



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA  
POSGRADO EN HORTICULTURA**

**PROPAGACIÓN *in vitro* DE *GENTIANA SPATHACEA* KUNTH  
Y ANÁLISIS DE SU COMPOSICIÓN QUÍMICA**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Presenta:

LETICIA MORALES TELLEZ

Bajo la supervisión de:

JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O, DOCTOR



**APROBADA**



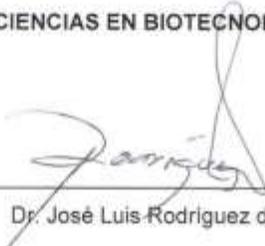
Chapingo, Estado de México, mayo, 2020

**PROPAGACIÓN *in vitro* DE GENTIANA SPATHACEA KUNTH  
Y ANÁLISIS DE SU COMPOSICIÓN QUÍMICA**

Tesis realizada por **LETICIA MORALES TELLEZ**, bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

DIRECTOR: \_\_\_\_\_

  
Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR: \_\_\_\_\_

  
Dr. Ramón Marcos Soto Hernández

ASESOR: \_\_\_\_\_

  
Dr. Luis Fernando Contreras Cruz

## CONTENIDO

|  |           |
|--|-----------|
| LISTA DE FIGURAS .....   | VI        |
| DEDICATORIA.....   | VIII      |
| AGRADECIMIENTOS .....  | IX        |
| DATOS BIBLIOGRÁFICOS.....  | X         |
| ABSTRACT .....   | XII       |
| <b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. OBJETIVO GENERAL.....   | 2         |
| 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 2         |
| 1.3. HIPÓTESIS.....  | 3         |
| <b>2. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>   | <b>4</b>  |
| 2.1. TAXONOMÍA Y DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA .....   | 4         |
| 2.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA .....   | 5         |
| 2.3. ECOFISIOLOGÍA Y REPRODUCCIÓN .....  | 6         |
| 2.4. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, UNA ALTERNATIVA PARA LA PRODUCCIÓN DE<br>PLANTAS .....      | 7         |
| 2.5. COMPUESTOS QUÍMICOS DE ESPECIES VEGETALES .....   | 7         |
| 2.6. LITERATURA CITADA.....  | 9         |
| <b>3. PROPAGACIÓN <i>in vitro</i> DE FLOR DE HIELO (<i>GENTIANA SPHATACEA</i> KUNTH) .....</b> | <b>12</b> |
| RESUMEN.....   | 12        |
| ABSTRAC .....  | 13        |
| 3.1. INTRODUCCIÓN .....  | 14        |
| 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 15        |
| 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 17        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 3.4.      | CONCLUSIONES .....  | 25        |
| 3.5.      | LITERATURA CITADA.....  | 26        |
| <b>4.</b> | <b>IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS DE <i>GENTIANA SPATHACEA</i> KUNTH EN<br/>AMBIENTES DIFERENTES.....</b>            | <b>28</b> |
|           | RESUMEN.....  | 28        |
|           | ABSTRACT .....  | 29        |
| 4.1.      | INTRODUCCIÓN .....  | 30        |
| 4.2.      | MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 31        |
| 4.3.      | RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 35        |
| 4.4.      | CONCLUSIONES .....  | 43        |
| 4.5.      | LITERATURA CITADA.....  | 43        |
| <b>5.</b> | <b>INDUCCIÓN DE CALLOGÉNESIS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE FLOR DE HIELO<br/>(<i>GENTIANA SPATHACEA</i> KUNTH).....</b> | <b>46</b> |
|           | RESUMEN.....  | 46        |
|           | ABSTRAC .....   | 47        |
| 5.1.      | INTRODUCCIÓN .....  | 48        |
| 5.2.      | MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 49        |
| 5.3.      | RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....  | 51        |
| 5.4.      | CONCLUSIONES .....  | 56        |
| 5.5.      | LITERATURA CITADA.....  | 56        |

## LISTA DE CUADROS

|   |    |
|---|----|
| Cuadro 1. Tratamientos y concentraciones aplicados en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>G. spathacea</i> .   | 16 |
| Cuadro 2. Tratamientos y concentraciones aplicados en la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>G. spathacea</i> .  | 16 |
| Cuadro 3. Efecto de tres auxinas AIA, AIB y ANA con diferentes concentraciones (0.1, 0.3 y 1.0 mgL <sup>-1</sup> ) en el enraizamiento de brotes de <i>G. spathacea</i> . | 22 |
| Cuadro 4. . Control positivo e indicador para la identificación preliminar de los metabolitos secundarios en <i>G. spathacea</i> .  | 32 |
| Cuadro 5. Sistema de elución y revelador de los metabolitos secundarios, empleados para el análisis fitoquímico de <i>G. spathacea</i> .                                  | 32 |
| Cuadro 6. Resultados del análisis preliminar de metabolitos secundarios en <i>G. sphatacea</i> determinado por coloración y precipitado.                                  | 35 |
| Cuadro 7. Cuantificación de taninos (proantocianidinas) en <i>G. spathacea</i> con extracto en acetona al 70 %.   | 37 |
| Cuadro 8. Cuantificación de flavonoides totales en <i>G. spathacea</i> en extracto metanólico al 80 %.  | 38 |
| Cuadro 9. Cuantificación de triterpenos totales en <i>G. spathacea</i> en extracto de etanol al 70 %.   | 39 |
| Cuadro 10. Cuantificación de fenoles totales de <i>G. spathacea</i> con extracto en metanol al 80 %.  | 40 |
| Cuadro 11. Concentraciones y reguladores de crecimiento utilizados en la inducción de callos (primer experimento) a partir de hojas de <i>G. spathacea</i> .              | 49 |

|   |    |
|---|----|
| Cuadro 12. Concentraciones y reguladores de crecimiento utilizados en la inducción de callos a partir de hojas de <i>G. spathacea</i> . .....                 | 50 |
| Cuadro 13. Descripción de los callos obtenidos en los tratamientos con más de 0.5 de probabilidad para producir tejido calloso en <i>G. spathacea</i> . ..... | 53 |

### LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. <i>Gentiana spathacea</i> Kunth: a y c) botones florales, b) corola, d) hojas: fotografía del Autor; Fotografías a, b y c de J. M. Morales, (con permiso). .....  | 5  |
| Figura 2. Distribución del género <i>Gentiana</i> en México. Se distribuye principalmente en el centro y norte del país. En altitudes de 2,400 a 3,100 m. s. n. m, principalmente en bosques de coníferas y de encino. Elaboración propia con información de Villaseñor (2016). .....   |    |
| Figura 3. Resultados de la etapa de multiplicación de <i>G. spathacea</i> . Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes a nivel del 0.05 por la prueba Tukey. ....  | 20 |
| Figura 4. Propagación <i>in vitro</i> de <i>G. spathacea</i> . <b>a</b> : semillas, <b>b</b> : método de desinfección, <b>c</b> : germinación <i>in vitro</i> , <b>d</b> : explante basal, <b>e</b> : explante intermedio, <b>f</b> : explante apical, <b>g</b> : planta empleada para obtener los tres segmentos en la etapa de multiplicación, <b>h</b> : explante basal, el más eficiente para la inducción de brotes, <b>i</b> : medio con 0.3 mgL <sup>-1</sup> de BA (mejor tratamiento para generar brotes), <b>j</b> : callo desarrollado en 0.3 mgL <sup>-1</sup> de BA, <b>k</b> : medio de cultivo con 0.3 mgL <sup>-1</sup> de AIB (tratamiento eficiente en la etapa de enraizamiento), <b>l</b> : formación de callo con ANA 1.0 mgL <sup>-1</sup> , <b>m</b> : etapa de aclimatación. .... | 21 |
| Figura 5. Enraizamiento de <i>G. spathacea</i> . 1, 2 y 3 medio de cultivo M1 con: 0.1, 0.3 y 1.0 mgL <sup>-1</sup> de AIA, 4, 5 y 6 medio suplementado con: 0.1, 0.3 y 1.0 mgL <sup>-1</sup> de AIB, tratamientos 7, 8 y 9 con: 0.1, 0.3 y 1.0 mgL <sup>-1</sup> de ANA, finalmente 10: testigo sin reguladores. ....  | 23 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 6. Callos generados en la etapa de enraizamiento con la auxina ANA: (a) 0.1 mgL <sup>-1</sup> , (b) 0.3 mgL <sup>-1</sup> y (c) 1.0 mgL <sup>-1</sup> .....  | 23 |
| Figura 7. Cromatografía en capa fina de los compuestos químicos de <i>G. spathacea</i> y visualización en luz UV. Las muestras de campo corresponden: a: flores, b: hojas, d: raíz, e: tallos, mientras que f: hojas, g: raíz y h: tallos son estructuras propagadas <i>in vitro</i> . El estándar se representa con las letras c, i. ...   | 36 |
| Figura 8. Curvas de calibración para la cuantificación de flavonoides, triterpenos y fenoles en <i>G. spathacea</i> . ....  | 38 |
| Figura 9. Explantes necrosados en la inducción de callos con TDZ y 2,4-D. ....  | 51 |
| Figura 10. Probabilidades de incidencia de callos de <i>G. spathacea</i> en medios de cultivo en combinación de ANA + BA, aplicado en los explantes extraídos de peciolo y ápice de hojas.....  | 52 |
| Figura 11. Color de callos <i>in vitro</i> a partir de hojas de <i>G. spathacea</i> . <b>a:</b> tratamiento 7 color blanco amarillento, <b>b:</b> T10 color café claro, <b>c:</b> T12, <b>d:</b> T13, <b>e:</b> T14 y <b>f:</b> T15 todos ellos de color blanco amarillento. Fotografías tomadas con estereoscopio en la sexta semana posterior al establecimiento en oscuridad continua. Fuente: Autores. .... | 54 |

## DEDICATORIA

A ti mi pequeño Juan Mateo

Eres la historia más bonita que el destino escribió en mi vida, tú la razón de mi existencia, mi motivación, mi fortaleza, gracias por traer tanta alegría. Te amo desde siempre, te amé más cuando escuché latir tu corazón por primera vez, jamás olvidare tu primera mirada, aquel día que llegaste al mundo para llenarlo de belleza. ¡Cada día te amo más!

Con amor eterno a mis padres Paula Tellez Cruz y Benito Morales Gaspar por su apoyo incondicional, por seguir creyendo en mí y por su ejemplo constante de superación.

A mis hermanos: Juan Miguel, Isabel, Marisol, Cristina y Rogelio por estar en el momento en que más los necesite y porque sé que estarán siempre. A Rubén (†) un abrazo hasta el cielo.

A mis sobrinos Alondra y Cristian por transmitir alegría en una sonrisa.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para la realización de mis estudios de Maestría.

A la Universidad Autónoma Chapingo por abrirme sus puertas y permitirme fortalecer mis conocimientos académicos.

Con sincero agradecimiento a mi **Comité Asesor**: al Dr. José Luis Rodríguez de la O por su orientación, por compartir su experiencia y dirección para la realización de esta tesis. Al Dr. Marcos Soto Hernández por su importante aporte y oportuna participación para el desarrollo de esta investigación. Al Dr. Luis Fernando Contreras Cruz por su contribución para enriquecer este trabajo.

Al M.C. Rubén San Miguel y al Sr. Domingo, por su enseñanza y paciencia en el laboratorio de Fitoquímica.

Con especial y eterno agradecimiento a Alejandra Fuentes Beltrán, por compartir sus conocimientos y tan acertadas opiniones durante la ejecución de este trabajo. Recuerda el conocimiento crece si se comparte, mil gracias.

Infinitamente agradecida con Eduardo Galeano Martínez por sus sabios consejos y significativas observaciones, estoy segura que serás un excelente Docente.

A las circunstancias de la vida que condujeron mi camino hasta este momento...

## **DATOS BIBLIOGRÁFICOS**



### **Datos personales**

**Nombre:** Leticia Morales Tellez  
**Fecha de nacimiento:** 17 de febrero de 1988  
**Lugar de nacimiento:** Ixmiquilpan, Hidalgo  
**CURP:** MOTL880217MHGRLT08  
**Profesión:** Ing. Agrónomo en Producción  
**Cédula Profesional:** 10167752

### **Desarrollo académico**

**Media superior** Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario  
No. 67, El Tephé, Ixmiquilpan, Hidalgo. 2005 – 2008.

**Superior** Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro  
(UAAAN), Saltillo, Coahuila. 2008 – 2012.

## RESUMEN GENERAL

### PROPAGACIÓN *in vitro* DE *GENTIANA SPATHACEA* KUNTH Y ANÁLISIS DE SU COMPOSICIÓN QUÍMICA

*Gentiana spathacea*, es una planta medicinal silvestre endémica de México. Se le atribuyen propiedades antiinflamatorias y antigripales, sin embargo, esta especie está en riesgo y sujeta a protección especial. El objetivo de esta investigación fue obtener un protocolo de propagación *in vitro*, e identificar los principales compuestos químicos mediante un análisis fitoquímico. Para la inducción de brotes a partir de tres segmentos de los tallos de las plantas germinadas *in vitro*, se empleó como medio básico las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), (MS) suplementados con 2iP, BA y Kin, 0.1, 0.3 y 1.0 mgL<sup>-1</sup>; y para enraizamiento con AIA, AIB y ANA en concentraciones de 0.1, 0.3 y 1.0 mgL<sup>-1</sup>. La aclimatación se evaluó por porcentaje de sobrevivencia bajo invernadero. La combinación de BA, ANA, 2,4-D y TDZ se utilizaron para promover callos a partir segmentos foliares. El análisis fitoquímico se realizó en tres etapas, una colorimétrica para taninos, flavonoides, terpenos y fenoles con FeCl<sub>3</sub>, HCl, reactivo de Libermann-Burchard y Folin-Ciocalteu respectivamente; una cualitativa, por cromatografía en capa fina y cuantitativa por espectrofotometría. El número de brotes obtenidos varía significativamente en función del tipo de explante y regulador ( $p < 0.05$ ), la mayor cantidad de brotes se encontraron empleando segmentos basales con BA 0.3 mgL<sup>-1</sup> ( $1.90 \pm 2.09$ ). La mejor formación de raíces ( $p < 0.05$ ) fue empleando AIB 0.3 mgL<sup>-1</sup> ( $6.74 \pm 1.61$ ). Se obtuvo un 80 % de sobrevivencia en la etapa de aclimatación. La mejor respuesta para formar callos fue con la combinación de ANA 0.3 mgL<sup>-1</sup> y BA 0.3 mgL<sup>-1</sup>. El análisis fitoquímico demostró que las hojas de campo presentan mayor concentración de flavonoides (0.573 mg/gPS), mientras que las raíces y hojas propagadas *in vitro*, tienen mayor cantidad de fenoles (5.96 mg/gPS), taninos (58.47%) y triterpenos (13.715 mg/gPS).

**Palabras clave:** análisis fitoquímico, callogénesis, metabolitos secundarios, inducción de brotes, aclimatación.

## ABSTRACT

### ***in vitro* PROPAGATION OF GENTIANA SPATHACEA KUNTH AND ANALYSIS OF ITS CHEMICAL COMPOSITION**

The *Gentiana spathacea*, is a wild medicinal plant endemic to Mexico. Anti-inflammatory and anti-flu properties are attributed to it; however, this species is at risk and subject to special protection. The objective of this research was to obtain an *in vitro* propagation protocol, and identify the main chemical compounds by phytochemical analysis. The inorganic salts of Murashige and Skoog (1962), (MS) supplemented with 2iP, BA and Kin, 0.1, 0.3 and 1.0 mgL<sup>-1</sup> were used as a basic medium for the induction of shoots from three segments of the stems of germinated plants *in vitro*, and for rooting with IAA, IBA and NAA in concentrations of 0.1, 0.3 and 1.0 mgL<sup>-1</sup>. Acclimatization was assessed by percentage of survival under greenhouse conditions. The combination of BA, NAA, 2,4-D and TDZ were used to promote callus from foliar segments. The phytochemical analysis was performed in three stages, a colorimetric for tannins, flavonoids, terpenes and phenols with FeCl<sub>3</sub>, HCl, Libermann-Burchard reagent and Folin-Ciocalteu respectively; a qualitative by thin layer chromatography and a quantitative one by spectrophotometry. The number of obtained shoots significantly varies depending on the type of explant and regulator ( $p < 0.05$ ). The largest number of shoots were found using basal segments with BA 0.3 mgL<sup>-1</sup> ( $1.90 \pm 2.09$ ), the best root formation ( $p < 0.05$ ) was using IBA 0.3 mgL<sup>-1</sup> ( $6.74 \pm 1.61$ ). An 80 % of survival was obtained in the acclimatization stage. The best response to form callus was using the combination of NAA 0.3 mgL<sup>-1</sup> and BA 0.3 mgL<sup>-1</sup>. The phytochemical analysis showed that the field leaves have a higher concentration of flavonoids (0.573 mg/gdw), while the roots and leaves propagated *in vitro* have a greater amount of phenols (5.96 mg/gdw), tannins (58.47%) and triterpenes (13,715 mg/gdw).

**Key words:** phytochemical analysis, callogenesis, secondary metabolites, shoot induction, acclimatization.

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

*Gentiana spathacea* Kunth es una planta herbácea, endémica de México localizada en 21 estados del país, en clima templado y frío (Villaseñor, 2016). Esta planta, ha tenido importancia desde el contexto cultural y social. Es empleada en la medicina tradicional, en comunidades rurales e indígenas del país, principalmente para problemas respiratorios, inflamatorios y diuréticos. Algunos estudios documentan presencia de fenoles, flavonoides y taninos (Arriaga y Montero, 2015). Incluso se ha fomentado y tolerado su presencia en algunos sistemas agrícolas tradicionales (Cano-Ramírez *et al.*, 2012). Esta especie pertenece al género *Gentiana* de la familia Gentianaceae, la cual, comprende alrededor de 100 géneros y 1800 especies nativas de todos los continentes, excepto la Antártida (Mészáros *et al.*, 2002).

Las especies del género *Gentiana* se caracterizan por tener sabores amargos, producto de las xantonas, iridoideas y amarogentina. Se ha investigado su actividad: analgésica, antiinflamatoria, diurética, antiasmática, entre otros (Singh, 2008). Las investigaciones de composición química de especies del género *Gentiana* se han basado en su aprovechamiento tradicional y grupo cultural, por ejemplo, en Italia se utiliza a *G. kochiana* como antihipertensivo (Vidaria y VitaFinzi, 2010).

*G. spathacea* se encuentra regulada por la norma mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, en la categoría de riesgo, sujeta a protección especial. La norma en relación a sus especies menciona: “aquellas que podrían llegar a encontrarse amenazadas por factores que inciden negativamente en su viabilidad, por lo que se determina la necesidad de propiciar su recuperación y conservación o la recuperación y conservación de poblaciones de especies asociadas”.

Esta planta, debido a su situación legal resulta contraproducente su aprovechamiento social y cultural. Aunado a ello, se ha documentado que

algunas especies del género *Gentiana* tienen una forma biológica en reproducirse muy particular y posiblemente explique su endemismo en México (Webb y Littleton, 1987).

Desde la prehistoria el ser humano ha procurado su bienestar y como proveedor importante ha sido la naturaleza, hallando plantas útiles como medicina (Quezada, 2008). Las investigaciones acerca de las fuentes naturales como alimento y como un medio para mejorar la salud ha sido la principal razón para el desarrollo de la propagación vegetativa y la manipulación del genoma utilizando enfoques *in vitro* (Cai *et al.*, 2009).

Son pocos los estudios documentados en especies del género *Gentiana* en México, desde el contexto biológico, cultural, fitoquímico y agronómico. Ante esta premisa, surge la necesidad de establecer protocolos *in vitro* que permitan la obtención exitosa de nuevos individuos para contribuir a la repoblación de esta especie en sitios estratégicos, además de tener acceso para su aprovechamiento social y cultural. Las técnicas de propagación *in vitro* coadyuvan a reducir riesgos por problemas fitosanitarios, garantizan la reproducción sin pérdida de variación genética y minimizan en tiempo y espacio. Siendo relevante para aquellas plantas con difícil reproducción o en peligro de extinción.

### **1.1. OBJETIVO GENERAL**

Establecer las condiciones *in vitro*, que permita obtener un protocolo de micropropagación e inducción de callogénesis de *Gentiana spathacea*, y mediante un análisis fitoquímico, evaluar la presencia de los principales ingredientes activos propios de esta especie.

### **1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar el efecto de citocininas y auxinas para establecer un protocolo de propagación *in vitro* a partir de diferentes explantes de *G. spathacea*.

2. Identificar la presencia de los metabolitos secundarios mayoritarios, presentes en las flores, hojas, tallos y raíces de *G. spathacea*.
3. Valorar las concentraciones de los compuestos químicos respecto a dos ambientes contrastantes (campo y laboratorio).
4. Establecer un método eficiente que permita la regeneración de callos a partir de explantes foliares de esta planta.

### **1.3. HIPÓTESIS**

1. La sucesión de organogénesis y callogénesis de *Gentiana spathacea* está en función del tipo de explante, el regulador de crecimiento, las concentraciones y el medio de cultivo, que interactúan en este proceso fisiológico.
2. El ambiente en donde crecen y se desarrollan las plantas es determinante en las concentraciones de los compuestos químicos.

Los experimentos realizados para la comprobación de las hipótesis y cumplimiento de los objetivos se encuentran plasmados en las siguientes páginas.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. TAXONOMÍA Y DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

De acuerdo con el sistema de clasificación de Cronquist, la especie *Gentiana spathacea* Kunth, pertenece al Reino Plantae, división: Magnoliophyta, clase: Magnoliopsida, orden: Gentianales, familia: Gentianaceae, Género *Gentiana* (Pringle, 1979).

El género *Gentiana* fue propuesto por Linneo en 1753 (Villareal-Qintanilla *et al.*, 2009; Wagenitz, 1864), esta conformado por diversas especies (Villareal-Qintanilla *et al.*, 2009) de las cuales se han originado nuevos géneros taxonómicos y 361 especies. Adicionalmente, *Gentiana* es el género más grande dentro de la familia Gentianaceae (Yuan *et al.*, 1996).

Las especies del género *Gentiana* generalmente son plantas perennes, ascendente o erecta que puede alcanzar hasta 1 m de altura, con uno o varios tallos saliendo desde la base, pubescentes. Posee hojas opuestas, sésiles, angostas, de hasta ocho cm de largo y hasta tres cm de ancho, puntiagudas (CONABIO, 2009). Las flores de *Gentiana spathacea* (Figura 1), pueden ser solitarias en las axilas de las hojas superiores, o dispuestas en inflorescencia acompañadas de brácteas, generalmente pentámeras. El cáliz es un tubo acampanado, profundamente hendido en un lado y terminado en 5 lóbulos que generalmente son diminutos. La corola consiste de cinco pétalos fusionados, raramente cuatro o seis, de color azul o azul-morado de hasta 5 cm de largo. El fruto es una cápsula algo comprimida, similar al largo de la corola. Tiene un ovulo unilocular. El estilo a menudo esta asunte o poco diferenciado, con lóbulos del estigma laminares y numerosas semillas, generalmente provistas de alas (Marroquín y Rzedowski, 2010).



Figura 1. *Gentiana spathacea* Kunth: a y c) botones florales, b) corola, d) hojas: fotografía del Autor; Fotografías a, b y c de J. M. Morales, (con permiso).

## 2.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El género *Gentiana* se distribuye principalmente en Asia con 312 especies, en Europa 29 y América 36. En África solamente se encuentran dos especies, y en Australia una. El centro con mayor diversidad de *Gentiana* es China y el noreste de Birmania, donde se encuentran 190 especies, de las cuales 98 son endémicas. La mayoría de las especies de *Gentiana* crecen a una altitud superior a los 1000 m. s. n. m (Yuan *et al.*, 1996) característico por sus niveles agudos de endemismo (Zhang *et al.*, 2007).

Hanan y Mondragón (2009), documentan 13 especies del género *Gentiana* en México, 11 fueron registradas como endémicas y dos con distribución en Guatemala (*G. pumilo* y *G. avatifolia*). No obstante, Villaseñor (2016), registró 16 especies del género *Gentiana*, distribuidas en 24 entidades de México (Figura 2), 13 de ellas endémicas y tres no. El género *Gentiana* en México se localiza en regiones montañosas de clima templado y frío (Hanan y Mondragón, 2009),

incluso se considera como parte de la vegetación silvestre de las montañas de las cimas más altas de México (Rzedowski, 2006).



Figura 2. Distribución del género *Gentiana* en México. Se distribuye principalmente en el centro y norte del país. En altitudes de 2,400 a 3,100 m. s. n. m, principalmente en bosques de coníferas y de encino. Elaboración propia con información de Villaseñor (2016).

### 2.3. ECOFISIOLOGÍA Y REPRODUCCIÓN

Las especies del género *Gentiana* como en todas las angiospermas, concurre una doble fecundación como parte de su reproducción. En algunas existen características muy peculiares para la ejecución de este proceso. Invariablemente se requiere de un agente polinizador como parte de su coevolución. Diferentes especies del género *Gentiana* son polinizadas por himenópteros, sin embargo, existen factores bióticos y abióticos que afectan la polinización y por ende el éxito de reproducción resulta ser más complejo, particularmente en su hábitat natural (Oostermeijer *et al.*, 1998).

La vida productiva de las flores de estas especies, están determinadas por la polinización. Poseen una reproducción muy peculiar y se manifiesta en los cambios fisiológicos de la corola de la flor posterior a la fertilización y conduciéndolo a la senescencia y cierre de corola condescendiendo el

recubrimiento del ovario. Una explicación posible a este fenómeno se deba a una estrategia de protección hacia sus depredadores e impedir la contaminación por otros granos de polen (Webb y Littleton, 1987). Sin embargo, los factores climáticos incitan a un cierre temporal de la corola, al descender la temperatura y al ascender, se reactiva la apertura. Esta acción coadyuva en la protección de los granos de polen situados en las anteras o en el estigma (He *et al.*, 2005).

#### 2.4. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, UNA ALTERNATIVA PARA LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS

Los métodos biotecnológicos favorecen los programas de propagación, conservación y mejoramiento de las especies vegetales. En este contexto, el cultivo de tejidos vegetales posee una amplia incidencia en las aplicaciones agrícolas (Valdés-Infante *et al.*, 2012), y se considera una herramienta complementaria. Las técnicas de propagación *in vitro* facilitan la obtención de plantas, conservan de la variabilidad genética y permiten la germinación de semillas (en casos donde el proceso natural no ocurre fácilmente). Estas técnicas derivan en una alta producción de plantas homogéneas, bajo un ambiente controlado, en condiciones de asepsia y con calidad fitosanitaria (Sharry *et al.*, 2015).

#### 2.5. COMPUESTOS QUÍMICOS DE ESPECIES VEGETALES

Además del metabolismo primario, las plantas poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos químicos (Seigler, 2012). Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular, que participan en los procesos de adaptación de las plantas, atracción de insectos polinizadores, etc. La síntesis de compuestos químicos se da por varias razones, incluida la protección contra el estrés biótico y abiótico (Jiménez *et al.*, 2003). Los metabolitos secundarios, se dividen en tres grupos químicamente diferentes: los fenólicos (45%) que son los fitoconstituyentes vegetales más numerosos y estructuralmente diversos, en segundo lugar, se encuentran los terpenos (27%),

seguido de los compuestos nitrogenados como alcaloides (18%) y otros (10%) (Alamgir, 2017).

Los fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, los tres grupos más importantes son: flavonoides, ácidos fenólicos y polifenoles (Alamgir, 2017). Contienen un grupo fenol, un grupo funcional hidroxilo en un anillo aromático. La fenilalanina es un intermediario en la biosíntesis de la mayoría de los fenólicos vegetales. La biosíntesis de la mayoría de estos compuestos ocurre en la vía del ácido shikimico (Taiz y Zeiger, 2010). De acuerdo a su diversidad química, estos compuestos desempeñan una variedad de funciones en la planta, muchos actúan como defensa contra herbívoros y patógenos, otros atrayendo polinizadores o como alelopatía.

Los terpenos se forman a través de la combinación de diferentes unidades de prenilo. Se clasifican por la cantidad de unidades de cinco carbonos que contienen, formando así los monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, donde los más grandes son los triterpenos y tetraterpenos. La ruta de biosíntesis de estos compuestos es por la vía del ácido mevalónico. Algunos terpenos tienen una función primaria en el crecimiento y desarrollo de las plantas, ejemplo las giberelinas y los carotenoides. Sin embargo, la mayoría son metabolitos secundarios que están involucrados en la defensa de las plantas (Taiz y Zeiger, 2010). Están muy extendidos en la naturaleza, principalmente en plantas como componentes de aceites esenciales (Alamgir, 2017).

La mayoría de los alcaloides son alcalinos, generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos comunes, en particular, lisina, tirosina y triptófano (Taiz y Zeiger, 2010). Pueden contener otros elementos como oxígeno y azufre, y no se limitan solo al reino vegetal, algunos alcaloides también se encuentran en bacterias, hongos, ranas, insectos y otros animales (Alamgir, 2017).

Las sustancias fitoquímicas poseen propiedades biológicas importantes como actividad antioxidante, efecto antimicrobiano, estimulación del sistema inmune, etc., y se han utilizado como medicamentos durante muchos años.

## 2.6. LITERATURA CITADA

- Alamgir, A. N. M. (2017). *Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts* (pp. 1-306). Chittagong, Bangladesh. Recuperado de [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=2LZhDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=Therapeutic+Use+of+Medicinal+Plants+and+Their+Extracts&ots=aX8XBWu3Rr&sig=EJdsHiJeuM4ED\\_jrj1icXkDeHyM#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=2LZhDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=Therapeutic+Use+of+Medicinal+Plants+and+Their+Extracts&ots=aX8XBWu3Rr&sig=EJdsHiJeuM4ED_jrj1icXkDeHyM#v=onepage&q&f=false)
- Arriaga, A. E., y Montero, E. D. (2015). Determinación de la Actividad Hipoglucemiante de *Polygonum Aviculare* y Actividad Antiinflamatoria de *Cuphea aequipetala Cav.*, *Taxodium mucronatum* y *Gentiana spathacea Kunth* (tesis de pregrado). Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.
- Cai, Y., Liu, Y., Liu, Z., Zhang, F., Xiang, F., & Xia, G. (2009). High-frequency embryogenesis and regeneration of plants with high content of gentiopicoside from the Chinese medicinal plant *Gentiana straminea* Maxim. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(6), 730-739.
- Cano-Ramírez, M., De la Tejera, B., Casas, A., Salazar, L., & García-Barrios, R. (2012). Migración rural y huertos familiares en una comunidad indígena del centro de México. *Botanical Sciences*, 90(3), 287-304.
- Cardoza, V. (2008). Tissue culture: The manipulation of plant development. *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications*, 113-134.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (2009). Malezas de México. CONABIO, México. Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/gentianaceae/gentiana-spathacea/fichas/ficha.htm>
- Diario Oficial de la Federación. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM059-SEMARNAT-2010. Protección Ambiental - Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres - Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio. Lista de especies en riesgo. Medio Ambiente y Recursos Naturales, 26 de noviembre de 2010.
- Hanan, A., & Mondragón P., J. (2009). Malezas de México Ed. Vibrans H. *Gentiana spathacea* Kunth : Recuperado en <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/gentianaceae/gentiana-spathacea/fichas/ficha.htm>
- He, Y. P., Duan, Y. W., Liu, J. Q., & Smith, W. K. (2005). Floral closure in response to temperature and pollination in *Gentiana straminea* Maxim.

- (Gentianaceae), an alpine perennial in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Plant Systematics and Evolution*, 256(1-4), 17-33.
- Jiménez, G. S., Ducoing, H. P., & Sosa, M. R. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Marroquín, J. & Rzedowski, J. (2010). Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, AC y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pazcuaro, Michoacán. 551-557.
- Mészáros, S., De Laet, J., Goethals, V., Smets, E., & Nilsson, S. (2002). Cladistics of Gentianaceae: a morphological approach. *Gentianaceae: systematics and natural history*. Cambridge University Press, Cambridge. 310–376.
- Oostermeijer, J. G. B., Luijten, S. H., Křenová, Z. V., & Den Nijs, H. C. (1998). Relationships between population and habitat characteristics and reproduction of the rare *Gentiana pneumonanthe* L. *Conservation Biology*, 12(5), 1042-1053.
- Pringle, J. (1979). Taxonomy and distribution of *Gentiana* (Gentianaceae) in Mexico and Central America. II. Sect. Chondrophyllae. *Contributions to Botany*, 8(1), 14-33.
- Quesada, A. (2008). Las plantas medicinales. *Biocenosis*, 21(1-2), 20-23.
- Rzedowski, J. (2006). Vegetación de México. 1ra. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, 77-78.
- Seigler, D. S. (2012). *Plant secondary metabolism*. Springer Science & Business Media.
- Sharry, S. E., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Singh, A. (2008). Phytochemicals of Gentianaceae: A Review of Pharmacological Properties. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* 1 (1): 33-37.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). Secondary Metabolites and Plant Defense. *Plant physiology* fifth edition (pp. 283 - 306). Sunderland, Massachusetts, USA. Sinauer Associates inc., publishers.
- Valdés-Infante, H. J., Rodríguez Medina, N. N., González, L., Velázquez Palenzuela, J. B., Rivero Rodríguez, D., Martínez, S., & Rodríguez Rodríguez, J. A. (2012). Biotechnology as a tool for propagation, con-

- ervation and genetic breeding in guava. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 7-19.
- Vidaria, G. & VitaFinzi, P. (2010). Las Gentianaceae: botánica, fitoquímica y actividad biológica. *La Granja*, 11(1), 3-14.
- Villarreal-Quintanilla, J. A., Estrada-Castillón, A. E., & Jasso de Rodríguez, D. (2009). El género *Gentiana* (Gentianaceae) en México. *Polibotánica*, 1(27), 1-16.
- Villaseñor, J. L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(3), 559-902.
- Webb, C. J., & Littleton, J. (1987). Flower longevity and protandry in two species of *Gentiana* (Gentianaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 74(1), 51-57.
- Yuan, Y. M., Küpfer, P., & Doyle, J. J. (1996). Infrageneric phylogeny of the genus *Gentiana* (Gentianaceae) inferred from nucleotide sequences of the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*, 83(5), 641-652.
- Zhang, X. L., Yuan, Y. M., & Ge, X. J. (2007). Genetic structure and differentiation of *Gentiana atunsiensis* WW Smith and *G. striolata* TN Ho (Gentianaceae) as revealed by ISSR markers. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 154(2), 225-232.

### 3. PROPAGACIÓN *in vitro* DE FLOR DE HIELO (*GENTIANA SPHATACEA* KUNTH)

Leticia Morales-Tellez<sup>1</sup>, José Luis Rodríguez-De la O<sup>1</sup>, Marcos Soto-Hernández<sup>2</sup>, Luis Fernando Contreras-Cruz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 carr. México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, México. C.P. 56230. <sup>2</sup>Postgrado de Botánica, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Texcoco, Estado de México, México.

#### RESUMEN

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ha sido una de las técnicas biotecnológicas más exitosas tanto para la producción y conservación de plantas. Con el propósito de establecer un protocolo eficiente de propagación *in vitro* de *G. spathacea*, se utilizaron de plantas germinadas, explantes de tejido de tallo de las regiones basales, intermedios y apicales sembrados en el medio de cultivo MS 100% suplementado con tres citocininas: 2iP, BA y Kinetina (0.1, 0.3 y 1.0 mgL<sup>-1</sup>). Y para el enraizamiento de brotes se evaluaron tres auxinas: AIA, AIB y ANA (0.1, 0.3 y 1.0 mgL<sup>-1</sup>). En la etapa de aclimatación se empleó una mezcla de sustrato, de Peat Moss y perlita (100%, 3:1, 1:1). Para el análisis estadístico de las variables se realizó un ANOVA bajo un diseño completo al azar, con 10 tratamientos y 5 repeticiones para las dos fases *in vitro*, y una prueba de comparación de medias de Tukey ( $p < 0.05$ ). Existe diferencia significativa en el tipo de explante y los tratamientos ( $p < 0.05$ ), siendo la región basal la que resultó ser la más eficiente para la inducción de brotes ( $2.14 \pm 1.15$ ), longitud de brotes ( $1.65 \pm 0.65$ ) y número de hojas ( $6.56 \pm 1.98$ ). El tratamiento con 0.3 mgL<sup>-1</sup> de BA, generó más brotes (1.9) de 1.39 cm de longitud. El mayor número de raíces ( $6.74 \pm 1.61$ ) se observó en el medio de cultivo con 0.3 mgL<sup>-1</sup> de AIB, después de ocho semanas de la siembra, sin embargo, en los medios suplementados con ANA: 0.1, 0.3 y 1.0 mgL<sup>-1</sup>, se presentó un 68 %, 76 % y 100 % de callos respectivamente. El porcentaje de sobrevivencia de las plantas en invernadero fue de 80 %. Fue posible identificar reguladores y concentraciones adecuados para generar un protocolo de propagación eficiente.

**Palabras clave:** aclimatación, callos, cultivo *in vitro*, enraizamiento, organogénesis.

---

Tesis de maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola  
Universidad Autónoma Chapingo  
Autor: Leticia Morales Tellez  
Director: José Luis Rodríguez de la O

## ***in vitro* PROPAGATION OF 'FLOR DE HIELO' (GENTIANA SPATHACEA KUNTH)**

### **ABSTRAC**

In vitro culture of plant tissues has been one of the most successful biotechnological techniques for both plant production and conservation. In order to establish an efficient in vitro propagation protocol of *G. spathacea*, use the germinated plants, explaining stem tissue from the basal, intermediate and apical regions sown in the MS 100% culture medium supplemented with three cytokines: 2iP, BA and Kinetina (0.1, 0.3 and 1.0 mgL<sup>-1</sup>). And for the rooting of shoots three auxins were evaluated: IAA, IBA and NAA (0.1, 0.3 and 1.0 mgL<sup>-1</sup>). In the acclimatization stage a mixture of substrate, Peat Moss and perlite (100%, 3: 1, 1: 1) was used. For the statistical analysis of the variables, an ANOVA was performed under a randomized complete design, with 10 treatments and 5 repetitions for the two phases in vitro, and a comparison test of Tukey means ( $p < 0.05$ ). There is a significant difference in type of explant and treatments ( $p < 0.05$ ), the basal region being the most efficient for the induction of shoots ( $2.14 \pm 1.15$ ), length of shoots ( $1.65 \pm 0.65$ ) and number of leaves ( $6.56 \pm 1.98$ ). The treatment with 0.3 mgL<sup>-1</sup> of BA generated more shoots (1.9) of 1.39 cm in length. The greatest number of roots ( $6.74 \pm 1.61$ ) was seen in the culture medium with 0.3 mgL<sup>-1</sup> of IBA, after eight weeks of sowing, however, in the media supplemented with NAA: 0.1, 0.3 and 1.0 mgL<sup>-1</sup>, 68 %, 76 % and 100 % of callus were selected respectively. The percentage of survival of the plants in the greenhouse was 80 %. It was possible to identify specific regulators and variables to generate an efficient propagation protocol.

**Key words:** acclimatization, callus, *in vitro* culture, rooting, organogenesis.

---

Tesis de maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola  
Universidad Autónoma Chapingo  
Autor: Leticia Morales Tellez  
Director: José Luis Rodríguez de la O

### 3.1. INTRODUCCIÓN

Los enfoques convencionales de conservación de germoplasma por sí solos no pueden garantizar un restablecimiento y recuperación de una especie vegetal en peligro de extinción. La aplicación de estrategias alternativas de micropropagación reproducibles a través de métodos biotecnológicos se ha vuelto útil para la preservación del germoplasma de muchas plantas (Chaudhuri *et al.*, 2008). El uso de la tecnología de cultivos de tejidos vegetales o también conocida como cultivo *in vitro*, resulta ser la alternativa de propagación de plantas, más utilizada. Se distingue por que a partir de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, genéticamente idéntica y un gran número de individuos en un espacio reducido. Las yemas vegetativas constituyen la estructura morfológica comúnmente más utilizada por los protocolos de propagación *in vitro* (Smith, 2012). En la familia Gentianaceae, en particular en las especies del género *Gentiana*, se ha logrado un progreso considerable en términos biotecnológicos (Rybczyński *et al.*, 2015). Se han desarrollado protocolos de cultivo *in vitro* para las principales especies de *Gentiana* en Europa y Asia, entre ellas *G. lutea*, considerada la especie europea farmacológicamente más importante (Viola y Franz 1989; Holobiuc y Blindu, 2008). En China, la micropropagación se ha centrado en *G. scabra*, una planta medicinal importante para ese país, con bajo porcentaje de germinación y periodo de latencia limitado (Huang *et al.*, 2014). Varias especies de *Gentiana* en Ucrania como *G. lutea*, *G. punctata*, *G. utriculosa* y *G. cruciata*; que se encuentran en riesgo de extinción, debido a la destrucción de su hábitat y recolección excesiva. Este género se caracteriza por su baja germinación, necesidad de polinizadores específicos, hongos micorrízicos y condiciones climáticas concretas (Drobyk *et al.*, 2015). En trece especies de *Gentiana*, Tomiczak *et al.* (2019), evaluaron explantes como; hojas, capullos, pedúnculos y embriones inmaduros para la regeneración de embriones somáticos, como estrategia de recuperación. Son pocos los estudios documentados en especies del género *Gentiana* en México, bajo este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo desarrollar un

protocolo *in vitro* para la desinfección, germinación, multiplicación y adaptación de las plantas obtenidas. La micropropagación exitosa de nuevos individuos contribuye a repoblar sitios estratégicos con esta especie, para su acceso y aprovechamiento social y cultural.

### **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Lugar de colecta**

Las semillas de *G. spathacea* provienen del municipio de Ixmiquilpan, Hidalgo. La recolección se realizó en las montañas de la comunidad indígena “La Lagunita”, ubicada en la zona norte del municipio, con las coordenadas geográficas longitud norte 20° 02` y longitud oeste 99° 15` a una altitud de 2540 m.s.n.m. (INEGI, 2019).

#### **Germinación *in vitro***

Las semillas se desinfectaron con tres lavados: el primero, con una solución de etanol al 70% por 30 s, el segundo, con solución de NaClO al 1% por 15 min y finalmente, con tres enjuagues con agua esterilizada. Las semillas desinfectadas se sembraron en tubos de 20 x 200 mm con 20 mL de medio M1 (MS basal (Murashige y Skoog, 1962) al 100% sin reguladores, suplementado con 0.40 mgL<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mgL<sup>-1</sup> de Myo-inositol, 60 mgL<sup>-1</sup> de L-cisteína, 3% de sacarosa, 7grL<sup>-1</sup> de agar-agar). El pH final se ajustó a 5.7 ± 0.1. Se esterilizó a 121 °C, 1.2 kg cm<sup>2</sup> de presión. Se depositaron sobre el agar 10 semillas/tubo en condiciones asépticas y se incubaron bajo condiciones controladas de iluminación 16 horas luz a 27 °C. El criterio para definir a una semilla germinada fue bajo indicadores visuales; la emergencia de la radícula y aparición de hojas verdaderas. Los resultados se reportaron como porcentaje de germinación.

## Etapa de multiplicación

Los explantes (basal, intermedio y apical) empleados para la etapa de multiplicación fueron obtenidos de las plantas germinadas en la etapa previa. Los explantes mencionados, se sembraron en frascos con 30 mL de medio M1 adicionado con citocininas en las concentraciones definidas en el Cuadro 1, empleando medio M1 como testigo. Durante 8 semanas de evaluación. Los resultados se reportaron como número de brotes, longitud y número de hojas.

Cuadro 1. Tratamientos y concentraciones aplicados en la etapa de multiplicación *in vitro* de *G. spathacea*.

| Citocininas (mgL <sup>-1</sup> ) |     |      |     |      |     |
|----------------------------------|-----|------|-----|------|-----|
| Trat                             | 2iP | Trat | BA  | Trat | Kin |
| 1                                | 0.1 | 4    | 0.1 | 7    | 0.1 |
| 2                                | 0.3 | 5    | 0.3 | 8    | 0.3 |
| 3                                | 1.0 | 6    | 1.0 | 9    | 1.0 |

2iP: 2-isopentil adenina; BA: benciladenina; Kin: Kinetina. Fuente: Autores.

## Etapa de enraizamiento

Los brotes obtenidos en la etapa de multiplicación se subcultivaron en medio M1 durante 30 días. Se seleccionaron brotes con ocho hojas y se subcultivaron en frascos con 30 mL de medio M1 adicionado con auxinas en las concentraciones definidas en el Cuadro 2, empleando medio M1 como testigo. Durante 8 semanas de evaluación. Los resultados se registraron como número y longitud de raíz.

Cuadro 2. Tratamientos y concentraciones aplicados en la etapa de enraizamiento *in vitro* de *G. spathacea*.

| Auxinas (mgL <sup>-1</sup> ) |     |      |     |      |     |
|------------------------------|-----|------|-----|------|-----|
| Trat                         | AIA | Trat | AIB | Trat | ANA |
| 1                            | 0.1 | 4    | 0.1 | 7    | 0.1 |
| 2                            | 0.3 | 5    | 0.3 | 8    | 0.3 |
| 3                            | 1.0 | 6    | 1.0 | 9    | 1.0 |

AIA: ácido indolacético; AIB: ácido indolbutírico y ANA: ácido naftalenacético. Fuente: Autores.

## **Aclimatación en invernadero**

Las plantas obtenidas en la etapa de enraizamiento se transfirieron a contenedores bajo condiciones de invernadero. Se emplearon tres combinaciones de sustrato: el primero, Peat Moss al 100%, y dos combinaciones de Peat Moss - perlita en proporción 3:1 y 1:1. Previo al trasplante, se lavaron las raíces con agua corriente y se sumergieron en una solución de benomilo 1gr/L como fungicida preventivo. Se aplicó enraizador Radix 1500®. Los resultados se recabaron como porcentaje de sobrevivencia a los 50 días.

## **Análisis estadístico**

Las diferencias ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos tanto para la etapa de multiplicación como de enraizamiento, se estudiaron a través de un Análisis de Varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de medias de Tukey (Cochran & Cox 2008). Los datos, fueron analizados en el software estadístico SAS, versión 9.1 (2002 SAS *Institute*, Inc., Cary, NC).

## **3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Porcentaje de germinación**

El método de desinfección empleado tuvo un 100 % de eficiencia. La germinación (emisión de raíz y presencia de hojas cotiledonares) de *G. spathacea* en el medio de cultivo M1 se observó a los 15 días después de la siembra, reportando un porcentaje de germinación relativamente bajo de 65%. Sin embargo, el resultado obtenido por este trabajo no es muy diferente al obtenido por Huang *et al.* (2014), para *G. scabra*, que lo explica a través de las limitaciones debidas al periodo corto de latencia de las semillas. Es posible concluir con estos resultados la germinación *in vitro* de *G. spathacea* es una alternativa adecuada para facilitar su propagación. Cabe mencionar, que en un estudio previo realizado por los autores se observó que existe una relación directamente proporcional entre la densidad de siembra y el porcentaje germinación en *G. spathacea*.

## **Etapa de multiplicación**

### **Número de brotes**

La ubicación del explante influye de forma significativa ( $p < 0.05$ ) en el número de brotes, de la misma forma, la citocinina y concentración empleada ( $p < 0.05$ ). Se obtuvo una mayor cantidad de brotes a partir del segmento basal ( $2.14 \pm 1.15$ ), seguida de la zona intermedia ( $0.59 \pm 0.33$ ) y del segmento apical ( $0.32 \pm 0.20$ ). La zona basal favorece la formación de brotes debido a que la citocinina se sintetiza en las yemas en desarrollo, tejidos meristemáticos y la zeatina en la parte basal de los brotes (Taiz y Zeiger, 2010). Cabe destacar que los brotes obtenidos tanto de la zona intermedia y apical no solamente eran cuantitativamente inferiores, sino que cualitativamente se presentaban de menor tamaño y poco vigorosos. Los explantes intermedios en presencia de 2iP se necrosaron en su mayoría y en los segmentos apicales en el medio con kinetina se observó inducción de raíces. La mayor cantidad de brotes se obtuvo en presencia de  $0.3 \text{ mgL}^{-1}$  de BA ( $1.90 \pm 2.09$ ). Es importante señalar que los brotes generados en dicho tratamiento fueron vigorosos y no se presentó necrosamiento en el explante. Los explantes basales en presencia de  $0.3 \text{ mgL}^{-1}$  de BA, a partir de la octava semana, desarrollaron callo en un 48 % del establecimiento.

### **Longitud de brotes**

La mayor longitud de brotes se desarrolló en los explantes basales ( $1.65 \pm 0.65$ ), seguido de los segmentos intermedios ( $0.67 \pm 0.33$ ) y los brotes más pequeños se indujeron en la zona apical ( $0.48 \pm 0.18$ ). Los brotes de mayor tamaño se observaron en el medio suplementado con  $0.3 \text{ mgL}^{-1}$  de BA ( $1.39 \pm 1.12$ ) y en el medio de cultivo con  $1.0 \text{ mgL}^{-1}$  de 2iP ( $1.08 \pm 0.90$ ).

## Número de hojas

Los brotes de la zona basal presentaron mayor número de hojas ( $6.56 \pm 1.98$ ), el tamaño de los brotes generados en los segmentos intermedios y apicales se encuentra relacionado con la cantidad de hojas observadas ( $2.51 \pm 1.61$  y  $1.18 \pm 0.90$ ) respectivamente. La mayor cantidad de hojas/brote se presentó en el medio con  $0.3 \text{ mgL}^{-1}$  de BA y  $0.3 \text{ mgL}^{-1}$  de Kin.

La generación de brotes fue favorecida con el segmento basal de la planta y la citocinina BA ( $0.3 \text{ mgL}^{-1}$ ). Huang *et al.* (2014), reporta que un estudio con brotes de ápice de *G. scabra*, BA ( $2.0 \text{ mgL}^{-1}$ ) fue más eficaz con un promedio de 9.1 brotes/explante y la longitud fue de 3.5 cm, con concentraciones bajas de kinetina ( $0.1 \text{ mgL}^{-1}$ ). *G. dinarica* tiene un índice de multiplicación bajo en comparación con otras especies de *Gentiana*, el valor de brotes más alto (1.54) se registró en el medio de cultivo con  $1.0$  y  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$  de BA y  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  de ANA, respectivamente (Vinterhalter *et al.*, 2012), los resultados de esa investigación son muy similares al presente estudio. Para algunas especies de *Gentiana*, la multiplicación de brotes requiere una concentración alta ( $2.0$ - $2.5 \text{ mgL}^{-1}$ ) de BA según lo informado para *G. davidii* (Nalawade *et al.*, 2003) y *G. asclepiadea* (Devic *et al.*, 2006). En otro estudio orientado a la inducción de brotes directos de pecíolo en *G. kurroo*, se logró un 73.3 %, con el medio MS suplementado con ANA y TDZ con  $0.1$  y  $0.75 \text{ mgL}^{-1}$  respectivamente (Sharma *et al.*, 2014).

Todos los factores son significativos ( $P > 0.05$ ), el tipo de explante y cada tratamiento, con sus respectivos niveles tienen efectos distintos en las variables evaluadas, la Figura 3 muestra la interacción de estos factores y en la Figura 4 se muestra el proceso de propagación *in vitro* de *G. spathacea*, resaltando el mejor tratamiento para la multiplicación y enraizamiento.

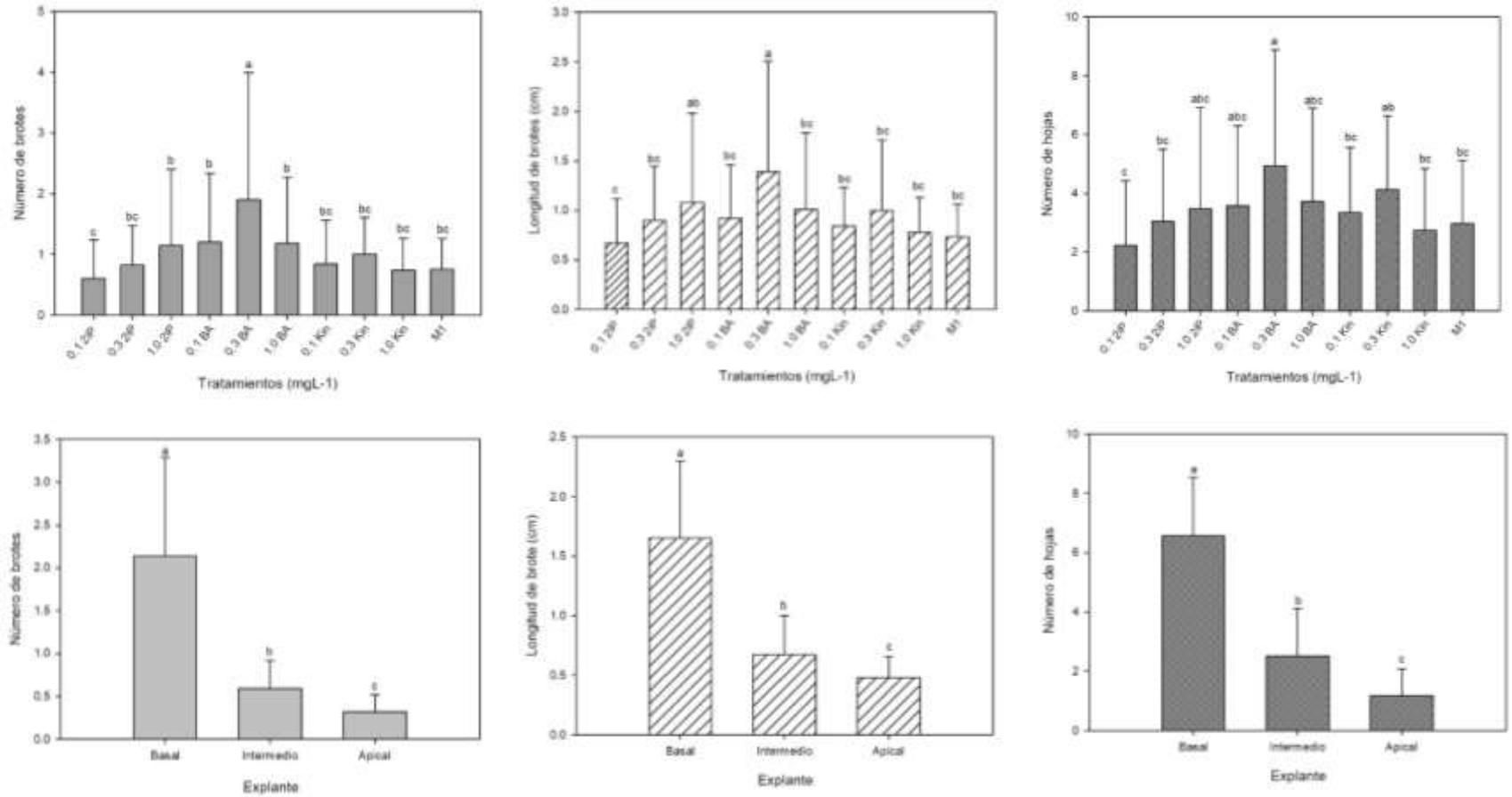


Figura 3. Resultados de la etapa de multiplicación de *G. spathacea*. Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes a nivel del 0.05 por la prueba Tukey.



Figura 4. Propagación *in vitro* de *G. spathacea*. **a**: semillas, **b**: método de desinfección, **c**: germinación *in vitro*, **d**: explante basal, **e**: explante intermedio, **f**: explante apical, **g**: planta empleada para obtener los tres segmentos en la etapa de multiplicación, **h**: explante basal, el más eficiente para la inducción de brotes, **i**: medio con  $0.3 \text{ mgL}^{-1}$  de BA (mejor tratamiento para generar brotes), **j**: callo desarrollado en  $0.3 \text{ mgL}^{-1}$  de BA, **k**: medio de cultivo con  $0.3 \text{ mgL}^{-1}$  de AIB (tratamiento eficiente en la etapa de enraizamiento), **l**: formación de callo con ANA  $1.0 \text{ mgL}^{-1}$ , **m**: etapa de aclimatación.

## Etapa de enraizamiento

En la mayoría de los tratamientos se observó el desarrollo de raíces *in vitro* (Cuadro 3), con excepción del medio en presencia de 1.0 mgL<sup>-1</sup> de ANA, que generó callos en todos los brotes.

Cuadro 3. Efecto de tres auxinas AIA, AIB y ANA con diferentes concentraciones (0.1, 0.3 y 1.0 mgL<sup>-1</sup>) en el enraizamiento de brotes de *G. spathacea*.

| Tratamientos | Número de raíces* | Longitud de raíz* |
|--------------|-------------------|-------------------|
| T1           | 2.50 ± 1.41 cd    | 2.02 ± 1.14 ab    |
| T2           | 1.98 ± 0.58 de    | 1.60 ± 1.18 abc   |
| T3           | 4.26 ± 0.57 bcd   | 2.02 ± 0.88 ab    |
| T4           | 4.60 ± 1.21 abc   | 1.98 ± 0.75 ab    |
| T5           | 6.74 ± 1.61 a     | 2.52 ± 0.25 a     |
| T6           | 5.38 ± 0.75 ab    | 2.28 ± 0.68 ab    |
| T7           | 2.72 ± 1.61 cd    | 0.64 ± 0.45 bc    |
| T8           | 2.50 ± 1.40 cd    | 1.16 ± 1.03 abc   |
| T9           | 0 ± 0 e           | 0 ± 0 c           |
| T10          | 3.40 ± 1.33 bcd   | 2.24 ± 0.33 ab    |

\*medias ± SE de cada tratamiento para las variables evaluadas. Las medias seguidas por la misma letra en cada columna no son significativamente diferentes a un nivel del 5% por la prueba de Tukey.

## Número de raíces

El mayor número de raíces se observó en los medios suplementados con el regulador AIB en concentraciones de: 0.3 mgL<sup>-1</sup> (6.74 ± 1.61), 1.0 mgL<sup>-1</sup> (5.38 ± 0.75) y 0.1 mgL<sup>-1</sup> (4.60 ± 1.21), mientras que en los demás tratamientos la presencia de raíces fue baja, tal y como se observa en la Figura 5.

## Longitud de raíz

Las raíces que se generaron eran de corta longitud, el tamaño más largo se observó en los brotes del medio con 0.3 mgL<sup>-1</sup> de AIB (2.52 ± 0.25), cabe mencionar que los tratamientos: 0.1 y 1.0 mgL<sup>-1</sup> de AIA, 0.1 y 1.0 mgL<sup>-1</sup> de AIB y el medio sin reguladores (testigo) son estadísticamente iguales con; 2.02 ± 1.14, 2.02 ± 0.88, 1.98 ± 0.75, 2.28 ± 0.68 y 2.24 ± 0.33 cm respectivamente.

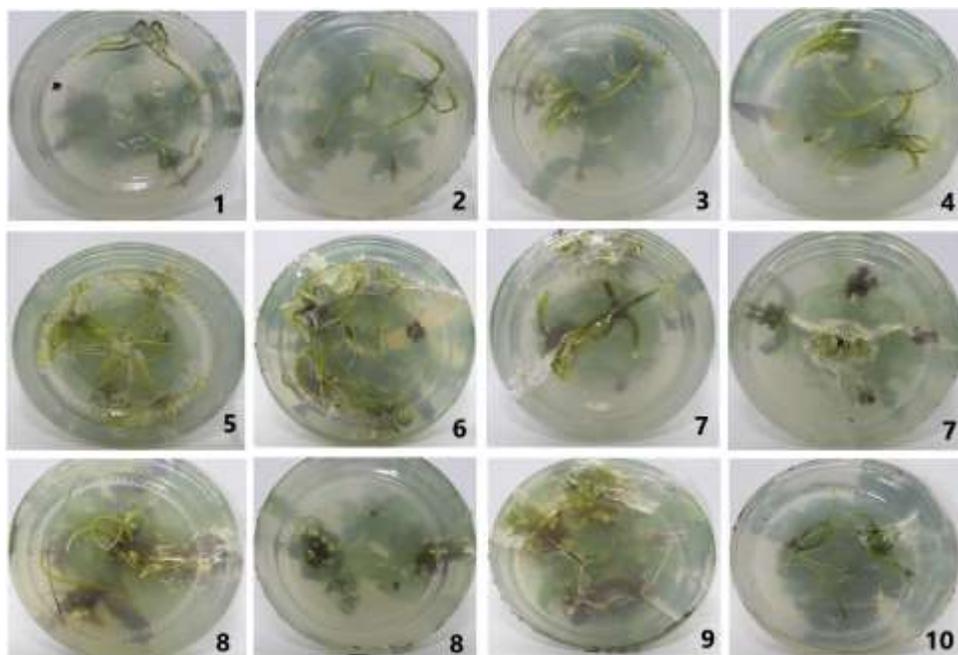


Figura 5. Enraizamiento de *G. spathacea*. 1, 2 y 3 medio de cultivo M1 con: 0.1, 0.3 y 1.0 mgL<sup>-1</sup> de AIA, 4, 5 y 6 medio suplementado con: 0.1, 0.3 y 1.0 mgL<sup>-1</sup> de AIB, tratamientos 7, 8 y 9 con: 0.1, 0.3 y 1.0 mgL<sup>-1</sup> de ANA, finalmente 10: testigo sin reguladores.

Los tratamientos con ANA, desarrollaron callos a partir del tallo, en las tres concentraciones: con 0.1 mgL<sup>-1</sup> de ANA se observó un 68 % de callos, con un peso promedio ( $0.1427 \pm 0.0209$ ), de color café claro, semicompacto. En la concentración de 0.3 mgL<sup>-1</sup> de ANA se presentó 76 % de tejido calloso, pesando ( $0.4661 \pm 0.0092$ ), fueron de color verde y compactos. Finalmente, en el medio de cultivo con 1.0 mgL<sup>-1</sup> de ANA el 100 % de establecimiento desarrollo callos, de  $1.1587 \pm 0.1253$  gr, verdes de textura compacta. Las pocas raíces de las dos primeras concentraciones eran pequeñas.



Figura 6. Callos generados en la etapa de enraizamiento con la auxina ANA: (a) 0.1 mgL<sup>-1</sup>, (b) 0.3 mgL<sup>-1</sup> y (c) 1.0 mgL<sup>-1</sup>.

A diferencia de la presente investigación, en un estudio con *G. scabra*, las concentraciones bajas de ANA a  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  indujeron el mayor número de raíces (37.2) en comparación con AIB a  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$  (25.8). Este resultado sugiere, que a mayor concentración de AIB y ANA se reduce el número y longitud de raíces (Huang *et al.*, 2014). Sharma *et al.*, (2014), reportan que el medio MS suplementado con AIB ( $1 \text{ mgL}^{-1}$ ) generó un 91.6 % de enraizamiento para *G. kurroo*. Por otro lado, para *G. lutea* se documenta que  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de TDZ y ANA ( $0.01 \text{ mgL}^{-1}$ ) producen rizogénesis (Drobyk *et al.*, 2015). Los resultados observados por Vinterhalter *et al.*, (2012), señalan que AIB  $1.0 \text{ mgL}^{-1}$  y sacarosa al 2% resulta óptimo para enraizar *G. dinarica*, sin embargo, el medio suplementado con ANA en concentraciones altas, estuvo acompañado por fuertes callosidades y las pocas raíces que se observaron permanecieron muy cortas, misma situación que se presentó en esta investigación con *G. spathacea*, los tratamientos con ANA generaron tejido calloso. Algo similar sucedió en un estudio con *G. utriculosa* las concentraciones de ANA desarrollaron pequeñas cantidades de callos y las raíces inducidas con esta hormona fueron compactas y cortas (Vinterhalter *et al.*, 2016). Con base a estos resultados no se recomienda usar ANA en la etapa de enraizamiento de *G. spathacea*. La estimulación de callos en esta etapa es indeseable para la calidad de las raíces y supervivencia *ex vitro* de las plantas. Cada especie en particular responde de manera diferente a las auxinas y citocininas, incluso algunas no requieren ningún suplemento de auxina en el medio para el enraizamiento (Agrawal y Gebhardt, 1994). Podría ser el caso de *G. spathacea*, en la germinación las plántulas desarrollaron buena calidad de raíces.

### **Aclimatación**

El porcentaje de sobrevivencia de las plantas aclimatadas fue de 80 %, 73 % y 60 % para los sustratos: (100 %, 3:1 y 1:1) Peat Moos-perlita respectivamente. La causa principal de la pérdida de plántula se debió a la ausencia o poca cantidad de raíces de las plantas transplantadas, el enraizador utilizado no

generó raíces como se esperaba, cabe mencionar que no hubo contaminación de patógenos. El porcentaje de sobrevivencia si bien no fue muy alto, es aceptable, *G. kurroo* registró 66.6 %, 60 %, 50 %, 41.6 y 40 % de supervivencia de plantas en vermiculita, arena y suelo (Sharma *et al.*, 2014). Para *G. scabra* los porcentajes fueron más altos alcanzando el 96% (Huang *et al.*, 2014). El porcentaje de sobrevivencia puede optimizarse, mejorando el protocolo de enraizamiento de esta especie, ejemplo, podría probarse una combinación de AIB y kinetina (debido a las observaciones en la etapa de multiplicación).

### **3.4. CONCLUSIONES**

Con base a los resultados de este trabajo se recomienda para la propagación *in vitro* de *G. spathacea*, usar el segmento basal y BA 0.3 mgL<sup>-1</sup> para la inducción de brotes, así como AIB 0.3 mgL<sup>-1</sup> para el enraizamiento y evitar ANA en esta etapa. Con esta información se contribuye a la producción *in vitro* y conservación de esta especie en su población natural.

### 3.5. LITERATURA CITADA

- Agrawal, D. C., & Gebhardt, K. (1994). Rapid micropropagation of hybrid willow (*Salix*) established by ovary culture. *Journal of plant physiology*, 143(6), 763-765.
- Chaudhuri, R. K., Pal, A., & Jha, T. B. (2008). Conservation of *Swertia chirata* through direct shoot multiplication from leaf explants. *Plant Biotechnology Reports*, 2(3), 213-218.
- Cochran W. G. & Cox, G. M. (2008). Diseños experimentales. *Trillas*. Distrito Federal, México.
- Devic, M., Momcilovic, I., Krstic, D., Maksimovic, V., & Konjevic, R. (2006). *In vitro* multiplication of willow gentian (*Gentiana asclepiadea* L.) and the production of gentiopirine and mangiferin. *Phyton-horn-*, 46(1), 45.
- Drobyk, N. M., Hrytsak, L. R., Mel'nyk, V. M., Kravets, N. B., Konvalyuk, I. I., Twardovska, M. O., & Kunakh, V. A. (2015). *In vitro* manipulation and propagation of *Gentiana* L. species from the Ukrainian Flora. In *The Gentianaceae-Volume 2: Biotechnology and Applications* (pp. 45-79). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Holobiuc, I., & Blîndu, R. (2008). *In vitro* culture of the protected rare species *Gentiana lutea* L. for conservative purpose. *Contributii Botanice*, 42, 125-134.
- Huang, S. H., Agrawal, D. C., Wu, F. S., & Tsay, H. S. (2014). *In vitro* propagation of *Gentiana scabra* Bunge-an important medicinal plant in the Chinese system of medicines. *Botanical studies*, 55(1), 56.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). <https://www.inegi.org.mx/>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nalawade, S. M., Sagare, A. P., Lee, C. Y., Kao, C. L., & Tsay, H. S. (2003). Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization. *Bot. Bull. Acad. Sin*, 44, 79-98.
- Rybczyński, J. J., Davey, M. R., Tomiczak, K., Niedziela, A., & Mikuła, A. (2015). Systems of plant regeneration in *Gentiana in vitro* cultures. In *The Gentianaceae-Vol 2: Biotechnology and Applications* (pp. 1-44). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Sharma, A., Kaur, R., & Sharma, N. (2014). *In vitro* morphogenic response of different explants of *Gentiana kurroo* Royle from Western Himalayas-an endangered medicinal plant. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20(2), 249-256.
- Smith, R. H. (2012). *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Recuperado de [https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as\\_sdt=0%2C5&q=Plant+tissue+culture%3A+Techniques+and+experiments&btnG=](https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Plant+tissue+culture%3A+Techniques+and+experiments&btnG=)
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). Secondary Metabolites and Plant Defense. *Plant physiology* fifth edition (pp. 283 - 306). Sunderland, Massachusetts, USA. Editorial Sinauer Associates inc., publishers.
- Tomiczak, K., Mięka, A., Niedziela, A., Wójcik-Lewandowska, A. I., Domżańska, L., & Rybczyński, J. J. (2019). Somatic embryogenesis in the family Gentianaceae and its biotechnological application. *Frontiers in Plant Science*, 10, 762.
- Vinterhalter, B., Milošević, D. K., Janković, T., Milojević, J., & Vinterhalter, D. (2012). *in vitro* propagation of *Gentiana dinarica* Beck. *Central European Journal of Biology*, 7(4), 690-697.
- Vinterhalter, B., Mitić, N., Vinterhalter, D., Uzelac, B., & Krstić-Milošević, D. (2016). Somatic embryogenesis and *in vitro* shoot propagation of *Gentiana utriculosa*. *Biologia*, 71(2), 139-148.
- Viola, U., & Franz, C. (1989). *In vitro* propagation of *Gentiana lutea*. *Planta medica*, 55(07), 690-690

#### 4. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS DE *GENTIANA SPATHACEA* KUNTH EN AMBIENTES DIFERENTES

Leticia Morales-Tellez<sup>1</sup>, José Luis Rodríguez-De la O<sup>1</sup>, Marcos Soto-Hernández<sup>2</sup>, Luis Fernando Contreras-Cruz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 carr. México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, México. C.P. 56230. <sup>2</sup>Postgrado de Botánica, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Texcoco, Estado de México, México.

##### RESUMEN

*Gentiana spathacea*, ha sido utilizada como planta medicinal en algunos lugares rurales de México, se le atribuye propiedades curativas contra problemas respiratorios además de aprovecharse como ornamental. Este estudio evaluó su composición química de dos ambientes contrastantes (campo y técnicas *in vitro*), las primeras muestras se recolectaron en Ixmiquilpan, Hidalgo y las otras se produjeron en laboratorio. Se utilizó 1 gramo de materia seca de raíz, tallo, hojas y flores. El extracto se obtuvo con metanol al 80%. La identificación de taninos, flavonoides, terpenos, fenoles, alcaloides y saponinas se determinaron a través de pruebas de desarrollo de color y la prueba de la espuma respectivamente. Se empleó la técnica de cromatografía en capa fina en la identificación preliminar y la cuantificación se hizo por espectrofotometría. Para el análisis cualitativo se reportó como presencia o ausencia de los metabolitos secundarios, mientras que para el análisis cuantitativo se realizó una regresión lineal y se interpolaron los datos de las mezclas vegetales. Los fenoles se localizan en todos los órganos vegetales evaluados, después los taninos, terpenos y flavonoides, sin embargo, no se observó presencia de alcaloides y saponinas. Las flores y hojas de campo tienen mayor presencia de metabolitos y muy pocas en la raíz. De esas plantas en las hojas se concentró más flavonoides totales (0.573 mg/gPS). De las plantas propagadas *in vitro*, las raíces concentraron más ácidos fenólicos (5.96 mg/gPS) y las hojas obtuvieron un mayor porcentaje de taninos (58.47 %/gPS) y triterpenos (13.715 mg/gPS). Los resultados indican que las condiciones ambientales en donde crece la planta es determinante en la concentración de sus ingredientes activos, las vitroplantas en contraste con las de campo presentaron mayor cantidad de compuesto químicos.

**Palabras clave:** análisis fitoquímico, fenoles, metabolitos secundarios, propagación *in vitro*, terpenos.

#### 4. IDENTIFICATION OF CHEMICAL COMPOUNDS OF *GENTIANA SPATHACEA* KUNTH IN DIFFERENT ENVIRONMENTS

##### ABSTRACT

*Gentiana spathacea*, has been used as a medicinal plant in some rural places in Mexico, is attributed healing properties against respiratory problems as well as being used as an ornamental. This study evaluated its chemical composition of two contrasting environments (field and in vitro techniques), the first samples were collected in Ixmiquilpan, Hidalgo and the others were produced in the laboratory. A gram of dry matter of root, stem, leaves and flowers was used. The extract was obtained with 80% methanol. The identification of tannins, flavonoids, terpenes, phenols, alkaloids and saponins were done through colorimetric tests foam test respectively. The thin layer chromatography technique was used in the preliminary identification and the quantification was through spectrophotometry. For the qualitative analysis, the presence or absence of secondary metabolites was reported, while for the quantitative analysis a linear regression was performed and the data of the plant mixtures were interpolated. Phenols are located in all evaluated plant organs, then tannins, terpenes and flavonoids, however, no presence of alkaloids and saponins was observed. The flowers and leaves of field have greater presence of metabolites and very few in the root. Of those plants in the leaves more total flavonoids were concentrated (0.573 mg/gdw). Of the plants propagated in vitro, the roots concentrated more phenolic acids (5.96 mg/gdw) and the leaves obtained a higher percentage of tannins (58.47 %/gdw) and triterpenes (13,715 mg/gdw). The results indicate that the environmental conditions where the plant grows is a determining factor in the concentration of its active ingredients, in vitro plants in contrast to those in the field presented a greater amount of chemical compounds.

**Key words:** phytochemical analysis, phenols, secondary metabolites, *in vitro* propagation, terpenes.

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

Las plantas producen una sorprendente variedad de compuestos químicos que se derivan del metabolismo primario (Shilpa *et al.*, 2010). Estos ingredientes activos difieren de los metabolitos primarios al tener una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, se encuentran particularmente en una sola familia, género, especie o grupos de plantas relacionados (Taiz y Zeiger, 2010). A lo largo de la evolución las plantas han tenido la necesidad de sintetizar diferentes compuestos químicos como respuesta a necesidades específicas (Pichersky y Gang, 2000). Los estudios de estos compuestos tienen múltiples aplicaciones prácticas, en virtud de sus actividades biológicas, como mecanismos de defensa contra patógenos y depredadores, para atraer polinizadores o para suprimir el crecimiento de plantas. Algunos de ellos están relacionados en la defensa contra el estrés abiótico, otros resultan importantes en la comunicación de las plantas con otros organismos (Schafer y Wink 2009). También se emplean comercialmente como insecticidas, fragancias y aromatizantes, sus principios activos son importantes en la industria farmacéutica y ha sido ampliamente usado en la medicina tradicional en diversas partes del mundo. Las plantas medicinales representan una fuente principal de compuestos químicos como alcaloides, terpenos, fenólicos, entre otros (Alamgir, 2017).

La familia Gentianaceae ha sido extensamente estudiada en cuanto al contenido de sus ingredientes activos (Jensen y Schripsema, 2002). Estudios recientes han manifestado que las especies del género *Gentiana* tienen propiedades antiinflamatorias, analgésicas, antirreumáticas, antipiréticas y diuréticas (Šavikin *et al.*, 2015). El conocimiento de las plantas, respecto a sus características, propiedades y usos, tiene una larga tradición en nuestro país, en las comunidades de México es común el uso de la biodiversidad con fines medicinales. Las gentianas han sido trascendentales en muchas familias campesinas y rurales de México y del orbe, por su aprovechamiento en la medicina tradicional. Ejemplo de ello es *G. spathacea* utilizada para los problemas respiratorios, digestivos y fiebre (Rojas *et al.*, 2000). Por lo anterior ha

surgido el interés de detectar los principales compuestos químicos mayoritarios presentes en esta especie en sus diferentes estructuras; flores, hojas, tallos y raíces y valorar la concentración de esos metabolitos secundarios respecto al ambiente de procedencia.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Las muestras se recolectaron en dos ambientes diferentes (campo y laboratorio), las primeras, en las montañas de La Lagunita, Ixmiquilpan, Hidalgo, durante el periodo de floración de la planta en el mes de diciembre y enero. Las segundas, se obtuvieron de la propagación *in vitro*, en el medio de cultivo básico MS 100 % Murashige y Skoog (1962), sin reguladores de crecimiento, en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales en la Universidad Autónoma Chapingo. Se separaron las estructuras de la planta en flores, hojas, tallos y raíces, fueron secadas en sombra a temperatura ambiente. Posteriormente se pasaron por un molino de discos hasta obtener un polvo fino.

### **Obtención del extracto**

Se pesó 1 gramo de cada muestra (material seco), y se le añadió 10 ml de metanol al 80 %. El tubo de ensayo se introdujo a baño de ultrasonido por tres periodos de 10 minutos, con 5 minutos de reposo entre cada uno. El análisis fitoquímico consistió en tres etapas.

#### **a) Análisis preliminar**

Del extracto en metanol al 80 % se tomaron 0.5 mL. Se ejecutaron ensayos colorimétricos para la determinación de los principales metabolitos secundarios: taninos con el reactivo cloruro férrico al 3 % ( $\text{FeCl}_3$ ), para flavonoides se usó magnesio metálico en presencia de ácido clorhídrico (HCl), los terpenos se determinaron con la prueba Libermann, fenoles con el reactivo Folin-Ciocalteu al

10 %, alcaloides empleando el reactivo Dragendorff y saponinas con la prueba de la espuma. El control positivo con el que se comparó la muestra y el criterio de evaluación se describe en el Cuadro 4.

Cuadro 4. . Control positivo e indicador para la identificación preliminar de los metabolitos secundarios en *G. spathacea*.

|             | <b>Control positivo</b> | <b>Indicador</b>                |
|-------------|-------------------------|---------------------------------|
| Taninos     | Ácido tánico            | Azul oscuro                     |
| Flavonoides | Quercitina              | Naranja débil, efervescencia    |
| Terpenoides | Ácido masticadienoico   | Morado intenso a café           |
| Fenoles     | Ácido gálico            | Azul intenso                    |
| Alcaloides  | Lupinus sp.             | Naranja brillante o precipitado |
| Saponinas   | Zacate chi-chi          | Espuma > 1min                   |

Fuente: Adaptado de Soto-Hernández *et al.* (2019).

### **b) Cromatografía en capa fina**

Se concentró el extracto en metanol al 80%, a una temperatura de 35 a 40 °C. Se pusieron algunas gotas del extracto concentrado en las placas de 10x10, previamente marcadas. La elución sucedió en una cámara de cromatografía, se dejó secar, se observaron las placas bajo luz ultravioleta y se revelaron de acuerdo al Cuadro 5. Cada metabolito secundario se comparó con un control positivo: taninos, flavonoides, terpenos, fenoles y alcaloides con ácido tánico, quercitina, ácido masticadienoico, ácido gálico y Lupinus sp., respectivamente.

Cuadro 5. Sistema de elución y revelador de los metabolitos secundarios, empleados para el análisis fitoquímico de *G. spathacea*.

|             | <b>Elución (v/v)</b>             | <b>Revelador</b>   | <b>Observaciones</b>                  |
|-------------|----------------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| Taninos     | Acetato de etilo-<br>metanol 1:1 | Cloruro<br>férrico |                                       |
| Flavonoides | Acetato de etilo-<br>metanol 1:1 | NP-PEG             | Previo al revelado<br>exponer a 110°C |

|             |                                      |                     |  |
|-------------|--------------------------------------|---------------------|--|
| Terpenoides | Tolueno- cloroformo-<br>etanol 4:4:2 | Anisaldehido        | Después de revelar<br>exponer a 110 °C |
| Fenoles     | Acetato de etilo-<br>metanol 9:1     | Folin-<br>Ciocalteu |  |

Fuente: adaptado de Soto-Hernández *et al.* (2019).

### c) Cuantificación de metabolitos secundarios

**Cuantificación de taninos (proantocianidinas):** se preparó un extracto en acetona al 70 % con 200 mg de muestra vegetal, se introdujo a baño de ultrasonido por 20 min, el sobrenadante se colectó y permaneció en hielo. En un tubo con tapa se depositaron 0.5 ml del extracto en acetona, añadiendo 3 ml del reactivo butanol-HCl y 0.1 ml del reactivo de hierro, se llevó a punto de ebullición en baño maría por 1 hora, se dejó enfriar y se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 550 nanómetros.

**Cuantificación de flavonoides totales:** se hizo una curva utilizando solución de quercitina (0.024 µg/µL en MeOH al 80 %), que fue distribuido en 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500 µl en tubos de ensayo. Del extracto vegetal en metanol al 80 % se tomó 100 µl y se colocó en un tubo independiente. A cada uno de los tubos se le añadió metanol hasta completar 1mL, posteriormente se incorporó 2 mL de acetato de potasio 1M y cloruro de aluminio. Se dejó reposar por 40 minutos y se tomó la absorbancia a 415 nm.

**Cuantificación de triterpenos totales:** para la extracción de triterpenos se desarrolló el procedimiento descrito por Ibarra (2017). Se obtuvo un extracto en etanol al 70 % con 1 gramo de material vegetal seco, se reposó durante 10 horas. Después el sobrenadante se evaporó en un rotavapor (marca: BÜCHI, Mod. R-114, equipado con baño de agua B-480) y se extrajo 4 veces con butanol-agua (1:1), decantando la fase acuosa. La fase orgánica se sometió a un segundo proceso de rotoevaporación agregando al residuo éter etílico. Se refrigeró a 4 °C durante 12 horas y finalmente se secó y se almaceno a -20 °C.

Para hacer la curva, se utilizó la solución madre de ácido ursólico ( $1\text{mg/mL}^{-1}$ ), que fue colocado en tubos con 20, 60, 80, 100 y 120  $\mu\text{l}$ . Respecto a la muestra vegetal se preparó una solución a una concentración de  $0.5\text{mg/mL}^{-1}$  en etanol al 70 % y se tomaron 100  $\mu\text{l}$ . A cada uno de los tubos se le añadió etanol absoluto, 100  $\mu\text{l}$  de vainillina al 5%, 400  $\mu\text{l}$  de ácido perclórico, se llevó a baño maría a 60 °C por 15 minutos. Posteriormente se le agregó 2.5 ml de ácido acético glacial y se leyó la absorbancia a 550 nm.

**Cuantificación de ácidos fenólicos:** se realizó una curva de calibración empleando un estándar de ácido gálico ( $0.024\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) distribuido en tubos de ensayo con 25, 50, 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{l}$ . Se dispuso de 20  $\mu\text{l}$  de extracto vegetal en metanol y se colocó en un tubo independiente. A cada tubo se le agregó agua destilada hasta completar 1  $\mu\text{l}$ , en seguida se incorporó 2.5  $\mu\text{l}$  de Folin 1N y 975  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaCO}_3$ . Se reposó durante 1 hora a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 740 nm.

Para todas las cuantificaciones de los metabolitos se preparó un blanco (sin estándar) y las muestras se hicieron por triplicado. Las absorbancias fueron leídas en el espectrofotómetro de la marca Spectronic® Instruments, Mod. GENESYS – 5.

### **Análisis estadístico**

Respecto al análisis cualitativo (preliminar y cromatografía), el primero se reporta como presencia o ausencia de metabolitos secundarios con base al criterio de colorimetría plasmado en el Cuadro 1. El estudio cromatográfico se determinó con fotografías en la cámara de luz ultravioleta. En relación al análisis cuantitativo se desarrolló una curva de calibración o regresión lineal con los datos de las concentraciones de los patrones efectuando una interpolación con los datos de las muestras vegetales. El resultado de los taninos se reporta en porcentaje utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ taninos} = \frac{\text{abs.550 nm (78.26) (f.d)}}{\% \text{ MS (90\%)}}$$

F.d. = factor de dilución

% MS = % de materia seca. Se resta el % de humedad al 100 % de materia seca. Generalmente se considera un 10 % de humedad por lo que el valor de % de materia seca queda en 90.

### 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia o ausencia de los metabolitos secundarios evaluados se muestran en el Cuadro 3 que hacen referencia a los resultados obtenidos del análisis preliminar de seis ingredientes activos en diferentes estructuras de *G. spathacea* provenientes de dos ambientes.

Cuadro 6. Resultados del análisis preliminar de metabolitos secundarios en *G. spathacea* determinado por coloración y precipitado.

| Metabolitos secundarios | Campo  |       |       |      | <i>In vitro</i> |       |      | Control positivo |
|-------------------------|--------|-------|-------|------|-----------------|-------|------|------------------|
|                         | Flores | Hojas | Tallo | Raíz | Hojas           | Tallo | Raíz |                  |
| Taninos                 | +++    | +++   | +++   | -    | +++             | +++   | +++  | +++              |
| Flavonoides             | +++    | ++    | +++   | -    | -               | -     | -    | +++              |
| Terpenoides             | +++    | +++   | -     | -    | +++             | ++    | +++  | +++              |
| Fenoles                 | ++     | +++   | +++   | +    | +++             | ++    | +++  | +++              |
| Alcaloides              | +      | +     | +     | +    | -               | -     | -    | +++              |
| Saponinas               | -      | -     | -     | -    | -               | -     | -    | +++              |

Presencia (+), ausencia (-) de compuestos químicos. Criterio: (+++) cuando el color de la muestra fue muy intenso, (++) color medio, se acercaba al color del estándar; (+) el color era tenue y (-) la muestra no se tiñó de acuerdo al indicador. Fuente: Autores.

Los resultados de este análisis indican la presencia de 4 ingredientes activos mayoritarios (taninos, flavonoides, terpenos y fenoles) en *G. spathacea* con extracto en metanol al 80 %. Arriaga y Montero (2015), usando el extracto en

metanol, identificaron en la fase polar (metanol-agua) la presencia de alcaloides, taninos y fenoles con los reactivos Dragendorff, cloruro férrico y Lieberman-Buchard respectivamente. Sin embargo, en la fase no polar (éter de petróleo) solamente observaron fenoles. Los autores antes citados, empleando el extracto en acetona observaron la presencia de alcaloides con el reactivo Dragendorff y fenoles. En la presente investigación no se observaron saponinas y alcaloides. Existen varias técnicas de extracción, la variabilidad de los resultados depende de la naturaleza de los constituyentes, el tipo de material vegetal, el propósito del estudio y del solvente, que tiene gran influencia en la determinación exitosa de los compuestos químicos de una especie vegetal específica (Alamgir, 2017).

La Figura 7 muestra la cromatografía en capa fina de los ingredientes activos estudiados en *G. spathacea*.

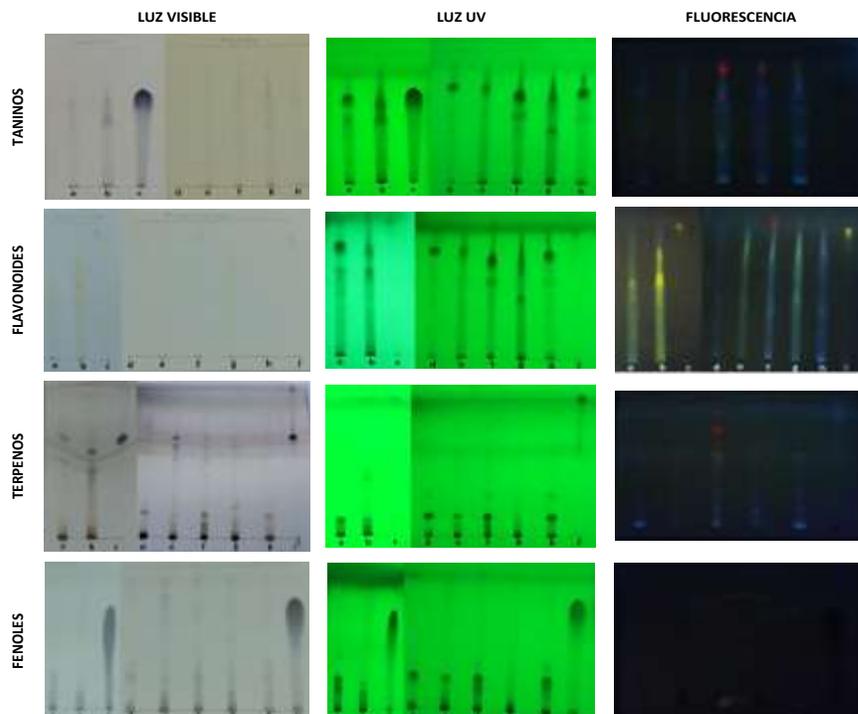


Figura 7. Cromatografía en capa fina de los compuestos químicos de *G. spathacea* y visualización en luz UV. Las muestras de campo corresponden: a: flores, b: hojas, d: raíz, e: tallos, mientras que f: hojas, g: raíz y h: tallos son estructuras propagadas *in vitro*. El estándar se representa con las letras c, i.

En las placas se observa el desplazamiento del compuesto químico y se visualiza un color particular respecto al metabolito secundario analizado. La cámara de luz

UV permite visualizar fluorescencia de los compuestos. Los resultados en las placas indican y corroboran la presencia de fenoles, flavonoides, terpenos y taninos, en los distintos órganos vegetales de *G. spathacea*. No se realizó cromatografía para saponinas y alcaloides debido a que la respuesta en el análisis preliminar fue muy bajo o nulo. En el Cuadro 7 se muestran los resultados del porcentaje de taninos en cada una de las estructuras vegetales de *Gentiana spathacea*.

Cuadro 7. Cuantificación de taninos (proantocianidinas) en *G. spathacea* con extracto en acetona al 70 %.

| Ambiente | Estructura | Absorbancia<br>550 nm | % en 200 mg PS | %/gPS |
|----------|------------|-----------------------|----------------|-------|
| Campo    | Tallos     | 0.122 ± 0.012         | 10.652 ± 1.045 | 53.26 |
|          | Flores     | 0.117 ± 0.004         | 10.173 ± 0.368 | 50.86 |
|          | Hojas      | 0.109 ± 0.001         | 9.478 ± 0.122  | 47.39 |
| In vitro | Raíz       | 0.049 ± 0.001         | 4.261 ± 0.122  | 21.30 |
|          | Hojas      | 0.134 ± 0.055         | 11.695 ± 4.857 | 58.47 |
|          | Raíz       | 0.082 ± 0.007         | 7.131 ± 0.614  | 35.65 |
|          | Tallo      | 0.071 ± 0.003         | 6.217 ± 0.307  | 31.08 |

Los datos representan el promedio y ± desviación estándar. Gramo de peso seco de la muestra vegetal (gPS).

El mayor porcentaje de taninos se concentra en las hojas provenientes de laboratorio (58.47 %), los tallos, flores y hojas de campo están muy cerca de un 50% y la concentración más baja la tiene las raíces (21.30 %) provenientes de su hábitat natural. Los taninos son compuestos polifenólicos, químicamente existen taninos hidrolizables y condensados a la cual pertenecen la protoantocianidinas que son en su mayoría unidades de catequina y epicatequina y se refieren a la clase más amplia de polifenoles. Su distribución en el reino vegetal es amplia, farmacéuticamente tienen propiedades antibacterianas, astringentes, antivirales (Alamgir, 2017). Son toxinas que reducen el crecimiento y supervivencia de algunos herbívoros cuando lo consumen, además los taninos actúan como

repelentes alimenticios en diversos animales (Taiz y Zeiger, 2010). En la Figura 8 se presentan las curvas de calibración para flavonoides, triterpenos y ácidos fenólicos de *G. spathacea*.

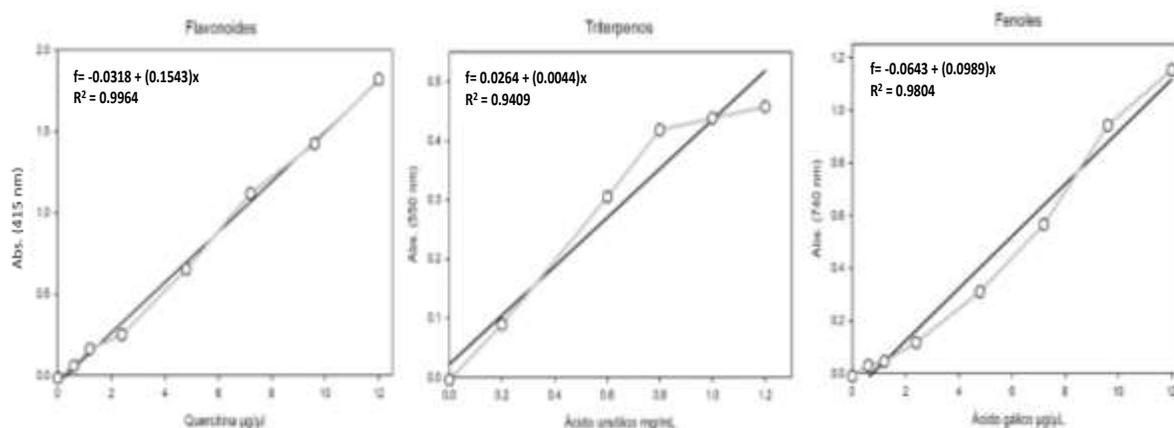


Figura 8. Curvas de calibración para la cuantificación de flavonoides, triterpenos y fenoles en *G. spathacea*.

Con la ecuación propuesta en cada curva se hizo la interpolación con los datos de las muestras vegetales para determinar la concentración de cada ingrediente activo presente en las estructuras de *G. spathacea*. La concentración de flavonoides se describe en el cuadro 8.

Cuadro 8. Cuantificación de flavonoides totales en *G. spathacea* en extracto metanólico al 80 %.

| Ambiente | Estructura | Absorbancia<br>415 nm | Concentración de<br>flavonoides µg/µL | mg de<br>flavonoides/gPS |
|----------|------------|-----------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Campo    | Hojas      | 0.863 ± 0.188         | 5.734 ± 1.249                         | 0.573 ± 0.124            |
|          | Flor       | 0.473 ± 0.014         | 3.146 ± 0.098                         | 0.314 ± 0.009            |
|          | Tallo      | 0.300 ± 0.034         | 1.996 ± 0.230                         | 0.199 ± 0.023            |
|          | Raíz       | 0.085 ± 0.002         | 0.568 ± 0.014                         | 0.056 ± 0.001            |
| in vitro | Raíz       | 0.548 ± 0.015         | 3.644 ± 0.103                         | 0.364 ± 0.073            |
|          | Hojas      | 0.359 ± 0.015         | 2.385 ± 0.103                         | 0.238 ± 0.010            |
|          | Tallo      | 0.123 ± 0.016         | 0.821 ± 0.108                         | 0.082 ± 0.010            |

Medias ± SE de las diferentes estructuras provenientes de campo y laboratorio. gPS: gramo de peso seco de la muestra vegetal.

Las hojas ( $0.573 \pm 0.124$  mg/gPS) y flores ( $0.314 \pm 0.009$  mg/gPS) de campo, así como las raíces ( $0.364 \pm 0.073$  mg/gPS) de laboratorio fueron los órganos vegetales que presentaron una concentración mayor de flavonoides. En un estudio realizado por Arriaga y Montero (2015), en hojas de esta misma especie reportan 10.32 mg eq. Rutina/2gr de la muestra vegetal en extracto de acetona, aunado a esto es posible explicar las discrepancias en los resultados a partir de los distintos estándares y extractos empleados. Los flavonoides corresponden a una de las clases más grandes de fenólicos vegetales. Los diversos tipos de flavonoides desempeñan funciones muy variadas en las plantas, incluye la pigmentación y la defensa, las antocianidinas es el grupo más extenso de flavonoides pigmentados responsables de la mayoría de la coloración rojo, rosa, morado y azul, que son de vital importancia para atraer polinizadores (Taiz y Zeiger, 2010).

Los terpenos constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios y parecen estar involucrados en la defensa de las plantas. El Cuadro 9 muestra las concentraciones de triterpenos presentes en las diversas estructuras evaluadas de *G. spathacea*.

Cuadro 9. Cuantificación de triterpenos totales en *G. spathacea* en extracto de etanol al 70 %.

| Ambiente | Estructura | Absorbancia<br>550 nm | Concentración de<br>triterpenos $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ | mg de<br>triterpenos/gPS |
|----------|------------|-----------------------|---|--------------------------|
| campo    | Tallo      | $0.143 \pm 0.600$     | $32.5 \pm 13.820$   | $4.940 \pm 2.100$        |
|          | Flor       | $0.148 \pm 0.010$     | $33.75 \pm 2.410$   | $2.767 \pm 0.197$        |
| In vitro | Hojas      | $0.141 \pm 0.005$     | $32.045 \pm 1.285$  | $13.715 \pm 0.550$       |
|          | Raíz       | $0.109 \pm 0.007$     | $24.772 \pm 1.607$  | $5.350 \pm 0.347$        |

Los datos representan el promedio y  $\pm$  desviación estándar. Gramo de peso seco de la muestra vegetal (gPS).

Existe una diferencia marcada en la concentración de triterpenos respecto a las hojas ( $13.715 \pm 0.550$  mg/gPS) de laboratorio y las estructuras de campo, la

razón puede deberse a diversas situaciones biológicas de la planta. No se llevó a cabo la cuantificación de triterpenos en tallos *in vitro* debido a la poca disponibilidad del material vegetal y no fue posible la cuantificación en las hojas de campo debido a la escasa liberación de polvo.

Los ácidos fenólicos son los metabolitos secundarios más distribuidos y abundantes de las especies vegetales. Se dividen en dos clases, derivados del ácido benzoico (ácido gálico) y del ácido cinámico (Alamgir, 2017). En el Cuadro 10 se describe las diferentes concentraciones de ácidos fenólicos en los órganos vegetales de *G. spathacea*.

Cuadro 10. Cuantificación de fenoles totales de *G. spathacea* con extracto en metanol al 80 %.

| Ambiente        | Estructura | Absorbancia<br>740 nm | Concentración<br>ácido gálico $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ | mg de ácidos<br>fenólicos/gPS |
|-----------------|------------|-----------------------|---|-------------------------------|
| Campo           | Hoja       | $1.02 \pm 0.11$       | $11.17 \pm 1.24$  | $5.58 \pm 0.62$               |
|                 | Tallo      | $0.82 \pm 0.01$       | $8.99 \pm 0.11$   | $4.49 \pm 0.05$               |
|                 | Flor       | $0.75 \pm 0.05$       | $8.17 \pm 0.64$   | $4.08 \pm 0.32$               |
|                 | Raíz       | $0.27 \pm 0.00$       | $2.98 \pm 0.007$  | $1.49 \pm 0.003$              |
| <i>In vitro</i> | Raíz       | $1.09 \pm 0.08$       | $11.93 \pm 0.91$  | $5.96 \pm 0.45$               |
|                 | Tallo      | $0.49 \pm 0.03$       | $5.41 \pm 0.37$   | $2.70 \pm 0.18$               |
|                 | Hojas      | $0.77 \pm 0.03$       | $8.48 \pm 0.40$   | $4.24 \pm 0.20$               |

Los datos representan el promedio y  $\pm$  desviación estándar. Gramo de peso seco de la muestra vegetal (gPS).

El contenido de fenoles difiere respecto a los órganos de la planta y al ambiente de procedencia. Las raíces propagadas en el laboratorio presentan la mayor concentración ( $5.96 \pm 0.45$  mg/gPS) de fenoles, sin embargo, las hojas, tallos y flores de campo no se encuentran muy alejadas de aquella cantidad. Arriaga y Montero (2015), reportan en hojas una concentración de 45.45 mg eq. de ácido gálico/1 gr de muestra, la diferencia probablemente sea consecuencia de las unidades de medida del estándar empleado, en esa investigación se usó mg/mL.

El análisis cuantitativo mostró las diferentes concentraciones de taninos, flavonoides, terpenos y fenoles entre las muestras cultivadas *in vitro* y silvestres. En la mayoría de los órganos de *G. sphatacea* se pudo presenciar los diferentes compuestos químicos analizados, sin embargo, existen diferencias en las concentraciones respecto al ambiente de procedencia, se aprecia que las hojas ( $13.715 \pm 0.550$ ) y raíces ( $5.350 \pm 0.347$ ) propagadas en laboratorio tienen la mayor concentración de triterpenos. El porcentaje más alto de taninos se concentró en las hojas *in vitro* (58.47 %), no obstante, la concentración de los tallos, flores y hojas de campo están muy cerca de este resultado. Los fenoles se encuentran en cantidades cercanas entre las raíces *in vitro* ( $5.96 \pm 0.450$ ), las hojas ( $5.58 \pm 0.62$ ) y tallos ( $4.49 \pm 0.05$ ) de campo. Mientras que la concentración más alta de flavonoides se presenta en las hojas ( $0.57 \pm 0.124$ ) de plantas silvestres. Las raíces provenientes de su hábitat natural concentran pequeñas cantidades de los ingredientes activos analizados.

Diversos estudios fitoquímicos demuestran que los iridoides y secoiridoides son los constituyentes principales en las especies del género *Gentiana* (Yang *et al.*, 2010). Estos compuestos naturales pertenecen a los terpenoides (Jensen y Schripsema, 2002). Los flavonoides son muy relevantes en *Gentiana*, se ha aislado una considerable cantidad, de los cuales 32 son xantonas, formando así la clase principal de flavonoides en este género (Yang *et al.*, 2010), también se han identificado triterpenos, flavonas y aceites esenciales (Pan *et al.*, 2016). De las partes aéreas de *G. lutea*, se aislaron tres tipos de metabolitos secundarios, incluyendo xantonas, flavonoides y secoiridoides; *G. dinarica* contenía secoiridoides y C-glucoflavonas. El análisis del extracto en metanol de las partes aéreas de *G. utriculosa* mostró la presencia de estos compuestos bioactivos (Šavikin, *et al.*, 2015). En relación a la composición química se han demostrado numerosas actividades farmacológicas en las especies de Gentianaceae (Jensen y Schripsema 2002; Šavikin *et al.*, 2015). Las especies del género *Gentiana* tienen diversas propiedades terapéuticas relacionadas con la raíz (Mirzaee *et al.*, 2017). Algunas investigaciones han demostrado que los

secoiridoides y xantonas son responsables de esta actividad. Otros estudios mostraron que la raíz posee actividad antiinflamatoria y antimicrobiana y que *G. lutea* se caracteriza por tener como componentes principales los secoiridoides (Šavikin *et al.*, 2015). Además, contienen amarogentina uno de los compuestos naturales más amargos (Singh, 2008). Estos compuestos químicos identificados en otras especies del Género *Gentiana* podrían encontrarse en *G. spathacea* debido a los resultados de este estudio, que permitió la identificación de terpenos, flavonoides, fenoles y taninos, que son grupos de metabolitos secundarios a los que pertenecen dichos compuestos químicos.

Las diferencias en las concentraciones de los metabolitos secundarios entre un ambiente y otro, se debe a diversos factores. La biosíntesis del metabolismo secundario frecuentemente se restringe a un tejido en particular y ocurre en una etapa específica de desarrollo (Pichersky y Gang, 2000). El contenido de estas sustancias se ve afectado por el origen, el entorno del cultivo, el pH, las condiciones de almacenamiento, la edad de la planta. También depende de la época de cosecha, el periodo antes de la floración es importante, la acumulación de flavonoides ocurre en esta fase, algunas xantonas se acumularon en ese momento, al igual que la acumulación de iridoides y secoiridoides en la etapa vegetativa (Xu *et al.*, 2017). El proceso de secado es otro factor importante, el secado artificial puede conservar un menor porcentaje del compuesto en comparación con el secado natural (Carnat *et al.*, 2005). La preparación de muestras en el extracto es el primer desafío en el análisis, el metanol acuoso es el solvente más exitoso para la obtención de la mayoría de los ingredientes activos, incluidos iridoides y secoiridoides, xantonas, triterpenoides, flavonas (Xu *et al.*, 2017). Las variaciones climáticas intervienen en la concentración de metabolitos secundarios, por lo que el crecimiento de la planta en ambientes controlados supera varias limitaciones, el cultivo de tejidos vegetales resulta ser una alternativa para obtener productos químicos (Huang *et al.*, 2014).

#### 4.4. CONCLUSIONES

Se logró identificar la presencia de taninos, flavonoides, terpenos y ácidos fenólicos en *G. spathacea*. Además, se demostró que las plantas propagadas *in vitro* acumulan una mayor concentración de metabolitos secundarios en contraste con las de campo. Estos resultados orientan a posibles estudios respecto a la producción de ingredientes activos bajo sistemas biotecnológicos.

#### 4.5. LITERATURA CITADA

- Alamgir, A. N. M. (2017). *Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts* (pp. 1-306). Chittagong, Bangladesh. Recuperado de [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=2LZhDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=Therapeutic+Use+of+Medicinal+Plants+and+Their+Extracts&ots=aX8XBWu3Rr&sig=EJdsHiJeuM4ED\\_jrj1icXkDeHyM#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=2LZhDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR9&dq=Therapeutic+Use+of+Medicinal+Plants+and+Their+Extracts&ots=aX8XBWu3Rr&sig=EJdsHiJeuM4ED_jrj1icXkDeHyM#v=onepage&q&f=false)
- Arriaga, A. E., y Montero, E. D. (2015). Determinación de la Actividad Hipoglucemiante de *Polygonum Aviculare* y Actividad Antiinflamatoria de *Cuphea Aequipetala Cav.*, *Taxodium Mucronatum* y *Gentiana Spathacea Kunth* (Tesis de Pregrado). Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.
- Carnat, A., Fraise, D., Carnat, A. P., Felgines, C., Chaud, D., & Lamaison, J. L. (2005). Influence of drying mode on iridoid bitter constituent levels in gentian root. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(4), 598-602.
- Huang, S. H., Vishwakarma, R. K., Lee, T. T., Chan, H. S., & Tsay, H. S. (2014). Establishment of hairy root lines and analysis of iridoids and secoiridoids in the medicinal plant *Gentiana scabra*. *Botanical studies*, 55(1), 17.
- Ibarra, C. D. (2017). Estudio del contenido de compuestos fitoquímicos en hoja, tallo, flor verde y beneficiado de *Vanilla planiflora* Jacks. ex Andrews de la región de Totonacapan, México (Tesis de Doctorado). Colegio de Postgraduados, campus Puebla, México.
- Jensen, S. R., & Schripsema, J. (2002). Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae. In *Gentianaceae-systematics and natural history* (pp. 573-631). Cambridge University Press.

- Mirzaee, F., Hosseini, A., Jouybari, H. B., Davoodi, A., & Azadbakht, M. (2017). Medicinal, biological and phytochemical properties of *Gentiana* species. *Journal of traditional and complementary medicine*, 7(4), 400-408.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Pan, Y., Zhao, Y. L., Zhang, J., Li, W. Y., & Wang, Y. Z. (2016). Phytochemistry and Pharmacological Activities of the Genus *Gentiana* (Gentianaceae). *Chemistry & biodiversity*, 13(2), 107.
- Pichersky, E., & Gang, D. R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science*, 5(10), 439-445.
- Rojas, A., Bah, M., Rojas, J. I., & Gutiérrez, D. M. (2000). Smooth muscle relaxing activity of gentiopicroside isolated from *Gentiana spathacea*. *Planta médica*, 66(08), 765-767.
- Šavikin, K., Aljančić, I. S., Vajs, V. E., Milosavljević, S. M., Jadranin, M., Đorđević, I., & Menković, N. R. (2015). Bioactive Secondary Metabolites in Several Genera of Gentianaceae Species from the Central Regions of the Balkan Peninsula. In *The Gentianaceae-Volume 2: Biotechnology and Applications* (pp. 319-347). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Schäfer, H., & Wink, M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 4(12), 1684-1703.
- Shilpa, K., Varun, K., & Lakshmi, B. S. (2010). An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of Plant Sciences*, 5(3), 222-247.
- Singh, A. (2008). Phytochemicals of Gentianaceae: a review of pharmacological properties. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 1(1), 33-36.
- Soto-Hernández, M., Palma-Tenango, M. & San Miguel-Chávez, R. (2019). Fitoquímica Experimental (pp. 1-121). Texcoco, Estado de México, México. Editorial Colegio de Postgraduados.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). Secondary Metabolites and Plant Defense. *Plant physiology* fifth edition (pp. 283 - 306). Sunderland, Massachusetts, USA. Editorial Sinauer Associates inc., publishers.

Xu, Y., Li, Y., Maffucci, K., Huang, L., & Zeng, R. (2017). Analytical Methods of Phytochemicals from the Genus *Gentiana*. *Molecules*, 22(12), 2080.

Yang, J. L., Liu, L. L., & Shi, Y. P. (2010). Phytochemicals and biological activities of *Gentiana* species. *Natural product communications*, 5(4), 649-664.

## 5. INDUCCIÓN DE CALLOGÉNESIS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE FLOR DE HIELO (*GENTIANA SPATHACEA* KUNTH)

Leticia Morales-Tellez<sup>1</sup>, José Luis Rodríguez-De la O<sup>1</sup>, Marcos Soto-Hernández<sup>2</sup>, Luis Fernando Contreras-Cruz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 carr. México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, México. C.P. 56230. <sup>2</sup>Postgrado de Botánica, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Texcoco, Estado de México, México.

### RESUMEN

Las técnicas biotecnológicas, desempeñan un papel importante en la búsqueda de nuevas alternativas que permita la propagación masiva de plantas además de la producción de ingredientes activos. El objetivo del presente estudio fue establecer un método eficiente que promueva la inducción de callos a partir de hojas de *Gentiana spathacea*. Se constituyó un experimento completamente al azar, con 27 tratamientos, un testigo y 10 repeticiones. Las hojas se dividieron en dos secciones (proximales al peciolo y al ápice), y fueron sembrados en el medio básico MS suplementado con BA en combinación con ANA y 2,4-D con diferentes concentraciones (0.0, 0.1, 0.3 y 1.0 mgL<sup>-1</sup>), invirtiendo la polaridad de la hoja, bajo oscuridad continua durante 6 semanas. Se evaluó la probabilidad de generación de callo, mediante el Modelo Lineal General (GLM) Logit ( $\pi$ ). Y un ANOVA para la variable peso. La combinación de 0.3 mgL<sup>-1</sup> de BA y ANA (T10) tiene mayor probabilidad de producir callos,  $p = 0.96$  para explantes próximos al peciolo y  $p = 0.94$  explantes cercanos al ápice. En contraste con los reguladores 2,4-D y TDZ en donde la ocurrencia de callos fue cero. Los callos de mayor peso ( $0.1887 \pm 0.0305$ ) se desarrollaron en el T10 y se observaron de color café claro, mientras que los demás eran blanco amarillento y de textura semicompacto.

**Palabras clave:** ANA, callos, combinación de reguladores, explante foliar, TDZ.

## 5. CALLUS INDUCTION FROM FOLIAR EXPLANTS IN 'FLOR DE HIELO' (*GENTIANA SPATHACEA* KUNTH)

### ABSTRAC

Biotechnological techniques play an important role in the search for new alternatives that allow the mass propagation of plants in addition to the production of active ingredients. The aim of the present study was to establish an efficient method that promotes the induction of callus from *Gentiana spathacea* leaves. A completely randomized experiment was constituted, with 27 treatments, a control and 10 repetitions. The leaves were divided into two sections (proximal to the petiole and apical), and were put in the basic MS medium supplemented with BA in combination with ANA and 2,4-D with different concentrations (0.0, 0.1, 0.3 and 1.0 mgL<sup>-1</sup>), reversing the polarity of the leaf, under continuous darkness for 6 weeks. The probability of callus generation was evaluated using the General Linear Model (GLM) Logit ( $\pi$ ). For the variable weight was analyzed with an ANOVA. The combination of 0.3 mgL<sup>-1</sup> of BA and ANA (T10) is more likely to produce callus,  $p = 0.96$  for explants near the petiole and  $p = 0.94$  near the apical section. In contrast to the 2,4-D and TDZ regulators where the occurrence of calluses was zero. The heaviest callus ( $0.1887 \pm 0.0305$ ) developed in T10 and were light brown, while the others were yellowish white and semi-compact.

**Kew words:** NAA, callus, combination of regulators, foliar explant, TDZ.

## 5.1. INTRODUCCIÓN

Diversas especies del género *Gentiana* ampliamente estudiadas, juegan un papel importante en la existencia del ser humano debido a su enfoque farmacológico, muchas de ellas acumulan ingredientes activos como iridoides, xantonas, amarogentina, utilizados con propósitos medicinales, también se cultivan ampliamente en países como china por la belleza de las flores y su amplia gama de colores (Tomiczak *et al.*, 2019). El cultivo de tejidos vegetales como herramienta para la regeneración de callos se ha utilizado ampliamente para la propagación masiva y para la obtención de variantes somáticos (Bouman y Klerk, 2001; Thorpe, 2007). La formación de callos es un método esencial en los trabajos de investigación para la producción de moléculas biológicamente activas en especies medicinales (Mahmood *et al.*, 2012). El callo es una masa amorfa, desorganizado que se forma a través de la división vigorosa de células, comienza con el aislamiento de órganos o tejidos diferenciados y pasa por un proceso de desdiferenciación celular en presencia del regulador adecuado en el medio de cultivo. El propósito de los callos puede ser la regeneración de plantas por organogénesis, embriogénesis somática o el cultivo de células en suspensión (Capelo *et al.*, 2010). Tsay *et al.* (2015), promovieron la inducción de callogénesis a partir de explantes de tallo de *G. davidii* en medio MS suplementado con ANA y kinetina. Drobyk *et al.* (2018), estimularon la formación de callo en varias especies de *Gentiana* a partir de explantes de raíz con B5, Kin, BAP, (2,4-D y ANA). La morfogénesis *in vitro* ha sido estudiada en siete géneros de la familia Genianaceae entre ellos el género *Gentiana* (Tomiczak *et al.*, 2019). El objetivo de la presente investigación fue generar un protocolo eficiente para la inducción y multiplicación de callos a partir de explantes foliares y evaluar la influencia de la citocinina BA (6-bencilaminopurina) en combinación con dos auxinas ANA (Ácido 1-naftalenoacético) y 2,4-D (Ácido 2,4-diclorofecoxiacético) en diferentes concentraciones.

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron hojas de *G. spathacea* obtenidas en condiciones *in vitro*, en etapa de subcultivo posterior a la multiplicación, cultivadas en medio básico M1. Los segmentos de hoja se obtuvieron por dos cortes con ayuda de un bisturí estéril en las secciones proximales al peciolo y al ápice de la hoja aproximadamente de  $0.5 \text{ cm} \pm 0.1$ .

### Inducción de callos

#### Experimento 1

Se usó el medio M1 (MS basal (Murashige y Skoog, 1962) al 100%, suplementado con  $0.40 \text{ mgL}^{-1}$  de tiamina,  $100 \text{ mgL}^{-1}$  de Myo-inositol,  $60 \text{ mL}^{-1}$  de L-cisteína, 3% de sacarosa,  $7 \text{ grL}^{-1}$  de agar-agar). El pH final se ajustó a  $5.7 \pm 0.1$ , adicionado con las concentraciones de los reguladores definidos en el Cuadro 11. El experimento se estableció bajo dos condiciones.

Cuadro 11. Concentraciones y reguladores de crecimiento utilizados en la inducción de callos (primer experimento) a partir de hojas de *G. spathacea*.

|    | TDZ ( $\text{mgL}^{-1}$ ) |    | 2,4-D ( $\text{mgL}^{-1}$ ) |
|----|---------------------------|----|-----------------------------|
| T0 | 0.0                       | T5 | 0.1                         |
| T1 | 0.1                       | T6 | 0.3                         |
| T2 | 0.3                       | T7 | 1.0                         |
| T3 | 1.0                       | T8 | 3.0                         |
| T4 | 3.0                       |    |                             |

TDZ: Thidiazuron; 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Fuente Autores.

La siembra se realizó en frascos con 30 ml de medio M1 en dos grupos con 14 repeticiones cada uno: en el primero, los explantes se colocaron con el envés

hacia abajo, el segundo, con el envés hacia arriba. El establecimiento se incubó a  $27 \pm 2$  °C, bajo dos condiciones: iluminación 16 horas luz y oscuridad continua, durante 8 semanas.

## Experimento 2

Se empleó el medio M1, adicionado con reguladores de crecimiento definidos a las concentraciones del Cuadro 12.

Cuadro 12. Concentraciones y reguladores de crecimiento utilizados en la inducción de callos a partir de hojas de *G. spathacea*.

|     | BA (mgL <sup>-1</sup> ) | ANA (mgL <sup>-1</sup> ) |     | BA (mgL <sup>-1</sup> ) | 2,4 -D (mgL <sup>-1</sup> ) |
|-----|-------------------------|--------------------------|-----|-------------------------|-----------------------------|
| T0  | 0.0                     | 0.0                      | T16 | 0.0                     | 0.1                         |
| T1  | 0.1                     | 0.0                      | T17 | 0.1                     | 0.1                         |
| T2  | 0.3                     | 0.0                      | T18 | 0.3                     | 0.1                         |
| T3  | 1.0                     | 0.0                      | T19 | 1.0                     | 0.1                         |
| T4  | 0.0                     | 0.1                      | T20 | 0.0                     | 0.3                         |
| T5  | 0.1                     | 0.1                      | T21 | 0.1                     | 0.3                         |
| T6  | 0.3                     | 0.1                      | T22 | 0.3                     | 0.3                         |
| T7  | 0.1                     | 0.1                      | T23 | 1.0                     | 0.3                         |
| T8  | 0.0                     | 0.3                      | T24 | 0.0                     | 1.0                         |
| T9  | 0.1                     | 0.3                      | T25 | 0.1                     | 1.0                         |
| T10 | 0.3                     | 0.3                      | T26 | 0.3                     | 1.0                         |
| T11 | 1.0                     | 0.3                      | 27  | 1.0                     | 1.0                         |
| T12 | 0.0                     | 1.0                      |     |                         |                             |
| T13 | 0.1                     | 1.0                      |     |                         |                             |
| T14 | 0.3                     | 1.0                      |     |                         |                             |
| T15 | 1.0                     | 1.0                      |     |                         |                             |

BA: 6- benciladenina, ANA: Ácido 1-naftalenoacético, 2,4-D: Ácido 2,4 diclorofecoxiacético.

Fuente: Autores.

La siembra se realizó en frascos con 30 mL de medio M1, en dos grupos con 10 repeticiones/tratamiento, el primero, con explantes proximales al peciolo, el segundo, con proximales al ápice de la hoja. Ambos grupos se sembraron con el envés hacia arriba. El experimento se incubó a  $27 \pm 2$  °C en oscuridad continua durante 6 semanas.

## Diseño estadístico y análisis de datos

La probabilidad de incidencia de callo en los tratamientos propuestos, se estudió estadísticamente como una variable del tipo “éxito/fracaso”, mediante un Modelo Lineal General (GLM) logit ( $\pi$ ), en el software estadístico R versión 3.5.3 (2019). Los cambios en el peso de callo se estudiaron mediante un Análisis de Varianza, las diferencias entre los tratamientos se evaluaron a través de una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). Los datos, fueron analizados en el software estadístico SAS, versión 9.1 (2002 SAS *Institute*, Inc., Cary, NC).

### 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Experimento 1

Se observó la presencia de tejido necrosado a partir de la tercera semana, al término de la octava semana el 100 % de los explantes sembrados bajo estas condiciones se necrosaron. Este resultado difiere significativamente de Drobyk *et al.* (2015), que observó la formación de callo en *G. pneumonanthe* con altas concentraciones de TDZ y bajas de ANA, esta discrepancia puede explicarse desde los requerimientos específicos de cada especie. Según las fuentes de literatura TDZ es preferible en la inducción de brotes y raíces de algunas especies de *Gentiana*.



Figura 9. Explantes necrosados en la inducción de callos con TDZ y 2,4-D.

## Experimento 2

La presencia de callos se observó a partir de los 18 días posteriores a la siembra, únicamente en las combinaciones de ANA y BA. Al término de la sexta semana todos los tratamientos en presencia de las combinaciones de BA y 2,4-D no desarrollaron tejido calloso, sin embargo, tampoco se observó la presencia de tejido necrosado. Las probabilidades teóricas de presencia de callo bajo los efectos de los reguladores estudiados se esquematizan en la Figura 10.

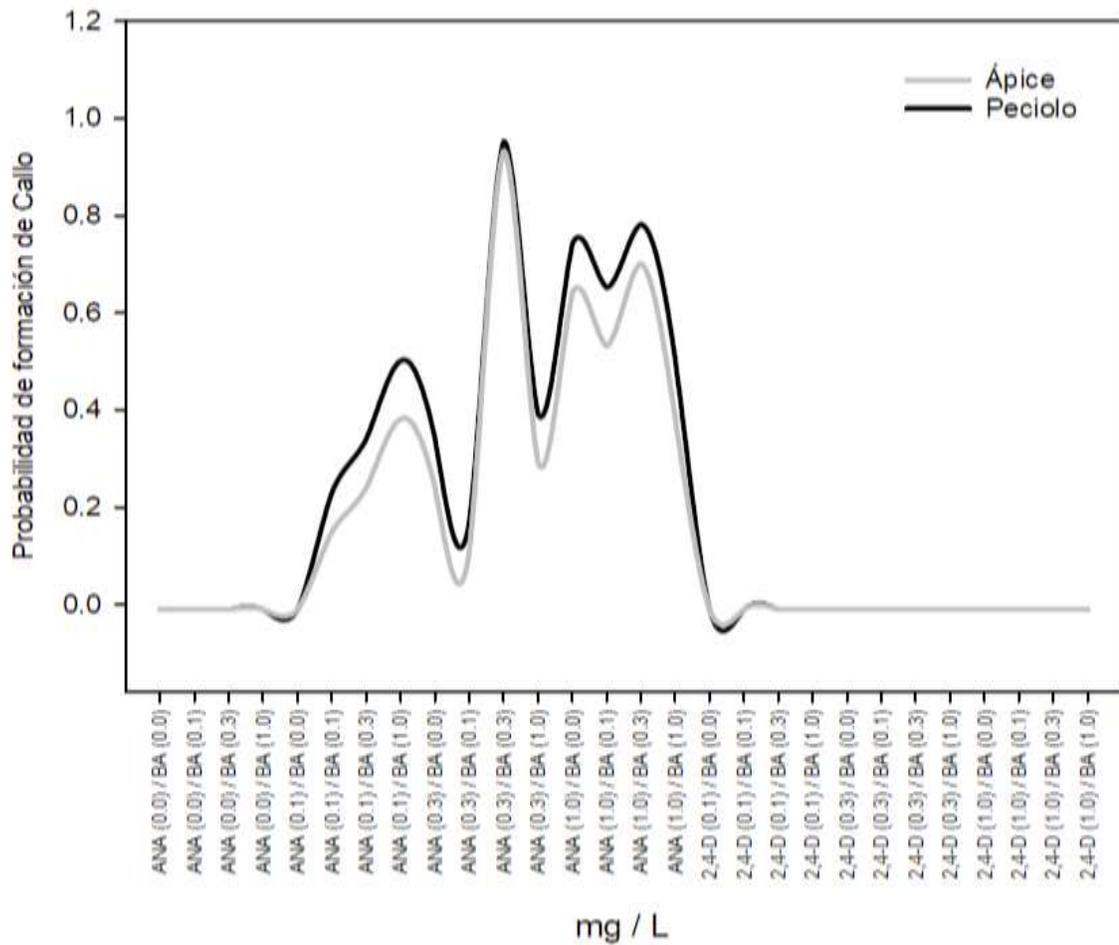


Figura 10. Probabilidades de incidencia de callos de *G. spathacea* en medios de cultivo en combinación de ANA + BA, aplicado en los explantes extraídos de pecíolo y ápice de hojas.

Se observa que el efecto de interacción entre ANA 0.3 mgL<sup>-1</sup> y BA 0.3 mgL<sup>-1</sup> tiene mayor influencia ( $p = 0.96$  pecíolo y 0.94 ápice de la hoja) sobre los resultados. Las probabilidades más altas para la generación de callos en explantes foliares

se centraliza en concentraciones altas de ANA (0.3, 1.0 mgL<sup>-1</sup>), con cantidades bajas a medias de BA (0.0, 0.3 mgL<sup>-1</sup>). Las combinaciones de ANA 1.0 mgL<sup>-1</sup> y 0.0, 0.1 y 0.3 mgL<sup>-1</sup> de BA, se encuentran dentro de los tratamientos con mayor probabilidad de desarrollar callos, ( $p = 0.79$ ;  $p = 0.71$ ), ( $p = 0.75$ ;  $p = 0.65$ ) y ( $p = 0.56$ ;  $p = 0.54$ ) para explantes proximales al peciolo y ápice de la hoja respectivamente. De manera general, se puede deducir que ANA tiene una influencia mayor en la generación de callos en esta especie. Y el regulador 2,4-D no es apropiado para la inducción de callogénesis en *G. spathacea*.

Respecto al efecto del tipo de explante (peciolo o ápice) la diferencia es mínima, lo que indica que independientemente de donde se realice el corte en la hoja, se produce callo cuando está en contacto con el tratamiento adecuado. Las características de los callos producidos se definen en el Cuadro 13 una vez que se identificaron a los tratamientos con mayor probabilidad de ocurrencia.

Cuadro 13. Descripción de los callos obtenidos en los tratamientos con más de 0.5 de probabilidad para producir tejido calloso en *G. spathacea*.

| Tratamientos | Peso (gr)         | Color              | Textura      |
|--------------|-------------------|--------------------|--------------|
| T7           | 0.0901 ± 0.0070 b | Blanco amarillento | Acuoso       |
| T10          | 0.1887 ± 0.0305 a | Café claro         | Semicompacto |
| T12          | 0.0866 ± 0.0093 b | Blanco amarillento | Semicompacto |
| T13          | 0.1058 ± 0.0025 b | Blanco amarillento | Semicompacto |
| T14          | 0.1075 ± 0.0302 b | Blanco amarillento | Semicompacto |
| T15          | 0.1187 ± 0.0364 b | Blanco amarillento | Semicompacto |

medias ± SE de peso fresco de callos. Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes a un nivel del 5% por la prueba de Tukey.

La variable peso de callo fresco indica diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ). El mayor peso de callos se generó en la combinación 0.3 mgL<sup>-1</sup> de ANA y 0.3 mgL<sup>-1</sup> de BA (T10), el resto de tratamientos son similares estadísticamente. La mayoría de los callos fueron de color blanco amarillento, excepto el T10 que se visualizó de color café claro, tal y como se observa en la Figura 11. El tejido

caloso generado presento una textura de tipo semicompacto a excepción del tratamiento ANA 0.1 mgL<sup>-1</sup> y 1.0 mgL<sup>-1</sup> de BA que fue acuoso.

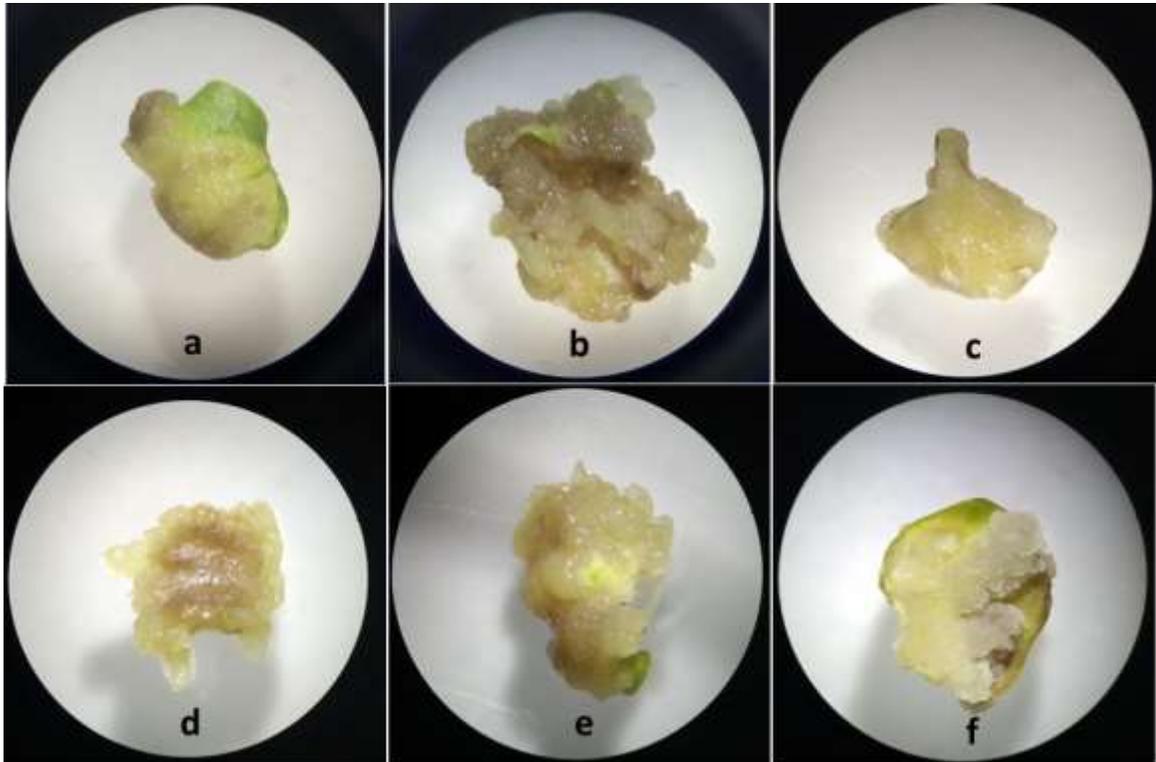


Figura 11. Color de callos *in vitro* a partir de hojas de *G. spathacea*. **a**: tratamiento 7 color blanco amarillento, **b**: T10 color café claro, **c**: T12, **d**: T13, **e**: T14 y **f**: T15 todos ellos de color blanco amarillento. Fotografías tomadas con estereoscopio en la sexta semana posterior al establecimiento en oscuridad continua. Fuente: Autores.

Los segmentos proximales al peciolo fueron los que generaron mayor cantidad de callos, esto podría estar asociado a lo que reporta Smith, (2012) que en este tipo de explantes se presenta una acumulación de auxinas que promueve la estimulación de la mitosis para dar lugar al tejido caloso. La lamina foliar de las hojas es el material vegetal más utilizado en la formación de callos. Sin embargo, un protocolo exitoso de calogénesis depende del tipo de explante, los reguladores de crecimiento y las concentraciones utilizadas. Además, la posición del explante (polaridad) desempeña un papel importante en la formación de callo o regeneración de brotes (Chaudhurj *et al.*, 2008). En el caso de *G. utriculosa* la eficiencia de la inducción de callos a partir de hojas dependió de la orientación

del explante, se obtuvieron más callos cuando el envés estuvo en contacto con el medio (Vinterhalter *et al.*, 2016). Difiere en los resultados de este trabajo en donde se observó presencia de callo con la polaridad invertida de la hoja, lo que puede estar asociado con la especie. El uso de 2,4-D solo o en interacción con BA en *G. spathacea* no fue eficiente para la regeneración de callo, al no presentar crecimiento en ninguno de los tratamientos, lo cual difiere de lo reportado por Drobyk *et al.*, (2015) que evaluaron la combinación de BAP y 2,4-D para la generación de callo en las especies de *G. lutea*, *G. punctata*, *G. asclepiadea* y *G. verna*, logrando un 100 % de formación de callo en esas especies. Para *G. pneumonanthe* y *G. acaulis*, la estimulación de callos fue pobre, por lo tanto, la eficiencia de callogénesis está influenciada por la especie y el genotipo de la planta. La combinación de ANA y BAP en las especies anteriores indujeron un porcentaje insignificante de callos, creció lentamente y con necrosis. Los explantes de hoja presentaron bajo porcentaje de callogénesis, siendo los segmentos de raíz los que obtuvieron mejor respuesta con aquellos reguladores (Drobyk *et al.*, 2015). En comparación con la presente investigación donde los segmentos de hoja presentaron una probabilidad alta para la inducción de callos, en investigaciones posteriores se podría evaluar explantes de tallo y raíz para la inducción de callos en *G. Spathacea*. En *G. utriculosa* el mejor explante para la inducción de callos fueron las raíces (85.6%) con ANA 0.1 mgL<sup>-1</sup> y las hojas con el haz hacia abajo presentaron un bajo porcentaje (18.06%) con 2,4-D 1.0 mgL<sup>-1</sup> (Vinterhalter *et al.*, 2016). El tallo de *G. spathacea* podría ser un buen generador de callo, debido a los resultados observados en este trabajo en la etapa de multiplicación y enraizamiento *in vitro* de esta especie (ver capítulo 3). Vinterhalter *et al.*, (2016), observó un porcentaje alto de tejido calloso (42.86%) en la etapa de enraizamiento de *G. utriculosa*, en los tratamientos de ANA (1.0 mgL<sup>-1</sup>). Similar al presente estudio, las probabilidades más altas de callo fueron inducidos por ANA en *G. davidii* var (Chueh *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2014).

## 5.4. CONCLUSIONES

Este estudio indicó que la callogénesis en *G. spathacea* puede generarse a partir de hojas independientemente de su polaridad, la combinación de reguladores con mayor probabilidad de incidencia de callos es de ANA 0.3 mgL<sup>-1</sup> y BA 0.3 mgL<sup>-1</sup>. Las auxinas 2,4-D y TDZ no se recomiendan para este proceso. Los periodos de oscuridad resultan ser adecuados para promover tejido calloso.

## 5.5. LITERATURA CITADA

- Bouman, H., & De Klerk, G. J. (2001). Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(1), 111-117.
- Capelo, A. M., Silva, S., Brito, G., & Santos, C. (2010). Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103(2), 237-242
- Chaudhuri, R. K., Pal, A., & Jha, T. B. (2008). Conservation of *Swertia chirata* through direct shoot multiplication from leaf explants. *Plant Biotechnology Reports*, 2(3), 213-218.
- Chueh, F. S., Chen, C. C., Sagare, A. P., & Tsay, H. S. (2001). Quantitative determination of secoiridoid glucosides in in vitro propagated plants of *Gentiana davidii* var. *formosana* by high performance liquid chromatography. *Planta medica*, 67(01), 70-73.
- Drobyk, N. M., Hrytsak, L. R., Mel'nyk, V. M., Kravets, N. B., Konvalyuk, I. I., Twardovska, M. O., & Kunakh, V. A. (2015). *In vitro* manipulation and propagation of *Gentiana* L. species from the Ukrainian Flora. In the *Gentianaceae-Volume 2: Biotechnology and Applications* (pp. 45-79). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Drobyk, N. M., Mel'nyk, V. M., Hrytsak, L. R., Kravets, N. B., Konvalyuk, I. I., Twardovska, M. O., & Kunakh, V. A. (2018). Establishment and analysis of tissue and fast-growing normal root cultures of four *Gentiana* L. species, rare highland medicinal plants. *Biopolymers and Cell*.

- Huang, S. H., Agrawal, D. C., Wu, F. S., & Tsay, H. S. (2014). *In vitro* propagation of *Gentiana scabra* Bunge—an important medicinal plant in the Chinese system of medicines. *Botanical studies*, 55(1), 56.
- Mahmood, T., Jameel, A., Abbasi, B. H., Munir, F., & Naqvi, S. M. S. (2012). *In vitro* callogenesis and detection of somaclonal variations in *Plantago ovata* L. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 15(4), 289-295.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Smith, R. H. (2012). *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Recuperado de [https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as\\_sdt=0%2C5&q=Plant+tissue+culture%3A+Techniques+and+experiments&btnG=](https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Plant+tissue+culture%3A+Techniques+and+experiments&btnG=)
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular biotechnology*, 37(2), 169-180.
- Tomiczak, K., Mięka, A., Niedziela, A., Wójcik-Lewandowska, A. I., Domżańska, L., & Rybczyński, J. J. (2019). Somatic embryogenesis in the family Gentianaceae and its biotechnological application. *Frontiers in Plant Science*, 10, 762.
- Tsay, H. S., Gupta, S. K., Huang, S. H., Kuo, C. L., Chueh, F. S., & Chang, H. C. (2015). *In vitro* studies and biotechnology of Taiwan native species of the Gentianaceae. In the *Gentianaceae-Volume 2: Biotechnology and Applications* (pp. 81-92). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Vinterhalter, B., Mitić, N., Vinterhalter, D., Uzelac, B., & Krstić-Milošević, D. (2016). Somatic embryogenesis and *in vitro* shoot propagation of *Gentiana utriculosa*. *Biologia*, 71(2), 139-148.