



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“ELEMENTOS BOTÁNICOS DE DIAGNÓSTICO,
FISIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, Y
COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN
OENOTHERA AFFINIS CAMBESS.”**

María Cecilia Rivas

Tesis de Maestría en Plantas Medicinales

2005

Lugar de realización:

- Farmacobotánica (LABRAM). Departamento de Biología.

Fac. de Ciencias Exactas. UNLP.

- Centro Experimental de Propagación Vegetativa (CEPROVE)

- Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE)

Fac. de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP

- Instituto de Investigaciones Biológicas La Plata (INIBIOLP)

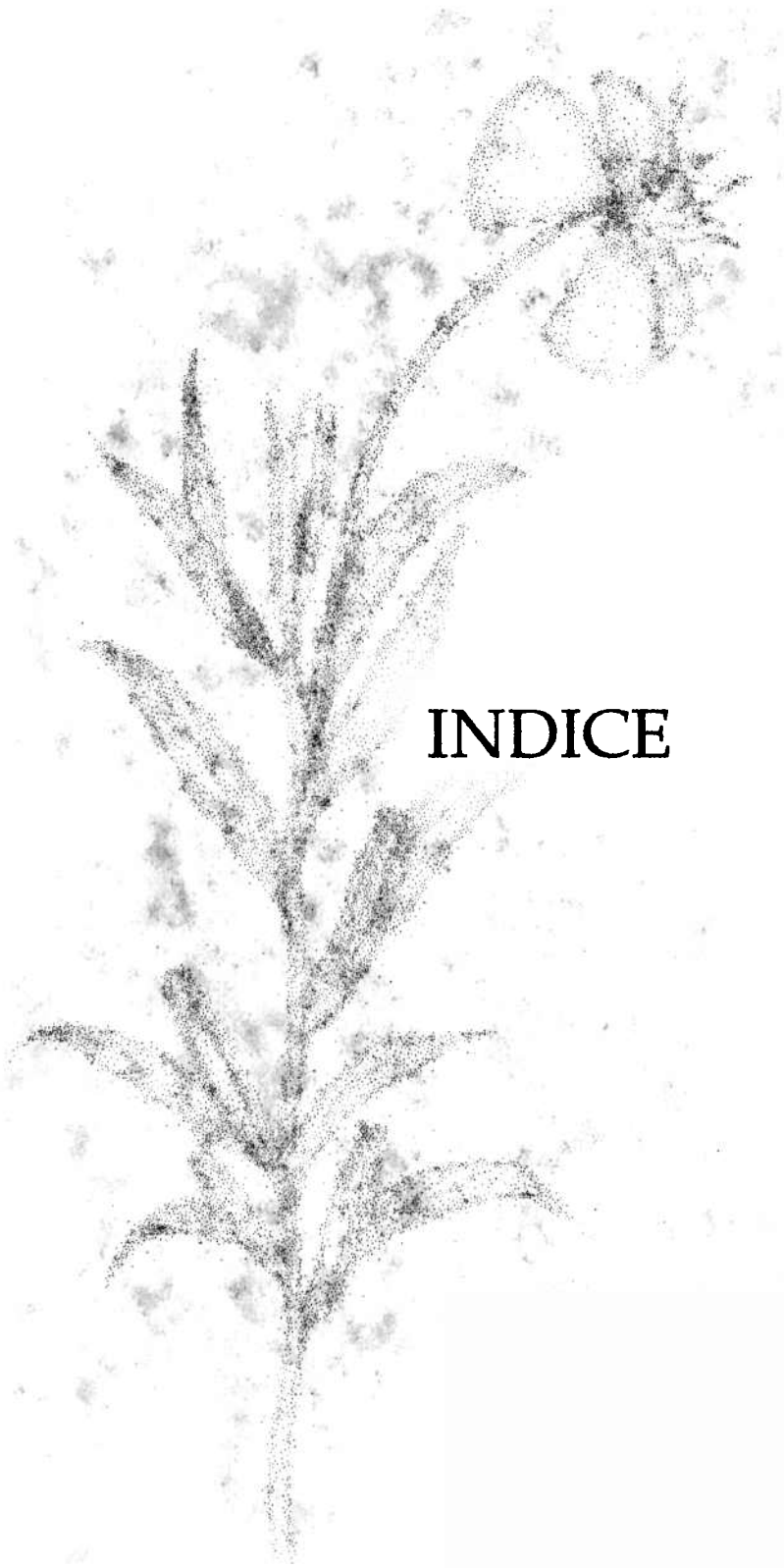
Fac. de Ciencias Médicas. UNLP

Directores: Ing. Ftal. (M. Sc.) Walter Ismael Abedini.

Dra. Etilé Dolores Spegazzini.

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un
esfuerzo total es una victoria completa”.*

Mahatma Gandhi



INDICE

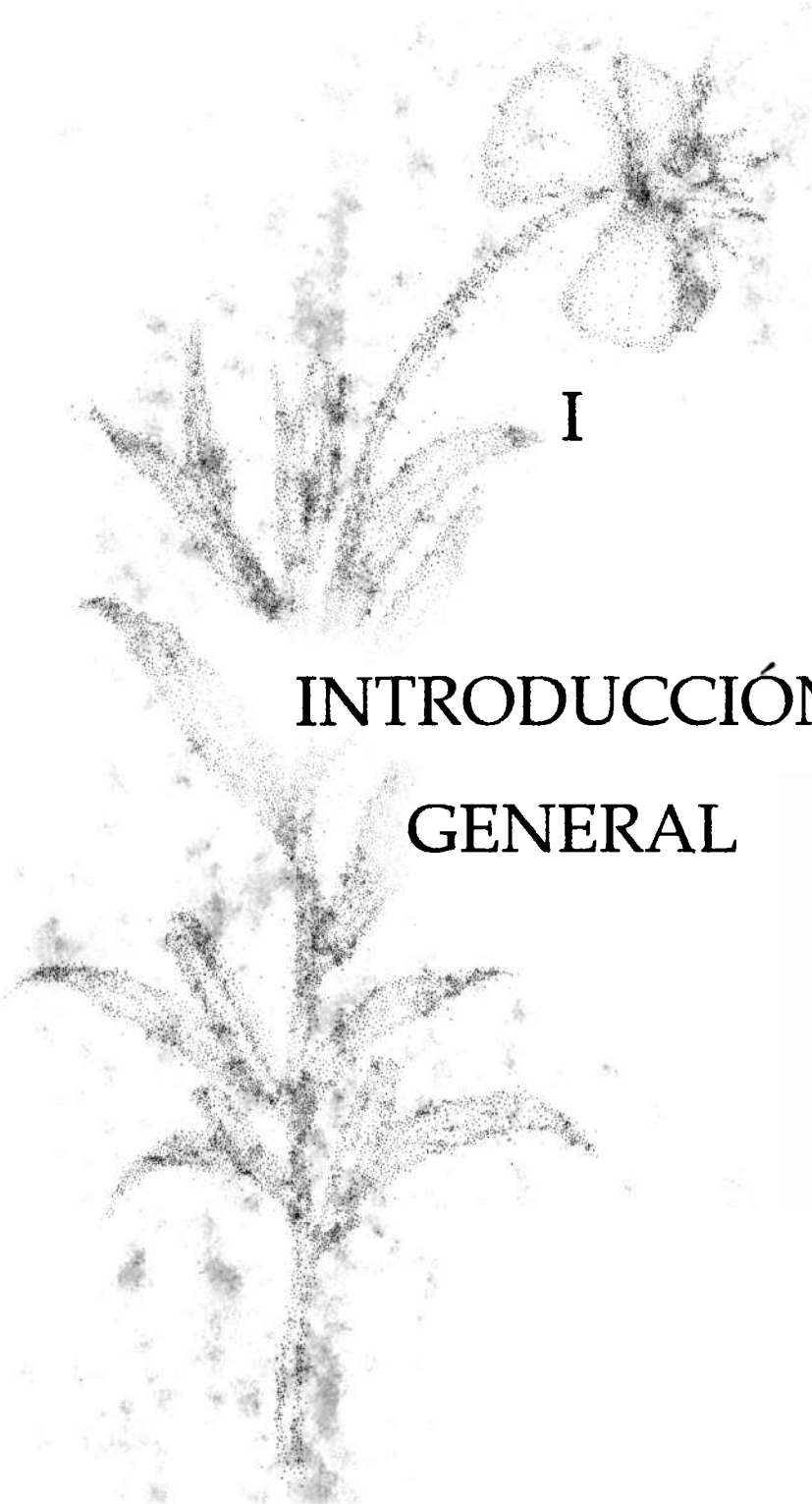
ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	
I. 1. Las plantas medicinales. Generalidades	1
I. 1. 1. Historia de las plantas medicinales en el mundo	1
I. 1. 2. Situación actual del mercado mundial de plantas medicinales	5
I. 1. 3. La Biodiversidad y acceso a los recursos genéticos	5
I. 1. 4. Situación de la Argentina. Perspectivas futuras	7
I. 2. El género <i>Oenothera</i> en medicina popular	10
I. 2. 1. Principios activos en especies del género <i>Oenothera</i>	12
I. 2. 2. <i>Oenothera affinis</i> , una planta nativa promisoría	13
II. OBJETIVO	
II. 1. Objetivo general	15
II. 2. Objetivos particulares	15
III. EXO-ENDOMORFOLOGÍA	
III. 1. La familia Onagraceae. Generalidades	16
III. 1. 1. Género <i>Oenothera</i>	16
III. 1. 2. Filogenia de las especies del género <i>Oenothera</i>	17
III. 1. 3. Especie tipo	18
III. 1. 4. Historia	18
III. 1. 5. Especies del Género <i>Oenothera</i> en Argentina	19
III. 2. <i>Oenothera affinis</i> Cambess. "flor de la oración"	20
III. 2. 1. Descripción de la especie	20
III. 2. 2. Distribución geográfica	22
III. 3. Objetivo	24
III. 4. Materiales y métodos	25
III. 4. 1. Materiales	25
III. 4. 2. Métodos	26
III. 4. 3. Test microquímicos	27
III. 5. Resultados	27

III. 5. 1. Caracteres anatómicos de raíz con estructura primaria	27
III. 5. 2. Caracteres anatómicos de tallo	28
III. 5. 2. 1. Tallo con estructura primaria	28
III. 5. 2. 2. Tallo con estructura secundaria	28
III. 5. 3. Caracteres anatómicos de hoja	28
III. 5. 3. 1. Lámina en vista superficial	28
III. 5. 3. 2. Lámina en corte transversal	29
III. 5. 3. 3. Pecíolo en corte transversal	29
III. 5. 4. Sección transversal de fruto	30
III. 5. 5. Análisis estructural de semilla	30
III. 5. 6. Grano de polen	30
III. 5. 7. Resultados de los test histoquímicos	31
III. 6. Figuras.	
III. 7. Discusión	31
IV. FISIOLÓGÍA DE LA GERMINACIÓN	39
IV. 1. La semilla. Definición. Características fisiológicas	39
IV. 1. 1. Viabilidad	40
IV. 1. 2. Reposo	41
IV. 1. 3. Domesticación y mejoramiento	42
IV. 2. Objetivo	45
IV. 3. Materiales y Métodos	46
IV. 3. 1. Material vegetal	46
IV. 3. 2. Determinación del contenido de humedad	47
IV. 3. 3. Determinación del peso de 1000 semillas	47
IV. 3. 4. Ensayos de germinación	48
IV. 3. 4. 1. Influencia de las bajas temperaturas	48
IV. 3. 4. 2. Influencia de la luz	48
IV. 3. 4. 3. Influencia del Ácido Giberélico (AG ₃)	49
IV. 3. 4. 4. Influencia del grado de madurez del fruto	49
IV. 3. 4. 5. Viabilidad en función del tiempo de almacenamiento	49
IV. 4. Resultados	50
IV. 4. 1. Contenido de humedad	50
IV. 4. 2. Peso de 1000 semillas	50

IV. 4. 3. Ensayos de germinación	50
IV. 4. 3. 1. Influencia de las bajas temperaturas	50
IV. 4. 3. 2. Influencia de la aplicación exógena de AG ₃	51
IV. 4. 3. 3. Influencia de la temperatura, luz y AG ₃	51
IV. 4. 3. 4. Influencia de la madurez del fruto	52
IV. 4. 3. 5. Viabilidad en función del tiempo de almacenamiento	52
IV. 5. Discusión	53
V. MORFOGÉNESIS IN VITRO	
V. 1. Biotecnología. Concepto. Historia	55
V. 2. Cultivo de tejidos <i>in vitro</i> . Morfogénesis	56
V. 2. 1. Factores que afectan los procesos morfogénicos	57
V. 2. 2. La biotecnología en el fitomejoramiento	60
V. 2. 3. La biotecnología y las plantas medicinales	61
V. 2. 4. La biotecnología y conservación de recursos genéticos	62
V. 3. Cultivo de tejidos <i>in vitro</i> en el género <i>Oenothera</i>	63
V. 4. Objetivo	65
V. 5. Materiales y métodos	66
V. 5. 1. Material vegetal	66
V. 5. 2. Tipo de explanto y desinfección	66
V. 5. 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación	67
V. 6. Resultados	68
V. 6. 1. Organogénesis	68
V. 6. 2. Callogénesis	68
V. 6. 3. Rizogénesis	69
V. 7. Láminas	71
V. 8. Discusión	72
VI. ACIDOS AGRASOS	74
VI. 1. Generalidades	74
VI. 1. 1. Función de los ácidos grasos. Importancia farmacológica	75
VI. 1. 2. Requerimiento de ácidos grasos esenciales	78
VI. 1. 3. Nomenclatura. Ácidos grasos en la naturaleza	79
VI. 1. 4. Presencia de ácidos grasos en plantas superiores	81

VI. 1. 5. Propiedades químicas de los ácidos grasos	81
VI. 1. 6. Biosíntesis	83
VI. 2. El aceite de "onagra" <i>Oenothera biennis</i>	85
VI. 2. 1. Composición química. Usos. Acción farmacológica	86
VI. 2. 2. Análisis de ácidos grasos en el aceite de "onagra"	87
VI. 3. Objetivo	89
VI. 4. Materiales y métodos	90
VI. 4. 1. Material vegetal	90
VI. 4. 2. Métodos de extracción	90
VI. 4. 3. Separación y cuantificación	91
VI. 5. Resultados	91
VI. 5. 1. Identificación y cuantificación	91
VI. 5. 2. Porcentaje de ácidos grasos analizados	93
VI. 6. Discusión	94
VII. CONCLUSIONES	95
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102



I

**INTRODUCCIÓN
GENERAL**

I. Introducción general

I. 1. Las plantas medicinales. Generalidades

I. 1. 1. Historia de las plantas medicinales en el mundo

El uso de las plantas medicinales se remonta al inicio de la civilización, como lo confirman numerosas pinturas rupestres. En la India, los textos de medicina ayurvédica (2500 a.C.) relatan cómo combatir la enfermedad mediante el uso de hierbas. En los papiros del antiguo Egipto (1700 a.C) se enumeran muchas plantas comunes, como el ajo, reconocida en la actualidad como hipotensor y reductor del nivel del colesterol, y el cáñamo que se usaba para los problemas oculares, mientras que la amapola era recomendada para “apaciguar el llanto de los niños” (Odi, 1993). En Grecia, en tiempos de Hipócrates (400 a.C.), se incorporaron conocimientos venidos de Asiria e India sobre el uso de plantas tales como la albahaca, utilizada como tónico y cuyo jugo se aplicaba para las mordeduras de serpiente y el jengibre que se empleaba para “caldear el estómago y disipar enfriamientos” y se sigue aún utilizando en China para reducir la toxicidad de algunas hierbas. Digno de mencionar es el griego Pedanius Dioscorides que escribió el documento clásico “*De Materia Medica*”, en el año 60 d.C., convertido en libro de referencia obligada durante 1500 años y que comprende la descripción y uso de aproximadamente 600 plantas medicinales.

La medicina tradicional China, cuya esencia se basa en conocimientos que se acumulan en el tiempo, trasciende hasta nuestros días; en ella se conjuga el equilibrio entre el cuerpo y el espíritu, y las hierbas constituyen un elemento clave del tratamiento terapéutico, asociado al equilibrio interior y con otras prácticas tales como la acupuntura. En la actualidad Occidente se ha familiarizado con estas

prácticas milenarias. Como ejemplo de algunas plantas usadas por los chinos citaremos la raíz de ginseng, recomendada como tónico y en afecciones del bazo y del estómago; las semillas de albaricoque o “Xing ren” que favorece la ventilación pulmonar y el “Gan cao” (raíz de regaliz) que tiene la propiedad de armonizar otras hierbas asociadas en diferentes tratamientos (Odi, 1993).

Como en muchas otras disciplinas, los pueblos de América, entre ellos los Aztecas, sorprendieron al Viejo Mundo por el conocimiento y uso de las plantas medicinales como los estigmas del maíz, la pimienta y el urucú. Muchas de estas plantas tenían carácter ritual; por caso los hongos alucinógenos como el peyote, administrados por los chamanes o brujos que lo consumían en busca del “viaje” que permitiera encontrar el alma de la persona enferma y lograr sanarla. La civilización Inca es otro claro ejemplo de antiguas culturas americanas con fuerte tradición de uso de plantas medicinales tales como la quina, la raíz de ratania y la zarzaparrilla (Ratera y Ratera, 1980; Doménech, 1998; Kinghorn, 2001).

La administración de la medicina tradicional estaba a cargo de sacerdotes, hechiceros, chamanes, machis, curanderos, sanadores, y era transmitido en forma oral de generación en generación. El hombre aprendió a reconocer las plantas y usarlas y respetarlas como forma de salvaguardar la salud. Lamentablemente estos conocimientos se desvanecieron en la medida del avance de la “civilización”. El desarrollo de la ciencia positiva y de las tecnologías de síntesis química los opacaron, y es recién en nuestros días que el hombre rescata las bondades de esas plantas, haciendo uso de un criterio científico de modo tal de asegurar su calidad y seguridad (prospección química), alcanzando de este modo la categoría de medicamento.

Los estudios modernos acerca de las propiedades terapéuticas de determinadas especies vegetales y su posible aplicación en la industria

farmacéutica están basados, en una primera instancia, en la etnofarmacobotánica, o sea en la recopilación de los conocimientos que se asientan en una comarca particular y se acumulan con el tiempo por transmisión de generación en generación (Cox, 2000). Hoy en día, la bioprospección, esto es: "la recolección de plantas y animales silvestres para aprovechar recursos genéticos y bioquímicos comercialmente valiosos" (GeneFlow, 2002), es el primer paso hacia la obtención de información científica del producto, pero ello implica realizar un screening al azar, lo cual demanda mucho tiempo. Actualmente se utilizan otras metodologías a fin de obtener compuestos con actividad demostrada *in vitro* e *in vivo* ("Lead") como son la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica, todas ellas tendientes a medir la mayor cantidad de parámetros bajo condiciones distintas (Verpoorte, 2004).

En el año 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS) solicita a los Estados Miembros que inicien estudios relacionados con la flora medicinal a fin de unificar criterios sistemáticos y de uso. El rescate del conocimiento popular y la sistematización de la información obtenida darán el marco para la validación de estas plantas. El mencionado organismo, en 1991, elabora la Reglamentación Farmacéutica y, en el año 2004, el Parlamento Europeo establece un código comunitario sobre medicamentos tradicionales a base de plantas para uso humano (Directiva 2004/24/CE, 2004). En ambos casos se establece la normativa de evaluación de inocuidad, seguridad y eficacia, a fin de brindar a la población un producto de calidad controlada.

En la actualidad, a medida que se profundizan los estudios farmacológicos, aparecen nuevas aplicaciones terapéuticas para especies de uso tradicional y se convalidan muchos de los antiguos usos. A continuación, y a manera de ejemplo, se enumeran algunas plantas de uso ancestral y las nuevas aplicaciones

descubiertas en nuestros días, ya sea a partir de los extractos, o por síntesis química de los principios activos encontrados en dichas plantas:

La “cascarilla”, *Cinchona pubescens* (Rubiaceae), de cuya corteza se extrae la quinina, fue usada por los indios de Centroamérica en la cura de la malaria. Los europeos la llevaron al Nuevo Mundo en 1630 y aislaron la quinidina y cinchonidina. Actualmente estos compuestos se obtienen y comercializan como productos de síntesis química (Dewick, 1997).

Las raíces y el rizoma seco de *Rauwolfia serpentina* (Apocinaceae), se usan en África desde hace 3000 años como antidoto ofídico. En 1947, el laboratorio CIBA extrajo un alcaloide, la reserpina y luego, en 1950, se aisló la rescinamina y deserpidina y se comprobó su acción como antihipertensivo, sedante y en tratamientos de disturbios mentales (Dewick, 1997).

Un caso típico lo constituye la planta determinada antiguamente como *Vinca rosea* y actualmente clasificada como *Catharanthus roseus* (Apocinaceae). Se trata de una planta oriunda de Madagascar, de la cual se han extraído y caracterizado más de 150 alcaloides. La vincristina y la vinorelbina fueron las primeras en usarse para tratamientos de linfomas, cáncer cervical y de mama. Más tarde se obtuvo la vindesina por hemisíntesis y actualmente se obtienen productos similares, pero de mayor eficacia, mediante la aplicación de técnicas biotecnológicas (Dewick, 1997).

Otro ejemplo muy significativo lo constituye el uso del “tejo”, *Taxus brevifolia* (Taxaceae), una especie arbórea de pequeño porte del Hemisferio Norte, de cuya corteza se extrae el TAXOL[®] aislado en 1971, que se utiliza en el tratamiento de cáncer de ovario. La sobreexplotación de la especie para la obtención de los principios activos llevó a una degradación del recurso de tal magnitud que condujo a encontrar una nueva vía de provisión de los fármacos. Es así que actualmente,

por hemisíntesis, se obtiene el TAXOTERE®, compuesto que reduce los efectos adversos de los fármacos originales (Ramachandra, 2002; Dewick, 1997).

I. 1. 2. Situación actual del mercado mundial de plantas medicinales

Como se ha visto en estos pocos ejemplos, resulta fundamental el estudio de las plantas para el desarrollo de medicamentos, pues se logra mejorar la acción farmacológica y se reducen los efectos tóxicos. Pero simultáneamente, la herboristería demanda, tanto en cantidad como en calidad, productos vegetales confiables para satisfacer un mercado paralelo al de la industria farmacéutica, con llegada a una franja cada vez mayor de la población, independientemente de su condición económica, y en franco ascenso. En el año 1999, el mercado mundial de medicamentos herbolarios generó 19.4 billones de dólares, de los cuales 6.7 corresponden a Europa, 5.1 a Asia, 4.0 a Estados Unidos de América, 2.2 a Japón y 1.4 billones de dólares para el resto del mundo (Laird y Pierce, 2002, Perrota, 2003). Cabe recordar, que el uso de plantas constituye hoy la única fuente de medicina para el 70 al 80% de la población de los países subdesarrollados y en vías de desarrollo (Farnsworth y Soejarto, 1988).

I. 1. 3. La Biodiversidad y el acceso a los recursos genéticos de las plantas medicinales

Numerosas especies vegetales de uso tradicional, han desaparecido de la faz de la tierra por cataclismos, cambios climáticos y, en gran medida, debido a la

fuerte presión antrópica, esto es, cuando el hombre avanza con la frontera agrícola, deforestando, privilegiando el monocultivo o construyendo represas o grandes urbanizaciones. Muchas plantas sobreviven y otras tantas quedan por estudiar. Las cifras son elocuentes: se conocen hasta el momento alrededor de 150000 productos naturales; se reportan 4000 nuevos compuestos naturales cada año; sólo en el 15 % de las plantas se conoce alguno de sus componentes.

La World Wide Foundation for Nature estimaba que para el año 2000 habrían desaparecido, o estarían en peligro de extinción, unas 50 mil especies vegetales del planeta; esto equivale a perder una de cada cinco plantas existentes, lo cual amerita reflexionar acerca de la importancia que tiene el conocimiento, aprovechamiento y conservación de la diversidad biológica de la flora.

Cabe señalar que en los países del llamado primer mundo se crearon diversos institutos que cuentan con presupuestos millonarios, dedicados al estudio de la composición química y la acción farmacológica de numerosas plantas, las que, paradójicamente se encuentran o son originarias de los países en desarrollo. Tal es el caso del National Cancer Institute (NCI) y el Smithsonian Institute, dedicados a relevar y recolectar ejemplares de la flora de Centro y Sudamérica y de Asia, con el objeto de establecer "bibliotecas". Estos bancos de genes aportan, mediante screening, la información de los metabolitos secundarios presentes, y que pasarán a integrar bases de datos tal como NAPRALER y el Dictionary of Natural Products (Verpoorte, 1999).

No es menor el conflicto de intereses que se plantea entre países o comunidades indígenas "poseedoras" del recurso y los estados o empresas que hacen usufructo del mismo. Si bien la Convención sobre Diversidad Biológica, en sus artículos 8 j, 10 c y 18 4, expresa con claridad "la necesidad de preservar y mantener el conocimiento ancestral y el uso sustentable del recurso, compartiendo

en forma equitativa los beneficios que devengan de la utilización del conocimiento de la planta y las innovaciones tecnológicas”, lejos se está de llevar a la práctica dichos enunciados. En ese sentido se entiende que el marco adecuado para articular esfuerzos de las distintas partes involucradas debe consistir en buenas alianzas (Baker *et al*, 1995), con el aporte financiero de la industria farmacéutica para la conservación ambiental a cambio de determinados derechos sobre la explotación de los recursos bióticos. En términos prácticos, lo afirmado significa buscar una forma de materializar el circuito lógico que incluye la conservación, la prospección química y el rédito financiero, mediante acuerdos contractuales entre países o regiones que busquen preservar sus recursos (programa CYTED, subprograma Química Fina Farmacéutica, 1989), e industrias que se propongan encontrar compuestos químicos que puedan ser utilizados; por ejemplo, lo acordado entre Costa Rica y la empresa Merck (INBIO-Merck) en el año 1989, o la relación entre Glaxo-Wellcome y la compañía brasileña de biotecnología Extracta, por la cual un número determinado de los descubrimientos deben ser donados a Brasil, quien se beneficia por la adquisición de infraestructura local (Cordell, 2000). Otro caso lo constituye la creación de la red Latinoamericana para la investigación de Compuestos Naturales Bioactivos (LANBIO) en el año 1991, con el apoyo del International Programme in the Chemical Science de la Universidad de Uppsala (Suecia) y de la International Foundation for Science (Reid *et al*, 1993).

I. 1. 4. Situación de la Argentina. Perspectivas futuras

Particularmente, las plantas medicinales nativas de la República Argentina han sido estudiadas desde el punto de vista botánico sistemático como lo

demuestran los trabajos de Volponi (1985), Amat (1983), Bocco *et al* (1997), Verettoni (1985), Freire y Urtubey (1999 y 2000), Barboza *et al* (2001), entre muchos otros. Pero el uso terapéutico de buena parte de las mismas está avalado hasta el momento, solamente por la medicina tradicional. Antecedentes sobre el tema se pueden encontrar en los trabajos desarrollados por Amorín (1974), Nájera y Spegazzini (1984, 1985), Amat *et al* (1998), Bassols y Gurni (1996), Bayón y Arambari (1999), Núñez y Cantero (2000) y recopilaciones como la de Ratera y Ratera (1980) y el Trabajo de la Asociación de Universidades Grupo de Montevideo (AUGM). Núcleo Temático "Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones.

Desde el año 1967 Rondina y col., en la Universidad de Buenos Aires, se abocan a la confección de una base de datos de plantas medicinales y tóxicas que cuenta actualmente con un registro de 1500 especies, donde se consignan datos como: nombre científico, sinónimos, hábitat, nombre vulgar, parte de la planta usada; sus aspectos morfológicos, anatómicos y obtención de parámetros cuali-cuantitativos para su diagnóstico, suministrando mediante ensayos químicos y pruebas biológicas, las recomendaciones para su uso terapéutico. La información se completa año tras año incorporando nuevas especies, con abundante bibliografía de consulta en la versión en CD de Bandoni *et al* (1998) y Martino y Rondina (1998) y en el trabajo de y Bandoni (2003) sobre "Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica" en la que, no sólo se describe el panorama general sobre estos recursos, sino que se agrega información a cerca del manejo de cultivo, usos y aplicaciones.

Poco o nada más nos ofrece el campo científico académico en esta materia en nuestro país. Por ello, nos encontramos hoy ante la necesidad de un estudio pormenorizado de las especies vegetales autóctonas, ya sea por su tradición de uso en medicina popular local, como de aquellas emparentadas con especies de

otros lugares cuyas propiedades terapéuticas están reconocidas. Estos estudios debieran incluir tanto los aspectos morfológicos, micrográficos y fitoquímicos (screening farmacológico) y posteriores pruebas biológicas, de modo tal de validar su uso; así como promover el conocimiento de sus características reproductivas y otros aspectos fisiológicos con el objeto de lograr su domesticación y cultivo.

Por otra parte y al mismo tiempo, es claro que resulta imprescindible preservar el recurso genético, teniendo en cuenta que la supervivencia de estas especies vegetales en su hábitat natural está amenazado por la recolección indiscriminada, casi siempre a cargo de personas inexpertas. El resultado se traduce en una peligrosa erosión génica y en la obtención de productos herbolarios de escaso valor, ya que las plantas recolectadas de poblaciones silvestres no reúnen las especificaciones de calidad, debido a la variabilidad natural, desconocimiento de la época de cosecha óptima para el mejor producto y a la presencia de impurezas y contaminantes. Todas estos controles están detallados en las normativas emitidas en el año 2001 por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) en las "Buenas Prácticas Agrícolas" y en "Buenas Prácticas de Manufactura", y en el "Codex Alimentarius" dictado por la Food and Agriculture Organization (FAO) en 1962.

La domesticación de plantas medicinales, entendiéndose como tal "el proceso de transformación y adaptación genética, tendiente a la máxima producción de principios activos de interés farmacológico, en condiciones ecológicas y económicamente sostenibles" (Ocampo y Villalobos, 1997), es prerequisite esencial para la producción de extractos estandarizados, así como para la implementación de test farmacológicos y pruebas clínicas. El cultivo y manejo adecuados permite controlar el material genético, los factores ambientales y nutricionales de la planta a fin de optimizar la calidad y los rindes. En tal sentido, los

trabajos de Letchamo *et al* (1993), Pietsch *et al* (1995), Büter *et al* (1998), Wang *et al* (1999) y Fielsend y Morinson (2000) demuestran los logros, mediante la domesticación, en especies tales como la manzanilla, el aloe y el hypérico.

I. 2. El género *Oenothera* en la medicina popular

Nos referiremos particularmente al género *Oenothera* debido a la amplia distribución geográfica de las especies que lo componen y, como se verá en los capítulos siguientes, por la posibilidad de encontrar en la flora nativa especies del género *Oenothera* de aplicación farmacológica. Es así que se puede hallar, basándose en estudios etnobotánicos, referencias sobre múltiples aplicaciones en el campo de la medicina tradicional como se describe a continuación:

Las raíces, hojas, flores, frutos y semillas de "primrose" (*Oenothera biennis* L.), originaria del Oeste de América del Norte fue utilizada por los aborígenes como alimento y en tratamiento de afecciones de las vías respiratorias y como antiflogístico. Fue introducida en Europa en el siglo XVII donde se encuentra actualmente al estado silvestre y bajo cultivo (Gola *et al.*, 1961).

A *Oenothera multicaulis* Ruiz & Pavón, se la encuentra entre los 3500 a 4500 m.s.n.m. desde Perú hasta Bolivia, y en Guatemala se la localiza tanto en praderas húmedas, como en lugares secos y rocosos (Macbride, 1941). Es una especie que se emplea en forma de decocción como desinfectante para lavar heridas, a manera de cataplasma en las contusiones o golpes para reabsorber la sangre y es además, un gran desinfectante en general (García-Barriga, 1975). Estas afirmaciones concuerdan con las de Perez-Arbelaez (1975) quien señaló que "esta especie sirve en infusión, para lavar heridas y en cataplasmas para

reabsorber la sangre acumulada bajo la piel por las contusiones”. Según Girault (1987), los indígenas Callaway de Bolivia usan las hojas frescas o secas de esta misma especie, en decocción, contra las inflamaciones de la matriz y ovarios en lavados uterinos. Las hojas y raíces frescas o secas en decocción, acompañada con raíz de “sacha parakay” (*Coligonia waberbaueri*), se toma en el tratamiento de flujos blancos.

La comunidad Chinchero del sur del Perú utiliza las hojas de *O. multicaulis* en forma de emplasto, para curar heridas y llagas. La raíz se emplea como infusión para combatir inflamaciones y calmar los estados de embriaguez (Fraquemont y Fraquemont, 1990). Piñeiros y García-Barriga en 1991, reafirmaron el uso de esta especie en forma de decocción, como antiséptico para lavar heridas. También le reconocen propiedades antiflogísticas en general y las hojas se emplean en forma de cataplasma para aliviar los golpes; las hojas cocidas se usan para combatir la neumonía, las enfermedades de los riñones, la vejiga y para eliminar parásitos intestinales.

Las hojas de *Oenothera campylocalyx*. se usan en forma de infusión para las enfermedades de la matriz, riñones y vejiga; el cocimiento de las mismas se emplea contra las enfermedades venéreas (De Lucca y Zalles, 1992).

En su libro “Plantas Medicinales de la Argentina”, Toursarkissian (1980), cita a Murillo (1889) quien se refiere a una especie de Chile y del sur de Argentina, *O. acaulis* Cav., de nombre vulgar: “colsilla”, como vulnerario; y a Hieronymus (1882) el cual le atribuye propiedades semejantes a otros géneros de *Oenothera* de la Argentina. *Oenothera pumilla* L., llamada vulgarmente “hierba de Santiago” es la única especie del género que está incluida en la Farmacopea de México en la 1ª y 2ª Edición. La parte aérea es usada en decocciones como emoliente. Estas mismas propiedades se reconocen en *Oenothera mollissima* L. (García-Barriga, 1975).

I. 2.1. Principios activos en especies del género *Oenothera*

Más allá de los usos tradicionales, muchos autores realizaron estudios para determinar el contenido de principios activos en numerosas especies del género *Oenothera*. Bernal *et al* le dedican un capítulo en el libro: "Especies Vegetales Promisorias de los países del Convenio Andrés Bello" (1998). En él se detalla en particular la especie *O. multicaulis*, si bien, en esa publicación, se describen los compuestos químicos hallados en 14 especies del género.

La especie del género *Oenothera* más difundida desde el punto de vista farmacológico es *Oenothera biennis* L. llamada vulgarmente "onagra" o "evening primrose". Bajo cultivo se usa en el Hemisferio Norte como ornamental y para la extracción de ácidos grasos esenciales, denominados comúnmente aceite de "onagra".

El aceite de "onagra", que se extrae de las semillas, posee 24% de aceites totales, compuesto por: ácido linoleico (65-80%), γ linolénico (14%), palmítico (7%) y ácido oleico (9%), entre otros (Krzyzaniak y Segeit-Kujaba, 1991. Christie, 1999 y Dewik, 1997). En particular, el ácido γ linolénico puede convertirse directamente en dihomo- γ -linolénico actuando como precursor de las prostaglandinas. Shukla *et al* (1999) comprobaron los efectos benéficos del aceite de "onagra" en enfermedades cardiovasculares, síndrome premenstrual y esclerosis múltiple. Estos mismos autores, aislaron ácido gálico y comprobaron la actividad antimicrobiana en extractos de raíces de *O. biennis*.

En otras especies del género *Oenothera* se detectaron concentraciones de ácido γ -linolénico superiores a las dosadas en "primrose" (Bruneton, 1991; Le Bozec, 1988). También se reconocieron otros compuestos como taninos elágicos en raíces de *O. lacinata*, de probada actividad antitumoral y antimicrobiana

(Yoshida *et al*, 1995; Taniguchi *et al*, 1998). A la vez se ha demostrado la eficacia de extractos de *Oenothera rosea* como antiinflamatoria y antiedematosa (Meckes *et al*, 2004) y de *O. paradoxa* en el tratamiento de diversas afecciones dermatológicas, trastornos hepáticos y colesterolemia (Balasinska, 1998) y, en general, en patologías relacionadas con la deficiencia de ácidos grasos esenciales. Por lo que se plantea la posible existencia de estos compuestos en especies nativas del género *Oenothera* en nuestro territorio y, en especial en la provincia de Buenos Aires donde se verifica la existencia de varias especies del género, entre ellas *Oenothera affinis* "flor de la oración".

I. 2. 2. *Oenothera affinis*, una planta nativa promisoría

Es a partir de ese marco conceptual descripto, y por los antecedentes de otras especies del género *Oenothera*, que el presente trabajo pretende ahondar en el conocimiento de una planta nativa: *Oenothera affinis* "flor de la oración".

Cuando nos referimos a *Oenothera affinis* Cambess. "flor de la oración" o "suspiros", planta nativa como se describe más adelante, encontramos en la bibliografía diversas aplicaciones tanto tradicionales como potenciales. Hyeronimus (1882) describe estas plantas como vulnerarias y aclara: "con el decoctado de las yerbas se lavan las heridas y se ponen también sobre éstas la yerba triturada en forma de cataplasma". Lahitte y Hurrell (1998) aclaran que las cataplasmas se consiguen machacando el polvo de las flores y se aplica como vulneraria. Del mismo modo la describen Núñez y Cantero (2000) en el trabajo sobre Plantas medicinales del sur de la provincia de Córdoba. También se cita a la "flor de la oración" como pigmento alimenticio potencial y fuente de xantófilas (Xifreda,

1992) y por su contenido de carotenoides (Natalucci y Caffini, 1980 y Natalucci, 1982).

Además de los usos enunciados, el estudio de la "flor de la oración" está orientado a conocer el contenido de ácidos grasos en las semilla, característica distintiva de *Oenothera biennis*, otra especie exótica del género *Oenothera*.



II

OBJETIVO

II. Objetivo

II. 1. Objetivo general

El objetivo del presente trabajo es el estudio de algunos aspectos que caracterizan a la "flor de la oración" (*Oenothera affinis* Cambess.), una planta nativa de interés medicinal y como posible reemplazo de fuente vegetal de ácidos grasos (aceite de "onagra" o "primrose"), obtenidos de *Oenothera biennis* "onagra", una planta originaria del hemisferio Norte y de reconocidas propiedades farmacológicas.

II. 2. Objetivos particulares

- a- Caracterizar los elementos botánicos de diagnóstico

- b- Conocer las características fisiológicas de la germinación de la semilla

- c- Estudiar los procesos de morfogénesis *in vitro*

- d- Identificar y cuantificar los ácidos grasos presentes en las semillas



III

EXO-ENDOMORFOLOGÍA

III. Exo-endomorfología

III. 1. La familia Onagraceae. Generalidades

La familia Onagraceae (Oenotheraceae) está bien definida dentro de las plantas con flor. Incluye siete tribus, 16 géneros y aproximadamente 652 especies, de las cuales 80 pertenecen al género *Oenothera*. Están ampliamente distribuidas en todo el mundo, pero predominan en América, donde ocupan regiones subtropicales y templadas, siendo más escasas en las regiones intertropicales (Hoch *et al.*, 1993). La familia Onagraceae se estudió desde el punto de vista biosistemático concluyendo que la misma, conforma un grupo monofilético definido por los siguientes sinapomorfías:

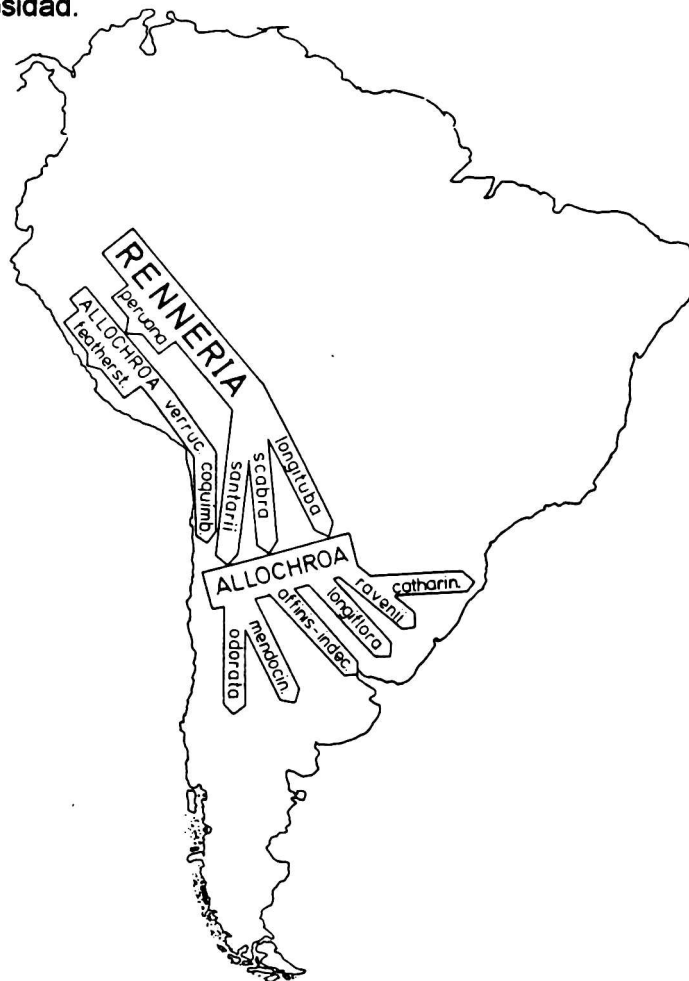
Un saco embrionario tetranucleado, presencia de abundantes rafidios en células vegetativas, septos dividiendo el tejido esporogénico, incrustaciones paracristalinas en la exina del polen, hilos de viscina o torzadas de ectexina sobre la pared proximal del polen (Hoch *et al.*, 1993).

Straley (1977) y Wagner (1986) realizaron revisiones taxonómicas para todas las especies de la familia focalizadas en las del Hemisferio Norte (Carlquist, 1977; Eyde, 1982), con estudios de las características foliares, florales y del leño, número cromosómico, tipo de reproducción y polinización. Un trabajo similar, pero en este caso para las *Oenotheras* del hemisferio Sur, fue realizado por Dietrich (1977).

III. 1. 1. Género *Oenothera* L. (LINNÉ, *Specie Plantarum*, 1: 346, 1753). Género tipo: *Oenothera biennis* L. nv. "onagra", "evening primrose" en inglés, "Nachtkrize" (vela de noche) en alemán, "blattaria virginiana" en italiano, "Diego de Noche".

III. 1. 2. Filogenia de las especies del género *Oenothera*

El ancestro común de *Oenothera*, Secc. *Oenothera*, Subsección *Munzia*, Serie *Allochroa*, se originó en la mitad del período Terciario en las regiones áridas y semihúmedas del oeste de Norteamérica, convirtiéndose en el centro de evolución de toda la Tribu Onagreae de donde proviene *Oenothera*. Este género parece haber arribado a Sud América desde Norteamérica sólo algunos millones de años atrás, originando por lo menos 57 taxas distintas en respuesta a los drásticos cambios climáticos sufridos durante ese período y al incremento de la altura en la zona montañosa de Sud América. En el trabajo de Dietrich (1977) se describen estos aspectos con minuciosidad.



Esquema 1. Distribución filogenética de la evolución de *Oenothera* (Dietrich, 1977)

III. 1. 3. Especie tipo: *Oenothera biennis* L., nv. "onagra" "evening primrose", es una planta bianual, de hasta 1,5 m de altura, hojas alternas, inflorescencia en espiga en el extremo del pedículo, flores amarillas, fruto cápsula con numerosas semillas. Floración estival, las flores son efímeras (de ahí su nombre común): abren al atardecer y marchitan al día siguiente.

La *Oenothera biennis* fue introducida en Europa, desde América, en el siglo XVII. Este género *Oenothera* se ha hecho célebre como consecuencia de los estudios realizados con alguna de sus especies, especialmente con la *Oenothera lamarckiana*, por H. de Vrie, para fundamentar su teoría de la mutación (Gola *et al*, 1961) y en investigaciones relacionadas a la evolución, debido a la capacidad de hibridación y por lo tanto alcanzando una compleja heterozigocidad (Dietrich, 1977).

III. 1. 4. Historia

La "onagra" recibió de Bauhin (1671), el nombre de *Lysimachia lutea comiculasta*. Alpino, en 1656, la describió bajo el vocablo de *Lysimachia virginiana* y publicó una figura con mucha exactitud. Esta especie despertó la curiosidad de los ingleses y fue llamada por Parkinson, según Leclerc (1967), *Lysimachia silicosa virginiana*, nombre que perduró en el tiempo gracias a Morrison (1680) que la denominó *Lysimachia lutea comiculata non paposa virginiana major*. Fue Linneo, citado por Leclerc (1967), quien creó el término "*Oenothera*", cuya etimología indica que procede del griego. Algunos atribuyen su origen a los términos *oinos* (vino), *thèoraô* (cazar), alusión a la propiedad que poseería la planta de disipar la embriaguez. Otros encuentran en las palabras *onos* (asno), *thera* (presa), la

etimología que explicaría la simpatía de los asnos por la *Onagra* cuyas hojas pastan gustosamente. Otros proponen que las raíces *oinos* (vino) y *ther* (bestia salvaje) de *Oenothera* hace mención a la designación entre los antiguos de una planta cuya raíz, puesta en infusión en vino, habría servido para domesticar las bestias.

III. 1. 5. Especies del Género *Oenothera* en Argentina

En el trabajo realizado por Munz, en 1932, se hace referencia a 80 especies de América subtropical y templada y, en coincidencia con Cabrera y Zardini (1978) se describen 8 géneros y 13 especies de *Oenotheras* en la Argentina, de las cuales 7 son nativas y comparten las siguientes características: Poseen flores hermafroditas, actinomorfas, 4-(rara vez 2-6)-meras. Receptáculo a menudo prolongado por encima del ovario. Sépalos libres. Pétalos no soldados entre sí, torcidos o imbricados, rara vez ausentes. Estambres en número igual o doble a los pétalos: anteras biloculares, de dehiscencia longitudinal. Ovario ínfero, alargado, 4-(2-6) locular; estilo simple, estigma esférico o con tantas ramas como carpelos. Óvulos numerosos, de placentación axilar, uni o pluri-seriados en cada lóculo. Fruto cápsula, baya o nuez. Semillas sin endosperma, numerosas en cada lóculo, rara vez solitarias, 2 lisas, aladas o con un mechón de pelos en uno de los extremos.

Son hierbas anuales o perennes, rara vez subarbustos, con hojas simples, opuestas o alternas, sin estípulas o con estípulas deciduas, flores solitarias o en espigas o racimos, amarillas, blancas o rosado-púrpura.

El siguiente listado corresponde a las especies del género *Oenothera* encontradas en la Argentina y descritas por Cabrera y Zardini (1978) y Correa (1988), en él se indica si las mismas son nativas (n) o son exóticas (e).

- Oenothera rosea* Ait. (e)
- Oenothera centaurifolia* (Spach) Steud. (n)
- Oenothera affinis* Cambess. (n)
- Oenothera longiflora* L. (n)
- Oenothera indecora* Camb. (n)
- Oenothera parodiana* Munz. (n)
- Oenothera mollissima* L. (n)
- Oenothera nana* Griseb (e)
- Oenothera odorata* Jacquin (n)
- Oenothera stricta* Ledeb. (n)
- Oenothera campilocalix* Kock y Bouché (e)
- Oenothera contorta* Dougl. var. *divaricata* (Gay) Munz (e)
- Oenothera grandiflora* Aiton (e)
- Oenothera bahia-blancae* (e)
- Oenothera mendocinensis* (e)
- Oenothera picensis* (e)
- Oenothera magellanica* (e)
- Oenothera villaricae* (e)

III. 2. *Oenothera affinis* Cambess. “flor de la oración”

III. 2. 1. Descripción de la especie. Distribución geográfica

Oenothera affinis Cambes. Género *Oenothera*, sección. *Oenothera*, subsección *Munzia*, Serie *Allochroa*. *Oenothera affinis* Cambessedes en St. Hilaire

“Flor de la oración”. Fl. Breas.. Merid. 2: 269. 1829. *O. berteriana* Spach, Now. Ann. Paris, 4: 343. 1835. *Oe. propinqua* Spach, l. C. *Oe. mollissima* var *grandiflora* Micheli, en Martinus, Fl Brasil. 13pt. 2: 178, t. 38 1875 (Munz, 1932).

Otros nombres vulgares dados a esta especie son: “flor de San José”, “matutina”, “Don Diego”, “suspiros” (Lahite y Hurrell, 1998).

La “flor de la oración” es una hierba pluriannual, de 40 a 150 cm de alto, erecta, presenta pocas ramificaciones, las primeras hojas son pecioladas y se ordenan en forma de roseta que no perdura. Posee tallo rizomatoso (Fig. 1, E, F (r)). La planta entera está cubierta de pelos suaves, largas vellosidades esparcidas más o menos densamente. Los tricomas pueden ser erectos, cortos y verrucosos. Las primeras hojas presentan un peciolo corto; las hojas caulinares son planas o levemente onduladas en los márgenes, cultradas a estrechamente lanceoladas, acutadas y acutadas a redondeadas en la base, sésiles, de 5 a 15 cm de largo y 0.5 a 1.5 cm de ancho; esparcidamente serradas, con dientes obtusos (Fig. 1, A). Brácteas cultradas, redondeadas en la base, sésiles, más largas que la cápsula que sostienen (Fig. 1, C (b)).

Posee flores amarillas, solitarias, con hipantio de 8 a 11 cm de longitud (Fig. 1, A, B). Los pimpollos son angostamente lanceolados a lanceolados en el extremo, verdes o verde amarillentos, a menudo levemente teñidos de rojo, de 2 a 3.4 cm de largo y de 0.6 a 0.9 cm de espesor. Los pétalos son anchamente obovados, de 2 a 4 cm de longitud. Las anteras de 1 a 1.4 cm de longitud, y los filamentos de 1.5 a 2 cm de longitud. El estilo mide de 9 a 13.5 cm de longitud, y el estigma supera, en la antesis, la altura de las anteras o alcanza la misma altura. Los lóbulos del estigma son de 0.5 a 1 cm de longitud. El ovario mide de 1.3 a 2 cm de longitud. Las flores abren al atardecer y senescen a la mañana siguiente tornándose de color rojizo. Los frutos son cápsulas de 2.5 a 4 cm de longitud y 0.3 a 0.4 cm de espesor,

afinadas en el tercio superior y con 4 valvas claramente separadas en el ápice (Fig. 1 A, C, (f)). Las semillas tienen forma elíptica en su contorno, levemente asimétrica, angulada, lateralmente deprimida, de 0.15 a 0.2 cm de longitud y 0.05 a 0.06 cm de espesor (Fig. 1, D). La época floración varía con la latitud: en Brasil desde septiembre a mayo al igual que en Uruguay y Este de Argentina. Florece de octubre a abril en región central de Argentina y de noviembre a abril, en Bolivia, Chile y Norte de Argentina.

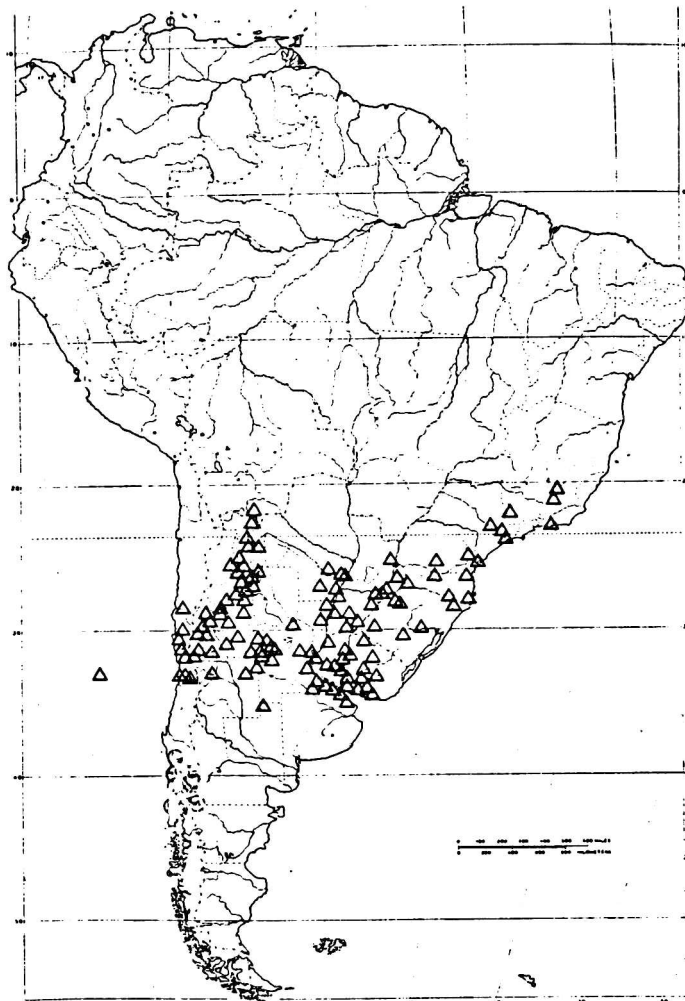


Foto 1. Vista de una población silvestre de *Oenothera affinis*.

III. 2. 2. Distribución geográfica de *Oenothera affinis*

En América del Sur se la encuentra en Brasil, desde Río de Janeiro a través de Mina Gerais hasta Río Grande do Sul. En República Oriental del Uruguay,

frecuente en los departamentos del oeste, centro y sur: Artigas, Salto, Paysandú, Río Negro, Soriano, Colonia, Flores, San José, Tacuarembó, Durazno, Florida Canelones y Montevideo. En Argentina: desde el norte las especies se extienden a Tarija en Bolivia. Cuando esto sucede llegan a los 2.500 m de altura bordeando los ríos, en los valles de los Andes. Al oeste de los Andes, las especies se distribuyen en Chile desde la provincia de Atacama hasta Valparaíso. En la República Argentina se la encuentra en las provincias de: Jujuy, Formosa, Salta, Chaco, Misiones, Corrientes, Santiago del Estero, Tucumán, Catamarca, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba, La Rioja, San Juan, San Luis, Mendoza, Buenos Aires, La Pampa.



Esquema 2. Distribución de *O. affinis* (Δ) en América del Sur (Dietrich, 1977)

III. 3. Objetivo

Determinar los caracteres morfológicos y anatómicos de diagnóstico de *Oenothera affinis* Cambess. "flor de la oración".

III. 4. Materiales y Métodos

III. 4. 1. Materiales

Se analizó material fresco y seco. El material fresco se recolectó en el mes de noviembre en la localidad de Crespo, Provincia de Entre Ríos (Argentina) y en los meses de diciembre y enero en la localidad de Abasto, Provincia de Buenos Aires (Argentina). Muestras de ese material fueron herborizadas e incorporadas en el Herbario del Museo de Botánica y Farmacognosia "Carlos Spegazzini" de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP (LPE) y en el Herbario de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP (LPAG).

Las exsiccatas provienen de los siguientes Herbarios: LP (Herbario del Museo de La Plata Argentina), LPAG (Herbario de la Facultad de Agronomía UNLP Argentina), SI (Instituto Darwinion, San Isidro Argentina): Provincia de Salta. Loc. Chachapoyas Alt.1250 m. Julio Tolaba 2325 22/1/2000 (LP); Provincia de Buenos Aires. Loc. Isla Martín García, Hurrel, Ulibarri, Jankowski; Bonavía 26/11/1999 4108 (LP) ; Loc. Delta Río Carabelas, XI/1925, Scala. 038267 (LP). Loc. Punta Lara, 5/4/1940, Cabrera 026898 (LP); Loc. Otamendi. I/1964 Fabris 4995 (LP) ; Loc. Estación San Ponciano, 4/2/2001, Rivas 1001 (LPAG), Loc. Estación San Ponciano Rivas 15/3/2001 1001 LPE. Loc. Paraje El Pinar Ruta 11 Dep. Magdalena, Bayon 5804 (LPAG). Provincia de Tucumán. Loc. Capital. Río Salí Alt: 600 X/1920 Venturi 038077 (LP); Provincia de Río Negro. Loc. San Carlos de Bariloche 2/2/1955 Schajousky 77 (LP); Provincia de San Juan. Loc. Valle del Zonda Alt. 800 m. XI/1941 Rodrigo 2887 (LP); Provincia de Córdoba. Loc. Ongamira Alt: 1253 m. 1/2/1936 Rodrigo 349 (LP); Loc. San Esteban (SI). Provincia de La Pampa Loc. Dep

Rancul. 2/XI/1968 Cabrera, Sagastegui 19406 (LP); Provincia de San Juan. Loc. Quebrada de Huachi. Dep de Jachal Alt: 1500 XI/1941 Rodrigo 2993 (LP).

III. 4. 2. Métodos

Las observaciones anatómicas se realizaron sobre material fresco y seco. Para la observación del detalle de la nerviación foliar y la determinación del índice de empalizada (Zorning y Weiss, 1925) e índice de estomas (Salisbury, 1927) se procedió a la diafanización y eliminación de la cutina según la técnica de Carpano *et al.* (1994).

A fin de observar las características anatómicas de la especie se realizaron cortes transversales de hoja, tallo y fruto, tanto de material fresco como de material fijado en FAA (alcohol etílico 50°-ácido acético glacial-formalina, 90:5:5) (Johansen, 1940) con micrótopo de Ranvier, luego se realizó una doble coloración de Safranina-Fast green (D'Ambrogio, 1986) y posterior montaje en bálsamo sintético Biopur®.

Las semillas se cosecharon a la madurez del fruto de plantas de *O. affinis* cultivadas en el invernadero del Centro Experimental de Propagación Vegetativa (CEPROVE) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP, y en las cuales el endosperma está totalmente absorbido y el embrión ocupa por completo el saco embrionario.

Las observaciones se realizaron con microscopio óptico (MO) Olympus CH y los diseños originales se obtuvieron usando microscopio Intek equipado con tubo de dibujo IROSCOPE. La simbología usada corresponde a la de Metcalfe & Chalk (1957).

Para los detalles de epidermis foliar, de corte de tallo y de polen se usó microscopio electrónico de barrido (MEB), con un equipo Jeol JSM-T100 del servicio de Microscopía Electrónica de Barrido del Museo de La Plata.

La terminología usada para describir la ornamentación de cutícula y polen con MEB es la propuesta por Wilkinson (1988).

La descripción de la superficie y de estructura histológica de la cubierta seminal es la utilizada por Tobe *et al.* (1987).

Los valores de Índice de Estomas, Índice de Empalizada (Fig. 4, E y F) y largo de rafidios se expresó en rango, promedio, moda (Mo) y desviación estandar (δ).

III. 4. 3. Test microquímicos

Los test microquímicos se efectuaron *in situ* aplicando diversos reactivos a cristales de oxalato de Calcio con ácido clorhídrico al 25%, aceites con Sudán III y IV y taninos con cloruro férrico (Gattuso y Gattuso, 1999, D'Ambrogio, 1986).

III. 5. Resultados

III. 5. 1. Caracteres anatómicos de raíz con estructura primaria

En corte transversal presenta sección circular; la estructura primaria no muestra diferencias con las típicas raíces primarias, excepto por la de presentar una exodermis de 2-3 hileras de células aplanadas (ex), un parénquima cortical (pc) conteniendo idioblastos con aceites (ia) y otros con rafidios de oxalato de Ca (rf) (Fig. 2, A, B y C).

III. 5. 2. Caracteres anatómicos de tallo

III. 5. 2. 1. Tallo con estructura primaria

En corte transverso es de contorno circular. Presenta una cutícula lisa y epidermis (e) con abundantes tricomas unicelulares tectores de tres tipos; con extremos agudos, con extremos romos y con extremo espatulado "dedo de guante". En posición subepidérmica se observan 3-4 hileras de células de colénquima angular (c) y 4-5 hileras de parénquima cortical (pc) y abundantes ideoblastos con rafidios de oxalato de Ca (rf) y aceites (ia). Cilindro vascular continuo. Parénquima medular (pm) con células de paredes finas e idioblastos conteniendo aceites (ia) (Fig. 3, A).

III. 5. 2. 2. Tallo con estructura secundaria

En sección transversal se observa una epidermis uniestratificada (e). Colénquima subepidérmico formado por 2-3 hileras de células (c). Parénquima cortical con 5-6 hileras de células (pc) (Fig. 3, B, C, D y F). Capa de células esclerénquimáticas (es). Felógeno interno que se originó del floema (f) Radios medulares primarios. Parénquima medular con idioblastos conteniendo aceites (ia) e idioblastos con rafidios de oxalato de Ca (rf) (Fig. 3, E).

III. 5. 3. Caracteres anatómicos de hoja

III. 5. 3. 1. Lámina en vista superficial

Arquitectura: Presenta venación reticulada, areolas con numerosas terminaciones vasculares ciegas en forma de yunque. Las venas mayores

confluyen en el borde foliar a la altura de los dientes, constituyendo hidatodes (Fig. 4, G).

Epidermis: la cutícula gruesa y lisa. Las células epidérmicas son semejantes en ambas caras, mas o menos isodiamétricas, de bordes levemente ondulados (Fig. 4, A). Los estomas están a nivel superficial, en epidermis abaxial y adaxial, mas abundantes en la epidermis abaxial y de tipo anisocíticos (Fig. 4, A y C). En ambas epidermis se observan tricomas unicelulares tectores de tres tipos; con extremos agudos (a), con extremos romos (b) y con extremo espatulado "dedo de guante" (c) con y sin cutícula verrugosa (Fig. 4, B y D).

Los valores obtenidos para Índice de Estomas son:

Para la epidermis abaxial 10,20 (17.26) 20, $\delta = 3.74$ Moda = 16. Para la epidermis adaxial 8.43 (12.76) 18.2, $\delta = 3.08$, Moda = 13.5.

El Índice de empalizada es de 2 (3.34) 4.75, $\delta = 0.63$ Moda = 2.5.

III. 5. 3. 2. Lámina en corte transversal

Ambas epidermis son uniestratificadas (e). Mesófilo dorsiventral (Fig. 5, A), el parénquima en empalizada (pe) está constituido por 2 hileras de células mas o menos rectangulares, el parénquima esponjoso (es) por 4-5 hileras de células con idioblastos conteniendo oxalato de calcio en forma de rafidios (rf) y aceites (ia) (Fig. 5, A, C). La nervadura media presenta una quilla abaxial poco pronunciada, haz bicolateral abierto, reforzado por colénquima de tipo angular (ca) del lado adaxial y abaxial (Fig. 5, B). Las nervaduras secundarias presentan haces colaterales.

III. 5. 3. 3. Pecíolo en corte transversal

El pecíolo sólo se advierte en las hojas basales formadas en los primeros estadios de la planta. Presenta contorno circular convexo-cóncavo con alas. La

epidermis es similar a la descrita para la lámina. Parénquima clorofiliano en la zona angular, el resto del parénquima está constituido por células mas o menos isodiamétricas y células parenquimáticas con idioblastos conteniendo rafidios y aceites. Se observa un solo haz colateral central (Fig. 5, D).

III. 5. 4. Sección transversal de fruto

En la sección transversal del un fruto inmaduro se observa, en el epicarpio, abundante cantidad de tricomas tectores de los tres tipos descritos, 4 lóculos que contiene 2 hileras de semillas cada uno, de placentación axial (Fig. 6, A).

III. 5. 5. Análisis estructural de semilla

La exotesta presenta una superficie esculturada en forma de retículo, con micropapilas poco conspicuas (Fig. 6, E) y está constituida por una capa de células aplanadas. El eje embrionario se ubica en el extremo menos aguzado de la semilla. En corte longitudinal y transversal (Fig. 6, B, C y D) se observa la mesotesta (c) formada por una capa de células comprimidas. La endotesta (d) está formada por 2-3 hileras de células; el exotegmen (e) está compuesto por una capa de células esclerosadas, en contacto con el endotegmen (f) formado por una capa de células finas y alargadas.

III. 5. 6. Grano de polen

Granos de polen triporados con ectexina esculturada con profusas micropapilas (Fig. 6, F y G).

III. 5. 7. Resultados de los test histoquímicos

- Oxalato de Ca: en rafidios contenidos en idioblastos, en parénquima de raíz, tallo y hojas

- Aceites: Reacción positiva con Sudán IV en ideoblastos de parénquima de tallo y hoja.

- Taninos: Reacción positiva en las células del endotegmen de las semillas.

III. 6. Discusión

Las observaciones morfológicas y anatómicas realizadas en *Oenothera affinis* permiten establecer los siguientes caracteres de tipo diagnóstico:

La presencia de rizoma bien definido, lo que confirma que se trata de una planta pluriannual y no anual como la cita Dietrich (1977). Este mismo autor señala la ausencia de roseta en *O. affinis*; si bien se observó que la planta presenta, en sus primeros estadios, unas pocas hojas basales en forma de roseta; esta arquitectura es efímera y da lugar a la formación del tallo al poco tiempo.

Posee flores solitarias y no agrupadas en inflorescencias como señala Cabrera (1978).

La forma de la cápsula denota menor diámetro en el tercio superior, en concordancia con lo descrito por Dietrich (1977). Munz (1932), al igual que Cabrera refieren al ensanchamiento en el tercio superior de la cápsula.

La raíz tiene la endodermis poco conspicua, característica de la familia Onagraceae, exceptuando el género *Epilobium* (Metcalf, 1988).

Los estomas son de tipo anisocíticos y se hallan en la epidermis abaxial y adaxial; Metcalfe (1988) se refiere a la presencia de estomas en el género, sólo en la superficie abaxial.

El pecíolo es manifiesto sólo en las hojas de los primeros estadios de la planta, el resto de las hojas son sésiles.

Las características de las semillas ha sido empleado como el mejor rasgo de segregación de grupos infragenéricos de *Oenothera* (Dietrich *et al*, 1985). Para ello se tiene en cuenta particularmente los caracteres topográficos y anatómicos de las cubiertas. La presencia de una fina endotesta, una mesotesta persistente y una exotesta no especializada en *O. affinis* concuerda con las características enunciadas por Tobe *et al* (1987) como indicativas para el género *Oenothera*. En *O. affinis* se comprueba la presencia de endotecmen de una capa de células alargadas con células conteniendo taninos. Mesotesta células esclerosadas, exotecmen de una capa de células elongadas longitudinalmente, en concordancia con Tobe *et al* (1987).

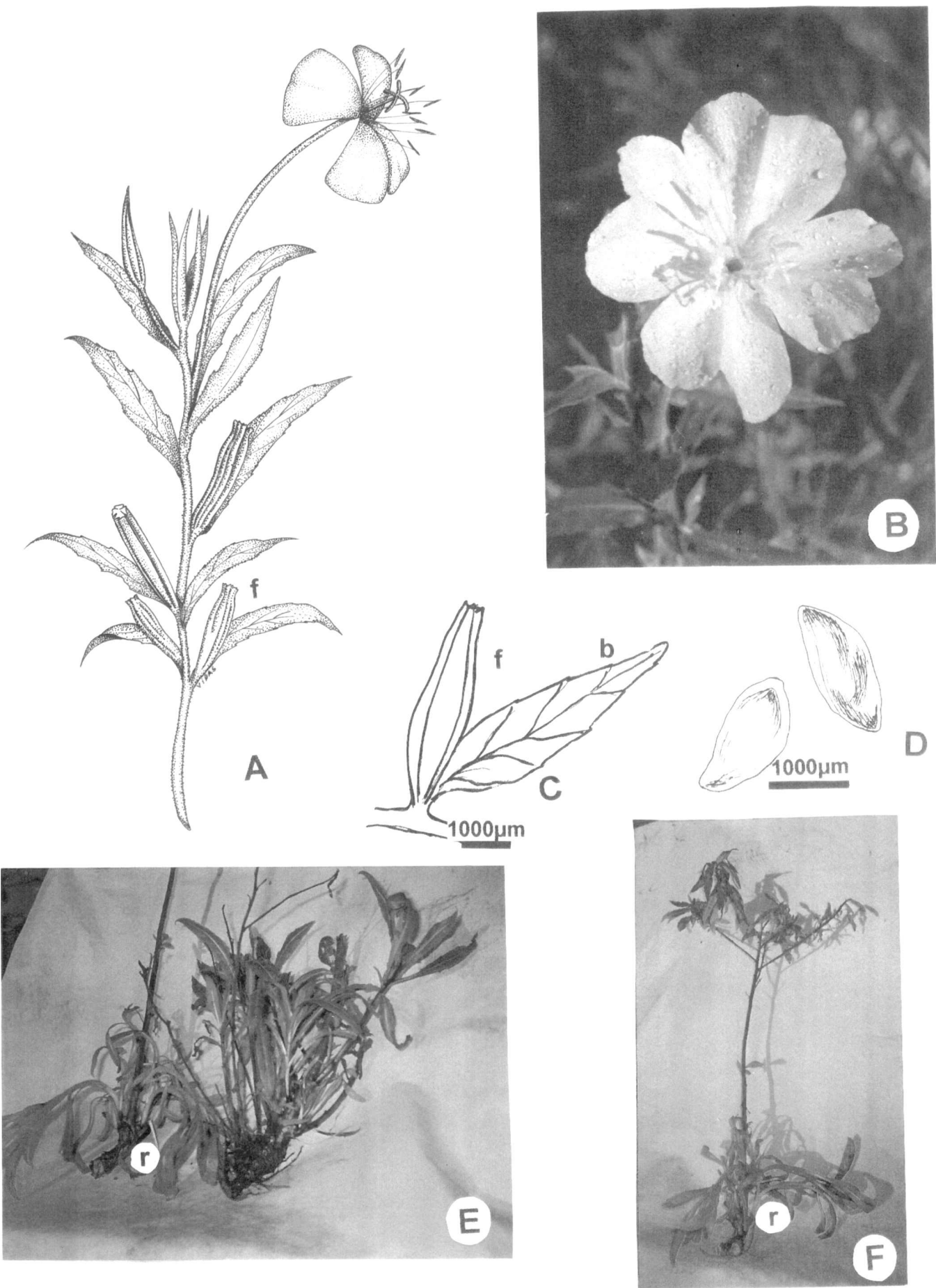


Fig. 1 *Oenothera affinis* Cambess. **A-F**: **A**, vástago con flor y frutos; esquema; **B**, flor; **C**, fruto; **D**, semillas; **E**, planta mostrando el rizoma; **F**, planta completa. **f**, fruto; **r**, rizoma; **b**, bractea.

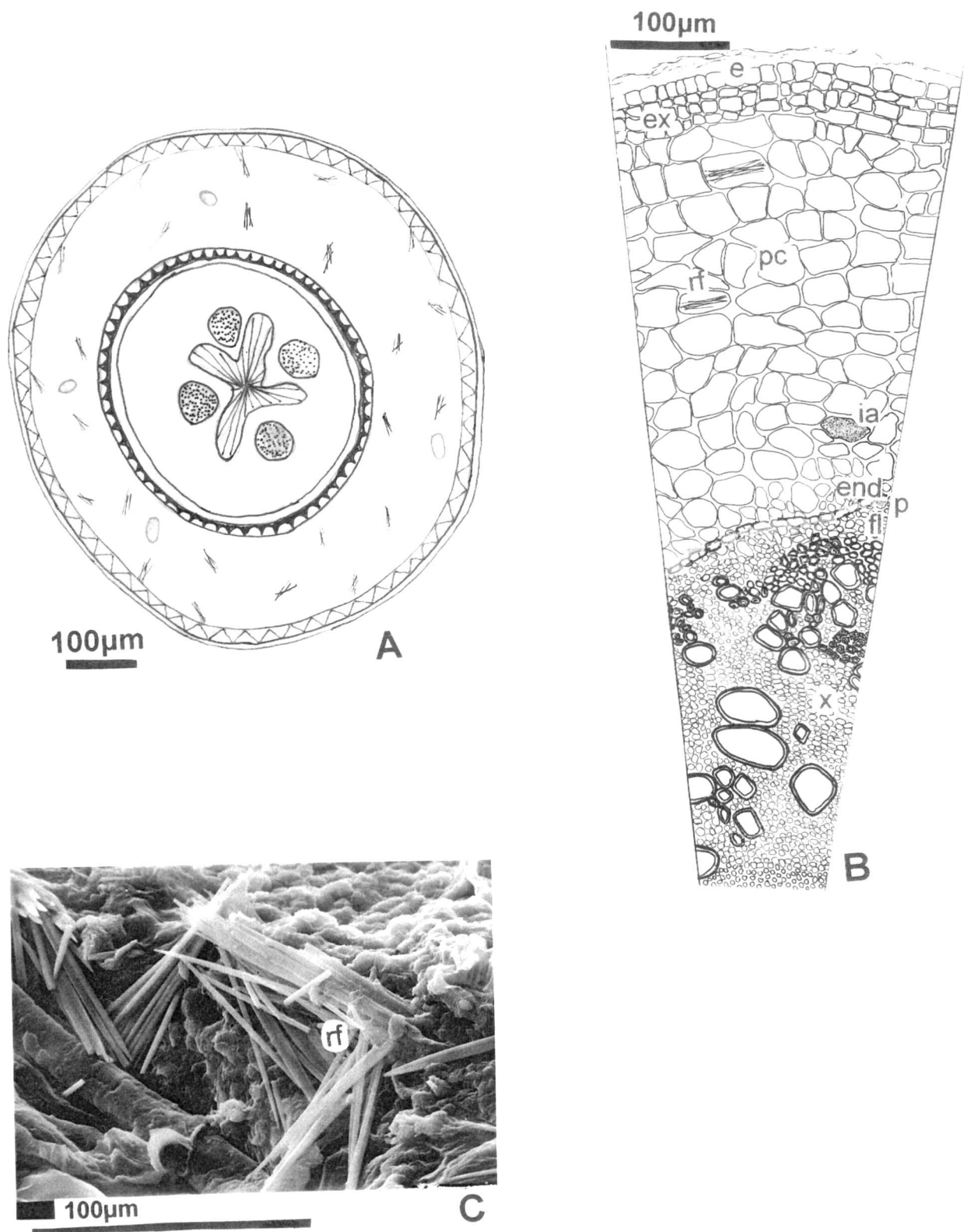


Fig. 2 A-C: Raíz; **A-B,** sección transversal, observación M.O.; **A,** estructura primaria, esquema; **B,** detalle de lo indicado en **A;** **C,** rafidios de oxalato de Ca observados con MEB.

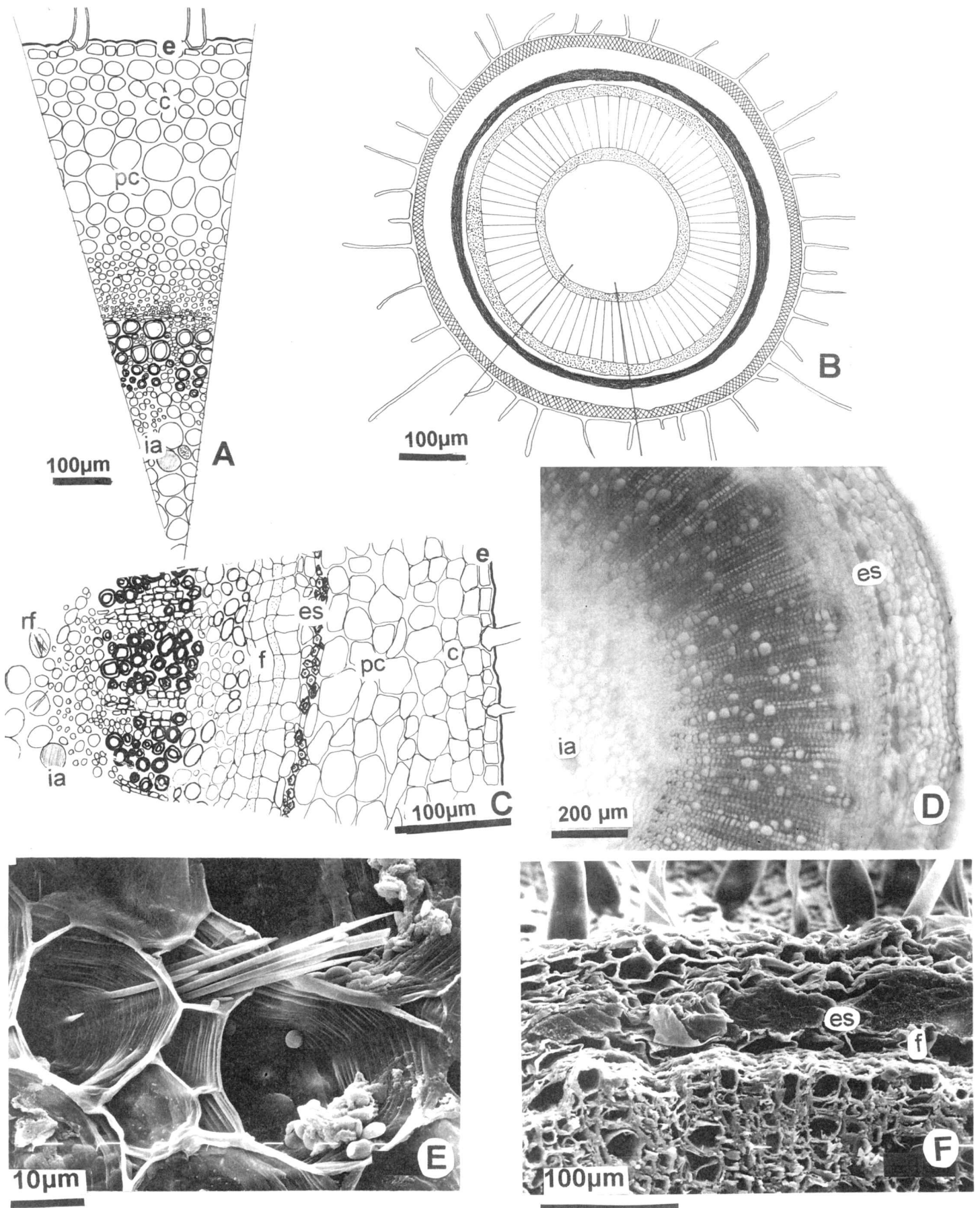


Fig. 3 A-F: Tallo, Sección transversal: **A**, estructura primaria; **B**, estructura secundaria, esquema; **C-D**, detalle de lo indicado en **B**; **E-F**, observaciones con MEB: **E**, vasos e idioblasto con rafidios de oxalato de Ca; **F**, corte transverso de tallo secundario.

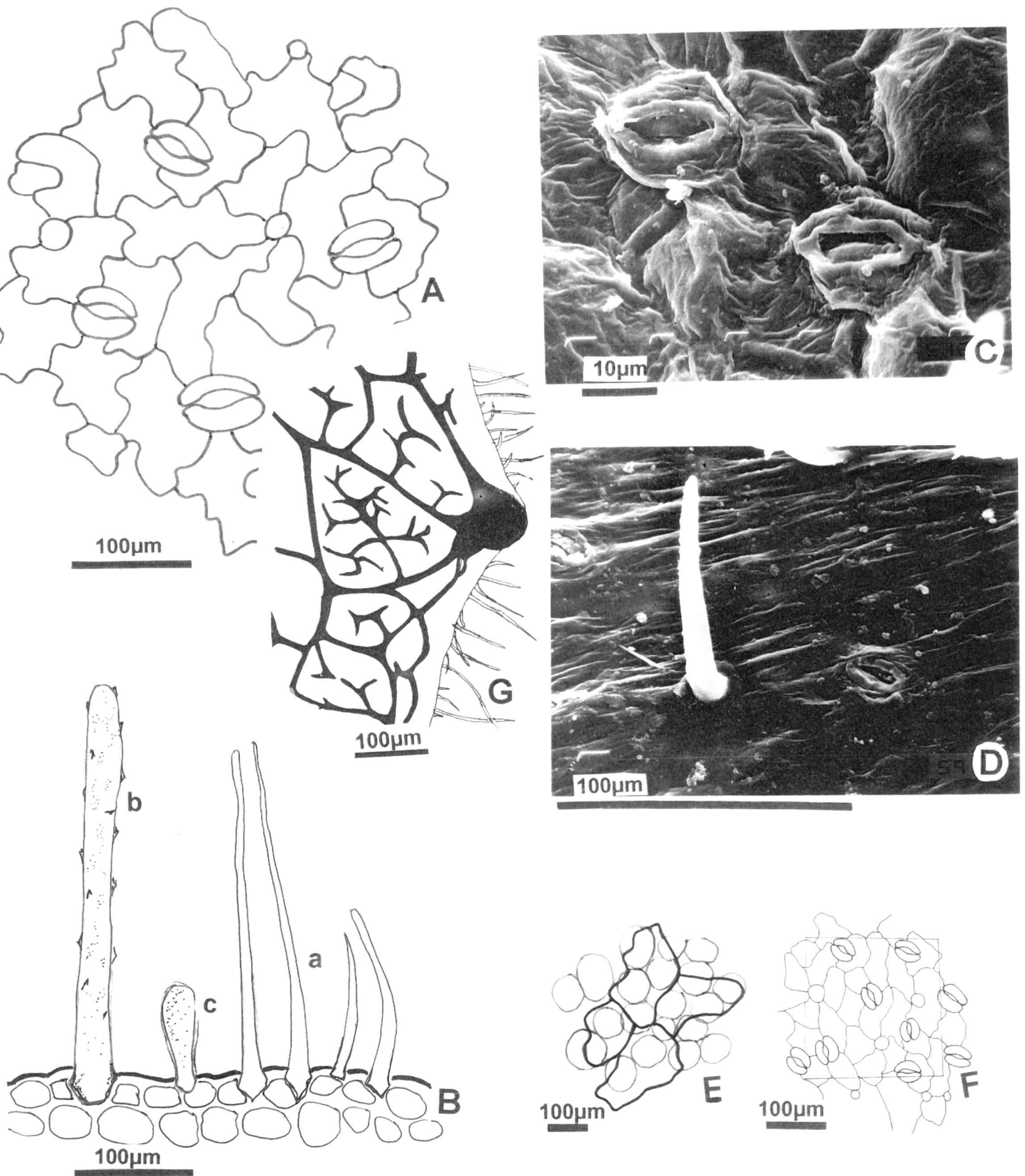


Fig. 4 A-F Hoja: **A**, **C-F**, vista en superficie: **A**, epidermis abaxial; **C-D** observación con MEB: **C**, epidermis abaxial con estomas anisocíticos, **D**, pelo tector tipo **a**; **E**, determinación de índice de empalizada; **F**, determinación de índice de estomas en epidermis abaxial; **G**, hidatodo; **B**, sección transversal con tricomas: **a**, tricoma uniseriado con extremo aguzado, **b**, tricoma uniseriado con extremo romo, **c**, tricoma uniseriado espatulado.

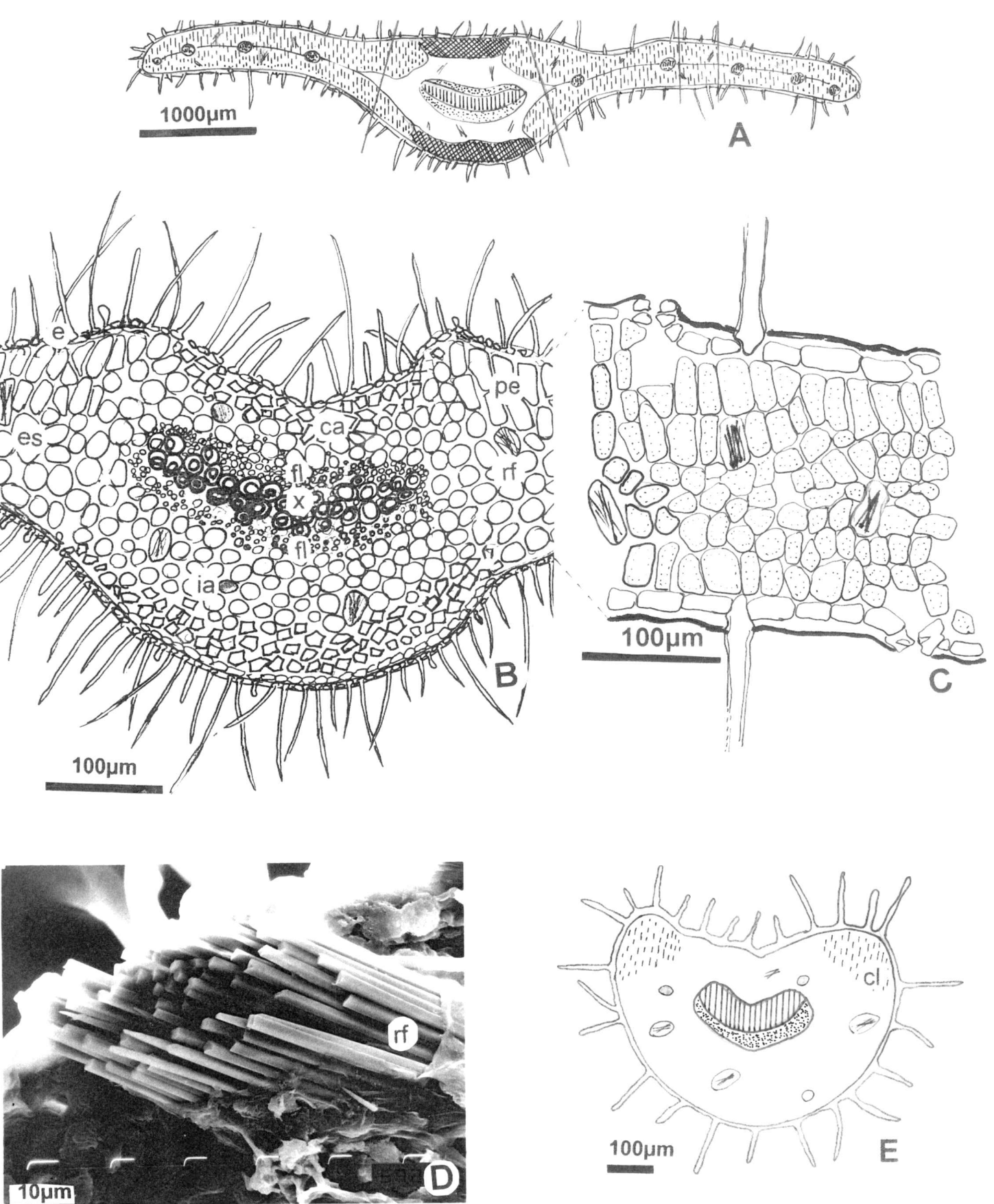


Fig. 5 A-E: Hoja; **A-C:** sección transversal de la lámina, observación MO; **A,** esquema; **B y C** detalle de lo indicado en **A;** **D,** observación con MEB, idioblasto con rafidios de oxalato de Ca; **E,** observación MO, sección transversal de pecíolo, esquema.

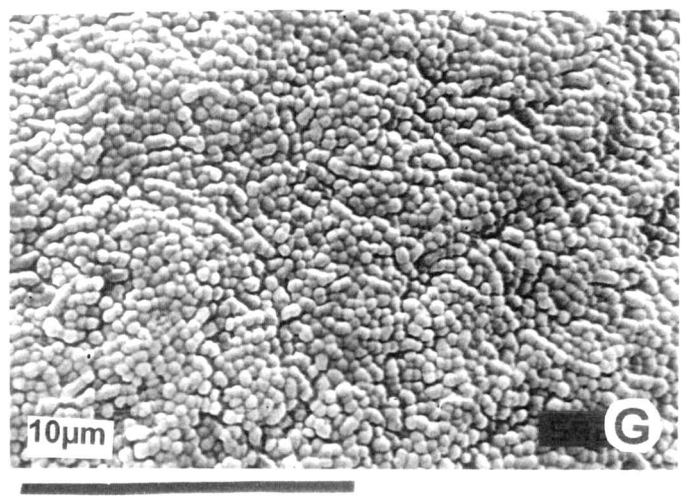
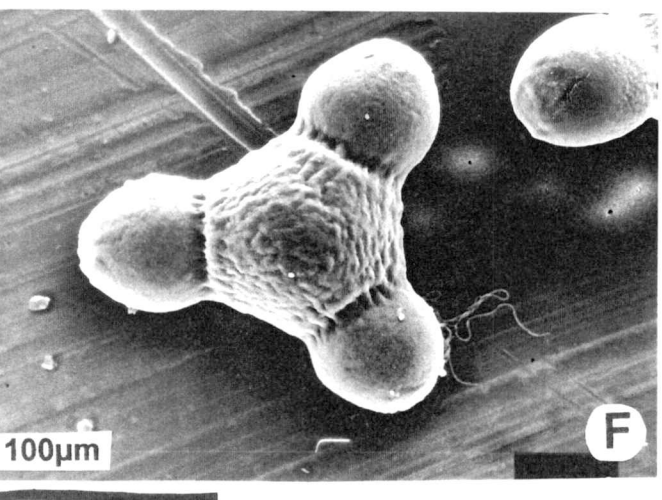
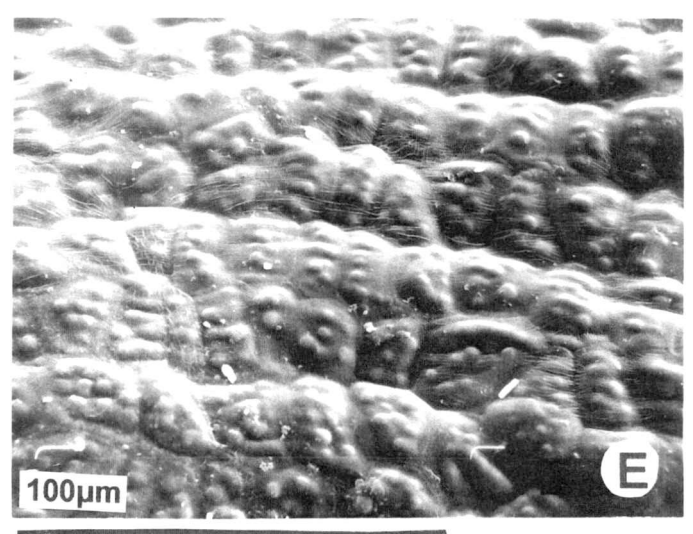
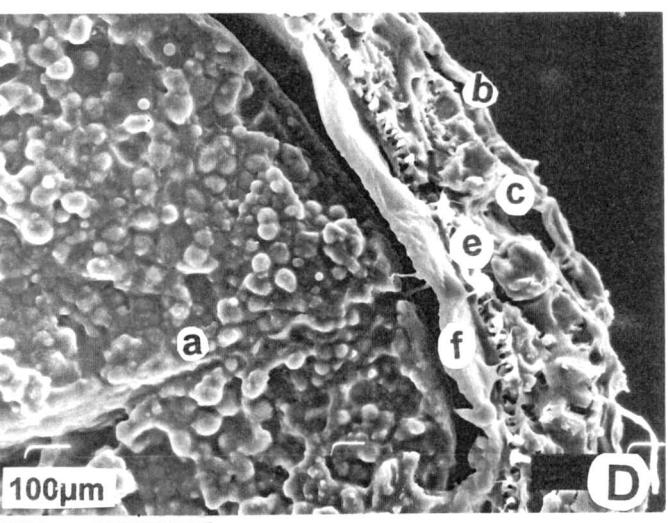
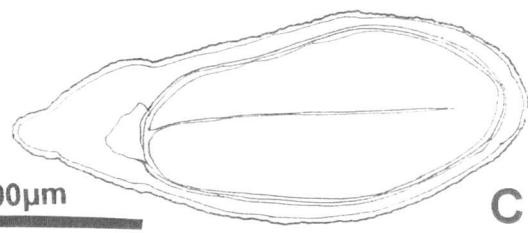
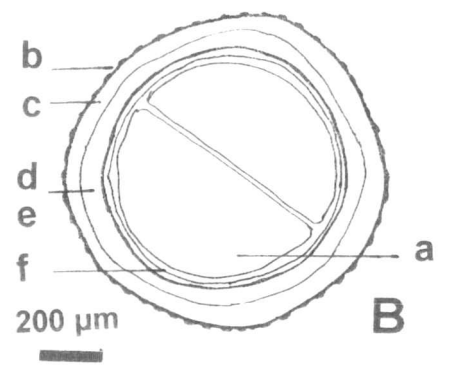
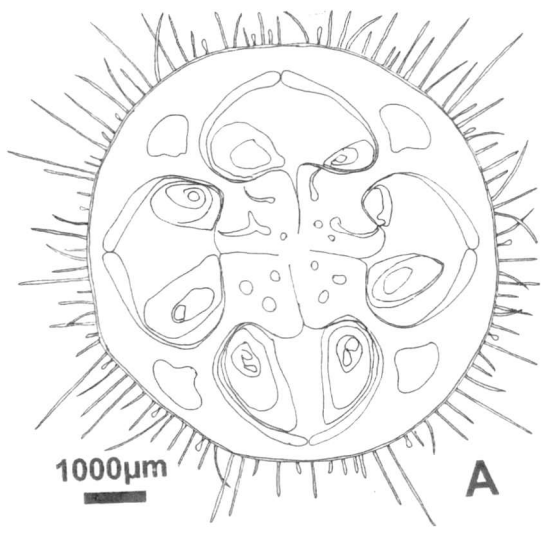


Fig. 6 A-G Fruto, Semilla, Grano de polen. **A-B:** sección transversal; **A,** fruto; **B,** semilla; **C,** sección longitudinal de la semilla. **D-E,** observación con MEB: **D,** corte transversal de semilla; **E,** exotesta; **F-G,** granos de polen, observación con MEB; **G,** ectexina; **a,** embrión; **b,** exotesta; **c,** mesotesta; **d,** endotesta; **e,** exotegmen; **f,** endotegmen.



IV

FISIOLOGÍA DE LA
GERMINACIÓN

IV. Fisiología de la germinación

IV. 1. La semilla. Definición. Características fisiológicas

Cuando se estudia una especie vegetal silvestre con el objeto de conocer sus potenciales aplicaciones alimentarias, maderables o en farmacología, es necesario conocer las formas de reproducción del vegetal bajo estudio. Se analiza la posibilidad de la reproducción sexual y/o asexual, y las ventajas y desventajas de cada modalidad. En el caso de la propagación por semilla, el estudio del comportamiento fisiológico de las simientes permite determinar los requerimientos para obtener valores óptimos de viabilidad, energía germinativa y poder germinativo al momento de la siembra, así como las condiciones adecuadas de almacenamiento y, de esta manera prolongar su viabilidad, específicamente, si se procura conservar su germoplasma en un "Banco de semillas".

Según Font Quer (1970) una semilla es: "el embrión en estado latente, acompañado o no de tejido nutritivo y protegido por el episperma y que proviene del óvulo fecundado con posterior maduración, hasta alcanzar la capacidad germinativa".

Desde el momento de la fecundación y a lo largo de la formación de las semillas ocurren cambios profundos y cada etapa está íntimamente relacionada con la especie vegetal, con el ambiente y con la acción de determinadas fitohormonas; así, el período temprano, que incluye el crecimiento luego de la fecundación, coincide con una gran actividad mitótica y está asociado a la síntesis de citoquininas. En el período medio, durante la expansión celular, actúan las auxinas y giberelinas, con una merma en la concentración de citoquininas. Finalmente, en el período tardío, la semilla se prepara para la desecación. Esta etapa es inducida por

la interrupción de suplemento de agua y nutrientes a través del funículo y se caracteriza por el incremento en la concentración de ácido abscísico que modula la expresión de genes implicados en la maduración, tolerancia a la desecación y posterior germinación de la semilla (Matilla, 2000).

IV. 1. 1. Viabilidad

Es importante conocer la viabilidad de una semilla, esto es, la supervivencia de las estructuras primordiales para lograr la germinación. La viabilidad es variable y depende de la especie vegetal y del modo de almacenamiento de las semillas. Las bajas temperaturas, baja humedad relativa, escasa concentración de oxígeno y la ausencia de luz son condiciones favorables para prolongar la vida de las semillas.

Como ejemplo de longevidad de semillas se puede citar a las de *Canna compacta*, encontradas en el yacimiento arqueológico de Sta. Rosa de Tastil (Argentina), que datan de 600 años de antigüedad y que mantuvieron la viabilidad debido al almacenamiento y a las condiciones climáticas del sitio. Las semillas de *Verbascum blattaria* permanecen viables luego de 90 años y las de *Rumex crispum* mantienen un alto porcentaje de viabilidad luego de 80 años de almacenamiento (Bewley y Black, 1994).

En el caso de semillas del género *Oenothera*, se ha comprobado la viabilidad luego de 80 años, con una pérdida del 60 % del poder germinativo, en ese período. Derek (1994) y Toth y Nemeth (2002) describen la viabilidad de *Oenothera erythrosepala* por un período de 4 años, almacenadas a 4°C, sin una disminución significativa de la capacidad germinativa.

IV. 1. 2. Reposo

En las llamadas semillas ortodoxas la fase de maduración concluye con la desecación, en la cual la semilla pierde del 90 al 95 % del contenido de agua, dependiendo del tipo de reservas que contenga la semilla (Bewley, 1994). A partir de ese momento, las semillas entran en estado de reposo, este término se aplica para generalizar la ausencia de germinación en semillas viables. En el caso que sea revertido por suministro de agua, temperaturas adecuadas y suficiente oxígeno, se dice que la semilla se encuentra en estado de quiescencia. Pero, cuando para lograr la germinación, se requieren otros estímulos adicionales, por características específicas inherentes a las cubiertas seminales, al embrión, o a la presencia de inhibidores, la semilla se encuentra en estado de dormición o dormancia (Mohr y Schopfer, 1995).

En la naturaleza las semillas viables, en estado de reposo, pueden germinar si se ablandan las cubiertas al pasar por el tracto digestivo de animales (escarificación), o al recibir ciertos estímulos como la luz de determinada longitud de onda (semillas fotoblásticas) y también luego de permanecer un cierto período en condiciones de humedad y bajas temperaturas (estratificación), generalmente bajo la hojarasca durante el invierno. Estos son algunos ejemplos de la diversidad de comportamientos derivados de características particulares de las semillas, y están asociadas a estrategias de conservación de las especies en los distintos climas y latitudes de origen. Desde el punto de vista ecológico, este comportamiento posibilita la germinación luego de superar períodos climáticos desfavorables (sequías, inviernos rigurosos) y se convierte en un modo de supervivencia de la plántula emergida cuando las condiciones son propicias.

En condiciones de laboratorio las semillas se tratan a fin de revertir el reposo y lograr altas tasas de germinación; deben realizarse tratamientos ya sea sometiendo las simientes a condiciones de luz (*Picea mariana*, *Pinus nigra*, *Lactuca sativa* v. Gran rapid), o con escarificación química o mecánica de las cubiertas seminales (*Medicago sativa*, *Aconitum spp*), o con estratificación con alto tenor de humedad y bajas temperaturas (*Abies spp*, *Acer spp*, *Taxus spp*, *Aesculus spp*) o también con la aplicación exógena de giberelinas (Hartmann y Kester, 1997).

IV. 1. 3. Domesticación y mejoramiento

En general, la colecta silvestre de plantas medicinales presenta una serie de particularidades diferentes a las de un cultivo, asimismo la modalidad de cosecha no es homogénea, pues las plantas presentan variado estado de desarrollo y como la población es dispersa, es posible que los distintos lotes recolectados muestren diferencias en la calidad farmacéutica, resultando un producto comercial heterogéneo que hace que la cantidad y la calidad de los principios activos sea irregular y que la productividad de recolección sea baja (Vogel, 1999).

La domesticación de las plantas medicinales implica cambios en la adaptación ecológica, que pueden asociarse a alteraciones de su metabolismo secundario (Martínez, 1996). Algunos metabolitos como los alcaloides son producidos por la planta en cantidades que varían en función de factores ontogénicos, fenológicos y genéticos (Gupta *et al*, 1986, Van Dam, 1995). Estos factores condicionan las prácticas de cultivo, la cosecha y todos los procesos de mejoramiento genético tendientes a una mejor y mayor producción (Ocampo y Villalobos, 1994). Büter *et al* (1998) estudiaron durante dos años consecutivos los

parámetros agronómicos y bioquímicos de 7 cultivares de *Hypericum perforatum* en tres sitios, y observaron diferencias en la floración, la altura de las plantas, la materia seca y el contenido de metabolitos secundarios; concluyendo que el efecto genético era el más marcado, seguido por el manejo agronómico. Los efectos del aumento de la concentración de nutrientes sobre la tasa fotosintética, rasgos morfológicos y contenido de sustancias activas de *Passiflora edulis* fue demostrado por Letchamo *et al* (1993). En cuanto a la influencia de las bajas temperaturas y diferentes fotoperíodos en la floración de *Lavandula angustifolia*, Whitman *et al* (1996), verificaron el grado de crecimiento, medido en número de nudos, de las plantas, para lograr adelantar el desarrollo reproductivo por los factores descriptos.

En el proceso de domesticación de *Oenothera biennis* L., se logró obtener cultivares anuales, (siendo la planta silvestre bianual). En particular en Francia, investigadores del Institute de Recherches pour les huiles et les oléagineux (IRHO) desarrollaron un programa para optimizar el rendimiento y aumentar el contenido de ácido y linolénico. En la misma especie se estudió el efecto de la densidad de siembra en la capacidad reproductiva, demostrándose una mayor tasa de plantas florecidas en cultivos con canopeos cerrados (Reekie *et al*, 1997). Saulnier y Reekie (1995) señalaron que, en ambientes deficitarios de nutrientes, el crecimiento de las plantas se detienen al momento de la floración, lo que no sucede con un suministro adecuado de nutrientes. Además Roy *et al* (1993) demostraron la influencia de la fecha de transplantes en la cantidad de semillas producidas por las plantas de *O. biennis* y en la concentración de ácidos grasos totales y de ácido y linolénico contenido en semillas.

En base a lo expuesto anteriormente queda claro que durante el proceso de domesticación de una planta, si la reproducción se realiza por la vía sexual, se necesita conocer la distribución, maduración, rendimiento, capacidad germinativa,

métodos de cosecha y almacenamiento de semillas. Para realizar estos estudios hay que tener presentes algunos aspectos básicos de la fisiología de la planta a fin de conocer su ciclo de vida y en vistas de obtener un producto de calidad.

IV. 2. Objetivo

Conocer las características fisiológicas y los determinantes del control de la germinación de las semillas de *Oenothera affinis* "flor de la oración".

IV. 3. Materiales y métodos

IV. 3. 1. Material vegetal

Las cápsulas maduras de plantas de *Oenothera affinis* se cosecharon entre los meses de noviembre a marzo de los años 2000, 2001 y 2002, de poblaciones silvestres de Crespo (Entre Ríos) y Abasto (Buenos Aires), y de plantas cultivadas en el invernadero del Centro Experimental de Propagación Vegetativa (CEPROVE), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP.

Las semillas cosechadas y trilladas a mano se acondicionaron en envases de vidrio sellados con Parafilm® y se almacenaron en oscuridad y a 5 °C para su conservación en el banco de semillas de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplares de *Oenothera affinis* estudiadas y conservadas en el banco de semillas de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Especie	Acrónimo	Nº de Accesión	Sitio de colecta	Fecha de colecta
<i>O. affinis</i>	OAE	1003	Entre Ríos	Nov. 2000
<i>O. affinis</i>	OAL	1001	La Plata	Enero 2002
<i>O. affinis</i>	OAA	1004	Abasto	Febr. 2001

El grado de maduración de los frutos se determinó en base a observaciones de color y grado de dehiscencia de los mismos, clasificándolos en: frutos verdes inmaduros a los frutos verdes de tamaño máximo, frutos maduros secos indehiscentes y frutos maduros secos dehiscentes.

IV. 3. 2. Determinación del contenido de humedad

Las determinaciones de contenido de humedad, se realizaron siguiendo las normas internacionales de la Asociación Internacional para el Ensayo de Semillas (ISTA) (1976). Debido a que se trabajó con semillas de especies silvestres, estas normas se adaptaron de acuerdo a la cantidad de muestra disponible, como se consigna en las Normas para los Bancos de Genes (FAO/IPGRI, 1994).

La muestra de trabajo consistió en 4 repeticiones de 250 mg de semillas maduras de *O. affinis* cada una, recién cosechadas. Luego de eliminar impurezas, se dispusieron las muestras en cajas de Petri previamente pesadas y se las colocó en estufa a temperatura constante de $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 17 ± 1 horas. Luego, se taparon los recipientes y se colocaron en un desecador durante 45 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente. En ese momento, se pesó el recipiente. El cálculo se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{P_f - P_s}{P_f} \times 100 =$$

Donde:

Pf = Peso fresco

Ps = Peso seco

IV. 3. 3. Determinación del peso de 1000 semillas

Se realizó teniendo en cuenta las normas internacionales de la Asociación Internacional para el Ensayo de Semillas (ISTA) (1976). La muestra se obtuvo de semillas recién cosechadas de frutos maduros, de distintas plantas de *O. affinis* de la población silvestre de Abasto. Se tomó al azar una muestra de semillas y se contaron ocho repeticiones de 100 semillas cada una, en forma manual. Cada

muestra se pesó en una balanza analítica Sartorius, con aproximación 0.001g. Se calcularon la varianza, la desviación típica y el coeficiente de variación.

IV. 3. 4. Ensayos de germinación

IV. 3. 4. 1. Influencia de las bajas temperaturas en la capacidad germinativa

Se usaron semillas de *O. affinis* (accesión N° 1004). Los experimentos se realizaron siguiendo los lineamientos de ISTA, adecuados por FAO/IPGRI (1994) descritas en Normas para Bancos de Genes. Para cada tratamiento se realizaron cuatro repeticiones de 50 semillas cada una. Las semillas se acondicionaron en cajas de Petri sobre papel de filtro humedecido con 3 ml de agua destilada, en oscuridad.

Los ensayos incluyen: semillas sin tratamiento (T), semillas con pretratamiento de 10 días (F10) y de 20 días (F20) a 5°C. Una vez cumplimentados los pretratamientos las semillas se incubaron en oscuridad (O) a 28 ± 2 °C. Se consignó diariamente el número de semillas germinadas (con emergencia de radícula), descartando las mismas de la caja de Petri. El ensayo se prolongó a largo de 10 días.

IV. 3. 4. 2. Influencia de la luz en la germinación

Las semillas, acondicionadas en cajas de Petri y previamente embebidas en agua, fueron expuestas a un fotoperíodo (L/O) de 16/8 horas de luz/oscuridad con irradiancia de $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con tubos fluorescentes (OSRAM L 58W/20) a 28 ± 2 °C de temperatura. Otro lote de semillas se incubaron en oscuridad (O) a 28 ± 2 °C. Se consignó diariamente el número de semillas germinadas (con emergencia de

radícula), descartando las mismas de la caja de Petri. El ensayo se prolongó a largo de 10 días.

IV. 3. 4. 3. Influencia de la aplicación exógena de Ácido Giberélico (AG₃)

Se remojaron las semillas durante 24 horas en solución acuosa de 0, 0.1, 1, 10, 100 y 250 ppm de Ácido Giberélico (AG₃) Sigma. Luego, se colocaron en cajas de Petri sobre papel de filtro húmedo y se incubaron a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad. Se consignó diariamente el número de semillas germinadas (con emergencia de radícula), descartando las mismas de la caja de Petri. El ensayo se prolongó a largo de 10 días.

IV. 3. 4. 4. Capacidad germinativa en función de la madurez del fruto

Las muestras de semillas fueron tomadas de frutos verdes inmaduros (FV), de frutos maduros secos indehiscentes (FSc) y de frutos maduros secos dehiscentes (FSd). En todos los casos se semillas se sometieron a pretratamiento de 10 días a 5°C . Una vez cumplimentados los pretratamientos las semillas se incubaron en oscuridad a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Se consignó diariamente el número de semillas germinadas (con emergencia de radícula), descartando las mismas de la caja de Petri. El ensayo se prolongó a largo de 10 días.

IV. 3. 4. 5. Viabilidad en función del tiempo de almacenamiento

Las semillas recién cosechadas en el año 2001, 2002 y 2003 se envasaron en recipientes herméticos y se colocaron en heladera a 5°C (temperatura de almacenamiento para Banco Activo de Semillas, según FAO IPGRI, 1994). Se extrajeron muestras y se midió el poder germinativo en marzo del 2004, con pretratamiento de 10 días de frío previa imbibición en agua.

Los resultados obtenidos en los ensayos fueron analizados estadísticamente usando Statgrafic Plus.

IV. 4. Resultados

IV. 4. 1. Contenido de humedad

El contenido de humedad de las semillas maduras de frutos maduros secos dehiscentes, alcanza valores de $4.8 \% \pm 0.9$.

IV. 4. 2. Peso de 1000 semillas

El peso de 1000 semillas maduras es de 0.3525 g con una desviación estándar (δ) de 0.002778.

IV. 4. 3. Ensayos de germinación

IV. 4. 3. 1. Influencia de las bajas temperaturas en la capacidad germinativa

La aplicación de pretratamiento de frío de 10 días y 20 días en semillas maduras, previamente embebidas, aumentó significativamente el porcentaje de germinación respecto de las semillas no tratadas (Tabla 2).

Tabla 2. Influencia del pretratamiento de frío en el poder germinativo de semillas de *O. affinis*.

	T A	F10	F20
Germinación (%)	30.00 b	92.0 a	91.75 a

TA: sin pretratamiento (temperatura ambiente)

F10: pretratamiento de 10 días a 5°C

F20: pretratamiento de 20 días a 5°C

(Los resultados se expresan en % de germinación a los 10 días de incubación a $28 \pm 2^\circ\text{C}$)

IV. 4. 3. 2. Influencia de la aplicación exógena de Ácido Giberélico (AG₃)

El efecto del Ácido Giberélico en el aumento del porcentaje de germinación, se observa en concentraciones de 0.1 y 1 ppm. En las mayores concentraciones probadas (10, 100 y 250 ppm) se verifica una disminución significativa de dicho porcentaje (Tabla 3).

Tabla 3. Influencia del Ácido Giberélico (AG₃) en la germinación de semillas de *O. affinis* incubadas en oscuridad a 28 ± 2° C.

	Concentración de AG ₃ (ppm)					
	0	0.1	1	10	100	250
Germinación (%)	31 c	89 a	94 a	82 ab	68 b	33 c

IV. 4. 3. 3. Influencia de la temperatura, luz y Ácido Giberélico (AG₃)

Los valores obtenidos del porcentaje de germinación en semillas con pretratamiento de frío y con aplicación de 1 ppm de Ácido Giberélico no presentan variaciones significativas cuando son incubados en oscuridad o con fotoperíodo de 16 horas de luz blanca y 8 de oscuridad (Tabla 4).

Tabla 4. Influencia del pretratamiento de frío y de Acido Giberélico (AG₃) en la germinación de semillas de *O. affinis* incubadas en oscuridad y en luz/oscuridad, a 28 ± 2° C.

	T	AG ₃	F10	F20
Oscuridad	33 b	94 a	95 a	98 a
Luz/Oscuridad	31 b	31 b	31 b	99 a

Oscuridad
Luz/oscuridad: fotoperíodo de 16/8.
T: sin pretratamiento.
F10: pretratamiento de 10 días a 5°C.
F20: pretratamiento de 20 días a 5°C.
AG₃: 1 ppm de Ácido Giberélico.

IV. 4. 3. 4. Capacidad germinativa en función de la madurez de fruto

Las semillas extraídas de frutos maduros secos, tanto indehiscentes como dehiscentes, con pretratamiento a temperatura de 5 °C durante 10 días, incubadas a la oscuridad, poseen una capacidad germinativa significativamente mayor que las semillas extraídas de frutos verdes igualmente tratadas (Tabla 5).

Tabla.5. Influencia de la madurez del fruto en la germinación de semillas de *O. affinis*, incubadas en oscuridad a $28 \pm 2^\circ \text{C}$.

	Madurez del fruto		
	FV	FSc	FSd
Germinación (%)	33 b	85 a	88 a

FV: fruto verde inmaduro.
 FSc: fruto maduro seco indehiscente.
 FSd: fruto maduro seco dehiscente.

IV. 4. 3. 5. Viabilidad en función del tiempo de almacenamiento

El porcentaje de germinación de semillas almacenadas a 5°C durante 2 años es significativamente menor a las almacenadas 1 año en las mismas condiciones. No existen diferencias significativas entre las semillas recién cosechadas y aquellas almacenadas durante 1 año a 5°C (Tabla 6).

Tabla 6. Viabilidad de semillas cosechadas en el año 2001 y 2002 y almacenadas a 5 °C y de semillas recién cosechadas del año 2003, incubadas en oscuridad a $28 \pm 2^\circ \text{C}$.

	Año de cosecha		
	2001	2002	2003
Germinación (%)	62 (b)	79 (a)	86 (a)

IV. 5. Discusión

El contenido de humedad encontrado en las semillas de *O. affinis*, del orden de 5%, corresponde a semillas con alto contenido de aceites como sustancia de reserva, por el contrario, las semillas con alto contenido de almidón poseen un contenido de humedad de 14 al 45 %, como lo afirma Bewley (1994).

En cuanto a la capacidad germinativa de semillas de especies del género *Oenothera*, Johnson y Whitwell (1997) realizaron un estudio de germinación de diversas especies de plantas silvestres con flores, tendiente a determinar su potencial germinativo para producción y comercialización. Ellos determinaron valores del orden de 45% para *O. speciosa* mientras que *Oenothera missouriensis* fue eliminada del estudio debido a su pobre producción de semillas y bajo poder germinativo. Hartmann y Kester (1997) afirman que las semillas de *Oenothera* germinan sin dificultad a las 2 ó 3 semanas, a una temperatura de 20-30°C.

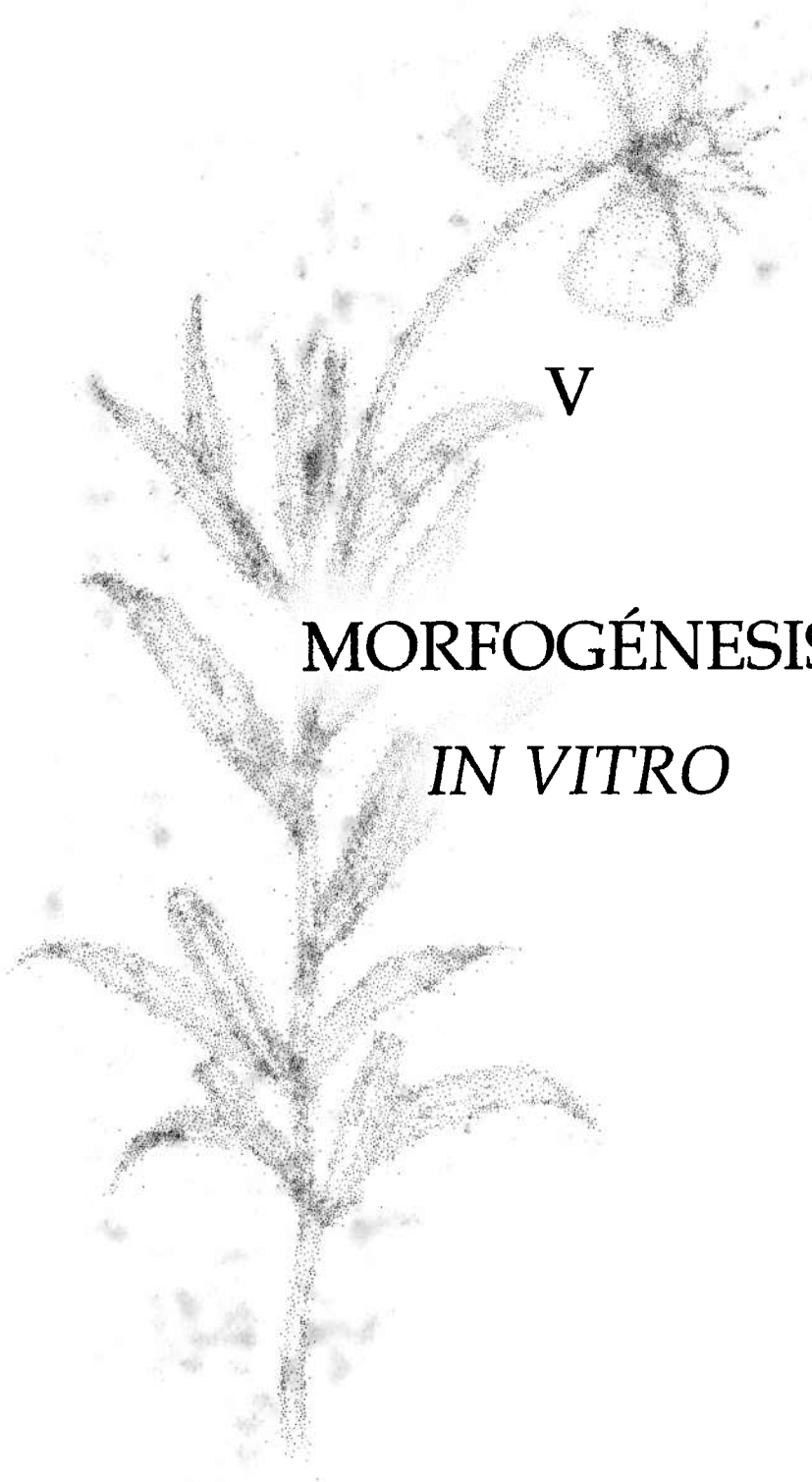
En nuestro trabajo, los valores encontrados en los experimentos de germinación en las semillas de *O. affinis* "flor de la oración", son cercanos al 100%. La mayor tasa de germinación corresponde a semillas con pretratamiento de frío, sin diferencias significativas entre 10 y 20 días a 5°C. En todos los casos los valores no variaron al ser expuestas a la luz, refutando lo expuesto por Ensminger (1987) quien resalta la necesidad de preinducción en oscuridad como prerequisite de germinación de *Oenothera sp.*

En cuanto al efecto del Ácido Giberélico (AG₃), como agente inductor de la germinación, se demostró que la concentración óptima se encuentran en el orden de 0.1 a 1 ppm, disminuyendo significativamente a concentraciones de 10 ppm o mayores. Los valores de concentración hallados como inductores se encuentran dentro del rango referido por Bewley (1994), quien señala que para *Oenothera sp.*

la concentración óptima de AG₃ es de 0.35 ppm. Por otro lado estos resultados se contraponen con los indicados por Hartmann y Kester (1997), quienes sugieren tratamientos inductivos de germinación de semillas usando AG₃ en concentraciones de entre 200 a 1000 ppm.

El porcentaje de germinación de las semillas extraídas de frutos verdes es significativamente menor al de las semillas extraídas de frutos secos indehiscentes y al de semillas de frutos secos dehiscentes; entre estas últimas no existe diferencias significativas en el porcentaje de germinación.

Los experimentos realizados para demostrar la viabilidad de las semillas a través del tiempo, cuando éstas se conservan en envases herméticos a 5°C, indican que se mantiene un alto porcentaje de germinación durante dos años, a los tres años de almacenamiento el poder germinativo decrece significativamente. Estos resultados no concuerdan con los presentados por Toth y Nemeth (2002) quienes logran conservar semillas de *Oenothera erythrosepala*, por un período de 4 años, almacenadas a 4°C, sin una disminución significativa de la capacidad germinativa.



V

MORFOGÉNESIS

IN VITRO

V. Morfogénesis in vitro

V. 1. Biotecnología. Concepto. Historia

La Biotecnología puede definirse como: "la aplicación de principios científicos y de ingeniería para el procesamiento de materiales por medio de agentes biológicos con el objeto de producir bienes y servicios, en donde los agentes biológicos se refieren a microorganismos, células de animales y plantas, y material genético aislado y clonado" (Sasson, 1989).

Los conocimientos de la Biotecnología se remontan a los primeros años del siglo XX, específicamente con los trabajos de Haberlandt de 1902, quien logró cultivar células vegetales aisladas en un medio nutritivo artificial (Carew y Satba, 1965). White, en 1934, consigue con éxito el cultivo de ápices radiculares de tomate en forma indefinida en medio líquido.

Es necesario recapacitar acerca de la lentitud, por esos años, de los avances en el tema; debido a las limitaciones de los investigadores en cuanto al desconocimiento de los factores hormonales que desencadenan las respuestas de los tejidos, y que fue superado con la identificación del ácido indol acético (AIA) primero y luego con el aislamiento de la cinetina, la primera citoquinina descubierta

El concepto de biotecnología fue ampliado a partir de 1970, con la aplicación de tecnología que permiten la manipulación de la molécula de ADN, lo que dio origen a la ingeniería genética

Desde entonces, hasta nuestros días, la nueva biotecnología, ha evolucionado en forma espectacular y, a través de sus distintas modalidades, se pueden aplicar a:

- a) técnicas de cultivo *in vitro* de células y tejidos, incluyendo el cultivo de microorganismos.
- b) técnicas de fermentación y bioprocesos, incluyendo técnicas de inmovilización de enzimas.
- c) técnicas para la identificación, mapeo, clonación, manipulación y transferencia de genes.

La comercialización de muchos de los descubrimientos ha abierto un mercado de gran envergadura, que incluye no sólo la medicina y la genética, sino también la industria alimentaria, la agrícola, la zootecnia y especialmente la farmacéutica.

V. 2. Cultivo de tejidos *in vitro*. Morfogénesis

El cultivo *in vitro* es una biotécnica que consiste en aislar una porción de una planta (tejido, órgano o célula), llamado explanto, para cultivarlo en un medio nutritivo en condiciones física y químicas artificiales. El objetivo es lograr que las células expresen su totipotencialidad, es decir, la capacidad que tiene la célula vegetal de regenerar una planta completa cuando son separadas del organismo madre.

Cuando los explantos se cultivan en condiciones apropiadas, es posible inducir la formación de estructuras organizadas y la formación de plantas completas. La regeneración es un proceso que incluye distintas etapas que son comunes a los diferentes tipos de cultivo *in vitro*. De Klerk *et al* (1997) denominan estas fases como: fase de adquisición de la competencia, fase de inducción, y fase

de realización. La primera corresponde a la percepción del estímulo tendiente a la desdiferenciación de los tejidos originales; en la segunda fase las células son receptivas al estímulo en relación directa a la calidad y cantidad los componentes del medio de cultivo (sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento). En la fase de realización las células forman, mediante las divisiones celulares, el órgano determinado.

Si como resultado de los fenómenos morfogénicos, a partir del explanto original, se logra la formación de brotes o yemas adventicias con posterior enraizamiento, se dice que el proceso es de organogénesis directa. Si la regeneración se obtiene a través de estructuras semejantes a embriones sexuales, llamados embriones somáticos, se dice que la vía es por embriogénesis somática. Si al cultivar un explanto, no se obtienen células diferenciadas o estructuras organizadas, sino la proliferación celular para formar un tejido amorfo no diferenciado, éste recibe el nombre de callo, el cual puede cultivarse en medio sólido o en medio líquido, en cuyo caso las células se disgregan para formar un cultivo de células en suspensión.

V. 2. 1. Factores que afectan los procesos morfogénicos

Los principales factores que condicionan las respuestas morfogénicas de los cultivos *in vitro* son:

a) el genotipo

El genotipo es un factor determinante, mas allá de ningún otro. Cada especie, variedad o línea tendrá una respuesta particular dada por su bagaje genético.

b) el tipo de explanto

Al momento de realizar un cultivo *in vitro* de una especie vegetal determinada es necesario tener en cuenta qué parte de la planta es la más adecuada como explanto, así también como el estado de la planta madre (grado de crecimiento y desarrollo, sanidad, estado nutricional).

c) los medios de cultivo

La composición de los mismos incluye formulaciones salinas, muchas de las cuales están probadas para determinadas especies y para inducir ciertos procesos morfogénicos, un ejemplo lo constituye la formulación de Murashige y Skoog (1952) (MS). En otros casos es necesario modificar la composición y adecuarla a la especie en estudio y la respuesta esperada.

Los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos no nutrientes, que actúan en concentraciones del orden de mg/l y que desencadenan procesos fisiológicos específicos. Su acción depende del tipo de regulador, la concentración, y el balance con los reguladores aplicados y los del propio explanto. Los más utilizados en cultivo *in vitro* son las auxinas (ácido indol acético (AIA), ácido naftalen acético (ANA), 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)), las citoquininas (cinetina (KIN), bencilaminopurina (BAP), 2,indolpropiónico (2,IP), las giberelinas, como ácido giberélico (AG₃).

Otros componentes del medio de cultivo son los hidratos de carbono (el más empleado es la sacarosa); los antibióticos se utilizan ya sea para eliminar microorganismos contaminantes (cefotaxime, kanamicina, carbenicilina) o para promover determinadas respuestas morfogénicas (carbenicilina para promover formación de callos); el carbón activado se agrega al medio de cultivo para adsorber compuestos tóxicos o promover embriogénesis somática; los agentes

La micropropagación *in vitro* permite la obtención de clones selectos a gran escala y en condiciones controladas de sanidad. El cultivo de células vegetales aisladas, el cultivo de callos o de órganos aislados es otra poderosa herramienta biotecnológica, no sólo para la regeneración de plantas completas sino para la extracción de metabolitos secundarios de acción farmacológica.

V. 2. 2. La biotecnología en el fitomejoramiento

En cuanto al aporte de la biotecnología en el fitomejoramiento se puede citar a García Olmedo (1998), quien, en su obra "La tercera revolución verde", relata la evolución que sufrió la agricultura desde la prehistoria hasta nuestros días. La obtención de genotipos definidos a partir de fenotipos se redujo de 8 años, en el mejoramiento tradicional, a 2 ó 3 años. La obtención de plantas haploides, la fusión de protoplastos y la ingeniería genética son algunas de las biotécnicas que permiten alcanzar logros insospechados para el futuro del mejoramiento de plantas medicinales.

Paralelamente al avance de estas técnicas fue necesario conocer el comportamiento fisiológico *in vitro* de la especie vegetal motivo de estudio, y de este modo encontrar la composición de los medios de cultivo adecuados, con la correcta formulación de macro y micronutrientes, fuente de azúcares y balance hormonal, así como las condiciones ambientales de incubación óptimas. La interacción de estos factores es lo que determina la respuesta del explanto al cultivo *in vitro*.

V. 2. 3. La biotecnología y la plantas medicinales

En el trabajo de Bajaj *et al* (1988) se detallan un gran número de protocolos para el cultivo *in vitro* de plantas aromáticas y medicinales, y la lista se actualiza hasta el presente.

Las ventajas de aplicar biotécnicas en la producción de plantas de uso medicinal, respecto a la producción por agricultura tradicional, se puede resumir en los siguientes item:

- es independiente de la geografía y las variaciones estacionales y demás factores ambientales.
- ofrece un sistema de producción definido, incluido una disponibilidad continua del producto.
- permite producir compuestos nuevos, que normalmente no sintetiza la planta, alterando la ruta metabólica establecida o sometiendo el tejido a situaciones de estrés biótico o abiótico.
- el o los principios activos generados se pueden recoger eficientemente y con tecnología no contaminante.

El aporte de las biotecnología a través de sus diferentes modalidades, en la mejora y producción de plantas medicinales y obtención de metabolitos es cada vez más relevante. Se puede citar como ejemplo el trabajo de Leveille y Wilson (2002), quienes lograron la regeneración *in vitro*, a partir de segmentos nodales de plantas silvestres de *Harpagophytum procumbens* y *H. zeyheri*, plantas cuyos tubérculos se usan en el tratamiento de artritis y lumbago, y cuya efectividad antiinflamatoria se ha comprobado debido a la presencia de indoides. Las plantas obtenidas *in vitro* demostraron poseer los mismos principios activos que los encontrados en poblaciones naturales.

Otro ejemplo lo constituye la micropropagación *in vitro* de *Rawolfia tetraphylla* realizada por Sarma Dhiren *et al*, (1999). En este caso, los autores demuestran que el contenido de reserpina de las plantas obtenidas por propagación sexual y el de las plantas micropropagadas es similar. Por lo cual, estas últimas, se utilizan como fuente alternativa de alcaloide, a la vez que se preserva la especie.

Con resultados igualmente exitosos se ha regenerado *in vitro* *Panax ginseng* via embriogénesis somática y organogénesis directa e indirecta, a través de callos. (Tang *et al* , 2000).

En el trabajo de Palazón *et al* (1995) se demuestra el efecto de precursores y elicitores bióticos a fin de estimular la producción de digitoxina en el cultivo de raíces de *Digitalis lanata* transformadas con *Agrobacterium*. Este mismo grupo de trabajo demostró, en 1999, el efecto de la fenilalanina y de VSO₄ como elicitores a fin de optimizar la producción de Taxol® y de bacatin III a partir de callos cultivados en medio líquido de *Taxus baccata*. (Cusido *et al*, 1999). En *Taxus chinensis*, Ying-Yin Yuan, *et al* (2002) demostraron el efecto de *Fusarium oxysprum* como elicitor en la producción de taxol a partir de cultivo de células. Para una completa revisión se puede consultar el excelente trabajo de recopilación de Ramachandra y Ravishankar (2002) quienes describen en detalle cada una de las técnicas factibles de usar y los logros obtenidos en los últimos años en la obtención de metabolitos secundarios con el uso de biotécnicas.

V. 2. 4. La biotecnología y la conservación de recursos genéticos

Otra aplicación de las biotécnicas descritas tienen, en la actualidad, el objeto de conservar material vegetal con altos niveles de estabilidad genética, lo

que se denomina "Banco Genético *in vitro*". De este modo, el germoplasma (ápices, meristemas, minitubérculos, embriones somáticos, cultivos celulares) se almacena en medio de cultivos especiales y bajas temperatura (crioconservación), a fin preservar las especies amenazadas o con riesgo de erosión génica (Cragg *et al*, 1996, Sudharsan *et al*, 2003).

V. 3. Cultivo de tejidos *in vitro* en el género *Oenothera*

En el caso particular de plantas del género *Oenothera* se reportan numerosos trabajos relacionados con la aplicación de la biotecnología en la micropropagación, cultivo de callos, obtención de haploides y transformación genética como se detalla a continuación:

- Se ha logrado la propagación de plantas de *Oenothera erythrosepala* a partir de cultivo de ápices caulinares (Zuzuki *et al*, 1990).
- En *Oenothera hookeri* se logró la regeneración de plantas a partir de protoplastos aislados de hojas (Kuchuk *et al*, 1998).
- Taniguchi *et al* (1998) lograron la obtención de oligómeros de elagitánicos macrocíclicos, de comprobada actividad antitumoral, a partir de cultivo de callos de *Oenothera lacinata* Hill; además demostraron la influencia de los distintos reguladores de crecimiento incluidos en el medio de cultivo en relación al contenido de oenotherina A y B.
- Para la obtención de plantas haploides, Martínez y Dehalac (1998), cultivaron granos de polen inmaduros y microsporas de *Oenothera hookeri* y *Oenothera picensis*. Por medio de esta técnica se obtienen callos que, por organogénesis indirecta, regeneran plantas haploides.

- También se ha realizado la transformación genética, mediante la infección con *Agrobacterium tumefaciens*, de cinco cultivares de *Oenothera biennis* L.. Los tejidos transformados mostraron un alto contenido endógeno de citoquininas (Pavingerova *et al*, 1996).

V. 4. Objetivo

Conocer las respuestas morfogénicas de *Oenothera affinis* "flor de la oración" cultivada *in vitro*.

V. 5. Materiales y métodos

V. 5. 1. Material vegetal

El material vegetal, utilizado para los diferentes experimentos de cultivo *in vitro*, se obtuvo de plantas de *Oenothera affinis*, cultivadas en condiciones de invernadero y que crecieron a partir de semillas cosechadas de una población silvestre de la localidad de Abasto, provincia de Buenos Aires. Para disminuir la contaminación bacteriana y fúngica al momento de la siembra *in vitro*, se realizaron aspersiones semanales, de la parte aérea de las plantas completas con una solución al 1% de Trigger® (N-Alkyl-dimetil-benzil cloruro de amonio).

V. 5 .2. Tipo de explanto y desinfección

Se usaron explantos extraídos de tallos jóvenes (secciones nodales de 1.5-2 cm de largo) y de hojas totalmente expandidas (secciones de 1 cm²), recolectados de plantas adultas. Los explantos se lavaron con agua corriente durante una hora y la superficie se esterilizó con alcohol 70° durante un minuto y con NaOCl comercial (55 g de cloro activo/l) al 30 %, con el agregado de Tween 80 al 0.05% como tensioactivo, durante 30 minutos. Posteriormente, el material fue lavado tres veces con agua estéril, con el agregado de una solución acuosa de 100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico, en el último lavado, a fin de evitar la oxidación de los explantos.

V. 5. 3. Medios de cultivo y condiciones de incubación

Se evaluaron distintos medios de cultivo para medir el potencial organogénico y callogénico de los explantos nodales de tallo y de hoja.

Se utilizó el medio basal de sales minerales (macro y micronutrientes) de Murashige-Skoog (MS) (Murashige, 1962) y vitaminas (MS) al 100% y al 50% de su concentración y el medio WPM (woody plant medium) (LLoyd y MC´Cown 1980). Todos los medios se suplementaron con 3% w/v de sacarosa, y reguladores de crecimiento a saber: Acido naftalenacético (ANA) (Sigma) como fuente auxínica, en concentraciones de 0.01; 0.02; 0.04; 0.1 y 0.2 ppm. Como citoquininas se utilizó: 6-bencilaminopurina (BAP) (Sigma) (0.5; 1 y 2 ppm), Kinetina (KIN) (Sigma) (0.5; 1 y 2 ppm); N-phenyl-N'-(1,2,3,thidiazol-5 yl) urea (TDZ) (Thidiazurón®) a concentraciones de 0.02; 0.2 y 2 ppm. El pH de los medios se ajustó a 5.8 con una solución de NaHO 1N previo al agregado de 0.6% w/v de agar (Difco Bafco). El medio se dispensó en tubos de vidrio (2.5 X 150 cm) conteniendo 10ml de medio de cultivo cada uno y se procedió a esterilizar en autoclave, a 121°C durante 20 minutos a 1.05 Kg/cm².

Los explantos de secciones nodales de tallo y de las secciones de hoja fueron cultivados en condiciones asépticas bajo campana de flujo laminar y se incubaron en cámara climatizada a 27 ± 2°C, con un fotoperíodo de 16 horas de luz y con una irradiancia de 60 μmol. m⁻².seg⁻¹.

Cada tratamiento tuvo tres repeticiones de 10 explantos cada uno, por cada órgano de la planta cultivado. Los datos se registraron a las 8 semanas de la siembra.

Los resultados se analizaron estadísticamente usando un programa Statgraphic Plus.

V. 6. Resultados

V. 6. 1. Organogénesis

En explantos nodales se observó la proliferación de brotes a partir de las yemas existentes. En el medio MS diluido a la mitad, a bajas concentraciones de ANA (0.02 ppm) y con 0.5 y 1 ppm de BAP se registró el crecimiento de hasta 4 brotes nuevos por explanto (Fig. 2. B, b), con un largo de entre 1 y 3 cm, no habiendo diferencias significativas entre los dos medios (Gráfico 1).

En el medio de cultivo WPM, a bajas concentraciones de auxina (0.02 ppm de ANA) y con 1ppm de BAP se formaron hasta 6 brotes por explanto, de entre 3 a 5 cm de largo por brote (Fig. 2. C). En las otras concentraciones probadas en medio WPM, los resultados fueron significativamente menores. Con igual concentración de auxina, pero usando TDZ como fuente de citoquinina, en concentraciones de 0.02, 0.2 y 2 ppm, no se observó la formación de múltiples brotes, sólo se advirtió el crecimiento del brote de la yema axilar preexistente en el explanto (Fig. 2. A).

No se observó respuesta organogénica en explantos de hoja, ni de secciones internodales de tallo.

V. 6. 2. Callogénesis

La formación de callos se observó sólo en explantos de hoja. Los callos de mayor tamaño se obtuvieron en el medio basal WPM, con el agregado de 0.04 ppm de ANA y entre 0.02 y 2 ppm de TDZ (callos de entre 460 y 590 mg/explanto). En el medio basal MS a la mitad de la concentración, la formación de callos se logró con un balance ANA/BAP de 0.04/0.5 ppm y ANA/TDZ 0/0.2 ppm con un peso promedio

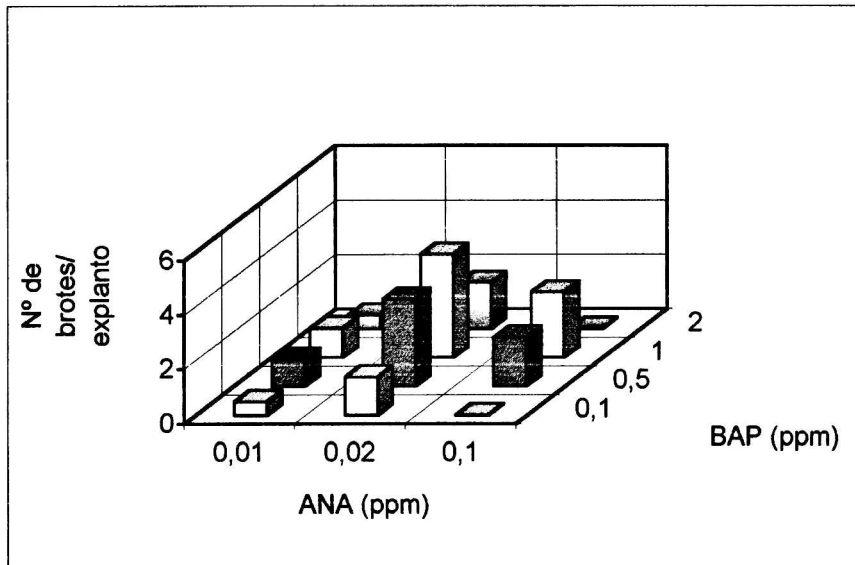
de entre 170 y 260 mg de callo/explanto. Cuando se utilizó BAP como citoquinina, los callos fueron de textura corchosa y coloración parda, mientras que cuando se usó TDZ como citoquinina los callos fueron friables y de color verdoso (Fig.2.D c.).

Cuando se usó BAP como citoquinina, la coloración rojiza , tanto de callos como de brotes se observó en cultivos realizados a fin de primavera o verano.

V. 6. 3. Rizogénesis

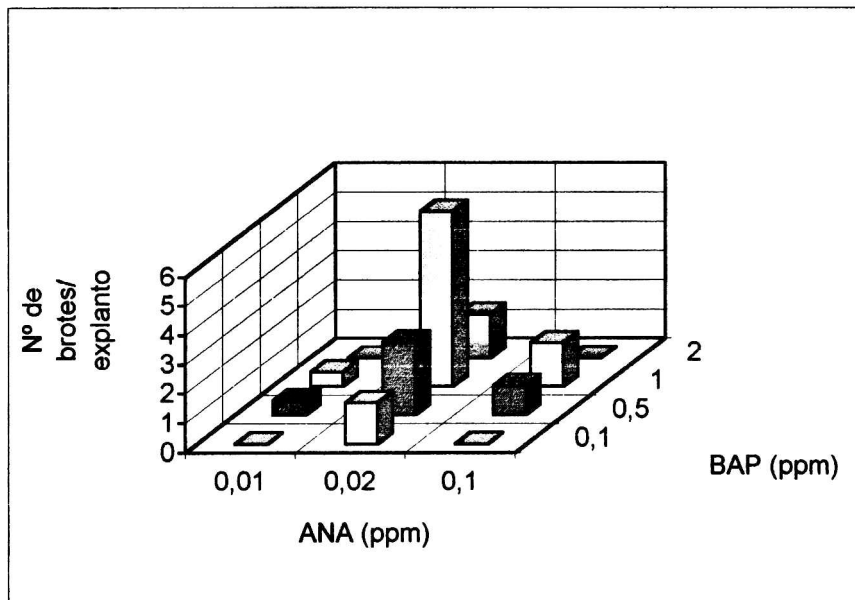
La formación de raíces adventicias por organogénesis indirecta a partir de callos, se verificó en el medio básico WPM con 0.02 ppm de ANA en ausencia de citoquininas (Fig.2 E r).y con el mismo medio básico suplementado con 0.04 ppm de ANA y 0.02 ppm de TDZ.

Fig. 2. Efecto de los reguladores de crecimiento (PGR), en medio MS, en la formación de brotes en *Oenothera affinis*



ANA: ácido naftalenacético
 BAP: bencilaminopurina

Fig. 3. Efecto de los reguladores de crecimiento (PGR), en medio WPM, en la formación de brotes en *Oenothera affinis*



ANA: ácido naftalenacético
 BAP: bencilaminopurina

V. 8. Discusión

En concordancia con Mehra-Palta *et al* (1998), la formación de múltiples brotes en especies de *Oenothera sp*, se verifica en medio con bajas concentraciones de auxinas y con BAP a concentraciones de entre 0.5 a 1 ppm.

En los medios con los mismos reguladores, en iguales concentraciones, la respuesta fue mayor en medio basal WPM, respecto del medio MS diluido a la mitad.

Al utilizar TDZ no se encontró una respuesta acorde con las propiedades enunciadas de este producto en el trabajo de Hare *et al* (1994). Según estos autores la acción del TDZ como regulador del crecimiento tipo citoquininas, en la organogénesis se basa en el efecto de la fenilurea, que actúa como inhibidor de la citokinina-oxidasa.

Los medios de cultivo utilizados en los experimentos, responden a modificaciones de aquellos usados por otros autores citados, para la regeneración, vía organogénesis directa o indirecta de especies del género de *Oenothera*, tales como el cultivo de ápices caulinares de *Oenothera erythrosepala* (Zuzuki *et al*, 1990), o el cultivo de callos en *Oenothera lacinata* (Taniguchi Shoko *et al*, 1998). Tales modificaciones obedecen a las respuestas organogénicas obtenidas en los experimentos *in vitro*, realizados en *O. biennis* por Rivas y Abedini (2000). En dichos ensayos *in vitro* de "primrose", se logró la regeneración de plantas completas, vía organogénesis directa e indirecta, a partir de tallo y hojas, incluida la rusticación. Los mismos medios de cultivo, aplicados en *O. affinis* por los mismos autores, no proporcionan iguales respuestas.

La variación de la respuesta *in vitro* en dos especies del género *Oenothera* está demostrada por Martínez *et al* (1998) en *O. hookeri* y *O. picensis*. Mientras

que en la primera se llega hasta un 50 % de inducción de callos a partir de antera, en la segunda sólo se logra un máximo de 17%.

Indudablemente existen factores endógenos, que influyen en la respuesta in vitro de distintos genotipos. Entre ellos la capacidad de síntesis de hormonas de crecimiento, específicamente las citoquininas. Este hecho está documentado por Pavingerova *et al* (1996), quienes demostraron que el contenido de citoquininas aumenta en un cultivar de una especie del género de *Oenothera* transformadas genéticamente con *Agrobacterium*.

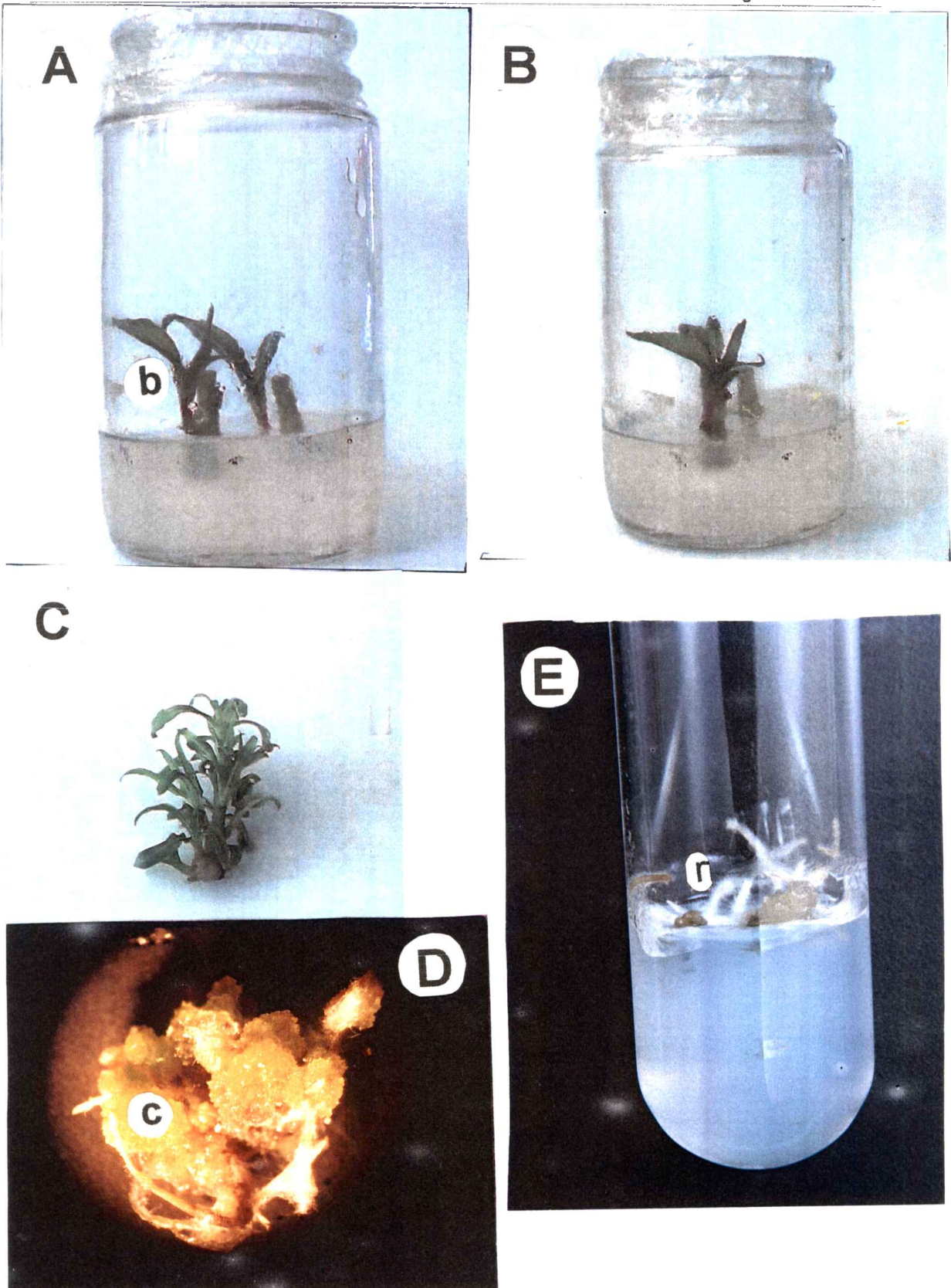


Fig. 2: Morfogénesis *in vitro* de *O. affinis*. A: Brotes de explantos nodales en medio WPM con 0.02 ppm de ANA y 0.2 ppm de TDZ; B: Brotes de explantos nodales en medio MS con 0.02 ppm de ANA y 1 ppm de BAP; C: Brotes de explantos nodales en medio WPM con 0.02 ppm de ANA y 1 ppm de BAP; D: callo en medio WPM con 0.04 ppm de ANA y 0.2 ppm de TDZ; E: raíces adventicias a partir de callo en medio WPM con 0.02 ppm de ANA.



VI

ÁCIDOS GRASOS

VI. Ácidos grasos

VI. 1. Generalidades

La percepción popular sobre las grasas es que no sólo engordan sino que aumentan el riesgo sobre una cantidad de problemas de salud tales como enfermedades coronarias, apoplejía y algunos tipos de cáncer. Pero no todas las grasas son perjudiciales. Las "buenas" incluyen las comprendidas en la familia de los ácidos grasos poliinsaturados y las conocidas como "grasas esenciales" o, más acertadamente, "ácidos grasos esenciales", esto es así porque, como las vitaminas, son vitales para la salud y no pueden ser fabricados por el cuerpo humano; deben ser obtenidos de los alimentos.

Lamentablemente, como resultado de los cambios en los hábitos alimentarios occidentales, los niveles de algunos de estos valiosos ácidos grasos esenciales son perniciosamente bajos mientras que, en demasiadas personas, los niveles de las grasas saturadas, las "malas", son demasiado altos.

En verdad hay muchas grasas que causan problemas de salud pero, de la misma manera, hay grasas alimenticias que resultan obligatorias para la buena salud. La connotación negativa de los excesos dietarios de grasa ha eclipsado la importancia de los tipos "saludables" de grasas en la prevención o la cura de enfermedades.

Dos ácidos grasos resultan esenciales para la salud humana. (Los peces requieren sólo un ácido graso y las plantas ninguno pues los producen). El primero es el ácido graso esencial ω_6 , llamado ácido linoleico (AL). El AL es abundante en los aceites poliinsaturados de cártamo, girasol y maíz. El segundo, conocido como

el ácido graso esencial ω_3 , es llamado ácido alfa-linoleico (ALN). A veces referido como superinsaturado, el ALN se encuentra en abundancia en las semillas de lino y de cáñamo.

El ácido linoleico y sus derivados corresponden a la familia ω_6 de poliinsaturados. Además del ácido linoleico, esta familia incluye el ácido γ -linoleico (AGL), el ácido dihomogama-linoleico (ADGL) y el ácido araquidónico (AA). Si el AL es provisto por los alimentos, las células de mamíferos fabrican AGL, ADGL y AA. Las grasas perjudiciales (margarinas, grasas para pastelería, ácidos trans-grasos, grasas pesadas, azúcar y colesterol), la falta de minerales (magnesio, selenio, zinc) y de vitaminas (B3, B6, C, E), virus, obesidad, diabetes, envejecimiento y algunas mutaciones genéticas pueden inhibir la conversión de ω_6 . En tales casos, puede resultar beneficioso un aceite que contenga derivados de ω_6 . El AGL está presente en las semillas de la "onagra", la "borraja" y el "casís". El ADGL se encuentra en la leche materna. El AA se encuentra en carnes, huevos y productos lácteos. (Paas, E. y Pierce, G., 2002).

VI. 1. 1. Función de los ácidos grasos. Importancia farmacológica

El descubrimiento de los ácidos grasos estuvo directamente asociado con el descubrimiento de las vitaminas y sus efectos derivados de la carencia de las mismas. Así se demostró el retardo en el crecimiento y lesiones en la piel y en la cola en ratas analizadas con dieta deficiente en ácido linoleico. Resultados similares se obtuvieron en ratas deficientes en ácido araquidónico (Brenner, 1993).

En términos generales los ácidos grasos son una muy eficaz fuente de energía para el organismo. Los ácidos grasos saturados que contienen menos de

16 átomos de carbono son usados con preferencia por el cuerpo humano como fuente de energía sobre los ácidos grasos con cadenas de entre 16 y 18 átomos de carbono. Estos ácidos grasos de cadenas más largas son usados a menudo para construir membranas celulares o para proveer un substrato para la fabricación de ácidos grasos insaturados por el organismo. El uso más importante que el organismo hace de los ácidos grasos esenciales $\omega 3$ y $\omega 6$ es aplicarlos como precursores de los compuestos hormonales, los que juegan un papel preponderante en la conservación de la estructura, función y homeostasis del cuerpo humano.

Los ácidos grasos son los componentes mayoritarios de los triglicéridos, los que sirven como reserva de energía de largo plazo del organismo. Los triglicéridos generalmente contienen ácidos grasos saturados. Los ácidos grasos insaturados son los bloques constructivos predominantes de los fosfolípidos, importantes constituyentes de las membranas celulares y los precursores de las hormonas eicosanoides.

Como parte de la dieta, los ácidos grasos ingeridos influyen sobre el nivel, en el suero sanguíneo, de lipoproteínas que contienen colesterol y su efecto sobre el riesgo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular. Los ácidos grasos saturados aumentan el nivel de LDL ("colesterol malo") en el suero sanguíneo, mientras los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados reducen el nivel de LDL y aumentan el nivel de HDL ("colesterol bueno").

Como componentes estructurales de las membranas, los ácidos grasos esenciales ayudan a formar una barrera que impide el paso de patógenos. También contribuyen a regular el intercambio de sustancias a través de los canales de proteína, las bombas y otros mecanismos a nivel de membranas. Contribuyen a formar el pigmento rojo de la sangre (hemoglobina) a partir de sustancias más simples. Mantienen activas las funciones glandulares de producción de fluidos

(exocrina) y de hormonas (endocrina). Contribuyen a producir lubricantes para las articulaciones. Son precursores de las prostaglandinas (PGs), tres familias de sustancias de tipo hormonal y de corta duración, que regulan la presión sanguínea, la adherencia de las plaquetas y la función renal. Un delicado equilibrio entre las PGs con funciones opuestas, determinadas en parte por la ingesta de $\omega 3$ y $\omega 6$, determinan la salud del sistema cardiovascular. Ayudan al transporte del colesterol. Son precursores de derivados tales como el ADH, requeridos por la mayoría de los tejidos activos: cerebro, retina, suprarrenal y testículos. Ayudan al sistema inmune a combatir las infecciones mediante el aumento de la producción de peróxido. Contribuyen a prevenir el desarrollo de alergias. En definitiva: cuando los alimentos son pobres en ácidos grasos esenciales, debe esperarse una diversidad de problemas de salud.

En la actualidad la actividad farmacológica de los ácidos grasos está demostrada en numerosos trabajos, ya sea por su efecto antioxidante (De La Cruz *et al*, 1999, Bushman *et al*, 2004), para el alivio de varias enfermedades crónicas tales como síndrome premenstrual, esclerosis múltiple (Huang y Mills, 1995., Fan y Chapkin, 1998), mastalgias, ulceración gástrica (Al-Shabanah, 1997) y problemas dermatológicos como eczemas y soriasis. Como precursores de la biosíntesis de prostaglandinas, estos ácidos actúan regulando funciones tales como la contracción y relajación del músculo liso del útero, sistema cardiovascular, tracto intestinal y tejido bronquial (Dewick, 1997).

Un efecto bien documentado del docosa-4,7,10,13,16,19 hexanoico (22-6n-3), es el referido a su incidencia en la visión normal y en el correcto funcionamiento de los fenómenos asociados a membranas del sistema nervioso central (Brenner, 1993).

VI. 1. 2. Requerimientos de ácidos grasos esenciales

De los aproximadamente cincuenta nutrientes esenciales conocidos, el ácido linolénico tiene el más alto requerimiento diario. La cantidad necesaria varía según la estación, la latitud, los niveles de actividad y de estrés, el estado nutricional y las diferencias individuales. Se ha estimado que puede resultar óptima una cantidad de 14-18 g/día de ω_6 y 4 g/día de ω_3 (Paas y Pierce, 2002); siendo mayor en individuos obesos, con desórdenes de lípidos en sangre o que ingieren gran cantidad de ácidos grasos saturados. Asimismo, los estudios con animales han recalcado la necesidad de proveer co-factores junto con los ácidos grasos esenciales para obtener un óptimo efecto metabólico durante la alimentación. Estos co-factores comprenden vitaminas B3, B6, C, E, A y los minerales zinc y magnesio.

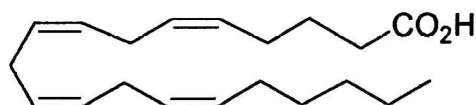
En la actualidad se conoce el contenido de los ácidos grasos en numerosas plantas (Tabla 1), pero son unas pocas especies vegetales las que se han estudiado en profundidad de modo tal de poder cumplir con los requerimientos para ser incluidos como suplemento de ω_3 y ω_6 en alimentos tales como productos lácteos, panificados, etc. El mayor inconveniente radica en las técnicas de preparación e industrialización de estos artículos que, debido a la inestabilidad química de los ácidos grasos en general, no asegura un resultado como el que se promociona el los productos.

Varios laboratorios de Europa y E.E.U.U. de América comercializan como suplemento dietario, en forma de cápsulas, el aceite de "borraja" (*Borago officinalis*), el aceite de "cáñamo" (*Cannabis sativa*) y aceite de "primrose" (*Oenothera biennis*); este último es el más difundido como suplemento dietario, con un precio aproximado de 6 a 8 U\$S el envase de 50 cápsulas de 2 g/cápsula.

VI. 1. 4. Nomenclatura y presencia de ácidos grasos en la naturaleza

En este capítulo se utiliza la nomenclatura abreviada de los ácidos grasos expresada por el número de átomos de carbono seguido de dos puntos y el número de dobles ligaduras seguido, a su vez, por la indicación de la familia a que pertenece dada por la ubicación de la doble ligadura más cercana al metilo terminal del ácido, o posición n también llamada ω (Brenner, 1993). Ej.: para el ácido araquidónico resultará ser 20:4n-6.

Ácido araquidónico



En las Tablas 2 y 3 se enumeran los ácidos grasos saturados e insaturados más frecuentes en la naturaleza:

Tabla 2. Ácidos grasos saturados de cadena lineal frecuentes en la naturaleza

Nombre vulgar	Nomenclatura condensada	Fórmula estructural
Butírico	4:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
Caproico	6:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
Caprílico	8:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
Láurico	12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
Mirístico	14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Palmitico	16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Esteárico	18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Araquídico	20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
Behénico	22:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
Lignocérico	24:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$
Melísico	30:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{28}\text{COOH}$

Tabla 3. Ácidos grasos insaturados de cadena lineal, frecuentes en la naturaleza

Nombre vulgar	Nº de dobles enlaces	Nomenclatura condensada	Fórmula estructural
Palmitoleico	1	16:1 n-7	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
Cis oleico	1	18:1 n-9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
Ricinoleico	1	18:1 n-9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
Linoleico	2	18:2 n-6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
α -linolénico	3	18:3 n-3	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$
γ -linolénico	3	18:3 n-6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CO}_2\text{H}$
Araquidónico	4	20:4 n-6	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CO}_2\text{H}$
Eicosapentanoico	5	20:5 n-3	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{H}$
Erúsico	1	22:1 n-9	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{CO}_2\text{H}$
Docosapentanoico	5	22:5 n-3	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{H}$
Docosahexanoico	6	22:6 n-3	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{CO}_2\text{H}$ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$

VI. 1. 3. Presencia de ácidos grasos en plantas superiores

Los ácidos grasos se encuentran presentes en numerosas familias de plantas superiores. A continuación se muestran algunos ejemplos:

Tabla.1. Plantas superiores caracterizadas por el contenido de ácidos grasos (Dewick 1997).

Especie vegetal	Parte utilizada	Cantidad de aceite (%)	Composición de ácidos grasos (%)	Usos industriales
<i>Prunus amigdalus</i> (Rosaceae)	semilla	40-55	oleico (62-86), linoleico (7-39), palmítico (4-9), esteárico (1-2).	Emoliente.
<i>Borago officinalis</i> (Boraginaceae)	semilla	28-35	linoleico (38), γ -linolénico (23-26), oleico (16), palmítico (11).	Suplemento dietario.
<i>Glycine max</i> (Leguminosae)	semilla	18-20	linoleico (44-62), oleico (19-30).	Aceite comestible, suplemento dietario.
<i>Ricinus communis</i> (Euphorbiaceae)	semilla	35-55	ricinoleico (80-90), oleico (4-9), linoleico (2-7), palmítico (2-3), esteárico (2-3).	Emoliente, purgante, perfumería.
<i>Cocos nucifera</i> (Palmae)	semilla	65-68	láurico (43-53), mirístico (15-21), palmítico (7-11), caprílico (5-10), cáprico (5-10), oleico (6-8), esteárico (2-4).	Perfumería.
<i>Zea mays</i> (Gramínea)	embrión	33-39	oleico (19-50), linoleico (34-62), palmítico (8-19), esteárico (0-4).	Aceite comestible, suplemento dietario, solvente de inyectables.
<i>Olea europaea</i> (Oleaceae)	fruto	15-40	oleico (56-85), linoleico (4-20), palmítico (8-20), esteárico (1-4).	Emoliente, aceite comestible.

VI. 1. 5. Propiedades químicas de los ácidos grasos

A continuación se enumeran las características generales de los ácidos grasos presentes en los animales superiores y en las plantas:

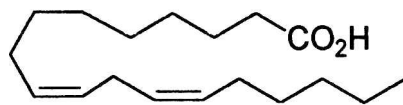
- Casi todos están compuestos por un número par de átomos de carbono, con cadenas cuyas longitudes se hallan comprendidas entre los 14 y los 22 átomos de carbono; los que poseen 16 o 18 átomos son los más abundantes.
- En general, los ácidos grasos insaturados predominan sobre el tipo saturado, especialmente en las grasas neutras y en las células de los organismos poiquilotermos que viven a temperaturas bajas.
- Los ácidos grasos no saturados poseen punto de fusión menor que los ácidos grasos saturados.
- En la mayoría de los ácidos grasos no saturados presentes en los organismos superiores existe un doble enlace entre los carbonos 9 y 10; pueden contener enlaces dobles adicionales entre el C10 y el metilo terminal de la cadena.
- En los ácidos grasos que contienen 2 o más enlaces dobles, éstos no se hallan nunca conjugados sino que están separados uno de otro por un grupo etileno (-CH₂-), de ahí la denominación de ácidos polietilénicos.
- Los enlaces dobles de casi todos los ácido grasos insaturados naturales poseen configuración geométrica *cis* .
- En los ácidos grasos saturados las cadenas hidrocarbonadas pueden existir en un número infinito de conformaciones, pues cada uno de los enlaces sencillos posee la libertad completa de rotación. Los ácido grasos insaturados, en cambio presentan un quiebre rígido en sus cadenas hidrocarbonadas originada por la incapacidad de rotación del doble enlace.
- Todos los ácidos grasos son esterificables, y los ésteres formados son suficientemente volátiles para ser separados e identificados por cromatografía gaseosa.

VI. 1. 6. Biosíntesis

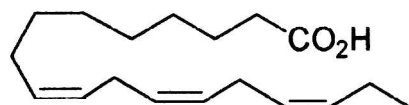
La síntesis de ácidos polietilénicos en los animales se realiza en el retículo endoplasmático por transformación de ácidos grasos precursores tioesterificados con la CoA. Dos reacciones se alternan en el proceso: la desaturación que forma las dobles ligaduras y la elongación por el agregado de unidades de dos carbonos provistas por la malonil-CoA.

Según cual sea el ácido graso no saturado precursor, se distinguen cuatro familias de ácidos grasos polietilénicos derivados, que son independientes y no interconvertibles. Cada una se caracteriza se identifica por la ubicación de la doble ligadura más cercana al metilo terminal del ácido, o posición n también llamada ω , a saber:

- del linoleico 18:2n-6 (ω 6)



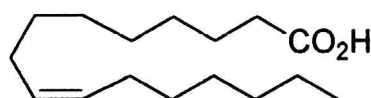
- del α -linolénico 18:3n-3 (ω 3)



- del oleico 18:1n-9 (ω 9)



- del palmitoleico 16:1n-7 (ω 7)



La familia del linoleico deriva de la linoleil-CoA que, en primer lugar se desatura por la enzima $\Delta 6$ desaturasa, formando una doble ligadura entre los carbonos 6 y 7. El nuevo ácido, γ -linolénico, tiene tres dobles ligaduras en 6, 9 y 12 (18:3n-6). Una elongación por condensación con malonil-CoA lo transforma en dihomo- γ -linolenil-CoA (20:3n-6-CoA).

Los ácidos de la serie α -linolénica se sintetizan en animales, a partir del ácido α -linolénico de origen vegetal, por reacciones similares a la de los ácidos de la serie linoleica.

En forma similar a lo que ocurre con las familias de los ácidos linoleico y α -linolénico, las mismas enzimas que actúan en ellas producen reacciones alternadas de desaturación y elongación de los ácidos palmitoleico (16:1n-7) y oleico (18:1n-9), constituyendo las familias n-7 y n-9 respectivamente. Los ácidos palmitoleico y oleico derivan de los ácidos palmítico y esteárico, respectivamente, por una reacción de desaturación catalizada por una enzima $\Delta 9$ desaturasa. Esta enzima existe en animales y vegetales, por tanto estas familias no se establecen como ácidos grasos esenciales, ya que derivan de los ácidos oleico y palmitoleico, que pueden sintetizarse *de novo* en los animales. A pesar de lo cual el ácido oleico, por ser no saturado, juega un importante papel en la constitución de los fosfolípidos en las membranas biológicas, influyendo en su estructura y propiedades.

En los animales, el ácido linoleico y los ácidos grasos no saturados que derivan de él tales como el γ -linolénico (18:3n-6), dihomo- γ -linolénico (20:3n-6), araquidónico (20:4n-6), adrénico (22:5n-6) y docosa 4,7,10,13,16 pentenoico (22:6n-3) constituyen la llamada familia biológica del linoleico, n-6, ya que todos tienen una doble ligadura terminal en el carbono 6 anterior al del metilo terminal.

En los vegetales, el ácido oleico (18:1n-9) puede ser convertido en linoleico por agregado de una doble ligadura en el carbono 6, mecanismo que no utilizan los

animales. Esta reacción de desaturación del ácido oleico ha sido especialmente estudiada en los cloroplastos del alga *Chorella*. El ácido linolénico también se sintetiza en los cloroplastos. Por tanto, en las plantas verdes y protistas fotosintéticas, el ácido linolénico es esencial en el proceso de producción de O₂, lo cual no ocurre con el linoleico (Brenner, 1983).

Los animales necesitan ácido linoleico para la biosíntesis del ácido dihomo- γ -linolénico y araquidónico, ácidos grasos polinosaturados precursores de prostaglandinas de la serie 1 (PGE₁) y serie 2 (PGE₂) respectivamente. Por lo tanto el ácido linoleico debe ser obtenido en la dieta a partir de vegetales, en donde se verifica la desaturación del extremo de la cadena correspondiente al carboxilo terminal, para dar ácido γ -linolénico, el cual es usado como sustrato para la extensión de la cadena, agregando una unidad de dos átomos de carbono del malonato y produciendo dihomo- γ -linolénico. El α -linolénico es un precursor similar al anterior, en la ruta de eicosapentanoico (EPA), requerido para la síntesis de prostaglandinas de la serie 3 (PGE₃) (Fig. 1).

En el hombre, la desaturación del ácido linoleico, para formar el ácido γ -linolénico, puede bloquearse por deficiencias genéticas y otros factores tales como la edad avanzada, la diabetes o el alcoholismo, que inhiben a la enzima desaturasa. El impedimento para la formación del ácido γ -linolénico también se puede deber a la ingesta excesiva de grasas pero en este caso, por competencia entre las enzimas involucradas.

VI. 2. El aceite de “onagra” (*Oenothera biennis*)

VI. 2. 1. Composición química. Usos. Acción farmacológica

El aceite extraído de semillas de *Oenothera biennis*, llamado aceite de “onagra” o “primrose”, se utiliza como complemento dietario por el alto contenido de ácido γ -linolénico. Estudios recientes lo recomiendan en patologías de diabetes, alcoholismo y afecciones cardiovasculares (Balasinska, 1998, Al-Shabanah, 1997).

El detalle del análisis químico del aceite de “onagra” o aceite de “primrose”, revela la presencia de 79 constituyentes distintos incluyendo terpenos, alcoholes alifáticos y aldehídos y compuestos aromáticos; el más abundante es el furfural. El aceite, que se extrae de la semilla, posee entre 17 y 24 % de aceites totales, con una composición de ácidos grasos de: 65-80 % de ácido linoleico, 7-14 % de ácido γ -linolénico, 7% de ácido palmítico y 9 % de ácido oleico (Krzyzaniak *et al*, 1991, Christie, 1999, Dewick, 1997). Se determinaron valores superiores en otras especies del género *Oenothera* del hemisferio norte como en *O. atrovirens* y *O. lamarkiana* (Bruneton, 1991). Le Bozec (1988) consigna un porcentaje de 9.3 de ácido γ -linolénico en *O. grandiflora*.

La variación en el contenido de aceite de “onagra” en las semillas se debe a factores tales como el cultivar seleccionado, el grado de maduración de la semilla, las condiciones de crecimiento de las plantas y, posiblemente, a la forma de procesamiento de las semillas (Hulan *et al.*, 1987, Cisowski *et al*, 1993, Christie, 1999, Fieldsend y Morinson, 2000). En el trabajo de Heuler *et al* (2002) se señala el incremento en el rendimiento de aceites en cultivares de *O. biennis* en regiones áridas y semiáridas con riego de agua salina. Yaniv y Perl (2004) estudiaron el contenido de ácidos grasos, en semillas de *O. biennis*, en relación con la

temperatura de conservación de semillas cosechadas, o de aquellas contenidas en los frutos adheridos en las ramas. En estas últimas, el coeficiente entre ácidos grasos saturados/insaturados aumentó al incrementar la temperatura. Mientras que en semillas aisladas del fruto, inmaduras, decrece el ácido γ -linoleico (GALA) y aumenta el ácido oleico. Estos resultados establecen una disminución en la relación ácidos grasos saturados/insaturados. Por otro lado, el γ linolénico sólo se encontró en semillas verdes (inmaduras) y en semillas en germinación.

VI. 2. 2. Análisis de ácidos grasos en el aceite de “onagra”

El mayor componente del aceite de “onagra” es el ácido palmítico (16:0), el esteárico (18:0), el oleico (18:1n-9), el linoleico (18:2n-6) y el γ -linolénico (18:3n-6). Un número menor de componentes se encuentra en bajas concentraciones, incluyendo el ácido mirístico (14:0), ácido palmitoleico (16:1n-7), ácido vascénico (18:1n-7), ácido α -linolénico (18:3n-3), ácido eicosanóico (20:0) y el ácido eicosenóico (20:1). Todos ellos están normalmente presentes en las proporciones expresadas en la Tabla 4 .

A causa del alto grado de insaturación del aceite de “onagra” y sus constituyentes, debe tenerse mucho cuidado durante el análisis con el fin de minimizar los efectos de la autooxidación, esto se logra trabajando en atmósfera de nitrógeno y, cuando es posible, mediante el agregado de antioxidantes (Christie, 1993).

Tabla. 4 Composición de ácidos grasos expresado como % del total, de aceite de "onagra" (Court *et al*, 1993)

Ácido graso	% del total en peso	Ácido graso	% del total en peso
12:0	0.04	18:2n-6	71.20
14:0	0.07	18:3n-6	8.72
15:0	0.03	18:3n-3	0.18
16:0	6.44	20:0	0.31
16:1n-9	0.04	20:1n-9	0.23
16:1n-7	0.07	20:2n-6	0.03
17:0	0.06	22:0	0.12
17:1n-7	0.04	24:0	0.04
18:0	1.81		
18:1n-9	9.76		
18:1n-7	0.84		

La cromatografía gaseosa (CG) es el método más apropiado para el análisis de los ácidos grasos, generalmente se los mide previa transformación en derivados volátiles de metil ésteres. Los análisis en CG, para realizar el control de calidad, arrojan buenos resultados cuando se usan columnas con fase estacionaria de polaridad moderada (Tipo Carbowax). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se identifican por el tiempo de retención relativos a auténticos estándares.

VI. 3. Objetivo

El presente capítulo tiene como objetivo el análisis cuali-cuantitativo de los ácidos grasos presentes en semillas de *Oenothera affinis* “flor de oración” a fin de determinar su posible uso, en reemplazo del aceite de “onagra” extraído de *O. biennis*.

VI. 4. Materiales y métodos

VI. 4. 1. Material vegetal

Para los ensayos se usaron semillas de *O. affinis* recolectadas de la localidad de Abasto, provincia de Buenos Aires. Con las siguientes características:

- semillas maduras. Cosecha febrero de 2002
- semillas maduras Cosecha febrero de 2003
- semillas inmaduras Cosecha febrero de 2003

En todos los casos las muestras utilizadas pertenecen a la colección de semillas que se encuentran disponibles en el Banco de Germoplasma de Semillas de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP, conservadas a 5°C.

VI. 4. 2. Métodos de extracción

Las semillas (1g) se molieron en mortero con 20 ml de reactivo de Folch (Folch *et al*, 1957) durante 2 minutos, en baño de hielo. Se filtró por papel y el marco remanente se extrajo en 10 ml de la mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v), durante 3 minutos. Se continuó la extracción hasta llegar a un volumen total de los eluatos de 20 ml y con el agregado de agua (20% en volumen). Se dejaron decantar las fases durante toda la noche a 4°C en atmósfera de N₂ (Christie, 1993).

Los lípidos se recuperaron de la fase orgánica y se hidrolizaros con álcali. La saponificación se realizó con KOH a 84°C durante 1 hora en atmósfera de N₂. Luego se procedió a la esterificación de los ácidos libres. Los metil ésteres de los

ácidos grasos se prepararon con BF_3MeOH a 65°C durante 1 hora, en atmósfera de N_2 (Christie, 1993), de acuerdo al método de Morrison y Smith, (1964). La extracción se realizó en cloroformo (3 ml) y luego se lavó con agua (2 ml). Los metil ésteres se recuperaron de la fase orgánica por evaporación bajo corriente de N_2 y se resuspendieron en hexano.

VI. 4. 3. Separación y cuantificación

Los análisis por cromatografía gaseosa (CGL) se realizaron en un equipo Hewlett-Packard HP 6890, con columna capilar Omega Wax 250 (Supelco, Bellefonte, PA) de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro y 0.25 μm . La temperatura se programó para obtener un incremento lineal de $3^\circ\text{C}/\text{minuto}$ desde 175°C a 230°C . Los picos cromatográficos se identificaron por comparación con los tiempos de retención de estándares auténticos.

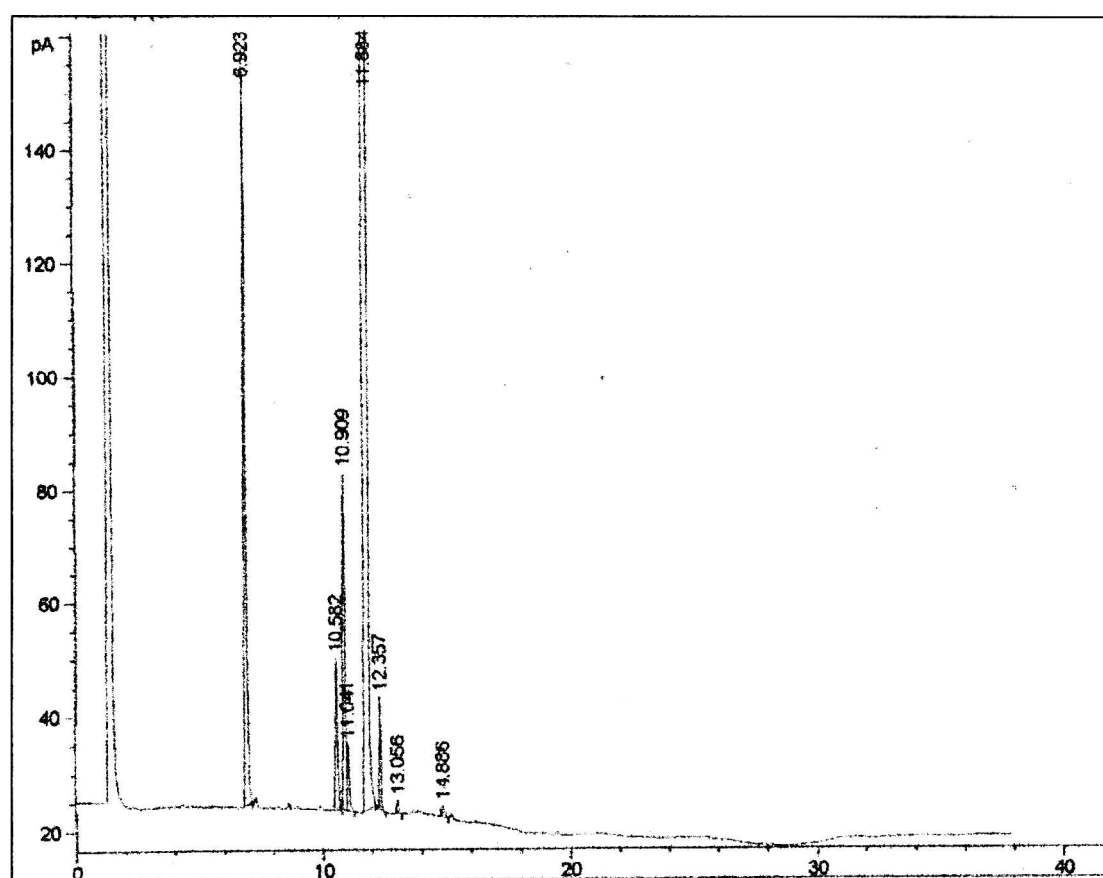
VI. 5. Resultados

VI. 5. 1. Identificación y cuantificación

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos totales de semillas de *O. affinis* fueron analizados por CGL capilar (Fig. 3). Se identificaron y cuantificaron 7 ácidos grasos, 2 ácidos grasos saturados: y 5 ácidos grasos insaturados. Como ácidos grasos saturados se reconocieron el ácido palmítico (1) y el ácido esteárico (2), y

como ácidos grasos insaturados el ácido palmitoleico (3), oleico (4), ascléptico (5), linoleico (6) y γ -linolénico (7)

Fig. 3: Cromatografía gaseosa (GLC) de ésteres metílicos de ácidos grasos de aceite de semillas de *Oenothera affinis* en un equipo Hewlett-Packard HP 6890, con columna capilar Omega Wax 250 (Supelco, Bellefonte, PA) de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.25 μ m. Temperatura inicial de 175°C con un incremento lineal de 3°C/minuto hasta 230°C.



VI. 5. 2. Porcentaje de ácidos grasos analizados

En la Tabla 5 se muestran los porcentajes de los ácido grasos analizados en las semillas de *O. affinis* cosechadas el mismo año de los ensayos (2003), (maduras e inmaduras) y en las semillas cosechadas en el año 2004 y almacenadas en frío durante un año

Tabla 5. Composición de los ácidos grasos (g/100 g de lípidos totales) en semillas de *Oenothera affinis* maduras (cosechadas en el año 2002) y semillas inmaduras y maduras (cosechadas en el 2003). ND (no detectable). T (trazas)

Acido graso	Año de cosecha		
	2002 Maduras	Inmaduras	2003 Maduras
1) Palmítico (16:0)	9.6	8.6	9.4
2) Palmitoleico (16:1n-7)	ND	ND	T
3) Esteárico (18:0)	2.5	3.2	3.5
4) Oleico (18:1n-9)	5.6	7.1	9.5
5) Asclépico (18:1n-7)	1.01	5.4	0.7
6) Linoleico (18:2n-6)	80.1	74.0	76.2
7) γ -linolénico (18:3n-6)	1.38	1.01	1.0

El ácido graso que se encuentra en mayor porcentaje corresponde al ácido linoleico, en todas las muestras analizadas. El ácido oleico aparece con un porcentaje elevado en semillas maduras de la cosecha 2003. Mientras que se observa que el ácido palmítico es el ácido graso saturado que se encuentra en mayor porcentaje, con valores superiores en las semillas maduras tanto de la cosecha 2002 como en la de 2003. En el caso del ácido esteárico, el porcentaje es menor en semillas con un año de almacenamiento, no habiendo diferencias

importantes en los porcentajes del ácido en semillas inmaduras y maduras de la cosecha 2003.

En el caso del ácido γ linolénico, se registran valores levemente mayores en semillas cosechadas en el 2002 y, se observó que, los valores en porcentaje, fueron similares en las semillas maduras e inmaduras de la cosecha 2003.

El porcentaje de ácido oleico de semillas maduras de la cosecha 2003, es significativamente mayor que en las semillas verdes de la misma cosecha y que el hallado en las semillas con un año de almacenamiento. El ácido ascléptico aparece en semillas verdes cosechadas en 2003, en el resto de las muestras sólo se observan trazas. Sólo se registran trazas de ácido palmitoleico en muestra de semillas maduras de la cosecha 2003.

VI. 6. Discusión

Los resultados obtenidos en muestras de semillas de *O. affinis* por los métodos descritos expresan una composición de ácidos grasos saturados e insaturados comparables a los consignados en los trabajos de Christie (1999) y Dewik (1998) para semillas de *O. biennis*.

En cuanto a los porcentajes de ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico), y en los ácido grasos insaturados, oleico, palmitoleico, ascléptico y linoleico testeados en *O. affinis*, se registran valores mayores, en porcentaje, que los reportados en aceite de semilla de *O. biennis* por Christie (1999), Cisowsky (1993) y Dewik (1999). Estos mismos autores encontraron mayor porcentaje de ácido γ -linolénico que el hallado en las muestras de semillas de *O. affinis*. Heuer ✓

(2002) consigna, en *O. biennis*, valores de ácido oleico mayores que los encontrados en *O. affinis*.

En concordancia con los autores mencionados, los mayores valores de porcentaje de ácidos insaturados corresponden al ácido linoleico. Con respecto a este ácido, en *O. affinis*, no se registran diferencias relevantes en los experimentos realizados con semillas maduras e inmaduras, si bien Peiretti *et al* (2004) encuentran valores mayores de ácido linoleico en semillas maduras de *Oenothera paradoxa*. Estas proporciones coinciden con los valores obtenidos por Cisowsky (1997); este mismo autor hace referencia a la diferencia en la concentraciones de ácidos de acuerdo al grado de madurez de la semilla. En tal sentido, los porcentajes de ácidos grasos en muestras analizadas en *O. affinis* de semillas de frutos verdes fueron similares a la de los frutos maduros, salvo en caso del ácido ascéptico que sufrió un disminución de la concentración en semillas maduras.

La diversidad de factores que condicionan las características del aceite de semillas de las diversas especies del género *Oenothera* queda reflejado en los trabajos de Heuer (2002) con datos de contenido de ácidos grasos en *O. biennis* creciendo en condiciones de salinidad y en los de Yaniv y Perl (1987) y Fieldsend y Morinson (2000) quienes relacionan la calidad de aceite en base a condiciones ambientales en semillas de *Oenothera sp.* Así mismo Levy *et al* (2000) analizan el incremento de γ linolénico en cultivares tempranos de *O. lamarkiana*. Peiretti (2004) y Cisowski (1992) en *O. paradoxa* en *O. biennis* respectivamente relacionaron el contenido de ácidos grasos según el grado de madurez de las semillas, y de Murphy *et al* (2004), quien evaluó la influencia de la densidad de siembra en contenido de γ linolénico de *O. elata*, *O. jamesii* y *O. rhombipetala*, son algunos ejemplos de la dispersión de los resultados del contenido de ácidos grasos debida al genotipo, el manejo del cultivo y condiciones climáticas y edáficas. Por tanto

podemos concluir que el aceite de semillas de *Oenothera affinis*, cosechadas en Abasto, provincia de Buenos Aires posee una composición de ácidos grasos que se encuadra en los estándares descriptos para la especie, y por lo tanto podría reemplazar al aceite de “onagra” extraído de *Oenothera biennis* para fines comerciales.



VII

CONCLUSIONES

VII. Conclusiones

VII. 1. Exo y endo morfología

Se determinaron las siguientes características de diagnóstico para la especie:

- Crecimiento pluriannual. Presencia de rizoma. Frutos cápsulas dehiscentes afinadas en el tercio superior.

- Presencia de tricomas tectores unicelulares filiformes, con extremos aguzados o romos, o espatulados, con o sin cutícula verrugosa, de 0.15 a 0.2 cm de longitud y 0.05 a 0.06 cm de espesor.

-La superficie del tallo, de las hojas y del fruto es densamente pubescente.

- Idioblastos con aceite y con abundantes rafidios de oxalato de Ca en los parénquimas de la raíz, el tallo y las hojas.

- La raíz tiene la endodermis poco conspicua.

- Tallo primario con sifonostela anfifloica. En el tallo secundario se observó la presencia de felógeno interno y felodermis que rodea al cilindro central.

- La hoja se caracteriza por la presencia de estomas anisocíticos en el haz y en el envés. Lagunas foliares con terminaciones de los haces conductores en forma de yunque. Presencia de hidatodes en los dientes del borde foliar.

- El pecíolo es manifiesto sólo en las hojas de los primeros estadios de la planta, el resto de las hojas son sésiles; posee parénquima clorofiliano en la zona angular y un solo haz colateral central.

- Índice de estomas en epidermis abaxial = 10.20 (17.26) 20.0 En epidermis adaxial = 8.43 (12.76) 18.2. Índice de empalizada = 2 (3.34) 4.75.

- Semillas de 0.15 a 0.2 cm de longitud y 0.05 a 0.06 cm de ancho y exotesta con esculturas reticuladas y micropapilas poco conspicuas. Sin endosperma. La exotesta está constituida por una capa de células con esculturas reticuladas, con micropapilas poco conspicuas, la mesotesta es persistente y está formada por una capa de células comprimidas. La endotesta está formada por 2-3 hileras de células, el exotegmen está compuesto por una capa de células esclerosadas, en contacto con el endotegmen, formado por una capa de células finas y alargadas.

- Granos de polen triporados con ectexina

VII. 2. Fisiología de la germinación

- Las semillas maduras de *O. affinis* tienen un contenido de humedad de 4.8%; y el peso de 1000 semillas es de 0.3525 g.

- El porcentaje de germinación en las semillas maduras, sin pretratamiento es del 30%.

- En las semillas maduras, con pretratamiento de 10 días y 20 días a 5°C el porcentaje de germinación es del 90%.

- El ácido giberélico, en concentraciones 0.1 ppm y 1 ppm reemplaza los requerimientos de frío en la germinación de las semillas. Los porcentajes de germinación con aplicación de AG₃ en las concentraciones mencionadas, son similares a los obtenidos con pretratamientos de frío de 10 y 20 días a 5°C .

- No se registran diferencias significativas en el porcentaje de germinación de semillas incubadas en ausencia de luz, de aquellas incubadas con fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

- Las semillas inmaduras tienen un poder germinativo inferior al 50% del correspondiente a semillas maduras de frutos tanto indehiscentes como dehiscentes.

- El poder germinativo de las semillas de *O.affinis*, conservadas 1 año en envases herméticos, a 5°C no disminuye significativamente respecto del de las semillas recién cosechadas. Luego de 2 años de almacenamiento, en las mismas condiciones, el poder germinativo disminuye significativamente (alrededor del 20%).

VII. 3. Morfogénesis *in vitro*

- Se logró la proliferación de múltiples brotes *in vitro* a partir de yemas axilares preexistentes. Los segmentos nodales de tallos jóvenes resultan el tipo de explanto más reactivo para la organogénesis.

- El medio de cultivo con el que se obtiene mayor número de brotes por explanto, corresponde a la formulación de macro y micronutrientes, y vitaminas de WPM, suplementado con 30g/l de sacarosa y con el agregado de 0.02 ppm de ANA y 1 ppm de BAP.

- Los segmentos de hoja resultan ser los explantos mas aptos para la formación de callos, cuando se los incuba en medio de macro y micronutrientes, y vitaminas de WPM, suplementado con 30g/l de sacarosa y con el agregado de 0.04 ppm de ANA y concentraciones de TDZ de entre 0.02 y 2 ppm. Con esta formulación se obtuvieron callos de hasta 0.600 g por explanto.

- La formación raíces se logra únicamente por vía indirecta, a partir de cultivo de callos, en formulación de macro y micronutrientes, y vitaminas de WPM, suplementado con 30g/l de sacarosa y con el agregado de 0.02 ppm de ANA.

VII. 4. Ácidos grasos

- Los ácidos grasos reconocidos por cromatografía fueron: Palmítico, Palmitoleico, Esteárico, Oleico, cis vascénico, linoleico y γ -linolénico.

- El ácido linoleico es el ácido graso encontrado en mayor proporción

- El ácido graso no saturado que se encontró en mayor proporción fue el ácido palmítico

- El contenido de ácidos grasos en semillas maduras almacenadas durante un año en frío, no mostró diferencias significativas respecto del contenido de ácido grasos de semillas maduras recién cosechadas.

- El contenido de ácido ascéptico de semillas inmaduras fue significativamente mayor que el de las semillas maduras de las dos cosechas testeadas.



VIII

REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

VIII. Referencias bibliográficas

AL-SHABANAH, O. A. (1997). Effect of evening primrose oil on gastric ulceration and secretion induced by various ulcerogenic and necrotizing agents in rats. *Food and Chemical Toxicology* 35(8): 769-775.

AMAT, A. (1983). Taxones de Compuestas Bonaerenses críticos para la Investigación Farmacológica. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 2(1): 23-36.

AMAT, A. ARENAS, P., BARBOZA, G., DEL VITTO, L. FREIRE, S., GATUZZO, S., GRATTI, A., MANDRILE, E., MARTINEZ, M. MARTINO, V., NAJERA, M., POCHETTINO, M., RONDINA, R., VIGNALE, N., YAJÍA, M. (1998) *Farmacobotánica y Farmacognosia en Argentina 1980-1998*. E.C.A. Ediciones Científicas Americanas. La Plata. Argentina.

AMORÍN, J. L. (1974) *Plantas de la Flora Argentina relacionadas con alucinógenos Americanos*. Publicaciones de la Academia Argentina de Farmacia y Bioquímica N° 1.

AMORÍN, J. L. (1977) Aprovechamiento y conservación de nuestras plantas medicinales. *Revista Farmacéutica*. N° 1-3 Tomo 119 Pp.15-24.

ANMAT (1999), Normas para la implementación del registro de medicamentos fitoterápicos. Disposición N° 2673/99. Ministerio de Salud y Acción Social.

AZCON-BIETO, J., TALÓN, M. (2000). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Edicions Universitat de Barcelona. Mc Graw-Hill. Interamericana. España.

BAJAJ, Y. P. S., FURMANOWA, M., OLSZOWSKA, O. (1988). *Biotechnology of the Micropropagation of Medicinal And Aromatic Plants*. Pp. 5- 11 En *Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 4 Medicinal and Aromatic Plants I* (ed. by Y.P.S.D. Bajaj) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

BAKER, J., BORRIS, R., CARTÉ, B., CORDELL, G., SOEJARTO, D., CRAGG, G. GUPTA, M., IWU, M., MADULID, D., TYLER, V. (1995). Natural Products Drug Discovery and Development: New Perspective on International Collaboration. *Journal of Natural Products*. Vol. 58 N°9 pp. 1325-1357.

BALASINSKA, B. (1998). Hypocolesterolemic effect of dietary evening primrose (*Oenothera paradoxa*) cake in rats. *Food Chemistry*. 63: 4.

BANDONI, L., COUSSIO, J., RONDINA, R. (2003). Plantas medicinales o tóxicas argentinas (base de datos) 3° Edición, IQUIMEFA (UBA-CONICET) Buenos Aires.

BANDONI, L. (2003). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Editor: Arnaldo L. Bandoni. CYTED.

BARBOZA, G. E., BONZANI, N., FILIPPA, E. M., LUJÁN, M. C., MORERO, R. BUGATTI, M., DECOLATTI, N., ARIZA ESPÍN, L. (2001). Atlas histomorfológico de plantas de interés medicinal de uso corriente en Argentina. Córdoba. Museo Botánico de Córdoba. Serie Especial I.

BASSOLS, G., GURNI, A. (1996). Especies del género *Lippia* utilizadas en medicina popular latinoamericana. *Dominguezia* Vol. 13 N°1 pp. 7-25.

BAYON, N., ARAMBARRI, A. (1999). Anatomía y etnobotánica de las especies medicinales de la Provincia Pampeana. Asclepiadáceas. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 18 (1) 23-31.

BERNAJ, H. Y., JAIME, M., CORREA, E. (1999). Especies promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Ministerio de educación y Ciencia. España.

BERNATH, J. (1998). Strategies and recent achievements in selection of medicinal and aromatic plants. *Acta Horticulturae* 576

BEWLEY, J. D., BLACK, M. (1978). Physiology and biochemistry of seeds. Vol. 2. Spring-Verlag.

BEWLEY, J. D., BLACK, M. (1994). Seeds. Physiology of Development and Germination. 2° Ed. p 391. Plenum Press. New York.

BOCCO, M. E., BOCCO, M. E. VISCHI, N. Y MONTANI, N. (1997). Relevamiento de las plantas medicinales espontáneas del Departamento de Río Cuarto (Córdoba. Argentina). Parodiana 10 (1-2):11-18.

BOSEC, A. (2000). Micropropagation and *in vitro* flowering of *Rauwolfia tetraphylla*; a potent source of anti-hypertension drug. Planta Medica 65: 277-278.

BRANDLE, J.E.; COURT W. A. Y ROY, R.C. (1993). Heritability of Seed Yield oil concentration and oil quality among wild biotypes of Ontario Evening Primrose. Canadian Journal of Plant Science 73(4): 1067-1070.

BRENNER, R. (1983). Biosíntesis de ácidos grasos. Cap 34 pp. 651-667. En: Bioquímica General. Torres, H., Carminatti, H., Cardini, C.. Editorial El Ateneo. Buenos Aires.

BRENNER, R. (1993). Los ácidos grasos y sus funciones. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana Vol. XXVII N°1.

BRUNETON, J. (1991). Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España.

BUSHMAN, B. S., PHILLIPS, B., ISBELL, T. OU,, B., CRANE, J. M., KNAPP, S. J. (2004). Chemical composition of caneberry (*Rubus* spp) seeds and o and their antioxidant potential. Journal Agriculture Food Chemistry. 52 (26) 7982-7.

BÜTER, B., ORLACCHIO, C., SOLDATI, A., BERGER, K. (1998). Significance of Genetic And Environmental Aspects in the Field Cultivation of *Hypericum perforatum*. *Planta Medica* 64 pp. 431-437.

CABRERA, A. L. Y ZARDINI, E. M. (1978). Manual de la flora de los alrededores de la provincia de Buenos Aires. Segunda edición. pp. 452-453. Editorial ACME S.A.C.I. Buenos Aires.

CARLQUIST, S. (1977). Wood anatomy of Onagraceae: additional species and concepts. *Annals of Missouri Botanical Garden* 64: 627-637.

CARPANO, S. M., SPEGAZZINI, E.D., NAJERA, M. (1994). Nueva técnica de eliminación de cutícula en órganos florales. *ROJASIANA*. Vol. 2 (1) pp. 9-12.

CAREW, D., STABA, E. J. (1965) *Plant Tissue Culture its Fundamental, Application and Relationship to Medicinal Plant Studies*. *Lloydia*. Vol 28 (1).

CHRISTIE, W. W. (1989). *Gas chromatography and lipids. A practical guide*. The oil press. Ayr, Scotland.

CHRISTIE, W.W. (1993). Preparation of lipid extracts from tissues. In: Christie, W.W. Editor. 1993. *Advances in Lipid Methodology—Two* Oily Press, Dundee, pp. 195–213.

CHRISTIE, W. W. (1999). The analysis of evening primrose oil. *Industrial Crops and Products*. Vol. 10 Issue 2. 73-83.

CISOWSKI, W., ZIELINSKA-STASIEK, M., LUCZKIEWICZ, M. Y STOLYHWO, A. (1993). Fatty acids and triacylglycerols of developing evening primrose (*Oenothera biennis*) seeds. *Fitoterapia* Vol. LXIV N°2 155-162.

CISOWSKI, W., ZIELINSKA-STASIEK, M., LUCZKIEWICZ, M. Y STOLYHWO, A. (1993). Fatty acids and triacylglycerols of developing evening

CORDELL, G. A. (2000). Biodiversity and drugs discovery: a symbiotic relationship. Review. *Phytochemistry*. 55.

CORREA, M. A. (1988). Flora Patagónica Parte V Tomo VIII. Colección Científica. INTA.

COURT, W. A., HENDEL, J. G. Y POCS, R. (1993). Determination of the fatty acids and oil contents of Evening Primrose (*Oenothera biennis* L.). *Food Research International* 26(3):181-186.

COX, P.A., BALICK, M. J. (1994) The Ethnobotanical Approach to Drug Discovery. *Scientific American*, June 1994.

COX, P. A. (2000). Will tribal knowledge survive the millennium?. *Science* 287.

CRAG, G., SIMON, J., JATO, J, SNADER, K. (1996). Drug discovery and development at the National Cancer Institute: Potential for new pharmaceutical crops. p. 554-560. In: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*. ASHS Press, Arlington, VA.

CUSIDO, R., PALAZÓN, J., NAVIA OSORIO, A., MALLOL, A., BONFILL, M., MORALES, C., PIÑOL, M. (1999). Production of Taxol® and baccatin III by selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture. *Plant Science* Vol. 146, 2 pp.101-107.

CYTED. (1996). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. Subprograma Química Fina Farmacéutica. Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos (RIPROFITO). 1º Reunión de Coordinación Internacional sep.-oct. 1996.

D'AMBROGGIO DE ARGUESO, A. (1986). Manual de técnicas en la histología vegetal. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires.

DE KLERK, G. J., ARNHOLD-SCHMITH, B, LIEBEREI, R., NEUMANN, K. H. (1997). Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biologia Plantarum* 39 (1):53-66.

DE LA CRUZ, J. P., QUINTERO, L., GALVEZB, M. A., VILLALOBOS, C., SÁNCHEZ DE LA CUESTA, F. (1999). Antioxidant potential of evening primrose oil administration in hyperlipemic rabbits. *Life Sciences*. June 65(5): 543-555. {a}.

DE LUCCA M., ZALLES, S. (1992) *Oenothera multicaulis*. En: Flora medicinal boliviana. Diccionario enciclopédico. 1º Edición. Editorial Los amigos del libro. La Paz. Bolivia.

DEREK, J. (1994). *Seeds Physiology of Development and Germination*. 2º Edition.

DEWICK, P. (1997). *Medicinal Natural Products*. John Wiley & Sons. UK.

DIETRICH, W. (1977). The South American Species of *Oenothera* Sect. *Oenothera* (*Raimannia*, *Renneria*; Onagraceae). *Annals of Missouri Botanical Garden* 64: 425-62. pp.524.

DIETRICH, W, RAVEN, P., WAGNER, W. (1985). Revision of *Oenothera* sect. *Oenothera*. Subsect. *Emersonia* (Onagraceae). *Systematic Botany*. 10 (1) pp. 29-48.

DIRECTIVA 2004/24/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y EL CONSEJO. (2004). *Revista de Fitoterapia* 4(1) 79-85.

DOMENECH, S. (1998). El chamanismo en la cultura indígena sudamericana. En *Fitociencia* N° 4. nov. 1998.

ENSMINGER, P., HIROSHI IKUMA. (1987). Photoinduced seed germination of *Oenothera biennis* L. (I) *Plant Physiology* 85 879- 884. 85 885-891.

ENSMINGER, P. A., IKUMA, H. (1988). Photoinduced seed germination of *Oenothera biennis* L.: III. Analysis of the postinduction period by means of temperature. *Plant Physiology* 86(2): 475-481.

ESAU, K. (1965). *Plant anatomy*. 2º ed. Willey.

ESAU, K. (1977) *Anatomía de las plantas con semillas*. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires.

EYDE, R. H. (1982). Reproductive structures and evolution in *Ludwigia* (Onagraceae). II Fruit and seed. *Annals Missouri Botanical Garden*. 65:656-675.

FAHN, A. (1974). *Anatomía Vegetal*. H. Blume. Madrid. España.

FAN, Y.Y., CHAPKIN, R.S. (1998). Importance of dietary γ -linolenic acid in human health and nutrition?. *Journal of Nutrition* . 128, pp. 1411–1414.

FARNSWORTH, N. H., SOEJARTO, D. D. (1988). Potential consequence of plant extinction in the Unites States on the current and future availability of prescription drugs. *Economic Botany* 39 (3) 231-240.

FIELDSEND, A., MORINSON, J. (2000). Climatic conditions during seeds growth. Significantly influence oil content and quality in winter and spring evening primrose crops (*Oenothera* spp.). *Industrial Crops and Products*. Vol:2 137-147.

FIELDSEND, A., MORINSON, J. (2000). Contrasting growth and dry matter partitioning in winter and spring evening primrose crops (*Oenothera* spp.). *Field Crops Research*.

FITOTERAPIA. (1998). *Vademécum de Prescripción. Plantas Medicinales*. 3º Edición Masson S. A. Barcelona. España.

FOLCH, J., LEES, G., SLOANE-STANLEY, A. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal Biological Chemistry* 226 pp. 497-509.

FRAQUEMONT, C., FRAQUEMONT, E. (1990). *Oenothera multicaulis*. En: The ethnobotanical of Cinchero an Andean Community in southern Peru. *Fieldiana Botany* 24: 87.

FREIRE, S., URTUBEY, E. (1999 y 2000) Compuestas Medicinales de la Provincia Biogeográfica Pampeana: claves para su determinación e iconografías Parte I, II, III, IV y V. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 18; 18; 19; 19; 19.

FONT QUER. P. (1970). *Diccionario de Botánica*. Editorial Labor S A.

GARCIA BARRIGA, H. (1975). *Oenothera multicaulis*. En: *Flora Medicinal de Colombia* 1º Ed. Tomo II P. 323. Bogotá.

GARCIA OLMEDO, F. (1998). *La tercera revolución verde*. Editorial Debate S.A. Madrid. España.

GATTUSO, M., GATTUSO, S. (1999) *Manual de procedimientos para análisis de drogas en polvo*. UNL Editora. Argentina.

GENEFLOW. (2002). *Glosario*. IPGRI. FAO.

GIRAULT, L. (1987). *Oenothera multicaulis*. En: *Kalawaya curanderos itinerantes de los Andes*. 1º Ed. Servicio Gráfico Quipus. Bolivia.

GOLA, G., NEGRI G., CAPPELLETTI. (1961). *Tratado de Botánica*. Segunda edición. pp. 948. Editorial Labor S.A. Madrid.

GUPTA, M. P., CEDEÑO, J. E. , SOTO A. A., CORREA, M. A. (1986). Seasonal variation in the alcaloidal content of Panamanian ipecac. *Fitoterapia* 57 (3) 147- 151.

HARE, P., VAN STADEN, J. (1994). Inhibitory effect of Thidiazuron on the activity of cytokinin oxidase isolated from soybean callus. *Plant Cell Physiology* 35(8) 1121-1125.

HARTMANN, H., KESTER, D. (1997). Propagación de plantas. Compañía Editorial Continental. México.

HEULER, B., YANIV Z., RAVINA I. (2002) Effect of late salinization of chia (*Sanvia hispanica*), stock (*Matthiola tricuspidata*) and evening primrose (*Oenothera biennis*) on their oil content and quality. *Industrial Crops and Products*. Vol. 15, (2) 163-167.

HIERONYMUS, J. (1882). *Plantae diaphoricae florum argentiniae*. Boletín de la Academia Nacional de Ciencias de Córdoba 4(3-4) 199-598.

HOCH, P.; CRISCI, J.; HIROSHI, T. Y., BERRY, P. (1993). A Cladistic Analysis of the Plant Family *Onagraceae*. *Systematic Botany* 18(1):pp 31-47.

HUANG, Y.S., MILLS, D.E. (EDS.), (1995). Linolenic Acid. Metabolism and its Roles in Nutrition and Medicine. AOCS Press, Champaign, IL, USA.

HUDSON, B. J. F. (1984). Evening primrose (*Oenothera* sp.) oil and seed. *Journal American Oil Chemistry Society*. 61 pp. 540-543.

HULAN, H. W., HALL, I. V., NASH, D. M. AND PROUDFOOT, F.G. (1987). Composition of native evening primrose seeds collected from Western Nova Scotia. *Crop Res. (Hortic. Res.)* 27, pp. 1-9.

ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. (1976). International rules for seed testing. *Seed Science Technology*. 4:114-77.

IZZO, R. Y MURATORE, G. (1997). Growth and nutrient efficiency in *Oenothera biennis* plants. *Agrochimica* 41:3-4 pp. 109-119.

JESID, H., BERNAJ, M. Y CORREA, J. E. (1998). Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. 8.Tomo XII. Ministerio de Educación y Ciencia. España. Corporación Andina de Fomento CAF. Bogotá. Colombia.

JOHANSEN, D. A. (1940). *Plant Microtechnique*. 1ªEd. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York.

JOHNSON, A. M., WHITWELL, T. (1997). Species for wild flowers seeds production. Department of Horticulture. Clemson University.

KINGHORN, A.D. (2001). Pharmacognosy in the 21th century. Review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Nº 53.

KNORR, R., HAMBURGER, M. (2004). Quantitative analysis of anti-inflammatory and radical scavenging triterpenoid esters in evening primrose oil. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 2004 Jun 2;52(11):3319-24.

KROMER, M. AND. GROSS, K. L. (1987). Seed mass, genotype, and density effects on growth and yield of *Oenothera biennis* L. *Oecologia* 73(2): 207-212.

KRZYZANIAK, M. Y SEGIET-KUJABA, E. (1991). Determination of gamma-linolenic acid in *Oenothera biennis* L.. *Herba Polonica* 37 (2) 57-62.

KUCHUK, N., HERRMANN, R. G. and KOOP, H. V. (1998). Plant regeneration from leaf protoplasts of evening primrose (*Oenothera hookeri*). *Plant Cell Report* 17: 601-604.

LAHITTE H. B., HURRELL, J. A. (1998). *Plantas Medicinales Rioplatenses*. L.O.L.A. Literature of Latin America pp. 120.

LAIRD, S. A., PIERCE, A. R. (2002) Promoting sustainable and ethical botanicals: strategies to improve commercial raw material sourcing. Rainforest Alliance, New York.

LE BOZEC, A. (1988). "La onagra". Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. España.

LECLERC, H. (1967). L' Onagre (*Oenothera biennis* L.). Plante antiphlogistique et sédative. Acta Phytoterapica. 14 (10) 183-189.

LETCAMO, W., XU, H. L., DESLOCHE B., GOSSELIN A. (1993). Effect of nutrient solution concentration on Photosynthesis, growth, and content of the active substances of Passionfruit. Journal of Plant Nutrition, 16 (12) 2521-25-37.

LEVY, A., PALEVITCH, D., RANEN, C. (2000). Increasing gamma linolénico acid in evening primrose grown under hot temperatures by breeding early cultivars. Acta Horticulturae 330. Conference 4.

LEVIEILLE, G., WILSON, M. (2002). In vitro propagation and iridoid analysis of the medicinal species *Harpagophytum procumbens* and *H. Zeyheri* in Cell Biology and Morphogenesis. Springer-Verlag.

LLOYD, G. AND MC'COWN, B. (1980). Commercially feasible micropropagación of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture Intl. Plant Prop. Soc. Proc. 30: 421-427.

MACBRIDE, N. (1941). *Oenothera multicaulis* en: Flora of Peru. Field Mus. Nat. His. Bot. 13(1) 538-539.

MARTINEZ, J. V. (1996). El cultivo de plantas medicinales: Una visión general de Guatemala. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. 1º Reunión de Coordinación Internacional. Antigua Guatemala. sep-oct. 1996.

MARTINEZ, I., DEHALAC, N. (1998). Callus induction in culture of *Oenothera hookeri* and *Oenothera picensis* anthers. *Biologia Plantarum* 40:1 11-16.

MARTINO, V., RONDINA, R. (1998). en *Farmacobotánica y Farmacognosia en Argentina 1980-1998*. Versión en CD.

MARZOCA, A. (1993). *Vademécum de Malezas Medicinales de la Argentina. Indígenas y Exóticas*. Orientación Gráfica Editora. Buenos Aires. Argentina.

MATILLA, A. (2000). Germinación y Dormición de semillas. Cap. 27. pp.435-449 En: AZCON-BIETO, J., TALÓN, M. 2000. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Edicions Universitat de Barcelona. Mc Graw-Hill. Interamericana. España.

MECKES, M., DAVID-RIVERA, A. D., NAVA-AGUILAR, V., JIMÉNEZ, A. (2004). Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine*. Vol. 11 5 446-451.

MEHRA-PALTA, H. U., KOOP, S., GOES, E. M., TROIDL, G., NAGY, S. TYAGI, W., KOFER, R. G. Y HERRMANN. (1998). Tissue culture of wild-type interspecific genome/plastome hybrids and plastome mutants of evening primrose (*Oenothera*): controlled morfogenesis and transformation. *Plant Cell Report*. 17:605-611.

MENDOZA DE GYVES, E., SPARK, A., FIELDENSEN, A. F., JONES, H. D. LAZZERI, P. A. (2001). High frequency of adventitious shoots regeneration from commercial cultivars of evening primrose (*Oenothera* spp), using thidiazuron. *Annals of Applied Biology*. 138 (3) 328-332.

MENDOZA DE GYVES, E., SPARK, A., SAYANOVA, O., LAZZERI, P., NAPIER, J. A., JONES, H.D. (2004). Genetic manipulation of γ -linolenic acid (GLA) synthesis in a commercial variety of evening primrose (*Oenothera* sp). *Plant Biotechnology Journal* 2(4) 351-357.

METCALFE C. R., CHALK, K. L. (1957). Anatomy of the dicotyledons. Vol. 1. pp.724. Claredon Press. Oxford.

METCALFE C. R., CHALK, K. L. (1988). Anatomy of the dicotyledons. Vol. 1. Second Edition. pp.172. Claredon Press. Oxford.

MIYAMOTO, K. (1993). Antitumor activity of oenotheina B, a unique macrocyclic allagitannin. Japan Journal of Cancer Research. Jan 84 (1):99-103.

MOHR, H., SCHOPFER, P. (1995). Encyclopedic of Plant Physiology. Cap 24 p 409-422. Springer Verlag.

MORRINSON, W. R., SMITH L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethyacetals from lipids with boron fluoride methanol. Journal Lipids Research 5 600-608.

MORRISON, K. D. AND. REEKIE, E. G. (1995). Pattern of defoliation and its effect on photosynthetic capacity in *Oenothera biennis*. Journal of Ecology 83(5): 759-767.

MUNZ, P .A. (1932). Las Onagraceas de la Argentina. Physis, 11: 267-292.

MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

MURCH, S., DHIREN SARMA, SONOESWAR SARMA AND ANJANA BARUAH. (2000). Micropropagation and *in vitro* flowering of *Rauwolfia tetraphylla*; a potent source of anti-hypertension drug. Planta Medica 65: 277-278.

MURILLO, N. (1889). Plantas medicinales du Chili. Paris

MURPHY, C.L., MCKENNEY, C. B., AULD D., HOPPER, N. (2004). Field production of Texas native evening primrose (*Oenothera* spp) as a source of gamma linolénico acid. *Acta Horticulturae* 629 pp. 576.

NAJERA, M. T., SPEGAZZINI, E. D. (1984). Datos Farmacobotánicos de las especies conocidas como "paico" en la Medicina Popular Argentina. *Revista Farmacéutica*. 126 (5-8). 7-14.

NAJERA, M. T., SPEGAZZINI, E. D. (1985). Etnofarmacobotánica de los "ajenjos" de la medicina popular argentina. Datos morfológicos para su reconocimiento. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. 3 (2) 153-60.

NATALUCCI DE DEMOLIS, C. Y CAFFINI N. (1980). Carotenoides de origen floral de plantas argentinas. Parte II. *Phyton* 39 (1-2). 94-98.

NATALUCCI C. (1982). Análisis del contenido de carotenoides Florales de 8 plantas que crecen en la provincia de Buenos Aires (Argentina). *Acta Farmacéutica Bonaerense* 1 (1): 13-21.

NEMETH E. (2002). Changes of germination ability of some fatty oil containing medicinal plant seeds during storage in genebank. *ISHS Acta Horticulturae* 576. abril 2002. Editores Bernarth J., Zamborine E., Nemeth L., Cracker L., Kock, O..

NORMA PARA BANCOS DE GENES. IPGRI/FAO.(1994). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma.

NÚÑEZ, C., CANTERO, J. J. (2000). Las plantas medicinales del sur de la provincia de Córdoba. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto.

OCAMPO, R., VILLALOBOS, R. (1994). Experiencias Técnicas sobre Domesticación de Plantas Medicinales en Centroamérica. Informe técnico N° 245. Documentos del CATIE, Turrialba. Costa Rica.

OCAMPO, R. VILLALOBOS, R. (1997). Pautas para la domesticación de plantas medicinales tropicales. En II Congreso Mundial de Plantas Aromáticas y Medicinales para el Bienestar de la Humanidad Mendoza. Argentina.

ODI, P. (1993). Las Plantas Medicinales. Javier Vergara Editores S .A. Buenos Aires.

OKUDA, T. (1989). Ellagitanins as active constituents of medicinal plants *Planta Medica*. Apr. 55(2):117-22.

PALAZÓN, J., BONFILL, M., CUSIDÓ, R., PIÑOL, M., MORALES, C. (1995). Effects of auxin and Phenobarbital on Morphogenesis and Production of Digitoxin in *Digitalis* Callus. *Plant Cell Physiology* 36(2): 247-252.

PAAS, E., PIERCE, G. (2002). Evening primrose oil. National Center for Agri-Food Research Medicine. Canadá.

PIÑOL, N., PALAZÓN, J., BONFILL, M., CUSIDÓ, R., M., MORALES, C. (1999). Introducción al metabolismo secundario. En: Azcón Bieto. 1999. Cap XVII. Pp.261

PAVINGEROVA, D., GALIS, I. (1996). Tissue culture and transformation of *Oenothera biennis*. *Biologia Plantarum*. 38(1): 27-32.

PEIRETTI, P. G., PALMEGIANO, G. B., MASOERO, G. (2004). Chemical composition, organic matter digestibility and fatty acid content of evening primrose (*Oenothera paradoxa*) during its growth cycle. *Animal Feed Science and Technology* 116 (3-4) 293-299.

PEREZ-ALBELAEZ, E. (1975). *Oenothera multicaulis*. Plantas medicinales y venenosas de Colombia. 1º Ed. Hernando Salazar Editor Colombia p. 217-218.

PERROTTA, J. A. (2003). Conservation and sustainable use of Medicinal Plant Resources. World Ayurveda Congress.

PIETSCH, G.M., CARLSON, W. H., HEINS, R. D., FAUST, J. E. (1995). The effect of day and night temperature and irradiance on development of *Catharantus roseus* (L.) "Grap Cooler". Journal American Society of Horticulture Science 120 (5) 877-881.

PIÑEIRO, C. J., GARCIA-BARRIGA, H. (1991). *Oenothera multicaulis*. En Plantas Medicinales. Compendio de Farmacología Vegetal. 1º Ed. Editorial Presencia Ltda.. Santa Fe de Bogotá. Colombia. pp. 126.

RAMACHANDRA RAO, S., RAVISHANKAR, G. A. (2002). Plant cell culture: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances. Vol. 20:2 Pp. 101-153.

RAMULU, K. S., SCHIBILLA, H., DIJKHUIS, P. (1981). Self-incompatibility system of *Oenothera organensis* for detection of genetic effects at low radiation doses. Environ Health Perspect. Jan 37 43-51.

RATERA E. Y RATERA M. (1980). Plantas de la Flora Argentina Empleadas en Medicina Popular. Ed. Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires. Argentina.

REEKIE, E. G., REEKIE, J. (1961). The effect of reproduction on canopy structure, allocation and growth in *Oenothera biennis*. Journal of Ecology. 79(4): 1061-1071.

REEKIE, E. G., PARMITER, D. ZEBIAN, K., REEKIE, J. (1997). Trade-offs between reproduction and growth influence time of reproduction in *Oenothera biennis*. Canadian Journal of Botany. 75: 11. pp 1897-1902.

REID, W.V., MEYER, C. A., GAMEZ, R., SITTFIELD, A., JANZEN, D. H., GOLLIN, M. A., JUMA, C. (1993). Biodiversity prospecting using genetic resources for sustainable development. World Resources Institute. Washington D. C.

RIVAS, M. C., ABEDINI, W. I. (2000). Clonación *in vitro* de *Oenothera sp.* XIII Congreso Nacional de Recursos Naturales Aromáticos y Medicinales. SAIPA. INTA. FCA-UNER. Crespo. Entre Ríos. Argentina. Noviembre. 2000.

ROCA, W., RAMÍREZ, H. (2000). Introducción a la Biotecnología Vegetal. CEDAF. Vicente Zapata S. Ed. Colombia.

RONDINA, R. V. D., BANDONI, A. L., COUSSIO, J. D. (2002). Plantas Silvestres Argentinas con reconocidas propiedades medicinales o tóxicas. CYTED (Ciencia y Tecnología para el desarrollo. OEA Organización de Estados Americanos ISBM 987-43-6073-9. Versión CD ROM.

ROY, R.C., WHITE, P. H., MORE, A. F., HENDEL, J. G.; POCS, R. Y COURT, W. A. (1993). Effect of transplanting date on the fatty acid composition, oil content and yield of *Evening primrose (Oenothera biennis L.)* seed. Canadian Journal of Plant Science 74(1):129-131.

SALISBURY, E. J. (1927). On the causes and ecological significance of stomatal frequency with special reference to the woodland flora. Phil. Trans. Roy Soc. London, 216 B:1-65.

SARMA DHIREN, S., SONESWAR, S., AND ANJANA BARUAH. (1999). Micropropagation and *in vitro* flowering of *Rauvolfia tetraphylla*; a potent source of anti-hypertension drugs. Planta Medica. 65: 277-278.

SASSON, A. (1989). Biotechnologies and Developing Countries: Present and Future. Pp. 23-46. In Sasson, A. and Constarini N.. Proceeding of an International Symposium CTA/FAO. Luxemburg.

SAULNIER, T. P., REEKIE, E. G. (1995). Effects of reproduction on nitrogen allocation and carbon gain in *Oenothera affinis*. Journal Ecology. 83: 23-29.

SHOKO TANIGUCHI, NOBUHIKO NAKAMURA, MIDORI NOSE, SHINHO TAKADA, RYOKO YABU-UCHI, HIDEYUKI ITO, TAKASHI YOSHIDA Y

KAZUFUMIYAZAKI. (1998). Production of macrocyclic ellagitannin oligomers by *Oenothera lacinata* callus culture. *Phytochemistry*. Vol. 48 6. Pp. 981-985.

SHUKLA, Y.N., ANISL SRIVASTAVA, SUNILKUMAR A. (1999). Phytotoxic and antimicrobial constituents of *Argyrea speciosa* and *Oenothera biennis*. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 67:2 pp 241-245.

SRIVASTAVA, A., SHUKLA, Y. N. (1998). Chemistry and pharmacology of the evening-primrose *Oenothera biennis* and related species: A review. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 20(2): 432-440.

STRALEY, G. B. (1977). Systematic of *Oenothera* sect. *Kneiffia* (Onagraceae). *Annals of Missouri Botanical Garden*. 64: 381-424.

SUDHERSAN C., M. ABOEL-NIL. HUSSAIN, J. (2003). Tissue culture technology for the conservation and propagation of certain native plants*1 *Journal of Arid Environments*. Volume 54, 1, pp. 133-147.

TANIGUCHI, S., NAKAMURA, N., NOSE, M.; TAKEDA, S., YABU-UCHI, R., ITO, H., YOSHIDA, T. Y YAZAKI K. (1998). Production of macrocyclic oligomers by *Oenothera lacinata* callus culture. *Phytochemistry*. Vol. 48 6. Pp 981-985.

TOBE, H., , WAGNER, W. L., HUI-CHEN CHIN. (1987). A systematic and evolutionary study of *Oenothera* (Onagraceae): Seed coat anatomy. *Botanical Gazette*. 148(2): 235-257.

TOTH, E., NEMETH, E. (2002). Changes of germination ability of some fatty oil containing medicinal plant seeds during storage in genebank. *ISHS Acta Horticulturae* 576. abril 2002. Editores Bernarth J., Zamborine E., Nemeth L., Cracker L., Kock, O.

TOURSARKISSIAN, M. (1980). Plantas medicinales de Argentina. Primera Edición Ed. Hemisferio Sur.

TWORKOWSKI, J., SZCZUKOUSKI, S. KUIATKOUSKI, J. (1997). Conditionary and cooling of evening primrose (*Oenothera paradoxa* Hudziok) seeds, and their value and yield of the succeeding generation Biuletyn Instytutu Hodouli i Aklimatyzacji Roslin N°201 219-223.

VAN DAM et al (1995). En: Verpoorte, R. (2004). Curso de postgrado. Bioprospecting: Biodiversity as source for finding leads for development. CEPROCOR. Córdoba. Noviembre 2004.

VANEK, T., MALÁ, J., SAMAN, D, SILHAVA, I. (1999). Production of Taxanes in Bioreactor by *Taxus baccata* cells. *Planta Medica*. 65: 275-277.

VERETTONI, H. N. (1985). Contribución al conocimiento de las plantas medicinales de la región de Bahía Blanca. pp. 374. Harris y C.I.A. Argentina.

VERPOOTE, R, VANDER HEIJDEN, R., TEN HOOPEN H .J. G. (1998). Metabolic engineering for improvement of plant secondary metabolic production. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. IX International Congress on Plant Tissue and Cell Culture Vol. 4 N°1. Jerusalem, Israel. Jun 14-19.

VERPOORTE, R. (2000). Pharmacognosy in the New Millennium: Leadfinding and Biotechnology. *Journal Pharm. Pharmacology*. 52 pp.: 253-262.

VERPOORTE, R. (2004). Curso de postgrado. Bioprospecting: Biodiversity as source for finding leads for development. CEPROCOR. Córdoba. Noviembre 2004.

VOGEL H. (1999). El Mejoramiento Genético de las Plantas Medicinales. Primer Simposio Internacional y Tercero Nacional de Platas Medicinales y Aromáticas. Palmira. Colombia.

VOLPONI, C. R. (1985). Caryophyllaceae utilizadas en Medicina Popular Argentina. *Revisiones. Acta Farmacéutica Bonaerense*. Vol. 4 N°2 p.135-141.

WAGNER, W. L. (1986). New taxa of the genus *Oenothera* (Onagraceae). *Annals of Missouri Botanical Garden*. 73:475-480.

WANG, Z., ACOCK, M. C., LIU, Q., ACOCK, B. (1999). Growth, opium gum yield, and photoperiod response of five opium poppy accessions. *HortScience* 34 (6): 1060-1063.

WATSON, L., DALLWITZ, M. J. (1992). *The Families of Flowering Plants 1999*.

WILKINSON, H. P. (1988). The plant surface (Mainly leaf). Part V The cuticle en: *Anatomy of the Dicotyledons* (C.R. Metcalfe 6 L. Chalk) 1: 140-58, Clarendon Press, Oxford.

WHITE, P. R. (1934). Potentially unlimited growth of excited tomato root tips in liquid medium. *Plant Physiology*. 9 pp. 585-600.

WITHMAN, C., HEINS, R., CAMERON, A., CARLSON, W. (1996). Cold treatments, photoperiod and forcing temperature influence flowering of *Lavandula angustifolia*. *Hort Science* 31 (7): 1150-1153.

XIFREDA, C. (1992). Plantas útiles de la flora de la provincia de Buenos Aires. Pp. 40. Situación ambiental de la Provincia de Buenos Aires A. Recursos y rasgos naturales en la evolución ambiental. Año II Nro.10 1992. C.I.C. Provincia de Buenos Aires.

YANIV, Z, PERL M. (1987). The effect of temperature on the fatty acid composition of evening primrose (*Oenothera*) seeds during their development, storage and germination. *ISHS. Acta Horticulturae* 215. Seed Research in Horticulture. Nº 30 Vol. I. Alemania.

YING-YIN YUAN, CHU-LI, ZONG-DING-HU, JIN-CHUAN WU AND AN-PING ZENG. (2002). Fungal elicitor-induced cell apoptosis in suspension culture of *Taxus chinensis* var. *mairei* for taxol production. *Process in Biotechnology*. Vol. 38-2 pp 193-198.

YOSHIDA, T., CHOU, T., OKUDA, T., SHIMGU, T. (1995). Oenotheins D, F and G, hydrolysable tannins dimers from *Oenothera lacinata*. *Phytochemistry*. 21.431.

ZORNING, H., WEISS, G. (1925). Beiträge Zur. Anatomie des Laubblattes offzineller und pharmäzeutisch gebräuchlicher. Compositen- Drogen. *Arch. Pharm. Berl.* 263: 451-470.

Base de datos consultada

Dictionary of Natural Products.

MEDLINE.

Natural Products Alert (NAPRALERT).

Rondina R. V. D., Bandoni, A. L., Cousio, J. D. 1998

Plantas medicinales y tóxicas argentinas (UBA. CONICET). Buenos Aires.