



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHAPINGO



DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

TESIS

**CALLOGÉNESIS *in vitro* Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE *Heimia Salicifolia*
(Kunth) Link.**

Que se presenta como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Presenta:

FERNANDO ORDOÑEZ POSADAS

Bajo la dirección de:

DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O



APROBADA



Chapingo, Texcoco, Estado de México, mayo de 2024

CALLOGÉNESIS *in vitro* Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE *Heimia Salicifolia* (Kunth) Link.

Tesis realizada por **Fernando Ordoñez Posadas** bajo la supervisión del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR: _____



Dr. José Luis Rodríguez de la O.

ASESOR: _____



Dra. Ernestina Valadez Moctezuma.

ASESOR: _____



Dr. José Oscar Mascorro Gallardo.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	8
DATOS BIOGRÁFICOS	9
RESUMEN GENERAL	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	12
1.1 Objetivo General	13
1.2 Objetivos específicos.....	13
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	13
2.1 <i>Heimia salicifolia</i> (Kunth) Link.	13
2.2 Usos tradicionales e historia prehispánica	14
2.3 Situación actual de la especie	15
2.4 Cultivo <i>in vitro</i> como herramienta de propagación y análisis vegetal	15
2.5 Los reguladores de crecimiento como alternativas para protocolos de clonación y germinación.....	16
2.6 El cultivo <i>in vitro</i> como herramienta para especies poco estudiadas o en peligro de extinción	18
2.7 Literatura Citada.....	18

3. GERMINACIÓN y DESINFESTACIÓN <i>in vitro</i> DE SINICUICHE (<i>Heimia salicifolia</i> (Kunth) Link.....	21
3.1 Resumen.....	21
3.2 Abstract	21
3.3 Introduucción	22
3.4 Materiales y métodos	23
3.4.1 Material vegetal, colecta y adquisición.....	23
3.4.2 Análisis y selección de material	23
3.4.3 Métodos de desinfección y preparación para siembra	24
3.4.4 Medios de cultivo.....	24
3.4.5 Siembra <i>in vitro</i>	25
3.4.6 Análisis	25
3.5 Resultados y discusión	25
3.5.1 Definición de metodologías de desinfestación	25
3.5.2 Comparación de tratamientos para desinfestación	27
3.6 Conclusiones	32
3.7 Literatura citada.....	33

4. GERMINACIÓN Y DESDIFERENCIACIÓN <i>in vitro</i> DE <i>Heimia salicifolia</i> (Kunth) Link	34
4.1 Resumen.....	34
4.2 Abstract	35
4.3 Introducción	35
4.4 Micropropagación	37
4.4.1 Desdiferenciación o producción de callo.	37
4.5 Materiales y métodos	38
4.5 Desinfestación	39
4.5.1 Evaluación de vitroplantas.....	39
4.5.2 Explantes para Callogenesis	40
4.5.3 Toma de datos y variables	41
4.6 Resultados y Discusión.....	41
4.6.1 Calidad de vitroplantas producidas a partir de semillas silvestres e <i>in vitro</i>.	41
4.6.2 Callogenesis/Desdiferenciación celular	48
4.7 Conclusión	53
4.8 Literatura Citada.....	54
5. ANALÍISIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>Heimia Salicifolia</i> (Kunth) Link PROCEDENTE DE TEJIDOS SILVESTRES.	57

5.1 Resumen.....	57
5.2 Abstract	58
5.3 Introducción	59
5.4 Materiales y Métodos	62
5.4.1 Métodos de extracción	62
5.5 Resultados y discusión	63
5.6 Conclusión	70
5.7 Literatura Citada.....	70

DEDICATORIA

Con todo el esfuerzo y dedicación al apoyo de mi familia que estuvo conmigo pese a tantas complicaciones durante este proceso, a la familia que perdí y que seguramente hubiesen estado conmigo.

Especial agradecimiento a mis asesores que comprendieron y apoyaron en cada asunto que fue posible y que estaba dentro de sus posibilidades.

A Nahomy Avilés García que estuvo fuerte y presente en todo momento incentivándome a seguir adelante pese a todas las situaciones que se suscitaron en este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. José Luis Rodríguez de la O.** por su apoyo y confianza durante ya más de 5 años de conocernos y confiar en este proyecto, que, pese a sus pausas, ha salido a flote gracias al apoyo y consideración.

Al **Dr. Ramón Marcos Soto** por acogerme en su laboratorio y brindarme todo el apoyo mediante equipo e incentivando a la investigación autodidacta, misma que proporciona esta tesis.

Al **Dr. José Óscar Mascorro Gallardo y a la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma** por su apoyo y atención en todo momento.

Agradecimiento especial a los laboratoristas Gisela y Domingo que me apoyaron en todo momento para el uso de la instrumentación, siendo que este tipo de trabajos no son óptimos sin ellos.

Se agradece al CONAHCyT y a la Universidad Autónoma de Chapingo por su apoyo mediante la otorgación de beca y lecciones en todo este periodo de maestría, ya que sin estas instituciones no sería posible el acceso a la investigación de calidad y formación de profesionales.

DATOS BIOGRÁFICOS

Nombre: Fernando Ordoñez Posadas.

Localidad de nacimiento: Cd. Sahagún, Hidalgo.

Fecha de nacimiento: 1 de noviembre de 1997.

CURP: OOPF971101HHGRSR04

Cédula profesional: 12519882



Desarrollo académico:

Licenciatura: Biología experimental por la Universidad Autónoma Metropolitana generación 2016-2019. Estancia profesional realizada en la Universidad Autónoma de Chapingo en el área de fitotecnia, existiendo ya una publicación previa como primer autor en la revista polibotánica

RESUMEN GENERAL

CALLOGÉNESIS *in vitro* Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE *Heimia salicifolia* (Kunth) Link.

Heimia salicifolia es una especie de importancia medicinal prehispánica en la cultura azteca, reivindicándola como una especie con potencial farmacéutico relevante que aún no ha sido elucidado en su totalidad. Cualidades específicas de la planta dificultan su identificación silvestre, requiriendo establecer protocolos *in vitro* para su estudio continuo a gran escala que permita la evaluación de posibles rutas de síntesis específicas acorde al metabolito de interés, entre los que se involucra la micropropagación y desdiferenciación con el objetivo del presente estudio fue el análisis de metabolitos secundarios disponibles en *Heimia salicifolia* que podrían funcionar de herramienta para la elucidación de efectos psicoactivos y farmacológicos. Se colectaron semillas y material vegetal silvestre de San Cristóbal de las Casas, Chiapas para comparar la productividad de plantas a partir de semillas de origen silvestre y de cultivar provenientes de Estados Unidos con la finalidad de comparar procesos de germinación, sobrevivencia y la definición de un protocolo de callogénesis con la finalidad de mantener y proveer de tejidos específicos para análisis del material vegetal. En la etapa de germinación se comparó el origen de las semillas, mientras que la callogénesis fue analizada a partir de concentraciones distintas de BA, KIN, 2ip y ANA, concluyendo que en estas etapas *in vitro* las semillas de cultivar permiten una mejor obtención de material vegetal y la callogénesis óptima es obtenida a partir de 1.5mg/L^{-1} de 2ip, KIN, BAP y 3mg/L^{-1} de ANA en medio MS al 100%. El estudio fitoquímico, define que tanto el uso de hexano como de metanol, permite la cuantificación básica de los metabolitos secundarios, permitiendo la cuantificación de alcaloides, taninos, fenoles y terpenos en porcentajes cercanos al blanco empleado para su detección siendo indiferente el método de separación por maceración o uso de soxhlet.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, citocininas, germinación, micropropagación, fitoquímica, metabolitos secundarios.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo.

Autor: Fernando Ordoñez Posadas

Director de tesis: José Luis Rodríguez de la O.

ABSTRACT

CALLOGÉNESIS *in vitro* Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE *Heimia salicifolia* (Kunth) Link.

Heimia salicifolia is a species of medicinal importance since pre-Hispanic times in the Aztec culture, which vindicates it to this day as a species with relevant pharmaceutical potential that has not yet been fully elucidated. Given qualities of the plant that make its identification in wildlife difficult, it is necessary to establish *in vitro* protocols for its continuous and large-scale study that allows the evaluation of possible synthesis routes that are relevant. The quantification of secondary metabolites beyond alkaloids has not been reported, the objective of the present study being the analysis of other secondary metabolites available in *Heimia salicifolia* that could function as a tool for the elucidation of effects described both in the Aztec tradition and in studies presented in the early 2000s that refer to treatments such as diuretics, analgesics, among others. The collection of seeds and wild plant material from San Cristóbal de las Casas, Chiapas and their purchase were carried out to compare the productivity of plants from wild and cultivated seeds with origin in the United States, with the purpose of establishing the best option for plant germination and maintenance, as well as defining a callogenesis protocol to maintain and provide specific tissues for future analysis of plant material. In the germination stage, only the origin of the seeds was compared, while callogenesis was compared based on the analysis of different concentrations of BA, KIN, 2ip and ANA, defining for these *in vitro* stages that cultivar seeds allow better Obtaining plant material and optimal callogenesis is obtained from 1.5 mg/L-1 of 2ip, KIN, BAP and 3 mg/L-1 of ANA in 100% MS medium, thus obtaining excellent results in the production of vegetable material. Regarding phytochemistry, it is defined that both the use of hexane and methanol allows the basic quantification of secondary metabolites, however, their analysis by HPLC is necessary for a more specific quantification and to evaluate if there are no interfering compounds. in this reading, as well as its coupling to masses in the case of the attempt to elucidate the qualities of the compounds and their relationship with pharmacological properties, being completely regardless the method of extraction between soxhlet and maceration.

Keywords: *In vitro* culture, cytokinins, germination, micropropagation, callogenesis, phytochemistry, secondary metabolites.

Thesis for Master of Science in Agriculture Biotechnology. Universidad Autónoma de Chapingo.

Author: Fernando Ordoñez Posadas

Thesis director: José Luis Rodríguez de la O.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Heimia es un género conformado por siete especies de plantas con flores pertenecientes a la familia *Lythraceae* compuesta por hierbas, arbustos y árboles. Este género forma parte del orden *Myrtales*, que posee una morfología generalizada, careciendo de una sinapomorfía que defina a la familia, dificultando su detección *in situ* (Graham, 1994).

Heimia salicifolia es un arbusto herbáceo perenne de hasta tres metros de altura que posee hojas sésiles, lanceoladas y lineales posicionadas de forma opuesta. Su floración es amarilla con dos centímetros de diámetro, formada por seis pétalos en pares a la porción axilar de la hoja y semillas de 0.5 mm de diámetro; en ambientes óptimos su germinación es producida entre los 10 y 16 meses (Bajaj, 1996).

Su distribución corresponde a sitios altos de México y en menor proporción en zonas de Suramérica, hasta Argentina, se encuentra en veredas de ríos y zonas de alta humedad, produciendo semillas numerosas, lo que indica poca viabilidad de las semillas o baja tasa de sobrevivencia y germinación de forma silvestre (Martínez, 1959).

Pese a la importancia que posee la planta dadas sus cualidades farmacológicas y usos prehispánicos, la planta no ha sido estudiada en su complejidad de metabolitos secundarios, obteniendo sólo en múltiples ocasiones, el análisis de alcaloides como los extractos relevantes de la planta (Dobberstein, 1975; Rumalla, 2008).

Dada la sinapomorfía de la especie, se propone que los modelos de cultivo *in vitro*, tales como la producción de callo/tejido desdiferenciado, pueden representar una herramienta fundamental en el trazado de rutas de síntesis y la elucidación de factores estresores o elicitores vegetales para la producción de estos metabolitos y su caracterización. Además de ello, la comparación entre las

vías de desdiferenciación es de relevancia para el establecimiento de protocolos de clonación y extracción (Rumalla, 2008).

1.1 Objetivo General

Clarificación de metabolitos secundarios que es posible obtener a partir del material silvestre obtenido y a su vez la comparación de producción vegetal a partir de material silvestre y de cultivar, lo que conlleva a la definición de un protocolo eficiente de producción de material vegetal que podría emplearse para la comparación, clasificación y cuantificación de metabolitos secundarios en plantas de origen silvestre y de cultivo *in vitro* a partir del protocolo de producción determinado.

1.2 Objetivos específicos

Comparación de tratamientos *in vitro* para eludir la contaminación del material vegetal, así como la comparación de tratamientos para la germinación, micropropagación y producción de callo dependiente del origen del material vegetal empleado.

Cuantificación y comparación de metabolitos secundarios abordando dos metodologías de extracción (soxhlet y maceración).

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 *Heimia salicifolia* (Kunth) Link.

Esta especie posee sinónimos para el nombre científico de la planta, entre los cuales se encuentran: *Heimia syphilitica* DC.; *Nesaea salicifolia* H.B.K y *Nasaea syphilitica* Steud (Graham. 1994).

Posee distintos nombres comunes dependientes de la zona donde se encuentre el arbusto; algunos de estos nombres son: Abre-o-sol (Brasil); anchinoli, chapuzina, cuauxihuitl (náhuatl), escoba de arrollo, flor de San Francisco, granadillo, huachinol, hierba de la vida, sin embargo, el nombre común más empleado para esta especie a nivel mundial, es sinicuiche (Graham. 1994).

Las otras dos especies que pertenecen al género *Heimia* son casi idénticas en apariencia, lo cual representa una dificultad en su localización de forma silvestre; *Heimia myrtifolia* Cham. Et. Schl. se distribuye en Brasil de forma endémica y *Heimia montana* que se distribuye desde Bolivia hasta Argentina (Malone & Rother, 1994).

En otros países como Paraguay se empleaban hojas de *Heimia salicifolia* como extractos para el tratamiento de heridas causadas por espinas, permitiendo su removimiento y la sanación de la herida (Filipov, 1994).

En regiones de Argentina, se reconoce su empleo en una bebida mediante decocción de sus raíces para el tratamiento de dolores estomacales y baño con la decocción para tratamiento contra sarna (Filipov, 1994).

2.2 Usos tradicionales e historia prehispánica

En el México prehispánico *Heimia salicifolia* era conocida como *Piltinzintecouhxochitl chiyaua*, siendo descrita más tarde como una especie casi imposible de identificar sin floración (Hernández, 2020).

El nombre de la especie se relaciona con el dios azteca del sol naciente, lo que implica su relación con la curación y visiones, implicando el hecho de ser una especie con potencial alucinógeno (Hernández, 2020).

Heimia salicifolia, se empleó para la adoración de la deidad Xochipilli, deidad azteca de la primavera y el deseo, que además fue mencionada en el código de flora azteca Cruz- Badiano (Díaz, 1999).

El uso de esta planta en tiempos prehispánicos consistía en la preparación de brebajes especiales con otras plantas, lo cual le confiere activación o inactivación de sus componentes activos, produciendo efectos psicotomiméticos descritos de la especie, que no se han logrado clarificar los efectos producidos y evaluar los efectos generales de la planta (Whitaker, 2016).

En el código cruz-badiano se describen sus usos medicinales tradicionales como diurético, laxante, emético, analgésico y antiinflamatorio; se ha identificado que la ingesta de una bebida producida tras su fermentación provoca desórdenes espaciotemporales dada su concentración de alcaloides (Malone & Rother, 1994).

2.3 Situación actual de la especie

Pese al potencial farmacológico al que se ha referido la especie, se carece de huellas genómicas vía marcadores morfológicos o moleculares y es nulo el conocimiento sobre caracterización de cloroplastos, lo que reivindica que la especie en cuestión se encuentra poco estudiada, y evidencia la necesidad de generar conocimiento sobre este recurso natural de México para su aprovechamiento y conservación (Oliver-Bever, 1972).

Heimia salicifolia se considera como una especie psicoactiva que permanece como una droga legal dada la poca relevancia o transmisión de conocimientos sobre cómo es producida la bebida que deriva en efectos de alteración espacio temporales (Malone & Rother, 1994).

La especie se encuentra en declive poblacional, siendo buscada como alternativa legal para uso lúdico, su comercialización y venta en el mercado negro, produciendo pérdidas y robo en su envío. Además de su saqueo silvestre dado su valor farmacológico, ornamental y hortícola (Arceusz et al., 2010).

2.4 Cultivo *in vitro* como herramienta de propagación y análisis vegetal

El cultivo *in vitro* vegetal involucra aspectos fundamentales de la producción de plantas completas y análisis de tejidos específicos como el cultivo de células, tejidos y órganos vegetales bajo condiciones idóneas, fungiendo como una herramienta fundamental para análisis farmacológicos y morfológicos a partir de

la producción de explantes y producción sistemática y coordinada de material vegetal (Matkowski, 2008).

El cultivo *in vitro* ha cobrado gran relevancia dado que especies como *Heimia salicifolia*, consideradas como especies de crecimiento silvestre, pero con características de planta medicinal, ornamental y aromática, suele padecer de extracción ilegal, así como uso indebido o extracción desmedida, por lo cual se han propuesto estrategias a corto y mediano plazo para la conservación *in vitro* de especies con estas características (Rajasekharan & Rao, 2019).

Una de las ventajas fundamentales para la aplicación de las técnicas de conservación a nivel *in vitro*, es el empleo de poco material vegetal, asegurando que es posible la propagación y manutención vegetal a través del tiempo de forma simplificada, que da lugar a la producción de más de 1,000,000 de plantas anuales sin espera del cambio de condiciones ideal para su desarrollo, plantas libres de patógenos y la manutención de la uniformidad genética y fisiológica (Debnath et al., 2006).

Las etapas del cultivo *in vitro* suelen clasificarse acorde al término de tiempos de producción que suelen ser clasificados en corto y mediano plazo; etapa de iniciación, etapa de multiplicación, etapa de enraizamiento y etapa de aclimatización, que en ocasiones no suele ser indispensable, como lo es la criopreservación (Radomir et al., 2023).

2.5 Los reguladores de crecimiento como alternativas para protocolos de clonación y germinación.

Los reguladores de crecimiento y la especificación de sales y concentraciones para emplear son fundamentales para la iniciación de los cultivos, como es el uso de medio MS y vitaminas MS, son necesarias para la iniciación específica de cultivos, lo cual define a su vez el seguimiento del protocolo y la producción de los resultados esperados del mismo, siendo estos medios empleados de forma general, sin embargo, es posible el empleo de medios específicos como es el

caso de medio para la producción de plantas leñosas (WPM) y la adición de otros complementos como es el caso de vitaminas o iones específicos para la estabilización del cultivo como el Fe^{+2} en la viabilidad de explantes de *Saussurea porcii* (Gashi et al., 2014).

Los reguladores de crecimiento vegetal son fundamentales para el establecimiento de protocolos y desarrollo celular específico, producción de callo, micropropagación de tejidos o el enraizamiento vegetal. (Galán et al., 2020).

El conjunto de reguladores de crecimiento comúnmente empleados involucra la combinación de auxinas y citocininas, estableciendo un radio fundamental de los reguladores, de tal manera que beneficie el protocolo y el tipo de cultivo deseado (Gashi et al., 2014).

Los reguladores que a menudo suplementan los medios de cultivo son citocininas (2-isopentiladenina (2ip); 6-benzylaminopurina (BAP); kinetina (KIN); en combinación con auxinas como el ácido 3-indolacético (IAA); el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 3-indolbutírico (IBA), que a su vez dependiendo de la especie es necesario no usarlos durante su germinación como es el caso de *Heimia salicifolia* y *Klasea bulgarica*, sin embargo, es necesaria la adición de antioxidantes como la L-cisteína (Radomir et al., 2023).

Además de ello, los reguladores de crecimiento funcionan como alternativas para la manutención de los cultivos en un lapso definido y contemplando tasas de supervivencia específicas para cada especie, acorde a los balances de reguladores empleados siendo que en ocasiones el empleo de estos reguladores por tiempos prolongados puede producir necrosis o muerte celular (Holobiuc & Blindu, 2006).

2.6 El cultivo *in vitro* como herramienta para especies poco estudiadas o en peligro de extinción

Existen especies de relevancia que han sido poco estudiadas e inclusive olvidadas por la ciencia, produciendo que la cosecha y prácticas inapropiadas de agricultura y deforestación aunadas a la presión antropogénica a nivel ecológico produzcan su desplazamiento y poda por ser consideradas como especies malezas, ya que no involucran su consumo o aprovechamiento como interés principal, considerándose como un problema mundial el desplazamiento de especies y recursos al borde de la extinción (Teixeira & Huber, 2021).

En países donde las estrategias de protección son insuficientes o carecen de normatividad, es requerido que se tomen medidas de protección y estudio *ex situ* prioritarias e inclusive estas técnicas en ocasiones suelen ser la única manera de preservar a especies específicas (Jennifer & Margaret, 2005).

A partir de estas técnicas es posible la manutención vegetal fuera de su ambiente natural, colocando a las especies bajo condiciones ambientales controladas y específicas, aunado a que en ocasiones la disponibilidad de material y su calidad son limitadas, así como los programas de rescate y protocolos de cultivo *ex situ* (Grigoriadou et al., 2011).

2.7 Literatura Citada

- Arceusz, A., Radecka, I., & Wesolowski, M. (2010). Identification of diversity in elements content in medicinal plants belonging to different plant families. *Food Chemistry*, 120(1), 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.068>
- Bajaj Y.P.S. (1996). *Medicinal and Aromatic Plants IX*. (1996). *Biotechnology in agriculture and forestry*. (Vol. 37). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-08618-6>
- Belmehdi, O., Harsal, A. E., Benmoussi, M., Laghmouchi, Y., Senhaji, N. S., & Abrini, J. (2018). Effect of light, temperature, salt stress and pH on seed germination of medicinal plant *Origanum elongatum* (Bonnet) Emb. & Maire. *Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, 16, 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.032>

- Debnath, M., Malik, C., & Bisen, P. (2006). Micropropagation: A tool for the production of high quality plant-based medicines. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 7(1),33-49. <https://doi.org/10.2174/138920106775789638>
- Díaz D. (1999, November). Xochipilli: Príncipe de las flores. *Arqueología Mexicana*, 52–53. (Vol. VII. Núm. 39)
- Dobberstein, R., Edwards, J., & Schwarting, A. (1975). The sequential appearance and metabolism of alkaloids in *Heimia salicifolia*. *Phytochemistry*, 14(8),1769-1775. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85291-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85291-5)
- Filipov, A. (1994). Medicinal plants of the Pilagá of Central Chaco. *Journal Of Ethnopharmacology*, 44(3),181-193. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)01185-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)01185-0)
- Galán A., García-Fortea, E., Prohens, J., & Herraiz, F. J. (2020). Development of a direct *in vitro* plant regeneration protocol from *Cannabis sativa* L. Seedling Explants: Developmental morphology of shoot regeneration and ploidy level of regenerated plants. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00645>
- Gashi, B., Abdullai, K., Sota, V., & Kongjika, E. (2014). Micropropagation and *in vitro* conservation of the rare and threatened plants *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae*. *Physiology and Molecular Biology of Plants/Physiology and Molecular Biology of Plants*, 21(1), 123-136. <https://doi.org/10.1007/s12298-014-0261-3>
- Graham, S. A. (1994). Familia lythraceae. *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*. Fascículo 24. Instituto de Ecología A. C. Pátzcuaro, Michoacán. <https://doi.org/10.21829/fb.224.1994.24>
- Grigoriadou, K., Krigas, N., & Maloupa, E. (2011). GIS-facilitated *in vitro* propagation and *ex situ* conservation of *Achillea occulta*. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 107(3), 531-540. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0004-x>
- Hernández A. M. (2020). Libellus de medicinalibus indorum herbis: Códice de la Cruz-Badiano. *Cuadernos de Biodiversidad*, 58, 1. <https://doi.org/10.14198/cdbio.2020.58.01>
- Holobiuc, I., & Blindu, R. (2006). *In vitro* culture of the protected rare species *Gentiana lutea* L. for conservative purpose. *Contributii Botanice*, 42, 125-134. <https://www.researchgate.net/publication/267835242>

- Jennifer, K., & Margaret. (2005). *Ex situ* conservation of bryophytes: progress and potential of a pilot project. *Boletín de la Sociedad Española de Briología/Boletín de la Sociedad Española de Briología*, 26-27(25), 17-22. <https://doi.org/10.58469/bseb.2005.43.92.002>
- Malone, M. H., & Rother, A. (1994). *Heimia salicifolia*: A phytochemical and phytopharmacologic review. *Journal of Ethnopharmacology*, 42(3), 135-159. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)90080-9)
- Martínez M. (1959). *Las plantas medicinales de México: Vol. I* (Botas, Ed.; 1st ed.). Universidad de Texas.
- Matkowski, A. (2008). Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants — A review. *Biotechnology Advances*, 26(6), 548-560. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.001>
- Oliver-Bever, B. (1972). Drug plants in ancient and modern Mexico. *Quarterly Journal of Crude Drug Research*, 12(4), 1957-1972. <https://doi.org/10.3109/13880207209083241>
- Radomir, A., Stan, R., Florea, A., Ciobotea, C., Bănuță, F. M., Negru, M., Neblea, M. A., & Sumedrea, D. I. (2023). Overview of the success of *in vitro* culture for *ex situ* conservation and sustainable utilization of endemic and subendemic native plants of Romania. *Sustainability*, 15(3), 2581. <https://doi.org/10.3390/su15032581>
- Rajasekharan, P. E., & Rao, R. (2019). *Conservation and utilization of horticultural genetic resources*. Springer eBooks. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-3669-0>
- Whitaker, E. D. (2016). *Health psychology*. Routledge eBooks. <https://doi.org/10.4324/9781315664033>

3. GERMINACIÓN y DESINFESTACIÓN *in vitro* DE SINICUICHE (*Heimia salicifolia* (Kunth) Link

3.1 Resumen

La germinación es la etapa más crucial para el desarrollo de una planta en su ciclo de vida dadas las condiciones que pueden afectar este proceso, como lo es el estrés ambiental, incidencia de enfermedades y heridas; el proceso requiere de la imbibición del embrión y la protrusión radicular que dan lugar al crecimiento vegetal en un estado de maduración rápido que suele involucrar condiciones específicas *in situ*. Para especies herbáceas con propiedades medicinales, que a menudo son consideradas malezas por el desconocimiento o desinformación, el cultivo *in vitro* provee de una herramienta para su propagación y mantenimiento. En este protocolo se comparó la tasa de sobrevivencia y contaminación de semillas germinadas en condiciones ideales *in vitro*. La comparación de la germinación y sobrevivencia de semillas en condiciones *in vitro* se cultivaron semillas obtenidas *in situ* y semillas provenientes de cultivares provenientes de Estados Unidos, comparando la tasa de sobrevivencia en un lapso definido, la germinación total de semillas y su porcentaje. Los resultados fueron diferentes significativamente desde la germinación produciendo diferencias en la tasa de sobrevivencia de semillas provenientes de cultivar comparadas con las de origen silvestre, arrojando como resultado una proporción de 20 vitroplantas producidas a partir de semillas de cultivar contra solo 1 vitroplanta proveniente de semilla silvestre exitosa, pese al uso de mismas concentraciones de alcohol, jabón, cloro y polisorbato 20. Los resultados en la comparación del éxito de germinación y desinfestación entre el origen de las semillas arroja también diferencias significativas en el efecto de la selección de semillas, ya que esta permite la elección aleatoria de semillas de calidad, tras la evaluación de la estadística de Kaplan-Meier.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*; Propagación vegetal, Crecimiento vegetal.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma de Chapingo.

Autor: Fernando Ordoñez Posadas

Director de Tesis: José Luis Rodríguez de la O.

3.2 Abstract

Germination is the crucial process for the development of a plant in its life cycle, because all the circumstances and conditions that could affect this process, like stressful ambient conditions, diseases and damage; this process requires de imbibition of the embryo and the radicular protrusion that develop the plant maturation in specific conditions *in situ*. For herbaceous plants with medicinal properties, *in vitro* culture means and advanced tool for their propagation and attainment, the principal reason for this statement is that this species has a little

of information and knowledge, even to consider them as weeds. This is the main reason for the comparison of the survival rate between seed from the wild and selected seeds from specialized cultivars. The comparison between the germination and the survival rate at *in vitro* conditions was executed with seed obtained from the wild and seed from selected cultivars with origin in the United States, comparing the survival rate in a standardized lapse, total germination and germination total percentage. These results were significantly different even from the germination, producing differences in the survival rate and contamination of seeds in comparison between seed from the wild and the seeds from specialized cultivars, obtaining the survival rate of 20 vitro plants from the commercial seeds compared to 1 vitroplant from wild seeds, even with the use of the same treatments with alcohol, soap, chlorine and polysorbate 20. The results in the comparison of the success of germination and disinfestation of seeds tough its origin, make significal differences in the effect of the selection of seeds, choosing only successful ones in the quality side of the cultivar seeds after the Kaplan-Meier stadistic.

Palabras clave: *In vitro* culture; Propagation of plantlets, Vitroplants.

Thesis for Master of Science in Agriculture Biotechnology. Universidad Autónoma de Chapingo.

Author: Fernando Ordoñez Posadas

Thesis director: José Luis Rodríguez de la O.

3.3 Introducción

La germinación y desarrollo de las plántulas requiere del diseño de protocolos para regular el crecimiento exponencial a partir del cultivo *in vitro* de semillas o de explantes bajo condiciones óptimas, sin embargo, las especies de plantas medicinales tienen la posibilidad de no germinar en condiciones de laboratorio, por lo que su estudio resulta en una herramienta fundamental para la conservación de germoplasma y análisis (Gupta et al., 2011).

Es esencial el establecimiento de un protocolo que permita la complementación del desarrollo vegetal y permita la obtención de buen rendimiento en la producción de material biológico y rendimiento suficiente en la producción de metabolitos secundarios en tejidos medidos en peso fresco o peso seco vegetal (Belmehdi et al., 2018).

La propagación mediante semillas permite la producción de mayor cantidad de plantas libres de patógenos para su propagación mediante el cultivo *in vitro* de explantes apicales y basales de *Heimia salicifolia*, estas vitroplantas se aprovecharán para el aislamiento de metabolitos secundarios a partir del empleo de hojas, en un lapso reducido al implicado en vida silvestre, que suele ser un periodo de crecimiento mayor a 2 años (Malone & Rother, 1994).

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Material vegetal, colecta y adquisición

La colecta del material vegetal (semillas y hojas), fue realizada en San Cristóbal de las Casas, Chiapas gracias al apoyo de guías de la zona pertenecientes a la filial de la Universidad Autónoma de Chapingo en el municipio. El material vegetal fue seleccionado acorde a la calidad visible de las plantas encontradas y el estado de floración para la identificación de la especie y colecta de semillas viables. Las semillas fueron sometidas a criopreservación y tras un día fueron llevadas a la Universidad Autónoma de Chapingo para poder ser conservadas y almacenadas en obscuridad a temperatura ambiente.

Las semillas de cultivar establecido fueron obtenidas de Nueva Jersey, con origen de una organización sin fines de lucro: plantswithapurpose.org, pedido que tuvo que ser dado en seguimiento con seguro de viaje ya que el peligro en el viaje estimado es demasiado y supone un riesgo debido al mercado negro de especies de interés al considerarse una especie con fines lúdicos que no posee prohibiciones legales.

3.4.2 Análisis y selección de material

Las semillas de origen silvestre fueron examinadas en el estereoscopio con la finalidad de seleccionar para siembra aquellas que poseyeran las mejores características visibles acorde a pruebas de germinación llevadas a cabo como paso inicial en condiciones sin reguladores de crecimiento y en medio MS al 100 % suplementado con tiamina, L-cisteína y mio-inositol.

Las semillas provenientes de cultivar no requirieron de una selección, ya que todas las semillas adquiridas de esta organización provienen de plantas sometidas a selección, sin contaminantes, sin riesgos de contaminación o plagas y a su vez criopreservación previa, por lo cual las semillas a cultivar provenientes de plantas silvestres se mantuvieron en condiciones idénticas de conservación.

3.4.3 Métodos de desinfección y preparación para siembra

Para la desinfestación de semillas y su preparación para la siembra, fue necesaria la comparación de distintos porcentajes y tiempos de lavado con distintos compuestos para evitar la contaminación vegetal en el medio de cultivo.

Para la desinfestación de las semillas en distintas pruebas, fue necesario el uso de jabón en polvo, alcohol al 70 % v/v, hipoclorito de sodio al 1 %, 5 % y 10 % v/v y tres lavados con agua destilada estéril, además una prueba con polisorbato 20 a partir de la disolución de una gota en 10ml de agua estéril.

Estos lavados para las semillas requieren de extrema precaución, ya que en el proceso las semillas pueden perderse debido a su tamaño ($\pm 0.5\text{mm}$), complicando también su esterilización, en consecuencia, fue necesario emplear un material permeable denominado propileno, polímero empleado en cubrebocas KN95 para uso quirúrgico, herramienta importante que permitió la manipulación y el cultivo de estas semillas.

3.4.4 Medios de cultivo

Con los medios de cultivo se consideró la comparación entre la germinación y los tiempos de sobrevivencia de las semillas procedentes de vida silvestre y las procedentes de cultivar, eliminando el uso de reguladores de crecimiento, siendo el origen de las semillas los tratamientos a evaluar. Para cada supuesto, fueron sembradas 100 semillas distribuidas en 20 frascos. El medio de cultivo seleccionado fue basado en medio MS al 100% suplementado con sacarosa al 3 %; 100mg/L de mio-inositol; 0.40mg/L de tiamina y 60mg/L de L-cisteína.

Se estima que, con las plantas obtenidas *in vitro*, sería posible una producción mayor de alcaloides a las comparadas *in situ*, dada la capacidad de emplear elicitores que promuevan esta respuesta como parte metabólica activa, siempre y cuando sea posible la producción de callo friable, de buena calidad y con eficiencia en subcultivos para el establecimiento de un protocolo de producción continua.

3.4.5 Siembra *in vitro*

Las semillas de *Heimia salicifolia* requieren un procedimiento delicado y minucioso para evitar la contaminación una vez finalizada la desinfestación. La toma y colocación de las semillas en los frascos se efectuó con el empleo de agujas estériles que permitieran una siembra ordenada sin afectar la asepsia del material de siembra en la cámara de flujo laminar.

Fueron dispuestas cinco semillas por frasco para llevar un control adecuado de las semillas germinadas, permitiendo así el conteo de forma accesible y el seguimiento de la calidad de las vitroplantas tras su germinación.

3.4.6 Análisis

La comparación de la germinación y calidad de vitroplantas obtenidas en este protocolo, se evaluó a partir del tiempo promedio de germinación, número de hojas y brotes producidos dos meses tras la germinación, evaluación positiva o negativa del desarrollo de raíces y contaminación presentada a partir de la misma metodología de desinfestación.

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Definición de metodologías de desinfestación

Se planteó la desinfestación de las semillas como un procedimiento para tener en cuenta para la elaboración del protocolo, ya que permite la evaluación de la asepsia de estas a partir de las dos variedades contempladas desde su

procedencia, siendo fundamental la observación de la respuesta vegetal desde la contaminación hasta la protrusión y conservación de las vitroplantas en un lapso definido, que fue de dos meses.

Cuadro 1. Tratamientos empleados para desinfestación de semillas de *Heimia salicifolia* provenientes de plantas silvestres y de cultivar.

Método	Alcohol al 70 %	Jabón	Cloro	Polisorbato 20
Tratamiento C	NA	NA	1 %	NA
Tratamiento 1	Sí	Sí	5 %	NA
Tratamiento 2	Sí	Sí	10 %	NA
Tratamiento 3	Sí	Sí	10%	0.01ml

En las pruebas realizadas, se sembraron 50 semillas por cada tratamiento para cada variedad de origen de las semillas, en consecuencia, la evaluación del desarrollo de patógenos de los tratamientos de desinfestación.

Los tratamientos 1 y 2 fueron ineficaces tanto para semillas provenientes de origen silvestre como para semillas de cultivar, considerándose como métodos ineficaces de desinfestación, mientras que el tratamiento 3 es suficiente para la producción de vitroplantas provenientes de cultivar tras tres semanas desde la siembra y el tratamiento 4 es eficaz para ambas variedades de semillas tres semanas tras la siembra en medio de cultivo, sin contaminación en algún medio o alrededor de alguna de las semillas dispuestas en los frascos.

Estos resultados comprueban que el tiempo de exposición a los agentes de desinfestación, las concentraciones y la calidad de estos afecta la contaminación y la germinación de las semillas, independientes a su origen, empleando regularmente compuestos como el cloruro de sodio, mercurio clórico y etanol (Texeira & Huber, 2021).

El uso de polisorbato como alternativa al mercurio se justifica en la emulsificación de los tejidos, logrando que se produzca estabilidad en los lavados y a su vez se

use como detergente por su baja toxicidad, lo que da lugar a muestras asépticas, como compuesto empleado inclusive en la industria farmacológica (Da Silva et al., 2015). Por lo cual se considera eficaz también en este protocolo para la desinfestación de semillas de *Heimia salicifolia*.

3.5.2 Comparación de tratamientos para desinfestación

Los tratamientos propuestos para la desinfestación de las semillas bajo las condiciones expuestas en cuanto a su manejo permitieron la producción de vitroplantas en un 80 % a 90 % de la totalidad de siembra de estas. Considerando este protocolo como exitoso desde el punto de partida de la germinación a partir de los siguientes puntos de análisis estadístico y comparativo.

La sobrevivencia total de las plantas fue incrementando conforme a lo especulado a partir del incremento en la concentración de hipoclorito de sodio y el uso de polisorbato 20; a partir de este tratamiento, el éxito de la germinación en 80 % para las semillas provenientes de cultivar y 70 % para las plantas provenientes de plantas silvestres (Figura 1).

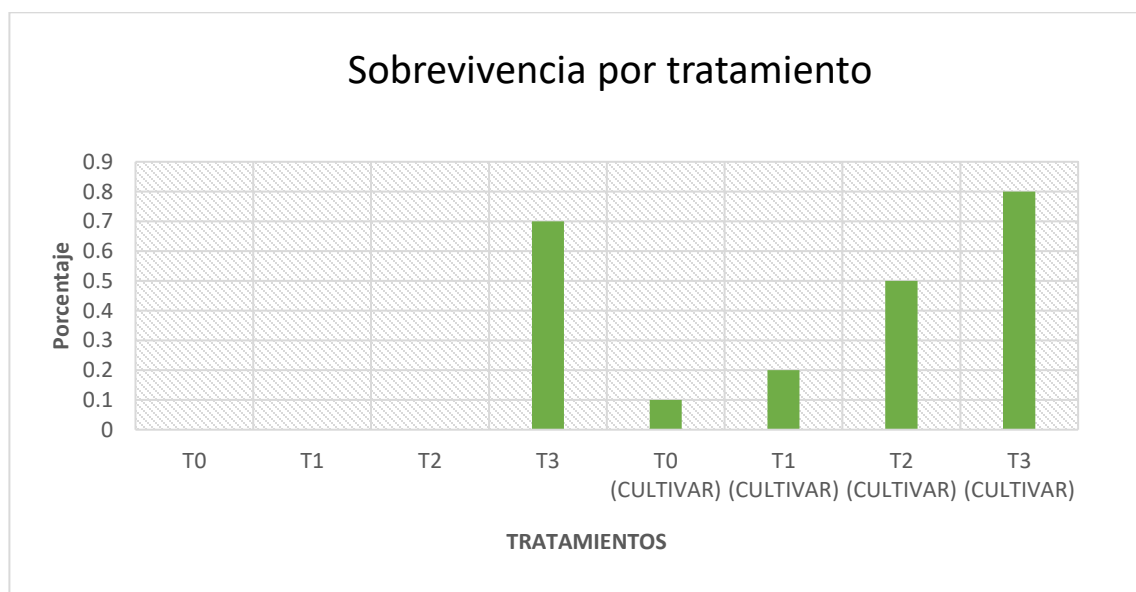


Figura 1. Sobrevivencia por tratamiento comparando semillas silvestres y de cultivar de *Heimia salicifolia*.

Se comparó la germinación de las semillas y su contaminación en un lapso de treinta días, con la finalidad de identificar la optimización del uso específico de alguno de los dos orígenes de semillas, arrojando que ningún tratamiento sin polisorbato 20 funcionó con las semillas silvestres, mientras que la desinfestación en semillas de cultivar funcionó desde el tratamiento control. (Figura 2)

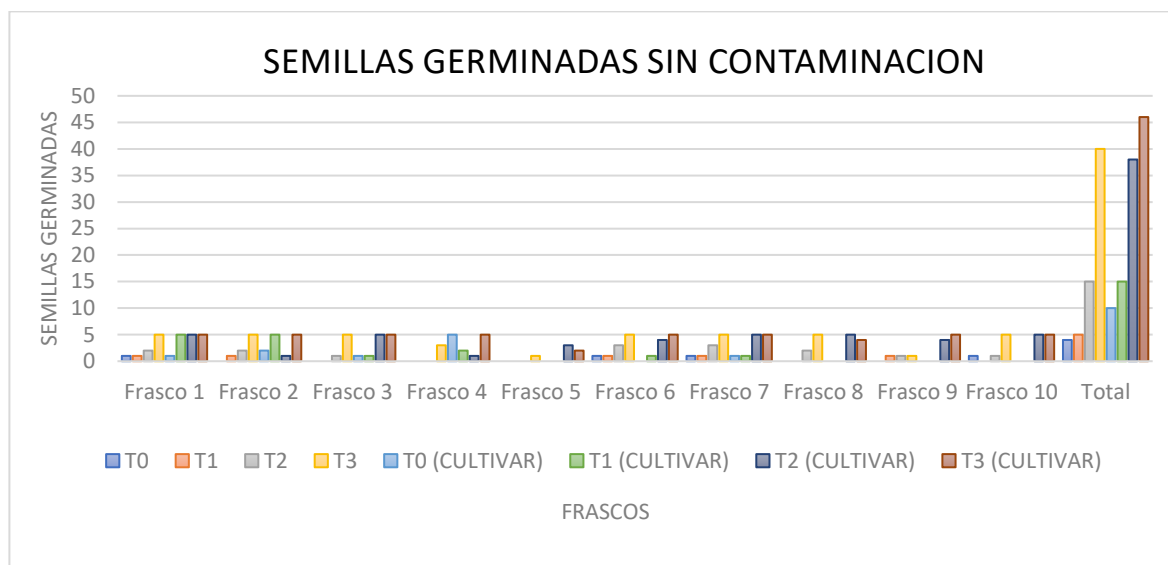


Figura 2. Semillas de *Heimia salicifolia* sin contaminar por cada tratamiento en comparación de semillas silvestres y de cultivar.

Las semillas germinadas totales por tratamiento y su comparación permite discernir el mejor tratamiento de forma cualitativa; las semillas de cultivar germinaron en un número cercano al total de semillas dispuestas en cada frasco por tratamiento, mientras que el número de semillas que germinaban sin contaminación provenientes de origen silvestre, no es cercano a cinco semillas por cada frasco en cada uno de los tratamientos dispuestos, lo que se relaciona directamente con la tasa de sobrevivencia y éxito que poseen las semillas de ambos orígenes dispuestas como tratamiento, sin importar la asepsia o el método de desinfestación empleado previamente.

Es posible apreciar el número total de semillas germinadas cercano a 50 en cada uno de los frascos sometidos a germinación para las semillas provenientes de

cultivar comparado con el número cercano sólo a 15 de semillas de origen silvestre (Figura 2).

La comparación anterior de semillas germinadas sin contaminación fue empleada como preámbulo para la determinación estadística de las observaciones dispuestas y el porcentaje de sobrevivencia comparando las medias obtenidas para la sobrevivencia y el éxito de los tratamientos de desinfestación mediante el análisis de curvas Keplen-Meier con una probabilidad estadística menor a 0.0001, con lo cual se compararon los datos, la sobrevivencia en un lapso definido y los eventos de sobrevivencia por cada uno de los tratamientos con la finalidad de arrojar resultados cuantitativos fiables en función de la sobrevivencia final de las vitroplantas (Figura 3).

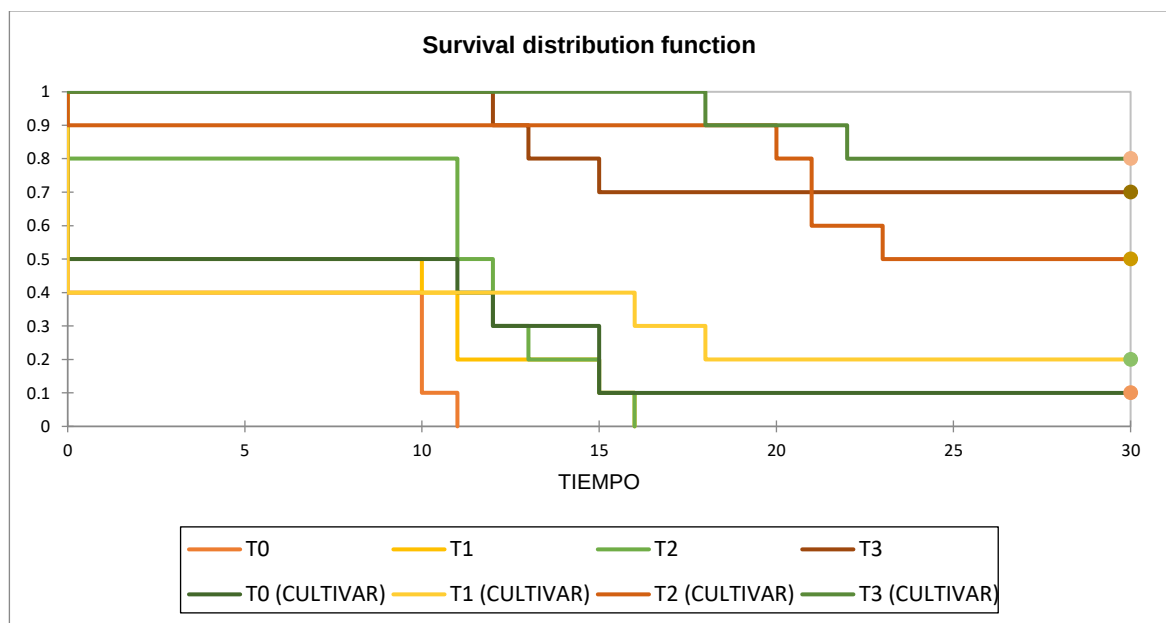


Figura 3. Distribución de la sobrevivencia en función del tiempo en semillas de cultivar vs silvestres de *Heimia salicifolia*.

Cuadro 2. Comparación de valores para la evaluación de diferencia significativa obtenida entre la distribución Kaplan-Meier de sobrevivencia para *Heimia salicifolia*.

Comparaciones	Valor Observado	P	Valor Ajustado de P. (Dunn-Sidak)
T0 vs T1	2.085	0.149	0.989
T0 vs T2	10.096	0.001	0.041
T0 vs T3	21.469	<0.0001	0.000
T0 vs T0 (CULTIVAR)	3.859	0.049	0.759
T0 vs T1 (CULTIVAR)	2.701	0.100	0.948
T0 vs T2 (CULTIVAR)	16.482	<0.0001	0.001
T0 vs T3 (CULTIVAR)	21.469	<0.0001	0.000
T1 vs T2	0.714	0.398	1.000
T1 vs T3	14.439	0.000	0.004
T1 vs T0 (CULTIVAR)	0.435	0.510	1.000
T1 vs T1 (CULTIVAR)	2.003	0.157	0.992
T1 vs T2 (CULTIVAR)	16.808	<0.0001	0.001
T1 vs T3 (CULTIVAR)	22.224	<0.0001	<0.0001
T2 vs T3	13.080	0.000	0.008
T2 vs T0 (CULTIVAR)	0.009	0.925	1.000
T2 vs T1 (CULTIVAR)	1.012	0.314	1.000
T2 vs T2 (CULTIVAR)	15.691	<0.0001	0.002
T2 vs T3 (CULTIVAR)	21.868	<0.0001	<0.0001
T3 vs T0 (CULTIVAR)	9.111	0.003	0.069
T3 vs T1 (CULTIVAR)	5.318	0.021	0.450
T3 vs T2 (CULTIVAR)	0.420	0.517	1.000
T3 vs T3 (CULTIVAR)	0.435	0.510	1.000
T0 (C) vs T1 (CULTIVAR)	0.506	0.477	1.000
T0 (C) vs T2 (CULTIVAR)	8.398	0.004	0.100
T0 (C) vs T3 (CULTIVAR)	14.303	0.000	0.004

T1 (C) vs T2 (CULTIVAR)	4.361	0.037	0.650
T1 (C) vs T3 (CULTIVAR)	9.292	0.002	0.062
T2 (C) vs T3 (CULTIVAR)	1.814	0.178	0.996

<.0001 alude en la columna de valor ajustado de P a diferencia significativa pese al ajuste de Dunn-Sidak, confirmando por lo tanto la diferencia significativa que presenta la columna de comparación $p < 0.001$; C: Refiere a cultivar en la comparación entre tratamientos de cultivar.

Como es apreciable en la estadística del protocolo, la elección de la procedencia de las semillas para la germinación es de relevancia, no sólo para la elección de los tejidos como parte de la mayor parte de los protocolos *in vitro*, sino que a su vez define la composición del medio de cultivo en cuanto a reguladores de crecimiento y vitaminas y la desinfestación de las mismas (Martínez et al., 2021).

El empleo de la estadística para la comprobación de los casos de sobrevivencia y definición de protocolos requiere de la estadística logarítmica de Kaplan-Meier, que permite la comparación y efectividad de tratamientos empleados, explantes y estimaciones, que pueden acercarse o alejarse de hipótesis posibles (Ancasi et al., 2016).

La estadística de Kaplan-Meier permite definir que existen diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 2 de semillas silvestres comparadas con el tratamiento 3 de semillas de cultivar, este último es el mejor de los tratamientos al relacionar la estadística de Kaplan-Meier con las semillas totales germinadas en el tratamiento (Figuras 2 y 3).

El análisis de tejidos para siembra *in vitro* suele ser esencial, ya que a menudo la respuesta de sobrevivencia obtenida al inicio de protocolos de multiplicación es fundamental para traspolar el número de explantes y tejidos que podrán sobrevivir en las fases finales del protocolo y comienzan a definir el éxito del mismo con la obtención de los resultados deseados desde etapas tempranas de germinación. Ejemplo previo, es el caso de *Musa AAB*, en el cual el éxito de adaptación en ambos casos permite la obtención de un éxito cercano al 100 %

llevando la experimentación de casos *in vitro* a *ex vitro* y viceversa (Corozco et al., 2021).

3.6 Conclusiones

La comparación de la germinación y el empleo de la contaminación de explantes diferenciales como el uso de semillas provenientes de cultivar y semillas silvestres, proporciona información relevante sobre los cultivos, la selección y las especies que se encuentran en riesgo incesante de desplazamiento dadas sus características, viabilidad y manejo.

Los porcentajes de germinación y contaminación de las semillas empleadas en los tratamientos propuestos arrojó resultados relevantes entre sí del 0 % al 7 % en cuanto a la contaminación de tratamientos con semillas de origen silvestre, mientras que no hay diferencia entre los tratamientos provenientes de cultivar pese a la metodología de desinfestación empleada.

El estudio no paramétrico del logaritmo Kaplan Meier arroja a su vez, resultados diferenciales entre el origen de las semillas y los tratamientos empleados, evidenciando la selección de semillas y plantas a través del tiempo como parte de la relevancia en los resultados obtenidos, las concentraciones de cloro y el uso de polisorbato 20, que puede variar acorde a la especie de interés, por lo cual se considera necesario el establecimiento de evaluaciones previas.

A partir de este estudio es posible concluir que debe compararse el uso de semillas de cultivar y semillas de origen silvestre con el fin de relacionar la tasa de éxito de la germinación de semillas, con el éxito posible del protocolo, ya que en este caso la diferencia de germinación total fue de más de 35 semillas comparando las semillas germinadas del tratamiento 3 de cultivar con el tratamiento 1 de semillas silvestres, lo que determinará el éxito del protocolo en un lapso establecido.

3.7 Literatura citada

- Ancasi-Espejo, R. G., Montero-Tonconi, J. R., Ferreira-Castedo, N. J., & Muñoz-Guzmán, I. (2016). Determinación un mejor medio de cultivo en la fase de establecimiento para la propagación *in vitro* de plátano (*Musa paradisiaca* L). *Journal of the Selva Andina Research Society*, 7(2), 104-111. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=361346796008>
- Belmehdi, O., Harsal, A. E., Benmoussi, M., Laghmouchi, Y., Senhaji, N. S., & Abrini, J. (2018b). Effect of light, temperature, salt stress and pH on seed germination of medicinal plant *Origanum elongatum* (Bonnet) Emb. & Maire. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.032>
- Da Silva, J. A. T., Tsavkelova, E. A., Ng, T. B., Parthibhan, S., Dobránszki, J., Cardoso, J. C., Rao, M. V., & Zeng, S. (2015). Asymbiotic *in vitro* seed propagation of *Dendrobium*. *Plant Cell Reports*, 34(10), 1685-1706. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1829-2>
- Gupta, S. M., Pandey, P., Grover, A., & Ahmed, Z. (2011). Breaking seed dormancy in *Hippophae salicifolia*, a high value medicinal plant. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(4), 403-406. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0082-6>
- Malone, M. H., & Rother, A. (1994b). *Heimia salicifolia*: A phytochemical and phytopharmacologic review. *Journal of Ethnopharmacology*, 42(3), 135-159. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)90080-9)
- Martínez, G., Rey, J. C., Pargas, R., Guerra, C., Manzanilla, E., & Ramírez, H. (2021). Efecto de sustratos y fuentes orgánicas en la propagación de banano y plátano. *Agronomía Mesoamericana*, 808-822. <https://doi.org/10.15517/am.v32i3.42490>
- Quiñonez, L. C., Ponce, F. M., Del Valle Moreira, M., Mieles, A. M., Gavilanes, F. Z., Alcívar, F. A., Cedeño-García, G., Vélez-Olmedo, J., & Jaimez, R. E. (2021). Effect of auxins, cytokinin and activated charcoal on *in vitro* propagation of plantains barraganete and curare (*Musa AAB*). *Proceedings of the National Academy of Sciences Section B: Biological Sciences*, 91(2), 431-440. <https://doi.org/10.1007/s40011-020-01218-7>
- Teixeira, J. C., & Huber, C. D. (2021). The inflated significance of neutral genetic diversity in conservation genetics. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(10), Article e2015096118 <https://doi.org/10.1073/pnas.2015096118>

4. GERMINACIÓN Y DESDIFERENCIACIÓN *in vitro* DE *Heimia salicifolia* (Kunth) Link

4.1 Resumen

Heimia salicifolia es un arbusto herbáceo que posee cualidades interesantes sobre sus compuestos potencialmente farmacológicos, sin embargo, aún no se ha realizado un análisis complejo de la planta, dado el desconocimiento de esta, desplazamiento y pérdida en el mercado negro. La alternativa más interesante al respecto es la producción de plantas *in vitro* a partir de la comparación del uso de semillas provenientes de plantas silvestres y plantas provenientes de selección a partir de cultivar especializado. En este protocolo, las semillas de ambos orígenes fueron seleccionadas completamente al azar con la finalidad de evaluar el número de hojas producidas tres meses tras la germinación, número de brotes producidos, producción de raíces y la longitud de las plantas producidas. En las observaciones tras los tres meses de evaluación, las vitroplantas provenientes de cultivar poseen características superiores con diferencias estadísticas significativas a las que poseen las de origen silvestre, inclusive superior en la sobrevivencia de las plantas, ya que fue posible la observación de plantas senescentes provenientes de las semillas de origen silvestre, siendo alarmante la cantidad de semillas que germinan y la calidad de plantas producidas por estas semillas, ya que es posible deducir que la mayor parte de las semillas en vida silvestre no germinan o suelen perderse en un lapso corto de tiempo pese a su germinación. El mejor de los tratamientos fue proveniente de semillas de cultivar en su germinación, suplementado con 30g/L de sacarosa, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 0.40mg de tiamina, 60 mg L⁻¹ de L-cisteína, pH 5.7± 0.1, 8g/L de phytagel aunado a 2ip, KIN, BAP a una concentración de 1.5 mg/L⁻¹ y ANA a 3.0 mg/L⁻¹. Este tratamiento por lo tanto es el que representa diferencias significativas con el resto de los tratamientos.

Palabras clave: Germinación, *in vitro*, *in situ*, silvestres, cultivar.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma de Chapingo.

Autor: Fernando Ordoñez Posadas

Director de Tesis: José Luis Rodríguez de la O.

4.2 Abstract

Heimia salicifolia is an herbaceous bush that keeps interesting qualities about its secondary metabolites that are considered as potentially pharmacologic, nevertheless it hasn't been analyzed in a complex form, because of this and the poor acknowledge of the plant, the displacement, ornament use and loss of the specie in the black market as a potential drug, but with legal gaps. The most interesting alternative for the plant is the production of plants *in vitro* in comparison of the origin of the seeds consider as wild and from specialized cultivars. In this protocol, the seeds from both treatments were selected randomly with the objective of acquiring the evaluation of number of leaf's, the bud number, production of roots and the length of the vitroplants. In the observation after three months, the vitroplants form cultivar have an arrange of superior quality compared to the counterpart of vitroplants from wild seeds, that was observed as senescent, considering this alarming because of the rate of germination and the quality of wild seeds considered them as lost or unstable even after the germination stage. The best of the treatments was the one supplemented with 30g/L of sacarose, 100 mg L⁻¹ of myo-inositol, 0.40mg of tiamine, 60 mg L⁻¹ of L-cistine, pH 5.7± 0.1, 8 g/L of phytagel and growth regulators 2ip, KIN, BAP at 1.5mg/L⁻¹ and NAA at 3.0 mg/L⁻¹. This treatment represents the significant differences between all the treatments.

Palabras clave: Germination, *in vitro*, *in situ*, wild, cultivar.

Thesis for Master Degree in Agricultural Biotechnology. Universidad Autónoma de Chapingo.

Author: Fernando Ordoñez Posadas

Thesis director: José Luis Rodríguez de la O.

4.3 Introducción

La germinación es una de las etapas fundamentales en el ciclo de vida vegetal, ya que es la etapa crítica inicial, que suele ser multifactorial hasta la protrusión, sin embargo, la capacidad de germinación de las semillas silvestres suele

depender de múltiples factores relacionados con la capsula o protección de las semillas, locación, temporada y el estadio de crecimiento de la planta madre (Nonogaki et al., 2010).

El cultivo particular de *Heimia salicifolia*, se justifica en la creación de protocolos que permitan la producción continua de plantas y especialmente de hojas, ya que es el elemento principal que concentra los metabolitos secundarios por los cuales la especie posee gran valor como recurso farmacológico poco estudiado (Malone & Rother, 1994).

La germinación es la etapa más crucial para el desarrollo de una planta en su ciclo de vida dadas las condiciones que pueden afectar este proceso, como lo es el estrés ambiental, incidencia de enfermedades y heridas; se trata de un proceso que requiere de la imbibición del embrión y la protrusión radicular que dan lugar al crecimiento vegetal en un estado de maduración rápido que suele involucrar condiciones específicas *in situ* (Gupta et al., 2011).

Para la germinación y multiplicación de plantas medicinales *in vitro* hay problemáticas importantes, ya que suelen ser afectadas por múltiples factores abióticos como lo es la temperatura, luz, estrés salino y Ph (Gupta et al., 2011).

Los antecedentes de la especie han indicado que además del interés farmacológico también posee interés ornamental por sus características, sin embargo, los protocolos previos para la germinación de la especie no habían contemplado la comparativa de la especie en cuanto a la selección a través de generaciones como es el caso de la producción de plantas en un cultivar especializado y semillas provenientes de plantas silvestres, que son desplazadas como maleza o extraídas como droga legal, implicando la pérdida de hábitat y supervivencia de la planta (Hesami et al., 2021).

Es esencial conformar un protocolo que permita la complementación del desarrollo de la planta, sobrevivencia y obtención de buen rendimiento en la producción de metabolitos secundarios tanto de estructuras desdiferenciadas y

de tejidos medidos en peso fresco o peso seco y mayor cantidad de material vegetal (Hesami et al., 2021).

4.4 Micropropagación

La micropropagación es un método eficaz para la clonación de material vegetal y producción de mayor cantidad de peso fresco o individuos vegetales, un material útil para su análisis anatómico, fitoquímico o para caracterización molecular (Ram & Shekhawat, 2011).

El empleo de explantes para la micropropagación de vitroplantas se fundamenta en la obtención de mayor cantidad de peso fresco o volumen vegetal a consecuencia de la producción de brotes y hojas nuevas como efecto derivado de la eliminación de la dominancia apical, lo que, en cuanto a la producción de componentes activos como metabolitos secundarios, permite una obtención continua y simplificada de estos (Bhojwani & Dantu, 2013).

4.4.1 Desdiferenciación o producción de callo.

La producción de callo representa una herramienta con grandes avances para la producción de tejidos en el cultivo *in vitro* desde su empleo para la producción de alimentos, biocombustibles y el uso de la desdiferenciación celular o callogénesis para la producción de precursores y metabolitos secundarios. (Hesami et al., 2021).

Esta producción de callo que es definida como la producción de masa irregular de tejido parenquimático con células meristemáticas, que suelen producir moléculas bioactivas acorde a la especie seleccionada para el cultivo (Thorpe, 2007).

Algunos trabajos han intentado que *Heimia salicifolia* en cultivo produzca alcaloides a partir de su desdiferenciación, con la formación de callo café a negro o callo friable a partir de la adición del regulador de crecimiento 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) aunado a auxinas y citocininas, como lo es el ácido

naftalenacético (ANA); benziladenina (BA) e isopentilaminopurina (IPA), sin embargo, el empleo de estos reguladores en concentraciones variables para la desdiferenciación de tejidos, no arroja datos sobre producción de alcaloides o precursores dado que la producción de callo es inestable e ineficiente (Malone & Rother, 1994).

Entre las ventajas de la desdiferenciación celular, se encuentra la transformación genética, ya que no requiere de la regeneración de la planta transgénica; la producción de variantes somaclonales que permiten la elucidación de rutas metabólicas a partir de cambios producidos por las alteraciones somaclonales, con lo cual se producen nuevos metabolitos (Hesami et al., 2021).

Otra de sus ventajas es el empleo de sistemas de biorreactores y su consideración como un proceso ecológico y sustentable (Yoo et al., 2018).

En cuanto a la producción de metabolitos secundarios para la demanda de investigación o la demanda a nivel poblacional el cultivo *in vitro* de callo se propone como una de las herramientas con mejores resultados, ya que produce un incremento en la producción de metabolitos como terpenos, alcaloides y polifenoles (Darigh et al., 2022).

Las condiciones de cultivo e inducción de callo también pueden ser propensas a modificación, siendo el uso de iluminación continua (500Fc, 40W, bajo luz fluorescente fría) una condición favorable (Malone & Rother, 1994).

4.5 Materiales y métodos

El material empleado para la comparación de la germinación fue obtenido en San Cristóbal de las Casas, Chiapas y el material de cultivar fue obtenido de Estados Unidos a partir de una organización conocida como plantswithapurpose.org; a partir de este preámbulo se buscó la evaluación de la calidad de las plantas producidas a partir de medios controlados con la finalidad de llevarlos hasta la producción de tejidos desdiferenciados.

Los medios de cultivo fueron idénticos, sin el uso de reguladores de crecimiento y medio MS al 100 % suplementado con vitaminas con la finalidad de no observar cambios en el fenotipo vegetal y además de ello permitir la evaluación para la definición de los explantes a usar para la desdiferenciación de tejidos y producción de callo.

Dadas las cualidades y gran número de plantas senescentes a partir de la germinación y evaluación de semillas de origen silvestre, se optó por elegir vitroplantas completamente al azar provenientes de semillas procedentes de cultivar.

4.5 Desinfestación

La desinfestación de acuerdo con la prueba realizada con anterioridad, se efectuó mediante el uso de polisorbato 20, cloro al 10 %, alcohol al 70 % y 3 lavados de agua estéril, todo esto en tela KN95 con la finalidad de lograr que las semillas fuesen manipulables. Las semillas fueron sembradas de forma estéril en cámara de flujo laminar en el laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos Vegetales en el área de Fitotecnia en la Universidad Autónoma de Chapingo. Todas las semillas sembradas fueron dispuestas en condiciones ambientales idénticas acorde a protocolos previos de establecimiento, es decir, a una temperatura entre 24 y 26 °C durante el día y 22 °C durante la noche en fotoperiodo de 16:8. La luminosidad se ajustó empleando un luxómetro en 485.75 $\mu\text{mol/s/m}^2$.

4.5.1 Evaluación de vitroplantas

Se procedió a evaluar las vitroplantas producidas tres meses tras la siembra, en lo que refiere al número de hojas producidas, longitud, número de brotes y la presencia o ausencia de raíces con la finalidad de concluir cuales plantas son mejores para la producción de callo, a partir de la siembra y germinación de 50 semillas de origen silvestre y 50 semillas de cultivar.

4.5.2 Explantes para Callogenesis

La callogenesis de *Heimia salicifolia*, fue llevada a cabo a partir de vitroplantas de cultivar dadas sus excelentes condiciones; por lo cual fueron elegidas plantas completamente al azar de este tratamiento y se evaluó la producción de callo a partir de hojas apicales, hojas basales, tallos en porción apical, basal e intermedia y a su vez se evaluó el peso fresco producido de los explantes a partir de la desdiferenciación de los distintos tipos de tejidos empleados como explantes para esta evaluación.

Cuadro 3. Tratamientos empleados para la producción de callo friable de tejidos de *Heimia salicifolia*. Expresados en mg/L.

Tratamientos para callogenesis	2ip	KIN	BAP	ANA	2-4-D
T0	0	0	0	0	0
T1	0.3	0.3	1	0.3	0
T2	1.5	0.6	0.6	0.6	0
T3	1.5	1.5	1.5	3	0
T4	3.75	2.5	2.5	0	2.5
T5	3.75	5	3.75	0	5
T6	5	5	8.75	0	5

Todos los tratamientos se mantuvieron en medio MS (1962) suplementados con 30 g/L de sacarosa, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 0.40mg de tiamina, 60 mg L⁻¹ de L-cisteína, pH 5.7± 0.1, 8g/L de phytigel. Como variable se evaluará el peso a través del tiempo, permitiendo la determinación de la producción efectiva de tejido desdiferenciado para su liofilización y determinación de alcaloides totales producidos en estos tejidos como peso seco.

4.5.3 Toma de datos y variables

La germinación se evaluó hasta 30 después la siembra, con el tiempo promedio de germinación ($MGT = \sum(nT) / \sum n$) donde: n es el número de semillas germinadas a determinado tiempo T; T representa los días del inicio de la prueba y $\sum n$ es referido a la germinación final por cada tratamiento. La germinación acumulada y los porcentajes de germinación finales se calcularon. Para la evaluación de la calidad de plantas, se consideró el crecimiento y desarrollo de las plántulas durante cuatro meses.

Los datos de callogénesis fueron evaluados a partir de un ANOVA y una prueba de tukey con $p < 0.001$ con la finalidad de arrojar la diferencia significativa entre la producción de callo de cada uno de los tratamientos y a su vez definir cuál es el mejor para el objetivo de la desdiferenciación celular.

4.6 Resultados y Discusión

4.6.1 Calidad de vitroplantas producidas a partir de semillas silvestres e *in vitro*.

Las plantas producidas a partir de la germinación de ambos tratamientos fueron sometidas a evaluación tres meses tras la siembra, siendo sometidos a la prueba de ANOVA y t de student con una p menor a 0.05; arrojando los siguientes resultados:



Figura 4. Plantas germinadas *in vitro* de *Heimia salicifolia* provenientes de semillas de cultivar y silvestres.

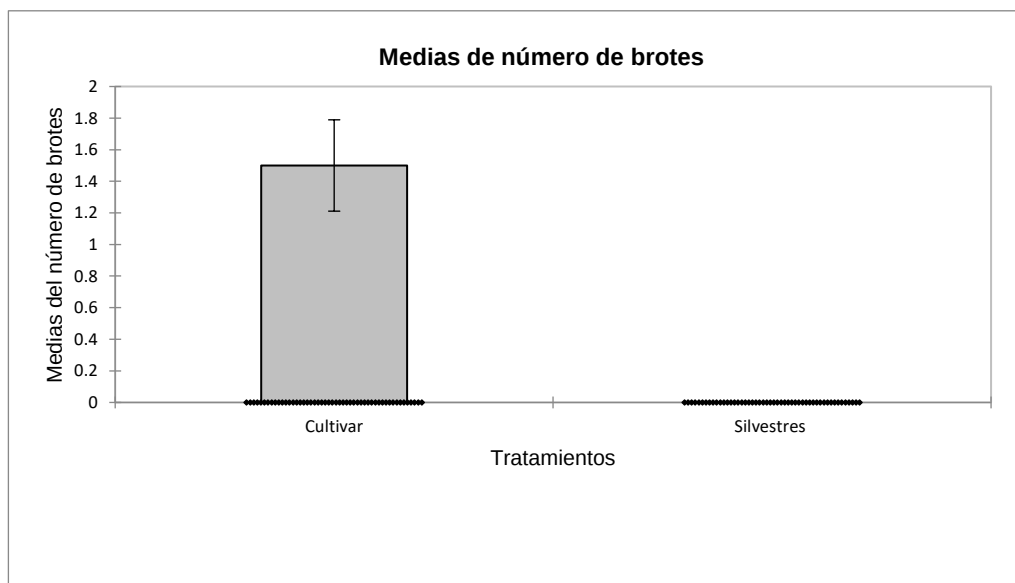


Figura 5. Medias del número de brotes en comparativa entre semillas germinadas de cultivar y silvestres de *Heimia salicifolia*.

Cuadro 4. Prueba de t de student con nivel de significancia a un intervalo del 95%.

Comparación	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor Crítico	Pr > Dif	Significativo
Cultivar vs Silvestres	1.500	10.299	1.984	<0.0001	Sí
q Rango estadístico			2.806		
Diferencia minima significativa:			0.409		
Categoría	Medias	Error estándar	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)	Grupos
Cultivar	1.500	0.146	1.211	1.789	a

Silvestres	0.000				b
-------------------	-------	--	--	--	----------

a: Grupo sin diferencias dentro del mismo.

b: Grupo sin diferencias dentro del mismo

Comparación de los grupos considerando $p < 0.001$; letras diferentes corresponden a diferencia significativa.

El análisis de la obtención de número de brotes a partir de ambos tratamientos, la diferencia significativa mostrada implica que las semillas de cultivar producen plantas con mayor número de brotes a lo largo de tres meses de crecimiento, optimizando el desarrollo y oportunidad de uso de explantes como hojas y tallos para la micropropagación o callogénesis de los tejidos mencionados. (Cuadro 4)

Otra variable fundamental analizada es la longitud de la planta, ya que de esta característica deriva la multiplicación vegetal y uso de explantes de distintas porciones de la planta. Se tiene diferencia significativa entre los tratamientos de origen silvestres y de cultivar de forma significativa con lo cual el tratamiento de cultivar diversifica e incrementa la producción del material vegetal. (Cuadro 5)

Cuadro 5. Análisis de varianza de la longitud entre vitroplantas tres meses tras la germinación de *Heimia salicifolia*.

Fuente	DF	Suma de Cuadrados	Cuadros de Media	F	Pr > F	Código de diferencia significativa
Modelo	1.000	47.472	47.472	202.297	<0.0001	***
Error	98.000	22.997	0.235			
Total	99.000	70.469				

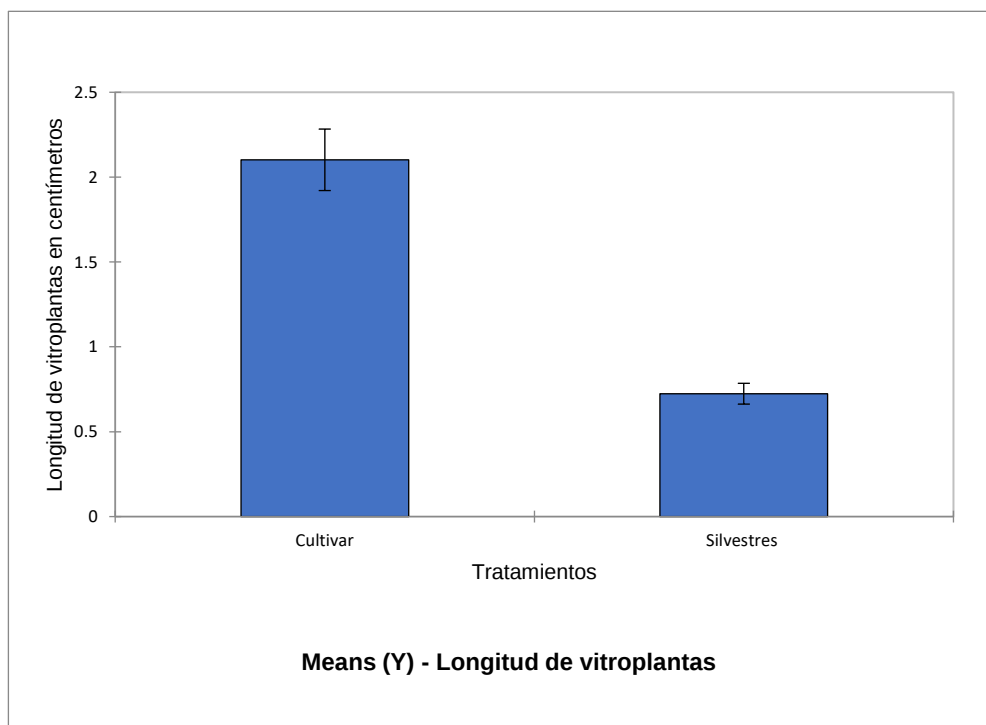


Figura 6. Comparación de medias por la longitud de las vitroplantas obtenidas de *Heimia salicifolia*.

La comparación de las medias entre la longitud de las vitroplantas (figura 6) también arroja diferencias significativas, lo cual es concluyente mediante el empleo de ANOVA para los valores arrojados, sin embargo, tras la confirmación con el ANOVA, es necesario el uso de la prueba de t de student con el 95% de intervalo de confianza, arrojando que en efecto existe diferencia significativa entre ambas vitroplantas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Prueba de t de student para la longitud de las vitroplantas, intervalo de confianza del 95%

Contraste	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significativo
Cultivar vs Silvestres	1.378	14.295	1.984	<0.0001	Sí

q rango estadístico:			2.806		
Diferencia mínima significativa:			0.256		
Categoría	Medias	Error estándar	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)	Grupos
Cultivar	2.102	0.091	1.921	2.283	a
Silvestres	0.724	0.031	0.663	0.785	b

a: Grupo sin diferencias dentro del mismo.

b: Grupo sin diferencias dentro del mismo

Comparación de los grupos considerando $p < 0.001$; letras diferentes corresponden a diferencia significativa.

La variable más importante de este análisis es la obtención de número de hojas, ya que a partir de este tejido es indispensable que se lleve a cabo la producción de callo, aplicable para la producción de metabolitos secundarios, ya que referencias previas indican que los principales metabolitos de la planta se encuentran en este tejido, refiriendo a una mayor probabilidad de éxito en la aplicación del protocolo. En el ANOVA de esta variable se concluye que existe diferencia significativa entre ambos tipos de semilla para la producción de una mayor cantidad de hojas a emplearse como explantes (Cuadro 7).

Cuadro 7. ANOVA del número de hojas producidas de vitroplantas de *Heimia salicifolia*.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Pr > F	Código de significancia de P
Modelo	1.000	2342.560	2342.560	489.031	<0.0001	***
Error	98.000	469.440	4.790			
Total	99.000	2812.000				

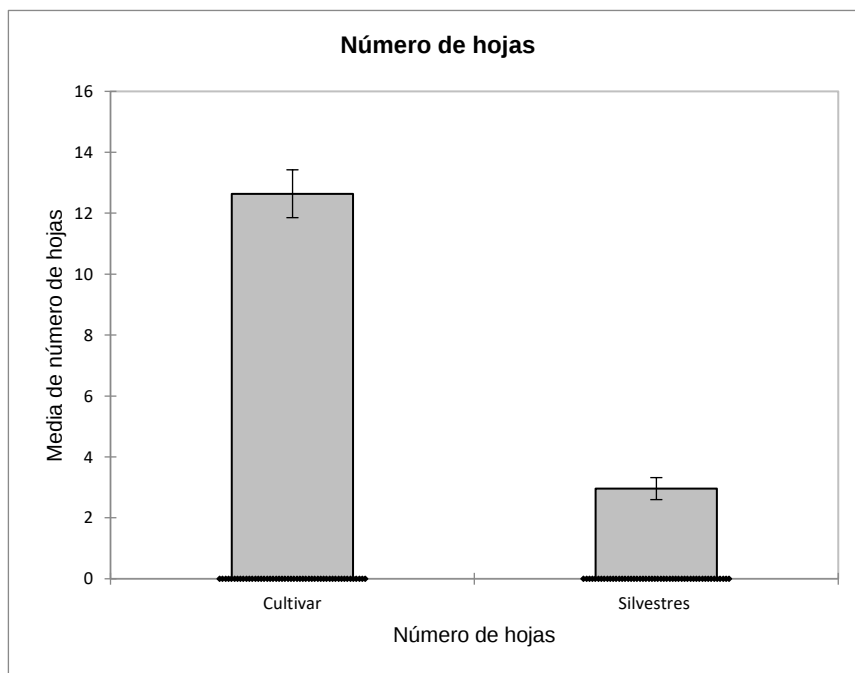


Figura 7. Comparativa de valores de referencia ANOVA para número de hojas de vitroplantas de *Heimia salicifolia*.

Una vez efectuado el ANOVA y observando la figura 7, sólo se requiere la confirmación de esta prueba evaluada mediante t de student, que provee de resultados significativos para la comparación de ambos tratamientos para la producción de número de hojas de *Heimia salicifolia* (Cuadro 8).

Cuadro 8. Prueba de t de student para la evaluación del número de hojas producidas de *Heimia salicifolia*.

Comparación	Diferencia	Diferencia estandarizada	Valor crítico	Pr > Diff	Significativo
Cultivar vs Silvestres	9.680	22.227	1.984	<0.0001	Sí
q rango estadístico:			2.806		

Diferencia mínima significativa			1.11		
Categoría	Medias	Error estándar	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)	Grupos
Cultivar	12.640	0.396	11.855	13.425	a
Silvestres	2.960	0.182	2.599	3.321	b

a: Grupo sin diferencias dentro del mismo.

b: Grupo sin diferencias dentro del mismo

Comparación de los grupos considerando $p < 0.001$; letras diferentes corresponden a diferencia significativa.

Los resultados obtenidos de estas pruebas permiten la identificación del mejor tratamiento para la elaboración de protocolos de la especie, es decir, el empleo de semillas de cultivar contra las semillas silvestres, las cuales producen características que no son óptimas para la investigación de la especie.

La característica más relevante para la especie, que es la producción de hojas, presentó diferencias significativas contundentes en la comparación de medias ANOVA y la prueba t de student, por lo cual se recomienda descartar el uso de semillas silvestres en esta etapa.

La especie se comporta de manera similar a protocolos previos en cuanto a tiempos de germinación y estadística de estas, como es el caso de previos referidos con semillas de cultivar (Schröder & Prasse, 2013).

Es importante señalar que el uso de semillas de cultivar se refiere directamente a una selección especializada sin importar la especie a lo largo del tiempo involucrando principalmente características como altura, floración, tipo de semillas obtenidas a partir de la crusa especializada de plantas y la producción de una mayor cantidad de biomasa lo cual les proporciona además de un menor lapso esperado para la investigación, sino también una mayor competencia a nivel ecológico una vez que estas son introducidas en cultivos *in situ* (Schröder & Prasse, 2013).

Entre los aspectos fundamentales que relacionan la calidad de la plántulas producidas por las semillas, se considera que la mayor parte de las semillas poseen características diferenciales desde la edad en la cual fueron recolectadas a partir de la planta madre y la posible alteración de polisacáridos de reserva en las semillas, alteración de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, así como la viabilidad reducida dadas las condiciones en las cuales se encontraban las plantas madre durante la recolección (Herrera et al., 2001).

4.6.2 Callogenesis/Desdiferenciación celular

Dado el éxito estadístico con las semillas de cultivar; se emplearon estos tejidos para la desdiferenciación celular; referencias sobre la producción de alcaloides y actividad metabólica en *Heimia salicifolia* apuntan reproducibilidad para producción de alcaloides bajo un sistema de cultivo *in vitro* suele ser exitosa para la producción de cultivos y su aprovechamiento de metabolitos secundarios, como alternativa a la obtención de estos usando plantas silvestres (Rojas et al., 1985).

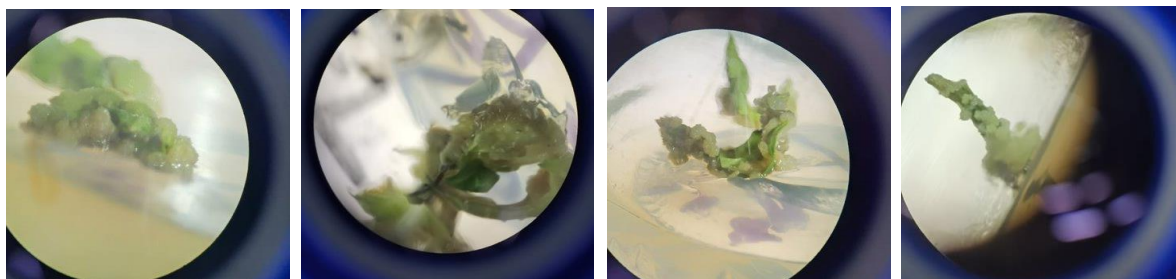


Figura 8. Callogénesis obtenida mediante el tratamiento 3 de *Heimia salicifolia*.

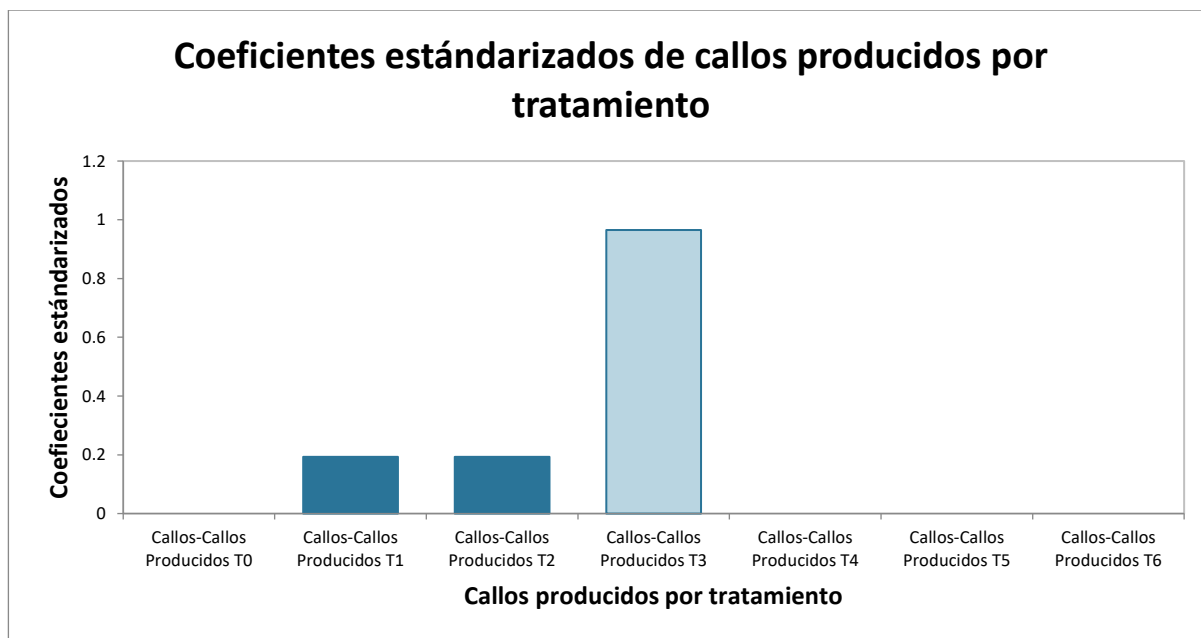


Figura 9. Coeficientes estandarizados para la comparación de los callos producidos de *Heimia salicifolia* por cada tratamiento.

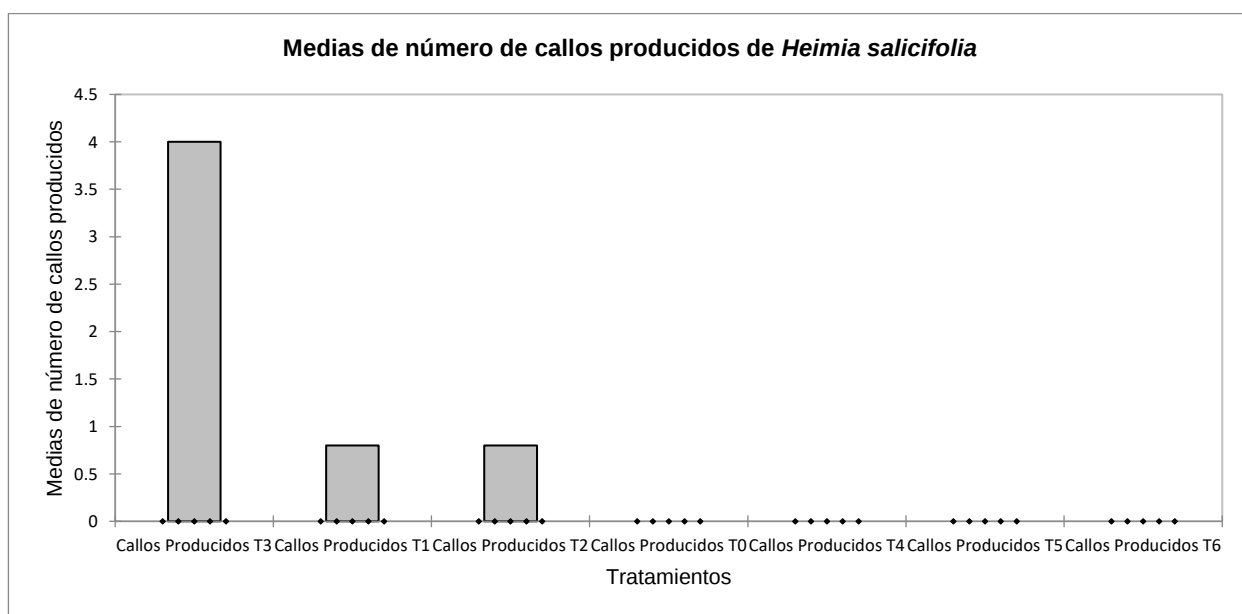


Figura 10. Comparación del número de callos producidos de *Heimia salicifolia* por tratamiento.

El número de callos producidos y los coeficientes estandarizados por cada tratamiento arroja las referencias para definir el mejor de los tratamientos, que pese a seleccionar el mejor de los explantes, es más relevante el número de callos que pueden producirse, ya que fue posible su obtención a partir de cualquier tejido, sin embargo, esto fue complementado mediante una prueba de ANOVA y su confirmación mediante tukey (DMSH) (Cuadro 9).

Cuadro 9. ANOVA referente al número de callos producidos de *Heimia salicifolia*.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Pr > F	Código de valor de significancia de <i>P</i>
Model	6.000	64.000	10.667	31.111	<0.0001	***
Error	28.000	9.600	0.343			
Corrected Total	34.000	73.600				

Cuadro 10. Prueba de tukey (DMSH) para la comparación del número de callos producidos de *Heimia salicifolia* por cada tratamiento.

Categoría	Medias	Grupos
Callos Producidos T3	4.000	a
Callos Producidos T1	0.800	b
Callos Producidos T2	0.800	b
Callos Producidos T0	0.000	b
Callos Producidos T4	0.000	b
Callos Producidos T5	0.000	b
Callos Producidos T6	0.000	b

a: Grupo sin diferencias dentro del mismo.

b: Grupo sin diferencias dentro del mismo

Comparación de los grupos considerando $p < 0.001$; letras diferentes corresponden a diferencia significativa.

Todas las pruebas efectuadas para la confirmación de diferencias significativas entre los tratamientos arrojan que el mejor de los tratamientos es el tratamiento 3, produciendo diferencias significativas con el resto de los tratamientos en el número de callos.

La producción eficaz de callos es relevante siempre que los reguladores de crecimiento empleados posean un balance adecuado según la especie, vitroplantas o tejidos desdiferenciados para la posterior regeneración de la especie partiendo de este punto (Irvani et al., 2010).

Los medios de cultivo para la producción de callos regularmente emplean un balance de reguladores de crecimiento involucrando principalmente auxinas, como lo son el 2-4D, ANA, KIN, IBA, permitiendo poco más de 10mm de regeneración vegetal a partir de la producción de callos (Ahmad et al., 2010). Por ello en este protocolo se combinaron reguladores en seis tratamientos diferentes, con la finalidad de obtener el mejor balance de reguladores para la desdiferenciación de los tejidos.

El número de callos producidos es una variable fundamental siempre y cuando esta se encuentre relacionada con la producción de biomasa o peso fresco derivado del explante y a su vez de la cantidad de peso fresco producido, lo cual define si el tratamiento es eficaz para el objetivo de la experimentación.

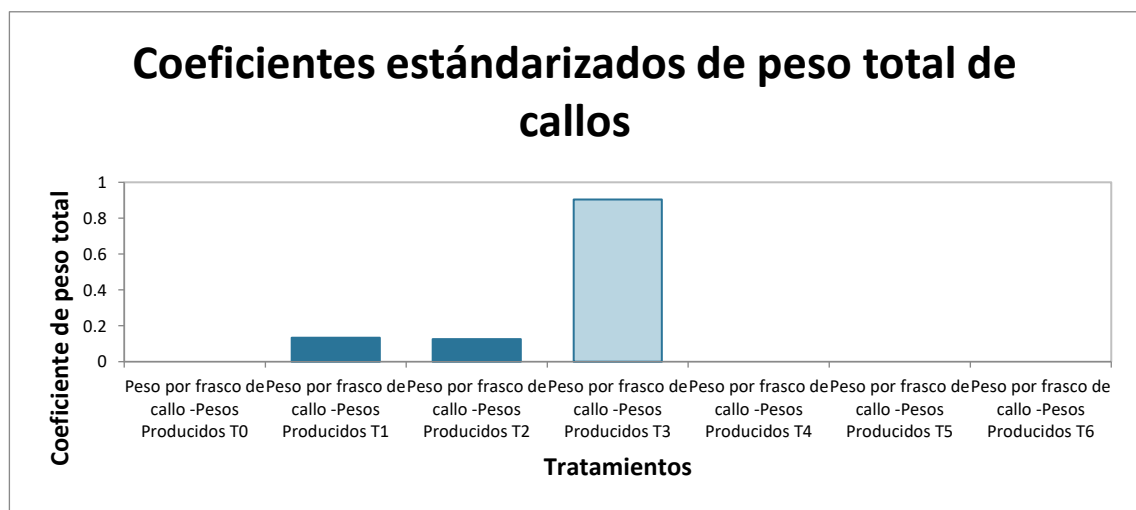


Figura 11. Coeficientes estandarizados del peso total de los callos producidos de *Heimia salicifolia* por cada tratamiento

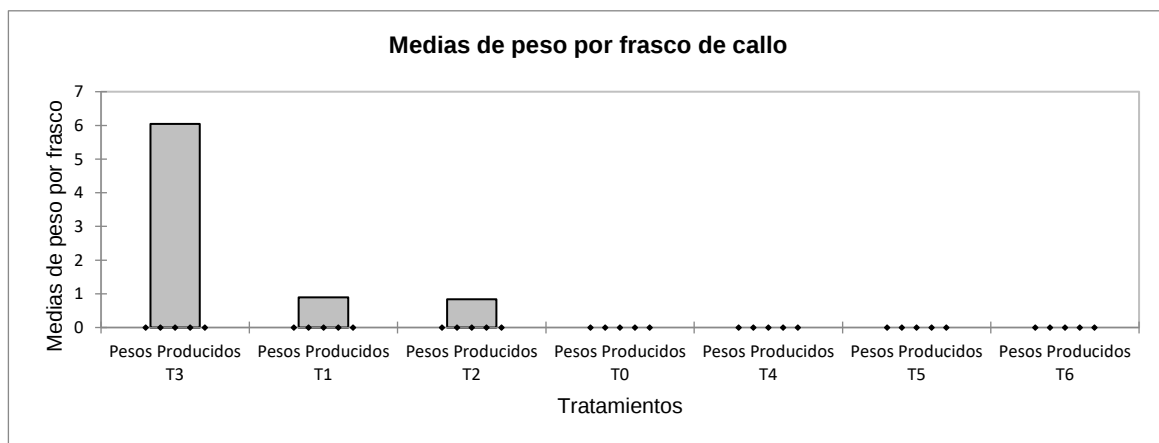


Figura 12. Peso total de los callos producidos de *Heimia salicifolia* por cada tratamiento.

Cuadro 11. ANOVA de peso producido de callo de *Heimia salicifolia* por cada tratamiento.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Pr > F	Código de significancia de valor de P
Modelo	6.000	146.769	24.461	15.387	<0.0001	***
Error	28.000	44.511	1.590			
Total corregido	34.000	191.280				

Cuadro 12. Prueba de tukey (DMSH) evaluando pesos producidos y establecimiento de diferencias significativas.

Categoría	Medias	Grupos	
Pesos Producidos T3	6.040	a	
Pesos Producidos T1	0.892		b

Pesos Producidos T2	0.840		b
Pesos Producidos T0	0.000		b
Pesos Producidos T4	0.000		b
Pesos Producidos T5	0.000		b
Pesos Producidos T6	0.000		b

a: Grupo sin diferencias dentro del mismo.

b: Grupo sin diferencias dentro del mismo

Comparación de los grupos considerando $p < 0.001$; letras diferentes corresponden a diferencia significativa.

El mejor de los tratamientos fue obtenido a partir del empleo de Zip, KIN, BAP a una concentración de 1.5 mg/L^{-1} y ANA a 3.0 mg/L^{-1} . Este tratamiento por lo tanto es el que representó diferencias significativas con el resto de los tratamientos aun conservando los explantes en las mismas condiciones físicas que no presentaron variaciones, acorde a los datos presentados en la figura 12, cuadro 11 y cuadro 12, la estadística que refiere a los pesos producidos por los tratamientos, también arroja diferencias significativas de este tratamiento con el resto.

Presuntamente se propone que el efecto de inducción de callo principalmente por el uso de ANA es sinérgico en lo que concierne al uso de BAP, produciendo callo en contraparte de regeneración de tejidos o brotes como se ha reportado en otra especie, siendo esto la justificación principal para la elaboración de protocolos especializados por especie (Wójcik & Podstolski, 2007).

4.7 Conclusión

Las vitroplantas poseen diferencias significativas en cuanto a la calidad de estas, basado en el número de hojas producidas, número de brotes y la longitud de los tallos, con lo cual es posible concluir que las semillas que preceden de una selección específica a lo largo de tiempo tienen una mayor probabilidad de éxito

inclusive en el cultivo *in vitro*, involucrando inclusive una selección de semillas de cultivar previo al inicio de un protocolo especializado con objetivos únicos.

Las vitroplantas provenientes de semillas de cultivar poseen mejores características para la producción de callo o desdiferenciación celular a partir de los distintos tejidos que se pueden obtener de una sola muestra de material o una sola semilla, comparado con lo que conllevaría la siembra de semillas de origen silvestre por un lapso mayor para la obtención de características de cultivar en un lapso menor.

El empleo del tratamiento suplementado con 2ip, KIN, BAP a una concentración de 1.5 mg/L⁻¹ y ANA a 3.0 mg/L⁻¹ produce la desdiferenciación celular estable y eficaz de tejidos de *Heimia salicifolia* con lo cual se podría proponer que este tratamiento sea eficaz para la elaboración de un protocolo más específico que conlleve a la producción de metabolitos *in vitro* para que estos puedan ser extraídos y sometidos a análisis, evitando así el uso de recursos biológicos provenientes de origen silvestre, ya que en este estudio se ha evaluado que la calidad de semillas o tejidos puede ser afectado por las condiciones ecológicas donde se extraiga la planta.

4.8 Literatura Citada

- Ahmad, N., Faisal, M., Anis, M., & Aref, I. (2010). *In vitro* callus induction and plant regeneration from leaf explants of *Ruta graveolens* L. *South African Journal of Botany*, 76(3), 597-600. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.03.008>
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). *Plant tissue culture: An introductory text*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>
- Darigh, F., Iranbakhsh, A., Ardebili, Z. O., Ebadi, M., & Hassanpour, H. (2022). Simulated microgravity contributed to modification of callogenesis performance and secondary metabolite production in *Cannabis indica*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 186, 157-168. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.07.012>

- Gupta, S. M., Pandey, P., Grover, A., & Ahmed, Z. (2011). Breaking seed dormancy in *Hippophae salicifolia*, a high value medicinal plant. *Physiology and Molecular Biology of Plants/Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(4), 403-406. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0082-6>
- Herrera, M. L., Rivera, J. A., Trejo, C., & Peña-Valdivia, C. (2001). Differences in seed germination of wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in response to storage. *South African Journal of Botany*, 67(4), 620-628. [https://doi.org/10.1016/s0254-6299\(15\)31192-3](https://doi.org/10.1016/s0254-6299(15)31192-3)
- Hesami, M., Baiton, A., Alizadeh, M., Pepe, M., Torkamaneh, D., & Jones, A. M. P. (2021). Advances and perspectives in tissue culture and genetic engineering of Cannabis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5671. <https://doi.org/10.3390/ijms22115671>
- Irvani, N., Solouki, M., Omid, M., Zare, A. R., & Shahnazi, S. (2009). Callus induction and plant regeneration in *Dorema ammoniacum* D., an endangered medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 100(3), 293-299. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9650-7>
- Malone, M. H., & Rother, A. (1994c). *Heimia salicifolia*: A phytochemical and phytopharmacologic review. *Journal of Ethnopharmacology*, 42(3), 135-159. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)90080-9)
- Martínez, G., Rey, J. C., Pargas, R., Guerra, C., Manzanilla, E., & Ramírez, H. (2021b). Efecto de sustratos y fuentes orgánicas en la propagación de banano y plátano. *Agronomía Mesoamericana*, 32(3), 808-822. <https://doi.org/10.15517/am.v32i3.42490>
- Nonogaki H., George W., & J. Derek B. (2010). Germination-still a mystery. *Plant Science*, 179(6), 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.02.010>
- Ram, K., & Shekhawat, N. S. (2011). Micropropagation of commercially cultivated Henna (*Lawsonia inermis*) using nodal explants. *Physiology and Molecular Biology of Plants/Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(3), 281-289. <https://doi.org/10.1007/s12298-011-0069-3>
- Roja, P. C., Benjamin, B. D., Heble, M. R., & Chadha, M. S. (1985). Indole alkaloids from multiple shoot cultures of *Rauwolfia serpentina*. *Planta Medica*, 51(01), 73-74. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969402>
- Schröder, R., & Prasse, R. (2013). Do cultivated varieties of native plants have the ability to outperform their wild relatives? *PloS One*, 8(8), e71066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071066>

- Schultes, R. E. (1976). Indole alkaloids in plant hallucinogens. *Journal of Psychedelic Drugs*, 8(1), 7-25. <https://doi.org/10.1080/02791072.1976.10472004>
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169-180. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0031-3>
- Wójcik, A., & Podstolski, A. (2007). Leaf explant response in *in vitro* culture of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(2), 151-156. <https://doi.org/10.1007/s11738-006-0019-9>
- Yoo, J. H., Seong, E. S., Ghimire, B. K., Heo, K., Jin, X., Yamada, T., Clark, L. V., Sacks, E. J., & Yu, C. Y. (2018). Establishment of *Miscanthus sinensis* with decreased lignin biosynthesis by *Agrobacterium*–mediated transformation using antisense COMT gene. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 133(3), 359-369. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1389-6>

5. ANALÍISIS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Heimia Salicifolia* (Kunth) Link PROCEDENTE DE TEJIDOS SILVESTRES.

5.1 Resumen

Heimia salicifolia es una planta medicinal empleada desde tiempos prehispánicos como remedio tradicional para múltiples afectaciones en el ser humano, además del empleo como droga religiosa en rituales de alta estirpe ceremonial. Los metabolitos secundarios *Heimia salicifolia* fueron obtenidos a partir de plantas silvestres de la localidad de San Cristóbal de las Casas, Chiapas. Se consideró la manipulación de tejidos dependiente del uso de metanol y hexano para la alcalinización de tejidos, la dilución acuosa en ácido, acetona y la separación a partir de la obtención de fracciones en fase orgánica o acuosa, contemplando y regulando el pH, dado que este al ser superior a 9.5 podría derivar en la pérdida de los alcaloides fenólicos que posee la planta. La planta contiene clorofila, pigmentos, goma, glucosa, aceites, almidón y rastros volátiles de aceites. Reporta a partir de este protocolo la presencia de alcaloides, fenoles, taninos y terpenos en proporciones similares a plantas empleadas como blanco para estudios básicos del porcentaje de obtención que permite cada material vegetal en concentraciones y pesos estandarizados de los extractos. Con lo cual se considera que las metodologías básicas aplicadas para esta extracción son suficientes para contabilizar los metabolitos extraídos, sin embargo, es necesario el uso de tecnologías más avanzadas y costosas para la elucidación específica de compuestos y su cuantificación puntual.

Palabras clave: Plantas medicinales, alcaloides, fenoles, taninos, terpenos, metabolitos secundarios.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, Universidad Autónoma de Chapingo.

Autor: Fernando Ordoñez Posadas

Director de Tesis: José Luis Rodríguez de la O.

5.2 Abstract

Heimia salicifolia is a medicinal plant used by the Aztec in the prehispanic period with traditional uses for affectations in humans, even they employ it as a religious drug for rituals from high ceremonial lineage. Secondary metabolites that exist in *Heimia salicifolia* were obtained using wild explants from the plant form San Cristóbal de las Casas, Chiapas. We consider some aspects for the extract of the metabolites like the use of ethanol, chloroform, acidic dilution, acetone and filtering from the aqueous and organic phase, regulating pH to not lose fraction of the secondary metabolites in the plant. This herbaceous shrub contains chlorophyll, pigments, gum, glucose, lipids, starch, volatile oils. After this protocol, the plant report alkaloids, phenols, tannins, and terpenes in similar proportions like the ones that researchers use for the basic studies for percentage, concentration and standardized weight of the vegetal extracts. With these basic applied methodologies for the extraction, we can quantify the metabolites, nevertheless, it is necessary to acquire and apply sophisticated and expensive technologies for the specific elucidation of compounds and its punctual quantification.

Palabras clave: Medicinal plants, alkaloids, phenols, tannins, terpenes, and secondary metabolites.

Thesis for Master of Science in Agriculture Biotechnology. Universidad Autónoma de Chapingo.

Author: Fernando Ordoñez Posadas

Thesis director: José Luis Rodríguez de la O.

5.3 Introducción

Heimia salicifolia se considera como una especie psicoactiva que permanece como una droga legal dada la poca relevancia o transmisión de conocimientos sobre cómo es producida la bebida que deriva en efectos de alteración espacio temporales (Malone & Rother, 1994).

La especie produce efectos de se encuentra en declive poblacional, siendo buscada como alternativa legal para uso lúdico, su comercialización y venta en el mercado negro, produciendo pérdidas y robo en su envío. Además de su saqueo silvestre dado su valor farmacológico, ornamental y hortícola (Arceusz et al., 2010).

Compuestos no nitrogenados como triterpenos, ácido ursólico y sitosterol, además de manitol, pero no se han elucidado aún compuestos de menor ocurrencia universal (Keller, 1981).

Los alcaloides más estudiados hasta el momento son lactonas de bifenílquinolizidina, entre las que se encuentran la vertina, lifolina, litrina y nesodina; encontradas únicamente en la familia Lythraceae. Además de otros usos, la ingesta de *Heimia salicifolia* podría ocasionar abortión en borregos y vacas; mientras que, en humanos, su ingesta produce distorsiones espaciotemporales desde la época prehispánica y es posible su empleo como repelente de mosquitos y otros insectos, lo que estimula su comprobación experimental (Díaz, 1999).

Todos los alcaloides de *Heimia* poseen un anillo de quinolizidina que es sustituido en la posición 2 por un grupo oxígeno orientado de forma axial y un anillo aromático orientado de forma ecuatorial en la posición 4. En los alcaloides mayores se produce la unión de un anillo C mediante un puente bifeníl hacia un grupo para-hidroxycinamóil que forma una lactona con el oxígeno del C-2. Además de ello se produce una quiralidad en el anillo D a partir de la ubicación de un grupo hidroxilo, evitando que los alcaloides sean planos (Rother, 1985).

Las diferencias estructurales se dan por la unión al anillo de quinolizidina dada una inversión del C-10 que produce un cambio conformacional en el anillo A, siendo *cis* como la vertina o *trans* como la litrina y nesodina, siendo estos últimos más básicos por su apareamiento sencillo de nitrógeno (Rother, 1985).

En la especie también se han encontrado compuestos no nitrogenados como lo son triterpenos, por ejemplo, el ácido ursólico y el sitosterol, así como el ácido elágico y manitol (Dobberstein et al., 1975).

El uso de resonancia magnética nuclear, ha permitido la elucidación de las estructuras de los compuestos mencionados anteriormente y la adición de dos compuestos nuevos encontrados en la planta, los cuales aún no han sido analizados para su uso con algún potencial biológico, implicando que la planta aún posee compuestos que no han sido determinados y que pueden depender de la etapa biológica de desarrollo o sitio de extracción del material vegetal (Rumalla et al., 2008).

El análisis de los compuestos de *Heimia salicifolia* llevados a cabo por Rumalla conllevaron a un estudio más extenuante sobre su composición dado que a la fecha aún no ha sido elucidada la molécula que posee el potencial psicotomimético principal de la especie. Además de los alcaloides ya mencionados, fueron descubiertas seis lactonas de bifenilquinolizidina a partir de análisis espectrofotométricos y relaciones químicas con HRESIMS (Kitajima et al., 2019).

Por lo cual se considera esencial para su análisis completo de la especie, protocolos de extracción y análisis biológicos. Siendo indispensable además la determinación de si la planta posee terpenos, fenoles, taninos y otros compuestos que puedan relacionarse con el uso medicinal (Kitajima et al., 2019).

Múltiples referencias indican que esta planta tiene reputación de comportarse como un psicotomimético induciendo una alteración psicótica, de comportamiento y personalidad. Estos efectos posiblemente producidos a partir

de la decocción de las plantas, es necesario el empleo de más de 15 mg para la experimentación de los efectos mediante la ebullición de las hojas en 250 ml (Schultes, 1976).

Referencias previas aseguran que su uso asegura la felicidad, energía y gozo, a partir de la maceración de hojas en combinación con etanol para potenciar su efecto sedativo. (Dobberstein et al., 1975).

Desde 1896 no se han llevado a cabo experimentos para evaluar la afectación al sistema nervioso central sin el empleo de decocción mediante etanol equivalente a 15 hojas, por lo cual, probablemente deba implementarse un aumento en la dosis (Malone & Rother, 1994).

Estudios no específicos muestran que extractos de partes aéreas de *Heimia salicifolia* son activos en la regulación del colesterol sérico, además de la capacidad de incrementar la dosis para reducir niveles de presión sanguínea, también se ha empleado la extracción de partes aéreas mediante etanol 20 % con efectos satisfactorios en la actividad contra *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* (Pérez & Anesini, 1994).

Además de la presencia de los alcaloides verdaderos de la planta (lactonas de bifenilquinolizidina), hay otros compuestos como la sinicuichina, que no poseen estudios previos o experimentales, además, las rutas de síntesis de todos los compuestos, no ha sido elucidada hasta el momento (Kitajima et al. 2019).

El enfoque de este estudio fue la elucidación de metabolitos secundarios relacionados con la actividad psicotomimética, que no han tenido relevancia en las investigaciones recientes (Kitajima et al. 2019). Es de gran relevancia la elucidación de otros metabolitos secundarios que podrían estar interactuando a nivel molecular con la planta en la producción de efectos alucinógenos, así como en los efectos medicinales mencionados previamente, por lo cual se buscó evaluar la presencia de terpenos, taninos, alcaloides y fenoles con la finalidad de confirmar su presencia en material vegetal silvestre disponible.

5.4 Materiales y Métodos

Se obtuvieron muestras de material vegetal en San Cristóbal de las Casas, Chiapas, bajo condiciones totalmente aleatorias y expuestas a factores de estrés. El análisis a partir de un protocolo de extracción específico permite la obtención de metabolitos secundarios de tallos y hojas liofilizadas con la finalidad de evitar la extracción de agua como primer punto para el análisis de metabolitos.

5.4.1 Métodos de extracción

Para la extracción de los metabolitos provenientes de *Heimia salicifolia*, se propuso el uso de un Soxhlet con un cartucho de 500 g de la planta, mientras que a su vez 500 g de material fueron dispuestos en un recipiente para la extracción mediante macerado, comparando así la obtención de los metabolitos mediante ambos procesos de extracción.

Para ambas extracciones se empleó hexano con la finalidad de eliminar grasas, almidón y agentes intrusivos en las lecturas de los metabolitos, número de recuperaciones y tiempo aproximado que conlleva la extracción por cada uno de los métodos para la eliminación aparente o visible de estos compuestos.

Tras la obtención de una coloración casi clara, la extracción se continuó mediante metanol, se contabilizó el tiempo de recuperación, hasta que la extracción de mostrar clara. Todos los extractos fueron sometidos a pruebas rápidas para la evaluación de compuestos secundarios obtenidos a partir de ambas extracciones.



Figura 13. Extracción de compuestos orgánicos de *Heimia salicifolia* en soxhlet y macerado.

Una vez finalizado el proceso de extracción de los compuestos a partir de los solventes establecidos previamente en el protocolo, se elaboraron pruebas rápidas de detección de los compuestos, así como cromatografía en placa y espectrofotometría con finalidad de cuantificar los compuestos y evaluar su concentración a partir del empleo de HPLC, en un inicio, para las plantas de origen silvestre.

5.5 Resultados y discusión

La extracción de los compuestos provenientes del material vegetal silvestre permitió la elaboración de pruebas preliminares que arrojaron resultados de cruces considerando tanto el método de extracción, como el agente de extracción (metanol y hexano).

Cuadro 13. Resultados de pruebas preliminares de los compuestos obtenidos de plantas silvestres de *Heimia salicifolia* a partir de cuatro métodos de extracción diferentes.

Solvente	Alcaloides	Flavonoides	Taninos	Fenoles	Terpenos	Saponinas
Metanol (Soxhlet)	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Doble Positivo	Negativo
Metanol (Macerado)	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Doble positivo	Negativo
Hexano (Soxhlet)	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
Hexano (Macerado)	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
Blanco Específico	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Cuadro 14. Resultados de prueba de cruces para compuestos obtenidos a partir de cuatro métodos de extracción diferentes para *Heimia salicifolia* obtenida de forma silvestre.

Solvente/Compuesto	Alcaloides	Taninos	Fenoles	Terpenos
Metanol (Soxhlet)	++	++	+	+
Metanol (Macerado)	++	++	+	+
Hexano (Soxhlet)	++	++	++	++
Hexano (Macerado)	++	++	++	++
Blanco Específico	+	+	++	+
Negativo	-	-	-	-

Una vez obtenida la prueba de detección de metabolitos secundarios a través de la técnica de cromatografía, se procedió a la cuantificación de estos a partir de su lectura en espectrofotometría de acuerdo con el protocolo con el metabolito de interés, así como la facilidad de detección y características de colorimetría.

a) Taninos (Proantocianidinas): La metodología empleada implicó el uso de *Quercus* sp. como testigo positivo de la reacción para la evaluación en la lectura a 550nm calculando la observancia y el contenido de taninos de cada extracción considerado a partir del cálculo siguiente:

Taninos % = Abs. 550nm x 78.26 x F.d. (%MS); Donde: F.d. es el factor de dilución y %MS es el porcentaje de materia seca, quedando el 90% de MS.

Las lecturas obtenidas fueron las siguientes:

Cuadro 15. Taninos obtenidos a partir de las muestras extraídas de *Heimia salicifolia*.

Muestras	Taninos %
BLANCO	0
Blanco Positivo	180.029304
Hexano Macerado	12.255516
Hexano Soxhlet	16.481556
Metanol Soxhlet	29.159676
Metanol Macerado	35.498736
Concentrado (100mg)	84.309498

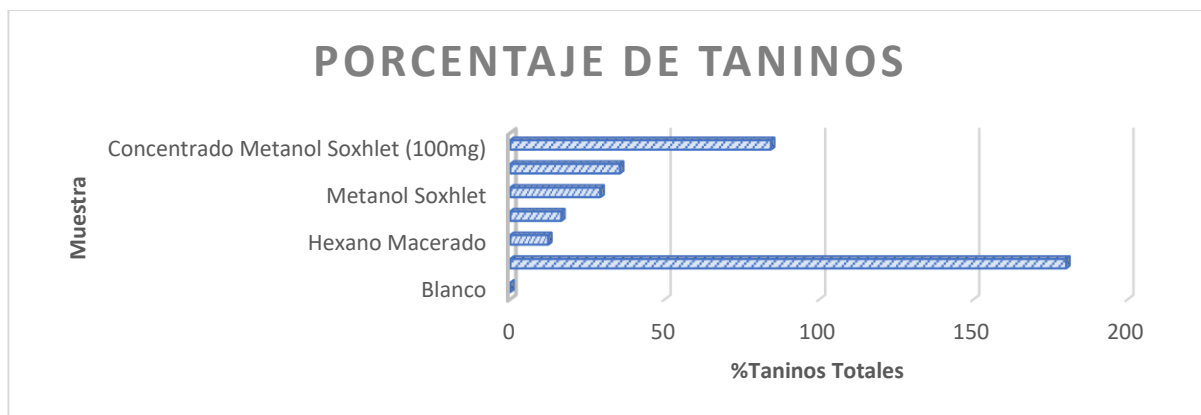


Figura 14. Concentración de taninos totales obtenidos de *Heimia salicifolia* mediante espectrofotometría.

La concentración de taninos en *Heimia salicifolia* se considera menor a la que es posible obtener en *Quercus* sp. con las mismas concentraciones y factor de dilución, sin embargo, estos compuestos se encuentran presentes y es posible incrementar su concentración a partir del uso de mayor peso seco, es decir, 100mg contra 10mg empleados en la muestra original de cada uno de los extractos.

b) Fenoles: La metodología para la obtención de fenoles totales de muestras sometidas a análisis mediante espectrofotometría implica el empleo de ácido gálico a distintas concentraciones para la elaboración de una amplitud de curva patrón que permita englobar los fenoles obtenidos de las muestras de interés. Una vez elaborada la curva patrón, se evalúan los datos y son leídos a 740nm, una vez leídos, se evalúan a partir de la siguiente fórmula:

$$X = Y / \text{CURVA} = X \mu\text{g} / 20\mu\text{l del extracto (S)}$$

$$1\text{gps} \text{---} 10\text{ml del extracto: } S/\text{gps}X_2 :: S/\text{gps}X :: \text{mg/gps.}$$

Cuadro 16. Fenoles totales obtenidos mediante curva patrón y análisis de las muestras de extractos de *Heimia salicifolia*.

Muestra	Fenoles Totales
25	0.404589372
25	0.480072464
50	0.80615942
50	0.797101449
100	1.132246377
100	1.204710145
200	1.265096618
200	1.271135266
300	1.343599034
300	1.322463768
400	1.328502415
400	1.391908213
500	1.422101449
500	1.527777778
Hexano Soxhlet	1.325483092
Metanol Soxhlet	1.52173913
Metanol Macerado	1.346618357
Hexano Macerado	1.274154589

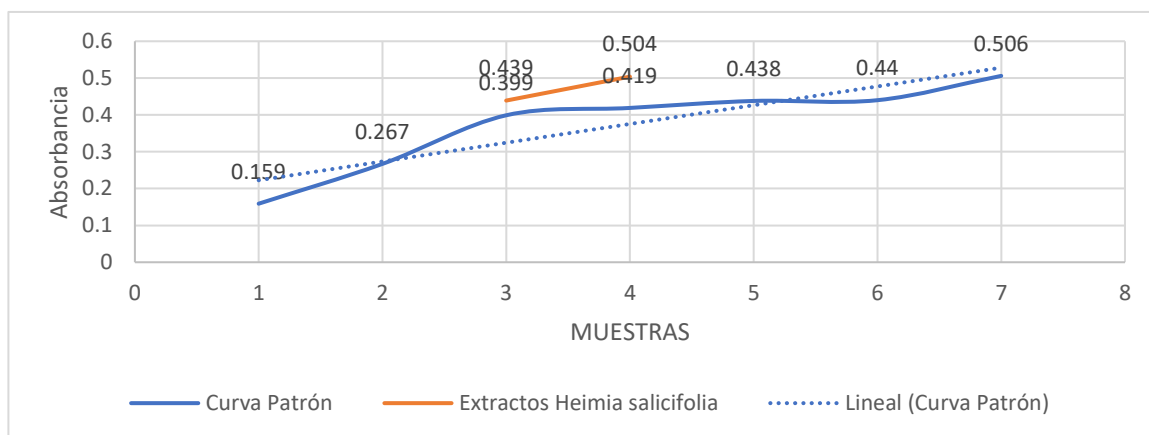


Figura 16. Curva patrón para extractos de *Heimia salicifolia* obtenida a partir de diluciones a diferentes concentraciones de ácido gálico.

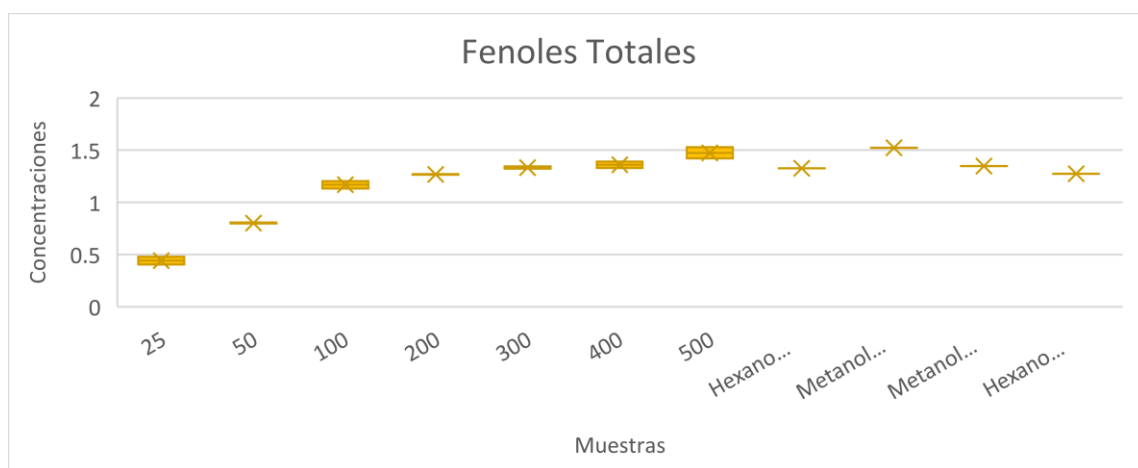


Figura 17. Comparación de fenoles totales obtenidos de ácido gálico y muestras de extractos de *Heimia salicifolia*.

El contenido de fenoles se considera dentro de la amplitud de la curva calibrada a partir de lectura previa con los testigos, con lo cual es posible determinar que en *Heimia salicifolia*, es posible encontrar alto contenido de flavonoides. Considerando que las técnicas de extracción fueron exitosas para la extracción de estos compuestos.

c) Terpenos: Los terpenos fueron analizados a partir de la elaboración de una curva patrón mediante dilución de los extractos, obteniendo los resultados siguientes:



Figura 17. Curva patrón de terpenos obtenidos de extractos de *Heimia salicifolia*.

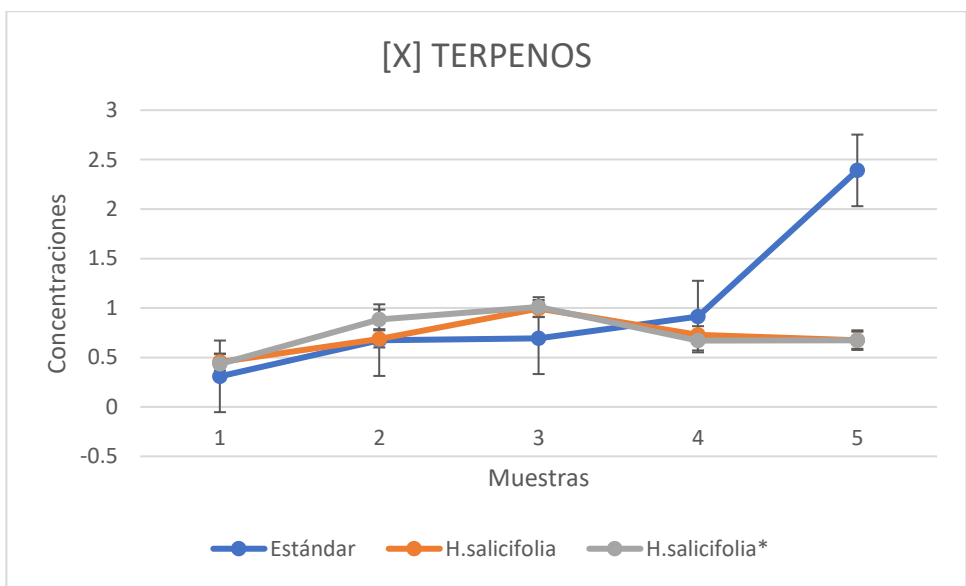


Figura 18. Comparación de curvas obtenidas a partir de curva estándar y duplicados de extractos de *Heimia salicifolia*.

Las muestras obtenidas mediante ambas extracciones muestran que los valores pese a encontrarse dentro de la curva, son menores, si bien estos están presentes, es necesario no diluir los extractos para obtener resultados similares a la curva patrón efectuada a A550nm.

La obtención de tejido desdiferenciado propone una nueva ventana para la producción de metabolitos secundarios de *Heimia salicifolia* con la finalidad de facilitar su estudio a profundidad ya que es posible obtener acorde a referencias previas, algunos de estos compuestos bioactivos. Es necesario además que se analice a profundidad la calidad, cantidad y uso de metabolitos secundarios aquí descritos, que a menudo suelen ser más relevantes en otras especies (Chandran et al., 2020).

5.6 Conclusión

La extracción de metabolitos secundarios de *Heimia salicifolia* es un reto, ya que, si bien la planta se considera de interés farmacológico, no hay información completa sobre los metabolitos secundarios mencionados en este protocolo, sólo se encuentra información completa referente a alcaloides de esta especie.

La extracción de otros metabolitos secundarios además de alcaloides, como lo fueron taninos, fenoles y terpenos a partir de metodologías básicas, presupone que el interés hacia la especie ha sido mínimo y que además de ello, es requerido ampliar el campo de estudio, con la finalidad de evaluar las interacciones que pueden suceder a nivel molecular con los metabolitos relacionados.

Es necesario a partir de este protocolo que los compuestos identificados y cuantificados a partir de espectrofotometría sean estudiados más a profundidad para definir sus características y sus rutas de síntesis.

Se considera que el protocolo podría funcionar como un preámbulo a investigaciones más avanzadas mediante tecnologías como la resonancia magnética nuclear, ya que de ello depende su análisis para aplicaciones farmacológicas o de alguna otra índole industrial.

5.7 Literatura Citada

Arceusz, A., Radecka, I., & Wesolowski, M. (2010). Identification of diversity in elements content in medicinal plants belonging to different plant

families. *Food Chemistry*, 120(1), 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.068>

Chandran, H., Meena, M., Barupal, T., & Sharma, K. (2020). Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports*, 26, e00450. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00450>

Díaz D. (1999, November). Xochipilli: Príncipe de las flores. *Arqueología Mexicana*, 7(39), 52–53.

Dobberstein, R., Edwards, J., & Schwarting, A. (1975). The sequential appearance and metabolism of alkaloids in *Heimia salicifolia*. *Phytochemistry*, 14(8), 1769-1775. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85291-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85291-5)

Keller, W. J. (1981). Alkaloid Variation in *Lupinus holosericeus*. *Journal of Natural Products*, 44(3), 357-359. <https://doi.org/10.1021/np50015a021>

Kitajima, M., Yamaguchi, Y., Yanagisawa, T., Kogure, N., Ogata, J., Kikura-Hanajiri, R., & Takayama, H. (2019). Biphenyl quinolizidine lactone alkaloids from “sinicuichi” (*Heimia salicifolia*). *Tetrahedron*, 75(27), 3733-3739. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.05.045>

Malone, M. H., & Rother, A. (1994d). *Heimia salicifolia*: A phytochemical and phytopharmacologic review. *Journal of Ethnopharmacology*, 42(3), 135-159. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)90080-9)

Pérez, C., & Anesini, C. (1994). *In vitro* antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 44(1), 41-46. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)90097-3](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)90097-3)

Rother, A. (1985). The phenyl- and biphenylquinolizidines of *in-vitro* grown *Heimia salicifolia*. *Journal of Natural Products*, 48(1), 33-41. <https://doi.org/10.1021/np50037a006>

Rumalla, C. S., Jadhav, A. N., Smillie, T., Fronczek, F. R., & Khan, I. A. (2008). Alkaloids from *Heimia salicifolia*. *Phytochemistry*, 69(8), 1756-1762. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.01.028>

Schultes, R. E. (1976b). Indole alkaloids in plant hallucinogens. *Journal of Psychedelic Drugs*, 8(1), 7-25. <https://doi.org/10.1080/02791072.1976.10472004>