



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**VARIACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS
ANSIOLÍTICOS Y SEDANTES EN POBLACIONES DE
Galphimia sp. CULTIVADAS EN CONDICIONES DE
INVERNADERO E *IN VITRO***

**PROYECTO DE DOCTORADO
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN
CIENCIAS NATURALES**

Estudiante:

M.F. GEMA SOLEDAD BALDERAS HERNÁNDEZ

Tutor de tesis:

DRA. MARÍA LUISA VILLARREAL ORTEGA

DR. ALEXANDRE T. CARDOSO-TAKETA

CUERNAVACA, MORELOS

MARZO, 2020.

Índice de Contenido

1. Introducción	9
1.2 Marco Teórico	13
1.2.1 Diversidad de Especies	13
1.2.2 Plasticidad Fenotípica en Plantas	14
1.2.3 Plasticidad Fenotípica Adaptativa y no Adaptativa	15
1.2.4 Impacto de Factores Abióticos (Luz) en la Plasticidad Fenotípica	16
1.2.5 Quimiotipos	17
1.2.6 Género <i>Galphimia</i>	18
1.2.7 Aspectos Farmacológicos, Fitoquímicos y Biotecnológicos de la Planta <i>Galphimia glauca</i>	20
1.2.8 Aspectos Metabolómicos y Genéticos de la Planta <i>Galphimia glauca</i>	22
1.2.9 Taxonomía de la Especie <i>Galphimia glauca</i>	24
1.2.9.1 Aspectos Botánicos de la Planta <i>Galphimia glauca</i>	24
1.2.9.2 Morfología y Distribución Geográfica de <i>Galphimia glauca</i>	25
2. Justificación	29
3. Hipótesis	30
4. Objetivos	31
4.1 Objetivo General	31
4.2 Objetivos Específicos	31
4. Estrategia Experimental	32
6. Materiales y Métodos	33
6.1 Recolección del Material Vegetal	33

6.2 Aclimatación de los Individuos Silvestres en Invernadero de las 7 Poblaciones de <i>Galphimia</i> sp.	34
6.2.1 Caracterización Morfológica y Heterogeneidad Ambiental de los Individuos Silvestres Aclimatados en Invernadero.....	34
6.2.2 Cromatografía en Capa Fina (CCF) de los Individuos Silvestres Aclimatados en Invernadero.....	35
6.2.3 Generación de Perfiles por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) de los Individuos Silvestres de <i>Galphimia</i> sp. Aclimatados en Invernadero.....	36
6.3 Micropropagación	36
6.3.1 Germinación y Crecimiento.....	37
6.3.2 Etapa de Inducción a Brotación Múltiple.....	37
6.3.3 Etapa de Enraizamiento y Aclimatación	37
6.3.4 Etapa de Enraizamiento	38
6.3.5 Prueba de Viabilidad con Tetrazolio	39
6.3.6 Cromatografía en Capa Fina (CCF) de los Individuos de los Individuos Germinados <i>in vitro</i>	39
6.3.7 Generación de Perfiles por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) de los Individuos Germinados <i>In Vitro</i>	40
6.4 Germinación de Semillas en Maceta de <i>Galphimia</i> sp.	40
7. Resultados.....	41
7.1 Aclimatación en Invernadero de Ejemplares Silvestres de las 7 Poblaciones de <i>Galphimia</i> Sp.....	41
7.1.1 Aclimatación de los Individuos Silvestres de las 7 Poblaciones de <i>Galphimia</i> sp..	41
7.1.2 Caracterización Morfológica y Heterogeneidad Ambiental de los Individuos Aclimatados en Invernadero de <i>Galphimia</i> sp.	41
7.1.3 Perfiles Cromatográficos en Capa Fina de los Individuos Aclimatados en Invernadero de <i>Galphimia</i> sp.	48

7.1.4 Generación de Perfiles por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) de 6 Poblaciones de <i>Galphimia</i> sp.....	53
7.2 Micropropagación de las 7 Poblaciones de <i>Galphimia</i> sp.	55
7.2.1 Propagación <i>In Vitro</i> de las 7 Poblaciones de la Planta <i>Galphimia</i> sp.	55
7.2.3 Prueba de Viabilidad con Tetrazolio en Semillas de <i>Galphimia</i> sp.....	63
7.2.4 Etapa de enraizamiento <i>In Vitro</i> de las 6 poblaciones de <i>Galphimia</i> sp.....	65
7.2.5 Etapa de Aclimatación de las 6 Poblaciones de <i>Galphimia</i> sp.	68
7.2.6 Etapa de Enraizamiento <i>Ex Vitro</i> de las Poblaciones de <i>Galphimia</i> sp.....	70
7.2.7 Perfil Químico por Cromatografía en Capa Fina de Algunas de las Poblaciones de <i>Galphimia</i> sp. Cultivadas <i>In Vitro</i>	73
7.2.8 Generación de Perfiles por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) De 6 Poblaciones de <i>Galphimia</i> sp.....	74
7.3 Propagación en Condiciones de Invernadero de las 7 poblaciones de <i>Galphimia</i> sp., (germinación de semillas en charola).....	81
7.3.1 Germinación en Condiciones de Invernadero de las 7 Poblaciones de <i>Galphimia</i> sp.	81
7.3.4 Perfil Cromatográfico de la Germinación en Invernadero de Semillas de <i>Galphimia</i> sp.	86
8. Discusión y Conclusiones	88
8.1 Análisis de Producción de Galfiminas de Ejemplares Silvestres de 6 Poblaciones de <i>Galphimia</i> sp. Cultivados y Aclimatados en Invernadero.....	88
8.2 Micropropagación <i>In Vitro</i> de las 6 Poblaciones de <i>Galphimia</i> sp.	93
8.4 Conclusiones Generales.....	96
8.5 Perspectivas.....	96
9. Referencias Bibliográficas.....	98

Índice de Figuras

Figura 1. Diferentes especies del genero <i>Galphimia</i> sp. endémicas de la República Mexicana (www.herbarium.lsa.umich.edu).....	19
Figura 2. Planta <i>Galphimia glauca</i> . (www.herbarium.lsa.umich.edu).....	25
Figura 3. <i>Galphimia glauca</i> . a. Rama con flores y hojas separadas a la derecha. b, c. Base de las hojas mostrando las glándulas. d. Flor abierta. e. Pétalo lateral. f. pétalo posterior g. androceo h. gineceo i. cubierta de semilla j. semilla k. embrión (Anderson, 2007).	26
Figura 4. Distribución geográfica de <i>Galphimia glauca</i> en diferentes estados de la República Mexicana (Anderson, 2007; Sharma et al., 2012).	27
Figura 5. Comparación de las hojas de las siete poblaciones de <i>Galphimia</i> sp. de los ejemplares aclimatados durante 3 meses en condiciones de invernadero.....	42
Figura 6. Individuos de <i>Galphimia</i> sp. aclimatados en condiciones de invernadero. A, Individuos aclimatados sin la presencia de inflorescencias B-H, individuos en su etapa de floración, mostrando diferencias morfológicas notables en el rearrreglo de sus inflorescencias. B (Jalpan, Qro.), C (Dr. Mora, Gto.), D (Guadalajara, Jal), E (Miacatlán, Mor), F (Tepoztlán, Mor), G (Cuernavaca, Mor.) y H (Tuxtla Gtz. Chi.).....	43
Figura 7. Plantas aclimatadas en invernadero de <i>Galphimia</i> sp, durante un periodo de 11 meses mostrando que el revestimiento de su follaje es uniforme.....	44
Figura 8. Variables morfométricas de las hojas de los individuos aclimatados en invernadero de las diferentes poblaciones de <i>Galphimia</i> sp. después de 11 meses aclimatadas en invernadero.....	45
Figura 9. Influencia del tiempo sobre el índice de área foliar de seis poblaciones de <i>Galphimia</i> sp. aclimatadas en condiciones de invernadero (GM: Dr. Mora, Gto.; QJ: Jalpan, Qro.; MC: Cuernavaca, Mor.; MT: Tepoztlán, Mor.; JG: Guadalajara, Jal.; y CT: Tuxtla Gtz., Chis.). Periodo de tiempo inicial (t_0) y final (t_{11}) (Intervalo de confianza del 95%).....	46
Figura 10. Análisis de Componente Principal de las variables climáticas de seis poblaciones de <i>Galphimia</i> sp. 1 = Guadalajara, Jal.; 2 = Dr. Mora, Gto.; 3 = Jalpan, Qro.; 4 = Cuernavaca, Mor.; 5 = Tepoztlán, Mor., 6 = Tuxtla Gutiérrez, Chis.....	48
Figura 11. Perfil cromatográfico en capa fina de las 7 poblaciones colectadas en diferentes localidades de la República Mexicana a tiempo 0. En 6 poblaciones se corrieron muestras correspondientes a 5 individuos excepto en la población de Jalpan, Qro., en la cual se corrieron muestras de los 17 individuos colectados. Se utilizó como control una fracción purificada de la familia de galfininas denominada con la letra C. El sistema de fase móvil utilizado fue acetato de etilo:cloroformo (2:1 v/v).	50

- Figura 12.** Perfil cromatográfico en capa fina de las 6 poblaciones colectadas en diferentes localidades de la República Mexicana, a tiempo de 7 meses. En 5 poblaciones se corrieron muestras correspondientes a 5 individuos excepto en la población de Jalpan, Qro., en la cual se corrieron muestras de los 11 individuos colectados. Se utilizó como control una fracción purificada de la familia de galfiminas denominada con la letra C. El sistema de fase móvil utilizado fue acetato de etilo:cloroformo (2:1 v/v).....51
- Figura 13.** Perfiles por cromatografía en capa fina de *Galphimia* sp. **A)** Perfil cromatográfico de los individuos aclimatados en invernadero de algunas poblaciones de *Galphimia* sp. (0 meses) **B)** Perfil cromatográfico de los individuos aclimatados en invernadero de algunas poblaciones de *Galphimia* sp. (11 meses). GM: Dr. Mora, Gto.; QJ: Jalpan, Qro.; MC: Cuernavaca, Mor.; MT: Tepoztlán, Mor.; JG: Guadalajara, Jal.; and CT: Tuxtla Gtz., Chis.). C = control de galfiminas; 1-5 son individuos de cada población. El sistema de fase móvil utilizado fue acetato de etilo:cloroformo (2:1 v/v).52
- Figura 14. A)** Perfiles cromatográficos por CLAE de extractos crudos de 5 individuos de *Galphimia* sp. colectados en Dr. Mora, Gto. (GM) a tiempo 0 (T0) y 11 meses (TF) después de ser trasplantados en condiciones de invernadero, mostrando la presencia de galfiminas. **B)** Perfiles cromatográficos por CLAE de extractos crudos de 5 individuos de *Galphimia* sp. colectados en Jalpan, Qro. (QJ) a tiempo 0 (T0) y 11 meses (TF) después de ser trasplantados en condiciones de invernadero mostrando la presencia de galfiminas. Condiciones cromatográficas: fase móvil, ACN: H2O (48:52); volumen de inyección 20µL; velocidad de flujo 0.7 mL/min; tiempo de corrida 30 min. (pico I GA/GH, pico II GB/GF, pico III GC, pico IV GD/GI, y pico V GE/GG).....54
- Figura 15.** Primeros brotes del cultivo *in vitro* de las siete poblaciones de *Galphimia* sp. mostrando tiempo y porcentaje de germinación de los 10 individuos sembrados en medio MS.....55
- Figura 16.** Muestra la germinación *in vitro* de las poblaciones de *Galphimia* sp. mostrando porcentajes de germinación del 10 hasta 60 %.56
- Figura 17.** Semillas recolectadas de *Galphimia* sp. de la población de Tepoztlán, Morelos.61
- Figura 18.** Germinación *in vitro* de *Galphimia* sp. de 3 poblaciones de Morelos (Cuernavaca, Tepoztlán y Miacatlán).....62
- Figura 19.** Enraizamiento *in vitro* de *Galphimia* sp. de las poblaciones de Dr. Mora y Cuernavaca.....65
- Figura 20.** Formación de callos en las 5 poblaciones de *Galphimia* sp. 1. Miacatlán, Mor. 2. Guadalajara, Jal. 3. Cuernavaca, Mor. 4. Dr. Mora, Gto. 5. Jalpan Qro.66
- Figura 21.** Enraizamiento *in vitro* de las poblaciones de Dr. Mora, Gto., Cuernavaca, Mor., Tepoztlán, Mor., respectivamente.....66
- Figura 22.** Enraizamiento de las 5 poblaciones de *Galphimia* sp. mediante el protocolo de Sadegui et al., 2015.68
- Figura 23.** Etapa de aclimatación de los individuos germinados *in vitro* de *Galphimia* sp.....69

Figura 24. Aclimatación de las poblaciones de <i>Galphimia</i> sp. mediante el protocolo de Ranaweera et al., 2013 y Patel et al., 2014.....	69
Figura 25. Aclimatación de individuos germinados <i>in vitro</i> de las 6 poblaciones de <i>Galphimia</i> sp.....	70
Figura 26. Enraizamiento <i>ex vitro</i> de la población de Jalpan Qro., de la planta <i>Galphimia</i> sp.	71
Figura 27. A) Enraizamiento <i>ex vitro</i> de la población de Jalpan Qro., de la planta <i>Galphimia</i> sp. (40 días). B) Enraizamiento <i>ex vitro</i> de la población de Dr. Mora Gto., de la planta <i>Galphimia</i> sp. (40 días).	72
Figura 28. Perfil cromatográfico del cultivo <i>in vitro</i> de algunas poblaciones de <i>Galphimia</i> sp. Carril: Ind. 7 Gld (90 d), Carril 2: Ind. 7 Gld (120 d), carril 4: Ind. Miacatlán Mor., Carril 5: Ind. Dr. M 7 y carril 6 Ind. Jalpan, Qro. Se utilizó como control (carril 3) una fracción purificada de la familia de galfiminas denominada con la letra C. El sistema de fase móvil utilizado fue acetato de etilo:cloroformo (2:1 v/v).	74
Figura 29. Curva estándar de GB/GF. Solución stock de 1mg/mL.....	76
Figura 30. Perfil cromatográfico de la familia de galfiminas. 100 mg de extracto metanólico. Condiciones cromatográficas: fase móvil, ACN:H ₂ O (48:52); volumen de inyección 20µL; velocidad de flujo 0.7 mL/min; tiempo de corrida 25 min.	78
Figura 31. Perfil cromatográfico de la población de Dr. Mora Gto., de <i>Galphimia</i> sp. 100 mg de material vegetal seco. Condiciones cromatográficas: fase móvil, ACN:H ₂ O (48:52); volumen de inyección 20µL; velocidad de flujo 0.7 mL/min; tiempo de corrida 25 min.....	79
Figura 32. Germinación en condiciones de invernadero de las siete poblaciones de <i>Galphimia</i> sp. Tiempo y porcentaje de germinación.	81
Figura 33. Plántulas de 7 meses de la población de Jalpan, Qro., germinadas a partir de semillas de <i>Galphimia</i> sp. en condiciones de invernadero.....	83
Figura 34. Plantas germinadas en charolas de las 6 poblaciones de <i>Galphimia</i> sp.	83
Figura 35. Perfil cromatográfico del cultivo en charola de algunas poblaciones de <i>Galphimia</i> sp. Carril 1: Cue 2, Carril 2 y 3 Dr. M3, carril 4 y 5: Ind. Jalpan., Qro. Carril 6 control una fracción purificada de la familia de galfiminas y carril 7-9 Ind. Jalpan, Qro. El sistema de fase móvil utilizado fue acetato de etilo:cloroformo (2:1 v/v).	86

Índice de Tablas

Tabla 1. Taxonomía de la planta <i>Galphimia glauca</i> . (Herbarium.lsa.umich.edu).....	24
Tabla 2. Características de las 7 poblaciones de <i>Galphimia</i> sp. que fueron colectadas.....	33
Tabla 3. Individuos germinados y clonados de las 7 poblaciones en estudio de <i>Galphimia</i> sp.	57
Tabla 4. Parámetros de crecimiento de las siete poblaciones de <i>Galphimia</i> sp. por individuo.	58
Tabla 5. Individuos germinados y clonados <i>in vitro</i> de las 7 poblaciones en estudio de <i>Galphimia</i> sp.	60
Tabla 6. Porcentaje de semillas maduras de las poblaciones de Morelos (Cuernavaca, Tepoztlán y Miacatlán).....	61
Tabla 7. Individuos germinados y clonados <i>in vitro</i> de las 7 poblaciones en estudio de <i>Galphimia</i> sp..	63
Tabla 8. Muestra el porcentaje de viabilidad de acuerdo a la tinción (rojo) que sufrió el embrión por el Tetrazolio en las poblaciones en estudio de <i>Galphimia</i> sp.....	64
Tabla 9. Prueba de viabilidad con Tetrazolio de las poblaciones de Morelos (Cuernavaca, Tepoztlán y Miacatlán).....	65
Tabla 10. Poblaciones enraizadas de <i>Galphimia</i> sp.	67
Tabla 11. Poblaciones enraizadas <i>ex vitro</i> y parámetros morfológicos de <i>Galphimia</i> sp.....	73
Tabla 12. Curva estándar de GB/GF.	75
Tabla 13. Cuantificación de GB/GF en las muestras cultivadas <i>in vitro</i> de las poblaciones de Dr. Mora, Gto., y Jalpan Qro (7 meses).	77
Tabla 14. Individuos germinados en charola de las 7 poblaciones en estudio de <i>Galphimia</i> sp.....	82
Tabla 15. Individuos germinados en invernadero de 5 poblaciones de <i>Galphimia</i> sp.....	84
Tabla 16. Parámetros morfológicos de los individuos germinados en invernadero de 5 poblaciones de <i>Galphimia</i> sp.	85

1. Introducción

En México, el uso de las plantas medicinales se considera una herramienta esencial entre las estrategias generadas por la población para enfrentar sus enfermedades cotidianas. Este hábito relevante se encuentra actualmente sujeto a diferentes condiciones, no solamente en el medio indígena y el rural, sino también entre poblaciones mestizas de zonas urbanas y suburbanas. Es resultado de la considerable diversidad biológica del país, de la naturaleza pluriétnica de su población y de la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas frente a diversos padecimientos (Cardoso-Hernández *et al.*, 2001). México posee una de las biodiversidades de plantas más grandes en el mundo y un gran conocimiento en la medicina tradicional, más de 6000 especies de plantas medicinales son utilizadas para el tratamiento de varias enfermedades (Lautiúa *et al.*, 2008, Juárez-Vázquez *et al.*, 2013). Las plantas producen metabolitos secundarios (MS) en cantidades diferentes y usualmente presentan una alta diversidad estructural, (Dewick, 2009). Algunos de los compuestos principales regularmente son acompañados de una variedad de derivados en menor proporción. El patrón de los metabolitos secundarios obtenidos de las plantas son complejos, debido a la gran diferencia que existe entre ellos, regularmente se deben a las etapas de desarrollo en la planta (ejemplo: órganos importantes para la sobrevivencia y reproducción que tienen la más alta y potente producción de MS). Los metabolitos secundarios no son necesarios para la planta, sin embargo, estos le confieren algunas ventajas como defensa a los ataques de patógenos, insectos y herbívoros u otros factores como abióticos y bióticos, este proceso de defensa lo realizan activando una matriz de mecanismos de defensa incluyendo la inducción de la biosíntesis de metabolitos secundarios como fitoalexinas, respuestas hipersensitivas y

barreras de defensa estructural como la deposición de lignina sobre la pared celular, entre otras (He *et al.*, 2002, Mert-Turk *et al.*, 2002, Durango *et al.*, 2002, Hutcheson *et al.*, 1998).

Otro estudio fue el realizado por Medina-Holguín en el año 2008 para observar la variación quimiotípica de aceites esenciales medicinales de la especie *Anemopsis californica* comúnmente llamada yerba mansa, es una importante especie medicinal utilizada para la inflamación, hígado, tracto circulatorio, urinario y digestivo también se utiliza para tratar cáncer uterino, trastornos menstruales y para inducir la concepción. Sin embargo, el polimorfismo químico o quimiotipos ha sido reportado en varias especies vegetales. Por ello es que se examinó la variabilidad química de esta especie vegetal en raíces y rizomas en relación a compuestos de naturaleza monocíclica, bicíclica, monoterpenos y fenilpropanoides donde se determinaron 3 quimiotipos en 17 poblaciones. Un quimiotipo se determinó por altas concentraciones de Elemicina, otro por Metileugenol y el último por Piperitona y Timol. Estos tres quimiotipos detectados son a priori el resultado de la variabilidad genética más que los efectos del medio ambiente. Puesto que estos resultados se determinaron en dos grupos de plantas cultivadas en condiciones controladas y en condiciones silvestres.

Además, existen estudios sobre la evolución en la variación química de la especie *Eucalyptus globulus* de tres regiones geográficas (este y oeste de Tasmania y Victoria, e Islandia) cultivadas en condiciones de jardín común, donde se determinaron 3 quimiotipos caracterizados específicamente por la presencia de terpenos y compuestos de formilato floroglucinol. Uno de los quimiotipos se encontró en Tasmania y los quimiotipos 2 y 3 en las poblaciones provenientes de Victoria. De acuerdo a los resultados, los autores sugieren que los quimiotipos son el reflejo de un proceso de introgresión entre *E. globulus ssp. Globulus* y

los árboles fuertemente relacionados como las subespecies (*E. globulus ssp. Bicostata*, *E. globulus ssp. Maidenii* y *E. globulus ssp. pseudoglobulus*) (Wallis *et al.*, 2011).

La planta *Galphimia glauca* Cav., comúnmente conocida como “calderona amarilla” ha sido utilizada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de desórdenes mentales y para disminuir la excitación nerviosa (Estrada, 1985). En esta especie se han demostrado efectos ansiolíticos y sedantes tanto en ratones como en humanos (Herrera *et al.*, 2006; Herrera *et al.*, 2007). Varios análisis fitoquímicos y farmacológicos indican que la población que crece en el estado de Guanajuato presenta una familia de nueve compuestos bioactivos de tipo nor-secofriedelanos denominados galfiminas (Cardoso-Taketa *et al.*, 2004). En el año 2008 Cardoso-Taketa y colaboradores analizaron seis poblaciones de *G. glauca* con el propósito de evaluar si presentaban diferencias en sus perfiles químicos. Las poblaciones evaluadas fueron obtenidas de las siguientes áreas geográficas: Dr. Mora Gto., Guadalajara, Jal., Cuernavaca, Mor., San Andrés de la Cal, Mor., Tepoztlán, Mor., y Jalpan Qro., arrojando como resultado diferencias en sus perfiles debido a la presencia o ausencia de las galfiminas. Solo las poblaciones correspondientes a Dr. Mora Gto., y Jalpan Qro., presentaron las galfiminas con actividad sedante. Estos resultados indican que esta especie endémica de México presenta diferencias en la producción o presencia de los compuestos bioactivos, por ello 4 años después se realizó otro análisis metabolómico por Sharma y colaboradores reafirmando los resultados obtenidos por Cardoso-Taketa *et al.*, 2008. Las diferencias observadas entre las poblaciones en estudio posiblemente podrían deberse a cambios en el metabolismo general de la planta inducido por estrés ecológico al que la planta está expuesta, a variaciones climáticas y ataques provenientes de depredadores o bien a diferencias genéticas. Por otra parte, existe una problemática referente a la clasificación botánica de la

especie, ya que en un estudio taxonómico del género *Galphimia* Cav reportado por Anderson en el 2007 se determinó que en la República Mexicana existen 22 especies de este género, con fenotipos similares lo que provoca que la identificación de cada especie sea difícil y confusa. No obstante, para ampliar este panorama e investigar la variabilidad genética de estas plantas Sharma y colaboradores en el año 2013, realizaron un estudio filogenético de las siete poblaciones, utilizando la técnica de código de barras de ADN en especies vegetales. Los resultados obtenidos indicaron que estas poblaciones pertenecen probablemente a un mínimo de tres especies diferentes, dando pauta a futuros estudios botánicos para confirmar o descartar estos datos. Para complementar estos resultados, los autores realizaron una comparación de los perfiles químicos por cromatografía en capa fina, observando que cuatro poblaciones se agrupan (Jalisco Gld., Tepoztlán, Cuernavaca y Miacatlán, Mor.) y comparten características similares, mientras que las poblaciones de Jalpan, Qro., y Dr. Mora Gto., también se agrupan y presentan perfiles cromatográficos semejantes entre si y por último el tercer grupo pertenece a la localidad de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, y presenta un perfil químico único. Lo anterior podría indicar que aun evaluando los factores genéticos que son responsables en la producción de metabolitos secundarios en las plantas, los factores ambientales (condiciones climáticas o suelo) pudieran jugar un papel importante y decisivo.

Por estas razones el presente proyecto tuvo como objetivo coleccionar las plantas de *G. glauca* de diferentes localidades geográficas y crecerlas en condiciones uniformes de invernadero, así como cultivadas en condiciones *in vitro* para su posterior análisis cromatográfico. Este enfoque pretende definir si la producción de los metabolitos de interés se debe a factores ambientales (abióticos y bióticos) dado que cada población está expuesta

a diferentes hábitats; o bien, si la diferencia de los perfiles químicos obedece a factores genéticos.

1.2 Marco Teórico

1.2.1 Diversidad de Especies

Las plantas son una herramienta potencial para el descubrimiento de nuevas moléculas de importancia biológica, ecológica, química e industrial, ya que juegan un rol predominante en el territorio terrestre y en algunos medios acuáticos y marinos. De esta manera, pueden ser reconocidas como unidades para describir la diversidad de la vida, así como poblaciones, subespecies, o especies, las cuales no son fácilmente identificables (Huston, 1995). Es por ello que, los taxónomos agrupan a las especies por géneros, familias, orden y reinos; mientras que, los ecólogos agrupan a las especies como grandes estructuras, denominadas comunidades y ecosistemas. No obstante, la justificación de la aplicación de esta variedad de términos es su utilidad, posiblemente para delimitar los grupos de organismos; sin embargo, el camino para la clasificación de los organismos lo determina jerárquicamente la evolución de la vida (Mallet, 2007).

Por otro lado, la selección natural divergente, la divergencia adaptativa y el flujo génico pueden interaccionar en diferentes vías. Estudios recientes se han centrado en el equilibrio de la selección y flujo génico de poblaciones naturales, mientras que el trabajo empírico ha mostrado que el flujo génico puede limitar a la divergencia adaptativa y la selección divergente puede limitar al flujo génico. Cabe mencionar que la diversificación fenotípica puede estar bajo la influencia directa de factores exógenos ambientales (es decir puede deberse a la plasticidad

fenotípica) además de la influencia parcial genética (Crispo *et al.*, 2008). Diferentes factores pueden influenciar la divergencia fenotípica adaptativa entre poblaciones, y tres de estas incluyen: (i) Selección natural divergente (Schluter, 2000), (ii) flujo génico entre entornos selectivos (Garant *et al.*, 2007) y (iii) plasticidad fenotípica (Pigliucci, 2001). Las relaciones entre la selección natural, la divergencia adaptativa y el flujo génico han sido consideradas tanto teórica como empíricamente en numerosos estudios (Hendry *et al.*, 2001; Hendry y Taylor, 2004; Nosil y Crespi, 2004). Sin embargo, la plasticidad puede ser un factor importante en la diversificación evolutiva. La modificación de los efectos de plasticidad sobre la adaptación y el flujo génico puede ser positiva o negativa, dependiendo de los matices de sistemas específicos.

1.2.2 Plasticidad Fenotípica en Plantas

La plasticidad fenotípica usualmente se define como la propiedad que tiene un genotipo individual a producir diferentes fenotipos cuando son expuestos a diferentes condiciones ambientales (Pigliucci, 2006). Dicho proceso se visualiza en las llamadas normas de reacción en donde el rango de respuestas fenotípicas de un genotipo expresado en un gradiente ambiental (Gianoli, 2004). La plasticidad fenotípica es un fenómeno que se da en una escala ecológica y su efecto a este nivel es evidente como por ejemplo el aumento a la tolerancia de hábitats extremos, con ello las plantas pueden ajustar su morfología y fisiología permitiéndoles enfrentarse a la heterogeneidad ambiental de su propio ambiente (Palacio *et al.*, 2007). Sin bien la plasticidad fenotípica puede estudiarse describiendo cambios morfológicos y fisiológicos de los individuos, resulta de mayor interés investigar el potencial

adaptativo de dichos cambios ya que dicho proceso puede tener consecuencias evolutivas que pueden ser significativas al modular la acción de la selección natural. Esto tendría lugar al moderar las diferencias en adecuación biológica de los genotipos de una población dada, como resultado de la variación de su expresión fenotípica en los diferentes ambientes experimentados por población (Sultan 1987). No obstante, es necesario puntualizar que la plasticidad fenotípica no siempre es adaptativa (en el sentido evolutivo de mejorar la reproducción o supervivencia de los organismos), algunos rasgos son plásticos debido a coacciones inevitables impuestas por la bioquímica, la fisiología o la biología del desarrollo del organismo propio (Sultan 1995). El tipo y el grado de plasticidad son específicos de rasgos individuales y de las condiciones ambientales; el mismo rasgo puede ser plástico en respuesta a cambios de temperatura, pero no a los nutrientes. Finalmente parece ser que la variación genética es abundante debido a una variedad de respuestas plásticas en poblaciones naturales, quienes hacen posibles procesos como la evolución de la plasticidad por la selección y otros mecanismos (Pigliucci 2006).

En resumen, la plasticidad fenotípica es una propiedad común de la norma de reacción de un genotipo (para un rasgo dado, dentro de una cierta gama de condiciones ambientales). La plasticidad es que hace posible el aspecto de un nuevo fenotipo inducido ecológicamente y un proceso de selección sobre la expresión de tal fenotipo en un nuevo entorno puede terminar 'por fijar' (asimilando genéticamente) y por ello alterando la forma de la norma de reacción.

1.2.3 Plasticidad Fenotípica Adaptativa y no Adaptativa

Existen dos tipos de plasticidad fenotípica que pueden únicamente contribuir a la evolución adaptativa cuando las poblaciones son expuestas a ambientes nuevos o alterados. La plasticidad fenotípica adaptativa se promueve por el establecimiento y persistencia en un ambiente nuevo, mientras que la plasticidad fenotípica no adaptativa es en respuesta a ambientes estresantes que puede resultar en una respuesta fenotípica media que puede estar fuera del ambiente óptimo favorecido o incrementar alternadamente la varianza alrededor de la media debido a la expresión de la variación genética críptica. La expresión de la variación genética críptica puede facilitar la evolución adaptativa si por el cambio resulta un fenotipo adecuado.

La plasticidad adaptativa se define simplemente mediante una norma de reacción que resulta en la producción de un fenotipo en la misma dirección como el valor óptimo favorecido por la selección en un ambiente nuevo.

La plasticidad no adaptativa en respuesta al estrés puede reflejar una ruptura fundamental durante el desarrollo o interrupción de funciones fisiológicas por cambios en la temperatura, pH, humedad, etc., este tipo de plasticidad representa fundamentalmente un tipo diferente de efecto inducido ecológicamente. Además, la plasticidad no adaptativa incluye cualquier respuesta a la inducción ambiental eso no mejoran su condición (incluyendo mala adaptación como respuesta a diferentes ambientes) (Fitzpatrick 2012).

1.2.4 Impacto de Factores Abióticos (Luz) en la Plasticidad Fenotípica

El estrés abiótico en plantas altera su fisiología, morfología y desarrollo en respuesta a cambios ambientales. Las hojas son órganos sensibles a cambios ambientales en el proceso de evolución y pueden exhibir plasticidad fenotípica como respuesta al estrés abiótico. Además, las hojas son órganos importantes para la fotosíntesis y juegan un papel relevante en el crecimiento y supervivencia de una planta. La estructura y forma de la hoja son definidas principalmente por un breve periodo de morfogénesis primaria. La plasticidad fenotípica también ocurre para producir rasgos en las hojas como resultado de cambios ambientales. En varios estudios previos se ha revelado que esta variación en los rasgos de las hojas es el resultado del proceso de adaptación durante su crecimiento en diferentes hábitats.

1.2.5 Quimiotipos

El concepto de quimiotipo en plantas, ha sido utilizado para describir a especies vegetales que producen compuestos secundarios con fenotipos químicos diferentes (Keefover-Ring *et al.*, 2009). Por otro lado, Soria y colaboradores en 2008 denominaron al término de quimiotipo, como un grupo de individuos de una misma especie que se distingue de forma significativa del resto por su composición química. Asimismo, se utiliza para calificar a un grupo de individuos que se caracterizan y distinguen de modo significativo de los demás miembros de una especie por la presencia o concentración de uno o varios compuestos, tal y como el término de quimiotaxonomía, que se utiliza para el estudio de la diversidad química de las plantas. Como por ejemplo la especie vegetal *Anemopsis californica* comúnmente llamada yerba mansa, es una importante planta medicinal que se localiza en desiertos del Norte de América y en las regiones del norte de México las cuales fueron analizadas por su

variabilidad química en raíces y rizomas de compuestos monocíclicos (cimeno, limoneno, piperitona y timol), compuestos bicíclicos (α -pineno, 1,8-cineol y myrtenol), monoterpenos y fenilpropanoides en donde se detectaron tres quimiotipos diferentes mediante un análisis jerárjico de grupos sobre la concentración de 10 diferentes analitos de tres individuos para las 17 poblaciones analizadas. El primer quimiotipo fue caracterizado por la alta concentración de elemicina, el segundo por metyleugenol y el tercero por piperitona y tymol. Las plantas analizadas fueron sujetas a dos ambientes diferentes: condiciones controladas *versus* condiciones silvestres (Medina-Holguín *et al.*, 2008). Otro estudio más reciente nos presenta la variabilidad química de *Eucalytus globulus* a partir de 60 compuestos químicos de los cuales 34 fueron terpenos, se analizaron las hojas de árboles crecidos en jardín común de tres diferentes poblaciones para observar la variación entre las regiones geográficas, observar la variación en el perfil químico y determinar si esta especie exhibe distintos quimiotipos (plantas que morfológicamente son similares, pero con diferente perfil químico). Los resultados obtenidos fueron que efectivamente existen tres quimiotipos de esta especie caracterizados específicamente por terpenos y compuestos de formiato de fluoroglucinol.

1.2.6 Género *Galphimia*

El género neotropical *Galphimia* Cav. (Malpighiaceae, Byrsonimoideae, tribu *Galphimieae*) comprende 26 especies diferentes de hierbas y arbustos. Se caracteriza por sus flores bilateralmente simétricas, con pétalos de color amarillo (frecuentemente teñidas con rojo), agrupadas en racimos, ya sea de forma única o agrupadas en panículos. En ocho especies, los pétalos permanecen constantes en el fruto. Los sépalos carecen de glándulas

sebáceas, que típicamente se encuentran en Malpighiaceae; no obstante, en pocas especies, el cáliz presenta una o más glándulas pequeñas con gran parecido a las glándulas de las hojas (Anderson, 2007)

Galphimia, en general, crece en hábitats de clima seco-árido. Cuatro especies (*G. amambayensis*, *G. australis*, *G. brasiliensis*, *G. platphylla*) se localizan en la cuenca del Amazonas en Sudamérica, en tanto que las especies restantes crecen en México (ver figura 3); una de las especies (*G. angustifolia*) se encuentra en Texas; y otra (*G. speciosa*) en Centroamérica. La mayoría de las especies endémicas de México crecen en bosque tropical seco, y otras en las costas del Pacífico entre matorrales o arbustos (Figura 1) (Anderson, 2007).

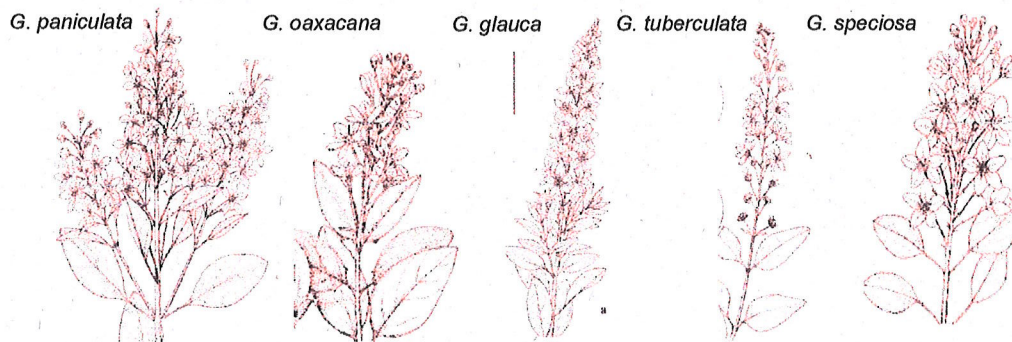


Figura 1. Diferentes especies del genero *Galphimia* sp. endémicas de la República Mexicana (www.herbarium.lsa.umich.edu).

1.2.7 Aspectos Farmacológicos, Fitoquímicos y Biotecnológicos de la Planta *Galphimia glauca*

Galphimia glauca (Anderson 2007) pertenece a la familia Malpighiaceae, y está distribuida ampliamente en Latinoamérica (Camacho *et al.*, 2002). Es un arbusto con flores amarillas que ha sido utilizado durante muchos años en la medicina tradicional mexicana como “sedante o tranquilizante nervioso” (Tortoriello *et al.*, 1992). Con base a la información etnomédica que respalda su uso medicinal, se ha demostrado en modelos *in vitro* e *in vivo* que el extracto crudo de las partes aéreas de *G. glauca* posee efectos ansiolítico y sedante. Por ello se han llevado a cabo diferentes preparaciones de extractos por maceración con disolventes orgánicos con distintas polaridades, los cuales han sido evaluados en modelos neurofarmacológicos empleándose ratones. Los resultados obtenidos han demostrado que el extracto metanólico de *G. glauca* posee efectos depresores del SNC, y los estudios fitoquímicos permitieron la identificación de un triterpeno novedoso del tipo nor-secofriedelano, denominado como galfimina B, responsable de la actividad farmacológica (Tortoriello *et al.*, 1992 y 1996).

Las investigaciones biotecnológicas iniciales de *G. glauca* permitieron establecer cultivos de callos, en los que se identificó la presencia de galfimina B y de otro derivado que fue denominado galfimina E (Osuna *et al.*, 1999).

En un trabajo fitoquímico realizado por Cardoso-Taketa y colaboradores en 2004 se aislaron e identificaron a partir de las partes aéreas del material vegetal silvestre otros derivados con el mismo núcleo nor-secotriterpénico, pero con diferencias en el grado de oxidación y acetilación en las posiciones C-6 y C-7, así como en la isomería endo (Δ^{20}) y exo

($\Delta^{20/29}$) del doble enlace en el anillo E, lo que resultó en la caracterización estructural de siete nuevos triterpenos, y llevó a la identificación de una familia de galfiminas (galfiminas A-I).

En otros estudios se ha reportado la transformación genética de la planta utilizando como vector *Agrobacterium rhizogenes*, lo que ha resultado en la obtención de una línea de raíces pilosas productoras de compuestos similares a las galfiminas, pero con un núcleo triterpénico del tipo nor-friedelano. Estos compuestos fueron denominados glaucacetinas A-C (Nader *et al.*, 2004).

Otros autores realizaron la micropropagación de *Galphimia glauca*, y obtuvieron múltiples brotes a partir de explantes de yemas axilares creciendo en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) complementado con diferentes combinaciones de ácido 3-indol acético (IAA) y cinetina (KN). Dichos brotes fueron enraizados y transferidos a un campo experimental con condiciones similares a las de la planta silvestre, poniendo de manifiesto que la propagación *in vitro* presentó efectos positivos sobre la síntesis de los compuestos naturales producidos por la planta, ya que se alcanzó una concentración de 7.39 mg/g de peso seco de galfimina B (Rojas *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que las galfiminas A-I poseen actividad ansiolítica, siendo que los compuestos más activos en el modelo de la cruz-elevada, ensayo utilizado para identificar nuevos candidatos para tratar la ansiedad y depresión, en los que se observa habitualmente que los animales muestran cierta preferencia por los brazos cerrados, aventurándose sólo esporádicamente a explorar los brazos abiertos, donde el sujeto se encuentra eventualmente más expuesto. Su validez se sustenta en que sólo los fármacos ansiolíticos mejoran la frecuencia de ingresos y tiempo de permanencia en los brazos abiertos, en tanto que no se

producen cambios conductuales significativos al administrar otros psicofármacos (antidepresivos y neurolépticos), son las galfiminas A y B (Herrera-Ruiz *et al.*, 2007).

1.2.8 Aspectos Metabólicos y Genéticos de la Planta *Galphimia glauca*.

La investigación de análisis metabólico realizada por Cardoso-Taketa y colaboradores (2008) demostró que poblaciones de *G. glauca*, colectadas en diferentes localidades de México (Dr. Mora, Guanajuato; San Andrés de la Cal, Tepoztlán y Cuernavaca, Morelos; Jalpan de Serra, Querétaro; y Zapopan, Jalisco), presentan variaciones importantes en el contenido metabólico de sus compuestos incluyendo a las galfiminas, lo que se refleja en variaciones en las actividades ansiolítica y sedante de sus extractos. El análisis metabólico de estas poblaciones demostró que, de las seis incluidas en el estudio, solo dos de ellas, creciendo en el Municipio de Dr. Mora, Guanajuato, y en Jalpan, Querétaro, se diferencian del resto de las poblaciones, y que ello responde a la presencia de galfiminas. Cuatro años más tarde, en un estudio realizado por Sharma *et al.*, 2012, se comparan los perfiles químicos de siete poblaciones de *G. glauca* colectadas en diferentes localidades de la República Mexicana, incluyendo la de Miacatlán, Morelos y Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Los resultados del estudio metabólico con las especies colectadas en el 2009 fueron similares a los de la colecta del 2005, confirmando así que el contenido de galfiminas es constante en las poblaciones de Jalpan, Querétaro y Dr. Mora Guanajuato, además de que estos compuestos son los responsables de la actividad farmacológica en el SNC. Este estudio plantea la posibilidad de que en las siete poblaciones analizadas se presentan al menos tres diferentes especies del género *Galphimia*, lo que sugiere que existen factores genéticos que

juegan un papel importante en la síntesis de los compuestos biodinámicos. En relación a la comparación del perfil químico por cromatografía en capa fina, se demostró que las poblaciones activas presentan un comportamiento químico único. Estos resultados muestran que el uso de código de barras de ADN combinado con el análisis del perfil químico por TLC, pueden ser una herramienta potencial en las pruebas de control de calidad para el desarrollo de fitomedicamentos a base de *Galphimia glauca*, y de cualquier otra especie vegetal. Por otro lado, este estudio abre la posibilidad para realizar investigaciones botánicas detalladas y de taxonomía molecular que permitan confirmar o descartar los datos obtenidos, además, en esa misma investigación se evaluó por primera vez, la actividad anti-inflamatoria en las poblaciones colectadas, encontrando actividades similares en todos los individuos, por lo que ésta actividad no se encuentra necesariamente relacionada con las galfiminas (Sharma *et al.*, 2012). En otro trabajo más reciente realizado por Gesto *et al.* (2019) se analizaron 9 poblaciones de *G. glauca* incluyendo 5 poblaciones no estudiadas anteriormente, y se logró identificar mediante técnicas cromatográficas (CCF y CLAE) y espectroscópicas (RMN-¹H) la presencia de galfiminas en las poblaciones de Doctor Mora, Gto.; Zimapán, Hgo.; Cadereyta, Qro. y Jalpan, Qro. Adicionalmente se realizó un análisis molecular en donde se emplearon 6 códigos de barras de ADN (matK, rbcL, rpoC1, psbA-trnH, ITS1 e ITS2), lo que permitió sugerir que las poblaciones estudiadas potencialmente pertenecen a cuatro especies diferentes del género *Galphimia*.

1.2.9 Taxonomía de la Especie *Galphimia glauca*

1.2.9.1 Aspectos Botánicos de la Planta *Galphimia Glauca*

El nombre de *Galphimia glauca* se ha aplicado a la mayoría de las especies mexicanas de *Galphimia*, y se caracteriza por sus inflorescencias de color amarillo con pétalos persistentes, debido a la temprana introducción de *Galphimia* a la horticultura. El Herbario de la Universidad de Michigan, propone la siguiente clasificación taxonómica para la especie *G. glauca*.

Tabla 1. Taxonomía de la planta *Galphimia glauca*. (Herbarium.Isa.umich.edu).

Reino	Plantae
Phyllum	Tracheophyta
Clase	Magneolopsida
Orden	Polygalales
Familia	Malpighiaceae
Género	<i>Galphimia</i>
Especie	<i>Galphimia glauca</i>

1.2.9.2 Morfología y Distribución Geográfica de *Galphimia glauca*



Figura 2. Planta *Galphimia glauca*.
(www.herbarium.lsa.umich.edu).

Es un arbusto de 2-3 m de alto; todas sus partes vegetativas están recubiertas principalmente por tricomas de color rojizos y cafés de 0.2-0.6 mm de longitud. Las hojas miden 1.5-5 cm de largo y 1.3-3.5 cm de ancho, son elípticas u ovaladas, rara vez suborbiculares, tienen una punta apiculada. Los pétalos miden 0.4-1.5 cm de largo son ligeramente serosos. Las

glándulas usualmente se encuentran por pares, cada glándula mide 0.4-0.7 mm de diámetro. Los frutos son capsulas globosas ligeramente triboladas, de 6 cm de diámetro conteniendo las semillas. Las inflorescencias se localizan en la parte superior en forma de racimo terminal densamente voluminoso de color amarillo. Los pétalos son abundantes de color amarillo no uniforme, su margen es finamente denticulado; los pétalos de las flores laterales de la punta miden 1.5-2 mm de largo y 0.5 mm de ancho; los pétalos más grandes de la flor miden 7.5-9.5 mm de largo y 5-6.5 mm de ancho tienen forma elíptica. Generalmente son triangulares y su vértice es redondeado. En cuanto a los ovarios; presentan un estilo de 5.5-6.7 mm de longitud. En relación a su fenología, la colecta de flores es durante el mes de noviembre a enero y el fruto de mayo a enero.

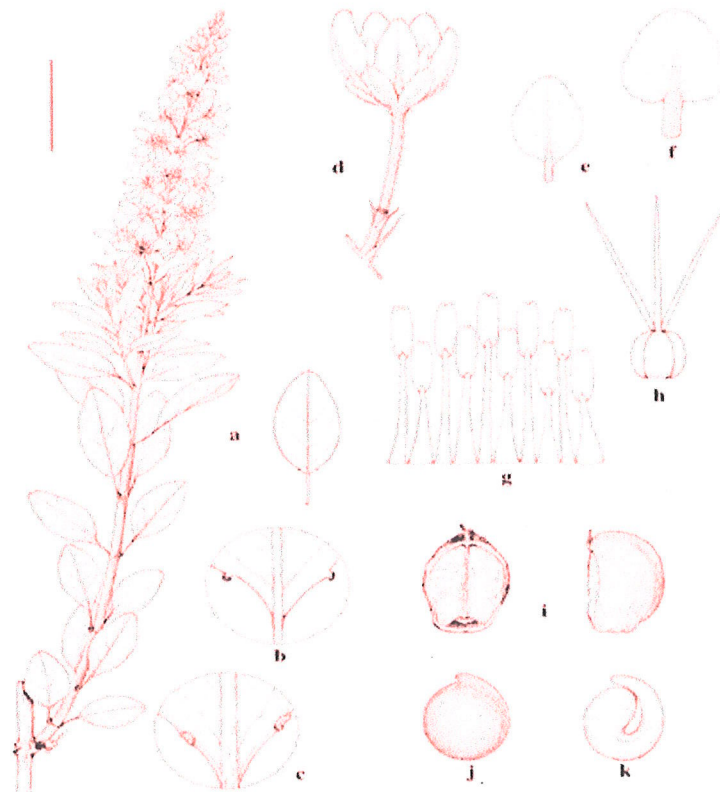


Figura 3. *Galphimia glauca*. a. Rama con flores y hojas separadas a la derecha. b, c. Base de las hojas mostrando las glándulas. d. Flor abierta. e. Pétalo lateral. f. pétalo posterior g. androceo h. gineceo i. cubierta de semilla j. semilla k. embrión (Anderson, 2007).

Distribución en México (Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas y Morelos); la especie *G. glauca* se encuentra en bosque caducifolio, bosque de pinos, bosque de robles-pinos, matorrales y en los alrededores de algunas carreteras (figura 4).



Figura 4. Distribución geográfica de *Galphimia glauca* en diferentes estados de la República Mexicana, puntos verdes indican los estados en donde se encuentra la planta (Anderson, 2007; Sharma et al., 2012).

Con el fin de investigar si la acumulación de galfiminas es el resultado de un control genético, o bien de condiciones ambientales, en la presente investigación realizamos un análisis fitoquímico aplicando procedimientos cromatográficos CCF y CLAE a todos los individuos de seis poblaciones que fueron estudiadas en un trabajo previo: Doctor Mora, Gto. (GM); Jalpan, Qro. (QJ); Cuernavaca, Mor. (MC); Tepoztlán, Mor. (MT), Guadalajara, Jal. (JG) y Tuxtla Gutiérrez, Chis. (CT)], y que fueron aclimatados en condiciones de invernadero, además de germinar sus semillas en condiciones *in vitro*. Adicionalmente y debido a que el proceso de aclimatación en condiciones del invernadero implica variaciones ambientales en términos de luz y humedad que influyen en el fenotipo de las plantas (Pigliucci *et al.*, 2006;

Sultan, 1995), once meses después de su trasplante a condiciones de invernadero se realizaron estudios morfométricos de las hojas colectadas de las plantas silvestres, así como del follaje de los mismos individuos, Si la producción de galfiminas responde al control genético, se predice que los individuos colectados de poblaciones silvestres activas deberían producir galfiminas en el invernadero y en condiciones *in vitro*; en tanto que, los especímenes inactivos en su entorno silvestre no producirían triterpenos en las condiciones controladas del invernadero ni en la plántulas germinadas *in vitro*.

2. Justificación

En la actualidad, no es claro si las diferencias observadas en la acumulación de galfiminas con actividades sedante y ansiolítica en individuos de diversas poblaciones de la especie vegetal que ha sido botánicamente clasificados como *Galphimia glauca*, se debe a diferencias genéticas entre las poblaciones, o si son producto de su entorno ecológico. Por ello se ha planteado que una de las formas de abordar esta problemática es determinar los perfiles químicos de individuos provenientes de diferentes poblaciones de la planta, que serán crecidas en el modelo experimental de jardín común con condiciones uniformes y controladas de invernadero, y en condiciones *in vitro*. Además, se realizará un estudio morfológico del follaje de las plantas silvestres y las aclimatadas en invernadero, debido a la variabilidad climática que podría influir en el fenotipo de estas últimas.

Por lo anterior, resulta relevante realizar análisis químicos cromatográficos con CCF y CLAE, de individuos de *Galphimia sp.* provenientes de poblaciones colectadas en diversas localidades de la República Mexicana, que serán cultivados en invernadero por un periodo de once meses y en condiciones *in vitro*; para después comparar sus perfiles con los de plantas silvestres. Será importante, asimismo realizar un estudio morfológico del follaje de los individuos silvestres *versus* los individuos aclimatados en invernadero durante once meses.

3. Hipótesis

La presencia de galfiminas en individuos de *Galphimia* sp. provenientes de diferentes poblaciones creciendo en la República Mexicana responde a factores genéticos, por lo que, de las seis poblaciones colectadas, aquellos individuos que pertenecen a dos poblaciones que sintetizan los compuestos activos en condiciones silvestres seguirán produciéndolos tanto en condiciones uniformes y controladas de invernadero como en condiciones *in vitro*. El fenotipo de las plantas aclimatadas en invernadero se mantendrá durante su aclimatación en condiciones de invernadero, por lo que sus características morfológicas de las hojas se mantendrán durante este periodo.

4. Objetivos

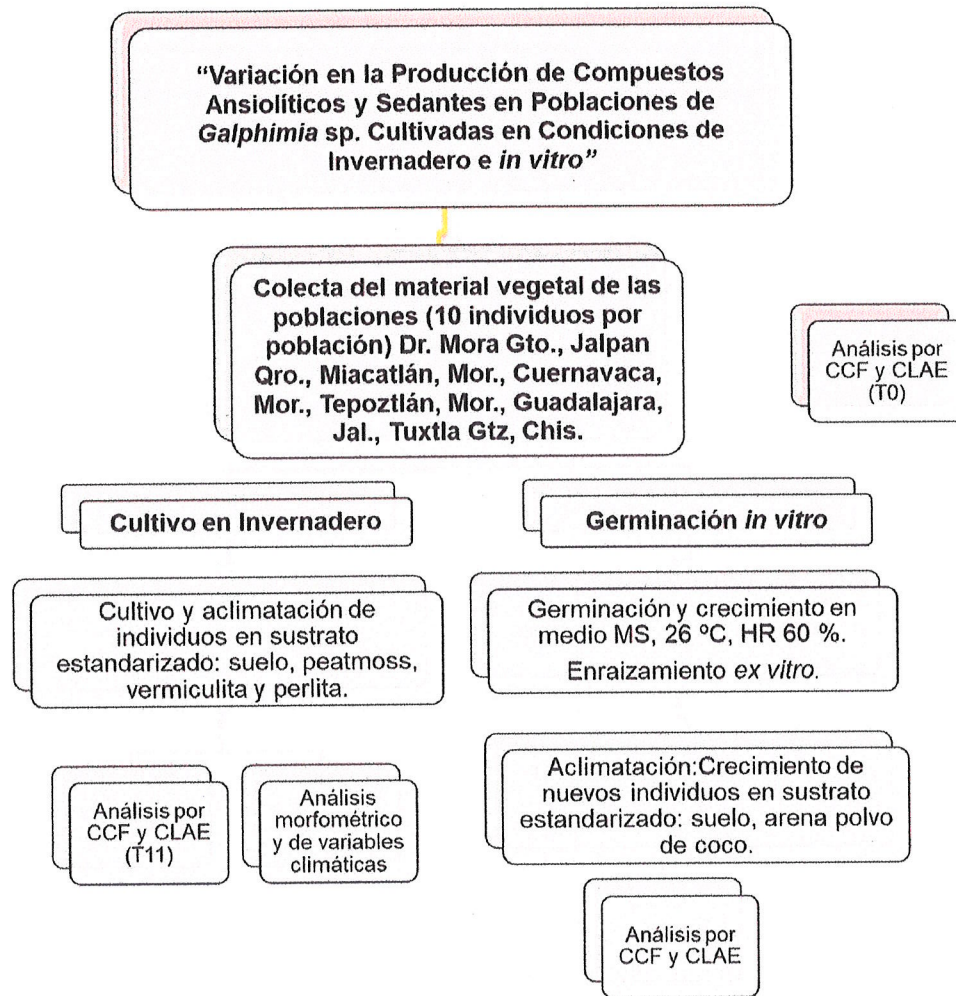
4.1 Objetivo General

Evaluar las diferencias químicas y morfológicas de 7 poblaciones de la especie *Galphimia sp* de las plantas cultivadas en invernadero y en condiciones *in vitro*.

4.2 Objetivos Específicos

- Identificar y cuantificar las galfiminas en individuos silvestres de 7 poblaciones de *Galphimia sp*. por medio de cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).
- Aclimatar individuos silvestres de las 7 poblaciones naturales de *Galphimia sp*. transfiriéndolos para ser cultivados en el modelo experimental de jardín común bajo condiciones uniformes y controladas de invernadero.
- Identificar y cuantificar las galfiminas en individuos de las diferentes poblaciones de las plantas cultivadas en condiciones de invernadero por medio de cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).
- Comparar los perfiles químicos de las plantas de *Galphimia sp*. aclimatadas en condiciones controladas de invernadero vs los individuos silvestres.
- Caracterizar las diferencias morfológicas foliares de los individuos provenientes de las 6 poblaciones de *Galphimia sp*. cultivadas bajo condiciones uniformes y controladas de invernadero por un periodo de once meses.
- Identificar y cuantificar las galfiminas en individuos de las diferentes poblaciones de las plantas crecidas *in vitro* por medio de cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

4. Estrategia Experimental



6. Materiales y Métodos

6.1 Recolección del Material Vegetal

Se colectaron 10 individuos y sus semillas de 7 poblaciones de la planta botánicamente clasificada como *G. glauca* provenientes de las siguientes localidades: Guanajuato (Dr. Mora), Morelos (Miacatlán, Cuernavaca y Tepoztlán), Querétaro (Jalpan), Jalisco (Guadalajara) y Chiapas (Tuxtla Gutiérrez). Posteriormente se realizó la separación de las semillas para su germinación *in vitro* y en condiciones de invernadero. Las plantas se identificaron en el Herbario HUMO de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos asignándoles un número de voucher, (Tabla 2).

Tabla 2. Características de las 7 poblaciones colectadas de *Galphimia* sp.

Población	Voucher	Localidad	Tiempo y fecha de colecta	Posición	Altitud	Ecosistema
	Herbario HUMO					
GM	15189	Doctor Mora, Guanajuato	Septiembre 16 12:00-13:00 h	21° 06.74 N 100° 19.22 W	2120	Semi-árido, vegetación secundaria
QJ	15421	Jalpan de Serra, Querétaro	Septiembre 15 15:00-16:00 h	21° 28.50 N 99° 28.57W	1548	Bosque de pino-encino
MC	15011	Cuemavaca, Morelos	Septiembre 10 13:00-14:00 h	18° 45.57N 99° 13.48 W	2204	Bosque tropical
MT	15485	Tepoztlán, Morelos	Septiembre 6 12:00-13:00 h	18 ° 59.35 N 99° 06.97 W	1700	Estacional-Bosque tropical seco de vegetación secundaria

JG	15014	Guadalajara, Jalisco	Septiembre 20 14:00-15:00 h	20° 40.67 N 103° 19.95W	1585	Estacional-Bosque tropical seco de vegetación secundaria
CT	15018	Tuxtla Gutiérrez, Chiapas	Septiembre 28 11:00-14:00 h	16° 49.52 N 93° 05.95 W	559	Bosque de pino-encino

6.2 Aclimatación en Invernadero de los Individuos Silvestres de las 7 Poblaciones de *Galphimia* sp.

El sembrado de los 10 individuos colectados de cada población, se realizó en un sustrato comercial adicionado con suelo de monte, peat moss, vermiculita y perlita (1:1:2:2). Los periodos de riego fueron 3 veces a la semana con 5 litros de agua por planta y 1 gr de fertilizante mensual (Miracle-Grow Company OH, USA), esto para un buen crecimiento. Los individuos colectados se colocaron en un espacio aislado territorialmente con luz y temperatura ambiental. Las plantas se clasificaron de acuerdo al grosor de su tallo determinado de manera visual (chico, mediano, grande).

6.2.1 Caracterización Morfológica y Heterogeneidad Ambiental de los Individuos Silvestres Aclimatados en Invernadero.

Para llevar a cabo la caracterización morfológica se tomaron muestras de hojas a los 3, 7 y 11 meses de aclimatación de las 7 poblaciones y se midieron las siguientes variables:

forma de la hoja, longitud de eje mayor y longitud de eje menor. Además, se tomaron datos de fenología de estos individuos silvestres; época de follaje y floración. El área de la hoja se calculó utilizando la ecuación de una elipse. Utilizamos mediciones repetidas ANOVA (rmANOVA) para analizar el efecto de la población (seis localidades), el tiempo (11 meses) y el término de interacción (población x tiempo) en la variación en el área de la hoja en réplicas de 5 individuos por población.

Con el fin de explorar si las variables ambientales climáticas se correlacionan con los patrones derivados de análisis químicos, realizamos un Análisis de Componentes Principales (PCA) sobre los valores medios mensuales de las variables climáticas (es decir, la temperatura media anual, temperaturas medias máximas, y la precipitación media anual, (<https://www.es.climate-data.org/>)).

6.2.2 Cromatografía en Capa Fina (CCF) de los Individuos Silvestres Aclimatados en Invernadero.

Se realizaron extractos metanólicos (100 mg/1 ml de MeOH) de las 7 poblaciones se sonicación 10 min, esto se repitió 4 veces las muestras se aplicaron en una cromatoplaque de aluminio recubiertas con 0.25 mm de gel de sílice. Como fase móvil se utilizó acetato de etilo con cloroformo a una proporción de 2:1. La visualización de los compuestos se realizó a través de la reacción con el agente cromógeno vainillina y H₂SO₄ al 1% (0.1 g en 10 mL) y finalmente la cromatoplaque se calentó a 100 °C para observar la presencia de los triterpenos que se

caracterizan por presentar un color violeta. Previo al revelado con el agente cromogénico se procedió a visualizar las placas mediante luz UV de longitud de onda corta y larga.

6.2.3 Generación de Perfiles por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) de los Individuos Silvestres de *Galphimia sp.* Aclimatados en Invernadero.

Se utilizó un equipo de CLAE, marca Waters, (MilliporeCorp, Waters). Este equipo cuenta con un sistema de distribución de disolventes (bomba 600), un detector UV con arreglo de diodos (410), inyector manual y un procesador de datos (Windows XP). Se realizaron extractos metanólicos de las 7 poblaciones (100 mg/1 ml de MeOH, sonicación 10 min, esto se repite 4 veces). Se utilizó una columna analítica Waters Symmetry Columns (4.6 X 250 mm). Para correr las muestras en el equipo de CLAE se programaron las siguientes condiciones: elución isocrática con CH₃CN: H₂O (48:52), una velocidad de flujo de 0.7 mL/min, un volumen de inyección de 20 µL, una presión de 1200 psi y la detección por UV a una longitud de onda de 232 nm (Taketa *et al.*, 2008, Sharma *et al.*, 2012).

6.3 Micropropagación

Las semillas de *G. glauca* se liberaron de la cubierta protectora y se almacenaron en el refrigerador a 4°C por un período de 5 a 10 días; más adelante, se mantuvieron a temperatura ambiente de 2 a 3 días. Posteriormente se esterilizaron de la siguiente manera: se colocaron en tubos Falcón y en agitación por 10 minutos en una solución de cloro comercial al 10 %, se realizaron 4 lavados con agua destilada estéril por un lapso de 5 minutos en agitación constante para quitar el exceso de cloro (Nader *et al.*, 2004).

6.3.1 Germinación y Crecimiento

Se colocaron 10 semillas desinfectadas de cada uno de los 10 individuos de cada población en frascos de vidrio de 250 ml conteniendo 40mL de medio MS y 0.7 % de agar (previamente, todos los medios se ajustaron a un pH de 5.7 y se esterilizaron a 120 °C y 1.5 kg.cm² por 15 minutos). Estos cultivos fueron incubados a 26 °C con una humedad relativa de 60% y un fotoperiodo constante con una intensidad de luz de 40 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ proveniente de una lámpara fluorescente de luz blanca (Nader *et al.*, 2004).

6.3.2 Etapa de Inducción a Brotación Múltiple

Para llevar a cabo la inducción de brotes, se extrajeron segmentos nodales de las plántulas germinadas asépticamente, estos se inocularon en medio MS. Posteriormente se realizó la comparación de la morfogénesis que presentaron los individuos de cada población. Los parámetros que se registraron cada 30 días por un periodo de 5 meses son los siguientes: altura de los brotes, tamaño de hojas, número de hojas por tallo y número de yemas por brote. Los datos serán analizados estadísticamente mediante análisis de varianza (Rojas *et al.*, 2005).

6.3.3 Etapa de enraizamiento y aclimatación

Se evaluaron 3 protocolos diferentes para llevar a cabo la etapa de enraizamiento *in vitro*:

- A) Protocolo modificado reportado por Rojas *et al.*, 2005, los brotes de mayor tamaño de *G. glauca* fueron transferidos a medio MS basal al 50 % de sales, complementado con 3 % de sacarosa, 2, 3 y 4 mg/Lt de IBA y 1 g/L de PVP, por un periodo de 30 días.
- B) En el segundo ensayo de enraizamiento *in vitro* se utilizó el mismo protocolo de Rojas *et al.*, 2005 pero se utilizó medio 1/2 MS suplementado con una mezcla de 0.1 mg/Lt cinetina (KN) con 3 mg/Lt ácido indol-3- butírico (IBA), 3% de sacarosa y 1 gr/Lt de polivinilpirrolidona (PVP). Se seleccionaron brotes de 2.5 cm, se colocaron 5 réplicas por individuo de cada población.
- C) Un tercer protocolo de enraizamiento descrito por Sadegui *et al.*, 2015 en donde utilizó brotes de 2-3 cm cultivados en medio ½ MS suplementado con 0.5 mg/Lt de IBA, 20 % de sacarosa, 7.5 gr/Lt de gar, 1.6 mg/Lt de tiamina y 150mg/Lt de EDTA, 5 réplicas por población. Puesto que la tiamina es esencial en la formación y aceleración de crecimiento de raíces, además que los quelatos protegen de la oxidación, permitiendo aportar elementos nutricionales asimilables en las raíces. Estos frascos se mantuvieron una semana en oscuridad y posteriormente se colocaron en el cuarto de cultivo con luz constante.

6.3.4 Etapa de Enraizamiento

En esta etapa de enraizamiento se llevaron a cabo dos protocolos:

- A) Rojas *et al.*, 2005. En el cual después de 30 días de cultivo *in vitro*, las plantas fueron removidas de los frascos, impregnadas de Radix 10000 y transferidos a recipientes de 250 mL con una mezcla de suelo, vermiculita y perlita (2:1:1 v/v). Cada plántula fue cubierta

con plástico para mantener un % HR del 90% y un 70% de sombra, además de dos periodos de irrigación por día. Después de 20 días se removió gradualmente el plástico y las condiciones para las plantas fueron gradualmente cambiadas a un invernadero para su crecimiento.

B) Se utilizó otro protocolo de aclimatación seguido por Ranaweera *et al.*, 2013 y Patel *et al.*, 2014. En los cuales se seleccionaron plántulas de 3-4 cm de altura y se lavaron con agua esteril 6-8 tiempos. Se colocaron 4 min en una solución de IBA (300 mg/lit), posteriormente se pasaron a frascos con una mezcla de sustrato (polvo de coco, suelo y arena). Este ensayo se realizó por triplicado. Periodo de riego 1c/24 hrs. Se colocaron en el cuarto de cultivo por una semana en oscuridad, posteriormente se llevaron a un invernadero con un 50 % de iluminación y un valor de humedad relativa de 60%.

6.3.5 Prueba de Viabilidad con Tetrazolio

Se colocaron 100 semillas por población en una solución acuosa a 45 °C durante un periodo de 24 horas, pasado este tiempo con la ayuda de un bisturí se realizó un corte longitudinal a cada semilla para poner el Tetrazolio en contacto con los tejidos del embrión. Las semillas fueron sumergidas en una solución de Tetrazolio al 1% por un lapso de tiempo de 4 horas. Finalmente, la evaluación se realizó con base al patrón de tinción. Los tejidos teñidos de rojo son lo que esta viables (ISTA 2007).

6.3.6 Cromatografía en Capa Fina (CCF) de los Individuos Germinados *In Vitro*.

Se realizaron siguiendo el mismo protocolo reportado en el punto 6.2.2.

6.3.7 Generación de Perfiles por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) de los Individuos Germinados *In Vitro*.

Se realizaron siguiendo el mismo protocolo reportado en el punto 6.2.3.

6.4 Germinación de Semillas en Maceta de *Galphimia sp.*

Se llevó a cabo la siembra de semillas de los 10 individuos de cada población en charola de 50 pozos para su propagación. La composición del sustrato por charola fue la siguiente: suelo, peatmoss, vermiculita, perlita (2:2:1:1 v/v) adicionado con fertilizante. Posteriormente las charolas se colocaron en el invernadero con un periodo de riego de 1 ocasión cada 3 días. Se realizaron registros de porcentajes de germinación de cada población. Cada 20 días por un lapso de 1 año, se evaluaron los diferentes estadios de la nueva planta, es decir, se realizó la comparación de la morfogénesis que presentan los individuos de cada población. Los parámetros que se registraron son los siguientes: altura de los brotes, tamaño de hoja, número de hojas por tallo y número de yemas por brote (Rojas *et al.*, 2005).

7. Resultados

7.1 Aclimatación en Invernadero de Ejemplares Silvestres de las 7 Poblaciones de *Galphimia* Sp.

7.1.1 Aclimatación de los Individuos Silvestres de las 7 Poblaciones de *Galphimia* sp.

A los 30 días de haber sembrado cada grupo de individuos, éstos comenzaron a mostrar nuevos brotes vegetativos y axilares. Cabe resaltar que los individuos de tallo grande presentan una mejor adaptación al nuevo sustrato y condiciones ambientales al que fueron sometidos en el invernadero. El porcentaje de supervivencia de estos individuos fue del 50 %.

7.1.2 Caracterización Morfológica y Heterogeneidad Ambiental de los Individuos Aclimatados en Invernadero de *Galphimia* sp.

Los ejemplares adaptados a condiciones de invernadero después de 3 meses se recubrieron de partes vegetativas como hojas y tricomas, mostrando diferencias morfológicas notables, ya que los individuos de Dr. Mora Gto., son arbustos de no más de 50 cm de altura, mientras que el resto de las poblaciones los tallos alcanzan una altura de 2.5 m. Además, el tamaño de las hojas mostró variaciones drásticas, ya que las poblaciones que pertenecen a Morelos y Jalisco presentan hojas que llegan a medir hasta 10 cm de largo, mientras las poblaciones de Guanajuato y Querétaro apenas y midieron 3.4 cm de largo, y por lo regular

tienen forma ovalada, finalmente las de Chiapas son hojas que miden 4-5 cm de largo, pero se diferencian de las demás porque son más alargadas, (figura 5).

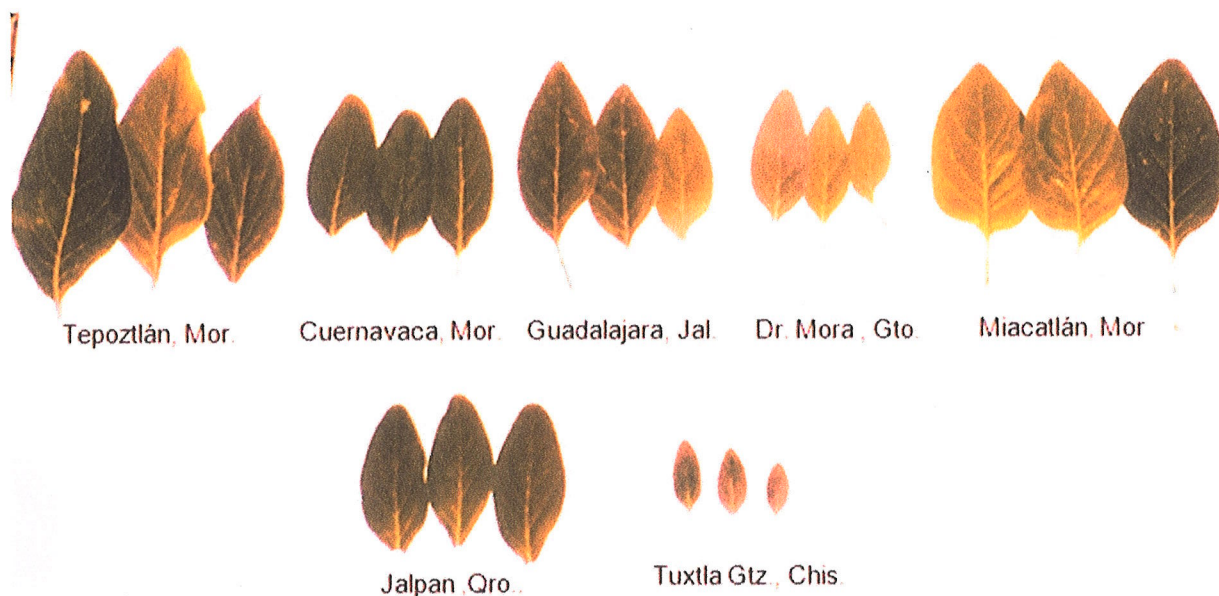


Figura 5. Comparación de las hojas de las siete poblaciones de *Galphimia* sp. de los ejemplares aclimatados durante 3 meses en condiciones de invernadero.

Posteriormente a los 6-7 meses de aclimatación durante los meses de agosto y septiembre, los individuos correspondientes a las poblaciones de Guanajuato y Querétaro comenzaron a presentar inflorescencias de color amarillo rojizo en forma de racimo único, mientras que en el mes de septiembre y octubre las poblaciones de Guadalajara y Morelos también comenzaron a florecer, pero las inflorescencias se presentaron en forma de varios racimos. En el mes de noviembre la población de Chiapas inició su etapa de floración con las mismas características morfológicas que las poblaciones de Guanajuato y Querétaro, (figura 6).

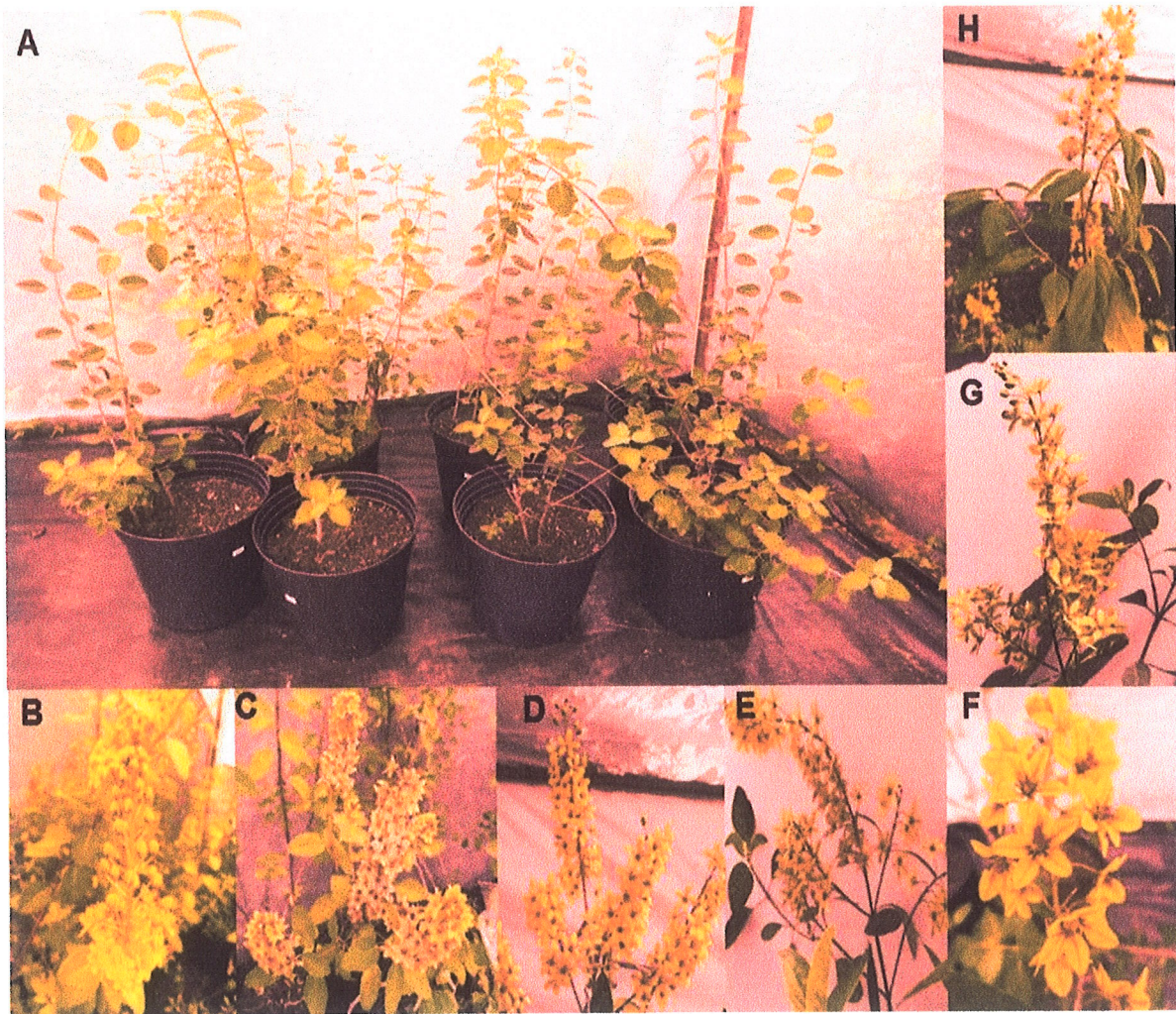


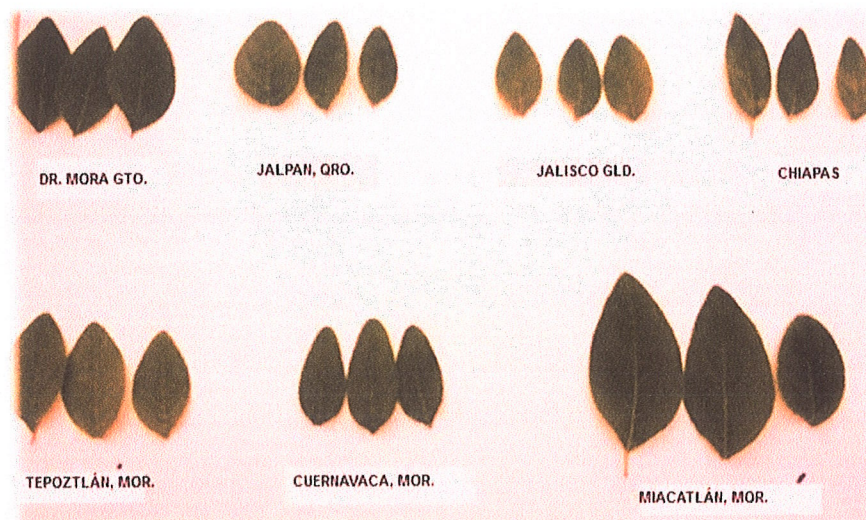
Figura 6. Individuos de *Galphimia* sp. aclimatados en condiciones de invernadero. A, Individuos aclimatados sin la presencia de inflorescencias B-H, individuos en su etapa de floración, mostrando diferencias morfológicas notables en el rearreglo de sus inflorescencias. B (Jalpan, Qro.), C (Dr. Mora, Gto.), D (Guadalajara, Jal), E (Miacatlán, Mor), F (Tepoztlán, Mor), G (Cuernavaca, Mor.) y H (Tuxtla Gtz. Chi.)

Se determinó que el periodo de pérdida de follaje fue durante los meses de diciembre-enero, mientras que su revestimiento ocurrió durante el mes de febrero. Además, se observó que la floración se presentó de forma distinta a la presentada al tiempo de la colecta (figura 7).



Figura 7. Plantas aclimatadas en invernadero de *Galphimia* sp, durante un periodo de 11 meses mostrando que el revestimiento de su follaje es uniforme.

Asimismo, se realizó un análisis de algunas variables morfométricas de las hojas y se determinó que las hojas de 6 poblaciones siguen un mismo patrón morfológico a los 11 meses de aclimatación en invernadero. Dicho cambio se podría atribuir a un proceso de plasticidad fenotípica adaptativa ya que este proceso es la capacidad de un individuo de producir fenotipos diferentes en respuesta a cambios en el medio ambiente y como ya se había comentado anteriormente todos los individuos recolectados se encuentran en las mismas condiciones. Mientras que las hojas de la población de Miacatlán siguieron otro patrón morfológico (figura 8).



Variables morfométricas	Tepoztlán Mor.	Cuernavaca Mor.	Guadalajara, Jal.	Dr. Mora	Miacatlán, Mor.	Jalpan Qro.	Chiapas
Forma de la hoja/ índice de redondez	Alargada elíptica	Alargada elítica	Alargada	Alargada	Elíptica ovalada	Alargada elíptica	Alargada
Longitud del eje mayor (cm)	7	7	5	6.5	11	5.5	6.5
Longitud de eje menor (cm)	3	2	2.5	2	4	2.5	2

Figura 8. Variables morfométricas de las hojas de los individuos aclimatados en invernadero de las diferentes poblaciones de *Galphimia* sp. después de 11 meses en invernadero

En el estudio de la variación en el área de la hoja, el rmANOVA mostró un efecto significativo dependiendo de la identidad de la población ($F_{(6)}$ a 18,89, $p < 0,0001$), el tiempo ($F_{(1)}$ a 7,72, $p < 0,011$) y el término de interacción (población x tiempo) ($F_{(6)}$ a 24,90, $p < 0,0001$). Al inicio del experimento, el área media de la hoja osciló entre 7 y 33 cm² en las seis poblaciones. En última instancia, el valor medio para el área de la hoja entre todas las poblaciones fue de casi 20 cm² (Figura 9). Sin embargo, mientras que la mayoría de las poblaciones mostraron una reducción en el área de la hoja, las plantas de GM mostraron claramente la tendencia opuesta. Los individuos de la población GM suelen crecer en un clima

semiárido con escasa vegetación secundaria (Sharma et al., 2012a), lo que permite que la luz acceda directamente a las plantas. Cuando fueron trasplantados al invernadero, mostraron un incremento en el tamaño de las hojas en respuesta a una menor disponibilidad de luz con respecto a su hábitat natural, situación que se ha observado para otras especies de plantas (Xu et al., 2009). Estos resultados indican que la variación en el área de la hoja se debió a la plasticidad fenotípica.

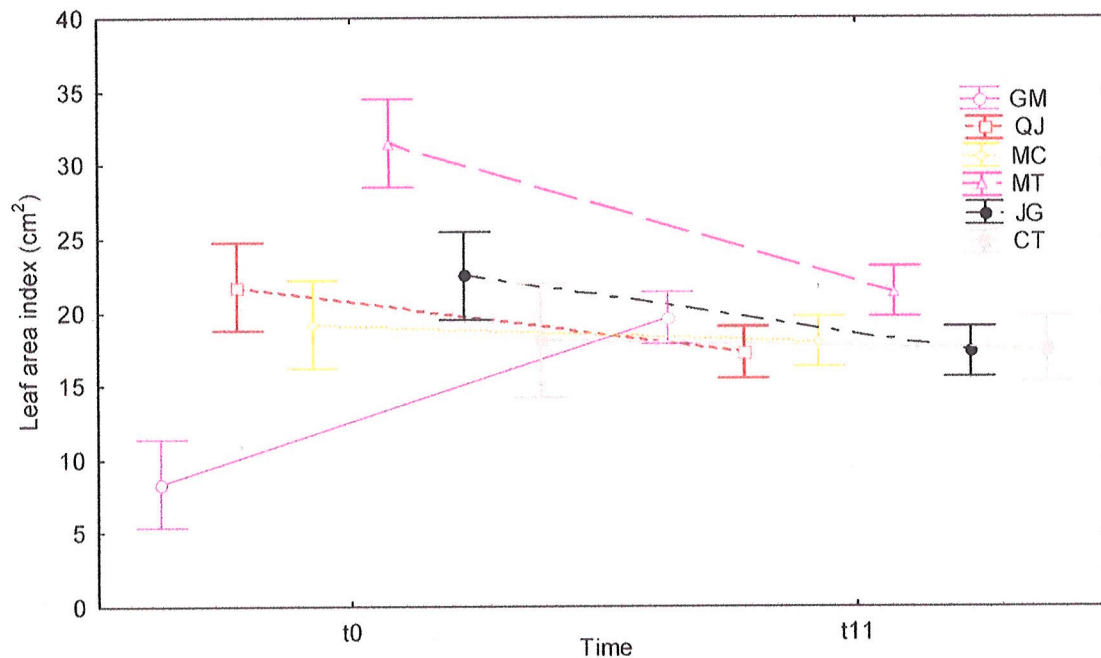


Figura 9. Influencia del tiempo sobre el índice de área foliar de seis poblaciones de *Galphimia* sp. aclimatadas en condiciones de invernadero (GM: Dr. Mora, Gto.; QJ: Jalpan, Qro.; MC: Cuernavaca, Mor.; MT: Tepoztlán, Mor.; JG: Guadalajara, Jal.; y CT: Tuxtla Gtz., Chis.). Periodo de tiempo inicial (t_0) y final (t_{11}) (Intervalo de confianza del 95%).

El análisis de componentes principales indica que la producción de galfiminas no depende de factores ambientales climáticos. Las tres variables que describen la temperatura se

correlacionan en gran medida con el Factor 1 (Cargas que van de 0,89 a 0,98). Por el contrario, la precipitación se correlacionó altamente con el Factor 2 (carga 0.87). Así, dentro del espacio multivariado, las dos poblaciones activas no compartían las condiciones climáticas más similares, ya que GM (población activa) y JG (población inactiva) se encontraban hacia valores negativos en términos de Factor 1, lo que indica temperatura similarmente baja. Por el contrario, QJ (población activa), estuvo expuesto a un clima más similar al observado para las poblaciones de MC y MT (Figura 10). Los resultados de las plantas en condiciones de invernadero proporcionaron pruebas directas de que la acumulación de estos triterpenos es independiente de las condiciones ambientales a las que estaban expuestos, ya que las seis poblaciones fueron sometidas a las mismas condiciones físicas de sustrato, luz, humedad y temperatura.

cuales reflejaron las diferencias reportadas por Sharma *et al.*, 2012. Este perfil cromatográfico se consideró como el control en relación a los ensayos posteriores. En la figura 11, se muestra el perfil químico (orden de poblaciones que presentan los compuestos de interés) de la población de Jalpan Querétaro y Dr. Mora Guanajuato, mostrando similitud en cuanto a la presencia de las galfiminas que revelan de color morado, no obstante, se hace mención que las muestras de Querétaro no presentan un perfil uniforme con respecto a la familia de las galfiminas, por ejemplo, el individuo E no presenta la galfimina B mientras que el resto de las muestras si presentan las galfiminas A y B. Con respecto al perfil de la población proveniente de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, esta presenta unos compuestos de color anaranjado presentes también en la población de Querétaro, pero no la presencia de las galfiminas. En tanto que el perfil químico de las poblaciones de Guadalajara y Morelos comparten un patrón similar con la presencia de compuestos que revelan en color azul los cuales no han sido identificados, pero se ha sugerido que posiblemente corresponden a los derivados del ácido gálico. Finalmente, el patrón cromatográfico revelado por la población de Cuernavaca, Morelos, no presenta compuestos con este sistema de elución. En resumen, con este perfil químico es posible corroborar que la planta de *Galphimia* sp. colectada en diferentes estados de la República Mexicana presenta una variación importante en el contenido de los compuestos bioactivos (familia de las galfiminas), pero únicamente en las poblaciones que inicialmente presentan estos compuestos.

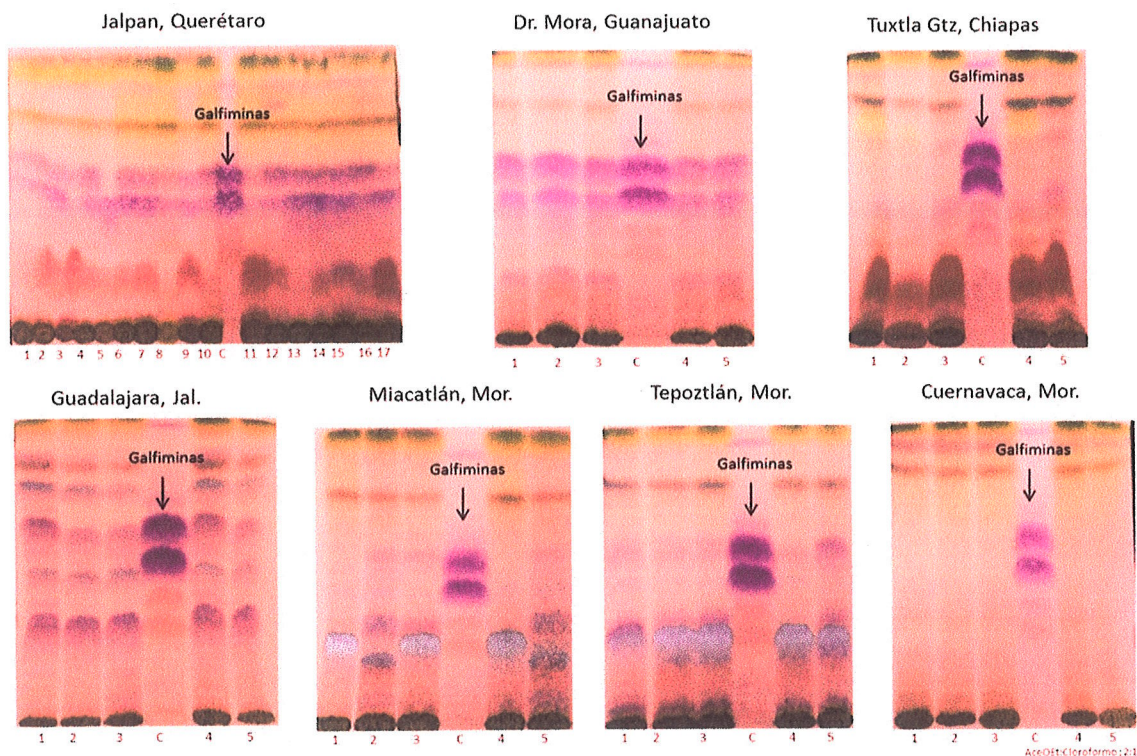


Figura 11. Perfil cromatográfico en capa fina de las 7 poblaciones colectadas en diferentes localidades de la República Mexicana a tiempo 0. En 6 poblaciones se corrieron muestras correspondientes a 5 individuos excepto en la población de Jalpan, Qro., en la cual se corrieron muestras de los 17 individuos colectados. Se utilizó como control una fracción purificada de la familia de galfiminas denominada con la letra C. El sistema de fase móvil utilizado fue acetato de etilo:cloroformo (2:1 v/v).

Posteriormente, se realizó un análisis cromatográfico comparativo con las hojas nuevas de los individuos recolectados y aclimatados en maceta (7 meses). Los perfiles químicos son mostrados en la figura 12 en donde la población de Jalpan, Qro. y Dr. Mora, Gto. Presentan las galfiminas que revelan en color morado-violeta, mientras que para la población de Tuxtla Gtz., Chi., siguen presentes los compuestos de color anaranjado, en tanto que, para las poblaciones de Guadalajara, Jal., y Miacatlán se siguen presentado los

compuestos de color azul y finalmente para la población de Cuernavaca, Mor., no se observa la presencia de ningún compuesto con este sistema cromatográfico.

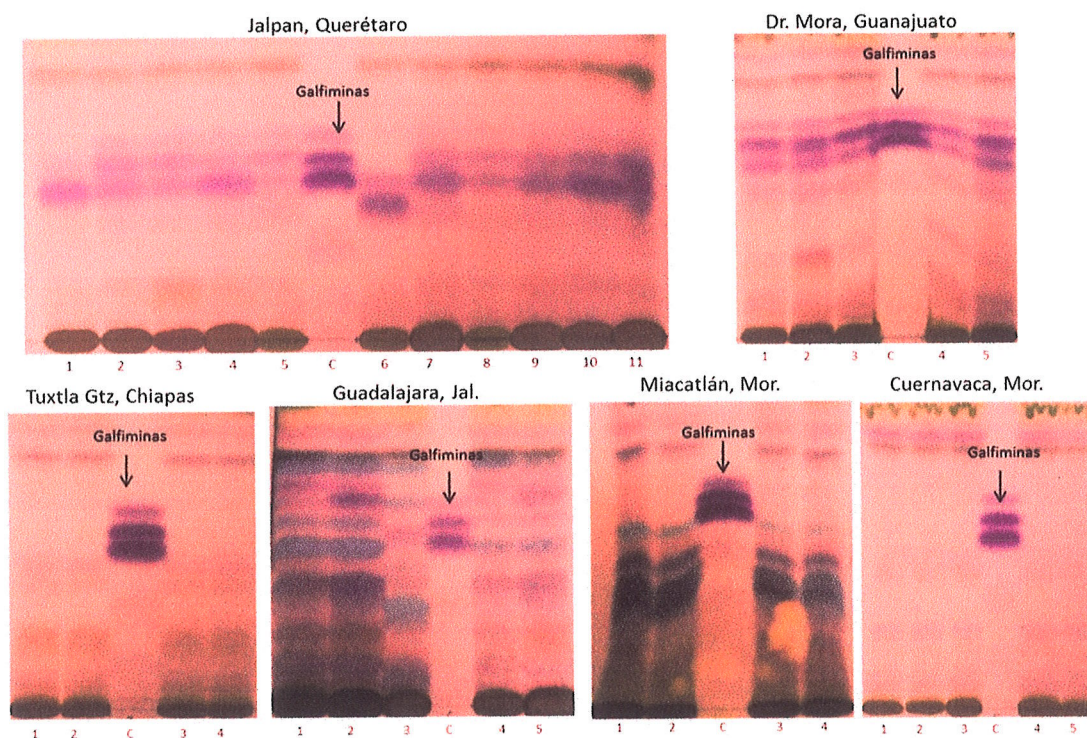


Figura 12. Perfil cromatográfico en capa fina de las 6 poblaciones colectadas en diferentes localidades de la República Mexicana, a 7 meses de aclimatación en invernadero. En 5 poblaciones se corrieron muestras correspondientes a 5 individuos excepto en la población de Jalpan, Qro., en la cual se corrieron muestras de los 11 individuos colectados. Se utilizó como control una fracción purificada de la familia de galfiminas denominada con la letra C. El sistema de fase móvil utilizado fue acetato de etilo:cloroformo (2:1 v/v).

Finalmente se llevó a cabo la recolecta de las hojas de cada individuo aclimatado en invernadero (11 meses) para la obtención de los extractos metanólicos y el análisis químico por cromatografía en capa fina, resultando lo siguiente: en las poblaciones de Miacatlán, Tepoztlán y Jalisco los compuestos de color azul, se mantienen presentes a pesar de los cambios morfológicos observados en las plantas; mientras que las poblaciones correspondientes a Dr. Mora y Jalpan que contienen las galfiminas los siguen presentando de manera similar al tiempo cero de recolecta y la población de Chiapas siguen estando presentes los compuestos de color anaranjado (figura 13 A y B).

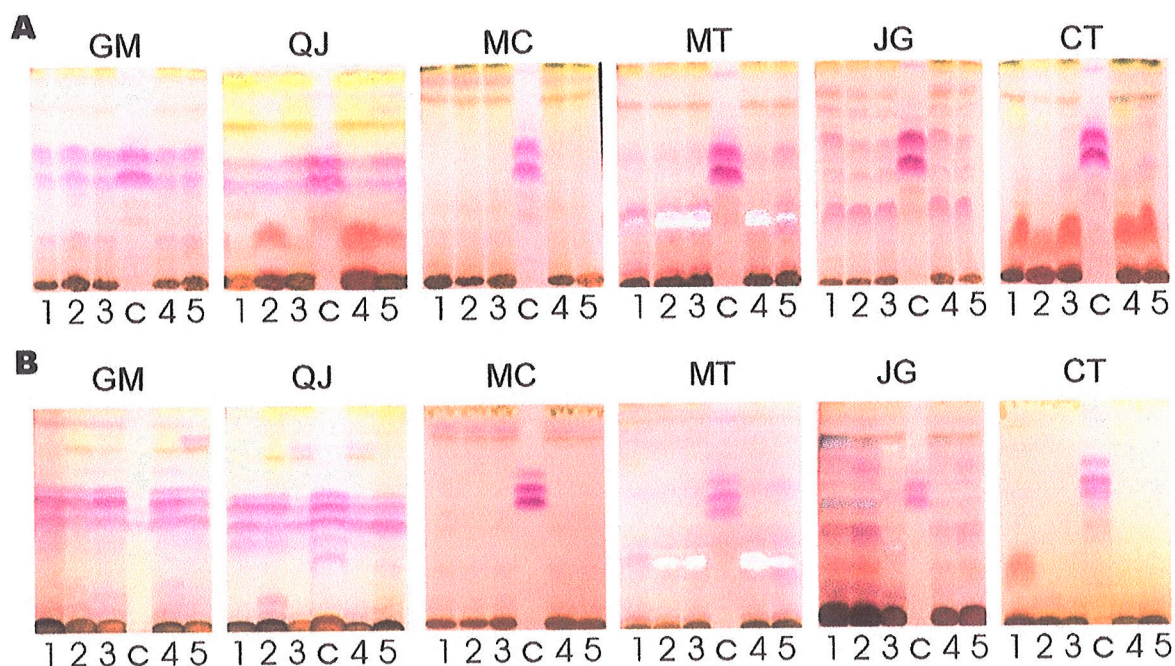


Figura 13. Perfiles por cromatografía en capa fina de *Galphimia* sp. **A)** Perfil cromatográfico de los individuos aclimatados en invernadero de algunas poblaciones de *Galphimia* sp. (0 meses) **B)** Perfil cromatográfico de los individuos aclimatados en invernadero de algunas poblaciones de *Galphimia* sp. (11 meses). GM: Dr. Mora, Gto.; QJ: Jalpan, Qro.; MC: Cuernavaca, Mor.; MT: Tepoztlán, Mor.; JG: Guadalajara, Jal.; and CT: Tuxtla Gtz., Chis.). C = control de galfiminas; 1-5 son individuos de cada población. El sistema de fase móvil utilizado fue acetato de etilo:cloroformo (2:1 v/v).

Los datos indican que a pesar de los cambios morfológicos que presentan los individuos aclimatados en invernadero, estos no pierden el patrón de la producción de metabolitos característicos de cada población.

7.1.4 Generación de Perfiles por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) de 6 Poblaciones de *Galphimia* sp.

El análisis por CLAE confirmó la presencia de picos de galfimina I-V, exclusivamente en todos los individuos GM y QJ (Figura 14A y B), tanto en el tiempo 0 como a los 11 meses después del trasplante. Las muestras de otras localidades no mostraron picos de galfiminas. En los perfiles por CLAE, las muestras de GM presentaron entre ellas variaciones en la acumulación de galfiminas, tanto en el tiempo 0 como en el tiempo 11: pico I, normalmente está presente en el tiempo 0 y ausente en el tiempo 11; pico II es más abundante en el tiempo 0 en comparación con el tiempo 11, mientras que el pico III está ausente en el tiempo 0 y mínimamente acumulado en el tiempo 11. Los picos para la acumulación IV y V fueron aproximadamente iguales en el tiempo 0 y el tiempo 11 (Figura 14A). Con respecto a las muestras de QJ, todas las galfiminas estaban presentes en tiempo 0 y 11, a concentraciones variables; sin embargo, los picos II y V fueron los más abundantes, especialmente a los 11 meses (Figura 14B). Como se ha demostrado anteriormente, la mayoría de los picos están compuestos por una mezcla diastereoisomérica de galfiminas; por ejemplo, el pico I se forma a partir de galfiminas (GA y GH), pico II (GB y GF), pico III (GC), pico IV (GD e GI) y pico V (GE y GG).

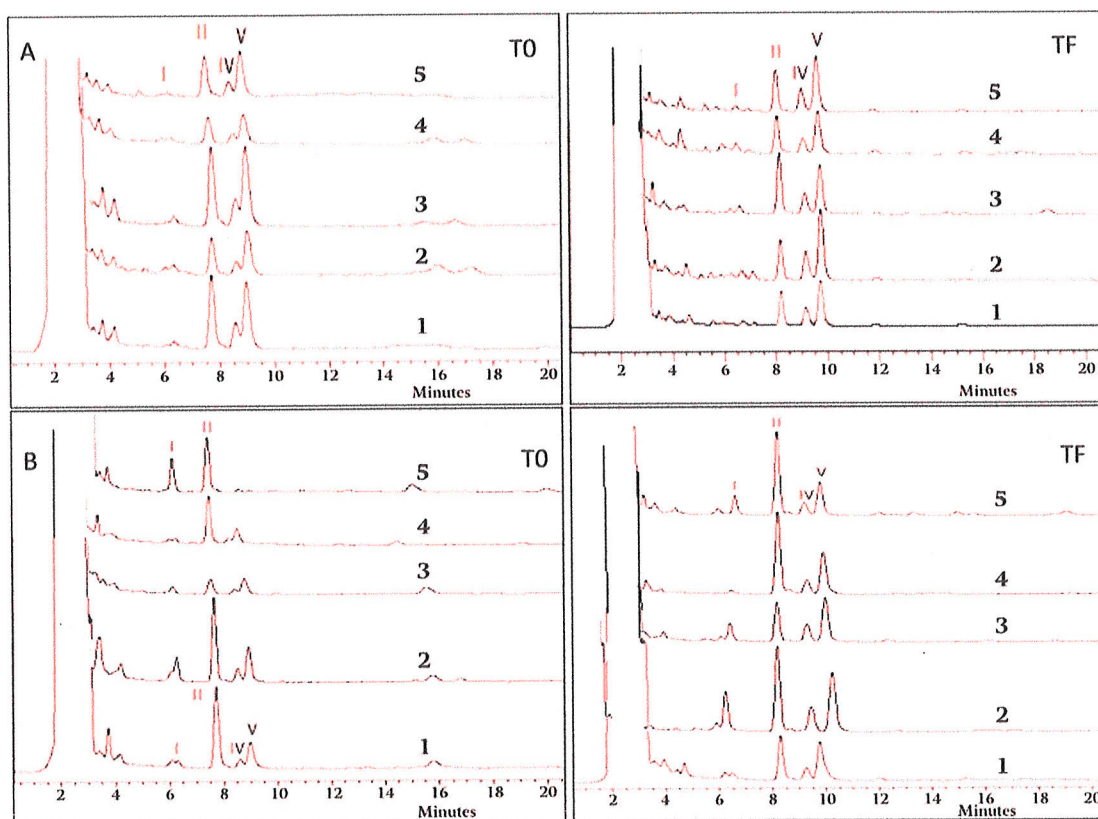


Figura 14. A) Perfiles cromatográficos por CLAE de extractos crudos de 5 individuos de *Galphimia* sp. colectados en Dr. Mora, Gto. (GM) a tiempo 0 (T0) y 11 meses (TF) después de ser trasplantados en condiciones de invernadero, mostrando la presencia de galthiminas. **B)** Perfiles cromatográficos por CLAE de extractos crudos de 5 individuos de *Galphimia* sp. colectados en Jalpan, Qro. (QJ) a tiempo 0 (T0) y 11 meses (TF) después de ser trasplantados en condiciones de invernadero mostrando la presencia de galthiminas. Condiciones cromatográficas: fase móvil, ACN: H₂O (48:52); volumen de inyección 20µL; velocidad de flujo 0.7 mL/min; tiempo de corrida 30 min. (pico I GA/GH, pico II GB/GF, pico III GC, pico IV GD/GI, y pico V GE/GG).

Diversos estudios en la literatura han mostrado variación entre las poblaciones de plantas en términos de producción de triterpenos, posiblemente resultantes del control genético y/ o factores ambientales que afectan los patrones observados. Devkota et al. (2010)

mostraron un efecto ambiental en la producción de triterpenos en *Centella asiatica* que correspondía a una variación en la exposición al sol entre sitios cercanos en Nepal. Makhnev et al. (2012) encontraron una mayor concentración de triterpenos para las poblaciones septentrionales de *Betula péndula* a lo largo de un gradiente latitudinal de 1600 km.

7.2 Micropropagación de las 7 Poblaciones de *Galphimia* sp.

7.2.1 Propagación *in vitro* de las 7 Poblaciones de la Planta *Galphimia* sp.

Los resultados obtenidos para el primer ensayo de germinación *in vitro* fueron los siguientes: solo se generaron brotes de la germinación de semillas de dos individuos de las poblaciones de Jalpan, Qro., Dr. Mora, Gto., Miacatlán, Mor., y Cuernavaca Mor, mientras que, para Guadalajara, Jal. y Tepoztlán, Mor., solo germinó uno de los de diez individuos. Los primeros brotes se observaron entre los 25 y 30 días de la inoculación, mostrando una baja germinación (10 y 20 %) (Figura 15).

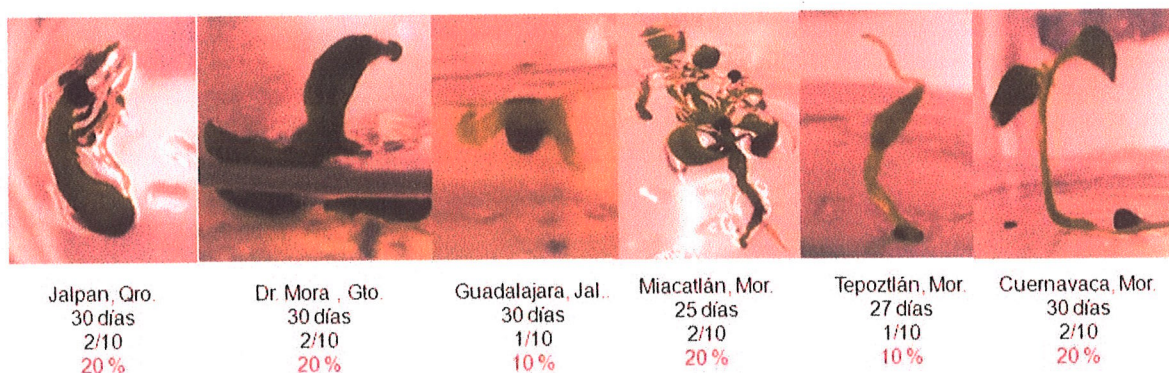


Figura 15. Primeros brotes del cultivo *in vitro* de las siete poblaciones de *Galphimia* sp. mostrando tiempo y porcentaje de germinación de los 10 individuos sembrados en medio MS.

Los resultados obtenidos en este ensayo nos indicaron que el porcentaje de germinación fue mínimo por ello se optó por realizar como primera instancia un ensayo de viabilidad de las semillas de *Galphimia* sp.

Los resultados de la prueba de viabilidad fueron alentadores y por ello se realizó nuevamente un segundo ensayo de germinación *in vitro* de las 7 poblaciones de *Galphimia* sp. sólo que en esta ocasión se incrementaron el número de semillas (15 semillas) de cada individuo por población para obtener mayor porcentaje de germinación, logrando un incremento en el número de individuos germinados de cada población. La falta de germinación en el primer ensayo se debió probablemente al deterioro físico de las semillas inoculadas. En la figura 16 se muestran el tiempo y porcentaje germinación de las semillas.



Figura 16. Muestra la germinación *in vitro* de las poblaciones de *Galphimia* sp. mostrando porcentajes de germinación del 10 hasta 60 %.

Las poblaciones con una velocidad mayor de germinación fueron las de Guadalajara, Miacatlán y Jalpan puesto que los primeros brotes se comenzaron a observar entre los 15 y

20 días de siembra. En la tabla 3 se indican los porcentajes de germinación y los individuos clonados de las poblaciones que germinaron de *Galphimia* sp. Además, los individuos correspondientes a las poblaciones antes mencionadas también mostraron un buen crecimiento en relación a los parámetros considerados, ver tabla 4.

Tabla 3. Individuos germinados y clonados de las 7 poblaciones en estudio de *Galphimia* sp.

Individuo	Dr. Mora, Gto.	Jalpan, Qro.	Tepoztlán, Mor.	Cuernavaca, Mor.	Miacatlán, Mor.	Guadalajara, Jal.	Tuxtla Gtz, Chi.
1		2	2	5			
2		2		5	15		
3	3	2					
4		2					
5		1		5			
6		1		5			
7	6			3	7	20	
8	3			5			
9							
10							
Total de ind. germinados	3	6	1	6	2	1	0
% de individuos germinados	30%	60%	10%	60%	20%	10%	0

Tabla 4. Parámetros de crecimiento a los 20 días de germinación de las siete poblaciones de *Galphimia* sp. por individuo.

Parámetros Morfológicos			
Poblaciones	Altura del tallo (cm)	Num. De hojas por tallo (cm)	Num. De yemas
Dr. Mora Gto.	10	6	6
	7	4	4
	7	6	4
Jalpan Qro.	7	8	6
	8	6	4
	6	6	4
	4	6	2
	6	7	4
	8	9	6
Tepoztlán, Mor.	6	6	3
Cuernavaca, Mor.	7	6	4
	7	6	3
	6	6	3
	7	6	4
	6	4	4
	6	4	6
Miacatlán, Mor.	7	10	4
	5	4	3
Guadalajara, Jal.	11	12	8

A pesar de haber aumentado el número de semillas inoculadas por frasco no se logró incrementar de manera considerable en la germinación; así que se decidió realizar modificaciones a los protocolos de desinfección, rompimiento de dormancia y cambio de medio de cultivo.

Además, se realizaron dos ensayos más de germinación *in vitro* de las poblaciones de *Galphimia* sp. incrementado el número de semillas, así de este modo se obtuvieron más individuos de cada población, exceptuando las poblaciones de Guadalajara, Jalisco y Tuxtla Gutiérrez Chiapas, ya que a pesar del resultado de viabilidad se siguieron inoculando en medio MS obteniéndose un resultado negativo. Los resultados se muestran en la tabla 5 la cual es una modificación de la tabla 3.

Tabla 5. Individuos germinados y clonados *in vitro* de las 7 poblaciones en estudio de *Galphimia* sp.

Individuo	Dr. Mora, Gto	Jalpan, Qro.	Tepoztlán, Mor.	Cuernavaca, Mor.	Miacatlán, Mor.	Guadalajara, Jal.	Tuxtla Gtz, Chi.
1	2	2	2	5			
2	3	2		5	15		
3	3	2					
4		2			2		
5		1		5			
6		1		5			
7	6			3	3	22	
8	3			5	2		
9							
10							
Total de ind. germinados	6	6	1	6	4	1	0
% de individuos germinados	60	60	10	60	40	10	0

En la tabla 6 se muestra que en las poblaciones de Dr. Mora, Cuernavaca y Miacatlán se incrementaron el porcentaje de individuos germinados, mientras que para las poblaciones de Jalpan, Tepoztlán, Guadalajara y Tuxtla Gutiérrez no se incrementó la germinación. En relación a los parámetros de crecimiento evaluados de estos individuos siguen un mismo patrón.

Finalmente se realizó el último ensayo de germinación de las tres poblaciones de Morelos (Tepoztlán, Cuernavaca y Miacatlán) colectadas durante los meses de enero-febrero del año en curso, esto se realizó para alcanzar el número de individuos necesarios para el análisis metabólico. En esta colecta se confirmó la hipótesis planteada de la baja

germinación, es decir, aunque en la planta se observó que la semilla haya alcanzado su madurez (máximo peso seco) al liberar las semillas de la testa se observó que algunas semillas aún siguen inmaduras (Figura 17).

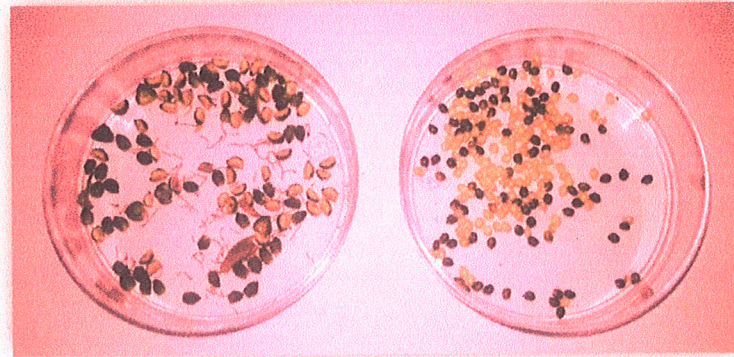


Figura 17. Semillas recolectadas de *Galphimia* sp. de la población de Tepoztlán, Morelos.

En la tabla 6 se resumen los datos de la cantidad de semillas que se liberaron de la testa para ser germinadas *in vitro*, se seleccionaron los individuos que contenían 100 semillas las cuales por su aspecto físico, se determinaron como semillas maduras e inmaduras, resultando en porcentajes que van desde los 40-30 % de semillas maduras (tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de semillas maduras de las poblaciones de Morelos (Cuernavaca, Tepoztlán y Miacatlán).

Población	Semillas totales	Semillas maduras	Semillas inmaduras	Porcentaje (%)
CUERNAVACA	600 (6 ind.)	264	336	44%
TEPOZTLÁN	600 (6 ind.)	192	408	32 %
MIACATLÁN	600 (6 ind)	241	379	40.1 %

Posteriormente se llevó a cabo la germinación *in vitro* de estas poblaciones comenzando a mostrar los nuevos brotes de los individuos viables de cada población entre los 15 y 20 días, como se observa en la figura 18.



Figura 18. Germinación *in vitro* de *Galphimia* sp. de 3 poblaciones de Morelos (Cuernavaca, Tepoztlán y Miacatlán).

De este modo con esta última colecta se completaron los individuos para realizar el análisis metabolómico y seguir con los protocolos químicos para identificar si existe la presencia de galfiminas en todas las poblaciones cultivadas en condiciones estandarizadas. Finalmente, la tabla 7 están de los individuos disponibles para realizar los siguientes estudios.

Tabla 7. Individuos germinados y clonados *in vitro* de las 7 poblaciones en estudio de *Galphimia* sp.









Individuo	Dr. Mora, Gto.	Jalpan, Qro.	Tepoztlán, Mor.	Cuernavaca, Mor.	Miacatlán, Mor.	Guadalajara, Jal.
1	18	2	2	1	5	
2	3	2	3	9	8	
3	3	2	3		3	
4		2	2		2	
5		1	3	4		
6	10	1		4		
7	7			3	3	15
8	3			5	2	
9						
10						
Total de ind. germinados	6	6	5	6	6	1

7.2.3 Prueba de Viabilidad con Tetrazolio en Semillas de *Galphimia* sp.

Esta prueba de viabilidad con sales de Tetrazolio (cloruro de 2, 3, 5 –trifenil tetrazol) de acuerdo al protocolo de ISTA (International Seed Testing Association), se realizó con base a los resultados obtenidos del primer ensayo de germinación *in vitro*, ya que se obtuvieron porcentajes de germinación bajos. Se decidió realizar una prueba de viabilidad, debido a que, nos permite conocer de manera relativamente rápida el potencial de germinación de las semillas. Con este ensayo se logra la tinción de los tejidos vivos, ya que mide la actividad de la enzima deshidrogenasa involucrada en el proceso de respiración, resultando lo siguiente: se determinó como control la colecta de Dr. Mora Gto., realizada en el año 2009 por presentar un porcentaje de germinación de 10-60 % en la prueba piloto de cultivo *in vitro*. Mientras que

las poblaciones colectadas en el año 2011 presentaron un porcentaje de viabilidad por arriba de 80 % ver tabla 8, por esta razón se realizaron las siguientes modificaciones, en el protocolo de desinfección, en las variables de almacenamiento para romper dormancia, en el medio de cultivo para su inoculación e incrementando el número de semillas por individuo.

Tabla 8. Muestra el porcentaje de viabilidad de acuerdo a la tinción (rojo) que sufrió el embrión por el Tetrazolio en las poblaciones en estudio de *Galphimia* sp.

Población	% Viabilidad	Embrión
Control s/tx Dr. Mora, Gto.		
Dr. Mora, Gto.	20 %	
Jalpan, Qro.	60 %	
Guadalajara, Jal.	10 %	
Miacatlán, Mor.	20%	
Tepoztlán, Mor.	10%	
Cuernavaca, Mor.	60 %	
Colecta 2011 Dr. Mora, Gto.	80%	

Se realizó una segunda prueba de viabilidad a las semillas colectadas de las poblaciones de Morelos (Tepoztlán, Cuernavaca y Miacatlán). Para poder corroborar los datos obtenidos sobre las semillas inmaduras se realizó la prueba de viabilidad con Tetrazolio en la cual se obtuvo como resultado porcentajes similares a los de las semillas maduras (tabla 9).

Tabla 9. Prueba de viabilidad con Tetrazolio de las poblaciones de Morelos (Cuernavaca, Tepoztlán y Miacatlán).

Población	Semillas tratadas	Porcentaje (%)
CUERNAVACA	20 x ind.	42 %
TEPOZTLÁN	20 x ind.	31.6 %
MIACATLÁN	20 x ind.	35 %

7.2.4 Etapa de enraizamiento *in vitro* de las 6 poblaciones de *Galphimia* sp.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos utilizando el protocolo de Rojas *et al.*, 2005 modificado. El resultado de este protocolo no fue positivo ya que solo se logró enraizar dos individuos de las poblaciones de Dr. Mora y Cuernavaca después de un periodo de 40 días, (Figura 19).



Figura 19. Enraizamiento *in vitro* de *Galphimia* sp. de las poblaciones de Dr. Mora y Cuernavaca.

Además de que se promovió la formación de callos en todas las poblaciones, esto debido al desbalance hormonal entre citocininas (KN) y auxinas (IBA), ya que en algunos

casos una mayor concentración de estas hormonas da como resultado la formación de callos (Figura 20).

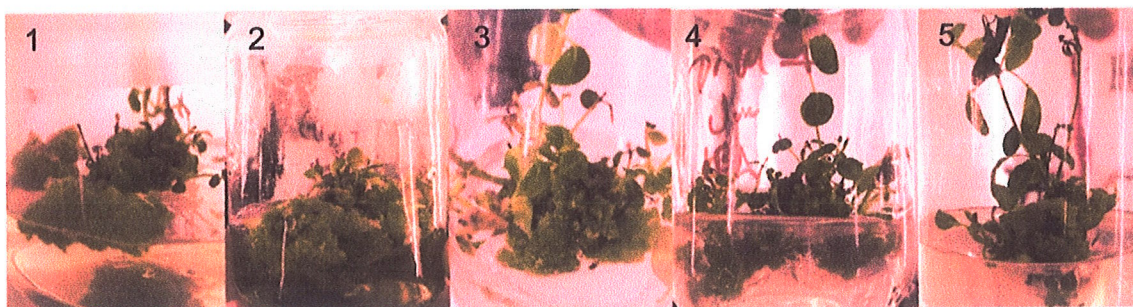


Figura 20. Formación de callos en las 5 poblaciones de *Galphimia* sp.1. Miacatlán, Mor. 2. Guadalajara, Jal. 3. Cuernavaca, Mor. 4. Dr. Mora, Gto. 5. Jalpan Qro.

Posteriormente se realizó otro ensayo con el protocolo de Rojas *et al.*, 2005. En el cual la combinación hormonal de cinetina y ácido-3-indol butírico es la más idónea para llevar a cabo la estimulación para la formación de raíces, ya que son concentraciones relativamente bajas, aunque no es su totalidad, debido a que se ha visto la formación de algunos callos (Figura 20).



Figura 21. Enraizamiento *in vitro* de las poblaciones de Dr. Mora, Gto., Cuernavaca, Mor., Tepoztlán, Mor., respectivamente.

Al término de 40 días se lograron enraizar los 3 individuos de las poblaciones de Dr. Mora, Gto., y Cuernavaca, Mor., mientras que para la población de Tepoztlán solo se enraizó un individuo, figura 21. En las poblaciones de Jalpan, Qro., y Guadalajara, Jal., no se lograron obtener raíces. El porcentaje de enraizamiento fue del 28 %, ya que solo se enraizaron 7 individuos de 25 tratados con ambas hormonas. En la tabla 10 se muestran los individuos enraizados, número de raíces y longitud de raíces.

Tabla 10. Poblaciones enraizadas de *Galphimia* sp.

Población	Numero de raíces	Longitud de raíces
Dr. Mora		
1	2	5 cm
2	4	7 cm
3	1	4 cm
Cuernavaca Mor.		
1	4	1.5 cm
2	4	3 cm
3	5	0.5 cm
Tepoztlán, Mor.		
1	4	3 cm

Posteriormente al observar que no fue óptimo el método para enraizar, se decidió llevar a cabo otro protocolo de enraizamiento. Se decidió utilizar el protocolo de Sadegui *et al.*, 2015 en donde se utilizaron concentraciones muy bajas de IBA (ácido-3-indol butírico). Con este

protocolo tampoco se logró enraizar las poblaciones sometidas a estas condiciones, (figura 22).



Figura 22. Enraizamiento de las 5 poblaciones de *Galphimia* sp. mediante el protocolo de Sadegui et al., 2015.

Por otro lado, también se llevó a cabo otro procedimiento en donde los brotes se impregnaron con Radix 10000 (ácido indol-3-butírico, que promueve la iniciación de la formación de raíces). Trascurrieron 40 días y no se observó el crecimiento de raíces sino de callos.

7.2.5 Etapa de Aclimatación de las 6 Poblaciones de *Galphimia* sp.

Se llevó a cabo la aclimatación de los algunos individuos en donde solo sobrevivieron 2 plántulas cultivadas *in vitro* de en un lapso de 40 días, posteriormente se comenzaron a contaminar con hongos hasta que finalmente se secaron (Figura 23).



Figura 23. Etapa de aclimatación de los individuos germinados *in vitro* de *Galphimia* sp.

Se utilizó otro protocolo de aclimatación seguido por Ranaweera *et al.*, 2013 y Patel *et al.*, 2014, en el cual se tienen resultados más alentadores, ya que 10 de 30 individuos sembrados en este sustrato fueron viables y mostraron nuevos brotes (Figura 24 y 25).

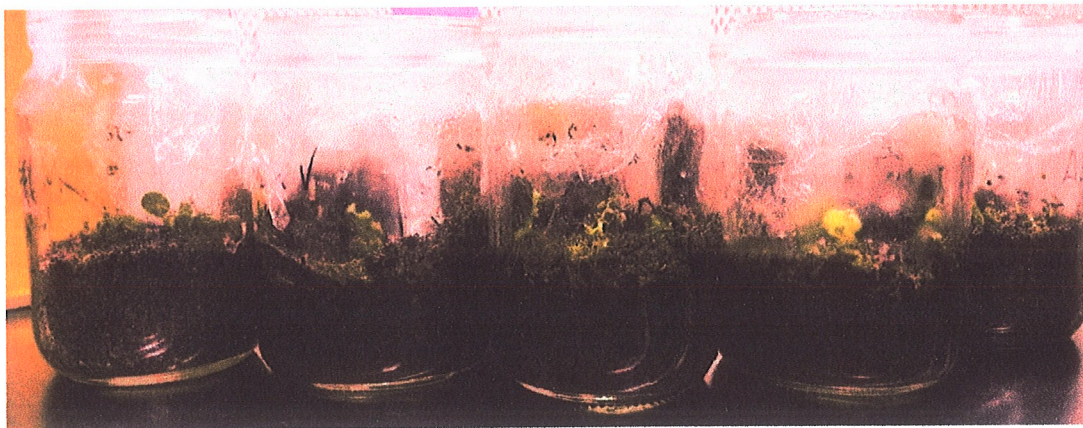


Figura 24. Aclimatación de las poblaciones de *Galphimia* sp. mediante el protocolo de Ranaweera *et al.*, 2013 y Patel *et al.*, 2014.

Estas plántulas permanecieron 45 días en frascos cubiertos con plástico que gradualmente se les realizaron orificios para su pronta aclimatación, en la figura 25 se muestra

uno de los individuos que se destapó completamente, mismo que se deshidrató y secó rápidamente, mientras que el frasco de la derecha muestra un individuo con nuevos brotes pero que no se ha destapado al 100%. Estos individuos se mantienen en condiciones de invernadero (Figura 25).

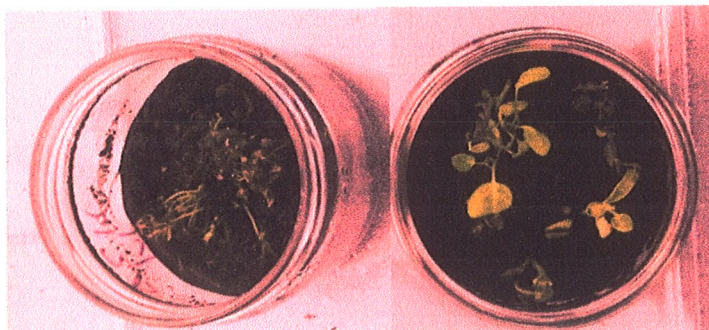


Figura 25. Aclimatación de individuos germinados *in vitro* de las 6 poblaciones de *Galphimia* sp.

Debido a los resultados poco alentadores se decidió aplicar la técnica de enraizamiento *ex vitro*.

7.2.6 Etapa de Enraizamiento *ex vitro* de las Poblaciones de *Galphimia* sp.

Se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura de protocolos de enraizamiento *ex vitro* y se aplicó el descrito por Ranaweera *et al.*, 2013 en el cual se utilizó un sustrato compuesto por polvo de coco, arena y suelo de monte y el protocolo de Patel *et al.*, 2014 aplicando una concentración 300 mg/lit de IBA a brotes de 6 cm de altura. El sustrato se humedeció con un enraizador agrícola. Los resultados de enraizamiento se observaron a los 40 días de haber sido sembrados los brotes en las condiciones antes mencionadas.

Se traspasaron 20 brotes cultivados *in vitro* de las poblaciones de Dr. Mora Gto., y Jalpan Qro., en donde se observó en un individuo de la población de Jalpan Qro., el crecimiento masivo de raíces (figura 26).

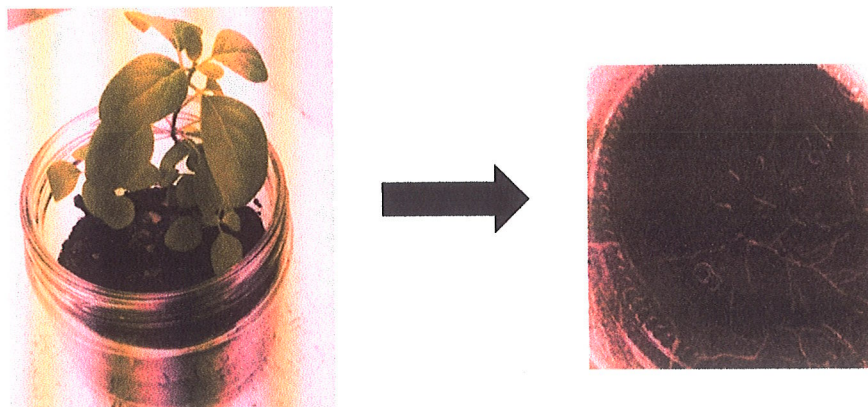


Figura 26. Enraizamiento *ex vitro* de la población de Jalpan Qro., de la planta *Galphimia* sp.



Figura 27. A) Enraizamiento *ex vitro* de la población de Jalpan Qro., de la planta *Galphimia* sp. (40 días). B) Enraizamiento *ex vitro* de la población de Dr. Mora Gto., de la planta *Galphimia* sp. (40 días).

Además, se realizaron registros del número de hojas por tallo, altura del tallo y número de yemas (tabla 11).

Tabla 11. Poblaciones enraizadas *ex vitro* y parámetros morfológicos de *Galphimia* sp.

Poblaciones	Parámetros Morfológicos		
	Altura del tallo (cm)	Num. De hojas por tallo (cm)	Num. De yemas
Dr. Mora Gto.			
1	8	12	6
2	6	6	4
3	7	6	4
4	5.5	6	4
5	6	7	3
Jalpan Qro.			
1	13	12	6
2	5	4	4
3	6	6	4
4	4	4	2
5	6	7	4
6	5	6	6

7.2.7 Perfil Químico por Cromatografía en Capa Fina de Algunas de las Poblaciones de *Galphimia* sp. Cultivadas *in vitro*.

Se realizó el análisis químico de los individuos de los que se obtuvieron más clones, para así adquirir el material vegetal seco necesario para este tipo de análisis. Las muestras analizadas fueron las de Guadalajara (Ind. 7) a los 90 y 120 días. En la figura 28 se puede observar en el carril 1 y 2 un individuo, que ya no presenta el mismo perfil químico de las muestras silvestres, lo mismo ocurre con un individuo de Miacatlán, Cuernavaca (120 días) que se observa en el carril 4 y finalmente en los carriles 5 y 6 que corresponde a las muestras

de Guanajuato y Querétaro (120 días) se logra observar que conservan ligeramente la presencia de las galfiminas, esto podría deberse a la cantidad de material vegetal seco, al estadio de la plántula y las condiciones *in vitro* a la que está siendo sometida la plántula (figura 28).

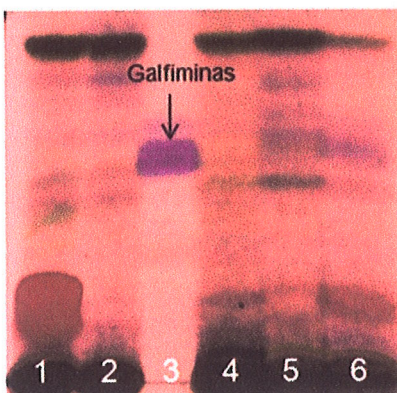


Figura 28. Perfil cromatográfico del cultivo *in vitro* de algunas poblaciones de *Galphimia* sp. Carril: Ind. 7 Gld (90 d), Carril 2: Ind. 7 Gld (120 d), carril 4: Ind. Miacatlán Mor., Carril 5: Ind. Dr. M 7 y carril 6 Ind. Jalpan, Qro. Se utilizó como control (carril 3) una fracción purificada de la familia de galfiminas denominada con la letra C. El sistema de fase móvil utilizado fue acetato de etilo:cloroformo (2:1 v/v).

Se llevó a cabo otro análisis químico por cromatografía en capa fina de los individuos germinados *in vitro* (4 meses) en donde tampoco se logró observar la presencia de galfiminas por lo menos en las poblaciones que las producen. Por ello se realizó el análisis por CLAE.

7.2.8 Generación de Perfiles por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) De 6 Poblaciones de *Galphimia* sp.

Para determinar si los individuos germinados *in vitro* produjeron las galfiminas se realizaron los perfiles cromatográficos por CLAE en las poblaciones que inicialmente las presentan, como las de Dr. Mora, Gto., y Jalpan, Qro., asimismo se analizaron las demás

poblaciones para observar si en condiciones *in vitro* se mantienen los perfiles químicos de las plantas silvestres.

Inicialmente se llevó a cabo la curva de calibración con un estándar correspondiente a GB/GF cuya finalidad es cuantificar la cantidad de galfimina B/F que está presente en las muestras cultivadas *in vitro*. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: fase móvil acetonitrilo-agua (48:52), velocidad de flujo 0.7 mL/min, volumen de inyección 20 μ (Tabla 12, figura 29).

Tabla 12. Curva estándar de GB/GF.

Concentración $\mu\text{g/ml}$	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	DE
250	2972259	2995436	3033620	3000438.333	30984.8444
125	1390478	1403166	1391572	1395072	7030.92
62.5	963094	872252	866050	900465.3333	54326.5922
30	338164	337664	339388	338405.3333	886.975385
15	128945	127898	141915	132919.3333	7808.04498
7.5	76522	78065	76815	77134	819.471171
Pendiente (m)	23631.0518	11815.5259	12076.8215	11950.2649	
Ordenada (b)	13309.05	7526.36158	11380.4234	1865.91166	
R	0.99506611	0.99782899	0.9977858	0.997080258	
r ²	0.99015656	0.99566269	0.9955765	0.994169041	

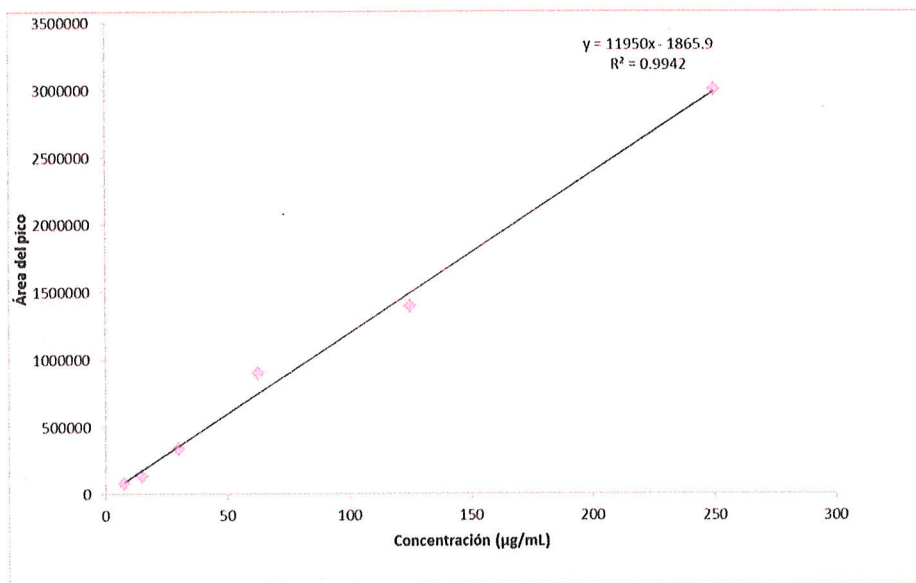


Figura 29. Curva estándar de GB/GF. Solución stock de 1mg/mL.

Se analizaron los correspondientes extractos metanólicos de los diferentes individuos cultivados *in vitro*, se utilizaron 100 mg de material vegetal seco posteriormente se obtuvo el rendimiento del extracto metanólico. Con base a la curva de calibración se llevó a cabo la cuantificación de cada una de las muestras, obteniéndose valores de GB similares a una muestra de 100 mg de extracto metanólico de Dr. Mora Gto., de planta silvestre (tabla 13).

Tabla 13. Cuantificación de GB/GF en las muestras cultivadas *in vitro* de las poblaciones de Dr. Mora, Gto., y Jalpan Qro (7 meses).

Muestra	Área	Concentración (µg/mL)	Rendimientos (mg)
Dr.M1	474024	39.8	24.9
Dr.M 2	633111	53.1	44.7
Dr.M 3	684558	57.4	32.9
Dr.M 4	46071	4.0	33.6
Dr.M 5	557649	46.8	18.9
Dr.M 6	138119	11.7	27.1
Jal 1	678647	56.9	20.9
Jal 2	94893	8.1	15.4
Jal 3	60535	5.2	23.7
Jal 4	216658	18.3	18.2
Jal 5	153163	13.0	32.2
Jal 6	110792	9.4	24.7
Control Ext MeOH			
Dr.M	1684570	141.1	100

A continuación, se presentan los cromatogramas de cada una de las muestras analizadas, observándose la producción de galfiminas en solo dos de las poblaciones (Dr. Mora, Gto., y Jalpan, Qro.). En algunas muestras de Miacatlán y Guadalajara se observan picos a los mismos tiempos de retención que las galfiminas, pero el patrón barrido de UV nos indica si estos picos pertenecen a las galfiminas, por ello es que adjunto el barrido de UV en el cromatograma de cada muestra y se determinó que, es totalmente diferente al patrón presentado por la familia de las galfiminas. No obstante, esto no es confirmativo por ello se realizó una co-elución para observar si el pico aumento o en su defecto aparecieron dos picos (Figuras 30 y 31).

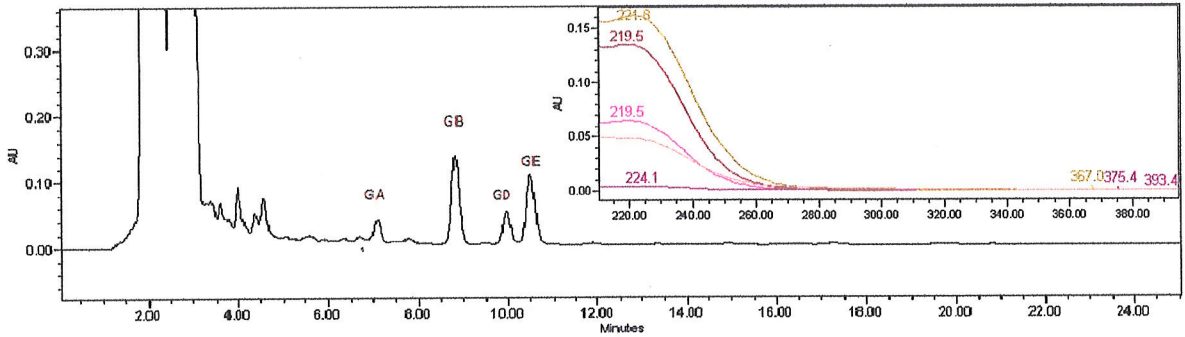
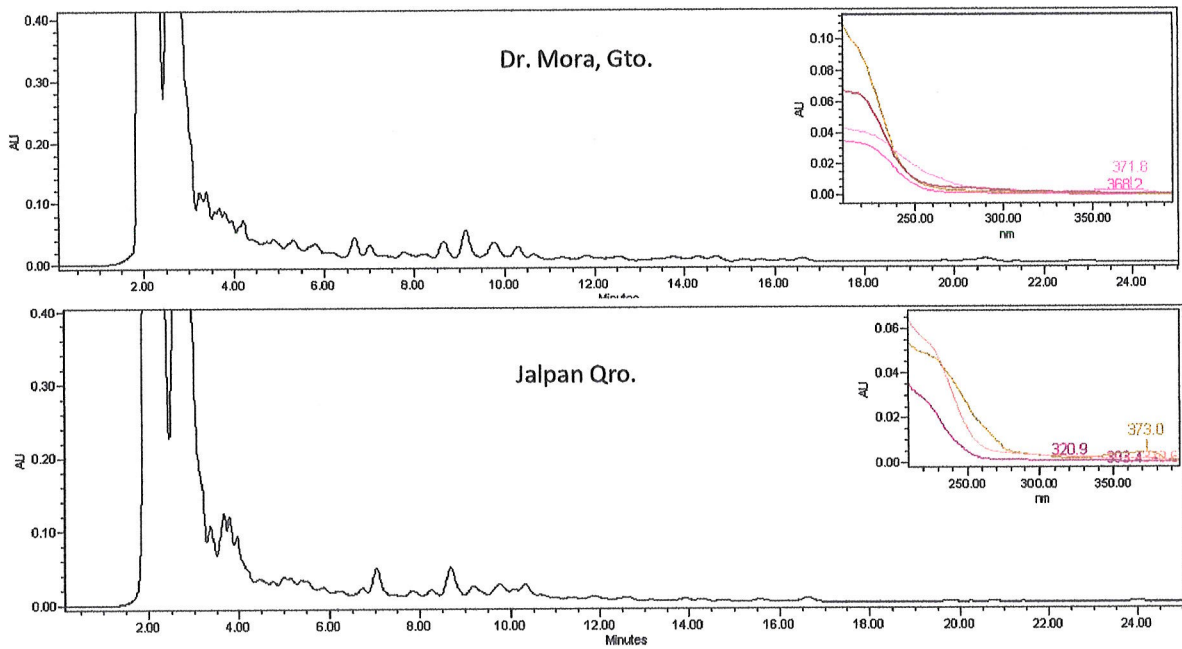


Figura 30. Perfil cromatográfico de la familia de galmifinas de un individuo de la población de Dr. Mora Gto. 100 mg de extracto metanólico. Condiciones cromatográficas: fase móvil, ACN:H₂O (48:52); volumen de inyección 20µL; velocidad de flujo 0.7 mL/min; tiempo de corrida 25 min.



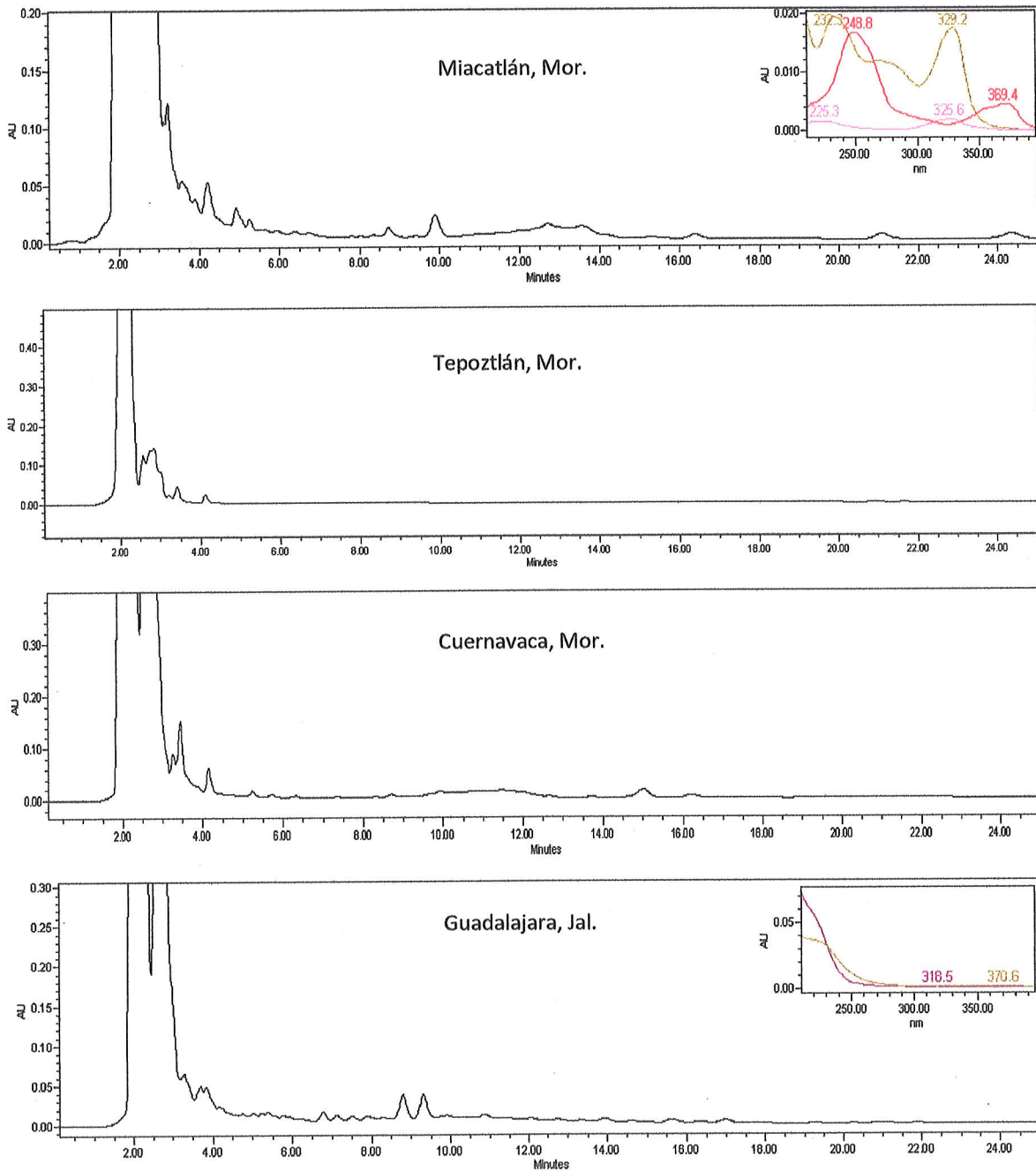


Figura 31. Perfil cromatográfico de la población de Dr. Mora Gto., Jalpan, Qro. Miacatlán, Tepoztlán y Cuernavaca, Mor., y Guadalajara, Jal., de *Galphimia* sp. 100 mg de material vegetal seco. Condiciones cromatográficas: fase móvil, ACN:H₂O (48:52); volumen de inyección 20µL; velocidad de flujo 0.7 mL/min; tiempo de corrida 25 min.

Con respecto a los perfiles cromatográficos obtenidos se observó la presencia de galfiminas en las poblaciones de Dr. Mora, Gto., y Jalpan, Qro., en tanto que para las poblaciones de Miacatlán presentaron picos característicos de la familia de galfiminas, pero al comparar el patrón de barrido de UV, se logró discrepar en esto, ya que se mantiene un patrón de UV diferente al presentado por la familia de las galfiminas. Asimismo, el perfil cromatográfico correspondiente a Guadalajara presentó un pico en los tiempos de retención en donde aparece las galfiminas por ello se realizó una co-elución con GB y de demostró que son dos compuestos diferentes (Figura 31).

7.3 Propagación en Condiciones de Invernadero de las 7 poblaciones de *Galphimia sp.*, (germinación de semillas en charola).

7.3.1 Germinación en Condiciones de Invernadero de las 7 Poblaciones de *Galphimia sp.*

Se realizó el cultivo de las semillas en charolas con sustrato estandarizado y estéril, pero solo germinaron las poblaciones correspondientes a Querétaro, Guanajuato, Jalisco y dos de Morelos (figura 32). Además, los porcentajes y velocidades de germinación fueron similares a los cultivos *in vitro*, aunque disminuyó un poco el porcentaje de germinación, puesto que el rango va de 10 al 50 %.

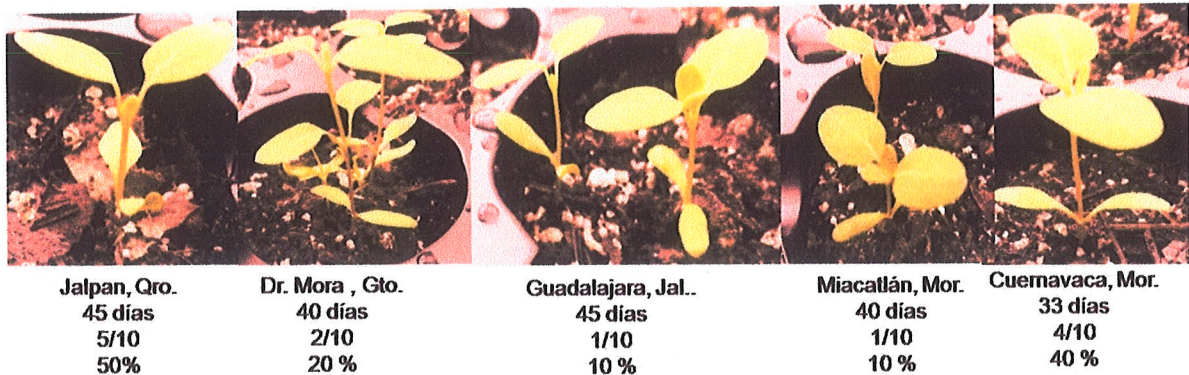


Figura 32. Germinación en condiciones de invernadero de las siete poblaciones de *Galphimia sp.* Tiempo y porcentaje de germinación.

En la figura 32 se muestran los individuos que fueron germinados en charola en condiciones de invernadero (tabla 14).

Tabla 14. Individuos germinados en charola de las 7 poblaciones en estudio de *Galphimia* sp.

Individuo	Dr. Mora Gto.	Jalpan Qro.	Tepoztlán Mor.	Cuernavaca Mor.	Miacatlán, Mor.	Guadalajara, Jal.	Chiapas
1		2		2			
2		1		1	3		
3							
4		3					
5	2						
6		2		1			
7	2			2		1	
8		1					
9							
10							
% de ind. germinados	20	50	0	40	10	10	

En la figura 33 se muestran las plántulas provenientes de la germinación de semillas con una edad de 7 meses, morfológicamente sus hojas son similares a los individuos aclimatados en condiciones de invernadero.



Figura 33. Plántulas de 7 meses de la población de Jalpan, Qro., germinadas a partir de semillas de *Galphimia* sp. en condiciones de invernadero.

Debido a las condiciones no óptimas de invernadero se perdieron varios especímenes que con anterioridad habían sido germinados en charolas con sustrato.

Se realizó nuevamente la germinación en charola de todas las poblaciones en un invernadero que cumple con las condiciones óptimas para la germinación de estas semillas. Los resultados se muestran en la figura 34 y tabla 15.



Figura 34. Plantas germinadas en charolas de las 6 poblaciones de *Galphimia* sp.

Tabla 15. Individuos germinados en invernadero de 5 poblaciones de *Galphimia* sp.

Individuo	Dr. Mora Gto.	Jalpan Qro.	Tepoztlán Mor.	Cuernavaca Mor.	Miacatlán, Mor.
1		2	1	2	
2		1		1	3
3	1		1		1
4	2	3			2
5					
6	1			1	1
7	2			2	5
8	1				2
9					
10					
Num. de ind. germinados	5	3	2	4	6

Los parámetros evaluados de crecimiento fueron número y tamaño de hojas, número de hojas por tallo y altura del tallo, estos se verificaron cada 20 días. Las plántulas con 90 días de haber germinado (tabla 16).

Tabla 16. Parámetros morfológicos de los individuos germinados en invernadero de 5 poblaciones de *Galphimia* sp.

Parámetros Morfológicos			
Poblaciones	Altura del tallo (cm)	Num. De hojas por tallo	Num.de yemas
Dr.Mora Gto.	7	3	2
	4	6	4
	1	2	2
	7	6	6
	7	6	6
Jalpan Qro.	5	5	4
	2	2	2
	4	6	4
Tepooztlan, Mor.	2	2	1
Cuernavaca, Mor.	1	2	1
	7	4	4
	7	4	4
	6	4	2
Miacatlán, Mor.	10	6	1
	3	6	2
	2	4	1
	5	3	1
	4	7	1
	3	5	2

La germinación no fue tan óptima, no obstante, se obtuvieron nuevos individuos para llevar a cabo la comparación con los individuos germinados *in vitro*.

7.3.4 Perfil Cromatográfico de la Germinación en Invernadero de Semillas de *Galphimia* sp.

Se realizó un análisis químico de estas plántulas para observar si a una corta edad se producían los compuestos de interés (galfiminas) y en la figura 35 se muestra el perfil cromatográfico resultante.

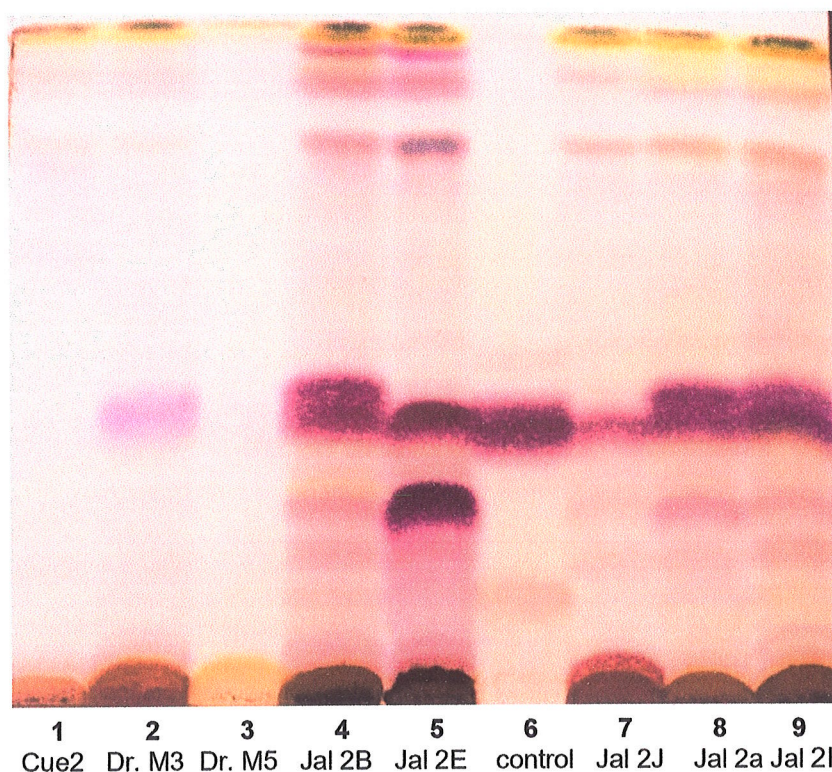


Figura 35. Perfil cromatográfico del cultivo en charola de algunas poblaciones de *Galphimia* sp. Carril 1: Cue 2, Carril 2 y 3 Dr. M3, carril 4 y 5: Ind. Jalpan., Qro. Carril 6 control una fracción purificada de la familia de galfiminas y carril 7-9 Ind. Jalpan, Qro. El sistema de fase móvil utilizado fue acetato de etilo:cloroformo (2:1 v/v).

Efectivamente se observó que las poblaciones de Dr. Mora y Jalpan, Qro. presentaron producción de galfiminas mientras que en la población de Cuernavaca no se observaron estos

compuestos. Este perfil permite determinar que se conservó el perfil químico de los metabolitos de interés, sin importar los factores ambientales involucrados en el desarrollo y crecimiento de las plantas.

8. Discusión y Conclusiones

En la discusión general se integran los resultados más relevantes de los capítulos previos sobre las diferencias espaciales en la producción de galfiminas de la planta *Galphimia* sp. de diferentes poblaciones localizadas en la República Mexicana y su aclimatación en condiciones uniformes y controladas de invernadero e *in vitro*.

8.1 Análisis de Producción de Galfiminas de Ejemplares Silvestres de 6 Poblaciones de *Galphimia* sp. Cultivados y Aclimatados en Invernadero

Con base a los resultados obtenidos en el análisis fitoquímico por cromatografía en capa fina se determinó la presencia de las galfiminas en las poblaciones de GM y QJ con metodologías fitoquímicas similares a las de trabajos previos de Taketa *et al.*, (2004); Sharma *et al.*, (2012). Los perfiles químicos presentados durante un periodo de once meses no se modificaron, es decir, cada población conservó el patrón químico que se presentó en condiciones silvestres. Sin embargo, es importante mencionar que la población de QJ al inicio del ensayo mostraba un perfil diferente entre individuos, ya que algunos individuos mostraron la familia completa de las galfiminas; mientras que, en uno de los individuos analizados solo se observaron dos galfiminas (GA y GB), a diferencia del perfil cromatográfico a tiempo final, donde se observó la presencia de la familia completa de galfiminas. Por otro lado, las poblaciones de MT y JZ revelaron compuestos de color azul, en tanto que la población de MC no reveló ningún compuesto visible a las mismas condiciones cromatográficas. Finalmente,

en la población de CT se observaron compuestos de color anaranjado. Este tipo de análisis permite visualizar la presencia de los compuestos mencionados, sin embargo; no determina su concentración. Al realizar la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) se observó que la población de GM mantuvo la producción de galfiminas en los 5 individuos analizados. Sin embargo, en algunos individuos disminuyó hasta la mitad de la producción, en tanto que en otros incrementaron aproximadamente el doble de su concentración; Cabe mencionar que al inicio del estudio, en los 5 individuos analizados, se observó la presencia de la galfimina GA, que al final del estudio ya no fue detectable; caso contrario lo que ocurrió con la galfimina GC, que a tiempo inicial no estaba presente en los individuos analizados y al final si se logró cuantificar. Para la población de QJ se determinó que la mayoría de los individuos analizados incrementaron por arriba del doble la producción de la familia de galfiminas en las muestras aclimatadas en invernadero (once meses). Además, se observó de forma más precisa que en uno de los individuos analizados en tiempo cero solo aparecen dos galfiminas GA y GB, mientras que a tiempo final (once meses de aclimatación) ya cuenta con la presencia de toda la familia de galfiminas. Este análisis permitió determinar y cuantificar de manera precisa el comportamiento de cada individuo de las seis poblaciones de *G. glauca*. Por lo anterior, se sugiere que la síntesis de estos compuestos no obedece a un proceso de plasticidad fenotípica ya que, aunque se están modificando las condiciones ambientales, las poblaciones en estudio que producen las galfiminas siguen produciéndolas como lo establece Pigliucci, (2006) en estudios de plasticidad fenotípica en donde se demuestra que la plasticidad fenotípica es un fenómeno en el cual cuando una especie vegetal es expuesta a condiciones ambientales diferentes y la misma especie puede presentar fenotipos diferentes de manera que pueden ajustar su fisiología y morfología para poder enfrentar de manera óptima el

gradiente ambiental. Por lo contrario, la producción de galfiminas en solo dos de las poblaciones GM y QJ se podría sugerir que se debe a un control genético, ya que las seis poblaciones fueron sometidas a las mismas condiciones ambientales de sustrato, fertilizante, luz, humedad y temperatura en un diseño experimental de jardín común como lo establece Wallis *et al.*, (2011) en un estudio que realizó con *Eucalyptus globulus* donde minimizó la variación ambiental de las regiones en donde crece esta especie vegetal y así determinó que se debe la variabilidad quimiotípica. Por otro lado, la influencia limitada de las condiciones ambientales sobre los perfiles químicos de las seis poblaciones en estudio se puede inferir en la tabla 2 en donde se observó la producción de galfiminas en solo dos de las seis poblaciones de las plantas provenientes de las plantas aclimatadas en invernadero y no se observaron diferencias respecto a las plantas silvestres estudiadas y la cuantificación de estos compuestos presenta diferencias estadísticas significativas entre individuos de la misma población. Tal y como se demuestra en los estudios realizados por Medina-Holguín (2007; 2008) en donde establecieron la existencia de tres quimiotipos de 17 poblaciones de la especie vegetal *A. californica* y determinaron que esta variabilidad química se debe principalmente a un control genético. Por otro lado, se podría sugerir que la concentración de las galfiminas observada en la tabla 2 de cada individuos de la población de QJ si respondió a las condiciones de sustrato, fertilizante, luz, humedad y temperatura a las que fueron sometidos los individuos de esta población, ya que incremento la concentración de estos metabolitos, mientras que en la población de GM la concentración de las galfiminas fue independiente a las condiciones de sustrato, fertilizante, luz, humedad y temperatura a los que fueron sometidos los individuos de esta población durante once meses. En conjunto estos

resultados podrían indicar que la variabilidad química entre las seis poblaciones de *G. glauca* aclimatadas en condiciones de invernadero es ante todo controlada genéticamente.

Respecto a los resultados de aclimatación los ejemplares cultivados en condiciones uniformes y controladas de invernadero (modelo de jardín común) mostraron un porcentaje de aclimatación del 50 % en todas las poblaciones en estudio, debido a que sobrevivieron la mitad de los ejemplares silvestres además de que se determinaron nuevas etapas fenológicas relacionadas a la caída de las hojas, revestimiento de follaje y etapa de floración. Este proceso fue determinado durante los once meses de cultivo en invernadero, tal y como lo describe Wilson *et al.*, 2002 en donde la aclimatación la refiere como las respuestas fisiológicas a las variables ambientales en el modelo experimental de campo, en donde el fenotipo óptimo resultante mostró etapas de crecimiento, reproducción y supervivencia, asimismo en la revisión de Niinemets *et al.*, 2010 estableció que la aclimatación y/o grado de aclimatación al estrés es la recuperación total o parcial de las funciones de la planta mediante el proceso de plasticidad fenotípica.

En relación a los datos morfológicos foliares, al inicio del estudio las seis poblaciones de *G. glauca* colectadas en diferentes localidades de la República Mexicana presentaron diferencias importantes en la morfología de sus hojas e inflorescencias. Este hecho se podría atribuir a la influencia de los distintos gradientes ambientales en que se encuentran creciendo las poblaciones, a causa de que la luz es uno de los factores ambientales más heterogéneos a nivel espacial y temporal como lo menciona Balaguer *et al.*, 2001 en un estudio que realizó *Quercus coccoifera*, en donde mencionó que la selección de entornos heterogéneos conduce a la coexistencia de genotipos con mayor plasticidad fenotípica; es decir, una mayor capacidad para expresar fenotipos alternativos en respuesta a las variaciones ambientales.

Asimismo, los resultados obtenidos en este estudio mostraron un cambio importante en el índice del área de la hoja, presentando similitudes en este parámetro a un tiempo de once meses en todas las plantas cultivadas en invernadero. Los cambios observados podrían ser el resultado de la homogenización de las condiciones de cultivo para todas las poblaciones (luz, disponibilidad de agua, sustrato y fertilizante), y en específico, el efecto de la luz fue un factor importante para explicar el cambio en el índice del área de la hoja. La población de GM crece en un clima semi-árido con poca vegetación secundaria, la cual no impide que la luz llegue directamente a la planta *G. glauca* (Sharma et al., 2012). En el invernadero los individuos de esta población incrementaron el tamaño de sus hojas, debido a la menor disponibilidad de luz en comparación con su ambiente natural (Xu et al., 2009). Para las poblaciones de QJ, MC, MT, JG y CT, donde su clima son bosques tropicales y cuentan con vegetación más alta que impide el paso de luz directamente a la planta de *G. glauca* (Sharma et al., 2012), sus hojas son más grandes; sin embargo, en condiciones de invernadero, las hojas de estas poblaciones disminuyeron el índice de área foliar, algunas más que otras, ya que contaban con un techo más translucido al de su hábitat, dicho cambio se podría atribuir a un proceso de plasticidad fenotípica, que involucra la capacidad de un individuo de producir fenotipos diferentes en respuesta a cambios en el medio ambiente como lo establece Pigliucci 2006. Además, lo demostró Tognetti et al., 1998 en un estudio de aclimatación en *Fagus sylvatica L.* cambiando las condiciones de luz en donde estableció que la morfología de la hoja sufre cambios debido al ambiente lumínico disponible. De esta manera Xu et al., 2009 mencionó que las hojas son órganos que pueden exhibir plasticidad fenotípica como respuesta a un estrés abiótico, además que demostró que el efecto de la disponibilidad de luz fue más significativa que la disponibilidad de agua ya que se observaron cambios importantes

en el tamaño de la hoja este incremento por la sombra del lugar en donde fueron colocadas las plantas para el estudio.

Los factores analizados indicaron que la planta *Galphimia* sp. se puede cultivar en invernadero y permiten contar con materia prima disponible para realizar ensayos futuros, sin la necesidad de trasladarse a cada población para la colecta de especímenes y contribuir con la extinción de esta especie de gran importancia en la medicina tradicional mexicana.

8.2 Micropropagación *in vitro* de las 6 Poblaciones de *Galphimia* sp.

Durante el proceso de micropropagación de individuos de las poblaciones estudiadas se presentaron una serie de inconvenientes como, por ejemplo, el bajo porcentaje de germinación de las semillas. Con base a todas las variables estudiadas se determinó que esto se debió al estadio de la semilla de cuando se realizó la colecta, de modo que la maduración de la semilla comprende una serie de transformaciones morfológicas, fisiológicas y funcionales que suceden en el óvulo fertilizado y culminan en el punto en que la semilla alcanza el máximo peso de materia seca. En este punto, la semilla obtiene también su máximo capacidad germinativa (madurez fisiológica), puesto que la germinación es un proceso paralizado durante esta etapa. A pesar de ello, se lograron germinar seis individuos de cada una de las seis poblaciones de *G. glauca* en estudio, con un porcentaje de germinación del 60-80%. Además, se obtuvieron las clonas suficientes para llevar a cabo la propagación, enraizamiento y el análisis cromatográfico correspondiente de las seis poblaciones de *Galphimia* sp. Asimismo, se realizó el enraizamiento *in vitro* de todas las poblaciones en donde se obtuvieron valores mínimos de enraizamiento (10-30%). Por ello se decidió llevar a cabo el enraizamiento *ex vitro* de todos los individuos para su pronta aclimatación en sustrato, con

el beneficio de que este tipo de enraizamiento sugiere disminuir costos en todo el proceso, así como una mejor manipulación de las plantas enraizadas. El enraizamiento *ex vitro* mediante el protocolo de Rojas *et al.*, 2005, dio como resultado un 0.6 % de enraizamiento, por ello se realizó una búsqueda exhaustiva de varios protocolos y se llevaron a cabo los establecidos por Ranaweera *et al.*, 2013 y Patel *et al.*, 2014, que fueron los más eficientes, dando como resultado valores de 50 % de enraizamiento y 40 % de aclimatación. Estos resultados se debieron principalmente a la estimulación provocada al adicionar una solución concentrada de IBA, hormona de elección para enraizar; además que, el sustrato (polvo de coco y suelo de monte) utilizado contiene hormonas y nutrientes que posiblemente estimularon el proceso de enraizamiento y el mantenimiento de humedad, brindando a la planta una buena disposición de agua para su crecimiento.

Los perfiles químicos obtenidos por CCF y CLAE de los individuos germinados y propagados *in vitro* sugieren que las seis poblaciones en estudio mostraron perfiles cromatográficos constantes en relación a las muestras de los individuos aclimatados e invernadero y las muestras silvestres. Al realizar el análisis por CLAE las poblaciones de GM y QJ, que mostraron desde el inicio del estudio la presencia de galfiminas, las conservaron en cantidades comparables a extractos metanólicos de muestras silvestres. Estos resultados indicaron que en condiciones de crecimiento *in vitro* a partir de la germinación de semillas de los individuos de *Galphimia* sp. mantuvieron la producción de galfiminas únicamente en las poblaciones de GM y QJ, por lo que se puede sugerir que la biosíntesis de estos compuestos obedece a un proceso de heredabilidad en donde la presencia de estos metabolitos secundarios está relacionado directamente a un control genético (Andrew *et al.*, 2007), dado que en los análisis cromatográficos se estableció que en las poblaciones JZ, MC, MT y MM

no se produjeron las gafiminas a pesar de que la manipulación del ambiente por técnicas *in vitro* cuenta con el potencial para inducir acumulaciones de metabolitos secundarios (Zobayed *et al.*, 2004). Así mismo no se estableció ninguna correlación entre la presencia de galfiminas en las partes aéreas de las plántulas obtenidas por métodos *in vitro* y su crecimiento, lo que implica que el costo fisiológico de la producción de las galfiminas no es grande o que el costo-beneficio es equilibrado en las condiciones del experimento. Así como lo describe Andrew *et al.*, (2007) en relación a la presencia de siderolxylonal foliar en la especie vegetal *Eucalipto*. Por el contrario, se ha demostrado que los metabolitos secundarios utilizados como defensa son regularmente compuestos con actividad farmacológica que suelen ser costosos en varias especies vegetales y la expresión de estos costos fisiológicos puede depender de las condiciones ambientales en las que se cultiven las plantas (Siemens *et al.*, 2003). En resumen, estas aproximaciones nos sugieren que la producción de galfiminas tiene una base genética debido a que, en este trabajo se evaluaron los factores ambientales los cuales no están relacionados en la producción de estos biocompuestos, no así en la concentración presente en las poblaciones de GM y QJ así como en cada individuo.

8.4 Conclusiones Generales

Se lograron aclimatar ejemplares silvestres de las diferentes poblaciones de *G. glauca* en condiciones uniformes y controladas de cultivo en invernadero.

La producción de galfiminas en individuos de la planta *Galphimia* sp. pertenecientes a seis poblaciones colectadas en diferentes localidades de la República Mexicana se limita solo a las plantas de las localidades de GM y QJ. Ese patrón de producción se conserva cuando los individuos son trasplantados a condiciones uniformes y controladas tanto de invernadero como al ser germinadas y cultivadas *in vitro*. Los resultados obtenidos pueden sugerir que los triterpenos activos responden a mecanismos de control genético.

La morfología foliar de todos los individuos de seis poblaciones de *G. glauca* cultivados en invernadero se modifica con el transcurso del tiempo, alcanzando parámetros muy similares al término de once meses de aclimatación, probablemente debido a un fenómeno de plasticidad fenotípica.

8.5 Perspectivas

- Optimizar el protocolo de enraizamiento *in vitro* de *Galphimia* sp. para aclimatar.
- Realizar el análisis metabolómico de los individuos crecidos *in vitro* y aclimatados en condiciones de invernadero.
- Realizar estudios de metaboloma y moleculares para trazar la vía metabólica responsable de la producción de galfiminas.
- Realizar estudios ontogenéticos de las diferentes poblaciones de *Galphimia* sp.

- Realizar estudios taxonómicos de las poblaciones en estudio para complementar los diversos estudios realizados a estas poblaciones de *Galphimia* sp.

9. Referencias Bibliográficas

1. Anderson Christiane. Revision of *Galphimia* (Malpighiaceae). (2007). Contr. Univ. Michiganj Herb.; 25:1-82.
2. Andrew RL, Ian R, Wallis CE. Harwood MH, William JF. (2007) Heritable variation in the foliar secondary metabolite sideroxylonal in *Eucalyptus* confers cross-resistance to herbivores. *Ecología* 153:891–901.
3. Balaguer L, Martínez-Ferri E, Valladares F, Pérez Corona M, Baquedano F, Castillo F, Manrique E. (2001). Population divergence in the plasticity of the response of *Quercus coccifera* to the light environment. *Functional Ecology*, 2001,15 124–135 © 2001 British Ecological Society, 124, Blackwell Science, Ltd.
4. Cardoso H, (2004). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, FEUM, 8 edición, México.
5. Cardoso-Taketa A, Lozada J, Fragoso M, Villareal ML, Pereda R. (2004). Isolation of Nor-secofriedelanes from the sedative extracts of *Galphimia glauca*. *J. Nat Prod.* 67: 644-649.
6. Cardoso-Taketa A, Pereda MR, Choi YH, Verpoorte R, Villarreal ML. (2008). Metabolic profiling of the mexican anxiolytic and sadative plant *Galphimia glauca* using nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis. *Planta. Med.* 74:1-7.
7. Crispo, E. (2008). Modifying effects of phenotypic plasticity on interactions among natural selection, adaptation and gene flow. Department of Biology, McGill University, Montreal, QC, Canada.
8. Devkota, A, Dall'Acqua, S, Jha, PK, Innocenti, G. (2010). Variation in the active constituent contents in *Centella asiatica* grown in different habitats in Nepal. *Botanica Orientalis: J Plant Sci.*, 7: 43–47.
9. Estrada, E, 1985. Jardín Botánico de Plantas Medicinales Maximino Martínez. Universidad Autónoma de Chapingo, Departamento de Fitotecnia, México.
10. Herrera A, Jiménez FE, Zamilpa A, Morales VM, García VE, Tortoriello J. (2007). Efficacy and tolerability of a standardized herbal product from *Galphimia glauca* on generalized anxiety disorder. A randomized, double-blind clinical trial controlled with lorazepam. *Planta Med.* 73:713-717.

11. Herrera RM, González CM, Jiménez FE, Zamilpa A, Álvarez L, Ramírez G, Tortoriello J. (2006). Anxiolytic effect of natural galphimines from *Galphimia glauca* and their chemical derivatives. *J. Nat Prod.* 69: 59-61.
12. Herrera RM, Jiménez FJ, De Lima TCM, Avilés MD, Pérez GD, González M, Tortoriello J. (2006). Anxiolytic and antidepressant like activity of a standardized extract from *Galphimia glauca*. *Phytomedicine*; 13: 23-28.
13. Herrera-Ruiz, M., Jiménez FJ, De Lima, TCM, Aviles MD., Pérez GD., González-CM, Tortoriello, J. (2006). Anxiolytic and antidepressant-like activity of a standardized extract from *Galphimia glauca*. *Phytomedicine* 13, 23–28.
14. Huston MA. (1994). *Species diversity or biological diversity?* Cambridge University.
15. Keefover-Ring K, Thompson JD, Linhart YB. (2009). Beyond six scents: defining a seventh *Thymus vulgaris* chemotype new to southern France by ethanol extraction. *Flavour Fragr. J.* 24, 117–122.
16. Mallet J. (2007). *Species, Concepts of.* Encyclopedia of Biodiversity. University College London.
17. Makhnev, AK, Degtyarev, ES, Migalina, SV, (2012). Intraspecific variability of triterpene content in the leaves of *Betula pendula* Roth. *Contemp. Probl. Ecol.* 5, 179–184.
18. Medina-Holguín, AL, Micheletto, S, Holguín, FO., Rodríguez, J, O'Connell, MA,
19. Martin, C., (2007). Environmental influences on essential oils in roots of *Anemopsis californica*. *Hort. Science* 42: 1578–1583.
20. Nader BL, Cardoso, TA, Iturriaga G, Pereda, MR, Villarreal ML. (2004). Genetic transformation of *Galphimia glauca* by *Agrobacterium rhizogenes* and the production of norfriedelanones. *Planta Med*; 70:1174-79.
21. Niinemets Ü. (2010). Responses of forest trees to single and multiple environmental stresses from seedlings to mature plants: Past stress history, stress interactions, tolerance and acclimation. *Forest Ecology and Management* 260 (2010) 1623–1639.
22. Osuna L, Pereda MR, Tortoriello J, Villarreal ML. (1999). Production of the sedative triterpene galphimine B in *Galphimia glauca* tissue culture. *Planta Med*; 65: 149-52.
23. Patel AK, Phulwariaa M, Raia KM, Guptab AK, Shekhawata S, Shekhawata NS. (2014). *In vitro* propagation and *ex vitro* rooting of *Caralluma edulis* (Edgew.): An

- endemic and endangered edible plant species of the Thar desert. *Sci. Horticult.* 165:175–180.
24. Ranaweeraa KK, Gunasekarab MTK, Eeswarac JP. (2013). *Ex vitro* rooting: A low cost micropropagation technique for Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz) hybrids. *Sci. Horticult.* 155:8–14.
 25. Rojas G, Aranda E, Navarro V, Zamilpa A, Tortoriello J. (2005). *In vitro* propagation of *Galphimia glauca* and content of the sedative compound galphimine-B in wild and micropropagated plants. *Planta Med.* Volume: 71, Issue: 11, Pages: 1076-1078.
 26. Sharma, A, Cardoso-Taketa, A, Hae, CY, Verpoorte, R, Villarreal, ML. (2012a). A comparison on the metabolic profiling of the Mexican anxiolytic and sedative plant *Galphimia glauca* four years later. *J. Ethnopharmacol.* 141, 964–974.
 27. Sharma, A, Folch, JL, Cardoso-Taketa, A, Lorence, A, Villarreal, ML. (2012b). DNA barcoding of the Mexican sedative and anxiolytic plant *Galphimia glauca*. *J. Ethnopharmacol.* 144, 371–378.
 28. Siemens DH, Lischke H, Maggiulli N, Schurch S, Roy BA. (2003). Cost of resistance and tolerance under competition: the defensestress benefit hypothesis. *Evol Ecol* 17:247–263.
 29. Sobayed SMA, Murch SJ, Rupashinghe HPV and Saxena PK. (2004). *In vitro* production and chemical characterization of St. John’s wort (*Hypericum perforatum* L. cv “New Stem”). *Planta Science* 166: 333-340.
 30. Soria AC, Esteban J, Morales R**, Martín-Álvarez P Sanz J. (2008) Validación estadística de la presencia en plantas de quimiotipos caracterizados por la concentración de componentes volátiles obtenida mediante GC-MS. *Botánica Complutenses* 32: 225-236.
 31. Sadeghi F., Yadollahi A., Jafarkhani Kermani M., Eftekhari M. (2015). Optimizing culture media for *in vitro* proliferation and rooting of Tetra (*Prunus empyrean* 3) rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 13, 19–23.
 32. Patel AK., Phulwariaa M., Raia KM., Guptab AK., Shekhawata S., Shekhawata N.S. (2014). *In vitro* propagation and *ex vitro* rooting of *Caralluma edulis* (Edgew.) Benth. &

- Hook. f.: An endemic and endangered edible plant species of the Thar Desert. *Scientia Horticulturae* 165:175–180
33. Pigliucci M., Courtney J. Murren, Schlichting Carl D. (2006). Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *The Journal of Experimental Biology* 209, 2362-2367.
 34. Gianoli E. (2004). Plasticidad fenotípica adaptativa en plantas. *Fisiología ecológica en plantas. Mecanismos y Respuestas a Estrés en los Ecosistemas*.
 35. Sultan SE. (1987). Evolutionary implications of phenotypic plasticity in plants. *Evolutionary Biology* 21:127-178.
 36. Sultan SE. (1995). Phenotypic plasticity and plant adaptation. *Acta Botanica Neerlandica* 44:363-383.
 37. Tognetti R, Minotta G, Pinzauti S, Michelozzi M, Borghetti M. (1998). Acclimation to changing light conditions of long-term shade-grown beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings of different geographic origins. *Trees* 12:326–333.
 38. Fitzpatrick Benjamin M. (2012). Underappreciated Consequences of Phenotypic Plasticity for Ecological Speciation. *International Journal of Ecology* Volume 2012, Article ID 256017, 12 pages.
 39. Wallis IR, Keszei A, Henerya ML, Moran GF, Forrester R, Maintza J, Marsha KJ, Andrew RL, Foley WJ. (2011). A chemical perspective on the evolution of variation in *Eucalyptus globulus*. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 13: 305–318.
 40. Wilson RS, Franklin CE. (2002). Testing the beneficial acclimation hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution* Vol.17 No.2. PII: S0169-5347(01)02384-9.
 41. Xu, F, Guo, W, Xu, W, Wei, Y, Wang, R. (2009). Leaf morphology correlates with water and light availability: What consequences for simple and compound leaves? *Prog. Nat. Sci.* 19, 1789–1798.
 42. Word Climated Data. <https://www.es.climate-data.org/america-del-norte/mexico-179/> (accessed 24 may 2019).
 43. www.herbarium.lsa.umich.edu



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 28/Febrero/2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co Tutor)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Raúl Ernesto Alcalá Martínez
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez
Dra. Verónica Rodríguez López

Tesis: "VARIACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANSIOLÍTICOS Y SEDANTES EN POBLACIONES DE *Galphimia* sp. CULTIVADAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO E *IN VITRO*"

Alumno que la presenta a revisión: **GEMA SOLEDAD BALDERAS HERNANDEZ**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. MARIA LUISA TERESA VILLARREAL ORTEGA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 28 / Febrero / 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co Tutor)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Raúl Ernesto Alcalá Martínez
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez
Dra. Verónica Rodríguez López

Tesis: "VARIACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANSIOLÍTICOS Y SEDANTES EN POBLACIONES DE *Galphimia* sp. CULTIVADAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO E *IN VITRO*"

Alumno que la presenta a revisión: **GEMA SOLEDAD BALDERAS HERNANDEZ**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 02 - Marzo - 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co Tutor)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Raúl Ernesto Alcalá Martínez
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez
Dra. Verónica Rodríguez López

Tesis: "VARIACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANSIOLÍTICOS Y SEDANTES EN POBLACIONES DE *Galphimia* sp. CULTIVADAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO E *IN VITRO*"

Alumno que la presenta a revisión: **GEMA SOLEDAD BALDERAS HERNANDEZ**

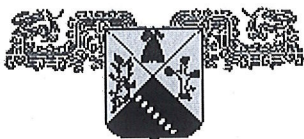
Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. ANABEL ORTIZ CALTEMPA



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 28 / Febrero / 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co Tutor)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Raúl Ernesto Alcalá Martínez
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez
Dra. Verónica Rodríguez López

Tesis: "VARIACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANSIOLÍTICOS Y SEDANTES EN POBLACIONES DE *Galphimia* sp. CULTIVADAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO E *IN VITRO*"

Alumno que la presenta a revisión: **GEMA SOLEDAD BALDERAS HERNANDEZ**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. RAUL ERNESTO ALCALA MARTINEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 28/Febrero/2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co Tutor)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Raúl Ernesto Alcalá Martínez
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez
Dra. Verónica Rodríguez López

Tesis: "VARIACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANSIOLÍTICOS Y SEDANTES EN POBLACIONES DE *Galphimia* sp. CULTIVADAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO E *IN VITRO*"

Alumno que la presenta a revisión: **GEMA SOLEDAD BALDERAS HERNANDEZ**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE



DRA. IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 2 Marzo 2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co Tutor)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Raúl Ernesto Alcalá Martínez
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez
Dra. Verónica Rodríguez López

Tesis: "VARIACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANSIOLÍTICOS Y SEDANTES EN POBLACIONES DE *Galphimia* sp. CULTIVADAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO E *IN VITRO*"

Alumno que la presenta a revisión: **GEMA SOLEDAD BALDERAS HERNANDEZ**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

DRA. NATIVIDAD SARA CONCEPCION GARCIA JIMENEZ



Universidad Autónoma del Estado de
Morelos
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a 28/Febrero/2020

COMITÉ DE REVISION DE TESIS

Dra. María Luisa Teresa Villarreal Ortega (Tutor)
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (Co Tutor)
Dra. Anabel Ortiz Caltempa
Dr. Raúl Ernesto Alcalá Martínez
Dra. Irene de la Concepción Perea Arango
Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez
Dra. Verónica Rodríguez López

Tesis: "VARIACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANSIOLÍTICOS Y SEDANTES EN POBLACIONES DE *Galphimia* sp. CULTIVADAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO E *IN VITRO*"

Alumno que la presenta a revisión: **GEMA SOLEDAD BALDERAS HERNANDEZ**

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE


DRA. VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ