

## Estudio de las características morfoanatómicas y cultivo de suspensiones celulares embriogénicas de *Pilocarpus goudotianus* Tul. (Rutaceae)

LUIS HERMOSO GALLARDO<sup>1,2</sup>, MARCIA ESCALA JIMÉNEZ<sup>1</sup> Y ANDREA MENÉNDEZ-YUFFÁ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Morfología y Anatomía Vegetal, <sup>2</sup>Laboratorio de Clonación y Genética Vegetal; Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Instituto de Biología Experimental, Centro de Botánica Tropical, Apartado 47114, Caracas 1041, Venezuela.

luisherroso59@hotmail.com amenendez@cantv.net

**Abstract.** The genus *Pilocarpus* has the alkaloid pilocarpine which has medicinal applications, such as the treatment of glaucoma. A research project was outlined to study the morphology, anatomy and *in vitro* propagation of *Pilocarpus goudotianus* Tul.

**Key words:** Anatomy, Cell suspension, *Pilocarpus*, Somatic embryogenesis

**Resumen.** El género *Pilocarpus* contiene el alcaloide pilocarpina, el cual tiene aplicaciones medicinales, como el tratamiento del glaucoma. Se diseñó un proyecto de investigación para estudiar la morfología, anatomía y propagación *in vitro* de *Pilocarpus goudotianus* Tul.

**Palabras clave:** Anatomía, Embriogénesis somática, *Pilocarpus*, Suspensión celular

### INTRODUCCIÓN

*Pilocarpus goudotianus* es un arbusto que crece en Colombia y Venezuela (MACIAS *et al.* 1993). Las hojas de *Pilocarpus* sp. contienen el alcaloide pilocarpina, ampliamente utilizado en el tratamiento del glaucoma (PINHEIRO 1997).

En Venezuela se encuentra distribuida en los estados Falcón y Lara y tiene varios usos tradicionales; por ejemplo, en el Estado Lara se utiliza para la cura de la sarna, por lo cual se le ha asignado el nombre común de Mata Sarna, y en el Estado Falcón se le conoce como Borrachero, debido a que los animales se marean cuando la comen (KAASTRA 1982). En el país se han realizado estudios del género *Pilocarpus* en el área de propagación vegetativa (HERMOSO 1992) y anatomía del tallo (HERMOSO & ESCALA 1999). Así como también se han desarrollado estudios de extracción del alcaloide en especies venezolanas (RODRÍGUEZ 1991).

Tomando en cuenta lo antes expuesto y considerando la importancia de *Pilocarpus goudotianus* Tul., como una planta autóctona con propiedades medicinales y que tiene el potencial para ser explotada comercialmente, nos hemos planteado

como objetivos la caracterización morfoanatómica de la misma y el establecimiento de condiciones para su propagación *in vitro*; este último aspecto puede ser de gran utilidad para la obtención de plantas de uso comercial y también para la conservación de la especie.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### *Caracterización morfoanatómica*

Se recolectaron plantas silvestres de *Pilocarpus goudotianus* Tul. en el caserío el Jobo, carretera Humocaró Bajo, Estado Lara, a 674 msnm con una temperatura promedio anual de 27,5 °C. El material fresco fue fijado en FAA, por lo menos durante una semana. A continuación las muestras se deshidrataron en una serie de concentración ascendente de alcohol butílico y se incluyeron en paraplast. Se hicieron secciones de 20-25 µm de espesor en un micrótopo de rotación y se realizó una coloración diferencial utilizando Fast Green y Orange G (JOHANSEN 1940). Los cortes coloreados fueron colocados en portaobjetos, utilizando Entellan como medio de montaje para

obtener láminas permanentes, las cuales fueron observadas posteriormente en el microscopio óptico.

### Suspensiones celulares

El procedimiento para establecer las suspensiones celulares embriogénicas de *Pilocarpus*, consistió básicamente de las siguientes etapas.

**Etapas I. Establecimiento in vitro de los tejidos foliares e inducción de callo.** Se utilizaron plantas adultas de *Pilocarpus* mantenidas en el vivero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Hojas jóvenes fueron sometidas a un proceso de desinfección, el cual consistió de un lavado con agua corriente y jabón azul, seguida de una incubación durante 15 minutos en un solución de Betadine (Iodo-Povidona) al 10%, dos lavados con agua destilada y 15 minutos de agitación en cloro comercial (hipoclorito de sodio al 5,25%) al 50%. Finalmente, las hojas fueron lavadas dos veces con agua destilada estéril para remover el cloro. Una vez desinfectadas, se tomaron secciones de hoja de 1 cm<sup>2</sup> incluyendo la nervadura central las cuales fueron sembrados con el haz sobre el medio de cultivo P1, P2 o P3 (Tabla 1). Los explantes fueron cultivados en dichos medios durante 12 semanas (Etapa 1, inducción de callo), a temperatura ambiente y en oscuridad. Mediante este tratamiento se obtuvo un tejido de callo que fue utilizado para iniciar las suspensiones celulares.

Básicamente, los medios de cultivo utilizados

estaban constituidos por las sales de MURASHIGE & SKOOG (1962), complementado con 100 mg/l de mio-inositol, 10 mg/l de tiamina, 35 mg/l de cisteína, 30 g/l de sacarosa, solidificado con 8 g/l de agar; el pH de los medios se ajustó a 5,8 y fueron esterilizados en autoclave a 120 °C durante 15 minutos. La composición hormonal y otras variaciones en la constitución de los medios utilizados para los distintos tratamientos y etapas se indican en la Tabla 1.

**Etapas II. Disgregación de los callos.** Para iniciar las suspensiones celulares se seleccionaron callos embriogénicos, caracterizados por presentar un color marrón claro y tener consistencia no friable. Un gramo de dichos tejidos fue inoculado en 50 ml de los medios líquidos PD1 o PD2 (Tabla 1), donde se incubaron durante 12 días, en oscuridad a temperatura ambiente, bajo agitación orbital de 110 rpm.

**Etapas III. Multiplicación celular y diferenciación de embriones.** El cultivo obtenido en la Etapa II se filtró a través de una malla de 60 mesh, conservándose sólo las células y agregados que pasaron por el tamiz, los cuales fueron mantenidos en el mismo medio de cultivo en oscuridad, a temperatura ambiente y con agitación de 110 rpm, renovando el medio cada 10 días. Se realizaron observaciones de la morfología de las suspensiones y sus células y se cuantificó la producción de embriones somáticos para cada tratamiento; para ello, todos los embriones somáticos producidos en cada tratamiento fueron contados visualmente.

**Etapas IV. Germinación de embriones somáticos**

Tabla 1 - Composición de los Medios de Cultivo.

Constituyentes del medio	Medio de cultivo <sup>1</sup>					
	P1	P2	P3	PD1	PD2	PG
Sales <sup>2</sup>	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Hormonas (mg/l) <sup>2</sup>	2 BAP 0,2 ANA	8 BAP 1 2,4-D	2 KIN 0,5 2,4-D	5 BAP	0,8 ANA	
Agente solidificante (g/l)	8 agar	8 agar	8 agar			8 agar

<sup>1</sup>Todos los medios contienen 100 mg/l mio-inositol, 10 mg/l tiamina, 35 mg/l cisteína y 30 g/l sacarosa y su pH fue ajustado a 5,8. Excepto el medio PG que contiene 10 g/l sacarosa.

<sup>2</sup>MS: Sales de MURASHIGE & SKOOG (1962); ANA: ácido naftalenoacético; KIN: cinetina; BAP: 6-benciladenina; 2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

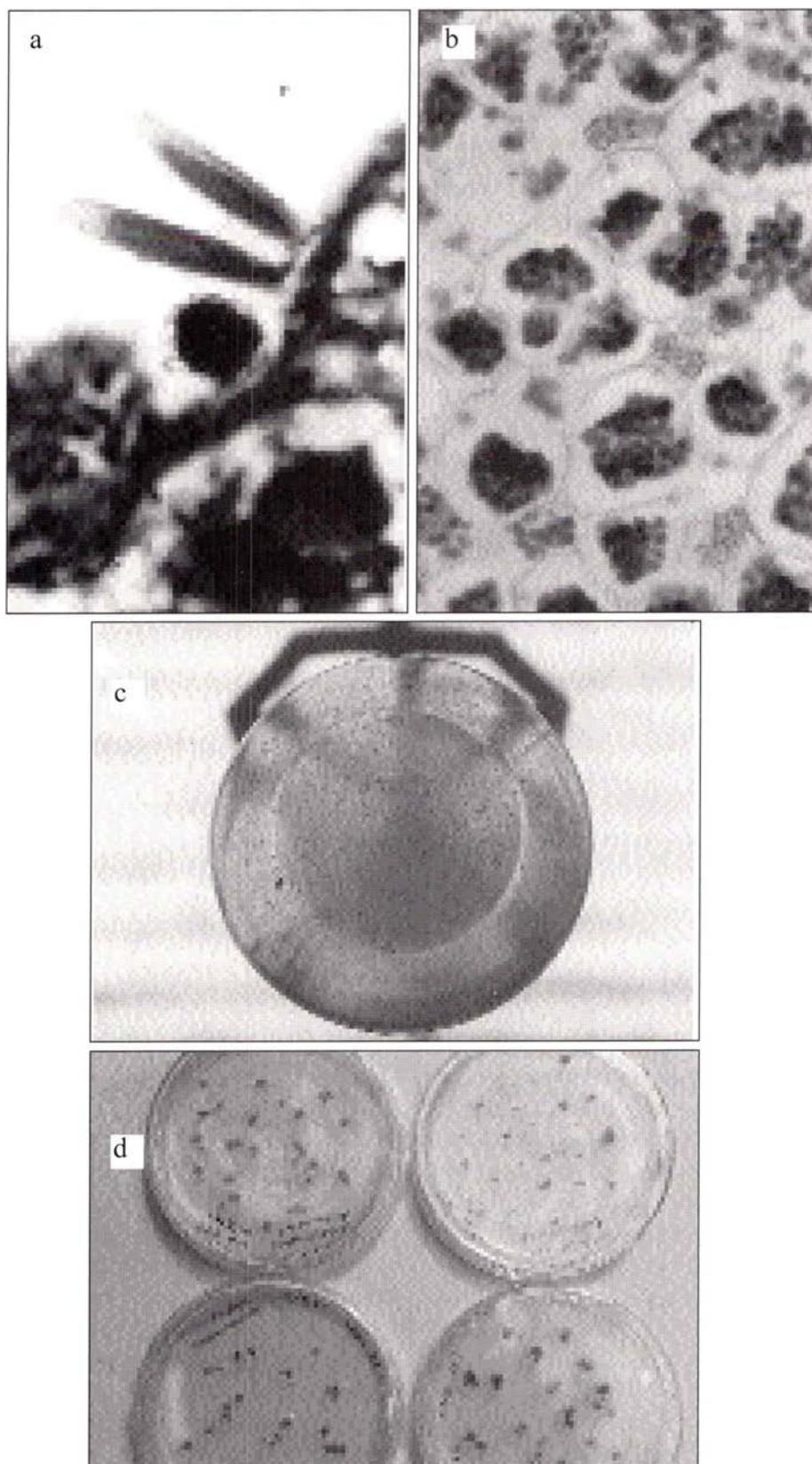


Fig. - 1 a) Exocarpo con pelos y glándulas secretoras; b) Endosperma mostrando cloroplastos y cristales tipo drusa; c) Suspensión celular después de tamizar; d) Embriões somáticos sembrados en medio sólido para inducir su germinación.

cos. Los embriones somáticos en estado globular fueron transferidos a condiciones de germinación, que consistieron en colocarlos en medio PG, bajo luz continua (5000 lux) a temperatura promedio de 27 °C.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Morfoanatomía del fruto*

Los frutos usualmente están formados por 5 lóculos de los cuales se desarrollan 1 o 2 donde cada lóculo se encuentra separado, formando mericarpios. Son de color marrón oscuro y presentan una nerviación muy prominente; estos nervios se disponen en subparalelo por toda la superficie del fruto; también se puede observar restos del cáliz. Anatómicamente este exocarpo está formado por una epidermis uniestratificada, de células alargadas, presenta cutícula, gran cantidad de pelos y glándulas secretoras (Fig. 1a), presenta un parénquima donde se encuentran canales secretores, lo cual es un carácter diagnóstico para este género, haces vasculares y una gran cantidad de cristales de oxalato de calcio, tipo drusa. El endocarpo está formado por células engrosadas, cuyas paredes más delgadas están hacia la línea de dehiscencia.

### *Morfoanatomía de la semilla*

La semilla es de color negro, observándose un hilo bien desarrollado y un rafe que abarca más de la mitad de la semilla. La cubierta seminal presenta una cutícula gruesa, epidermis uniestratificada, parénquima de células alargadas, seguida de una capa de células de paredes con engrosamientos espiralados, con una envoltura transparente que cubre el embrión (restos de nucela). El

embrión presenta cotiledones asimétricos, donde se observan canales secretores, células con alto contenido de aleurona, grasas, cloroplastos y cristales de oxalato de calcio, tipo drusa, los cuales constituyen caracteres diagnósticos de este género (Fig. 1b).

Desde el punto de vista taxonómico merece especial mención la presencia de caracteres anatómicos con valor diagnóstico a nivel de género, los cuales coinciden con los reportados en la literatura para el género *Pilocarpus* (METCALFE & CHALK 1950).

### *Suspensiones celulares*

El establecimiento de las suspensiones celulares requiere la formación previa de callo. En los medios ensayados se observó la formación de callo en el medio P1, que contenía 2 mg/l de BAP y 0,2 mg/l de ANA (HERMOSO & MENÉNDEZ 1998); por el contrario, en los medios P2 y P3 la proliferación de callo fue escasa. Cuando el callo fue colocado en medio líquido bajo agitación orbital, se logró la disgregación de los mismos, dando origen a una suspensión formada por agregados de callo de color beige. Los medios líquidos utilizados en esta etapa del cultivo fueron el PD1 y PD2, obteniéndose una mayor producción de embriones en el medio PD1 (367) que en el medio PD2 (175) (Fig. 1c), los cuales fueron transferidos a medio sólido para su germinación (Fig. 1d).

Al ser observada al microscopio óptico, la suspensión celular presentó una composición heterogénea, formada por células aisladas o agrupadas. Las células no embriogénicas eran relativamente grandes, con paredes celulares delgadas y el citoplasma menos denso. Las células embriogénicas eran más pequeñas, redondeadas y con paredes gruesas y citoplasma denso.

## LITERATURA CITADA

- HERMOSO L. 1992. Propagación vegetativa de *Pilocarpus goudotianus* Tul. (Rutaceae). Tesis de Grado, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UCV, Caracas, p. 83.
- HERMOSO L., M. ESCALA. 1999. Caracterización anatómica del tallo de *Pilocarpus goudotianus* Tul. (Rutaceae). Anales de Botánica Agrícola 6: 47-49.
- HERMOSO L., A. MENÉNDEZ-YUFFÁ. 1998. Estudio preliminar de la micropropagación de *Pilocarpus goudotianus* Tul. (Rutaceae). III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología

- Vegetal, REDBIO 1-5 Junio, La Habana, Cuba (Resumen).
- JOHANSEN D.A. 1940. Plant microtechnique. Mc Graw-Hill Book Company, New York, London, p. 523.
- KAASTRA R.C. 1982. Pilocarpaceae (Rutaceae). En: Flora Neotrópica. Monografía N° 33, p. 181.
- MACIAS F.A, GALINDO J.C.G., MASSANET G.M, RODRÍGUEZ-LUIS F., ZUBÍA E. 1993. Allelochemicals from *Pilocarpus goudotianus* leaves. Journal of Chemical Ecology 19 (7): 1371-1379.
- METCALFE C., L. CHALK. 1950. Anatomy of the Dicotyledons. Vol 1. Oxford at the Clarendon Press. London, p.1459.
- MURASHIGE T., F.A SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- PINHEIRO C.U.B. 1997. Jaborandi (*Pilocarpus* sp., Rutaceae): a wild species and its rapid transformation into a crop. Economic Botany 51 (1): 49-58.
- RODRÍGUEZ M. 1991. Aislamiento y determinación de Pilocarpina en especies de *Pilocarpus* Venezolanas. Trabajo de Grado, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, UCV, Caracas, p. 96.

