

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONÓMICAS**



RESPUESTA DE LA PLANTA DE ZARZAPARRILLA (*SMILAX SPINOSA* MILL.) A LA PROPAGACIÓN *in vitro*.

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

POR

FRANCISCO COSME QUECHE.

En el acto de investidura como

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

**SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
EN EL GRADO DE LICENCIADO**

Guatemala, Septiembre del 2,001

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

RECTOR

Ing. Agr. EFRAÍN MEDINA GUERRA

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Ing. Agr.	Edgar Oswaldo Franco Rivera.
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr.	Walter Estuardo García Tello.
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr.	Manuel de Jesús Martínez Ovalle.
VOCAL TERCERO	Ing. Agr.	Erberto Raúl Alfaro Ortiz.
VOCAL CUARTO	Prof.	Abelardo Caal Ich.
VOCAL QUINTO	Br.	Axel Aureliano Herrera Pérez.
SECRETARIO	Ing. Agr.	Edil René Rodríguez Quezada.

Guatemala, Septiembre del 2,001

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

Distinguidos miembros:

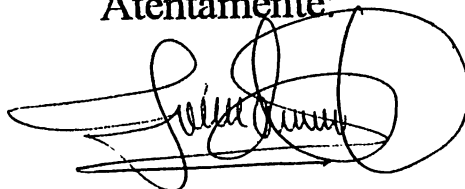
De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someterme a su consideración el trabajo de tesis titulado:

RESPUESTA DE LA PLANTA DE ZARZAPARRILLA (*SMILAX SPINOSA* MILL.) A LA PROPAGACIÓN *in vitro*.

Presentado como requisito previo a optar el Título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado Académico de Licenciado.

En espera de su aprobación, me es grato presentarles mi agradecimiento.

Atentamente:



FRANCISCO COSME QUECHE

ACTO QUE DEDICO

A:

JESUCRISTO:

SEÑOR Y RAZÓN DE MI VIDA.

MIS PADRES:

**FRANCISCO COSME SEQUEC (Q.E.P.D.)
TEODORA QUECHE DE COSME (Q.E.P.D.)
SOY FRUTO DE SU ESFUERZO.**

MIS HERMANOS:

**RAMON, VIDALIA (Q.E.P.D.), TEODORA
(Q.E.P.D.), FRANCISCA Y JOSÉ.**

MI ESPOSA:

**SANDRA GRACIELA RODRÍGUEZ DE
COSME.**

MIS HIJOS:

**GIDARDO ESAU, MAYNOR AMAURY, Y
FRANCISCO ISAI.**

MIS AMIGOS:

**POR HABER COMPARTIDO BUENOS
MOMENTOS AGRADABLES.**

TESIS QUE DEDICO

A:

PANAJACHEL SOLOLÁ.

ESCUELA NACIONAL MIXTA PANAJACHEL SOLOLÁ.

INSTITUTO BÁSICO DE PANAJACHEL.

INSTITUTO CENTRAL PARA VARONES GUATEMALA.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

FACULTAD DE AGRONOMÍA.

LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS.

AGRADECIMIENTOS

QUIERO EXPRESAR MI MÁS SINCERO AGRADECIMIENTO:

Ing. Agr. Msc. Domingo Amador Pérez. Por sus enseñanzas y experiencias compartidas en el campo de la biotecnología y por permitirme realizar el presente trabajo.

Inga. Agra. Msc. Myrna Ethel Herrera Sosa. Por su asesoría y consejos en el área de Botánica y en la realización del estudio.

Ing. Agr. Msc. José de Jesús Chonay Pantzay. Por su orientación y conocimientos dados en el Ejercicio Profesional Supervisado (EPS).

Ing. Agr. Msc. Fredy Rolando Hernández Ola. Por su colaboración y orientación en la fase de Sistema de Cultivos.

Ing. Agr. Byron Barrientos. Por su asesoría y gran apoyo.

Agr. Mak Milan Cruz Sic. Gracias por su apoyo logístico y amistad incondicional y a la vez por compartir conocimientos y experiencias en cultivo de tejidos.

Agr. Eric Ortega. Por colaboración y amistad.

Agr. Manuel Bolaños. Por el apoyo y amistad sincera.

Agr. Cesar Muñoz. Por su colaboración y amistad.

ÍNDICE

CONTENIDO	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE GRÁFICAS	v
RESUMEN	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1 Marco conceptual	3
3.1.1 Historia de la micropropagación	3
3.1.2 Importancia de la micropropagación	4
3.1.3 Fases de la micropropagación	4
3.1.3.A Asepsia del cultivo	4
3.1.3.B Multiplicación	5
3.1.3.C Enraizamiento de brotes y trasplantes	5
3.1.4 Factores que influyen en la micropropagación	5
3.1.4.A Explante	5
3.1.4.B Medio de cultivo	6
a. Compuestos orgánicos	6
b. Sales orgánicas	6
c. Complejos naturales	6
d. Materiales inertes	7
3.1.4.3 Factores físicos	7
3.1.5 Reguladores del crecimiento y su importancia en los medios de cultivo	7
3.1.5.1 Auxinas	7
3.1.5.2 Citocininas	8
3.1.5.3 Giberelinas	8
3.1.6 Diferentes estructuras vegetales utilizadas en la micropropagación	8
3.1.6.1 Cultivo de hojas	9
3.1.6.2 Cultivo de raíces	9
3.1.7 Definición de plantas medicinales	9
3.1.8 Los principios activos en las plantas medicinales	10
3.1.9 El uso de la zarzaparrilla como planta medicinal	10
3.1.10 Selección y mejora de plantas medicinales	11
3.2 Marco Referencial	11
3.2.1 Características generales de la zarzaparrilla (<i>Smilax spp.</i>)	11
3.2.1.1 Descripción botánica de la zarzaparrilla (<i>Smilax spp.</i>)	12
3.2.1.2 Distribución geográfica	12
3.2.1.3 Propiedades biológicas	15
3.2.1.4 Propiedades de la Zarzaparrilla (<i>Smilax spp.</i>) biológicas demostradas	16
1. Propiedades diurética	16
2. Propiedad antibacteriana	16
3. Propiedad antifúngica	16
3.2.1.5 Usos medicinales	17
3.2.1.6 Contraindicaciones	18
3.2.2 Domesticación de la zarzaparrilla	19

3.2.2.1 Propagación sexual	19
1. Proceso de fermentación de fruto	19
A. Ensayo sobre desinfección de la semilla <i>Smilax</i> spp. y selección del sustrato para el semillero	19
3.2.2.2 Propagación asexual	20
1. Propagación de tallos	20
2. Propagación de rizomas	21
3.2.2.3 Respuesta del cultivo de <i>Smilax</i> , en la fase de vivero	21
3.2.2.4 Evaluación de tres especies arbóreas de sombra para el crecimiento de <i>Smilax</i> spp.	23
4. OBJETIVOS	25
5. HIPÓTESIS	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1 Área experimental	27
6.2 Medio basal	27
6.3 Elaboración de los medios de cultivo	27
6.4 Esterilización de los medios de cultivo	27
6.5 Material vegetal	28
6.6 Selección del material experimental	28
6.7 Determinación de la especie	28
6.8 Siembra del tejido en el medio de cultivo	29
6.9 Incubación de los cultivos	29
6.10 Fases de la investigación	29
6.10.1 Fase I: Inducción de callo y regeneración de brotes	29
6.10.1.A Tratamientos	29
6.10.1.B Unidad experimental	32
6.10.1.1 Manejo del experimento	32
6.10.1.2 Variables evaluadas	32
a) Número total de callos inducidos por tratamiento	32
b) Porcentaje de callo inducido por tratamiento	32
c) Porcentaje de brotes regenerados por tratamiento	33
d) Promedio de hojas formadas por brote	33
e) Promedio de longitud de brotes formados por explantes	33
6.10.2 Fase II: Enraizamiento	33
6.10.2.1 Unidad experimental	33
a. Materiales	33
b. Preparación del medio de cultivo	33
c. Traslado de los explantes	33
d. Condiciones de cultivo	34
6.10.2.2 Variables respuesta	34
a. Porcentaje de plantas que emitieron raíces	34
b. Número de raíces por planta	34
c. Longitud media de raíces	34
6.10.2.3 Aclimatación	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1 FASE I. Inducción de callos y regeneración de brotes	35
7.1.1 Iniciación del cultivo de tejidos	35
1. Explante hoja con peciolo	35
2. Explante de brote apical	36

7.1.2 Porcentaje de callos inducidos por tratamiento	36
7.1.3 Porcentajes de brotes regenerados por tratamiento	37
7.1.4 Respuesta del explante brote apical a la inducción de callo	38
7.1.5 Respuesta del explante brote apical a la inducción de brotes	39
7.2 FASE II Enraizamiento	40
7.2.1 Respuesta de brote apical a la inducción de raíces	40
7.2.2 Traslado de los explantes	40
7.2.3 Condiciones de cultivo	40
7.3. Aclimatación de plántulas	43
8. CONCLUSIONES	45
9. RECOMENDACIONES	46
10. BIBLIOGRAFÍA	47
11. APÉNDICE	50

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Distribución geográfica y altitudinal de las especies del género <i>Smilax</i> en Guatemala y países vecinos.	13
CUADRO 2. Ubicación, nombre vernáculo, altitud (msnm), zona de vida y número de plantas (estimadas) de las especies de <i>Smilax</i> observadas en la república de Guatemala.	14
CUADRO 3. Condición fenológica de las diferentes poblaciones de zarzaparrilla (<i>Smilax spp.</i>), durante los primeros 6 meses del año, en la república de Guatemala.	15
CUADRO 4. Datos morfológicos referidos al crecimiento y desarrollo de <i>Smilax spp.</i> , tomado de una muestra de plántulas propagadas de la población de Campur, Alta Verapaz, en Mayo de 1993, a los 10 y 15 meses de edad.	22
CUADRO 5. Resultados de la primera toma de datos de la evaluación de tres especie arbóreas de sombra sobre el crecimiento de <i>Smilax</i> . (Los datos corresponden a la media de 10 plantas muestreadas por parcela).	23
CUADRO 6. Tipo de explante y niveles de regulador que se utilizaron en la sub-fase de inducción de callo.	30
CUADRO 7. Niveles del regulador del crecimiento en mg/lit, adicionando al medio de cultivo MS, para la fase de multiplicación de hojas con pecíolo y brotes apicales.	31
CUADRO 8. Respuesta del explante hoja con pecíolo a la inducción de callo y brote.	36
CUADRO 9. Respuesta del explante brote apical a la inducción de callo.	39
CUADRO 10. Respuesta del explante brote apical a la inducción de brotes múltiples.	40
CUADRO 11. Respuesta del explante brote apical a la inducción raíces. CONCENTRACIÓN DE SALES MS AL 100%.	41
CUADRO 12. Respuesta del explante brote apical a la inducción de raíces. CONCENTRACIÓN DE SALES MS AL 75%.	42
CUADRO 13. Respuesta del explante brote apical a la inducción de raíces. CONCENTRACIÓN DE SALES MS AL 50%.	43
CUADRO 14 A. Funciones de las sustancias activas presentes en las plantas medicinales.	53
CUADRO 15 A. Composición del medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS) utilizando en fases de multiplicación (100%) y enraizamiento (75% y 50% de los componentes).	54

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. Porcentaje de callos y brotes obtenidos en los diferentes tratamientos de auxinas y citocininas.

37

RESPUESTA DE LA ZARZAPARRILLA (*Smilax spinosa* Mill.) A LA PROPAGACIÓN *in vitro*.

RESPONSE OF SARSAPARRILLA (*Smilax spinosa* Mill.) explants to *in vitro* Culture.

RESUMEN.

Guatemala por sus condiciones climáticas posee variedad de recursos fitogenéticos. Sin embargo muchos de estos están en peligro de extinción, este es el caso de la zarzaparrilla (*Smilax spp*). Es una especie nativa con propiedades medicinales que presenta dificultades para reproducirse en forma natural, por lo cual se planteó la presente investigación con el objetivo de evaluar la respuesta de la zarzaparrilla a la propagación *in vitro*.

La micropropagación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía de la USAC. La investigación incluyó dos fases. En la fase I se logró la inducción de callos y regeneración de brotes a partir de los explantes "hojas con pecíolo" y "brotes apicales" utilizando el medio MS suplementado con diferentes dosis de los reguladores ANA y BAP. La segunda fase consistió en la inducción al enraizamiento de brotes en el medio MS con el 100% de sus componentes y reducido al 75 y 50% de sus componentes.

Los resultados indican que los explantes "brotes apicales" responden fácilmente a la regeneración de brotes aun sin la suplementación de reguladores del crecimiento, no así el explante "hojas con pecíolo" que casi no regeneró brotes. Para la inducción de raíces hubo mejor respuesta utilizando el MS con el 100% de sus componentes.

Es posible obtener respuesta a la inducción de callo y regeneración de brotes múltiples en el cultivo *in vitro*, utilizando explantes de hoja con pecíolo de zarzaparrilla (*Smilax spinosa*) y aplicando diferentes concentraciones de auxinas y citocininas.

En cuanto a la formación de callo, tomando como tejido inicial el "brote apical", sobresalieron los tratamientos con las siguientes combinaciones hormonales: 3.0+0.1, 5.0+0.1 mg/lit ANA+BAP obteniéndose los resultados de 31.25% y 25% de callo respectivamente.

Por otra parte, tomando como tejido inicial "hoja con pecíolo", en las combinaciones hormonales de 1.0+0.5 y 1.0+5.0 mg/lit ANA+BAP se obtuvo 56.25% y 50.00%, de callo respectivamente.

En cuanto a la obtención de plantas a partir de callos del explante "brote apical" con la combinación hormonal de 3.0+0.1 mg/lit ANA+BAP, se lograron las plantas más grandes y con un número significativo de hojas, siendo estos: 42.25 mm de largo y 7.44 hojas por planta en promedio. En combinación hormonal de 1.0+1.0 mg/lit ANA+BAP, a partir del explante "brote apical" se obtuvieron plantas con el mayor número de hojas, con 9.12 en promedio.

El testigo no formó callos pero sí generó brotes; sin embargo éstos fueron menos vigorosos que el resto de tratamientos.

Los brotes vegetativos obtenidos a partir de callos del explante "hojas con pecíolo" fueron más escasos, más pequeños y más débiles que los brotes vegetativos obtenidos de callos del explante "brote apical".

Con respecto al enraizamiento de los brotes adventicios obtenidos, estos fueron inoculados con medios nutritivos conteniendo 100%, 75% y 50% de sales MS. Se observó que a medida que se redujo la concentración de sales, así también se redujo la longitud de raíces y el número de plantas sin enraizar. Siendo por lo tanto el mejor tratamiento el que contenía 100% de sales de MS.

1. INTRODUCCIÓN

Debido a los efectos colaterales de algunos fármacos sintéticos, las sociedades actuales están retornando al uso de plantas medicinales, como un componente del movimiento mundial "de regreso a la naturaleza". En Guatemala, las condiciones de relieve y los cambios de altitud en distancias relativamente pequeñas, provocan una serie de microclimas que estimulan la gran biodiversidad existente dando lugar a que Guatemala, dentro de la región mesoamericana en general, sea considerada como uno de los ocho centros importantes de diversidad biológica del mundo. Paralelo a esta condición privilegiada, está el hecho de que su población es heredera y portadora de un legado único, como es el extenso conocimiento de los usos y propiedades de las plantas medicinales, que alcanzaron los mayas (12).

Entre las plantas medicinales nativas, se encuentra la zarzaparrilla (*Smilax sp.*), la cual ha demostrado tener propiedades para contrarrestar problemas de reumatismo, úlceras estomacales y enfermedades de la piel. Desafortunadamente las especies medicinales de este género se encuentra en peligro de extinción, debido a factores como:

1. La presión que ejercen los pobladores sobre los bosques de Guatemala, en los cuales se encuentran condiciones propicias para su sobrevivencia.
2. La extracción continua de rizoma y raíces de zarzaparrilla silvestre, sin considerar su capacidad de regeneración.

La zarzaparrilla es una planta silvestre que debido a su importancia económica es recomendable desarrollar métodos de propagación que faciliten su cultivo.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala durante los años 2000-2001. Su objetivo fue la inducción de callo y enraizamiento de la zarzaparrilla (*Smilax spinosa*) *in vitro*.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Guatemala forma parte de la región mesoamericana, uno de los ocho centros de origen de diversidad biológica; entre los valiosos recursos fitogenéticos se encuentran las plantas medicinales, cuyo uso es común en nuestro país, pues ofrecen una alternativa económica para el restablecimiento de la salud la cual está al alcance de la mayoría de la población Guatemalteca. En muchos lugares en los cuales no hay presencia de profesionales o técnicos en la medicina, esta es la única alternativa.

Según Herrera, M. (1993) (12), dentro de las plantas medicinales utilizadas por la población se encuentra la zarzaparrilla (*Smilax spp.*), especie en vías de extinción, la razón principal de su extinción es que es una planta dioica. Esto quiere decir que en la naturaleza existen plantas que únicamente presentan flores masculinas y plantas con flores femeninas. Solamente al estar estas plantas creciendo en forma separada en el bosque, disminuyen las probabilidades de polinización para la obtención de frutos y semillas necesarios para la propagación sexual.

Por otro lado la presencia de los hongos *Phaeoisariopsis sp* (y posiblemente *Phaeoisariopsis pubescens*), *Mycosphaerella sp.* (estado perfecto de *Phaeoisariopsis pubescens.*) y *Colletotrichum sp.*, que en las poblaciones naturales de *Smilax spp.* promueven la muerte de flores y frutos.

Considerando la dificultad que se ha presentado para reproducir las especies de zarzaparrilla, la presente investigación tiene como finalidad estudiar el comportamiento de esta planta a la propagación *in vitro*, técnica que no ha sido aplicada en forma significativa en la propagación de esta especie. De tal manera, en el presente informe se plantea la metodología de trabajo utilizada en esta investigación.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Marco conceptual

3.1.1 Historia de la micropropagación

La micropropagación es la técnica que se utiliza para lograr el desarrollo de nuevas plantas en un medio artificial, en condiciones asépticas, a partir de porciones muy pequeñas de plantas, tales como: embriones, semillas, tallos, puntas de ramas y raíces, callo y células individuales en suspensión (Litz, R.; Jarret, R. 1991).

El tipo de patrón de crecimiento depende del potencial genético de la planta así cultivada y del ambiente químico y físico a que está sometida la parte de la planta (Litz, R.; Jarret, R. 1991).

La micropropagación se inicia en el año 1,902 con el intento de Haberlandt, de aislar y cultivar el tejido vegetal en cultivo aséptico y desde esa fecha se utiliza en todo el mundo (Litz, R.; Jarret, R. 1991).

Knudson (1,922) describió técnicas de cultivo para la germinación de semillas de orquídeas; un procedimiento que ahora es de empleo estándar en la horticultura. Los embriones cuya germinación está detenida porque estos están latentes dentro de la semilla intacta, pueden separarse de la semilla y ponerse a germinar mediante la técnica del cultivo de embriones (Villalobos, W.; Thorpe, T. 1991).

White, P. (1,934) logró cultivar raíces de tomate, proporcionándoles extracto de levadura, siendo esenciales ciertas vitaminas del complejo B, especialmente la Tiamina.

Nobecurt y Gautheret, Francia (1,939) y White, Estados Unidos (1,939), reportaron en forma independiente el crecimiento por tiempo indefinido de tejidos de callo en un medio sintético (Villalobos, W.; Torpe, T. 1991).

En la actualidad, el número de investigaciones que aplican la micropropagación son innumerables y las técnicas de propagación *in vitro* de plantas son mejores.

3.1.2 Importancia de la micropropagación

La importancia más relevante de la micropropagación *in vitro* son:

- a) La conservación e intercambio de germoplasma.
- b) Rescate de embriones de cruzamiento, que de otro modo perecerían.
- c) Cultivo de anteras o polen para desarrollar plantas haploides dobles que contienen solo el conjunto de cromosomas masculinos. Estas plantas se pueden utilizar para producir plantas homocigóticas, lo que significa que son uniformes en sus características genéticas y son más fáciles de usar para identificar caracteres deseables, acelerando el proceso de mejoramiento convencional (20).
- d) Comercialización rápida de una nueva variedad.
- e) Obtención masiva de clones (14).
- f) Propagación de plantas cuyas condiciones normales de multiplicación son largas y difíciles (29).
- g) Identificar grupos de células resistentes a niveles altos de sales, de herbicidas y toxinas exudados por organismos patógenos o plagas (15).
- h) Fusión de protoplastos (29).

Las desventajas que ofrece este método de producción de plantas son: altos costos de mantenimiento e infraestructura, necesidad de mano de obra calificada y pérdida de variabilidad en algunas técnicas (Villalobos, W.; Thorpe, T. 1991).

3.1.3 Fases de la micropropagación

La micropropagación de plantas se realiza a través de desarrollar tres fases: Iniciación (asepsia), multiplicación y enraizamiento, las cuales se encuentran estrechamente relacionadas, según lo propuesto por Murashige (1,974). Las mismas se describen a continuación:

3.1.3.A Asepsia del cultivo

Los medios de cultivo son propicios para el desarrollo de microorganismos, que reducen la calidad de las plantas producidas, además de competir por el espacio y alimento del cultivo, por lo cual es necesario que el explante se encuentre debidamente limpio y desinfectado. Los compuestos químicos más utilizados para

la limpieza y desinfección de explantes son el hipoclorito de sodio o de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloruro de mercurio, el cloro comercial y el alcohol en diferentes concentraciones (Litz, R.; Jarret, R. 1991).

3.1.3.B Multiplicación

Esta fase se ve influenciada por las condiciones nutritivas y micro climáticas *in vitro*, y la ganancia en peso seco da como resultado la diferenciación *de novo*. La formación de nuevas células por división, producen esa ganancia en peso (Mroginski, L.; Roca, W. 1991).

3.1.3.C Enraizamiento de brotes y trasplantes

Esta fase consta de dos pasos: el primero, se inicia con trasladar el material vegetal a otro medio de cultivo con menos cantidad de sales inorgánicas y cambios en el balance hormonal, es decir; disminuir las citocininas y aumentar las auxinas. El segundo paso, consiste en lavar la planta y eliminar los resto del medio de cultivo que quedan en las raíces y luego sembrarlas en suelo estéril, cubriéndolas con bolsas plásticas, a las cuales se les van abriendo agujeros para que las plantas se adapten paulatinamente a su nuevo hábitat. Esta última parte de esta fase se le conoce como aclimatación o endurecimiento de la planta (Mroginski, L.; Roca, W. 1991).

3.1.4 Factores que influyen en la micropropagación

Los factores que influyen en la micropropagación son básicamente a) el explante, b) el medio de cultivo y c) los factores físicos. Estos se describen a continuación:

3.1.4.A Explante

La elección del explante depende del estudio a realizar y de la especie vegetal a reproducir. Por ejemplo, Villalobos, WE Thorpe, T. (1991) (29), reportan que los tejidos de Gimnospermas son más difíciles de reproducir que los tejidos de angiospermas y dentro de estas últimas, el material derivado de las dicotiledóneas o magnoliopsidas puede ser cultivado con mayor facilidad que el de las monocotiledóneas o Liliopsidas.

Ramazzini, H. (1992) (24) indica que otros factores a considerar sobre los explantes son: 1) La parte de la planta a partir de la cual se iniciará el cultivo de callo, 2) La edad de la planta, ya que esta influye sobre el estado fisiológico de la misma, recomendando utilizar plantas jóvenes, con crecimiento activo y sanas completamente; 3) El tamaño y la forma del explante, estos factores no son importantes, aunque explantes muy pequeños pueden tener baja respuesta, recomendando utilizar fragmentos de tejidos de 5 a 10 mm por lado.

3.1.4.B Medio de cultivo

La mayoría de medios de cultivo utilizados hasta la fecha contienen entre 5 y 35 compuestos que se agrupan en función de su naturaleza química.

a. Compuestos orgánicos

Estos compuestos orgánicos están agrupados en carbohidratos, de los cuales la sacarosa es la más utilizada. Las hormonas promueven el crecimiento celular, siendo las más utilizadas las auxinas y las citocininas; las vitaminas, utilizando preferentemente la tiamina, la cual es la única que ha respondido exitosamente, y finalmente, los aminoácidos, especialmente el inositol, para completar el medio.

b. Sales orgánicas

Estas agrupan generalmente a las mezclas de macro y micronutrientes (Weaber, R. 1987). *Los macronutrientes* son el nitrógeno, en forma de nitrato ó iones de amonio o combinado de las dos formas; el magnesio y el azufre adicionados en forma de sulfato de magnesio, el fósforo, en forma de fosfato ácido de sodio monohidratado y fosfato ácido de potasio; el potasio se agrega en forma de cloruro de potasio, nitrato de potasio y fosfato ácido de potasio; el calcio en forma de cloruro de calcio dihidratado o nitrato de calcio (Hurtado, M.; Merino, M. 1988). *Los micronutrientes* son el hierro, en forma de quelatos de hierro; al manganeso, el zinc, cobre, cobalto y boro (Litz, R.; Jarret, R. 1991).

c. Complejos naturales

Los complejos naturales más utilizados son la pulpa de plátano, el agua de coco, la emulsión de pescado, el jugo de naranja, el extracto de malta, hidrolizado proteico (caseína), jugo de tomate, extracto de levadura, etc.

d. Materiales inertes

Dentro de los materiales inertes utilizados como componentes de los medios de cultivo, el agar, es el más utilizado, ya que proporciona un medio de soporte adecuado para él inoculo. Otros medios utilizan otros componentes, como la poliacrilamida y la silicagel (Hurtado, M.; Merino, M. 1988).

3.1.4.C Factores físicos

Entre los factores físicos más importantes que influyen sobre la micropropagación se encuentran la luz y la temperatura. Dentro de estos dos factores, el más importante es la luz, ya que, aplicada a la intensidad adecuada a los requerimientos de las plantas promueve la organogénesis debido a la acumulación de almidón en las células, durante la fotosíntesis. Villalobos, W.; Thorpe, T. (1991) señalan que la cantidad de luz diaria influye sobre la diferenciación de yemas, y este fotoperíodo se puede ver influido por cambios internos hormonales (auxinas-citocininas). Las altas intensidades de luz inhiben el crecimiento del explante, el cual se encuentra estrechamente relacionado con la producción de fenoles.

3.1.5 Reguladores del crecimiento y su importancia en los medios de cultivo

En la época actual se reconoce que la mayor parte de la actividad fisiológica de los vegetales está condicionada por la presencia de ciertos reguladores del crecimiento, los cuales se encuentran en pequeñas cantidades y se caracterizan por ser sustancias mensajeras, con diferentes puntos de síntesis y acción, siendo en algunos casos, activos en el mismo sitio de síntesis, pudiendo además influir en múltiples procesos totalmente distintos, en forma simultánea, en diferentes partes de la planta (Weaber, R. 1987).

Estos reguladores del crecimiento se han preparado en forma sintética, con efectos reguladores en los distintos procesos fisiológicos y se utilizan en la propagación *in vitro*; utilizando principalmente las auxinas, las citocininas y las giberelinas (Hurtado, M.; Merino, M. 1988).

3.1.5.1 Auxinas

Las auxinas tienen como función biológica la expansión de las células del tallo y coleótilos, a través de promover el ensanchamiento de las paredes celulares en la división celular; así mismo, fomentan el desarrollo de callos, e inducen la formación de raíces a partir de éste. Se utilizan también para el enraizamiento de varias especies vegetales (Weaber, R. 1987).

Las auxinas más utilizadas son Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), Ácido Naftalenacético (ANA) y Ácido Indolbutírico (AIB). El AIB se utiliza en concentraciones entre 0.001 y 10 mg/l, con su punto óptimo en la concentración de 0.1 a 10 mg/l. El 2,4.-D se utiliza en concentraciones que varían entre 1 y 5 mg/l; el ANA se utiliza generalmente en concentraciones que oscilen entre 1 y 10 mg/l (15).

3.1.5.2 Citocininas

La función biológica de las citocininas es estimular principalmente la división celular o citocinesis. Perea, citado por Villacinda (1990) (28), menciona que en cultivos *in vitro*, las citocininas han permitido grandes progresos, especialmente, en micro propagación, por su función de proliferación celular mediante la división celular y la diferenciación de los explantes. Las citocininas más utilizadas son la bencil aminopurina (BAP), siendo esta más utilizada que la cinetina (KIN) y la 6-4-hidroxi-e-meil but-trans-2-erilamino-purina (ZEA). Hurtado (1988) (14) reporta que la concentración de citocinina usada varía entre 0.03 y 30 mg/l.

Según Villalobos y Thorpe (1991) (29), el balance entre las auxinas y las citoquininas en el medio de cultivo determinará la formación de brotes, raíces, embriones o la continua proliferación del callo. Cuando la concentración de citocininas es mayor que la de auxinas, entonces se iniciarán las yemas de brotes, pero si es a la inversa, entonces se desarrollarán los primordios radiculares; cuando la concentración de ambas es equilibrada, se inducirá el incremento de callo.

3.1.5.3 Giberelinas

Las giberelinas se caracterizan por estimular la división y/o incremento celular. Se han encontrado más de 20 giberelinas diferentes en el reino vegetal, todas ellas caracterizadas por poseer en su estructura un esqueleto gibano (30).

Mroginski y Roca (1991) (20) indican que las concentraciones de giberelinas varían de 0.01 a 1.0 mg/l, con un punto óptimo alrededor de 0.1 mg/l. Para la mayoría de cultivos, los niveles superiores a 1.0 mg/l, resultan tóxicos. La más conocida de las giberelinas es la giberelina 3 (GA3) o ácido giberélico (30).

3.1.6 Diferentes estructuras vegetales utilizadas en la micropropagación

El cultivo de cualquier órgano vegetal con capacidad para desdiferenciarse, tiene por finalidad

producir órganos con una estructura morfo y fisiológicamente organizada. Por ejemplo, hojas, raíces etc.

3.1.6.1 Cultivo de hojas

Estévez y Sunex, citados por Hurtado (1988) (14), iniciaron las investigaciones de cultivo *in vitro*, utilizando para ello primordios de hojas. La mayoría de estudios utilizando hojas como explantes han dado buenos resultados, como el caso del helecho canela (*Osmunda cinnamomea*), girasol (*Heliantus sp*), y tabaco (*Nicotiana sp*).

Los primordios de hojas requieren de un medio nutritivo simple para completar su desarrollo utilizando para ello un medio de cultivo rico en sales minerales y una fuente de carbono, que regularmente es la sacarosa al 2% o 3 %. Para primordios grandes se utiliza el agar y para primordios pequeños se utilizan medios de cultivo líquidos. Street (1,976) observó en explantes de un grupo de células que estimulaban la división de células adyacentes. Las células de la periferia crecen más lentamente, pues las del centro toman nutrientes de ellas y les restan potencialidad para dividirse (15).

3.1.6.2 Cultivo de raíces

Kotte y Robinson, citados por Hurtado (1988) (14), fueron los pioneros de esta técnica, ya que en el año 1,922 reportaron un crecimiento limitado de los ápices provenientes de raíces de plántulas de trigo (*Triticum sativum L.*). White (1,934) cultivó ápices aislados de raíz de tomate (*Lycopersicum esculentum L.*) por un tiempo indefinido utilizando un medio líquido.

La reproducción de plantas a través de utilizar el cultivo de raíz ha permitido enriquecer el conocimiento de la fisiología vegetal, ya que actualmente se conoce más sobre el metabolismo de los carbohidratos, el papel de los iones minerales, vitaminas y hormonas vegetales que regulan el crecimiento vegetal y en los procesos de diferenciación y desarrollo de raíces (14).

3.1.7 Definición de plantas medicinales

Las plantas medicinales se definen, como aquellos vegetales que producen compuestos químicos llamados principios activos, los cuales ejercen una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial sobre un organismo vivo (animales específicamente). Su función primordial es servir como droga o medicamento que

alivie la enfermedad o recupere la salud perdida; es decir, que tiendan a reducir o neutralizar el desequilibrio orgánico, que es la enfermedad. Se considera que la séptima parte de las especies vegetales existentes, son medicinales (11, 21).

3.1.8 Los principios activos en las plantas medicinales

Pahlow (1985) (22) los define como “compuestos químicos que la planta ha sintetizado y almacenado en el curso de su crecimiento y desarrollo con ayuda del metabolismo, de los cuales algunos de ellos tienen un valor medicinal directamente aprovechable”. Los compuestos químicos que no producen efectos en el organismo vivo y que son parte de las plantas medicinales se consideran como sustancias indiferentes y se les conoce como lastre.

Sin embargo, se ha comprobado que la aplicación del principio activo principal (aislado previamente) produce resultados distintos a los preparados medicinales a base de esto ha dado lugar a considerar que las “sustancias indiferentes son”, necesarios para combatir la enfermedad (22).

Los principios activos de las plantas medicinales se distribuyen (de forma heterogénea) en diferentes concentraciones en toda la planta. La concentración de principio activo también depende del hábitat, de la época de recolección y el modo de preparación (22).

Barillas Aragón (1995) (1) encontró diferentes concentraciones de los ingredientes activos en los cinco diferentes estados fenológicos del pericón (*Tagetes lucida Cav.*) y en diferentes partes de la planta (tallos, flor y hoja).

Las sustancias activas más comunes son: Los alcaloides, los taninos, los aceites esenciales, los principios amargos, flavonoides, heterósidos, glucósidos, saponinas, mucílagos, vitaminas, minerales y elementos vestigiales (en el apéndice 1 aparecen las funciones de cada una de estas sustancias activas) (22).

3.1.9 El uso de la zarzaparrilla como planta medicinal

Antiguamente las plantas medicinales eran las únicas medicinas que se conocían. La experiencia adquirida por los galenos de la antigüedad y los monjes de los monasterios medievales, tanto en su tratamiento como en sus diferentes aplicaciones, era transmitida de generación en generación a través de los

herbarios (22).

En los últimos años, el uso de las plantas medicinales como sustituto de las drogas sintéticas se ha incrementado, lo que ha demandado la domesticación de muchas plantas silvestres con potencial, como el caso del pericón tres puntas y zarzaparrilla (1, 13, 12, 28).

La Organización Mundial de la Salud ha inventariado alrededor de 21,000 plantas medicinales en todo el mundo.

3.1.10 Selección y mejoramiento genético de plantas medicinales

El mejoramiento genético de las plantas medicinales es más complejo que en otros vegetales, puesto que entre sus objetivos están los siguientes: 1) Se persigue que las plantas tengan un buen porte y desarrollo; 2) Que sean resistentes a condiciones climáticas y edáficas adversas y también a plagas y enfermedades; 3) Mantener y elevar el rendimiento de sus principios activos y que éstos sean de buena calidad, siendo éste el principal criterio de selección.

3.2 Marco Referencial

3.2.1 Características generales de la zarzaparrilla (*Smilax spp.*)

La planta de zarzaparrilla pertenece al género *Smilax* y éste pertenece a la familia Smilacaceae. El género *Smilax* comprende a más de 200 especies, extendidas en ambos hemisferios, siendo más abundantes en las regiones tropicales. Este género está representado por 14 especies en nuestro país, según lo reporta la Flora de Guatemala (26).

3.2.1.1 Descripción botánica de la zarzaparrilla (*Smilax spp.*)

Las plantas del género *Smilax* se caracterizan por ser enredaderas herbáceas o leñosas. Los tallos son más o menos pubescentes y en algunas especies es glabro, con espinas o sin ellas. Las ramas obtusamente cuadrangulares, glabras cuando jóvenes o bien cilíndricas, regularmente muy pilosas cuando maduras.

Las hojas densamente tomentosas en el envés, con 7 nervaduras, las cuales se encuentran enraizadas

desde la fase de la hoja; la consistencia es membranosa o coriácea; la base es subcordada o acutada y en algunas especies es aculeada. Las flores estaminadas con o sin un ovario abortivo; las flores pistiladas usualmente más pequeñas que las estaminadas, con un ovario y usualmente con varios estambres abortivos.

La familia Smilacaceae presenta flores estaminadas sus estambres en dos verticilos y con anteras uniloculares. Las plantas son dioicas; por lo tanto, con una longitud que varía entre 2.8 y 4.0 mm, aunque hay algunas especies que tienen flores con longitudes mayores a los 4.0 mm; los pedúnculos de las flores pistiladas son umbelados y más largos o cortos que los pecíolos; las anteras más largas o cortas que los filamentos. Los frutos son bayas elongadas o globosas, de color rojo o negro (26).

3.2.1.2 Distribución geográfica

En el cuadro 1 aparece la distribución altitudinal y por departamento, para cada una de las especies de *Smilax*, reportadas en la obra Flora de Guatemala (26).

El estudio realizado por Herrera Sosa, M. *et al.* (13, 12) determinó la distribución por municipio y departamento, el nombre común, la altitud, la zona de vida y el número de plantas estimado por hectárea, los cuales se presentan en el cuadro 2, en donde se observa que las mayores densidades se presentan en los municipios de Alotenango, Sacatepéquez (25-30 plantas por ha.) y Chuituj, Santa Catarina Ixtahuacán, Sololá (20 plantas por ha.).

En el cuadro 3, aparece la condición fenológica de las diferentes poblaciones de *Smilax*, ubicadas en la república de Guatemala.

Cuadro 1. Distribución geográfica y altitudinal de las especies del género *Smilax* en Guatemala y países vecinos.

No.	Especie	LUGAR DE ORIGINACION	NOMBRE LOCAL	ALTITUD (metros)	USOS
1	<i>S. aristolochiaefolia</i> Mill	Petén (Uaxactún), probablemente extendida entre Alta Verapaz, sur de México y Belice	Escoca		Presumiblemente una de las más importantes fuentes de zarzaparrilla comercial.
2	<i>S. jalapensis</i> Schlecht. Existe <i>S. jalapensis</i> var. <i>Botteri</i>	Alta Verapaz, Zacapa, Guatemala, Chimaltenango, Quiché, Huehuetenango, San Marcos y Sur de México.		1200-1700	
3	<i>S. lanceolata</i> L.	Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Zacapa, Escuintla, Sacatepéquez, México, Belice y Honduras.	Tete y China root, en Belice. "Bejuco canasta" en Costa Rica.	0-1200	Utilizado en Costa Rica para elaborar canastos.
4	<i>S. lundellii</i> Killip & Morton	Petén (típica sabana), Alta Verapaz, San Marcos, Belice.	Diente de chucho. San Marcos. Zarza.	0-1300	
5	<i>S. mollis</i> Humb & Bonpl	Petén, Alta Verapaz, Chiquimula, Izabal, Chimaltenango, Quetzaltenango, San Marcos, sur de México.	Pate, en Honduras.	0-3000	Parte inferior es usada como veneno para pescar.
6	<i>S. munda</i> Killip & Morton	Petén (rio Cancuén), Belice (típico desde el río Grande).		75	
7	<i>S. panamensis</i> Morong	Baja Verapaz (Panzal), Honduras, Costa Rica y Panamá.			
8	<i>S. papiraceae</i> Duhan	Volcán de Fuego			
9	<i>S. regelii</i> Killip & Morton	Petén, Izabal, Jalapa, Santa Rosa, Chimaltenango, Quetzaltenango, San Marcos, Belice a Honduras.	Zarzaparrilla, bejuco de corona	0-1500	Usado como estimulante y sudorificador. Introducido a España en 1504.
10	<i>S. regelii</i> F. <i>allicida</i> (Killip & Morton) Standl & Steyer	Tela, Costa Atlántica de Honduras.			
11	<i>S. spinosa</i> Mill	Petén, Alta Verapaz, Izabal, Zacapa, Jutiapa, Santa Rosa, Guatemala, Suchitepéquez, Retalhuleu, Quetzaltenango, Huehuetenango, México y Belice a Panamá.	Madre de zarzaparrilla; zarza; zarzaparrilla; Madre, Bejuco de la vida.	0-2800	Se considera preventiva contra la malaria.
12	<i>S. standleyi</i> Killip & Morton	Alta Verapaz, Chimaltenango, Suchitepéquez, Quetzaltenango, Huehuetenango, Tierras baja del Pacífico de Costa Rica (Guanacaste).		200-1800	
13	<i>S. subpubescens</i> A.	Alta Verapaz, Zacapa, El Progreso, Chimaltenango, Suchitepéquez, Quiché, Huehuetenango, Quetzaltenango, San Marcos, Sur de México, Honduras y Costa Rica.		1500-2500	
14	<i>S. velutina</i> Killip & Morton	Alta Verapaz, Izabal, San Marcos, Huehuetenango, Chiapas y Belice.		0-1500	

FUENTE: Flora de Guatemala (Standley P.G.) (27).

Cuadro 2. Ubicación, nombre vernáculo, altitud (msnm), zona de vida y número de plantas (estimadas) de las especies de *Smilax* observadas en la república de Guatemala.

No.	UBICACIÓN	NOMBRE VERNÁCULO	ALTITUD (msnm)	ZONA DE VIDA	Nº DE PLANTAS
1	Cerro Gordo, Santa Rosa	Zarzaparrilla, Bejuco de vida	1,100	bh-S(t)	8
2	El Palmar, Santa Rosa	Zarzaparrilla	1,900	bh-S(t)	1-2
3	San José Pinula, Guatemala	Curlo	1,700	bh-S(t)	variable
4	Mataquescuintla, Jalapa	Curlo	1,700	bh-S(t)	variable
5	Alotenango, Sacatepéquez	Corona de Cristo	1,300	bmh-S(c)	25-30
6	Alotenango, Sacatepéquez	Zarzaparrilla	2,000	bmh-S(c)	4
7	Campur, Alta Verapaz	Diente de chucho, uña de gato	800-900	bmh-S(c)	4
8	Patulul, Suchitepéquez	Palo de vida	800-900	bmh-S(c)	5
9	Santa Bárbara, Suchitepéquez	Palo de vida	10-20	bmh-S(c)	5
10	San Francisco Zapotitlán, Suchitepéquez	Uña de gato	1600-1800	bmh-S(c)	5
11	San Martín Chiquito, Quetzaltenango	zarzaparrilla, Bejuco de vida	2,000	bmh-S(c)	5-7
12	La Reforma San Marcos	Zarzaparrilla	1,100	bmh-S(c)	10
13	Ghuituj, Santa Catarina Ixtahuacán, Sololá	Zarzaparrilla	2400-2800	bmh-MBs	20
14	Erivon, Río Dulce, Izabal	Sinaca	15-25	bmh-T	3
15	San Miguel la Palotada, Petén	Coculmeca roja	175-200	bh-S(c)	5
16	Uaxactún, Petén	Coculmeca roja	185	bh-S(c)	8

REFERENCIA:

Zona de vida según clasificación de Holdridge modificado por De la Cruz:

- bh-S(t) = Bosque húmedo subtropical templado
 bmh-S(s) = Bosque muy húmedo subtropical cálido
 bmh-MBs = Bosque muy húmedo Montano Bajo Subtropical
 bmh-T = Bosque muy húmedo Templado

FUENTE: Herrera Sosa *et al.* (13, 12).

Cuadro 3. Condición fenológica de las diferentes poblaciones de zarzaparrilla (*Smilax spp.*), durante los primeros 6 meses del año, en la república de Guatemala.

NO.	UBICACION	MESES DEL AÑO					
		ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN
1	Cerro Gordo, Santa Rosa	FF*		CV			
2	El Palmar, Santa Rosa	FF*			CV		
3	San José Pinula, Guatemala					ff	
4	Mataquescuintla, Jalapa					ff	
5	Alotenango, Sacatepéquez				ff		ff
6	Alotenango, Sacatepéquez						ff
7	Campur, Alta Verapaz, especie "A"				F		
	Campur, Alta Verapaz, especie "A"			FF	FF		
8	Patulul, Suchitepéquez				FF		
9	Santa Bárbara, Suchitepéquez					IF	
10	San Francisco Zapotitlán, Suchitepéquez					F	
11	San Martín Chiquito, Quetzaltenango			FF	FF		
12	La Reforma San Marcos					IF	
13	Chuituj, Santa Catarina Ixtahuacán, Sololá						F
14	Erivón, Río Dulce, Izabal						FF
15	San Miguel La Palotada, Petén						CV
16	Uaxactún, Petén						CV

FUENTE: Herrera Sosa *et al* (13,12).

REFERENCIA:

CV = Crecimiento vegetativo

FF = Final de fructificación (* año siguiente)

ff = Floración y fructificación

F = Fructificación

IF = Inicio de floración

3.2.1.3 Propiedades biológicas

En un estudio realizado en la facultad de Ciencias Químicas y Farmacia en plantas de aproximadamente uno y medio años de edad de la especie de *Smilax lundellii* Killip & Morton cultivadas en la FAUSAC se encontró un 12.05% de saponinas esteroideas presentes en los rizomas, mientras en las hojas se encontró 9.25% de las mismas. Estas saponinas esteroideas son la materia prima en la fabricación de hormonas esteroideas, vitamina D y compuestos esteroideos relacionados (27).

Las saponinas esteroidales se componen de triterpenos tetracíclicos y son los menos frecuentes en la naturaleza (17). Éstas se caracterizan por poseer un esqueleto del tipo colestano, siendo las más abundantes las pertenecientes al grupo de las B-amirina, que salvo algunas excepciones poseen grupos funcionales solos o acompañados por funciones aldehídos, lactona y comúnmente por ácidos carboxílicos (7, 25).

3.2.1.4 Propiedades de la Zarzaparrilla (*Smilax spp.*) biológicas demostradas

1. Propiedades diuréticas

Méndez J. A. (1992) (18) determinó esta propiedad a través de administrar por vía oral una solución de 1 g/kg de peso en ratas. La solución se preparó con 10 gramos de raíz en 100 ml de agua y se hirvió durante 3 y 5 minutos posteriormente se filtró.

Los resultados obtenidos fueron un aumento en la producción de volumen urinario. *Smilax lundellii* Killip & Morton incrementó en un 24%; *Smilax regelii* Killip & Morton incrementó en un 243% y 210% de incremento para *Smilax spinosa* Mill, con respecto al testigo (18).

2. Propiedad antibacteriana

Estudios microbiológicos realizados con el extracto alcohólico de la raíz de las especies *Smilax lundellii* Killip & Morton y *Smilax regelii* Killip & Morton, aplicado sobre 20 cepas de bacterias patógenas, demostró un espectro de inhibición del 85% de cepas de *Pseudomonas thypi* y 70% de *Pseudomonas aureus*. Estudios realizados con una solución de raíz de *Smilax spinosa* Mill, demostraron que se inhibe el crecimiento *in vitro* de microorganismos causales de infecciones de piel y mucosas, como *Escherichia coli* y *microsporum canis*, así mismo, aumentó la excreción urinaria de ratas (3, 4, 23).

3. Propiedad antifúngica

En estudio realizado con 30 pacientes que presentaban candidiasis vaginal, demostró que los óvulos a base de una tintura de la raíz de *Smilax lundellii* Killip & Morton, se comportan de manera similar al fármaco de referencia (Clotrimazol). Por otro lado, los ensayos clínicos de una pomada del mismo vegetal, muestran una mejoría en la sintomatología de 76 trabajadores de un rastro; y una pasteurizadora que padecía pie de atleta, en forma similar a la del fármaco de referencia (Tolnaftato), aunque en la mayoría de los casos no se

logró la negativización (3, 4, 5, 23).

3.2.1.5 Usos medicinales

La zarzaparrilla es utilizada como una planta medicinal, por la presencia de saponinas esteroidales, en las raíces, hojas y rizomas (13, 26). Pahlow (1985) (22) indica que la zarzaparrilla es utilizada como: Alterativo, antiinflamatorio, antiprurítico y antiséptico. En el año 1563 es introducido al Reino Unido, con la finalidad de curar en forma segura la sífilis. Durante muchos años se le ha utilizado como tratamiento para las enfermedades de la piel, incluyendo la psoriasis.

En la China, otras especies del género *Smilax* se utilizaron con propósitos similares, para el reumatismo, enfermedades de la piel, disentería y hasta la sífilis.

Este mismo autor (22), reporta que hace muchos años se realizó un estudio en el cual pacientes con psoriasis, fueron tratados durante años con tabletas de "Sarsasaponina", elaboradas a base de zarzaparrilla y se notificó un mejoramiento de la sintomatología en el 62% de los casos.

Además, indica que a esta planta se le considera antiguamente como un remedio excelente contra la sífilis y como depurativo de la sangre; sin embargo, actualmente se sabe que no cura totalmente la sífilis, si no que más parece que contribuye a que el paciente tenga una mejor calidad de vida debido a los esteroides que contiene. El té de zarzaparrilla es recomendable para el tratamiento de la psoriasis.

El homeopático "zarzaparrilla" se utiliza con frecuencia en las erupciones de diverso tipo que van acompañadas de prurito intenso. Otras indicaciones son la psoriasis, los eczemas y la costra láctea, así como las verrugas y forúnculos. Además, es un remedio contra la gota, el reumatismo y las afecciones vesicales y renales (22).

Cáceres A, et al. (4) y Palomo Robles (1993) (23) indican que la decocción de zarzaparrilla es utilizada para el tratamiento de las afecciones gastrointestinales (diarrea, dolor de estomago), alergia, debilidad, dolor de riñones, enfermedades de la sangre y del hígado, inapetencia, infecciones venéreas y dermatomucosas, lepra, retención urinaria, gota artritis y reumatismo.

Martínez M. (16) indica que para uso externo, la forma de preparación es hervir 5 cucharadas de raíz

machacada en 4 tazas de agua por 10-15 minutos; se deja entibiar, se cuela y se aplica en forma de lavados o lienzos en la parte afectada.

Se cree que por sus propiedades diuréticas y depurativas, ayudan a eliminar las impurezas del organismo como ácido láctico, úrico y grasa, por medio del sudor, heces y orina; alivia enfermedades como la artritis y el reumatismo. En las enfermedades eruptivas como sarampión y varicela, baja la fiebre y favorece la evolución de estas enfermedades (8). Se prepara hirviendo una cucharadita de raíces en una taza de agua durante 5-10 minutos, se tapa, se deja reposar y se cuela. De esta solución se debe tomar una taza en ayunas (9).

En Cuba el uso de zarzaparrilla está muy arraigado, ya que es un ingrediente de un tónico local llamado "pru". Partes de raíz de zarzaparrilla junto con los rizomas de *Renealmia aromática*, piezas de *Vitis caribea*, tallos de *Typhaleae fructicosa*, azúcar y clavo, producen este tónico, que se utiliza como fortalecedor de los riñones (19).

La especie de *Smilax aristolochiaefolia Mill*, se utiliza junto con las raíces de Ginseng, Jengibre y Sasafrás, en un preparado llamado "Root Booster", al cual se le atribuyen propiedades afrodisíacas (16).

El té de zarzaparrilla también es utilizado para el tratamiento del cáncer (26). Los nativos de Nueva Guinea, aplicaban la corteza macerada del tallo de especies del género *Smilax*, para el dolor de muelas (16). Las raíces y rizomas del género *Smilax* se combinan con otras plantas y presentan las siguientes propiedades:

Antiséptica: Mezcla de zarzaparrilla con Guayaba, Hierba de Cáncer, Macuy y Tomillo.

Cicatrizante: Mezcla de zarzaparrilla con Encino, Llantén, Nance y Quilete.

Depurativa: de un Amargón, Borraja, Saúco y Verbena (9).

En Guatemala lo han utilizado también para tratar el salpullido en los niños, la dermatitis alérgica, hepatitis y malaria (3).

3.2.1.6 Contraindicaciones

No se conocen efectos adversos mayores, pero el uso de dosis excesivas podría resultar dañino, ya

que por el contenido de saponinas se podrían irritar algunos órganos del tracto gastrointestinal. El uso inyectado puede causar hemólisis (4, 23). En estudios realizados por Movitz y Runge, citados por Beal J. L: *et al* (2), se encontró que el índice de hemólisis de la parillina es de 4,000 y el de la sarsasaponina es de 4,500.

3.2.2 Domesticación agrícola de la Zarzaparrilla

Dado que el manejo de los recursos fitogenéticos es de suma importancia para el país, la Facultad de Agronomía de la USAC y el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola decidieron conjuntar esfuerzos e iniciaron, en 1991 el proyecto de investigación titulado “Desarrollo Agrotecnológico de cinco especies medicinales, silvestres con potencial de exportación” (12, 13). El cual fue financiado por la Gremial de Exportadores de Productos no Tradicionales”. Con este proyecto dio inicio el proceso de domesticación de la Zarzaparrilla (*Smilax sp*) en Guatemala por lo que, a continuación se presentan los aspectos metodológicos y los resultados más sobresalientes:

3.2.2.1 Propagación sexual

1. Pruebas de fermentación de frutos

Se propuso ensayar en 3 medios de fermentación, como agua, materia orgánica húmeda y la combinación de materia orgánica más agua. Las semillas de *Smilax* se obtuvieron de las localidades de Campur, Alta Verapaz, Chuituj, Sololá, y Erivón, Izabal. Los medios de fermentación fueron: 375 ml de agua, 200 gr. de materia orgánica y 200 gr. de materia orgánica más 25 ml de agua, por unidad experimental. Este experimento permitió concluir, que el tiempo requerido para la fermentación de frutos maduros de *Smilax spp.* es de alrededor de 14 días, para las 3 poblaciones, aunque la población de Campur, lo hizo en el menor tiempo, debido quizá a la época de colecta (18/06/92). Y el medio de fermentación de frutos de *Smilax spp.* que dio los mejores resultados, fue solamente el agua (13, 12).

A) Ensayo sobre Desinfección de la Semilla de *Smilax spp.* y Selección del Sustrato para el Semillero

Las semillas que se utilizaron en este ensayo, son las que fueron sometidas a fermentación en el experimento anterior. Los tratamientos para desinfección de las semillas fueron 3: a) con una solución de ácido sulfúrico al 10%, remojadas durante 5 minutos, b) en hipoclorito de calcio al 0.9%, durante 5 minutos y

testigo (sin aplicación). Los sustratos utilizados fueron: a) arena, b) materia orgánica y c) arena y materia orgánica en proporción 1:1. Se hicieron 3 lecturas. La primera a los 60 días, la segunda a los 80 días y la tercera a los 110 días. Se dió por germinada la semilla al momento del apareamiento del primordio, sin embargo, hay que anotar que para constituirse como plántula de unos 5 centímetros de altura, le tomó aproximadamente 30 días más a la semilla (23, 12).

Los resultados obtenidos posteriormente permitieron concluir, que la población de Campur, Alta Verapaz, fue la que mejor resultado dio en el porcentaje de germinación de la semilla, con 62% a los 110 días. No es necesario usar productos químicos para la desinfección de la semilla de Smilax, antes de sembrarla; y el mejor sustrato para la germinación es la materia orgánica (13, 12).

3.2.2.2 Propagación asexual

1. Propagación de tallos

Este tipo de propagación se inició en el año de 1991, utilizando porciones vegetativas, y aplicando en los cortes, inductores de raíces tales como el Rootone 1, 2, 3. La edad de las porciones vegetativas utilizadas fue desconocida, ya que el material vegetal colectado es de poblaciones silvestres. Los resultados obtenidos fueron insatisfactorios (13, 12).

A mediados del año 1992, se reiniciaron las pruebas de propagación asexual, utilizando porciones vegetativas (basal, medial y apical) de una (o dos plantas) por población. Se utilizaron inductores de raíces tales como el Rootone 1, 2, 3, y Rootex 5.

Los resultados obtenidos fueron nuevamente insatisfactorios, pues todos los esquejes sembrados bajo condiciones de invernadero, en cajas de propagación, con sustrato de arena, no emitieron sistema radicular. No obstante, hay que aclarar, que algunos de estos pocos esquejes emitieron brote lateral del (o los) nudo (s) exterior (es) o aéreo (s), aproximadamente al mes de sembrados, pero el mismo feneció al término de dos meses de brotado, dada la ausencia de raíces. Las edades de las porciones vegetativas en estas pruebas, nuevamente fueron desconocidas, lo cual limita el análisis de los datos bajo métodos estadísticos formales (13, 12).

2. Propagación de *Smilax* spp. rizomas

La propagación (clonal) asexual de las especies de *Smilax* se intentó utilizando rizomas; los cuales fueron seccionados tratando de que cada cada sección presentará, por lo menos, una yema vegetativa .

Los substratos utilizados fueron: arena, broza y arena más broza (1:1); no existiendo diferencias entre los mismos en cuanto a la inducción de raíces. Para producir un brote, la especie de *Smilax* de Campur demandó 45 días, mientras la población de El Palmar, demandó 120 días (12). En términos generales, la propagación de *Smilax* por rizomas presenta las siguientes ventajas: a) las raíces y los brotes se desarrollan vigorosamente, que en comparación a la propagación por semillas, lo cual se debe a los recursos energéticos del rizoma, b) en nuevos rizomas se desarrollan más rápidamente que aquellos que provienen de propagación por semillas. Sin embargo, la propagación por rizomas presenta 3 problemas: 1) El rizoma se endurece y muere rápidamente si no es sembrado de inmediato, 2) Los cortes hechos al rizoma tienden a infectarse y luego la sección completa sufre necrosis, 3) La propagación por rizomas tiene un costo ecológico muy alto, ya que por ejemplo, de un rizoma de 10 años de edad solamente se tienen de 3 o 4 plantas.

3.2.2.3 Respuesta del cultivo de *Smilax*, en la fase de vivero

Los frutos de zarzaparrilla fueron colectados en el mes de abril, sembrándose y germinando en el mes de Junio de 1992; haciéndose lecturas a partir de esa fecha. La primera a los 10 meses (la plántula se encontraba en bolsas de almácigo y condiciones de vivero) y la segunda a los 15 meses (las plántulas fueron trasladadas a la Finca Bulbuxyá). Los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 4.

En este cuadro (4) puede observarse que del peso medio total de las plantas, el 41% corresponde a las hojas, el 20.52% a los tallos, el 30.53% a las raicillas y el 7.95% a los rizomas. Este porcentaje es importante considerarlo, ya que los ingredientes activos de este género se encuentran en las hojas y rizomas (12).

Cuando las plantas se trasladaron al campo definitivo, en la finca Bulbuxyá de la FAUSAC, en Chicacao, Suchitepéquez, estas encontraron un ambiente más propicio para su crecimiento, como se aprecia en el incremento de las variables altura de las plantas, número de hojas funcionales, peso fresco y seco entre otros; por ejemplo, el peso fresco de las hojas funcionales se incrementa en un 11.87% (además de que se incrementa su número); el peso fresco del tallo se incrementa en un 238% por metro lineal. Otras variables que se incrementaron adecuadamente son el tamaño medio del rizoma y su peso fresco, así como el peso

fresco total de la planta (12).

Cuadro 4. Datos morfológicos referidos al crecimiento y desarrollo de *Smilax spp.*, tomado de una muestra de plántulas propagadas de la población de Campur, Alta Verapaz, en Mayo de 1993, a los 10 y 15 meses de edad.

VARIABLES		PLANTAS EN EL VIVACIO	PLANTAS DE CULTIVO EN EL CAMPO
Altura de la planta (cm)		91.10	134.07
Número de brotes vegetativos		4.00	3.47
Número de nudos por brote vegetativo	Primero (más largo)	10.00	9.67
	Segundo (siguiente)	7.00	-----
	Tercero (subsiguiente)	5.00	-----
	Cuarto (más pequeño)	4.00	-----
Largo medio de los tres primeros del primer (más largo) brote vegetativo (cm)		12.00	-----
Número de hojas funcionales		19.00	43.13
Tamaño medio de las hojas funcionales	Largo (cm)	12.00	-----
	Ancho (cm)	4.39	-----
Peso fresco de las hojas funcionales (gr.)		12.49	31.70
Peso seco de las hojas funcionales (gr.)		-----	8.17
Peso fresco de los tallos (gr.)		6.25	31.19
Peso seco de los tallos (gr.)		-----	9.19
Peso seco de las raicillas (gr.)		9.30	7.05
Peso seco de las raicillas (g.)		-----	1.75
Largo de las raicillas		31.10	-----
Tamaño medio del rizoma	Largo (cm)	2.37	4.83
	Diámetro (cm)	1.47	1.81
Peso fresco del rizoma (gr.)		2.42	15.16
Peso seco del rizoma (gr.)		-----	4.76
Sumatoria de peso fresco total de la planta (g.)		30.46	85.10
Sumatoria del peso seco total de la planta (gr.)		-----	23.87
Diámetro base del tallo principal (cm)		-----	0.62

FUENTE: Herrera Sosa et al. (12).

3.2.2.4 Evaluación de tres especies arbóreas de sombra para el crecimiento de *Smilax spp.*

Las plantas de *Smilax spp.* evaluadas presentan 15 meses de edad (10 meses en fase de vivero y en invernadero, en la FAUSAC, Guatemala; y 5 meses de campo en la Finca Bulbuxyá, Chicacao, Suchitepéquez), las cuales se distribuyen en 3 parcelas de adaptación, bajo la sombra de las especies *Tectona grandis* (Teca), *Gmelina arborea* (Melina) y Aripín.

El número de plantas por parcela fue de 66, utilizando los árboles de estas especies como tutores y proveyéndolos de varas de madera para su crecimiento inicial. Los resultados que se presentan en el cuadro 5, son los valores obtenidos en el primer muestreo.

Cuadro 5. Resultados de la primera toma de datos de la evaluación de tres especie arbóreas de sombra sobre el crecimiento de *Smilax*. (Los datos corresponden a la media de 10 plantas muestreadas por parcela).

VARIABLE	SOMBRA DE		
	TECA	ARIPÍN	MELINA
Largo del tallo principal (cm)	97.60	163.20	141.40
Número de hojas funcionales por planta	24.80	41.80	62.80
Número de brotes por planta	3.320	3.40	3.80
Número de nudos del tallo principal	8.00	10.60	10.40
Peso fresco de los tallos (gr.)	12.46	39.70	41.40
Peso seco de los tallos (gr.)	4.39	10.88	12.30
Peso fresco de las hojas (gr.)	18.14	37.54	39.44
Peso seco de las hojas (gr.)	4.20	23.18	11.15
Diámetro basal del tallo principal (cm)	0.45	0.76	0.66
Peso fresco del rizoma (gr.)	4.04	20.20	21.24
Peso seco del rizoma (gr.)	1.41	5.89	6.99
Largo del rizoma (cm)	3.10	5.80	5.60
Diámetro del rizoma (cm)	1.41	2.20	2.10
Peso fresco de las raíces (gr.)	3.58	7.56	10.02
Peso seco de las raíces (gr.)	2.19	1.59	1.48

Fuente: Herrera Sosa *et al.* (12).

Con base en los resultados obtenidos, se puede concluir que las especies de *Smilax* se desarrollan mejor bajo sombra de aripín y melina, proporcionando estas especies un 60% de sombra, mientras que teca proporciona un 90% de sombra. El peso fresco total de la planta es de 112.10 gr. en la sombra de melina (18.95% de peso fresco de rizoma y 8.94% de peso fresco de raíces). En sombra aripín el peso fue de 105.00 gr. (19.24% de peso fresco de rizoma y 7.20% peso fresco de raíces), presentando un 6.33% menos de peso fresco que las plantas de *Smilax* bajo sombra de melina. En sombra de teca, su peso fresco fue de 38.22 gr. (10.57% peso fresco de rizoma y 9.37% peso fresco de raíces), representando esta peso fresco el 34.09% del peso fresco de las especies de *Smilax* bajo la sombra de melina (12).

4. OBJETIVOS

- 4.1 Evaluar la respuesta a la inducción de callo y brotes a partir de explantes (hojas con pecíolo y brotes apicales) de zarzaparrilla (*Smilax spinosa Mill.*), utilizando diferentes concentraciones de bencilamino purina (citocinina) y ácido naftalenacético (auxina).
- 4.2 Evaluar la respuesta al enraizamiento a partir de brotes provenientes de explantes (hojas con pecíolo y brotes apicales) de zarzaparrilla (*Smilax spinosa Mill.*).
- 4.3 Lograr la adaptación de plantas de *Smilax spinosa Mill* obtenidas *in vitro* a condiciones de macetas.

5. HIPÓTESIS

- 5.1 Los explantes (hojas con pecíolo y brotes apicales) de zarzaparrilla (*Smilax spinosa Mill.*), responden a la inducción de callos y formación de brotes.

- 5.2 Los brotes formados a partir de explantes (hojas con pecíolo y brotes apicales) de zarzaparrilla (*Smilax spinosa Mill.*) responden al enraizamiento.

- 5.3 Las plantas de *Smilax spinosa Mill* obtenidas *in vitro* se adaptan a condiciones ambientales normales de maceta.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área experimental

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. El Laboratorio está ubicado en el salón C-16, tercer nivel del edificio T-8, de ciudad universitaria, zona 12, ciudad de Guatemala.

6.2 Medio basal

En todas las etapas que se realizaron en este trabajo, se utilizó el medio nutritivo basal, descrito por Murashige y Skoog (1962), y denominado comúnmente MS, pues se consideró el más apropiado (ver fórmula de MS en anexo, cuadro # 9A).

6.3 Elaboración de los medios de cultivo

Para la obtención de los medios de cultivo se prepararon, en primer lugar, las soluciones madre de concentración conocida. Se tomó como base la preparación de un litro del medio, agregando los ingredientes correspondientes para el MS, y las combinaciones de reguladores del crecimiento (ver cuadro 7). Utilizando 30 gr/lt, de sacarosa como fuente de carbono y 10 gr/lt de agar como agente gelificante.

Las soluciones madre de concentración conocida sirvieron de base para la preparación del medio MS, a utilizarse en las distintas fases de la investigación, con sus respectivas combinaciones hormonales (ver cuadro 7), ajustándose el pH entre 5.7 y 5.8, con HCl y NaOH al 0.1 N y 1.0 N. Se prepararon 25 ml de medio para cada combinación hormonal.

6.4 Esterilización de los medios de cultivo

Luego de preparar los medios de cultivo con sus combinaciones hormonales, se depositaron en frascos de vidrio de 120 ml de capacidad, esterilizándose en el autoclave durante 20 minutos a 121 grados centígrados y 15 libras de presión.

6.5 Material vegetal

Los materiales vegetales utilizados fueron hojas con pecíolo y brotes apicales de *Smilax spinosa* Mill.

6.6 Selección del material experimental

Los materiales utilizados para la micropropagación *in vitro* fueron hojas enteras con sus respectivos pecíolos de plantas de zarzaparrilla (*Smilax spinosa* Mill), provenientes de una población natural encontrada en un paraje del municipio de Alotenango, conocido como "El astillero" el paraje se ubica al suroeste del municipio, en las faldas del volcán de Fuego, a una altitud de 1,400 msnm. en las coordenadas geográficas de 14°27'40" de latitud norte y 90°49'20" de longitud oeste. Se colectaron en el "astillero" 10 plantas pequeñas de aproximadamente 15 cm. de altura. Dichas plantas fueron trasladadas al invernadero de la FAUSAC, en donde se sembraron en bancales con una mezcla de suelo franco arenoso; en este lugar se les dio manejo consistente en un riego por semana durante 4 meses y aspersiones con el fungicida Ridomil en concentración de 0.9 gr/lt y del bactericida Agrimicín a razón de 1 gr/lt; realizando una aspersión semanal desde un mes antes de iniciar la toma de explantes y brotes apicales que sirvieron para realizar los experimentos *in vitro*.

Fue necesario desinfectar el material vegetal para asegurarse que éste estuviera libre de microorganismos contaminantes, para lo cual se procedió de la siguiente manera:

- a) Se cortaron las hojas incluyendo el pecíolo y se lavaron cinco veces con agua y jabón líquido, b) Se colocó el material vegetal en etanol al 70%, durante dos minutos, c) El material vegetal se trasladó a un beaker de 100 ml, que contenía hipoclorito de sodio al 20% v/v, dejándose reposar durante 20 minutos y finalmente, c) Se enjuagó el material con agua destilada esterilizada dentro de la cámara de flujo laminar.

6.7 Determinación de la especie

Utilizando material colectado en el campo la clave botánica que se presenta en el anexo 1, se determinó que la especie colectada y que es la que sirvió para la investigación corresponde a *Smilax spinosa* Mill. La determinación botánica se hizo en el Herbario de la Facultad de Agronomía "AGUAT" ; "José Hernesto Carrillo".

6.8 Siembra del tejido en el medio de cultivo

La siembra del explante en el medio de cultivo se realizó en la cámara de flujo laminar, la cual fue desinfectada previamente con alcohol etílico al 70%. Para la manipulación del tejido en la campana de flujo laminar se utilizaron frascos y cajas de petrí previamente esterilizadas, así como agua destilada estéril. También se utilizó instrumentos como asas, pinzas, bisturís que eran flameados en el mechero cada vez que eran utilizados en la manipulación de los explantes, los cuales se inocularon en frascos de vidrio conteniendo el medio de cultivo con los componentes de las sales de Murashige y Skoog (1962).

6.9 Incubación de los cultivos

Los frascos conteniendo el medio de cultivo y los explantes, se colocaron sobre los anaqueles del cuarto de crecimiento del laboratorio y fueron sometidos a una fuente de luz blanca fluorescente de 1,000 a 3,000 lux de intensidad aproximadamente, a una temperatura media de 25 grados centígrados y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

6.10 Fases de la investigación

El estudio se desarrolló en dos fases para facilitar el manejo de la investigación. La Fase I, persiguió básicamente la inducción de callos y la regeneración de brotes, y la Fase II, consistió en la inducción de enraizamiento.

6.10.1 Fase I: Inducción de callo y regeneración de brotes

En la primera etapa de la investigación, llamada iniciación de los cultivos, se procedió a la siembra de explantes de hoja con pecíolo y de brotes apicales de zarzaparrilla, en el medio basal de Murashige y Skoog, complementado con las respectivas combinaciones de reguladores de crecimiento, en los frascos de vidrio de 125 ml de capacidad, conteniendo cada uno aproximadamente 25 ml del medio de cultivo. Esta etapa se desarrolló bajo condiciones homogéneas de luz, temperatura y humedad.

6.10.1.A Tratamientos

Para el experimento sobre "inducción de callos y la regeneración de brotes, a partir de explantes de

hoja con pecíolo de *Smilax spinosa*", corresponde a la fase I de la investigación, se establecieron 12 tratamientos y un testigo con 4 repeticiones cada una.

Los 12 tratamientos resultaron de combinar 4 concentraciones de la auxina ácido naftalenacético - ANA- y 3 de la citocinina bencilaminopurina -BAP-, un medio basal (MS), y dos tipos de explantes (hoja con pecíolo y brotes apicales), además del testigo (medio basal MS sin aplicación de reguladores del crecimiento), presentados en los cuadros 6 y 7.

Cuadro 6. Tipo de explante y niveles de regulador que se utilizaron en la sub-fase de inducción de callo.

FACTOR	NIVEL
A. EXPLANTES	A1 Hojas con pecíolo
	A2 Brotes apicales
B. BENCILAMINOPURINA (mg/l) (citocinina).	0.1
	0.5
	1.0
	5.0
C. ACIDO NAFTALENACETICO (mg/l) (auxina).	1.0
	3.0
	5.0

A = explantes B = concentración

Cuadro 7. Niveles del regulador del crecimiento en mg/l, adicionando al medio de cultivo MS, para la fase de multiplicación de hojas con pecíolo y brotes apicales.

Tratamientos	Tipo de explante	Niveles de regulador de crecimiento	
		Bencilaminopurina (mg/l)	Acido naftalenacético (mg/l)
1	PECÍOLO	0.1	1.0
2		0.1	3.0
3		0.1	5.0
4		0.5	1.0
5		0.5	3.0
6		0.5	5.0
7		1.0	1.0
8		1.0	3.0
9		1.0	5.0
10		5.0	1.0
11		5.0	3.0
12		5.0	5.0
13	BROTOS APICALES	0.1	1.0
14		0.1	3.0
15		0.1	5.0
16		0.5	1.0
17		0.5	3.0
18		0.5	5.0
19		1.0	1.0
20		1.0	3.0
21		1.0	5.0
22		5.0	1.0
23		5.0	3.0
24		5.0	5.0

6.10.1.B Unidad experimental

La unidad experimental la constituyó un frasco de compota con 4 explantes, a cada frasco se le agregaron 25 ml. del medio de cultivo.

6.10.1.1 Manejo del experimento

Se realizó la siembra de explantes de hojas con pecíolo y brotes apicales de *Smilax spinosa*, el primero se colocó de forma vertical haciendo contacto el envés de la hoja con el medio de cultivo, para el caso de brotes apicales éstos se inocularon verticalmente. Para tal caso se utilizó el medio basal de Murashige y Skoog suplementado con las respectivas combinaciones de reguladores de crecimiento (Ver cuadro 1), en frascos de vidrio con capacidad de 125 ml, y 25 ml del medio, sembrándose en cada frasco 4 explantes, utilizando un total de 4 repeticiones por tratamiento, y fueron depositados sobre los anaqueles del cuarto de crecimiento del laboratorio bajo condiciones controladas de luz y temperatura.

A los valores de las variables evaluadas, se les aplicó un análisis descriptivo con base a valores absolutos, porcentajes y promedios obtenidos. Con los resultados finales de cada etapa se elaboraron cuadros y figuras para una mejor ilustración de las respuestas presentadas.

6.10.1.2 Variables evaluadas

Las variables evaluadas en este estudio fueron:

a) *Número total de callos inducidos por tratamiento*

Se registró el número total de callos inducidos por tratamiento. Este dato fue tomado al momento del primer subcultivo, después de 10 semanas de efectuada la siembra.

b) *Porcentaje de callo inducido por tratamiento*

También se registró el número de explantes que presentaron callos en todos los tratamientos, desde el momento del primer subcultivo hasta el final del mismo, que fueron 10 semanas. Para ello se hizo una relación entre número total de callos inducidos y el número de explantes que presentaron respuesta al formar callos, obteniéndose así el porcentaje de callos formado por tratamiento.

c) *Porcentaje de brotes regenerados por tratamiento*

Se registró el número de explantes que presentaron respuesta al regenerar brotes, luego, se procedió hacer la relación entre el número total de brotes regenerados y el número de explantes que reportaron respuesta al formar brotes, obteniéndose así el porcentaje de brotes formados por tratamiento.

d) *Promedio de hojas formadas por brote*

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

e) *Promedio de longitud de brotes formados por explantes*

Para establecer este dato se registró la longitud de brotes producidos por los explantes en cada tratamiento.

6.10.2 FASE II: ENRAIZAMIENTO

6.10.2.1 Unidad experimental

La unidad experimental la constituyó un frasco de compota con cuatro explantes cada uno, a cada frasco se le agregó 25 ml del medio de cultivo.

a. Materiales

Se utilizó como medio basal el medio de Murashige y Skoog, reducido en un 50%, 75% y 100% de sus componentes (ver cuadro 9A). Los explantes que se utilizaron fueron brotes regenerados.

b. Preparación del medio de cultivo

En esta fase se utilizó el medio basal de Murashige y Skoog, reducidos al 50%, 75% y 100% de sus componentes, sin ninguna suplementación de Bencilaminopurina y ácido naftalenacético.

c. Traslado de los explantes

Los explantes se trasladaron de los medios basales enriquecidos con reguladores de crecimiento a los

medios basales sin reguladores de crecimiento, utilizando las respectivas medidas de asepsia y pinzas previamente desinfectadas.

d. Condiciones de cultivo

Las condiciones del cultivo fueron las mismas que para la fase de inducción de callo.

6.10.2.2 Variables respuesta

- a. *Porcentaje de plantas que emitieron raíces:*** Se relacionó el número de plantas que emitieron raíces con el número de plantas totales, determinándose de esta manera su porcentaje.
- b. *Número de raíces por planta:*** Se realizó el conteo de raíces por cada una de las plantas que logró enraizar.
- c. *Longitud media de raíces:*** Se midieron todas las raíces y se determinó el promedio de longitudes.

6.10.2.3 Aclimatación

Cuando las plantas enraizaron con una altura de 5 cm se les aclimató de la siguiente manera:

- a)** Se utilizó un sustrato llamado Peg Moss, el cual fue esterilizado en autoclave durante 20' a 121 °C y 15 lbs de presión depositándose así dicho sustrato en macetas para ser utilizados para la siembra.
- b)** Se extrajeron las plántulas de los medios de cultivo; se lavaron con agua destilada para la eliminación de residuos de medios de cultivo.
- c)** Se sembraron las plántulas y se les aplicó riego.
- d)** El lugar en donde se ubicaron las plántulas fue una mesa cubierta de los lados y parte de encima (a un metro más arriba de la superficie de la mesa), con nylon negro. Cinco días después se dejaron hasta la mitad de la altura cubierta, para luego eliminar el nylon 3 días después, dejando de tal manera descubiertas las plántulas.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

A continuación se describen los resultados obtenidos en dos fases importantes del proceso de formación, desarrollo y crecimiento de callos, brotes y enraizamiento de plántulas provenientes de explantes de hojas con pecíolo y brotes apicales de *Smilax spinosa Mill.*

7.1 FASE I. Inducción de callos y regeneración de brotes

7.1.1 Iniciación del cultivo de tejidos

Los explantes de hoja con pecíolo y brotes apicales de zarzaparrilla cultivados en recipientes de vidrio de 125 ml de capacidad, conteniendo 25 ml del medio basal de Murashige y Skoog suplementado con la auxina ácido nafalenacético -ANA- en niveles de 1.0, 3.0, 5.0 mg/lt, y la citocinina bencilaminopurina -BAP- en niveles de 0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 mg/lt que permanecieron durante 10 semanas en los medios de cultivos formando callos y brotes.

A continuación se describe el proceso de formación de callos:

1. **Explante de hoja con pecíolo:** a las cuatro semanas de cultivo comenzó a ser visible la formación de protuberancias en forma de pequeñas agallas sobre el haz y el envés de las hojas; también se pudo observar como indicio de respuesta, la expansión o hinchamiento del tejido alrededor del corte y sobre el área del pecíolo, debido al efecto de la auxina al promover la división celular, lo que indujo al crecimiento y proliferación de masas celulares amorfas. La lámina foliar comenzó a arrugarse o plegarse sobre sí misma, muchas veces arqueándose en el medio de cultivo y presentando protuberancias que eran el indicio más notable de la formación de callos sobre la hoja.

Algunos explantes en todos los tratamientos permanecieron verdes, es decir, vivos durante toda la fase del cultivo sin embargo; no presentaron algún tipo de respuesta que se evidenciara. Otros, en cambio, degeneraron primero a un color amarillo luego a un color parduzco y finalmente a un color

negro, lo que evidenció su muerte, esto podía observarse en un mismo frasco de cultivo, es decir que en un mismo frasco se observaron explantes vivos -verdes- pero sin alguna respuesta visible, explantes con respuesta visible y explantes muertos o en un proceso de necrosis.

2. **Explanter de brote apical:** el tejido se va desdiferenciando por lo cual el explante va adquiriendo una forma amorfa de color blanquecino y en algunos casos verde pálido, como producto de la proliferación de embrioides que conforman una masa callosa.

7.1.2 Porcentaje de callos inducidos por tratamiento

Como se observa en el cuadro 8, al final de la fase I casi todos los tratamientos evaluados (11 de 12 tratamientos) formaron callo; a excepción de los explantes del tratamiento testigo y del tratamiento # 7 (1.0+1.0 mg/lt), ANA+BAP), que los formaron.

CUADRO 8. Respuesta del explante hoja con pecíolo a la inducción de callo y brote.

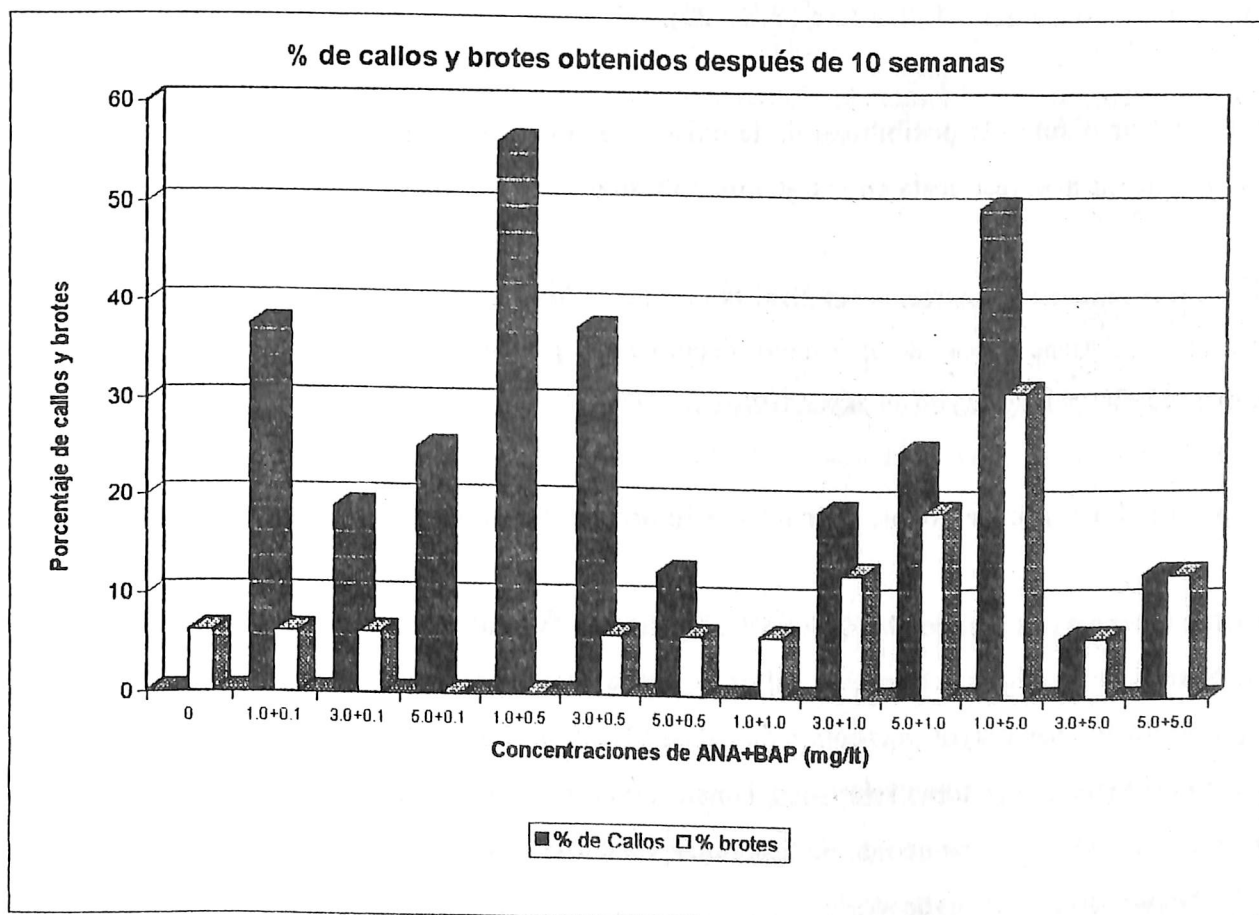
Concentración ANA+BAP (mg/lt)	% de Callos	Consistencia de callo	Color de callo	% brotes
1.0+0.1	37.50	Duro	Café	6.25
3.0+0.1	18.75	Duro	Café	6.25
5.0+0.1	25.00	Duro	Café	0.00
1.0+0.5	56.25	Duro	Café	0.00
3.0+0.5	37.50	Suave	Café	6.25
5.0+0.5	12.50	Duro	Café	6.25
1.0+1.0	0.00	Duro	-	6.25
3.0+1.0	18.75	Duro	Café	12.50
5.0+1.0	25.00	Duro	Verde	18.75
1.0+5.0	50.00	Duro	Verde	31.25
3.0+5.0	6.25	Duro	Café	6.25
5.0+5.0	12.50	Duro	Verde	12.50
Testigo	0	-	-	6.25

Los tratamientos que más se destacaron en la formación de callos fueron los que incluían las concentraciones hormonales de 1.0+0.5, 1.0+5.0, mg/lt de ANA+BAP, con el 56.25% y 50.00% de formación de callos respectivamente, esto sugiere que cuando se necesite de la formación de callos a partir de hojas con pecíolo de *Smilax spinosa* Mill. es suficiente con utilizar concentraciones de 1 mg/lt de ANA y de

0.5 mg/lt de BAP. Se observó que si se aumenta por sobre 1 mg/lt la concentración de ANA, entonces la obtención de callo tiende a reducirse.

Los callos observados fueron de consistencia compacta, presentando coloración generalmente café, aunque en algunos casos se presentaron de un color verde claro.

En la gráfica 1 se muestran los resultados anteriormente descritos, realizando una comparación gráfica en cuanto al porcentajes de callos inducidos durante la iniciación del cultivo, por las diferentes concentraciones de ANA y BAP evaluados, estableciéndose que el tratamiento 4 (1.0 mg/lt de ANA + 0.5 mg/lt de BAP) presentó el mayor porcentaje de callos.



Gráfica 1. Porcentaje de callos y brotes obtenidos en los diferentes tratamientos de auxinas y citocininas.

7.1.3 Porcentajes de brotes regenerados por tratamiento

En esa misma gráfica se muestra que el tratamiento 10 (1.0 mg/lt de ANA + 5.0 mg/lt de BAP)

logró la formación del mayor % de brotes.

En los explantes de hoja con pecíolo con presencia de tejido calloso, se pudo observar que dicho tejido calloso, con el paso del tiempo sufrió un proceso de desdiferenciación, dando origen a diferentes brotes, y como se observa en el cuadro, las 2 combinaciones que más brotes formaron a partir de hojas con pecíolo fueron 1.0 mg/lt de ANA + 5.0 mg/lt de BAP y 5.0 mg/lt de ANA + 1.0 mg/lt de BAP con 31.25% y 18.75% respectivamente.

El tratamiento testigo MS sin adición de reguladores no mostró formación de callos, pero si de brotes, lo que sugiere que no todos los brotes fueron regenerados por un callo intermedio, es decir tuvo un proceso de organogénesis, a través de la cual se puede obtener brotes adventicios que surgen directamente del tejido del explante, como lo asegura, Villalobos, *et al.* (29).

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

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

7.1.4 Respuesta del explante "brote apical" a la inducción de callo

Como se observa en el cuadro 9, los 12 tratamientos evaluados en esta fase formaron callos, mientras que los explantes del testigo no formaron callos. Y fue la combinación de 3.0 mg/lt de ANA + 0.1 mg/lt de BAP la que logró formar mayor porcentaje de callos (31.25%). La formación de callos a partir de explantes de zarzaparrilla *Smilax spp.* toma relevancia considerando que a partir de los callos se forman raíces que es donde se encuentra el mayor contenido de saponinas y además a partir de los callos se pueden reproducir una buena cantidad de brotes de zarzaparrilla.

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

CUADRO 9. Respuesta del explante brote apical a la inducción de callo.

Combinación Hormonal	% de Callos	Consistencia de callo	Color de callo
ANA + BAP (mg/l)			
1.0+0.1	12.50	Duro	Café
3.0+0.1	31.25	Duro	Café
5.0+0.1	25.00	Duro	Café
1.0+0.5	25.00	Duro/suave	Café
3.0+0.5	6.25	Duro	Café
5.0+0.5	12.50	Duro	Café
1.0+1.0	18.75	Suave	Café
3.0+1.0	6.25	Duro	Café
5.0+1.0	18.75	Duro	Café
1.0+5.0	6.25	Duro	Café
3.0+5.0	6.25	Duro/suave	Verde
5.0+5.0	6.25	Duro	Verde
Testigo	0	-	-

7.1.5. Respuesta del explante brote apical a la inducción de brotes

Como se observa en cuadro 10, la regeneración de brotes a partir del explante brote apical fue total ya que para todas las combinaciones de ANA + BAP al igual que para el testigo se presentó un 100% de regeneración de brotes.

El hecho de que para el testigo la respuesta fue de 100%, sugiere que para regenerar brotes no es necesario suplir el MS con ANA y BAP.

Para la variable "longitud promedio de brotes", fueron los tratamientos 5.0 + 0.5 mg/l ANA + BAP y 3.0 + 0.1 mg/l ANA + BAP los que presentaron los brotes más grandes con longitudes de 43.75 y 42.25 mm. respectivamente. Estos dos tratamientos fueron también los que presentaron mayor cantidad de hojas promedio, de 9.12 y 7.44 hojas por brote respectivamente. Mientras que, el testigo presentó brotes más pequeños con menor cantidad de hojas.

CUADRO 10. Respuesta del explante brote apical a la inducción de brotes múltiples.

Combinación Hormonal ANA - BAP (mg/l)	% de Brotes	Longitud Promedio de Brotes (mm)	Promedio de hojas
1.0+0.1	100.00	31.25	5.38
3.0+0.1	100.00	42.25	7.44
5.0+0.1	100.00	35.50	3.31
1.0+0.5	100.00	31.75	5.25
3.0+0.5	100.00	26.25	4.06
5.0+0.5	100.00	43.75	5.06
1.0+1.0	100.00	33.00	9.12
3.0+1.0	100.00	30.00	5.12
5.0+1.0	100.00	34.50	5.15
1.0+5.0	100.00	26.25	2.94
3.0+5.0	100.00	34.25	4.19
5.0+5.0	100.00	23.75	4.88
Testigo	100.00	22.50	3.50

7.2 FASE II ENRAIZAMIENTO

7.2.1 Respuesta de brote apical a la inducción de raíces

Se utilizó como medio basal el medio de Murashige y Skoog reducido a un 50%, 75% y 100% de sus componentes (cuadro 15A); los explantes que se utilizaron fueron brotes apicales sin ninguna suplementación de Bencilaminopurina y ácido naftalenacético.

7.2.2 Traslado de los explantes

Los explantes se trasladaron de los medios basales enriquecidos con reguladores de crecimiento a los medios basales sin los medios de crecimiento, utilizando las respectivas medidas de asepsia e instrumentos previamente desinfectados.

7.2.3 Condiciones de cultivo

Las condiciones del medio de cultivo fueron las mismas que para la fase de inducción de callo. En el cuadro 11 puede verse la respuesta de los explantes de brote apical a la inducción de raíces en un medio MS al que se observa que la variable "longitud de raíces" osciló entre 4 y 2.5 cms; aunque generalmente las

plantas sólo presentaron 2 raíces cada una, el promedio de longitud de raíces fue de 11.13 cm por planta.

CUADRO 11. Respuesta del explante brote apical a la inducción raíces.

CONCENTRACIÓN DE SALES MS AL 100%

Plantas	Promedio de longitud de raíces (cms)	Nº Raíces
1	16.00	2
2	15.00	1
3	8.00	3
4	6.33	3
5	10.67	3
6	17.00	1
7	10.33	3
8	3.67	3
9	15.75	4
10	7.70	2
11	12.00	1
12	6.33	3
13	12.00	2
14	21.00	1
15	15.50	2
16	8.00	1
17	7.33	3
18	15.50	2
19	8.00	3
20	12.50	2
21	5.50	4
22	2.20	5
23	4.67	3
24	25.00	1
25	15.00	2
26	18.00	1
27	14.50	2

MS= medio nutritivo de Murashige y Skoog.

En el cuadro 12, se presentan los resultados sobre la respuesta del explante, "brote apical" a la inducción de raíces, utilizando una concentración de sales MS al 75%. Se visualiza que para la variable "promedio de longitud de raíces", el rango varió entre 4 y 19 cms; el promedio del número de raíces por planta fue de 3 y, el promedio de la longitud de raíces fue de 8.24 cms.

CUADRO 12. Respuesta del explante brote apical a la inducción de raíces.

CONCENTRACIÓN DE SALES MS AL 75%

Planta	Promedio de longitud de raíces	# Raíces
1	4.29	7
2	9.00	1
3	6.33	3
4	4.25	2
5	12.00	3
6	19.00	2
7	12.60	5
8	7.50	2
9	4.00	3
10	9.33	3
11	12.00	1
12	2.83	3
13	10.33	3
14	14.00	3
15	9.33	3
16	5.00	2
17	9.00	3
18	7.17	6
19	6.67	3
20	3.50	3
21	4.60	5
22	8.75	4
23	4.33	3
24	11.00	2
25	14.00	1
26	7.00	3
27	4.00	5
28	8.00	3
29	9.00	2

MS= medio nutritivo de Murashige y Skoog.

El cuadro 13, nos muestra que cuando se utilizó el MS al 50% se obtuvieron raíces más pequeñas, ya que la longitud promedio fue de sólo 6.32 cms. y muchas plantas sólo presentaron 1 ó 2 raíces.

CUADRO 13. Respuesta del explante brote apical a la inducción de raíces.

CONCENTRACIÓN DE SALES MS AL 50%.

Plantas	Promedio de longitud de raíces	N.º raíces por planta
1	10.50	2
2	3.75	4
3	2.75	4
4	14.00	1
5	2.67	3
6	6.33	3
7	2.33	3
8	7.00	1
9	11	3
10	7.00	1
11	3.00	3
12	7.00	1
13	9.25	4
14	7.67	3
15	7.75	4
16	3.00	1
17	2.5	2

MS= medio nutritivo de Murashige y Skoog.

Esta variabilidad entre el número de plantas no enraizadas, promedio de longitud de raíces, número total de raíces se debe a que se forzaron las plántulas en el medio para producir sus propias hormonas naturales que son las auxinas y citocininas; pero nos damos cuenta que entre más se reduce el medio más plantas no enraizaron; también podemos mencionar que las raíces se observaron débiles y frágiles en su aspecto físico.

7.3 ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS

Extracción de las plántulas de los frascos de cultivo: Se procedió a la extracción de las plántulas de los frascos de cultivo los cuales se encontraban en incubación; dicha actividad se realizó con los cuidados necesarios para no dañar las raíces de las plántulas.

Lavado de las plántulas: Para el lavado de las raíces se utilizó agua tibia para eliminar los residuos de agar; esto con la finalidad de evitar la proliferación de microorganismos patógenos que crecerían con los residuos de agar en el sustrato.

Preparación del sustrato: Introduciendo el sustrato "peat moss" en bolsas plásticas y envolviéndolas con papel periódico para evitar el rompimiento al momento de transportarlas, el mismo se esterilizó en el autoclave a 15 lbs de presión, a 21°C durante 20 minutos.

Llenado de recipientes de duroport: El sustrato "peat moss", previamente esterilizado, se colocó en recipientes de duroport de 10 onzas de capacidad.

Siembra de las plántulas: Para esta actividad se introdujeron las plántulas en los recipientes que contenía el sustrato esterilizado, para que las mismas comenzaran a crecer y desarrollarse fuera del los frascos de cultivo y de la incubación.

Protección de las plántulas con plástico. Las plántulas se colocaron en una mesa cubierta de los lados y parte de encima con nylon negro. 5 días después la cubierta plástica se bajo hasta la mitad de la altura, para luego eliminar el nylon 3 días después, dejando de tal manera descubierta las plántulas. El comportamiento de las plántulas fue de un 80% de adaptación en el sustrato peat moss dando un color en las hojas totalmente verdes y con un desarrollo adecuado.

8. CONCLUSIONES

1. Es posible obtener respuesta a la inducción de callo y regeneración de brotes múltiples en el cultivo *in vitro*, utilizando explantes de hoja con pecíolo de zarzaparrilla (*Smilax spinosa*) y aplicando diferentes concentraciones de auxinas y citocininas.
2. En cuanto a la formación de callo, tomando como tejido inicial el "brote apical", sobresalieron los tratamientos con las siguientes combinaciones hormonales: 3.0+0.1, 5.0+0.1 mg/lt ANA+BAP obteniéndose los resultados de 31.25% y 25% de callo respectivamente.
3. Por otra parte, tomando como tejido inicial "hoja con pecíolo", en las combinaciones hormonales de 1.0+0.5 y 1.0+5.0 mg/lt ANA+BAP se obtuvo 56.25% y 50.00%, de callo respectivamente.
4. En cuanto a la obtención de plantas a partir de callos del explante "brote apical" con la combinación hormonal de 3.0+0.1 mg/lt ANA+BAP, se lograron las plantas más grandes y con un número significativo de hojas, siendo estos: 42.25 mm de largo y 7.44 hojas por planta en promedio.
5. En combinación hormonal de 1.0+1.0 mg/lt ANA+BAP, a partir del explante "brote apical" se obtuvieron plantas con el mayor número de hojas, con 9.12 en promedio.
6. El testigo no formó callos pero sí generó brotes; sin embargo éstos fueron menos vigorosos que el resto de tratamientos.
7. Los brotes vegetativos obtenidos a partir de callos del explante "hojas con pecíolo" fueron más escasos, más pequeños y más débiles que los brotes vegetativos obtenidos de callos del explante "brote apical".
8. Con respecto al enraizamiento de los brotes adventicios obtenidos, estos fueron inoculados con medios nutritivos conteniendo 100%, 75% y 50% de sales MS. Se observó que a medida que se redujo la concentración de sales, así también se redujo la longitud de raíces y el número de plantas sin enraizar. Siendo por lo tanto el mejor tratamiento el que contenía 100% de sales de MS.

9. RECOMENDACIONES.

1. Se recomienda utilizar concentraciones de 1.0+0.5 mg/lt, de ANA+BAP en explantes de hojas con pecíolo, para la inducción de callo en la especie de zarzaparrilla *Smilax espinosa Mill.*
2. Para lograr éxito en la formación de brotes en cultivo *in vitro*, a partir de explantes de hoja con pecíolo de zarzaparrilla, se sugiere agregar concentraciones de 1.0+5.0 mg/lt, ANA+BAP, al medio de cultivo MS.

10. BIBLIOGRAFÍA


1. BARILLAS ARAGÓN, C. L. 1995. Determinación de la concentración y rendimiento de 7-metoxicumarina y aceite esencial en cinco estados de desarrollo del pericón *Tagetes lucida* Cav.) en la Alameda Chimaltenango. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 81 p.
2. BEAL, J. L.; REINHARD, E. 1980. Natural products as medicinal agents. Strasbourg, Hippokrates Verlag Stuttgart. p. 486-489.
3. CÁCERES, A.; SAMAYOA, B.; FLETES, L. 1990. Actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de infecciones. Guatemala, Editorial Universitaria. Cuadernos de Investigación No. 4-90 100 p.
4. CACERES, A. et al. 1993. Actividad antifungica de plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala, Editorial Universitaria. Cuaderno de Investigación. No. 7-92. 89 p.
5. CÁCERES, A. 1996. Plantas de uso medicinal de Guatemala. Guatemala, Editorial Universitaria. Colección Monográficas No. 1. p. 373-377
6. CARBAJAL, A. 1991. Plantas que curan y matan. México, D. F., México, Mexicanos Unidos. 288 p.
7. DOMÍNGUEZ, X. A. 1973. Métodos de investigación fotoquímica. México, D. F., Méx., Limusa. 200 p.
8. EVANS, T. 1991. Farmacognosia. 3 ed. México D.F., Méx., Interamericana. 600 p.
9. FERNÁNDEZ, H. R. 1982. Etnobotánica de los recursos fitogenéticos de uso medicinal presentes en 8 municipios del área de influencia étnica Man del departamento de Huehuetenango, Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 138 p.
10. GUATEMALA. INSTITUTO GEOGRÁFICO MILITAR. 1976. Diccionario geográfico de Guatemala. Trad. Por Francis Gall. Guatemala. v. I, p. 833
11. GRANDA, M. M. 1985. Reporte sobre inducción de plantas medicinales exóticas. Plantas Medicinales (Cuba) 6:79-85.

12. HERRERA, M.; Perla Gonzáles, H.; Moreno Arreaga, P.A. 1993. Informe de actividades febrero de 1992 – diciembre de 1993. Proyecto: desarrollo agrotecnológico de cinco especies medicinales, silvestres, con potencial de exportación; smilax spp, Petiveria alliaceae L., Neurolena lobata L. Br., Tagetes lucida Cav. Guatemala, GEXPRONT/FAUSAC/USAID. 30 p.
13. HERRERA SOSA, M. et al. 1993. Proyecto de plantas medicinales. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 55 p.
14. HURTADO, M. D.; MERINO, M. E. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. México, D. F., Méx., Trillas. 232 p.
15. LITZ, R. E.; JARRET, R. L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos; embriogénesis somática y organogénesis. In: Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Ed. William Roca; Luis Mroginski, Colombia, CIAT. p. 143-172.
16. MARTINEZ, M. 1969. Las plantas medicinales de México. 5 ed. México, D. F., Méx., Botas. p. 355-356.
17. MEDINILLA, B. 1993. Manual de laboratorio de fotoquímica. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 70 p.
18. MENDEZ, J. A.; DE JIMENEZ BATRES, B. 1992. Listado Itzamna; recopilación sobre investigación científica y validación farmacológica en plantas medicinales de Guatemala. Guatemala, Centro de Información de Medicamentos. 170 p.
19. MORTON, J. F. 1981. Atlas of medicinal plants of middle America, Bahamas to Yucatán. EE.UU., Ed. Charles C. Thomas Publisher. p. 82.86.
20. MROGINSKI, L. A.; ROCA W. M. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. In: Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Ed. William Roca; Luis Mroginski. Colombia, CIAT. p. 19-40.
21. MUÑOZ, L. B. 1987. Plantas aromáticas y medicinales; estudio, cultivo y procesado. Madrid, Mundi-Prensa. 365 p.
22. PAHLOW, M. 1985. El gran libro de las plantas medicinales; la salud mediante las fuerzas curativas de la naturaleza. León, España, Everest. 465 p.

23. PALOMO ROBLES, P. E. 1993. Informe final de EPS en el Centro de Información de Medicamentos (CEGIMED). Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 35 p.
24. RAMAZZINI SANTOS, H. R. 1992. Respuesta del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) cv. Parramos a la inducción de callo y al cultivo de células en suspensión. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 67 p.
25. SILVA, M. et al. 1992. Química de los triterpenos. Washington, D. C., EE.UU., Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. 509 p.
26. STANDLEY, P. R.; STEYEMARCK, J. A. 1952. Flora of Guatemala. Chicago, Estados Unidos, Chicago Natural History Museum. Fieldiana: Botany. v. 24, pte 3, p. 92-98
27. TEMAJ SAMAYOA, S. P. 1995. Cuantificación de saponinas esteroidales en hojas y rizomas de *Smilax lundellii* Killip & Morton (zarzaparrilla). Tesis Lic. Quím. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 55 p.
- Citado por: GRANDA, M. M. 1985. Reporte sobre inducción de plantas medicinales exóticas. Plantas Medicinales (Cuba) 6:79-85.
28. VILLACINDA MALDONADO, R. W. 1990. Respuesta de la especie tres puntas (*Neurolona lobata* L.) a la propagación *in vitro*. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 93 p.
29. VILLALOBOS, W. M.; THORPE, T. A. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *In*: Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Ed. William Roca, Luis Mroginski. Colombia, CIAT. p. 127-141.
30. WEABER, R. J. 1987. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. México, D. F., Méx., Trillas. 622 p.

Vo. Bo.

Patualla



11. APÉNDICE

Clave 1A. Clave botánica para el género Smilax reportada por la flora de Guatemala. (26)

1. Plantas más o menos pubescentes, algunas veces glabras cuando maduras pero con al menos unos pocos bellos persistentes en los pecíolos, pedúnculos o pedicelos; siempre desprovistas de espinas.
 2. Ramas obtusamente cuadrangulares, glabras cuando maduras; 6 estaminodios en las flores pistiladas.....S. pubescens
 - 2'. Ramas cilíndricas, excepto las más bajas, usualmente abundantemente pilosas también cuando maduras.
 3. Tallos densamente lanoso-tomentoso; hojas densamente tomentosas abajo, triple nervada.....S. velutina.
 - 3'. Tallos pilosos o subtomentosos, los bellos toscos o al menos parte de ellos esparcidos; hojas belludas con pelos largos o cortos, 7 nervaduras, los nervios todos enraizados desde la base de las hojas. S. mollis.
- 1'. Plantas glabras en todas partes, a menudo provistas con espinas.
 4. Flores estaminadas de 2.8 mm de largo o menos.
 5. Hojas con venas conspicuamente reticuladas, membranosas o cactáceas o sí coriáceas, pequeña, a menudo espinosa en las nervaduras de abajo; ramas anguladas y a menudo flexuosas.....S. spinosa.
 - 5'. Hojas con venas oscuras, coriáceas, largas, sin espinas; ramillas cilíndricas, erguidas.
 6. Bayas globosas. S. lundelii.
 - 6'. Bayas elongadas, acutadas al final de cada una. S. munda.
 - 4'. Flores estaminadas de 4 mm de longitud o más grandes.
 7. Pedúnculos de los pistilos umbelados más cortos que los pecíolos subtendidos, subcilíndricos. S. lancoolata.
 - 7'. Pedúnculos de los pistilos umbelados más largos que los pecíolos, casi siempre conspicuamente comprimidos.
 8. Anteras más cortas que los filamentos; hojas sin espinas. pecíolos articulados a por debajo de la mitad.
 9. Ramillas cilíndricas o irregularmente subanguladas. Hojas desecativas negruzcas... S. jalapensis.
 - 9'. Ramillas cuadrangulares.
 10. Hojas desecativas negruzcas, 7 nervaduras, las más grandes a menudo subcordadas en la base. S. jalapensis var. Botterii.
 - 10'. Hojas desecativas verde pálidas, 5 nervaduras, nunca subcordadas en la base. S. standleyi.
 - 8'. Anteras más grandes que los filamentos.
 11. Tallos cilíndricos; pecíolo reticulado por debajo de la mitad de la porción libre, hojas acutadas a la base; sin espinas. S. panamensis.

- 11'. Tallos agudos u obtusamente cuadrangulares, al menos los de abajo; pecíolo articulado sobre la mitad de la porción libre; hojas más bajas cordadas o de punta aguda a la base, a menudo aculeada.
12. Bayas rojas; tallos obtusamente cuadrangulares, subcilíndricos encima. *S. aristolochiaefolia*.
- 12'. Bayas negras; tallos agudamente cuadrangulares en todas partes. *S. regelii*.

Cuadro 14 A. Funciones de las sustancias activas presentes en las plantas medicinales.

Sustancia activa	Función
Alcaloides	Son sustancias muy activas, en cierta medida venenos medicinales. Todas las plantas que los tienen como principal componente no son tanto indicadas para terapia en forma de té. Alcaloides son por ejemplo: La Atropina, la Morfina y la Colchicina.
Principios amargos	A estos productos se les llama en fitoterapia Amara y se les ha dividido en: 1) productos amargos puros o Amara tónica; 2) Además de los productos amargos tienen aceites esenciales en cantidades considerables, se les llama Amara aromático; 3) Además de los principios amargos tienen sustancias picantes, se llaman Amara acria. Estimulan intensamente la secreción de jugos gástricos y desarrollan una acción tónica general.
Aceite esencial	Son sustancias vegetales que debido a su consistencia son muy volátiles, aunque en el agua difícilmente se disuelven o resultan incluso insolubles. Las familias vegetales que contienen hasta un 10% de aceite esencial son las labiadas y las umbelíferas. Son sustancias antiinflamatorias en las irritaciones cutáneas más o menos intensas, expectorantes, diuréticas, antiespasmódicas y tonificantes sobre el estómago, el intestino, la bilis y el hígado.
Flavonoides	Son sustancias que a pesar de ser diferentes tienen la misma composición química base. Tres acciones las caracterizan: 1) Acción sobre la rotura anormal de los capilares; 2) Acción en determinados trastornos cardiacos y circulatorios; 3) Acción antiespasmódica en el tracto digestivo.
Taninos	Son sustancias vegetales que están en condiciones de ligar las proteínas de la piel y de la mucosa y transformarlas en sustancias insolubles resistentes. Se utilizan como gargarismos para las anginas, para enjuagar las ansias inflamadas, en forma de apósito para el tratamiento de las heridas; pero sobre todo antidiarreico.
Glucósidos	Todos los glucósidos tienen en común que por hidrólisis (desdoblamiento con absorción de agua) se desintegran en un azúcar y un no-azúcar, el llamado Alucón. Este es el que determina en gran medida las características de la planta. Son sustancias cardioactivas, mucolíticas y sudoríficas.
Ácido salicílico	Las plantas de la familia Equisetáceas, de las Borragináceas y de las gramíneas absorben gran cantidad de ácido silícico del suelo y lo almacenan en su membrana celular o en el protoplasma. Las plantas medicinales que contienen este componente contribuyen a mejorar el tejido conjuntivo, la piel, el pelo y las uñas.
Saponinas	Son glucósidos vegetales que junto con el agua dan una espuma permanente, que emulsiona el aceite en el agua y que poseen un efecto hemolítico, es decir, que extrae de los glóbulos rojos el colorante del mismo color. Las plantas con saponinas se utilizan para las toses crónicas, para la depuración de la sangre. Son eficaces contra las impurezas cutáneas y dolencias reumáticas, son antiinflamatorias y curan los edemas.
Mucilagos	Son sustancias que contienen hidratos de carbono, que se hinchan fuertemente con el agua y proporcionan un líquido viscoso. Los mucilagos vegetales se distribuyen en forma de una capa delgada sobre las mucosas y las protege contra las sustancias irritantes locales y actúa como atenuante de la excitación. Las plantas que lo contienen actúan sobre la tos, como purgantes ligeros y atenúan de modo general los sabores agrios.
Vitaminas, minerales y elementos vestigiales	Son las sustancias nutritivas que se encuentran en las frutas, las verduras y los cereales, las cuales son necesarias para mantener un equilibrio mineral dentro del cuerpo.

Fuente: (22).

Cuadro 15 A. Composición del medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS) utilizando en fases de multiplicación (100%) y enraizamiento (75% y 50% de los componentes).

Componentes	Porcentaje de los componentes (mg/l)		
	100%	75%	50%
NO ₄ NO ₃	1,650.000	1,237.500	825.000
KNO ₃	1,900.000	1,425.000	950.000
KH ₂ PO ₄	170.000	127.500	85.000
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370.000	277.500	185.000
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440.000	330.000	220.000
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.800	20.850	13.900
Na ₂ EDTA	37.300	27.975	18.650
H ₃ BO ₃	6.200	4.650	3.100
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.300	16.725	11.150
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	10.600	7.950	5.300
KI	0.830	0.623	0.415
NaMoO ₄ . 2H ₂ O	0.250	0.188	0.125
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0.025	0.019	0.013
COCL. 6 H ₂ O	0.025	0.019	0.013
VITAMINA-HCL	0.100	0.075	0.050
ACIDO NICOTÍNICO	0.500	0.375	0.250
MYO-INOSITOL	100.000	75.00	50.000
GLICINA	2.000	1.500	1.000

Fuente: (14).



FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGRONOMICAS

LA TESIS TITULADA: "RESPUESTA DE LA PLANTA DE ZARZAPARRILLA (Smilax spinosa Mill)
A LA PROPAGACION in vitro".

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: FRANCISCO COSME QUECHE

CARNET No: 55558

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Boris Augusto Méndez Paíz
Dr. Carlos Alfonso Orozco Castillo
Ing. Agr. Pedro Peláez Reyes

Los Asesores y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha
cumplido con las Normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía
de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

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

Inga. Agr. Myrna Ethel Herrera Sosa
A S E S O R



Dr. Ariel Abderramán Ortiz López
DIRECCIÓN DIRECTOR DEL IIA.

I M P R I M A S E

Ing. Agr. M.Sc. Edgar Oswaldo Franco Herrera
D E C A N O



cc: Control Académico
IIA.
Archivo
AO/pr

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