

University of Nebraska - Lincoln

DigitalCommons@University of Nebraska - Lincoln

Estudios científicos en el estado de Hidalgo y
zonas aledañas

Parasitology, Harold W. Manter Laboratory of

2013

Micropropagación de *Hedeoma drummondii* Benth

Su Lin Zamora-Hierro

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Ana Laura López-Escamilla

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Follow this and additional works at: <https://digitalcommons.unl.edu/hidalgo>



Part of the [Plant Biology Commons](#)

Zamora-Hierro, Su Lin and López-Escamilla, Ana Laura, "Micropropagación de *Hedeoma drummondii* Benth" (2013). *Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas*. 13.
<https://digitalcommons.unl.edu/hidalgo/13>

This Article is brought to you for free and open access by the Parasitology, Harold W. Manter Laboratory of at DigitalCommons@University of Nebraska - Lincoln. It has been accepted for inclusion in Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas by an authorized administrator of DigitalCommons@University of Nebraska - Lincoln.

Micropropagación de *Hedeoma drummondii* Benth

Su Lin Zamora-Hierro y Ana Laura López-Escamilla

Resumen

La especie *Hedeoma drummondii* Benth (Lamiaceae) es una planta útil de Hidalgo, México, con uso medicinal, comestible y con potencial de insecticida por el contenido de pulegona en sus aceites esenciales extraídos. En parte por su valor, la especie ha sido sobrecolectada en el medio silvestre, por lo que es necesario establecer estrategias como la micropropagación para la conservación de la misma y para la obtención de sus aceites esenciales. Este trabajo es un reporte de los avances en el cultivo de *H. drummondii*. Semillas de *H. drummondii* se desinfectaron superficialmente y se colocaron en cuatro medios de cultivo diferentes: Murashige y Skoog (MS) (1962) al 50 y al 100% de sus componentes y medios de MS al 100%, adicionados con 1 o 2 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃). Las plántulas que se desarrollaron a partir de las semillas sirvieron como fuente de explantes (microesquejes con dos entrenodos), los cuales se transfirieron a cinco tratamientos: medio de MS 100% adicionados con 1 ó 2 mg L⁻¹ de N⁶-benciladenina (BA) y medio de MS 100% adicionados con 1 ó 2 mg L⁻¹ de N⁶-2, isopentenil adenina (2iP) y un control de MS al 100% de sus componentes. Los tratamientos de MS al 100% de sus componentes y MS al 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de ácido giberélico fueron los mejores medios para promover la germinación y los medios óptimos para la producción de brotes fueron MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de BA y MS 100% adicionado con 2iP.

Palabras clave: *Hedeoma drummondii*, micropropagación, microesquejes

Introducción

El estado de Hidalgo cuenta con un gran número de especies de plantas útiles y medicinales, que han sido empleadas durante mucho tiempo como remedios a diferentes padecimientos. Actualmente se ha tratado de investigar a que se debe su propiedad medicinal, por lo que se ha llevado a cabo la identificación de aceites esenciales provenientes de estas plantas. Como en el caso de *Hedeoma drummondii* (Fig. 1), planta útil de Hidalgo (Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 1995).

Esta especie es muy apreciada y se vende en los tianguis y mercados de la región (Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 1995). Se utiliza como aromatizante, es comestible y tiene propiedades medicinales ya que es utilizada para curar problemas digestivos como los cólicos (Pérez-Escandón *et al.*, 2003). Los aceites esenciales extraídos de *H. drummondii* contienen compuestos como la mentona, n-metil-piridona-6-ácido carboxílico y pulegona, este último con po-

tencial como insecticida (Tovar, 2007). Por lo cual, ejemplares de la especie se han sobrecolectado en el medio silvestre, por lo que es importante establecer estrategias de propagación para la conservación de la misma. Su valor para el uso del compuesto de interés como materia prima de un insecticida natural subraya la importancia para el desarrollo de un método de cultivo para la obtención de sus aceites esenciales sin la extinción de la especie.

Existen estrategias convencionales para la propagación por vía modo sexual (semilla) o asexual (esquejes, vástagos e injertos), pero se requiere de mucho tiempo para una limitada producción de plantas. El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una alternativa para la continua y rápida producción de plantas (Malda *et al.*, 1999) y una estrategia biotecnológica que permite el cultivo en condiciones asépticas de órganos, tejidos, células y protoplastos empleando medios nutritivos artificiales (Jiménez, 1998). La técnica de CTV se ha utilizado en algunas plantas aromatizantes y medicinales a



Figura 1. *Hedeoma drummondii* colectada en la localidad de Magdalena, Actopan, Hidalgo. A. Planta silvestre de 29 cm de alto. B. Tallo con hojas opuestas. C. Tallo con hojas opuestas y flores de color morado.

partir de diferentes órganos como hojas, ápices, nudos, entrenudos de tallos y piezas florales (Rout *et al.*, 2000).

El objetivo de este trabajo es establecer un método para la germinación *in vitro* de semillas de *H. drummondii*, promover su germinación así como desarrollar la técnica de micropropagación, para obtener un mayor número de plantas de las cuales se pueda posteriormente obtener el compuesto de interés. Finalmente, la producción *in vitro* de esta especie servirá como una estrategia de producir plantas para su uso directo sin coleccionar ejemplares en la naturaleza, y apoyar su conservación.

Material y Método

Material biológico: Semillas de *H. drummondii* se obtuvieron de frutos provenientes de una planta adulta recolectada en la localidad de Magdalena en Actopan, Hidalgo, México. Las semillas se colocaron en una caja Petri con agua destilada y cinco gotas de hipoclorito de sodio comercial (6% de cloro activo) durante 24 horas.

Escarificación y desinfección de semillas: Se escarificaron 1000 semillas con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) durante 15 segundos, posteriormente se en-

juagaron con agua destilada y se colocaron en sobres de papel filtro asegurados con grapas. Se transfirieron los sobres a 50 ml de hipoclorito de sodio comercial (6% de cloro activo) al 30% durante 20 minutos. Por último, en una campana de flujo laminar, se realizaron tres enjuagues de un minuto, cada uno en agua destilada esterilizada.

Siembra y establecimiento in vitro de semillas: Se establecieron las semillas escarificadas y desinfectadas *in vitro* en cuatro medios de cultivo diferentes: medios de Murashige y Skoog (MS) (1962) al 50 y al 100% de sus componentes y medios MS al 100%, adicionados con 1 ó 2 mg L⁻¹ de ácido giberélico (AG₃). Se sembraron cinco lotes de 50 semillas cada uno, con una diferencia de cuatro días entre cada lote.

Obtención y siembra de explantes con fitorreguladores: A partir de las plántulas germinadas *in vitro*, se obtuvieron microesquejes con dos entrenudos que se establecieron en cinco medios de cultivo: MS 100% adicionado con 1 mg L⁻¹ de N⁶-benciladenina (BA); MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de BA; MS 100% adicionado con 1 mg L⁻¹ de N⁶-2, isopentenil adenina (2iP); MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de 2iP; y MS 100% como control. Al concluir un mes se transfirieron todos a medio MS 100%, donde permanecieron 45 días para promover el desarrollo y crecimiento de brotes. Se cuantificaron el número de brotes por explante, y se observaron las respuestas morfológicas y fisiológicas obtenidas.

Condiciones in vitro: Todos los cultivos se colocaron en un cuarto de incubación con un fotoperíodo de 16 h/8 h (horas de luz/oscuridad) con una intensidad luminosa de 54 µmol m⁻² s⁻¹ y una temperatura de 26 ± 1° C.

Análisis de resultados: Los resultados de la germinación fueron analizados con ANOVA de una vía donde el factor fue el medio de cultivo con los cuatro niveles (MS 50%, MS 100%, MS 100% adicionado con 1 mg L⁻¹ de AG₃ y MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de AG₃) y comparación múltiple de medias de Tukey. Los resultados de la cantidad de brotes por tratamiento fueron analizados con ANOVA de una vía para datos desiguales (GLM), donde el factor fue el tratamiento hormonal con cinco niveles (control, 1 y 2 mg L⁻¹ de 2iP y 1 y 2 mg L⁻¹ BA) y comparación múltiple de medias de Tukey.

Se utilizó un microscopio óptico, marca Olympus, modelo BX41, con un aumento de 4x en campo claro y oscuro para observar las semillas y las

plántulas. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital, Olympus, modelo E-620 de 10 megapíxeles.

Resultados y Discusión

Germinación in vitro: En semillas de *H. drummondii* de 1 mm de largo por 0.5 mm de ancho, cultivadas *in vitro* en medio MS 100%, se hidrataron. Se observaron más turgentes, con un incremento de tamaño y cambio de color al quinto día, lo que llevó a la ruptura de la testa y la emergencia de la radícula al sexto día. Este criterio se utilizó como el inicio de la germinación. Al séptimo día se observó el crecimiento de la radícula y al noveno día la diferenciación de la misma; la cofia se formó a los 10 días y a los 11 días se desarrolló el hipocótilo. El alargamiento del hipocótilo se presentó a los 12 días y a los 13 días se desarrollaron los cotiledones. El crecimiento de los mismos se inició a los 14 días (Fig. 2).

En los cuatro medios de cultivo (MS 50%, MS 100%, MS 100% adicionado con 1 mg L⁻¹ de AG₃ y MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de AG₃) utilizados para inducir la germinación en semillas de *H. drummondii* se contaminaron con hongos en un porcentaje de 12.56%, 4.56%, 12.56% y 6.58%, respectivamente. La germinación inició al sexto día en los medios MS 50%, MS 100% y MS 100% adicionado con 1 mg L⁻¹ de AG₃. La germinación en el medio MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de AG₃ comenzó al cuarto día. El mayor número promedio de semillas germinadas se obtuvieron a los 43 días, con un promedio de 7.2 semillas germinadas en el medio MS 100% y de 6.6 en el medio MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de AG₃. En el medio de MS 100% adicionado con 1 mg L⁻¹ de AG₃ y de MS 50% se obtuvieron a los 27 días 5.2 y 1.8 semillas germinadas, respectivamente (Fig. 3).

El número de semillas promedio germinadas fue muy bajo en los cuatro medios de cultivo. A pesar de la poca viabilidad en las semillas, la contaminación también interfirió con la germinación. Sin embargo, con los datos obtenidos se observa que el medio MS 100% tiene un mayor número de semillas promedio germinadas, seguido de MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de AG₃. Los tratamientos MS 50% y MS 100% adicionado con 1 mg L⁻¹ de AG₃ presentaron diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) con respecto a MS 100% y MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de AG₃ (Tabla 1).

Usando el medio MS 50% permitió a Koroch *et al.* (1997) establecer semillas de *Hedeoma multiflorum* y micropropagarlos, pero en el presente trabajo el me-

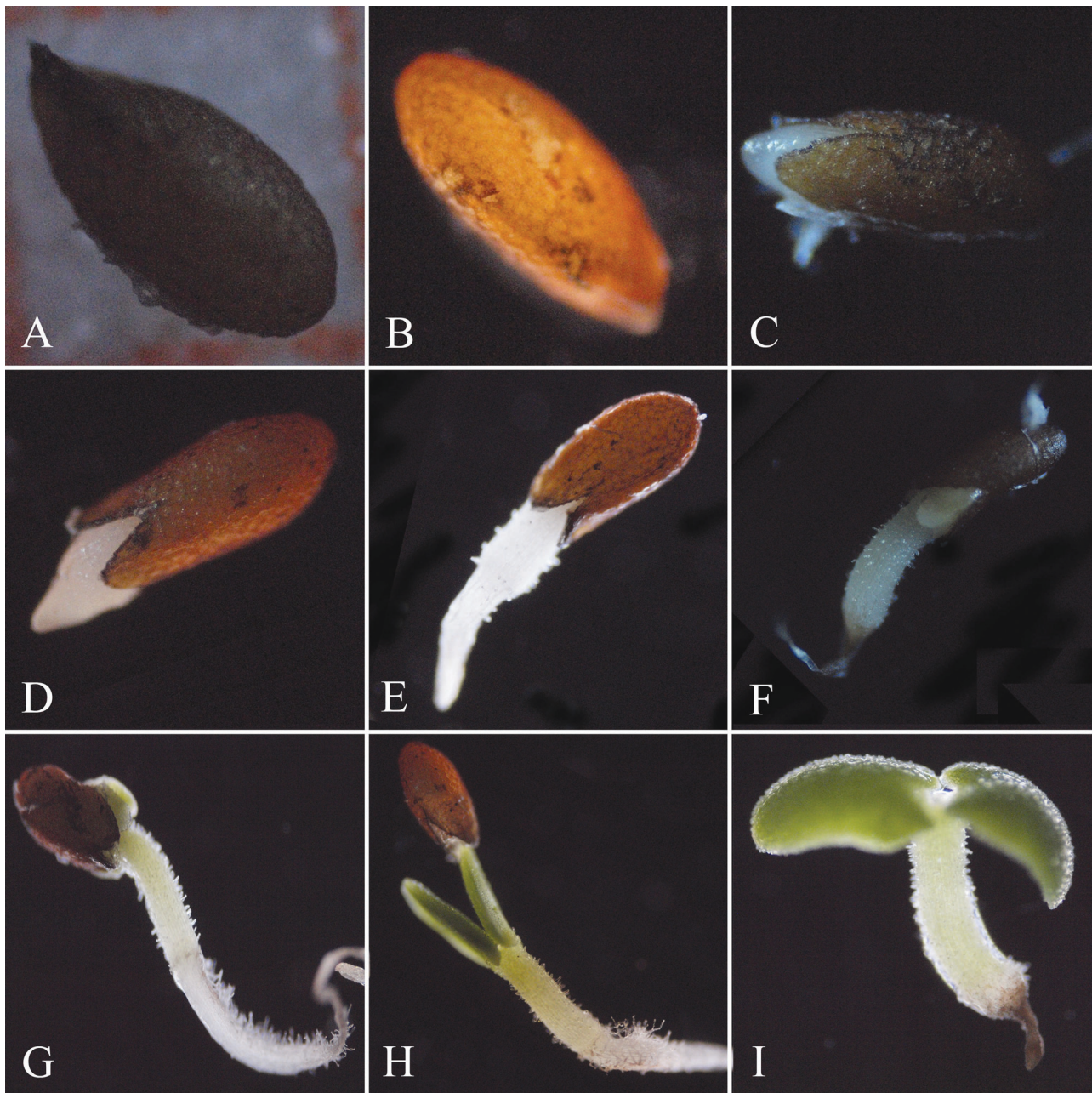


Figura 2. Germinación *in vitro* de semillas de *H. drummondii*. A. Semilla de *H. drummondii* (tamaño 1 x 05 mm) con hoja milimétrica de fondo. B. Imbibición de la semilla. C. Ruptura de la testa. D. Emergencia de la radícula. E. Crecimiento y diferenciación de la radícula. F. Diferenciación de la cofia e hipocótilo y formación de los primeros pelos radiculares. G. Diferenciación de los cotiledones. H. Desarrollo de cotiledones y desprendimiento de la cubierta seminal. I. Crecimiento del raíz, el hipocótilo y los cotiledones.

dio MS 50% tenía el menor número promedio de semillas germinadas. Los mejores tratamientos fueron MS 100% y MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de AG₃; en este último tratamiento el inicio de la germinación fue al cuarto día y en los otros tratamientos fue en el sexto (Tabla 1). Podemos sugerir que esto resultó por la adición del AG₃, ya que esta hor-

mona estimula la producción de enzimas, como la α -amilasa (Davies, 2005), relacionadas con la germinación. Sin embargo las semillas de *H. drummondii* tenían poca viabilidad y un alto porcentaje de contaminación *in vitro*, lo que indica la posibilidad que esta especie de manera natural se reproduzca más por la vía vegetativa.

Tabla 1. Inicio y días máximos de germinación, semillas germinadas y porcentaje de contaminación de semillas de *H. drummondii* establecidas *in vitro* en cuatro diferentes medios de cultivo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$).

Medio de cultivo (mg L ⁻¹)	Inicio de germinación (días)	Máximo de germinación (días)	Semillas germinadas	Contaminación (%)
MS 100%	6°	43	0.14 a	4.56
MS 50%	6°	27	0.04 b	12.56
1 AG ₃	6°	27	0.1 ab	12.56
2 AG ₃	4°	42	0.13 a	6.58

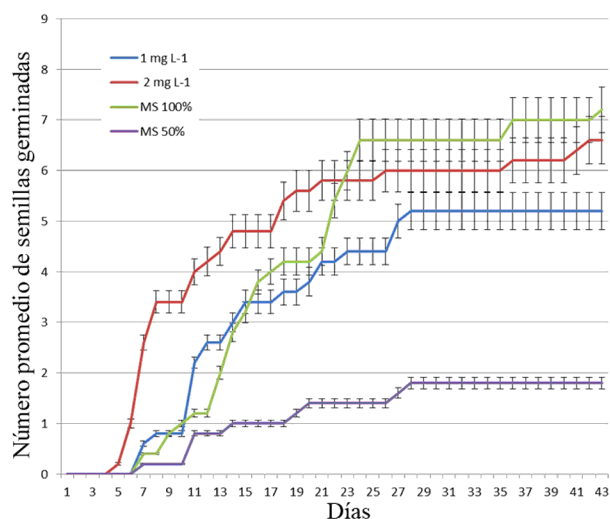


Figura 3. Germinación de semillas *in vitro* de *H. drummondii*. Medios de MS 100%, MS 50%, MS 100% adicionado con 1 y MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de AG₃. Registro hasta los 43 días de haber iniciado el cultivo.

Siembra de explantes con fitorreguladores: En los microesquejes con dos entrenudos sembrados en todos los tratamientos se observó cicatrización en el área donde se realizó el corte y en todos hubo respuestas morfogénicas. El conteo de brotes y la evaluación de las respuestas morfogénicas y fisiológicas de los diferentes tratamientos se realizaron después de 45 días (medio de inducción) con la finalidad de promover el mayor número de brotes y crecimiento de los mismos.

A los 15 días, en el medio de inducción, se observó la activación de las yemas axilares que dieron lugar a nuevas ramas, como también el desarrollo de brotes en cada uno de los tratamientos. Las respuestas morfogénicas obtenidas fueron: callo, raíces adventicias, elongación de microesquejes y formación de brotes, así como la hiprehidratación como respuesta fisiológica (Fig. 4).

En el tratamiento de MS 100% adicionado con 1 mg L⁻¹ de 2iP, sólo el 76.2% de los explantes presentaron brotes, con 1,382 en total por tratamiento. En MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de 2iP, el 83.7% de los explantes desarrollaron brotes con 1,525 explantes en total por tratamiento. En ambos tratamientos se observaron raíces adventicias, el 32.2% en MS 100% adicionado con 1 mg L⁻¹ de 2iP y el 19.4% en MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de 2iP.

En los medios MS 100% adicionado con 1 mg L⁻¹ de BA y MS 100% adicionado 2 mg L⁻¹ de BA el porcentaje de explantes con respuesta por tratamiento fue de 75.6% y 72.6% respectivamente, con 1084 y 1467 brotes por tratamiento respectivamente (Tabla 2). El porcentaje de raíces adventicias fue de 23.9% para MS 100% adicionado con 1 mg L⁻¹ de BA y de 28.9% para MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de BA.

El control (MS 100%) presentó diferencias estadísticamente significativas ($p=0.05$) con respecto a los demás tratamientos. El tratamiento MS 100% adicionado con 1 mg L⁻¹ de BA, mostró diferencias significativas con respecto a medio MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de 2iP y MS 100% adicionado con

Tabla 2. Número de brotes obtenidos a partir de microesquejes con dos entrenudos de *H. drummondii* después de un mes de incubación con dos citocininas en diferentes concentraciones

Citocinina mg L ⁻¹		Explantes con respuesta	%	Brotes por tratamiento	Número de brotes promedio por explante
2iP	1	154/202	76.23	1382	6.84 ab
	2	164/196	83.67	1525	7.78 a
BA	1	152/201	75.62	1084	5.39 b
	2	146/201	72.63	1467	7.30 a
MS 100%		85/201	42.28	352	1.75 c

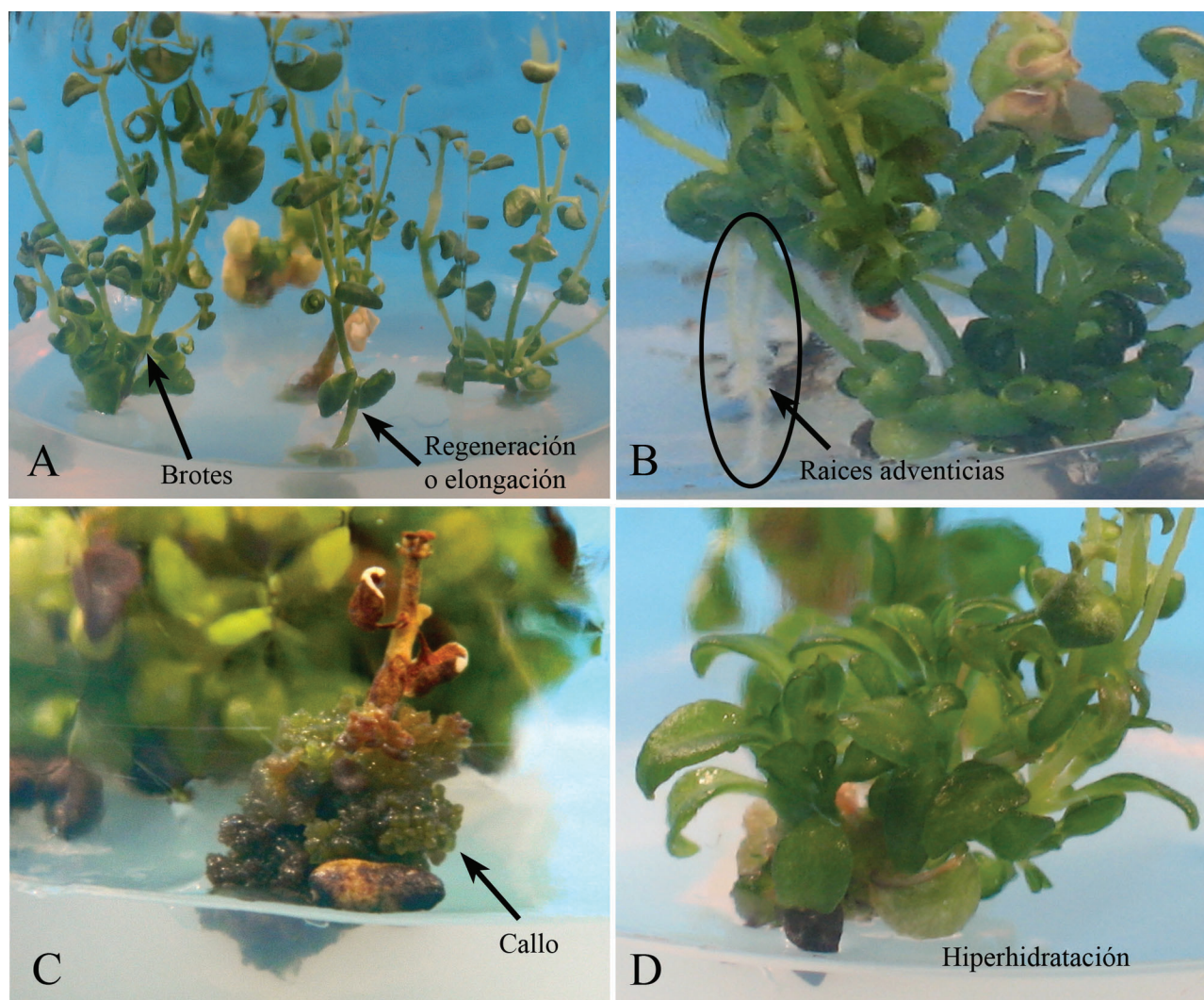


Figura 4. Respuestas morfológicas y respuesta fisiológica observadas en microesquejes de *H. drummondii* presentes *in vitro* en los cuatro diferentes tratamientos y en el control. A. Regeneración o elongación del microesqueje y formación de brotes. B. Raíces adventicias. C. Callo. D. Hiperhidratación.

2 mg L⁻¹ de BA, los cuales desarrollaron un mayor número de brotes en el tiempo de inducción.

Con respecto a las respuestas morfológicas y la respuesta fisiológica, se observó que el tratamiento de medio MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de 2iP generó una mayor cantidad brotes, con menor por-

centaje de raíces adventicias (19.3) e hiperhidratación (30.1%) con respecto a los otros tratamientos de fitorreguladores, sin embargo se distinguió un mayor porcentaje de callo (20.4%) con respecto a los demás (Tabla 3), aunque en otros trabajos con el género *Hedeoma* no reportan estas respuestas.

Tabla 3. Número de brotes obtenidos a partir de microesquejes con dos entrenudos y porcentaje de respuestas morfológica y fisiológica de *H. drummondii*, después de un mes de incubación con dos citocininas en diferentes concentraciones.

	Medio de cultivo (mg L ⁻¹)	Brotos por tratamiento	Elongación (%)	Raíces adventicias (%)	Callo (%)	Hiperhidratación
2iP	1	1382	5.9	32.1	19.3	31.1
	2	1525	3	19.3	20.4	30.1
BA	1	1084	3.4	23.8	18.4	35.3
	2	1467	5.4	28.8	18.9	37.8
MS 100%		352	13.4	36.3	16.9	16.4

Tabla 4. Diversos trabajos de micropropagación realizados en el género *Hedeoma*

Especie	Fitorregulador	Concentración mg L ⁻¹	Material vegetal	Mejor tratamiento	Autor
<i>Hedeoma multiflorum</i>	ANA BA	0.01, 0.09, 0.5, 1, y 2 0.01, 0.09, 1, 5, y 10	Semillas y microesquejes	BA 5 sólo y con ANA 0.01	Koroch et al., 1997
<i>Hedeoma multiflorum</i>	BA	0.01, 0.1, y 0.5	Microesquejes (uninodales)	BA 5	Brunetti et al., 2007
	BA/ANA AG ₃	0.01, 0.1, y 0.5 0.1, 1, 5, y 10		ANA 0.01 AG ₃ 10	
<i>Hedeoma todsenii</i>	BA y ANA	0.01 y 0.5	Microesquejes	BA 0.5	Pence et al., 2009
<i>Hedeoma drummondii</i>	BA y 2iP	1 y 2	Microesquejes	2iP 2	Presente trabajo

ANA = ácido α naftalenacético; BA = N6-benciladenina; AG₃ = ácido giberélico; 2iP = N6-2, isopentenil adenina.

En cuanto a la formación de brotes por la adición de fitorreguladores al medio, hay dos trabajos de *H. multiflorum* donde reportan que los mejores tratamientos fueron el 0.5 mg L⁻¹ y el 5 mg L⁻¹ de BA (Koroch et al., 1997; Brunetti et al., 2007) y en *H. todsenii* también reportaron 0.5 mg L⁻¹ de BA para su micropropagación (Pence et al., 2009). En el presente trabajo se observó que los mejores tratamientos fueron MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de 2iP y MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de BA (Tabla 4). Es posible que estas especies, incluyendo *H. drummondii*, tengan una gran cantidad de auxinas endógenas, por lo que sólo es necesario proporcionarles citocininas para promover la formación de brotes, ya que el balance de auxina-citocinina es determinado por el factor morfogénico. Cuando se observa la formación de brotes en un medio de cultivo adicionado con citocinina, el explante debe contener auxinas endógenas suficientes o producirlas (Julliard et al., 1992).

Conclusiones

Los medios de MS 100% y MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de AG₃ promovieron los más altos porcentajes de germinación. Las semillas de *H. drummondii* mostraron poca viabilidad y un alto porcentaje de contaminación *in vitro*, lo que nos indica la probabilidad de que esta especie se reproduzca más por la vía vegetativa de forma natural. La micropropagación se presentó en todos los tratamientos utilizados, pero se obtuvo el mayor número de brotes en el medio MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de 2iP y en el medio MS 100% adicionado con 2 mg L⁻¹ de BA. Con base en estos resultados, concluimos que el cultivo de tejidos vegetales es una técnica fa-

vorable para la propagación de esta especie, como estrategia de conservación *ex situ*, así como también para la obtención de metabolitos secundarios de interés.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca 237480 otorgada a ZHSL para realizar estudios de Maestría en Ciencias en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Literatura citada

- Brunetti, P. C., L. Ortiz, L. Palacio, C. Lloret y M. Gole-niowski. 2007. Micropropagación de "Tomillo de las sierras" *Hedeoma multiflorum* Benth. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas medicinales y Aromáticas 6:391-392.
- Davies, P. J. 2005. The plant hormones: their nature, occurrence, and function. En: Davies, P. J. (Ed.), Plant Hormones. Biosynthesis, Signal Transduction, Action. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands pp. 1-15.
- Jiménez, E. 1998. Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Pérez-Ponce, J. (Eds.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biología de las plantas, Santa Clara, Cuba pp. 13-35.
- Julliard, J., L. Sosountzov, Y. Habricot y G. Pelletier. 1992. Hormonal requirement and tissue competency for shoot organogenesis in two cultivars of *Brassica napus*. Physiology Plant 84:512-530.
- Koroch, A. R., H. R. Juliani Jr., H. R. Juliani y V. S. Trippi. 1997. Micropropagation and acclimatization of *Hedeoma multiflorum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 48:213-217.

- Malda, G., H. Suzán y R. Backhaus. 1999. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* 81:71-87.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Pence, V. C., G. D. Winget, K. L. Lindsey, B. L. Plair y S. M. Charls. 2009. *In vitro* propagation, cryopreservation and genetic analysis of endangered *Hedeoma todsenii* (Lamiaceae). *Madroño* 56:221-228.
- Pérez-Escandón, B. E., M. A. Villavicencio-Nieto y A. Ramírez. 2003. Lista de las plantas útiles del estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Hidalgo, México 134 p.
- Rout, G. R., S. Samantaray y P. Das. 2000. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology Advances* 18:91-120.
- Tovar, J. C. 2007. Composición química, actividad antibacteriana y tóxica de aceites esenciales de seis especies medicinales de Lamiaceae en el estado de Hidalgo. Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México 95 p.
- Villavicencio-Nieto, M. A. y B. E. Pérez-Escandón. 1995. Plantas útiles del Estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Hidalgo, México 71 p.