celular. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, la unidad experimental consistió de cuatro embriones en un frasco de cultivo con cinco repeticiones por tratamiento ($n=20$), o tres segmentos de semillas en un frasco de cultivo con cuatro repeticiones ($n=12$).

Cuadro 5. Concentraciones de reguladores utilizados en el experimento con embriones aislados y con segmentos de semillas de *M. mexicana* para evaluar germinación *in vitro*.

T	AG (mg L ⁻¹)	BA (mg L ⁻¹)
Tg ₀	0	0
Tg ₁	3	0.1
Tg ₂	1	0.3
Tg ₃	0.3	1.0
Tg ₄	0.1	3.0

4.4.5. Evaluación del crecimiento de callos a partir de nervaduras centrales de hojas y embriones de *M. mexicana*.

El medio de cultivo consistió en las sales WP suplementadas como se indica en la sección anterior. Se usaron como reguladores de crecimiento la auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2-4 D) y la citocinina 6-bencialaminopurina (BA) en las concentraciones que se muestran en el Cuadro 6. La unidad experimental fue de una caja Petri para explantes de hoja con ocho explantes de nervadura de hoja y cinco repeticiones (n=40) o un frasco de cultivo de 150 mL con cuatro embriones y cinco repeticiones (n=20). El diseño fue completamente al azar. Las variables calculadas fueron el porcentaje de desarrollo celular y el nivel de respuesta usando las categorías: bajo (+), medio (++), alto (+++).

Cuadro 6. Concentraciones de reguladores utilizados en el experimento con embriones aislados o segmentos de semillas de *M. mexicana*.

T	2-4 D (mg L ⁻¹)	(BA mg L ⁻¹)
T ₀	0	0
T ₁	0.3	0.1
T ₂	1	0.3
T ₃	3	1
T ₄	10	3

4.4.6. Análisis estadístico

Los ensayos se llevaron a cabo bajo un diseño experimental completamente al azar. Las variables registradas fueron de tipo dicotómicos para la evaluación de porcentaje de crecimiento (0 sin respuesta, 1 con respuesta) y categóricos al

considerarse tres niveles de respuesta bajo (+), medio (++), alto (+++). Por lo que para el análisis estadístico de los resultados se utilizó una prueba no paramétrica basada en rangos de Kruskal - Wallis, y una comparación por parejas U de Mann Whitney, ambas con un nivel de significancia $p \leq 0.05$. En todas las pruebas se utilizó el programa SPSS 20 ®.

4.5. Resultados y discusión

4.5.1. Prueba de viabilidad

Los porcentajes de viabilidad obtenidos en *M. mexicana* se muestran en el Cuadro 7. Con 77 % de semillas viables los resultados obtenidos se acercan a los encontrados en *Magnolia pugana* con 63 % (Jacobo, Romo & Flores, 2016), *Magnolia iltisiana* con 80 % (Acosta, Aguilar, & Peláez, 2001), y 82 % de *M. mexicana* reportado por Gómez-Maqueo (2011). En estudios previos las pruebas de germinación han mostrado resultados desfavorables en comparación a la cantidad de semillas viables por ejemplo en *M. mexicana* germinaron 11.2 % del total de semillas sembradas (Gómez-Maqueo, 2011), menos del 52 % en *M. pugana* (Jacobo, et al., 2016) y 60 % para los estudios realizados en *M. iltisiana* (Acosta et al., 2001). Por los resultados obtenidos y sin considerar las semillas vanas (sin embrión) más del 80 % de los embriones utilizados en el presente estudio se encontraban vivos por lo que contenían células capaces de responder a los reguladores suplementados en el cultivo *in vitro* (Figura 7).

Cuadro 7. Porcentaje de viabilidad en semillas y con respecto a embriones aislados. Porcentajes $\pm$ DS.

	Viabilidad de semillas colectadas (%)	Viabilidad de embriones aislados (%)
Positivas	77.68 $\pm$ 3.29	86.96 $\pm$ 0.47
Negativas	11.99 $\pm$ 0.02	13.04 $\pm$ 0.47
Vanas	10.34 $\pm$ 3.31	-----

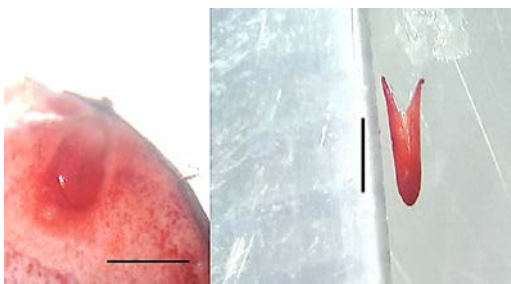


Figura 7. Coloración positiva en rojo intenso para la prueba de viabilidad con tetrazolio. Longitud de la barra 1 mm.

4.5.2. Evaluación de la germinación *in vitro* de embriones cigóticos y segmentos de semilla.

En los experimentos para evaluar germinación *in vitro* se utilizaron embriones aislados y segmentos de semilla. En el Cuadro 8 se presenta el porcentaje de respuesta total. El alargamiento de hipocótilo y cotiledones fue considerado como respuesta de germinación y solamente se observó en los tratamientos T_{gs0} y T_{gs1} . El tratamiento T_{gs4} desarrolló crecimiento callogénico. El crecimiento de las plántulas fue lento y no generaron radícula incluso después de los 60 días de cultivo. A los 30 días el medio de cultivo contaba con presencia de exudados necróticos (Figura 8) por lo que fue necesario remover el segmento de endospermo de los embriones para continuar con el experimento.

Cuadro 8. Porcentaje de respuesta encontrada en segmentos de semillas de *M. mexicana*.

Segmentos de Semillas con Respuesta Total				
	AG (mg L ⁻¹)	BA (mg L ⁻¹)	30 días (%)	60 días (%)
T_{gs0}	0	0	25a	25a
T_{gs1}	3	0.1	10ab	10ab
T_{gs2}	1	0.3	0b	0b
T_{gs3}	0.3	1	0b	10b [†]
T_{gs4}	0.1	3	0b	0b

Letras iguales no muestran diferencias significativas, Kruskal-Wallis $p < 0.05$. (†) Respuesta callogénica.

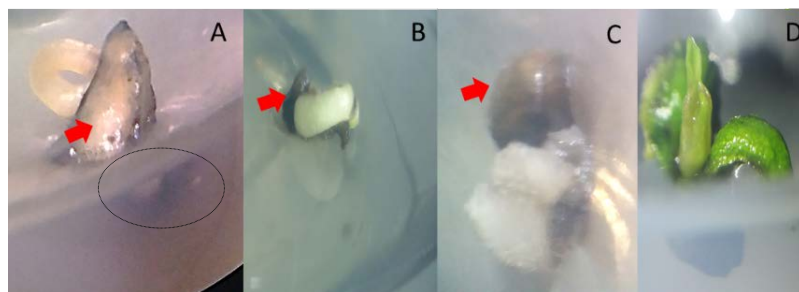


Figura 8. Prueba de germinación de segmentos de semillas de *M. mexicana*. Las flechas rojas señalan los segmentos de endospermo micropilar, en círculo punteado el exudado necrótico. A) Alargamiento del hipocótilo 30 días y B) 60 días C) Respuesta callogénica en T_{gs3} D) Las plántulas no generan radícula después de 5 meses de cultivo.

En diferentes especies de semillas de magnolias incluyendo *M. mexicana* se ha reportado que la presencia de la sarcotesta y testa actúan inhibiendo mecánicamente la germinación (Osuna, 1997; Gómez-Maqueo, 2011; Jacobo *et al.*, 2016). En este estudio estas estructuras fueron removidas y se sembró un segmento pequeño de semilla para facilitar la entrada de la humedad del medio de cultivo y de los reguladores de crecimiento. Se optó por un experimento con segmentos de semillas ya el ácido giberélico ejerce su influencia de dos maneras, primero aumentando el potencial de crecimiento del embrión y segundo induciendo enzimas hidrolíticas como la alfa amilasa en el endospermo (Bewley, 1997). Sin embargo, estas acciones parecieron no tener efecto por lo que fue necesario retirar el endospermo de los embriones debido a que éste último se necrosó. De acuerdo con estos resultados se aconseja eliminar el endospermo para las pruebas de germinación *in vitro*.

En el otro experimento solo se usaron los embriones, la mejor respuesta de germinación fue registrada en el tratamiento sin reguladores T_{ge0} (58.3 %, Cuadro 9) después de 90 días. Al aumentar la concentración de BA el porcentaje de generación de callos aumentó. La Figura 9 muestra ejemplos de estas respuestas, al igual que en el experimento con segmentos de semillas, las plántulas crecieron lentamente y no fueron capaces de generar raíz aún después de varios meses en cultivo. Gómez-Maqueo (2011) encontró que los embriones de *M. mexicana* están inmaduros al momento de la dispersión de las semillas y

durante un proceso de deshidratación los embriones generan estructuras como el procambium y se alargan 0.2 mm. En otras especies como *Magnolia soulangeana* y *Magnolia grandiflora* también se ha reportado inhibición de germinación causada por inmadurez embrionaria (le Page-Degivry, 1970). Por ello al realizar el cultivo *in vitro* de semillas de *M. mexicana* se adicionaron reguladores de crecimiento y nutrientes para permitir el crecimiento y desarrollo de los embriones inmaduros.

Cuadro 9. Respuestas obtenidas en embriones de *M. mexicana* a los 30, 60 y 90 días.

Tratamiento	(mg L ⁻¹)		Embriones (%)					
			30 días		60 días		90 días	
	AG	BA	Germinan	Callogénesis	Germinan	Callogénesis	Germinan	Callogénesis
T _{ge0}	0	0	38.9ac	38.9a	45.4a	38.9a	58.3ac	38.9ac
T _{ge1}	3	0.1	41.7c	25.0a	41.7ca	58.3ca	33.3c	66.7c
T _{ge2}	1	0.3	16.7c	41.7c	16.7ca	50ca	16.7c	50c
T _{ge3}	0.3	1	0.0bc	81.8c	8.3ca	81.8ca	8.3cb	81.8c
T _{ge4}	0.1	3	0.0bc	91.7cb	0cb	91.7cb	0cb	91.7bc

P $\geq$ X² = Nivel de significancia observado con la chi-cuadrada en la prueba de Kruskal-Wallis comparación por parejas con prueba U de Mann Whitney.

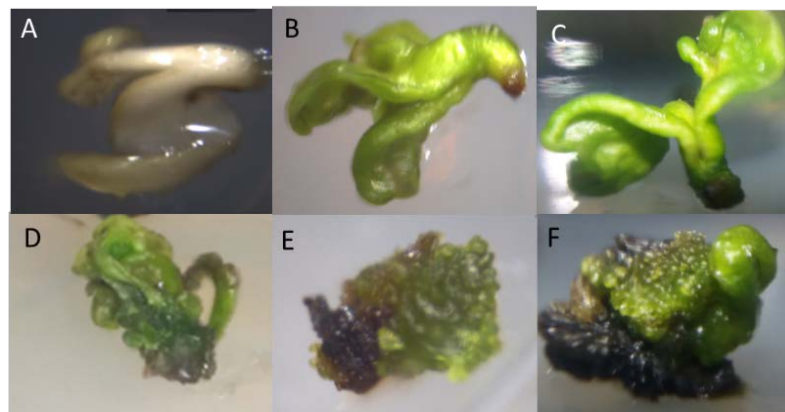


Figura 9. Respuestas obtenidas *in vitro* de germinación de embriones. A) Elongación y desarrollo de hipocótilo a los 30 días, B) 60 días C) 120 días. D) Respuesta de tipo callogénica de 30 días, E) 60 días y F) 90 días.

La CH se utiliza como fuente de nitrógeno y estimulante de crecimiento en el cultivo de embriones *in vitro* (Bridgen, 1994) sin embargo, se ha especulado que está puede contener algún factor de crecimiento desconocido, que promueve la formación de callos (Khaleda & Al-Forkan, 2006). Por lo tanto, es posible que la

interacción de CH en el medio de cultivo promoviera las respuestas callogénicas producidas en el tratamiento T_{ge0} , las cuales se potencializaron en presencia de BA en los tratamientos T_{gs1-4} . El desarrollo de plántulas a partir de embriones cultivados *in vitro* no hubo desarrollo de raíz, lo cual se puede atribuirse al estado inmaduro de estos al momento de la colecta y siembra. Para promover la maduración es necesario suplementar el medio de cultivo *in vitro* con reguladores y factores de crecimiento, en este caso se recomienda sustituir o disminuir la concentración de CH.

4.5.3. Evaluación de la respuesta morfogénica de embriones y explantes de nervadura de hojas en *M. mexicana*.

Para generar respuestas organogénicas o callogénicas se utilizó el medio base descrito anteriormente y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento de 2-4 D y BA. En el tratamiento sin reguladores (T_0) se presentaron dos tipos de respuesta germinación, pero sin generar raíz (40 %) y formación de callos (35 %) lo cual se atribuye a la presencia de CH discutida anteriormente (Cuadro 10). En el resto de los tratamientos sólo se presentó la respuesta callogénica y el T_4 fue el único significativamente diferente ($p \leq 0.05$) ya que solo logró generar callos en 25 % por lo que las altas dosis de 2-4 D y BA fueron inhibitorias de la respuesta callogénica en embriones de *M. mexicana*. El resto de los tratamientos no fueron diferentes en cuanto al porcentaje de respuesta. Si se comparan los tiempos 30, 60 y 90 días de cultivo no hubo una diferencia estadística ($p < 0.05$) y se deduce que a partir de los 30 días no se observó mayor crecimiento de callos.

En la evaluación del tamaño del crecimiento de callos se registraron categorías bajo (+), medio (++) y alto (+++). En la evaluación del primer mes se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el tratamiento T_2 ya que aproximadamente 85 % de su tipo de crecimiento está catalogado de medio a alto. En los meses posteriores las respuestas se igualaron en cuanto a significancia. Considerando tiempo de cultivo y gasto de insumos el tratamiento T_2 con 2.4 D 1 mg L⁻¹ y BA

0.3 mg L⁻¹ fue el más conveniente debido a su nivel de respuesta y desarrollo temprano.

Cuadro 10. Respuesta a los tratamientos con diferentes concentraciones de 2,4 D y BA de los embriones de *M. mexicana*.

		2-4 D	BA	Respuesta (%)		Nivel de respuesta (%)				
		(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹)	Total	G	+	++	+++	p≤0.05	
30 días	T ₀	0	0	75	40	0	35	0	a	
	T ₁	0.3	0.1	70		50	20	0	a	
	T ₂	1	0.3	85		0	55	30	b	
	T ₃	3	1	65		45	20	0	a	
	T ₄	10	3	30**		15	15	0	c	
60 días	T ₀	0	0	80	40	60	15	5	a	
	T ₁	0.3	0.1	70		30	40	0	a	
	T ₂	1	0.3	85		35	20	30	a	
	T ₃	3	1	65		30	30	5	a	
	T ₄	10	3	25**		25	0	0	b	
90 días	T ₀	0	0	90	40	0	10	0	a	
	T ₁	0.3	0.1	70		30	0	40	a	
	T ₂	1	0.3	85		20	45	20	a	
	T ₃	3	1	65		25	0	40	a	
	T ₄	10	3	25**		20	5	0	b	

G: Germinación. Nivel de respuesta Bajo: (+), Medio (++), Alto (+++), n=20. Valores con letras diferentes son tratamientos estadísticamente diferentes con prueba Kruskal-Wallis y comparación por parejas U de Mann Whitney nivel de significación p≤0.05.

En la Figura 10 se pueden observar ejemplos de las repuestas a los tratamientos en embriones aislados, la necrosis fue un impedimento para el crecimiento de las células (Flechas negras). El uso del medio de cultivo a base de sales WP y suplementado con L-cisteína y PVP (100 mg L⁻¹ c/u) favoreció el crecimiento constante y el control de la necrosis, resultado que no se obtuvo en pruebas con otros medios especialmente el MS (Murashige & Skoog, 1962) en el cual el crecimiento fue mínimo, seguido de necrosamiento y muerte (datos no mostrados).

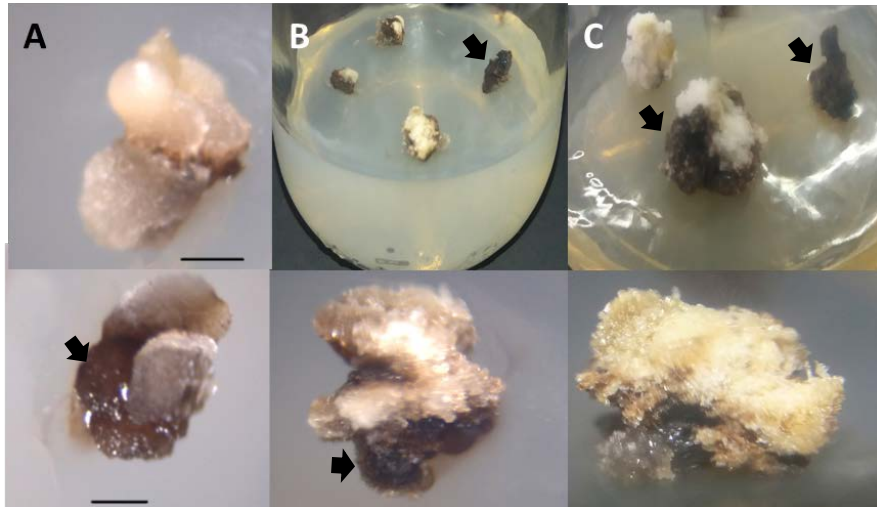


Figura 10. Crecimiento de callos en embriones aislados de *M. mexicana*.
A) 30 días: T₂ arriba y T₁ abajo, B) 60 días: T₂ frasco de cultivo y acercamiento
C) >90 días: arriba frasco de cultivo y abajo acercamiento a un explante T₂.

En el Cuadro 11 se muestran los resultados obtenidos en el experimento en que se usaron explantes de nervadura central de hojas para la obtención de callos. Al igual que en el experimento donde se usaron embriones, durante los primeros 30 días fue posible detectar diferencias significativas en el T_{H2} con 93 % de respuesta en el total de explantes sembrados. Para el segundo y tercer mes sólo el tratamiento T_{H0} no mostró crecimiento no desarrollo ningún tipo de crecimiento. En cuanto al nivel de respuesta a los 30 y 60 días, el tratamiento T_{H2} fue significativamente ($p \leq 0.05$) el de mejor respuesta con 42.9 % de explantes de nivel medio y 31 % de explantes de nivel de respuesta alto. A los 90 días los explantes del T₃ crecieron significativamente (Figura 11), pero presentaron mayor grado de necrosis.

El desarrollo de cultivos que presentan desarrollos tardíos, no son convenientes ya que están sujetas a necrosis, adicionalmente se buscan métodos más eficientes en factores como tiempo y recursos. Por lo anterior tratamiento T₂ con 1 mg L⁻¹ 2,4 D y 0.3 mg L⁻¹ BA es recomendable para desarrollar callos en explantes de nervadura central de hojas de *M. mexicana* debido a su nivel de respuesta y desarrollo rápido.

Cuadro 11. Respuesta callogénica en explantes de nervadura central de hojas con diferentes concentraciones de 2,4 D y BA.

Días	Tratamiento	2-4 D (mg L ⁻¹)	BA (mg L ⁻¹)	Respuesta Total (%)	Nivel de respuesta (%)			
					(+)	(++)	(+++)	p≤0.05
30	T _{H0}	0	0	0*	0.0	0.0	0.0	a
	T _{H1}	0.3	0.1	60	35.0	25.0	0.0	b
	T _{H2}	1	0.3	93.5**	76.1	17.4	0.0	c
	T _{H3}	3	1	75.6	58.5	17.1	0.0	b
60	T _{H0}	0	0	0*	0.0	0.0	0.0	a
	T _{H1}	0.3	0.1	95.3	31.0	42.9	26.2	b
	T _{H2}	1	0.3	95.7	20.0	42.9	31.4	c
	T _{H3}	3	1	100	22.0	78.0	0.0	b
90	T _{H0}	0	0	0*	0.0	0.0	0.0	a
	T _{H1}	0.3	0.1	100	51.3	17.9	30.8	b
	T _{H2}	1	0.3	97.7	50.0	40.9	6.8	b
	T _{H3}	3	1	100	16.0	56.0	28.0	c

Nivel de respuesta Bajo: (+), Medio (++), Alto (+++), n=40. Valores con letras diferentes y (*) son tratamientos estadísticamente diferentes con prueba Kruskal-Wallis y comparación por parejas U de Mann Whitney, nivel de significación p≤0.05.

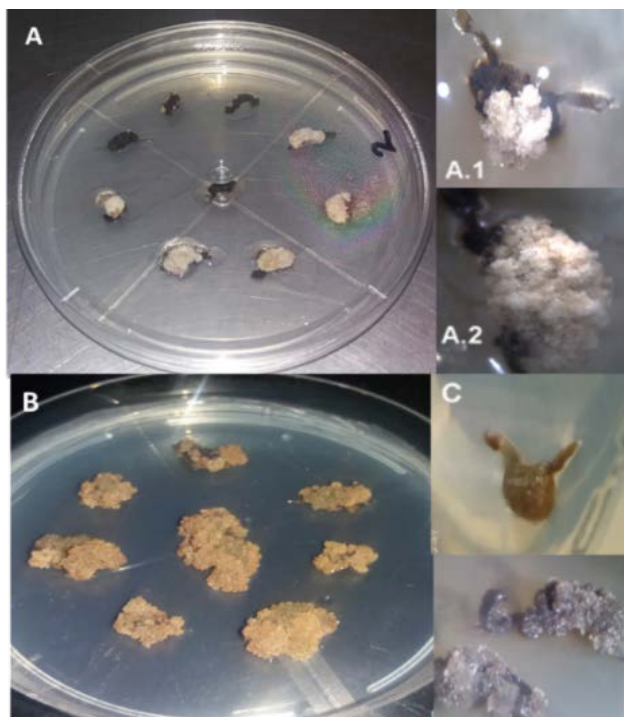


Figura 11. Callos obtenidos en las nervaduras de hojas. A) T_{H2} a los 60 días se nota la presencia de células vivas. B y C) T_{H3} 90 días o más se nota la presencia de necrosis.

Para desarrollar embriones somáticos *in vitro* las células pueden pasar por un proceso de dediferenciación y generar callos denominado embriogénesis indirecta o no pasar por ese proceso llamado embriogénesis directa (Roca & Mroginski, 1991). En este trabajo se desarrollaron callos de hojas y de embriones cigóticos de *M. mexicana* pero no se obtuvieron embriones somáticos. En la Figura 12 se presenta una fotografía de las células de los callos observadas con un microscopio estereoscópico, en ella no se aprecian estructuras compactas. Varios trabajos realizados en especies del género *Magnolia* reportan la obtención de embriones somática por organogénesis indirecta en *Magnolia obovata*, (Kim, Park, Park, & Moon, 2007), *Magnolia pyramidata* (Merkle & Watson-Pauley, 1994), *Magnolia virginiana*, *Magnolia fraseri*, *Magnolia acuminata* var. *cordata* (Merkle & Wiecko, 1990), entre otros. En la especie *Magnolia dealbata* se logró una respuesta directa e indirecta a partir de embriones cigóticos con diferentes concentraciones de BA y 2,4 D (Mata, Jiménez, & Chávez, 2006). Algunos autores consiguieron organogénesis directa a partir de tejidos como entrenudos, ápices y yemas axilares (Parris, Touchell, Ranney, & Adelberg, 2012). No hay reportes de obtención de callos a partir de hojas, ápices o yemas axilares. Por lo anterior el establecimiento de cultivos callogénicos viables es un primer paso en el cultivo *in vitro* de *M. mexicana* para la generación de embriones somáticos lo cual podría ayudar a su multiplicación eficaz y contribuir a su conservación y rescate.

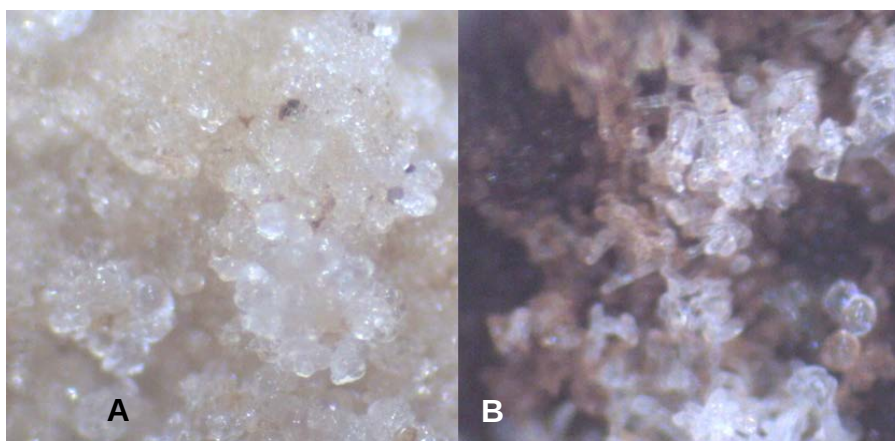


Figura 12. Acercamiento de la formación callosa en explantes de nervadura de hoja, no se observó formación preembrionaria o embrionaria A) 60 días, B) 120 días. Fotografías 40x.

4.6. Conclusiones

M. mexicana presenta embriones inmaduros que no generan radícula en cultivo *in vitro*. La adición de CH como factor de crecimiento resultó ser contraproducente, ya que induce callogénesis en cultivos para germinación. Se establecieron satisfactoriamente cultivos de masas callogénicas en porcentajes superiores a 75 % tanto en explantes de hojas como en embriones cigóticos, las concentraciones de reguladores 2.4 D 1 mg L⁻¹ y BA 0.3 mg L⁻¹ son las más recomendables para generar callos.

4.7. Referencias

- Acosta, Á. S., Aguilar, M. S. Z., & Peláez, E. J. J. (2001). Germinación de *Acer skutchii* Rehder y *Magnolia iltisiana* Vázquez en la reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán, Jalisco, México. *Foresta Veracruzana*, 3(2). Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49703201>
- Attree, S. M., & Fowke, L. C. (1993). Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35(1), 1-35. <https://doi.org/10.1007/BF00043936>
- Bewley, J. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9(7), 1055-1066.
- Bridgen, M. P. (1994). A review of plant embryo culture. *HortScience*, 29(11), 1243-1246.
- Calva, C. G., & Pérez, V. J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro, *Revista Digital Universitaria*, 6(11). Recuperado a partir de <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a-1a.htm>
- Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López-Vela, D., & Toribio, M. (2005). La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Forest Systems*, 14(3), 345-357.
- Fay, M. F. (1992). Conservation of rare and endangered plants using *in vitro* methods. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 28(1), 1-4. <https://doi.org/10.1007/BF02632183>
- Gómez-Maqueo, B. X. (2011). *Germinación de semillas de Talauma mexicana deshidratadas en ambientes controlados*. Tesis de licenciatura. Universidad Autonoma de México, Mexico. D.F. pág. 68 Recuperado a partir de <http://bibliotecacentral.unam.mx/tesis.html>
- Gutiérrez M. A., Santacruz R. F., Cabrera P. J. L., & Rodríguez G. B. (2003). Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. *e-Gnosis*, 1(4), 19.

- Hernández, C. M. (1980). Flora de Veracruz. Magnoliaceae [Mexico]. *Instituto Nacional de Investigadores sobre Recursos Bióticos, INIREB* (14), 17.
- Jacobo, P. C., Romo, C. R., & Flores, J. (2016). Germinación de semillas de *Magnolia pugana* (Magnoliaceae), especie endémica y en peligro de extinción del occidente de México. *Botanical Sciences*, 94(3), 575-584.
- Khaleda, L., & Al-Forkan, M. (2006). Stimulatory effects of casein hydrolysate and proline in in vitro callus induction and plant regeneration from five deepwater rice (*Oryza sativa* L.). *Biotechnology*, 5(3), 379-384. <https://doi.org/10.3923/biotech.2006.379.384>
- Kim, Y. W., Park, S. Y., Park, I. S., & Moon, H. K. (2007). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seeds of *Magnolia obovata* Thunberg. *Plant Biotechnology Reports*, 1(4), 237-242. <https://doi.org/10.1007/s11816-007-0037-0>
- le Page-Degivry, M. T. (1970). Seed dormancy associated with embryo immaturity: Contribution for the study of *Magnolia soulangeana* Soul. Bod. and *Magnolia grandiflora* L. by means of *in vitro* culture. *Planta*, 90(3), 267-271. <https://doi.org/10.1007/BF00387178>
- Lloyd, G., & McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings - International Plant Propagators' Society (USA)*, 30, 421-427
Recuperado a partir de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8134503>
- Mata, R. M., Jiménez, R. Á., & Chávez, A. V. M. (2006). Somatic embryogenesis and organogenesis in *Magnolia dealbata* Zucc. (Magnoliaceae), an endangered, endemic mexican species. *HortScience*, 41(5), 1325-1329.
- Merkle, S. A., & Wiecko, A. T. (1990). Somatic embryogenesis in three magnolia species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115(5), 858-860
- Merkle, S. A., & Watson-Pauley, B. A. (1994). Ex vitro conversion of pyramid magnolia somatic embryos. *HortScience*, 29(10), 1186-1188.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Osuna, F. H. R. (1997). *Estructura y respuesta germinativa de semillas de plantas medicinales: Chiranthodendron pentadactylon y Talauma mexicana*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de México, México. D.F. pág. 132
Recuperado a partir de <http://bibliotecacentral.unam.mx/tesis.html>
- Palacios, E. (2006). Ficha técnica de *Magnolia mexicana*. Cuarenta y ocho especies de la flora de Chiapas incluidas en el PROY-NOM-059-ECOL-2000. (p. 6). Mexico. D.F: Instituto de Historia Natural y Ecología.
Recuperado a partir de

<http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichasnom/Talaumamexicana00.pdf>

- Parris, J. K., Touchell, D. H., Ranney, T. G., & Adelberg, J. (2012). Basal salt composition, cytokinins, and phenolic binding agents influence in vitro growth and ex vitro establishment of magnolia 'Ann'. *HortScience*, 47(11), 1625-1629.
- Roca, W. M., & Mroginski, L. A. (1991). Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas *in vitro*. En *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT. pág 970. Recuperado a partir de Google-Books-ID: EXijYNw55DUC
- SEMARNAT. (2010). Protección ambiental - Especies nativas de México de flora y fauna silvestres - Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio - Lista de especies en riesgo, NOM-059-SEMARNAT-2010 Norma Oficial Mexicana. Recuperado a partir de http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNA_T_2010.pdf
- Street, H. E. (1973). *Plant Tissue and Cell Culture*. California:University of California Press. pág. 520
- Waizel B., J. (2002). Uso tradicional e investigación científica de *Talauma mexicana* (D.C.) Don., o flor del corazón. *Revista Mexicana Cardiología*. 13 (1): 31-38
- Zabala, M. A., Velásquez, M. J. A., Cardona, A. M. A., Flórez, J. M. R., & Vallejo, C. M. (2009). Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células vegetales. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. 62 (1): 4881-4895. Recuperado 8 de enero de 2017, a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179915377015>

5. ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y PROPIEDADES ANTIOXIDANTES, DE EXTRACTOS DE YOLOXÓCHITL (*Magnolia mexicana* DC.)

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF YOLOXOCHITL EXTRACTS (*Magnolia mexicana* DC.)

5.1. Resumen

Las flores de *Magnolia mexicana* se utilizan en la medicina tradicional mexicana para tratar afectaciones cardíacas. Las plantas medicinales contienen varios tipos de metabolitos secundarios en *M. mexicana* se han encontrado alcaloides como lirioidenina, aztequina y talaumina y flavonoides como quercetina. Esta clase de metabolitos secundarios tienen propiedades antioxidantes. El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo un análisis fitoquímico del extracto metanólico y de una extracción ácido-base para aislar alcaloides, así como determinar la capacidad antioxidante de extractos acuosos de hojas y flores de *M. mexicana* para contribuir al conocimiento de la composición química de esta planta y sus el análisis de sus propiedades antioxidantes se determinó mediante el ensayo DPPH• y ABTS•, los fenoles por el método de Folin-Ciocalteu y los flavonoides con base en equivalentes de catequina. Del extracto metanólico de hojas se aisló β -Sitosterol y de la extracción ácido-base de las flores se identificaron los alcaloides 6-metoxi-2-metil indolina y 5-metoxi-2-metil indolina. La mayor capacidad antioxidante y contenido de flavonoides y fenoles totales se obtuvo en el extracto de pétalos (Cl_{50} : $42.91 \pm 4.47 \mu\text{g mL}^{-1}$, fenoles totales: $111.26 \text{ mg EAG g}_{bs}^{-1}$ y flavonoides: $50.87 \pm 1.37 \text{ mgEC g}_{bs}^{-1}$). Estos resultados aportan nuevos compuestos no encontrados anteriormente en *Magnolia mexicana* y potencial antioxidante posiblemente relacionados con sus atributos medicinales.

Palabras clave: Propiedades antioxidantes; alcaloides; plantas medicinales

Tesis Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Jessica Miriam Medrano Hernández
Director de Tesis: Dr. José Luis Rodríguez de la O

5.2. Abstract

Magnolia mexicana DC. has been reported in traditional Mexican medicine as cardi tonic. Medicinal plants are known to contain several types of secondary metabolites which have beneficial properties such as polyphenols, flavonoids or alkaloids. Their antioxidant capacity has been studied. The objective of this study was to perform a phytochemical analysis and to determine the antioxidant capacity of extracts of *M. mexicana* due to its importance in medicinal properties of this plant. From the phytochemical analysis, the alkaloids 6-methoxy-2-methyl indoline and 5-methoxy-2-methyl indoline were isolated from flowers, while β -Sitosterol was found in leaves. The antioxidant activity was determined by the DPPH • and ABTS tests, phenols by the Folin-Ciocalteu method, and the flavonoids based on catechin equivalents. The highest antioxidant capacity and total flavonoid and phenol content were obtained from petal extract (IC₅₀: $42.91 \pm 4.47 \mu\text{g mL}^{-1}$, total phenols: $111.26 \text{ mg EAG g}_{\text{bs}}^{-1}$ and flavonoids: $50.87 \pm 1.37 \text{ mgEC g}_{\text{bs}}^{-1}$). These results indicate that *Magnolia mexicana* has important bioactive compounds and antioxidant potential possible related to its medicinal attributes.

Index words: DPPH test •; Alkaloids; medicinal plants

Thesis Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Jessica Miriam Medrano Hernández
Advisor: Dr. José Luis Rodríguez de la O

5.3. Introducción

Magnolia mexicana DC., es una especie endémica del centro-sur de México y norte de Centroamérica (Hernández, 1980), durante siglos ha sido empleada en la medicina tradicional mexicana en diversos padecimientos. En el Códice de la Cruz Badiano de plantas medicinales se describe con efecto descongestionante (De Micheli-Serra & Izaguirre-Ávila, 2014), los aztecas empleaban el cocimiento de la flor de esta especie para "corregir el vientre, reconfortar el corazón, para problemas de la micción y como un medio excelente para combatir la esterilidad" (Hernández, 1980). De *M. mexicana* existen reportes etnofarmacológicos desde el siglo XVI y a partir de 1927 se han llevado a cabo diversos bioensayos para comprobar sus propiedades medicinales, algunos con buenos resultados sobre todo los relacionados con las funciones cardíaca y vascular (Waizel, 2002). Recientemente se reportó que el extracto de diclorometano de *M. mexicana* tiene efectos significativos en la relajación de anillos de tráquea de ratas, sugiriendo su capacidad terapéutica en enfermedades como el asma (Sánchez-Recillas *et al.*, 2014).

Los metabolitos secundarios producidos por las plantas son compuestos que participan en los procesos de adaptación a su ambiente, la síntesis de éstos se producen en respuesta a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros, b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda, Porta-Ducoing, & Rocha, 2003). Por lo que los metabolitos secundarios intervienen en respuesta a un estrés fisiológico, biótico o abiótico tratando de restringir, matar o inhibir una invasión o ataque de animales, hongos o bacterias. Además, actúan manteniendo un equilibrio de óxido-reducción en las células vegetales debido a su capacidad antioxidante. La capacidad antioxidante de los metabolitos secundarios de las plantas son objeto de amplio interés científico debido a los efectos que se observan en los seres humanos por la

ingesta de alimentos de origen vegetal y el uso de productos naturales con potencial terapéutico (Oliveira-Miranda, Velázquez, & Bermúdez, 2005).

La oxidación implica la pérdida de electrones durante este proceso se producen radicales libres que son moléculas altamente reactivas que dañan lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos alterando los procesos naturales en los que estos participan (Corrales & Muñoz-Ariza, 2012). La producción de un exceso de radicales libres se conoce como estrés oxidativo y se define como la ruptura del equilibrio entre las sustancias o factores oxidantes y los mecanismos antioxidantes (Venereo-Gutiérrez, 2002), lo cual se considera como la causa silenciosa de múltiples enfermedades en el ser humano, por ejemplo, las neurodegenerativas, cardiovasculares, cáncer, entre otras (Reed, 2011; Reuter, Gupta, Chaturvedi, & Aggarwal, 2010; Sugamura & Keaney, 2011).

Los antioxidantes son moléculas que a bajas concentraciones retardan o previenen la oxidación de los componentes de la célula como lípidos, proteínas, ADN. Los antioxidantes al colisionar con el radical libre le ceden un electrón, estabilizándolo y protegiendo al metabolismo celular de su ataque (Venereo-Gutiérrez, 2002). En la búsqueda de compuestos naturales con actividad antioxidante se han encontrado diversos compuestos fenólicos, ácido ascórbico y compuestos nitrogenados como péptidos, aminoácidos, aminas y alcaloides (Valentao *et al.*, 2002). Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas (Dixon & Paiva, 1995) y están presentes en un gran número de derivados como: flavonoles, chalconas, flavonas, flavanonas, taninos, estilbenos, curcuminoides, ácidos fenólicos, coumarinas, lignanos, etc. (Huang, Cai, & Zhang, 2010).

Los ensayos para medir la capacidad antioxidante han sido desarrollados y ampliamente utilizados para la detección y evaluación rápida de nuevas sustancias antioxidantes (Cheng, Moore, & Yu, 2006), entre estas técnicas se encuentran los ensayos con los radicales libres del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónica (ABTS·) (Re *et al.*, 1999), y 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

(DPPH·) (Cheng *et al.*, 2006). Adicionalmente, las determinaciones del contenido fenólico (Prior, Wu, & Schaich, 2005) y de flavonoides (Bors, Heller, Michel, & Saran, 1990) son estudios para evaluar el potencial antioxidante en vegetales.

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue analizar el extracto metanólico de hojas y enriquecido con alcaloides de flores *M. mexicana*, así como determinar sus propiedades antioxidantes como parte del potencial medicinal de esta planta.

5.4. Materiales y métodos

5.4.1. Material vegetal

Hojas y flores de *M. mexicana* fueron colectadas en mayo 2015 en el municipio de Huitzilán de Serdán, Estado de Puebla localizado a una altitud 967.44 ± 15.8 msnm y coordenadas geográficas $19^{\circ}58'15.1\text{N}$, $97^{\circ}41'49.30\text{O}$. La colecta fue de un árbol maduro de 18 metros de altura, cuya identificación botánica la realizó el M.C. Antonio Cortés Jiménez, se depositó un ejemplar (No. 31613) en el Herbario JES del área de Biología de la Universidad Autónoma Chapingo.

5.4.2. Preparación de extractos para fitoquímica

Hojas

Las hojas secas y molidas de *M. mexicana* (100 g) fueron sometidas a maceración con hexano durante 48 horas (500 mL x 3). Del extracto recuperado por filtración, se evaporó el disolvente a presión reducida, en un rotavapor BÜCHI R-210, después de eliminar el hexano del residuo vegetal, se adicionó cloruro de metileno (500 mL x 3) y se repitió el procedimiento de filtración y eliminación del disolvente, el residuo vegetal se maceró nuevamente con metanol (500 mL x 3), siguiendo el mismo procedimiento. Finalmente, se obtuvieron 1.2 g de extracto hexánico seco, 1.7 g de extracto de cloruro de metileno y 2.3 g de extracto metanólico.

Extracción ácido-base para alcaloides en flores

Para la obtención de un extracto enriquecido con alcaloides se siguió la metodología descrita en (Maldoni, 1991) con modificaciones. Las flores frescas (198 g) fueron maceradas en 500 mL de metanol por 48 h, posteriormente se evaporó el disolvente a presión reducida en un rotavapor BÜCHI R-210 este procedimiento se hizo tres veces y se obtuvo una pasta color caramelo (150 g). El extracto seco se mezcló con 100mL de una solución de HCl 0.5 N en baño de hielo y con agitación, esta mezcla alcanzó un pH = 2.5, se filtró para separar los compuestos solubles de la pasta insoluble. La mezcla acuosa se extrajo con hexano 100 mL (x 3) la fase orgánica fue separada de la fase acuosa y esta última tratada NaOH 15 % (pH 10) para alcalinizar pH 9 lo cual fue monitoreado con ayuda de un potenciómetro Hanna Instruments ®. La solución acuosa-básica fue extraída con cloroformo 100 mL (x 5), la fase orgánica se evaporó en un rotavapor BÜCHI R-210.

5.4.3. Separación de extractos

Hojas

El extracto metanólico de hojas de *M. mexicana* (2.3 g) fue separado por cromatografía en columna (CC) sobre gel de sílice en una relación 1:20 (p/p) Merck 40 tamaño de la partícula 0.063-0.20 mm. se hizo pasar una mezcla de disolvente puros y de polaridad creciente de cloruro de metileno- metanol en proporción 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1. Se colectaron fracciones de 15 ml las cuales fueron evaporadas en baño de vapor de agua y monitoreadas con CCD utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (Merck 60 F254) y reveladas con ácido fosfomolibdico 20 % y/o con reactivo de Dragendorff se obtuvieron un total de 544 fracciones.

Flores

El extracto clorofórmico con alcaloides de *M. mexicana* (0.1 g) fue separado por cromatografía en columna sobre gel de sílice en una relación 1:20 (p/p) Merck 40 tamaño de la partícula 0.063-0.20 mm. se utilizaron como eluyentes mezclas de

polaridad creciente y disolvente puros de cloruro de metileno- metanol en proporción 9:1,8:2, 7:3, 6:4, 1:1. Se colectaron fracciones de 15 ml estas fueron evaporadas en baño de vapor de agua y monitoreadas con CCD utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (Merck 60 F254) y reveladas con ácido fosfomolibdico 20 % y/o con reactivo de Dragendorff se obtuvieron un total de 367 fracciones.

5.4.4. Elucidación estructural

La estructura de los compuestos aislados se estableció con base en el análisis de los espectros de H^1 -RMN y C^{13} , los compuestos puros fueron analizados por Resonancia Magnética Nuclear de protón de Hidrogeno (RMN de 1H) y de Carbono 13 (^{13}C), la concentración de la muestra usada fue de 5-10 % en $CDCl_3$ como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna en un espectrofotómetro Agilent operado a 400 MHz y 100MHz para ^{13}C . Los desplazamientos químicos (δ) fueron expresados en partes por millón (ppm).

5.4.5. Preparación de extractos para pruebas de capacidad antioxidante.

Las hojas fueron secadas bajo sombra en un lugar fresco, los pétalos de las flores fueron cortados y congelados para posteriormente liofilizarlos a temperatura de -44 °C, presión de 17×10^{-3} mBar, durante 96 h en un liofilizador Labconco 77510 00. Las hojas secas y molidas (0.5 g) o las flores liofilizadas (0.5 g) fueron extraídas con 5 mL de una mezcla de metanol/agua (4:1 v/v) en medio ácido pH = 3, el ajuste se hizo con HCl al 10 %. La mezcla se agito en vórtex (3 min a 3000 rpm) y se sometió a sonicación por 15 min (Ultrasonic Cleaner 8890, Cole Parmer). Posteriormente se agitaron (30 min; 30 °C) en una incubadora Orbital Prendo INO-650 M, finalmente la mezcla fue centrifugada (1300 rpm, 15 min) (SOLBAT J-600, México). Los sobrenadantes fueron recuperados, filtrados y aforados a 10 mL con metanol/agua (4:1 v/v) y se conservaron en frascos ámbar y en refrigeración (6 °C) hasta su análisis. A partir de estos extractos se tomaron alícuotas para determinar fenoles totales, flavonoides y estimar la capacidad antioxidante.

5.4.6. Pruebas de capacidad antioxidante

Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales fue determinado por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) adaptado a microplacas 96 pozos, en cada pozo de una placa se mezclaron: una alícuota (25 μL) de la muestra con la dilución para analizar o de curva estándar, agua destilada (125 μL), el reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:10 con 20 μL de agua destilada y finalmente se agregaron 30 μL de Na_2CO_3 al 20 %. La mezcla fue agitada y se dejó reposar durante 30 minutos en oscuridad, la absorbancia fue medida a 765 nm en un lector de microplacas multidetector con inyector Synergy® HT equipado con el programa Gen5 de análisis de datos (Biotek Instruments Inc., Winoosky, VT, USA). Para la curva de calibración se empleó ácido gálico y se preparó en un rango de concentración de 0.001 a 0.01 mg mL⁻¹, la ecuación obtenida a partir de la curva fue utilizada para determinar la concentración de fenoles totales en la muestra. Las mediciones se hicieron por cuadruplicado. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en base seca (mg EAG g_{bs}⁻¹).

Determinación de flavonoides

Los flavonoides totales fueron determinados de acuerdo al procedimiento de Kubola & Siriamornpun, (2011) adaptado a microplacas. Una alícuota de cada extracto de prueba (0.5 mL) se mezcló con 2.5 mL de agua destilada y NaNO_2 al 5 % (0.15 mL), después de 5 min, se agregó $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 % (0.3 mL). La mezcla se dejó reposar durante 5 min y enseguida se agregó 1 mL de NaOH al 5 %; las muestras fueron agitadas en vórtex (3,000 rpm x 3 min). Finalmente se transfirieron 200 μL de cada muestra a los pozos de la microplaca y se midió la absorbancia a 510 nm. Las mediciones se hicieron por cuadruplicado. El intervalo de la curva de calibración de catequina fue de 0 a 130.18 μM . La ecuación obtenida de la curva de calibración fue utilizada para determinar la concentración de flavonoides totales en las muestras. Los resultados fueron expresados como

miligramos equivalentes de catequina por gramo de muestra en base seca (mgEC g_{bs}⁻¹).

Ensayo ABTS

El ensayo ABTS descrito por (Re *et al.*, 1999) adaptado a microplacas se utilizó para evaluar la capacidad antioxidante de *M. mexicana*. Una disolución del catión ABTS^{•+} fue preparada mezclando ABTS (7.4 mM) y persulfato de sodio (2.6 mM) en proporción 1:1. Esta mezcla se dejó reposar durante 16 h y finalmente fue diluida para obtener una absorbancia entre 0.7 y 1.2 leída a 734 nm, para lo cual se tomaron 600 µL y se aforaron a 10 mL con metanol/agua (4:1 v/v), en los pozos de la microplaca se mezclaron 20 µL de muestra o curva patrón y 180 µL de la disolución ABTS^{•+}. Como blanco se usó la disolución ABTS^{•+} (200 µL). La microplaca se agitó y la mezcla de reacción se dejó reposar durante 10 min protegida de la luz, finalmente la absorbancia fue medida a 734 nm. La ecuación obtenida de la curva de calibración con Trolox fue utilizada para determinar la capacidad antioxidante de las muestras. El intervalo de la curva de calibración fue de 4.99 a 59.93 µM. Las mediciones se hicieron por cuadruplicado. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca (µmol ET g_{bs}⁻¹).

Ensayo DPPH

La capacidad de atrapamiento de radicales libres se midió utilizando el ensayo DPPH descrito por (Cheng *et al.*, 2006). En microplacas de 96 pozos se mezcló el extracto de cada muestra (200 µL) diluido en las siguientes proporciones: 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1, 1 más 50 µL de disolución de DPPH (0.099 mM). Como blanco se usó metanol/agua 4:1 v/v (250 µL) y como control metanol/agua 4:1 v/v (200 µL) y DPPH 0.099 mM (50 µL). La curva estándar de Trolox de una concentración entre 7.67 - 34.51 µM. La microplaca fue agitada y conservada en oscuridad durante 30 min y la absorbancia se midió a 515 nm. El porcentaje de DPPH degradado fue determinado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% DPPH \text{ degradado} = \left(1 - \frac{A_{muestra} - A_{blanco}}{A_{control} - A_{blanco}}\right) \times 100$$

Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra en base seca ($\mu\text{mol ET g}_{\text{bs}}^{-1}$). El porcentaje de reducción del DPPH fue graficado contra las concentraciones de las muestras y se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀).

5.4.7. Análisis estadístico

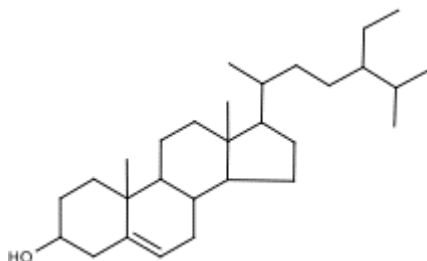
El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro repeticiones por muestra. Para detectar diferencias significativas entre los valores de hojas y flores, los resultados fueron sometidos a una prueba t para muestras independientes y la comparación entre las pruebas de capacidad antioxidante se realizó mediante un análisis de varianza de un factor y prueba de comparación de medias de Tukey, con ($p < 0.05$). Los análisis fueron realizados con el programa SPSS 20 ®.

5.5. Resultados y discusión

5.5.1. Análisis de extracto de hojas

A partir de la separación por CC del extracto metanólico de las hojas de *M. mexicana*. Se obtuvieron 544 fracciones de 15 mL cada una, las cuales fueron monitoreadas por CCD; las fracciones 21-23 eluidas con cloruro de metileno al 100 % se obtuvo un sólido blanco con punto de fusión de 124 a 135 °C. La comparación de los RF de este compuesto con muestras auténticas de β -sitosterol (Sigma) y estigmasterol, demostraron la presencia de β -sitosterol (**1**) que anteriormente ya se habían encontrado en esta especie (Collera, Walls, Garcia, Flores, & Herrán, 1963; Waizel, 2002). La estructura de este compuesto se confirmó mediante la obtención del espectro de RMN de ^1H (Figura 14), todas las señales concuerdan con el espectro de β -sitosterol descrito en la base de datos “Human Metabolome Database” que muestra un espectro de ^1H a 600 MHz

de β -sitosterol en CDCl_3 (Human Metabolome Database: ^1H NMR Spectrum (HMDB00852), 2016).



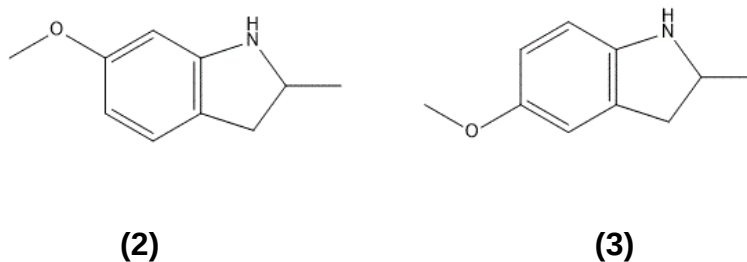
(1)

En forma general en un espectro RMN ^1H de esteroides presenta absorciones características. El multiplete en 3.52 ppm corresponde al protón del carbono oxigenado y varias señales de protones metílicos en la región de 0.84 al 2.32 ppm correspondientes a los protones de los ciclos y la cadena alifática, en el caso del doble enlace entre los carbonos 5 y 6, el protón del carbono 6 se observa como un doblete ancho alrededor de 5.3 ppm (Figura 13)

5.5.2. Análisis de la extracción ácido-base de flores

De acuerdo con la información de la literatura, *M. mexicana* contiene alcaloides (Waizel, 2002). Los alcaloides se pueden separar considerando sus propiedades ácido- básicas. Primero el extracto metanólico de las flores de *M. mexicana* fue acidificado para formar las sales de alcaloides, las cuales son solubles en agua y se separan del resto de material no soluble; posteriormente al cambiar el pH a básico los alcaloides precipitan y se pueden recuperar con solventes orgánicos como cloroformo (Maldoni, 1991). El extracto enriquecido con alcaloides fue separado por CC obteniendo un total de 367 fracciones; de éstas la CCD mostró que estaban presentes sustancias puras que se analizaron en RMN. La mayoría fueron mezclas de compuestos a excepción de las fracciones 5-20 cuyo espectro muestra las señales típicas para alcaloides; la señal en 5.5 ppm correspondiente a un protón unido a nitrógeno, las señales del 6.5 a 7 ppm son característica de protones aromáticos, la señal 3.8 ppm corresponde al grupo metoxilo, mientras

que entre δ 2.3-2.8 se presentan los protones unidos a carbonos metileno y metilo (Figura 14). Las moléculas fueron dibujadas mediante el programa Chem3D 16.0 y corresponden a 6-metoxi-2-metil indolina (**2**) y 5-metoxi-2-metil indolina (**3**). La mezcla se pasó por una columna de cromatografía para separar los compuestos, pero debido a su enorme semejanza estructural no tuvo éxito.



Los alcaloides encontrados en este estudio son moléculas que no habían sido reportadas para *M. mexicana*, anteriormente los únicos alcaloides encontrados habían sido la aztequina, talaumina en extractos de hojas (Waizel, 2002) y liriodenina (Kametani, Terasawa, Ihara, & Iriarte, 1975) obtenida de la corteza. De estos alcaloides la talaumina no ha sido mencionada nuevamente en ninguna publicación posterior al año 1950 y en el caso de la aztequina se duda de la estructura propuesta (Collera *et al.*, 1963).

Pruebas realizadas en compuestos de indolinas sustituidas aleatoriamente y sintetizadas en laboratorio demostró actividad antagonista de la 6-metoxi-1,1 metil indolina en receptores muscarínicos M3 en musculo liso de íleon de cobayos (Adachi, Koike, & Takayanagi, 1996). Estos receptores están presentes en músculo liso bronquial y glándulas submucosas (Escribano-Gimeno, Ruiz-Cobos, & Alonso-Viteri, 2013), por lo que los alcaloides encontrados en este trabajo podrían tener una actividad biológica relacionada a la actividad reportada de *M. mexicana* en musculo liso de tráquea de rata (Sánchez-Recillas *et al.*, 2014).

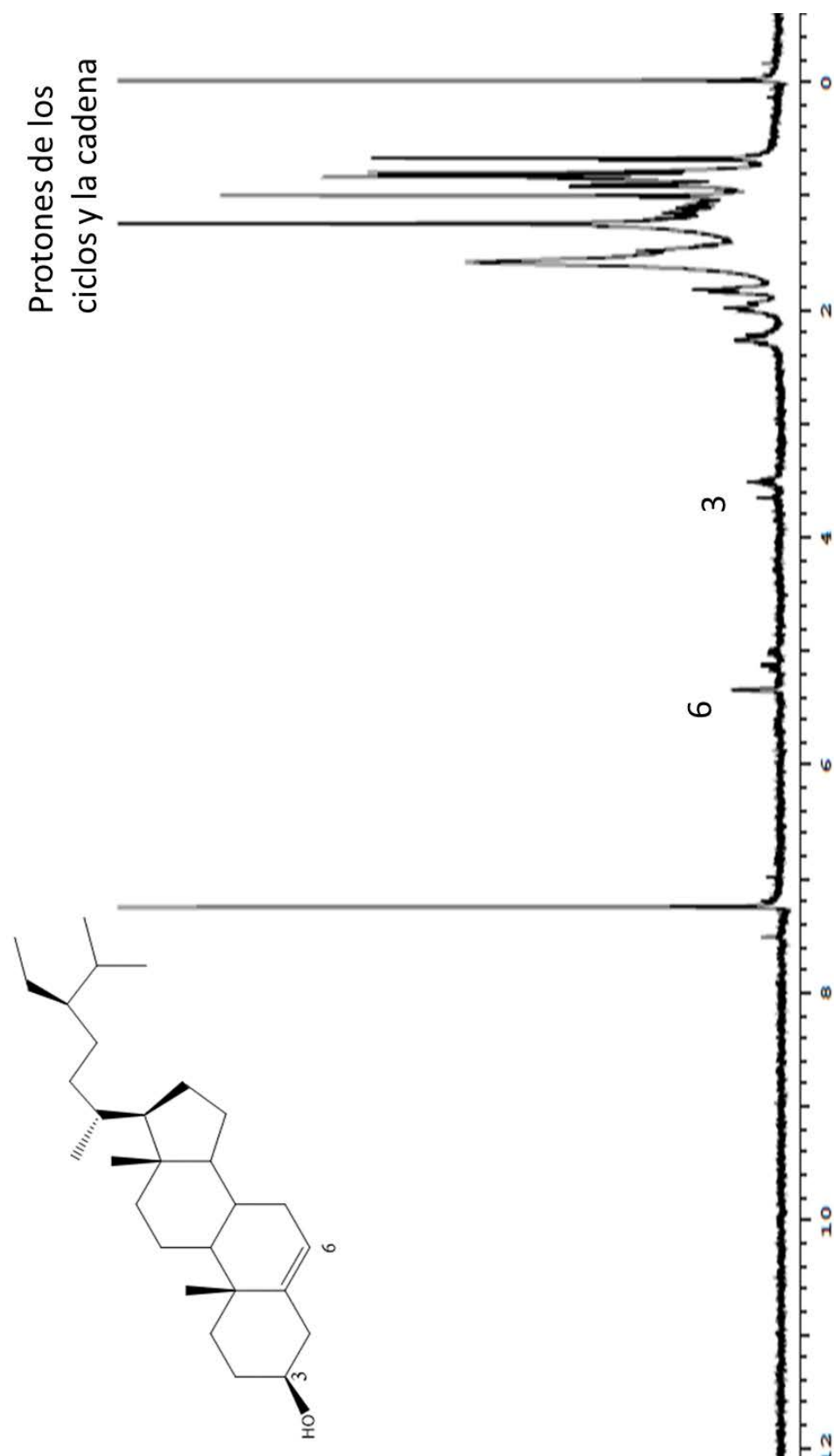


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 400 MHz) de β -Sitosterol en CDCl_3

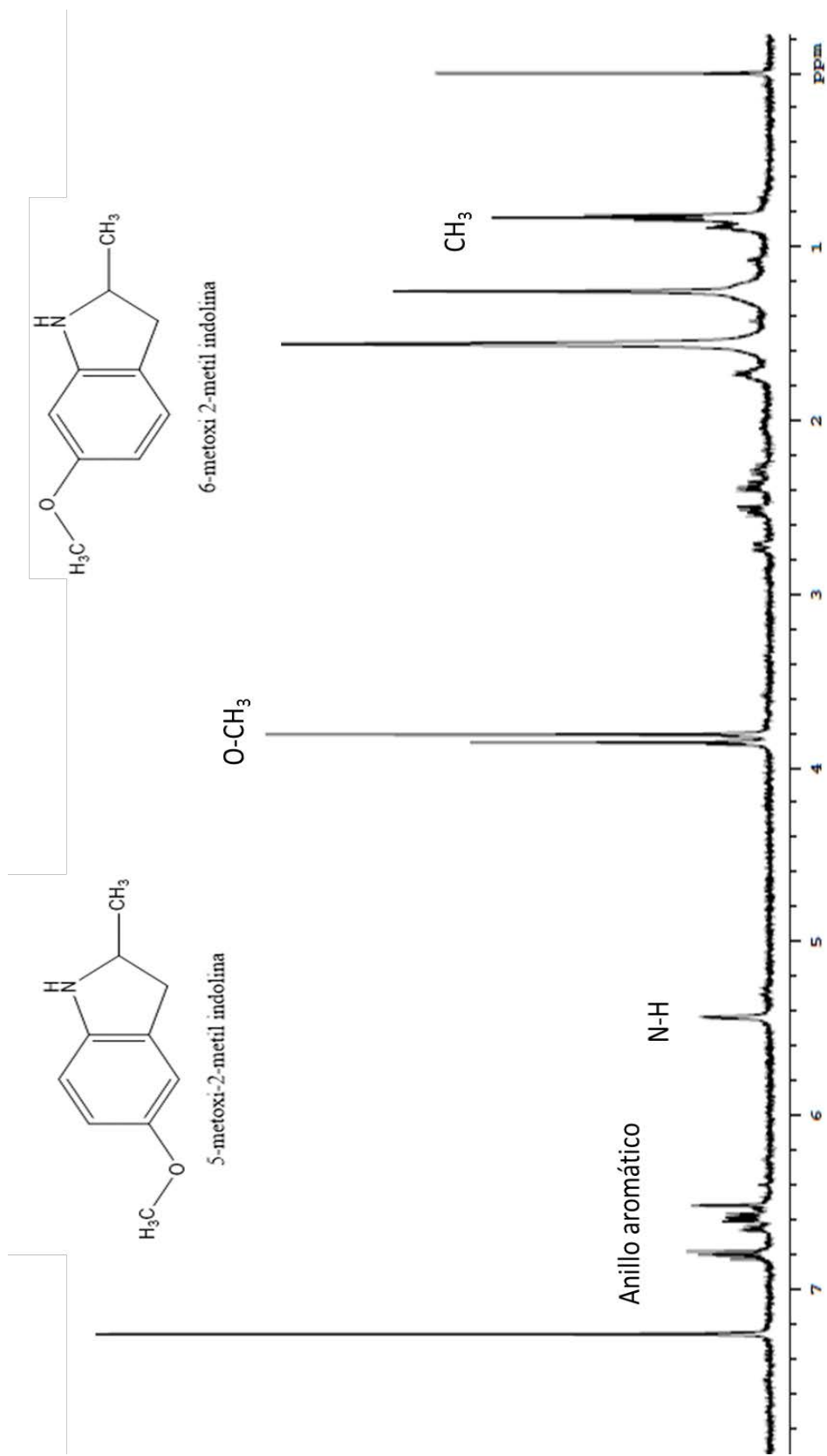


Figura 14. Espectro ^1H -RMN (CDCl_3 400 MHz) de la mezcla de alcaloides obtenidos del extracto de *M. mexicana*.

5.5.3. Propiedades antioxidantes de *M. mexicana*

En el Cuadro 12 se muestran los resultados del contenido de fenoles y flavonoides totales, así como las propiedades antioxidantes de los extractos polares de las hojas y flores de *M. mexicana*. Se observa que existe una diferencia significativa entre estos valores, las flores contienen más del doble de compuestos fenólicos que las hojas. El porcentaje de flavonoides en comparación al contenido de fenoles es superior en hojas que en flores (56 % de flavonoides en hojas: 45 % en flores). Se sabe que a mayor cantidad de compuestos fenólicos la actividad antioxidante aumenta (Bors *et al.*, 1990) y los ensayos realizados en este trabajo siguen la misma tendencia. Estos resultados son comparables con los obtenidos en otras especies de magnolias; por ejemplo, en *Magnolia liliflora* Desr. en un extracto de polaridad intermedia de acetato de etilo se encontraron 96.13 mg EAG g_{bs}⁻¹ de fenoles totales (Bajpai, Yoon, & Kang, 2009); mientras que en extractos metanólicos de flores de *Magnolia denudata* y *Magnolia denudata* Var. *purpurascens* la cantidad de fenoles totales encontrada fue de 85.80 ± 0.64 y 80.96 ± 0.63 EAG g_{bs}⁻¹ respectivamente (Jo, Seo, Yuk, & Lee, 2012). Extractos obtenidos de otras partes de las plantas de magnolia han mostrado bajos niveles de capacidad antioxidante; tal es el caso del extracto etanólico (60 % v/v) de córtex *Magnolia officinalis* que presentó 24.34 ± 0.44 mg EAG g_{bs}⁻¹ (He, Lan, Lu, Zhao, & Yuan, 2013) y para glicenecoles de *M. gradiflora* 0.2890 ± 0.022 mg EAG g_{bs}⁻¹ (Sokkar, Rabeh, Ghazal, & Slem, 2014). En el caso de flavonoides se ha reportado para *M. denudata* 0.574 mg de equivalentes de catequina por gramo de muestra fresca (Youwei, Jinlian, & Yonghong, 2008).

Cuadro 12. Fenoles totales, flavonoides totales y capacidad antioxidante de hojas y flores de *M. mexicana*.

	DPPH (μmol ET g _{bs} ⁻¹)	ABTS (μmol ET g _{bs} ⁻¹)	Fenoles (mg EAG g _{bs} ⁻¹)	Flavonoides (mgEC g _{bs} ⁻¹)
Hojas	75.7±13.6 a	70.7±16.7 a	32.4±2.5 a	18.2±1.1 a
Flores	511.1±53.1 b	505.6±145.2 b	111.7±13.7 b	50.9±1.4 b

Valores con diferente letra dentro de columnas son estadísticamente diferentes con prueba de Tukey (p ≤ 0.05) ± desviación estándar.

Para los estudios de propiedades antioxidantes se utilizaron dos pruebas la del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH·) y el catión del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzitiiazolina-6-sulfónico (ABTS·), los resultados son estadísticamente iguales para las técnicas en hojas y flores mostrando concordancia entre estas, concluyendo que las flores tienen más propiedades antioxidantes en comparación con las hojas de *M. mexicana* (Figura 15).

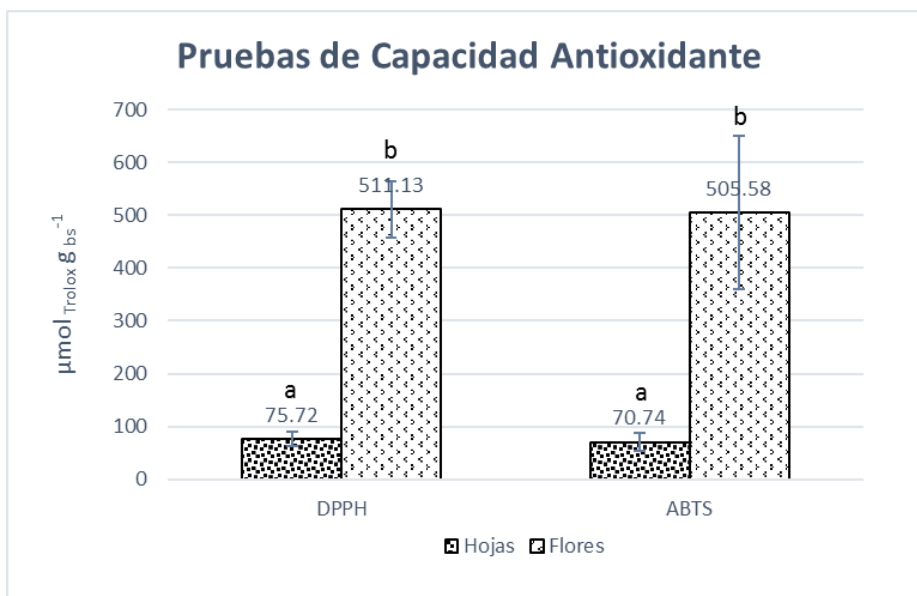


Figura 15. Pruebas DPPH y ABTS para extractos polares de hojas y flores de *M. mexicana*. Las columnas con las mismas letras son estadísticamente iguales con la prueba Tukey ($P \leq 0.05$).

El contenido de fenoles totales correlaciona con las propiedades antioxidantes medidas por las pruebas DPPH y ABTS. Los fenoles son compuestos con elevada actividad antioxidante así que un alto contenido de fenoles es proporcional a la respuesta antioxidante medida por el DPPH y el ABTS. Pocos análisis existen sobre los compuestos fenólicos presentes en flores y hojas de *M. mexicana*, se ha encontrado quercetina en flores y corteza (Waizel, 2002). Otros compuestos con conocida capacidad antioxidante son los alcaloides, se han relacionado capacidad antioxidante a derivados de indol e indolina con variados sustituyentes (Brown, Graupner, Sainsbury, & Shertzer, 1991; Estevão *et al.*, 2010).

En el caso del DPPH además se calculó la capacidad del extracto para inhibir 50 % de radical DPPH, conocido como concentración inhibitoria 50 (CI₅₀, Figura 16), el extracto de flores tuvo menor valor de CI₅₀ que el de hojas. Cuando un extracto tiene mayor capacidad antioxidante se requiere una menor cantidad para inhibir 50 % de radicales DPPH. Los estudios practicados para las especies de *Magnolia denudata* y *Magnolia denudata* var. *purpurascens* reportan un CI₅₀ de 262.05±3.10 y 246.99±2.09 µg ml⁻¹ respectivamente (Jo *et al.*, 2012); en el caso de diferentes extractos de *M. liliflora* los valores CI₅₀ oscilaron entre 10.11–178.10 µg ml⁻¹ con el mayor valor para el extracto de acetato de etilo (Bajpai *et al.*, 2009). Por lo que existe concordancia entre los valores obtenidos en este estudio y los reportados por la literatura.

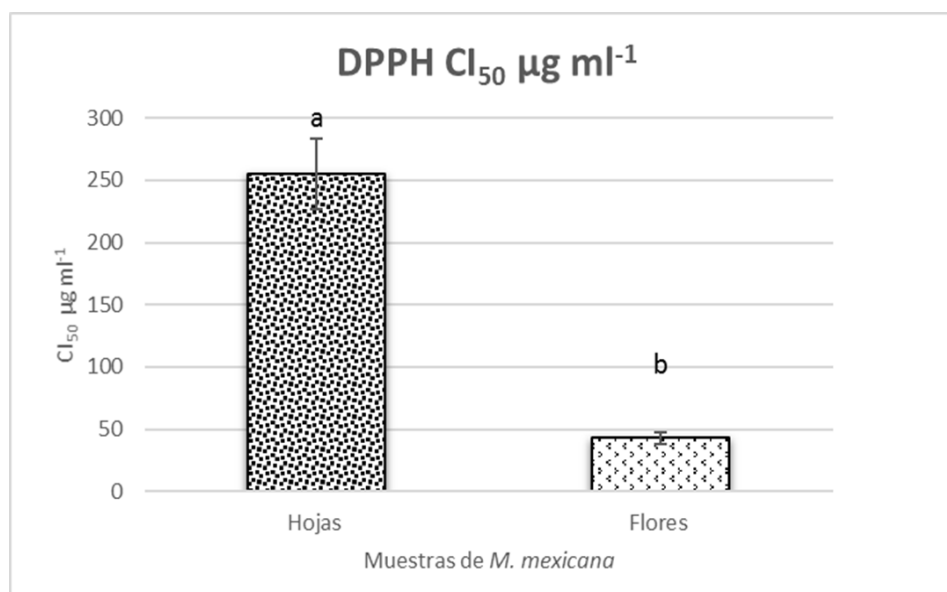


Figura 16. CI₅₀ en la prueba de DPPH de extractos polares obtenidos de hojas y flores de *M. mexicana*. Prueba t para muestras independientes (P≤0. 05).

Los resultados obtenidos de las propiedades antioxidantes de *M. mexicana* se acercan a otras especies de gran importancia por sus propiedades medicinales, por ejemplo, el té verde (*Camellia sinensis* Linn) que contiene 165 mg EAG g_{bs}⁻¹ y 47 mg EC g_{bs}⁻¹ de fenoles y flavonoides totales respectivamente; el té negro se reporta 124 mg EAG g_{bs}⁻¹ y 34 mg EC g_{bs}⁻¹ (Lee, Kim, Lee, & Lee, 2003). La CI₅₀ de DPPH del extracto metanólico del té verde (6.7 ± 0.1 µg ml⁻¹) la sitúan muy

por encima de la encontrada en los extractos de flores de *M. mexicana* ($42.91 \pm 4.47 \mu\text{g ml}^{-1}$); sin embargo, la capacidad antioxidante de magnolia estuvo a la par de la reportada para el extracto metanólico de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) con $65.1 \pm 1.7 \mu\text{g ml}^{-1}$, y superior al de la pimienta negra (*Piper nigrum* Linn) con $144.1 \pm 2.2 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Khalaf, Shakya, Al-Othman, El-Agbar, & Farah, 2008).

5.6. Conclusión

El extracto metanólico de las hojas de *M. mexicana* contiene β -sitosterol mientras que una extracción ácido- base del extracto metanolico de flores aisló los alcaloides 6-metoxi-2-metil indolina y 5-metoxi-2-metil indolina, los cuales no habían sido reportados anteriormente en esta especie. Las flores de *M. mexicana* presentaron propiedades antioxidantes superiores a las hojas de la misma especie, los resultados de la capacidad antioxidante son concordantes con los reportados para otras especies del genero *Magnolia* y son cercanos a los encontrados para otras plantas consumidas como fuentes de antioxidantes.

5.7. Agradecimientos

A la Dra. Diana Guerra Ramírez por su asesoría y observaciones para la realización de este trabajo. Al Dr. Benito Reyes Trejo por la interpretación de los espectros de RMN. Al Sr. Elías Nicolás Galindo y familia por su ayuda para la obtención del material vegetal.

5.8. Referencias

- Adachi, S., Koike, K., & Takayanagi, I. (1996). Pharmacological Characteristics of Indoline Derivatives in Muscarinic Receptor Subtypes. *Pharmacology*, 53(4), 250–258. <https://doi.org/10.1159/000139437>
- Bajpai, V. K., Yoon, J. I., & Kang, S. C. (2009). Antioxidant and antidermatophytic activities of essential oil and extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10), 2606-2612. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.07.025>
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. En B.-M. in *Enzymology*

- (Ed.) (Vol. 186, pp. 343-355). Academic Press. Recuperado a partir de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687990861281>
- Brown, D. W., Graupner, P. R., Sainsbury, M., & Shertzer, H. G. (1991). New antioxidants incorporating indole and indoline chromophores. *Tetrahedron*, 47(25), 4383–4408. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)87108-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)87108-8)
- Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006). High-Throughput Relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7429-7436. <https://doi.org/10.1021/jf0611668>
- Collera, A., Walls, F., Garcia, F., Flores, S. E., & Herrán, J. (1963). *Estudio de las cortezas de Talauma mexicana Don. y Magnolia shedeana (Magnoliaceae)*. Boletín del Instituto de Química Universidad Autónoma de Mexico. 15, 38-40. Recuperado a partir de https://uniquim.iquimica.unam.mx/boletin_electronico/15.html
- Corrales, L. C., & Muñoz-Ariza, M. M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*. 10(18), 213-225.
- De Micheli-Serra, A. A., & Izaguirre-Ávila, R. (2014). On new Spain and Mexican medicinal botany in cardiology. *Revista De Investigación Clínica*, 66(2), 194-199
- Dixon, R., & Paiva, N. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, 7(7), 1085-1097.
- Escribano-Gimeno, I., Ruiz-Cobos, M. A., & Alonso-Viteri, S. (2013). Papel de los anticolinérgicos en la enfermedad asmática. *Revista de Patología Respiratoria*, 16(1), 14–20.
- Estevão, M. S., Carvalho, L. C., Ribeiro, D., Couto, D., Freitas, M., Gomes, A., ... Marques, M. M. B. (2010). Antioxidant activity of unexplored indole derivatives: Synthesis and screening. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(11), 4869–4878. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.07.059>
- He, Z., Lan, M., Lu, D., Zhao, H., & Yuan, H. (2013). Antioxidant activity of 50 traditional Chinese medicinal materials varies with total phenolics. *Chinese Medicine*, 04(04), 148-156. <https://doi.org/10.4236/cm.2013.44018>
- Hernández C. M. (1980). Flora de Veracruz Magnoliaceae [México]. Instituto Nacional de Investigadores sobre Recursos Bióticos, (14), 17.
- Huang, W.-Y., Cai, Y.-Z., & Zhang, Y. (2010). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 62(1), 1-20. <https://doi.org/10.1080/01635580903191585>
- Human Metabolome Database: 1H NMR Spectrum (HMDB00852). (s. f.). Recuperado 28 de diciembre de 2016, a partir de http://www.hmdb.ca/spectra/nmr_one_d/1568

- Jo, Y.-H., Seo, G.-U., Yuk, H.-G., & Lee, S.-C. (2012). Antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of methanol extracts from *Magnolia denudata* and *Magnolia denudata* var. *purpurascens* flowers. *Food Research International*, 47(2), 197-200. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.032>
- Kametani, T., Terasawa, H., Ihara, M., & Iriarte, J. (1975). Liriodenine from *Talauma mexicana*. *Phytochemistry*, 14(8), 1884-1885. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85326-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85326-X)
- Khalaf, N. A., Shakya, A. K., Al-Othman, A., El-Agbar, Z., & Farah, H. (2008). Antioxidant activity of some common plants. *Turkish Journal of Biology*, 32(1), 51-55.
- Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry*, 127(3), 1138-1145. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.115>
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7292-7295. <https://doi.org/10.1021/jf0344385>
- Maldoni, B. (1991). Alkaloids: Isolation and purification. *Journal of Chemical Education*, 68(8), 700. <https://doi.org/10.1021/ed068p700>
- Oliveira-Miranda, M. A., Velázquez, D., & Bermúdez, A. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 30(8), 453-459.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reed, T. T. (2011). Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 51(7): 1302-1319 <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.027>
- Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free Radical Biology & Medicine*, 49(11), 1603-1616 <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>

- Sánchez-Recillas, A., Mantecón-Reyes, P., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., & Estrada-Soto, S. (2014). Tracheal relaxation of five medicinal plants used in Mexico for the treatment of several diseases. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(3), 179-183. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60017-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60017-1)
- Sepúlveda, J. G., Porta-Ducoing, H., & Rocha, S. M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 355-363.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sokkar, N. M., Rabeh, M. A., Ghazal, G., & Slem, A. M. (2014). Determination of flavonoids in stamen, gynoecium, and petals of *Magnolia grandiflora* L. and their associated antioxidant and hepatoprotection activities. *Química Nova*, 37(4), 667-671. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140106>
- Sugamura, K., & Keaney, J. F. (2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 51(5), 978-992 <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.004>
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Bastos, M. L. (2002). Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4989–4993
- Venereo-Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133.
- Waizel, B. J. (2002). Uso tradicional e investigación científica de *Talauma mexicana* (D.C.) Don., o flor del corazón. *Revista Mexicana de Cardiología*, 13(1), 31–38.
- Youwei, Z., Jinlian, Z., & Yonghong, P. (2008). A comparative study on the free radical scavenging activities of some fresh flowers in southern China. *LWT - Food Science and Technology*, 41(9), 1586-1591. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.10.010>

6. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Magnolia mexicana* DC., EN COLECTAS DEL ESTADO DE PUEBLA, MÉXICO

CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OIL OF *Magnolia mexicana* FROM DIFFERENT REGIONS IN PUEBLA, MEXICO

6.1. Resumen

Los aceites esenciales son sustancias con importantes funciones ecológicas responsables del aroma de las plantas. El aceite esencial de tres colectas de *Magnolia mexicana* DC. (Magnoliaceae) fue analizado por GC-MS. Los principales compuestos encontrados fueron diferentes para cada muestra. Los compuestos elixeno y germacreno están presentes en todas las colectas y se encuentran dentro de los cinco compuestos más abundantes. Solo 45.5 % de los compuestos son iguales en todas las colectas. Las extracciones de material liofilizado y congelado fueron analizadas, encontrándose que solo 50 % y 68 % respectivamente de los compuestos encontrados corresponden al del material analizado en fresco.

Palabras clave: GC-MS, hidrodestilación, yolo-xóchitl

Tesis Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Jessica Miriam Medrano Hernández
Director de Tesis: Dr. José Luis Rodríguez de la O

6.2. Abstract

Essential oils are substances responsible of plants fragrance, they have important ecological functions. The essential oil of three accessions of *Magnolia mexicana*. (Magnoliaceae) was analyzed by GC-MS. The main compounds found were different for each region. Elixene and germacrene are most abundant compounds they are present within in all locations. Only 45.5 % compounds are found in all collections. The lyophilized and frozen extractions were analyzed, we found only 50 % and 68% of the compounds found in freshly analyzed material.

Keywords: GC-MS, hydrodistillation, yoloxochitl

Thesis Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Jessica Miriam Medrano Hernández
Advisor: Dr. José Luis Rodríguez de la O

6.3. Introducción

Los árboles de *Magnolia mexicana* DC. (Magnoliaceae) miden entre 3-20 m de altura y se distribuyen en la vertiente del golfo de México desde el norte de Puebla y Veracruz hasta el norte de Chiapas (Hernández, 1980). Es silvestre y en su área de distribución la población local los tolera y/o fomenta como especie útil para sombra del café y planta de ornato en patios, parques y jardines por la belleza de sus aromáticas flores de color blanco (Palacios, 2006). Se encuentran numerosas referencias del empleo de yoloxóchitl en la medicina popular se dice que los aztecas empleaban el cocimiento de la flor para “corregir el vientre, reconfortar al corazón y combatir la esterilidad” (Hernández, 1980). Los reportes la catalogan como antiparasitaria, astringente, antidiarreico, contra la esterilidad femenina, para el control de los desórdenes o enfermedades cardíacas, control de enfermedades de los sistemas nervioso y cardiovascular (Waizel, 2002).

Los aceites esenciales son sustancias responsables del aroma de muchas plantas, tienen importantes funciones ecológicas como atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas y polen, protección contra herbívoros y alelopatía (Marín-Loaiza & Céspedes, 2007). Son mezclas complejas de hidrocarburos terpénicos o terpenos y sus derivados hidrogenados. En numerosos estudios se ha confirmado la actividad biológica que los aceites esenciales pueden tener, entre las más comunes son los efectos como antimicrobianos, antifúngicos y antivirales (Stashenko, 2009). En varias especies del género *Magnolia* como *M. grandiflora* y *M. virginiana* (Farag & Al-Mahdy, 2013), *M. liliflora* (Fujita, 1989), *M. biondii* (Qu, Qi, Fan, & Wu, 2009), *M. officinalis* (Luo, Sun, Zhang, & Jiang, 2012), *M. kobus* (Azuma, Toyota, & Asakawa, 2001), *M. salicifolia* (Azuma *et al.*, 1997) ya ha sido reportada la composición química de sus aceites esenciales.

La composición y proporción de los componentes de un aceite esencial pueden cambiar dependiendo de factores como el lugar de la colecta (Chamorro, Ballerini, Sequeira, Velasco, & Zalazar, 2008), las condiciones climáticas y nutricionales (Okoh, Sadimenko, & Afolayan, 2007), vegetación relacionada (Gil

et al., 2002; Zygadlo *et al.*, 1993), los procedimientos empleados para la extracción y análisis (Zhao, Zhou, Fan, Chai, & Wu, 2007) e incluso la presencia de diferentes quimiotipos en la misma especie (Gil, Ghera, & Leicach, 2000).

La presente investigación tuvo como finalidad extraer el aceite esencial e identificar sus componentes en GC-MS de tres colectas de *M. mexicana* en el Estado de Puebla, México.

6.4. Materiales y métodos

6.4.1. Material vegetal

Para este estudio se emplearon pétalos de flores frescas de *M. mexicana* que fueron colectadas en mayo del 2015 de árboles silvestres en tres localidades de Estado de Puebla, México ubicadas: Huitzilan de Sedán 19°57'54.72"N-97°41'38.31"O; Jonotla 20° 1'48.79"N- 97°34'30.13"O; Ecatlán 20° 3'15.34"N-97°33'22.82"O. El material fue identificado por el biólogo Antonio Cortés Jiménez y se depositó un ejemplar con Número 31613 en el Herbario JES del Área de Biología de la Universidad Autónoma Chapingo.

6.4.2. Extracción y análisis de aceites esenciales

Los aceites esenciales se extrajeron por hidrodestilación. Los pétalos frescos (200 g) se colocaron en un matraz bola de fondo plano y se adaptó el equipo Clevenger. La destilación se mantuvo durante dos horas, posteriormente el aceite fue colectado y secado con sulfato de anhidro y mantenido en una atmosfera de argón y refrigerado hasta su análisis por GC-MS. El material de *M. mexicana* es susceptible a la pudrición y ataque por hongos por lo que el material sobrante se congeló o liofilizó como métodos de conservación y posteriormente fue recuperado y procesado por hidrodestilación. El aceite esencial de pétalos de *M. mexicana* se comparó entre extracciones de material congelado y liofilizado y de un aceite que se extrajo de material fresco pero que se conservó en refrigeración hasta el análisis (6 meses). Una vez extraído los

aceites esenciales fueron filtrados, secados con argón y guardados en refrigeración hasta su análisis.

6.4.3. Separación cromatográfica

La separación y análisis de los componentes de los aceites esenciales se llevó a cabo en un equipo de GC-MS Agilent Tecnologist 6890 Series GC, acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies 240 GC-MS. Los parámetros operacionales del cromatógrafo de gases fueron los siguientes: Puerto de inyección: Split (relación Split 50:1). Se utilizó una columna capilar (30 m de largo x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 μ m de diámetro externo) VF-5ms (Agilent Tecnologist®). La temperatura del horno se programó desde 50 °C (3 min), 10 °C/min, hasta 100 °C, luego 3 °C/min hasta 170 °C y finalmente 15°C/min hasta 270 en esta temperatura se dejó 2 min. La temperatura del puerto de inyección fue de 250 °C, trampa 150 °C y línea de transferencia 250 °C. El gas de arrastre (He) con presión de entrada a la columna 7,909 psi con velocidad lineal de flujo de He 1 mL/min. Detector de masas de impacto electrónico (EI) con 70 eV y rango de escaneo de la masa 50 a la 350 m/z. El aceite esencial se diluyó en hexano grado HPLC (20 μ L en 1 ml) y se inyectó un volumen de 1 μ L, las inyecciones se llevaron a cabo por triplicado. Los n-alcanos C₇- C₃₀ (Sigma®) se usaron como referencias en el cálculo de los índices de retención.

6.4.4. Análisis de los datos

La identificación de los componentes se basó en sus similitudes con los espectros de masas con respecto a los compuestos estándar registrados en las bibliotecas espectrales NIST (National Institute for Standards and Technology, USA) del GC-MS y confirmadas por sus índices de retención (I_R) con respecto a los de los compuestos estándar reportados por NIST. Para el cálculo del índice de retención (I_R) se utilizó la ecuación para índices de retención lineales de Kovats usada para métodos con programación de rampas de temperatura en el GC-MS, la ecuación es la siguiente:

$$IR = 100n + 100 \frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}}$$

Donde:

N: número de átomos de carbono del n-alcano que eluye antes del compuesto de interés.

t_{Rx} : tiempo de retención de analito de interés

t_{Rn} y t_{RN} : son los tiempos de retención de los n alcanos con los números de átomos de carbono n y N respectivamente que eluyen inmediatamente antes y después del analito de interés (Stashenko, & Martínez, 2010).

6.5. Resultados y discusión

En el Cuadro 13 se muestran los rendimientos obtenidos para los aceites esenciales de cada colecta. El mejor rendimiento obtenido fue de 0.05 % de la localidad de Huitzilan, considerando los reportes que indican rendimientos hasta 2.4 % en *M. biombi* (Qu *et al.*, 2009), y 5.9 % en *M. liliflora* (Zhenhong, 2011) pero de 0.004 % para *M. grandiflora* y 0.001 % en *M. virginiana* (Farag & Al-Mahdy, 2013), encontramos una enorme variabilidad en la cantidad de aceite esencial dentro del mismo género.

Cuadro 13. Peso promedio y porcentaje obtenido de la extracción de aceites esenciales.

Lugar de colecta	Peso (mg)	Porcentaje (%)
Ecatlán	27.8±0.01	0.02
Jonotla	27.9±0.01	0.02
Huitzilan	67.7±0.04	0.05

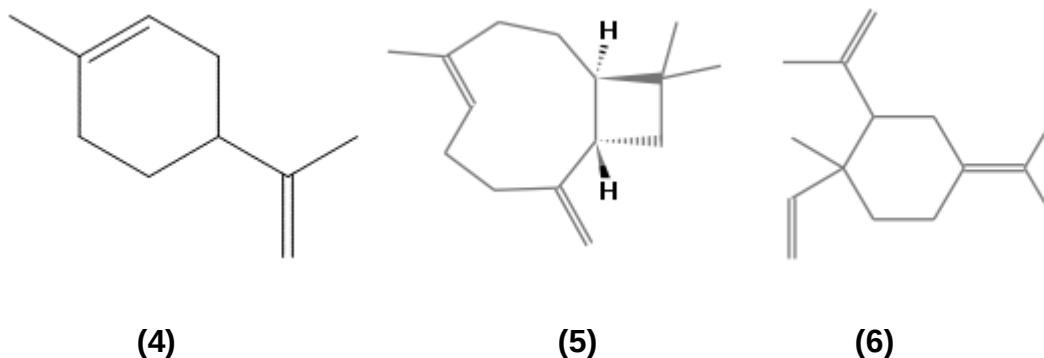
*Se realizaron tres extracciones por localidad

En el Cuadro 14 se muestran la composición química de los aceites esenciales de cada una de las accesiones de *M. mexicana*. En total se identificaron 23 compuestos, el aceite esencial de la colecta de Huitzilan presento mayor contenido de compuestos (21), comparado con los de Jonotla (15) y Ecatlán (18).

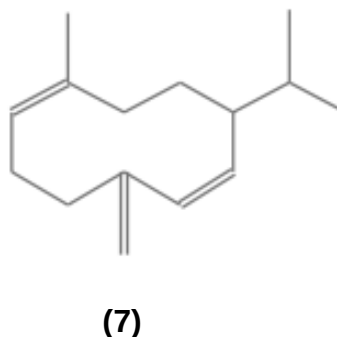
Cuadro 14. Compuestos obtenidos por GC-MS para tres localidades de Puebla, México.

N. °	I _R	Nombre	PM	% PORCENTAJE		
				Jonotla	Ecatlan	Huitzilan
1	938	camfeno	136.2	-	1	1.2
2	983	sabineno	136.2	-	0.6	4.8
3	1031	limoneno	136.2	-	1.9	33.7
4	1101	linalool	154.3	-	-	0.8
5	1337	elemeno	204.4	5.1	1.6	1.1
6	1349	cubebeno	204.4	-	2.6	4.4
7	1392	β-elemeno	204.4	23	8.1	-
8	1415	α-bergamoteno	204.4	0.5	0.9	0.5
9	1424	cariofileno	204.4	5	37	5.8
10	1432	γ-elemeno	204.4	0.7	2.9	1.7
11	1438	α-guajeno	204.4	0.7	-	1
12	1453	β-farneseno	204.4	0.59	0.5	0.6
13	1459	α-humuleno	204.4	2.7	-	2
14	1484	germacreno	204.4	7.4	9.7	20.9
15	1499	elixeno	204.4	27.9	22	4.8
16	1505	δ-guaieno	204.4	10.9	-	-
17	1521	δ-cadineno	204.4	1.3	0.9	1.6
18	1525	β-sesquifelandreno	204.4	2.6	1.1	1.6
19	1542	α-bisaboleno	204.4	5.4	2.1	1.2
20	1550	elemol	222.4	-	-	1.8
21	1687	α-bisabolol	222.4	-	0.8	5.3
22	1747	farnesal	220.4	-	0.8	0.9
23	1928	palmitato de metilo	270.4	2.5	0.8	0.5
		No. compuestos		15	18	22
		Monoterpenos hidrocarbonados			16.7	18.2
		Monoterpenos oxigenados				4.5
		Sesquiterpenos hidrocarbonados		93.3	66.7	59.1
		Sesquiterpenos oxigenados			11.1	13.6
		Hidrocarburos		6.67	5.6	4.5

El compuesto mayoritario fue diferente para cada localidad encontrándose limoneno **(4)** en Huitzilan, el cariofileno **(5)** en Ecatlan y elixeno **(6)** en Jonotla.



Dentro de los cinco compuestos mayoritarios los que se encuentran en las tres muestras son; germacreno **(7)** y elixeno (Cuadro 15). Un total de diez compuestos en común son encontrados en todas las accesiones, pero en diferentes porcentajes, estos compuestos son: α -cubebeno, cariofileno, γ -elemeno, α -guajeno, α -humuleno, elixene, δ -guaieno, β -sesquifelandreno, trans- α -bisaboleno y elemol.



Los constituyentes de mayor porcentaje en todas las colectas son sesquiterpenos hidrocarbonados seguido de los monoterpenos hidrocarbonados. Estudios previos de la composición de aceites esenciales en flores en el género *magnolia* indican la presencia de estos grupos (Azuma *et al.*, 1997). Las diferencias en la proporción de los componentes de un aceite esencial pueden ser debidas a la interacción entre las poblaciones silvestres y su ambiente, edad y fenología del árbol, tal y como se ha documentado para otras especies (Putievsky *et al.*, 1992; Sartorelli, Marquioreto, Amaral-Baroli, Lima, & Moreno, 2007).

Cuadro 15. Porcentaje de los compuestos mayoritarios de cada una de las accesiones de *M. mexicana*.

	Jonotla	%	Ecatlan	%	Huitzilan	%
1	elixeno	27.9	cariofileno	37	limoneno	33.7
2	β -elemeno	23	elixeno	22	germacreno	20.9
3	δ -guaieno	10.9	germacreno	9.7	cariofileno	5.8
4	germacreno	7.4	β -elemeno	8.1	α -bisabolol	5.3
5	α -bisabolenol	5.4	γ -elemeno	2.9	elixeno	4.8

En el Cuadro 16, se muestran el porcentaje y composición química de los aceites aislados de las flores que fueron congeladas y liofilizadas antes de la extracción y de un aceite esencial guardado en refrigeración. Se puede notar que congelar el material para luego extraerlo no conserva el aceite esencial de *M. mexicana* al solo contener 11 compuestos de los 21 encontrados en aceite esencial extraído de flores frescas. Quince compuestos fueron encontrados en el análisis de material vegetal liofilizado. Por lo tanto, es recomendable extraer el aceite de material fresco y guardarlo en refrigeración hasta su análisis para tener resultados cualitativos más confiables, la cantidad de aceite esencial se ve afectado por el método de conservación.

Los compuestos presentes en los aceites esenciales pueden tener propiedades benéficas. Los aceites esenciales están constituidos principalmente por terpenoides quienes tienen una alta solubilidad en las membranas plasmáticas de bacterias, hongos o animales (Knobloch, Pauli, Iberl, Weigand, & Weis, 1989). Los aceites esenciales aislados en algunas especies del género *Magnolia* han probado actividad biológica tal es el caso de *Magnolia grandiflora* y *M. virginianase* tuvieron buenos resultados para inhibir la reproducción de células de cáncer de pulmón *in vitro* y solo el aceite de *M. virginianase* con moderada actividad antioxidante medida con DPPH (Farag & Al-Mahdy, 2013), otros aceites esenciales en *M. liliflora* probaron resultados satisfactorios para pruebas contra hongos fitopatogenos *in vitro* (Bajpai & Kang, 2012).

Cuadro 16. Resultados del análisis de aceite esencial refrigerado y extraído después de congelar o liofilizar pétalos de *M. mexicana*

N.º	I _R	Nombre	% PORCENTAJE		
			Pétalos congelados	Pétalos liofilizados	Aceite esencial refrigerado
1	938	camfeno	1.4	2.8	1.1
2	983	sabineno	6.2	12.3	5.5
3	1031	limoneno	51.6	53.5	38.4
4	1101	linalool	-	0.3	-
5	1153	alcanfor	-	0.6	-
6	1349	cubebeno	1.1	1.7	6
7	1392	β-elemeno	-	1.9	6.6
8	1415	bergamoteno	-	-	0.8
9	1424	cariofileno	6.7	6.9	6.9
10	1432	γ-elemeno	-	-	2.6
11	1438	α-guajeno	-	-	1.3
12	1453	β-farnesene	-	-	0.7
13	1459	α-humuleno	2.4	0.2	2.6
14	1484	germacreno	16.7	5.5	7.6
15	1499	elixene,	3.1	0.9	1.8
16	1505	δ-guaieno	-	1.8	1.3
18	1521	δ-cadineno	-	5.4	1.4
19	1525	β-sesquifelandreno	-	1.6	1.9
21	1542	α-bisaboleno	-	-	0.9
22	1550	elemol	-	-	2
23	1687	bisabolol	2.7	-	1.6
24	1747	farnesal	2.5	-	1.8
25	1928	palmitato de metilo	1	-	1
		No. compuestos	11	15	22

6.6. Conclusiones

La composición química del aceite esencial de *M. mexicana* fue diferente para cada una de las accesiones. Los constituyentes comunes a las tres colectas son elixene (23.0 %) y germacreno (28.9 %). El rendimiento obtenido en la extracción de aceite esencial de esta especie osciló entre un 0.02 y 0.05 %. Los tratamientos de conservación del material vegetal antes de ser hidrodestilado inducen una pérdida de los componentes del aceite esencial.

6.7. Agradecimientos

A la Dra. Matilde Villa García por su apoyo logístico en la operación del GC-MS. Al Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, al Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez y a los técnicos académicos M. en C. Everardo Tapia Mendoza, M. en C. Lucía del Carmen Marquéz Alonso y M. en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz del Instituto de Química UNAM, por su asesoría y orientación técnica sobre GC-MS, LC-MS.

6.8. Referencias

- Azuma, H., Toyota, M., & Asakawa, Y. (2001). intraspecific variation of floral scent chemistry in *Magnolia kobus* DC. (Magnoliaceae). *Journal of Plant Research*, 114(4), 411-422. <https://doi.org/10.1007/PL00014006>
- Azuma, H., Toyota, M., Asakawa, Y., Yamaoka, R., Garcia-Franco, J. G., Dieringer, G., Kawano, S. (1997). Chemical divergence in floral scents of magnolia and allied genera (magnoliaceae). *Plant Species Biology*, 12(2-3), 69-83. <https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.1997.tb00159.x>
- Bajpai, V. K., & Kang, S. C. (2012). In Vitro and In Vivo Inhibition of Plant Pathogenic Fungi by Essential Oil and Extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *J. Agr. Sci. Tech*, 14, 845–856. Retrieved from http://jast.modares.ac.ir/article_4856_218fba469da0a3ae592decfddeb617b.pdf
- Chamorro, E. R., Ballerini, G., Sequeira, A. F., Velasco, G. A., & Zalazar, M. F. (2008). Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. *The Journal of Argentine Chemical Society*, 96(1-2), 80-86.
- Farag, M. A., & Al-Mahdy, D. A. (2013). Comparative study of the chemical composition and biological activities of *Magnolia grandiflora* and *Magnolia virginiana* flower essential oils. *Natural Product Research*, 27(12), 1091-1097. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.696256>
- Fujita, S. (1989). Components of the Essential Oil of *Magnolia liliflora* Desr. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(9), 2523-2526. <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869660>
- Gil, A., de la Fuente, E. B., Lenardis, A. E., López Pereira, M., Suárez, S. A., Bandoni, A., Ghersa, C. M. (2002). Coriander Essential Oil Composition from Two Genotypes Grown in Different Environmental Conditions. *Journal*

- of *Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2870-2877.
<https://doi.org/10.1021/jf011128i>
- Gil, A., Ghera, C. M., & Leicach, S. (2000). Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(3), 261-274. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00062-9](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00062-9)
- Hernández, C. M. (1980). Flora de Veracruz. Magnoliaceae [Mexico]. *Instituto Nacional de Investigadores sobre Recursos Bióticos, INIREB*, (14), 80.
- Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., & Weis, N. (1989). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oil Components. *Journal of Essential Oil Research*, 1(3), 119-128.
<https://doi.org/10.1080/10412905.1989.9697767>
- Luo, M., Sun, J., Zhang, B., & Jiang, L. (2012). Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from *Magnolia grandiflora* L. seed. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, 17(3), 249-254.
<https://doi.org/10.1007/s11859-012-0837-0>
- Marín-Loaiza, J. C., & Céspedes, C. L. (2007). Compuestos volátiles de plantas. origen, emisión, efectos, análisis y aplicaciones al agro. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30(4), 327-351 Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61030401>
- Okoh, O.O., Sadimenko, A.A., & Afolayan, A.J. (2007). The Effects of Age on the Yield and Composition of the Essential Oils of *Calendula officinalis*. *Journal of Applied Sciences*, 7(23), 3806-3810.
<https://doi.org/10.3923/jas.2007.3806.3810>
- Palacios, E. (2006). *Ficha técnica de Magnolia mexicana. Cuarenta y ocho especies de la flora de Chiapas incluidas en el PROY-NOM-059-ECOL-2000*. México. D.F: Instituto de Historia Natural y Ecología. (p. 6) Recuperado a partir de <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichasnom/Talaumamexicana00.pdf>
- Putievsky, E., Ravid, U., Dudai, N., Katzir, I., Carmeli, D., & Eshel, A. (1992). Variations in the essential oil of *Artemisia judaica* L. Chemotypes related to phenological and environmental factors. *Flavour and Fragrance Journal*, 7(5), 253-257. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730070504>
- Qu, L., Qi, Y., Fan, G., & Wu, Y. (2009). Determination of the volatile oil of *magnolia biondii* pamp by Gc–Ms combined with chemometric techniques. *Chromatographia*, 70(5-6), 905-914. <https://doi.org/10.1365/s10337-009-1211-z>
- Sartorelli, P., Marquiere, A. D., Amaral-Baroli, A., Lima, M. E. L., & Moreno, P. R. H. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of Eucalyptus. *Phytotherapy Research*, 21(3), 231-233. <https://doi.org/10.1002/ptr.2051>

- Stashenko, E., E. (2009). *Aceites esenciales*. Colombia: Universidad Industrial de Santander-CENIVAM. Recuperado a partir de <http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/documentos/libros/1.pdf>
- Stashenko, E., E., & Martínez, J., R. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *SC - Scientia Chromatographica*, 2(1), 29-47.
- Viljoen, A. M., Subramoney, S., Vuuren, S. F. van, Başer, K. H. C., & Demirci, B. (2005). The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2), 271-277. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.017>
- Waizel, B. J. (2002). Uso tradicional e investigación científica de *Talauma mexicana* (D.C.) Don., o flor del corazón. *Revista Mexicana de Cardiología*, 13(1), 31-38.
- Zhao, W., Zhou, T., Fan, G., Chai, Y., & Wu, Y. (2007). Isolation and purification of lignans from *Magnolia biondii* Pamp by isocratic reversed-phase two-dimensional liquid chromatography following microwave-assisted extraction. *Journal of Separation Science*, 30(15), 2370-2381. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700098>
- Zhenhong, L. (2011). Chemical analysis of *Magnolia liliflora* essential oil and its pharmacological function in nursing pregnant women suffering from decubitus ulcer. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(11), 2283-2288.
- Zygadlo, J. A., Abburra, R. E., Maestri, D. M., Guzmán, C. A., Grosso, N. R., & Espinar, L. A. (1993). Essential oil composition of *Tagetes terniflora* H.B.K. and *Tagetes laxa* Cabrera. *Flavour and Fragrance Journal*, 8(5), 273-275. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730080507>

CONCLUSIONES GENERALES

En esta tesis se llevó a cabo la caracterización fitoquímica, molecular, y el establecimiento *in vitro* de *Magnolia mexicana* DC. Los marcadores ISSR demostraron que aún no existe alteración en la estructura genética de *M. mexicana* en las poblaciones analizadas. El cultivo *in vitro* de hojas y embriones de *M. mexicana* consiguió masas callosas con un tratamiento de 2,4 diclorofenoxiacético 1 mg L⁻¹ y bencialaminopurina 0.3 mg L⁻¹, pero no se obtuvieron embriones somáticos. En las flores de *M. mexicana* fue posible identificar por análisis espectroscópicos de RMN de ¹H, los alcaloides isoméricos 5-metoxi-3-metil indolina y 6-metoxi 2-metil indolina aislados por primera vez, aunque su similitud estructural impidió su separación. Las flores de *M. mexicana* presentaron una mayor capacidad antioxidante que las hojas, su potencial antioxidante es equiparable con el de conocidas plantas medicinales. El aceite esencial de las tres colectas de flores de *M. mexicana* tiene como componentes comunes a los terpenos elixeno y germancreno. El trabajo desarrollado aporta nueva información sobre *M. mexicana* y destaca la importancia de esta especie.