



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

CARACTERIZACIÓN SEMINAL, MULTIPLICACIÓN Y DESARROLLO DE *Oenothera rosea* L. 'Hér. ex Ait. EN INVERNADERO Y COMPARACIÓN DE SU COMPOSICIÓN QUÍMICA PARCIAL CON PLANTAS *IN SITU*

IRMA ROMERO SÁNCHEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe, **Irma Romero Sánchez** alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección de la profesora **Dra. Cecilia Beatriz Peña Valdivia**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "**Caracterización seminal, multiplicación y desarrollo de *Oenothera rosea* L. 'Hér. ex Ait. en invernadero y comparación de su composición química parcial con plantas *in situ*'**" y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 4 de junio de 2019.

Irma Romero Sánchez

Vo.Bo.

Dra. Cecilia Beatriz Peña Valdivia

La presente tesis titulada: **Caracterización seminal, multiplicación y desarrollo de *Oenothera rosea* L. 'Hér. ex Ait. en invernadero y comparación de su composición química parcial con plantas *in situ***, realizada por la alumna: Irma Romero Sánchez bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



Dra. Cecilia Beatriz Peña Valdivia

ASESORA



Dra. Gisela Aguilar Benítez

ASESOR



MC Antonio García Esteva

Montecillo, Texcoco, Estado de México, junio de 2019.

CARACTERIZACIÓN SEMINAL, MULTIPLICACIÓN Y DESARROLLO DE
Oenothera rosea L. 'Hér. ex Ait. EN INVERNADERO Y COMPARACIÓN DE SU
COMPOSICIÓN QUÍMICA PARCIAL CON PLANTAS *IN SITU*

Irma Romero Sánchez. M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue recolectar semillas silvestres de *Oenothera rosea* L. 'Hér. ex Ait para determinar germinación, emergencia de plántulas y desarrollo de plantas, en condiciones protegidas, hasta la etapa reproductiva y evaluación de la presencia de los grupos de metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos, saponinas y terpenos en hojas y tallos de las plantas de invernadero y recolectados en *in situ*. La hipótesis fue que las semillas muestran variabilidad amplia en su tamaño, latencia alta y emergencia asincrónica de plántulas y que las plantas cultivadas en invernadero contrastan entre poblaciones, pero contienen los mismos grupos de metabolitos secundarios que las plantas *in situ*. Las recolectas de cápsulas, hojas y tallos se hizo en cuatro poblaciones en los alrededores de Barrio San Pedro, Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). El diseño experimental fue en bloques al azar, con número variable de repeticiones. Las características de las semillas, de la germinación y del crecimiento de las plantas se analizaron con ANDEVA y compararon con la prueba de Tukey. La presencia de metabolitos secundarios se analizó con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. La biomasa seminal promedio varió entre 0.0027 y 0.0091 g. La latencia varió ($P \leq 0.05$) entre 20 y 80 % en las semillas chicas y entre 10 y 40 % en las grandes. Las plantas de semilla grande mostraron altura del tallo (hasta 35 %), número de yemas florales (60 %) y de cápsulas maduras (el doble) y longitud de la raíz (27.2 %) mayores en la cosecha (110 días después de la siembra), respecto a las de semillas chicas. En contraste el diámetro del tallo y la anchura, la longitud o el número promedio de las hojas durante el crecimiento o en la cosecha fueron independientes del tamaño de la semilla. Los extractos con acetato de etilo mostraron presencia leve de terpenos y

no presentaron diferencias entre hojas y tallos *in situ* e invernadero. Los extractos de etanol mostraron diferencia significativa ($P < 0.05$) en fenoles entre tallos *insitu* e invernadero de plantas de semilla chica y grande. Los extractos con metanol mostraron diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las plantas *in-situ* y las de invernadero en presencia de alcaloides, saponinas y terpenos. En general, el crecimiento de las plantas cultivadas en invernadero depende del tamaño de semilla original y en las plantas *in-situ* hay presencia mayor de metabolitos secundarios.

Palabras clave: crecimiento vegetativo, inflorescencias, latencia, semillas silvestres, disolventes orgánicos, metabolitos secundarios.

SEMINAL CHARACTERIZATION, MULTIPLICATION AND DEVELOPMENT OF
Oenothera rosea L. 'Hér. ex Ait. IN GREENHOUSE AND COMPARISON OF ITS
PARTIAL CHEMICAL COMPOSITION WITH PLANT *IN SITU*

Irma Romero Sánchez. M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

The objective of this study was to collect wild seeds of *Oenothera rosea* L. 'Her. ex Ait to determine germination, seedlings emergence and plant development, in greenhouse, up to the reproductive stage and to evaluate the presence of secondary metabolites groups: alkaloids, flavonoids, phenols, tannins, saponins and terpenes in leaves and stems collected *in situ* and those of plants growing in greenhouse. The hypothesis was that seeds show wide variability in their size, high latency and asynchronous emergence of seedlings and that plants grown in the greenhouse contrast between populations, but contain the same secondary metabolite groups as those *in situ*. Capsules, leaves and stems were harvested in four wild populations around Barrio San Pedro, Tepepa, Municipality of Tlaquilpa, Veracruz (18° 36'29" N, 97° 07' W and 2434 m altitude). Experimental design was in random blocks, with variable number of repetitions, the germination and the growth of the plants The characteristics of the were analyzed with ANDEVA and compared with the Tukey test. The presence of secondary metabolites was analyzed with the nonparametric Mann-Whitney test. The average seminal biomass varied between 0.0027 and 0.0091 g. Latency varied ($P \leq 0.05$) between 20 and 80 % in small seeds and between 10 and 40 % in large seeds. Large-seeded plants showed stem height (up to 35 %), number of flower buds (60 %) and mature capsules (twice as much) and root length (27.2 %) higher at harvest (110 days after harvest) in comparison with those of small-seeded plants. In contrast, the diameter of the stem and the width, length or average number of leaves during growth or harvest were independent of the seed size. The extracts with ethyl acetate showed a slight presence of terpenes and did not present differences between leaves and stems *in situ* and greenhouse. The ethanol extracts showed significant difference ($P < 0.05$) in phenols between *in*

situ stems and greenhouse of small and large seed plants. The methanol extracts showed a significant difference ($P < 0.05$) between *in situ* and greenhouse plants in the presence of alkaloids, saponins and terpenes. In general, the growth of plants grown in the greenhouse depends on the size of the original seed and in the in-situ plants there is a greater presence of secondary metabolites.

Key words: vegetative growth, inflorescences, dormancy, wild seeds, organic solvents, floral buds, secondary metabolites.

A la memoria de mi Padre y Marianita, hermana querida, que con tu guía y dedicación fortaleciste mi espíritu para alcanzar mis metas.

Con amor para mi Mamita, Nacho, Euly, Jovita y los pequeños que alegran mi vida; Kelly, Joshua, Leónidas y Liam.

Para Armando, mi compañero de viaje.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a Dios padre celestial, fuente de inspiración y proveedor del don de la sabiduría, quien ilumina mi sendero y bendice cada día de mi existencia sosteniéndome en los momentos de dificultad y debilidad.

Al pueblo de México que pagan impuestos y quienes a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) me brindaron el apoyo financiero para realizar mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados, por la formación académica a través del Posgrado de Botánica.

A la Dra. Cecilia Peña Valdivia por la dirección de este tema de investigación, gracias por todo su apoyo incondicional, disposición de tiempo, por sus grandes enseñanzas, por su paciencia y comprensión durante todo este trayecto.

Al MC Antonio García Esteva, mi profundo agradecimiento por orientarme en cada etapa de este proyecto, pero sobre todo por el apoyo incondicional que tuvo conmigo a lo largo de la maestría.

A la Dra. Gisela Aguilar Benítez por los conocimientos aportados y su calidez humana.

Al Dr. Carlos Trejo López quien con sus asesorías contribuyo en mi aprendizaje.

A todos los miembros de Botánica, gracias por permitirme ser parte de esta comunidad y contribuir en mi formación.

A mi Madre, por la paciencia y el gran amor que me da, por sus cuidados en el tiempo que hemos vivido juntas y estar siempre conmigo en todo momento, Gracias mama por estar pendiente durante esta etapa y por creer en mí.

A ti hermanito por estar siempre en los momentos importantes de mi vida, por ser mi gran apoyo y ejemplo para salir adelante a través de tus consejos que han sido de gran ayuda para mi crecimiento personal y profesional.

A mis hermanas Euly y Jovita gracias por ser mis amigas y confidentes, por brindarme su cariño y consentirme cuando me enfermo.

De todo corazón a ese hombre especial a quien amo mucho, Armando, que con su valor y entrega ha sido una persona incondicional en mi vida y mi soporte emocional.

Un agradecimiento especial para los del coro “canto nuevo” quienes hicieron más placentera mi estancia y sentirme como en familia en mi etapa de posgrado un trayecto de vivencias que nunca olvidaré.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE CUADROS.....	xviii
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
REVISION DE LITERATURA	5
Origen de <i>Oenothera rosea</i> L. ´Hér. ex Ait.	5
Clasificación taxonómica	5
Generalidades morfológicas	6
Metabolitos secundarios y su efecto.....	7
Literatura citada	8
CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN SEMINAL, CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE <i>Oenothera rosea</i> L. ´Hér. ex Ait. EN INVERNADERO.....	10
1.1 RESUMEN	10
1.2 ABSTRACT.....	11
1.3 INTRODUCCIÓN.....	12
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
1.4.1 Sitio experimental	16
1.4.2 Material biológico.....	16
1.4.3 Medición de las características físicas de la semilla	16
1.4.4 Determinación de la germinación de las semillas.....	16
1.4.5 Determinación de la emergencia de las plántulas.....	17
1.4.6 Determinación del crecimiento y desarrollo de las plantas	17
1.4.7 Diseño experimental y análisis estadístico.....	18
1.5 RESULTADOS.....	19
1.5.1 Características físicas de las semillas	19
1.5.2 Germinación de semillas	21
1.5.3 Emergencia de las plántulas	23

1.5.4 Crecimiento de las plantas en invernadero	25
1.5.4.1 Altura	25
1.5.4.2 Diámetro del tallo	27
1.5.4.3 Anchura de la hoja	28
1.5.4.4 Longitud de la hoja.....	30
1.5.4.5 Número de hoja por planta	31
1.5.4.6 Otros componentes del rendimiento	32
1.6 DISCUSIÓN	37
1.7 CONCLUSIONES.....	42
1.8 LITERATURA CITADA.....	43
CAPÍTULO II. METABOLITOS SECUNDARIOS EN HOJAS Y TALLO DE	
<i>Oenothera rosea</i> L. 'Hér. ex Ait.....	47
2.1 RESUMEN	47
2.2 ABSTRACT.....	48
4.3 INTRODUCCIÓN.....	49
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
4.4.1 Localización del sitio experimental	55
4.4.2 Tejido vegetal.....	55
4.4.3 Obtención de extractos	56
4.4.4 Análisis de los grupos de metabolitos secundarios	56
4.4.5 Diseño experimental y análisis estadístico	57
4.5 RESULTADOS	58
4.5.1 Composición de los extractos de acetato de etilo.....	58
4.5.2 Composición de los extractos de etanol	59
4.5.3 Composición de los extractos de metanol.....	62
4.6 DISCUSIÓN	65
4.7 CONCLUSIONES	69
4.8 LITERATURA CITADA.....	70
5 DISCUSIÓN GENERAL.....	75
6 CONCLUSIONES GENERALES	78

6.1 LITERATURA CITADA..... 79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1. Semillas de *Oenothera rosea* recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud)..... 19
- Figura 1.2. Características físicas (A) y dimensiones (B) de semillas de *Oenothera rosea* recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud)..... 20
- Figura 1.3. Biomasa de las semillas, separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, en chicas y grandes, de cuatro plantas (muestras) de *Oenothera rosea* recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz Entre los paralelos 18° 34' y 18° 39' de latitud norte; los meridianos 97° 02' y 97° 09' de longitud oeste; altitud entre 1 840 y 2 700 m. 20
- Figura 1.4. Aspecto de las plántulas de *Oenothera rosea* 4-5 días después de la germinación a 21 ± 3 °C, con fotoperiodo natural, de semillas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz entre los paralelos 18° 34' y 18° 39' de latitud norte; los meridianos 97° 02' y 97° 09' de longitud oeste; altitud entre 1 840 y 2 700 m. 21
- Figura 1.5. Estructuras de las semillas de *Oenothera rosea* después de cinco días en germinación a 21 ± 3 °C y en obscuridad. 22
- Figura 1.6. Germinación promedio acumulada a 21 ± 3 °C, en obscuridad, de las semillas chicas (A) y grandes (B), separadas a través de tamices, con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas de *Oenothera rosea* recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud); n = 10..... 23
- Figura 1.7. Aspecto de las plántulas de *Oenothera rosea* después de un día (A) y siete días (B) de su emergencia en turba y mantenidas en invernadero con riego diario, a 20.7 °C y fotoperiodo natural..... 24

Figura 1.8. Emergencia acumulada de plántulas, a partir de semillas chicas (A) y grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas de *Oenothera rosea* recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). La siembra se hizo en turba y las unidades experimentales se mantuvieron en invernadero, con riego diario, a 20.7°C y fotoperiodo natural; n = 10. 25

Figura 1.9. Plantas de *Oenothera rosea* en etapa vegetativa (A) y floración (B), después 26 y 51 días de su siembra en turba y mantenidas en invernadero, con riego diario, a 21.7 °C y fotoperiodo natural. 26

Figura 1.10. Altura del tallo de plantas de *Oenothera rosea* obtenidas de semillas chicas (A) o grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). Las plantas crecieron en invernadero, en turba, con riego diario, a 21.4 °C y fotoperiodo natural; n = 10. 27

Figura 1.11. Diámetro del tallo de plantas de *Oenothera rosea* obtenidas de semillas chicas (A) o grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). Las plantas crecieron en invernadero, en turba, con riego diario, a 21.4°C y fotoperiodo natural; n = 10. 28

Figura 1.12. Anchura promedio de las hojas de plantas de *Oenothera rosea* obtenidas de semillas chicas (A) o grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). Las plantas crecieron en invernadero, en turba, con riego diario, a 21.4 °C y fotoperiodo natural; n = 10. 29

Figura 1.13. Longitud promedio de las hojas de plantas de <i>Oenothera rosea</i> obtenidas de semillas chicas (A) o grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). Las plantas crecieron en invernadero, en turba, con riego diario, a 21.4 °C y fotoperiodo natural.....	31
Figura 1.14. Número de hojas por planta de <i>Oenothera rosea</i> obtenidas de semillas chicas (A) o grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). Las plantas crecieron en invernadero, en turba, con riego diario, a 21.4 °C y fotoperiodo natural.	32
Figura 1.15. Número de estructuras vegetativas y reproductivas de plantas de <i>Oenothera rosea</i> obtenidas de semillas chicas (A) o grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). Las plantas crecieron en invernadero, en turba, con riego diario, a 21.4 °C y fotoperiodo natural.....	34
Figura 1.16. Biomasa seca acumulada en las estructuras vegetativas, estructuras reproductivas y raíz de plantas de <i>Oenothera rosea</i> obtenidas de semillas chicas (A) o grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). Las plantas crecieron en invernadero, en turba, con riego diario, a 21.4 °C y fotoperiodo natural.....	35

Figura 1.17. Longitud de la raíz de plantas de *Oenothera rosea* obtenidas de semillas chicas (A) o grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). Las plantas crecieron en invernadero, en turba, con riego diario, a 21.4 °C y fotoperiodo natural. 36

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO II

Cuadro 2.1. Metabolitos presentes en extractos obtenidos con acetato de etilo, de hojas y tallos de <i>Oenothera rosea</i> recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz.	58
Cuadro 2.2. Metabolitos presentes en extractos obtenidos con acetato de etilo, de hojas y tallos de plantas de <i>Oenothera rosea</i> cultivadas en invernadero en Montecillo, Estado de México.	59
Cuadro 2.3. Metabolitos presentes en extractos obtenidos con etanol, de hojas y tallos de <i>Oenothera rosea</i> recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz.	60
Cuadro 2.4. Metabolitos presentes en extractos obtenidos con etanol, de hojas y tallos de plantas de semilla chica de <i>Oenothera rosea</i> cultivadas en invernadero en Montecillo, Estado de México.	61
Cuadro 2.5. Metabolitos presentes en extractos obtenidos con etanol, de hojas y tallos de plantas semilla grande de <i>Oenothera rosea</i> cultivadas en invernadero en Montecillo, Estado de México.	62
Cuadro 2.6. Metabolitos presentes en extractos obtenidos con metanol, de hojas y tallos de <i>Oenothera rosea</i> recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz.	63
Cuadro 2.7. Metabolitos presentes en extractos obtenidos con metanol de hojas y tallos de plantas de semilla chica de <i>Oenothera rosea</i> cultivadas en invernadero en Montecillo, Estado de México.	63
Cuadro 2.8. Metabolitos presentes en extractos obtenidos con metanol de hojas y tallos de plantas de semilla grande de <i>Oenothera rosea</i> cultivadas en invernadero en Montecillo, Estado de México.	64

ANEXOS

Cuadro 1. Pesos del suelo utilizado para el trasplante de plantas de <i>O. rosea</i> . .	82
Cuadro 2. Sistema cromatográfico y reveladores para la identificación de compuestos fitoquímicos en <i>Oenothera rosea</i> con material vegetativo obtenida de las semillas reproducidas en invernadero y recolectadas en in situ.	83

INTRODUCCIÓN GENERAL

La medicina tradicional es el “conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas, explicables o no, usados para el mantenimiento de la salud, y la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales” (OMS, 2018). La medicina tradicional se ha utilizado para mantener la salud, y prevenir y tratar enfermedades; entre éstas destacan las enfermedades crónicas (OMS, 2013). La medicina tradicional tiene su base en compuestos o principios activos mayormente de plantas (OMS, 2018).

En México se han identificado alrededor de 5,000 especies de plantas con aplicación en medicina herbolaria y comúnmente las utilizan más de 60 grupos étnicos. La búsqueda de principios activos para la elaboración de medicamentos ocupa un lugar relevante en la investigación (González-Stuart y Rivera, 2009).

El uso de ciertas especies vegetales está restringido por las autoridades de salud en México; pero, debido a las tradiciones y culturas populares se utilizan en regiones marginadas (Juárez-Rosete *et al.*, 2013). La comercialización de plantas medicinales y aromáticas endémicas en México por tradición, se desarrolla en los mercados y tiendas que expenden productos naturistas. Además, diversas especies se comercializan en el extranjero por su contenido de principios activos. Muñetón (2009) señaló que, en el mercado Sonora, de la Ciudad de México, diariamente se venden 10 toneladas de plantas curativas y en todo el país la cantidad total podría alcanzar más de 100 toneladas. Aunque algunas especies que se usan como medicinales se cultivan, alrededor de 85 % de las especies son plantas silvestres que se recolectan debido a su demanda (Muñetón, 2009). Esto indica que es necesario investigar para planificar el aprovechamiento controlado de las especies nativas y endémicas (Boegue, 2008) y asegurar su permanencia.

El cultivo de las especies con potencial medicinal es necesario; ya que, permitiría: (a) evitar la sobreexplotación de los recursos silvestres y el peligro de extinción de algunas especies, (b) disponibilidad de la materia prima vegetal homogénea y libre

de contaminantes, (c) mejorar la calidad y cantidad de los principios activos y (d) estandarizar la materia prima para los laboratorios fabricantes de medicamentos, cosméticos y perfumes (Juárez-Rosete, 2010).

Pérez (1992) investigó los recursos naturales renovables en el municipio de Tlaquilpa, Veracruz. El investigador registró 197 especies correspondientes a 56 familias de plantas útiles principalmente medicinales. Entre estas especies está *Oenothera rosea* L. 'Hér. ex Ait' que se conoce popularmente como Esta especie es una arvense, originaria de México y actualmente crece en otras regiones del mundo (Heike Vibrans, 2009).

En la práctica común, la población mexicana utiliza especies con efectos antiinflamatorios; una de ellas es *O. rosea* L. (CONABIO, 2009). Los usos de la incluyen padecimientos variados, como los enfocados al alivio de lesiones cutáneas y, como su nombre popular más difundido lo indica, se emplea en el tratamiento de golpes en cualquier parte del cuerpo (García *et al.*, 2002). También, esta especie tradicionalmente se utiliza en el tratamiento de la inflamación, dolor de cabeza, dolor de estómago, infecciones, entre otros (Calva-Candelaria *et al.*, 2018). A pesar del uso tradicional de esta planta, la información de su composición química relacionada con la actividad antiinflamatoria y de otros tipos en humanos es escasa. El objetivo de este estudio fue caracterizar la morfología y capacidad germinativa de las semillas silvestres de *O. rosea*, reproducir plantas en condiciones protegidas, a partir de esas semillas, caracterizar su crecimiento, desarrollo y presencia de metabolitos secundarios. La hipótesis fue que a partir de semillas silvestres de *O. rosea* la planta puede multiplicarse, en condiciones protegidas, y la presencia de metabolitos secundarios es similar a la de las plantas silvestres.

Literatura citada

- Boegue, E. 2008. El patrimonio biocultural de los pueblos indígenas de México. Hacia la conservación *in situ* de la biodiversidad y agrobiodiversidad en los territorios indígenas. Instituto Nacional de Antropología e Historia, Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas. 342 p.
- Calva-Candelaria, N.; Meléndez-Camargo M. E.; Montellano-Rosales H.; Estrada-Pérez, A. R.; Rosales-Hernández, M. C.; Fragoso-Vázquez M. J.; Martínez-Archundia M.; Correa-Basurto J.; Márquez-Flores, Y. K. 2018. *Oenothera rosea* L'Hér. ex Ait attenuates acute colonic inflammation in TNBS-induced colitis model in rats: in vivo and in silico myeloperoxidase role. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 108: 852-864.
- Heike Vibrans (ed.), 2009, Malezas de México, *Oenothera rosea* L'Hér. ex Ait. (consulta 23 diciembre 2018), *Oenothera rosea* L'Hér. ex Ait. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/onagraceae/oenothera-rosea/fichas/ficha.htm>
- Rzedowski, G. C. de J. Rzedowski y colaboradores. 2005. Flora Fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., 1a. reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán). 1406 pp.
- Espinosa G. F.; Sarukhán J. 1997. Manual de malezas del Valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México. 407 pp.
- García L.; Rojo D.; Gómez L.; Hernández M. 2002. Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 21: 214-216.
- González-Stuart A; Rivera J. O. 2009. Comparison of herbal products use in two largest border communities between the US and Mexico. *Herbalgram* 81: 58-66.
- Juárez-Rosete C. R. 2010. Fertilización orgánica e inorgánica en la producción y calidad de aceites esenciales en manzanilla, menta y tomillo. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados, Texcoco, Edo. México. 97 p.

- Juárez-Rosete C. R.; Aguilar-Castillo J. A.; Juárez-Rosete M. E.; Bugarín-Montoya R.; Juárez-López P; Cruz C. E. 2013. Hierbas aromáticas y medicinales en México: tradición e innovación. *Revista Bio Ciencias* 2: 119-129.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) 2013. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/iris/handle/10665/95008> (Consulta: febrero de 2019).
- OMS (Organización Mundial de la Salud) 2018. Temas sobre salud. Medicina tradicional. https://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/ (Consulta: febrero de 2019).
- Muñetón P, 2009. Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. *Revista Digital Universitaria* (Consultada: enero 2019) <http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art58/int58.htm>
- Pérez, A. 1992. Paisaje y aprovechamiento del suelo y la vegetación en Tlaquilpa, Veracruz. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados de Chapingo, Montecillo, México. p.165

REVISION DE LITERATURA

Origen de *Oenothera rosea* L. 'Hér. ex Ait.

El área de origen de *Oenothera rosea* L. 'Hér. ex Ait probablemente es Mesoamérica. Aunque actualmente se distribuye desde el suroeste de Estados Unidos hasta Perú y Argentina y su distribución secundaria se identifica en Europa, Asia, África, Oceanía (USDA, 2009). Se considerada una especie con estatus migratorio y nativa de México ("*Oenothera rosea* - ficha informativa," n.d.).

O. rosea se distribuye naturalmente en encinares, bosques de coníferas, pastizales y matorrales xerófilos, pero se reporta como cultivada para ornamento y arvense. En México *O. rosea* se ha identificado en Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Ciudad de México, Coahuila, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Villaseñor-Ríos y Espinosa-García, 1998).

Actualmente, *O. rosea* no se comercializa en México; pero, en la literatura se indica que se cultiva para ornamento, por sus flores. En otros países sí se cultiva. Esta especie se identifica como planta medicinal, ya que se emplea como desinflamante, analgésico, desinfectante y cicatrizante, también para padecimientos digestivos y contra esterilidad, trastornos menstruales, padecimientos renales y tos (UNAM, 2009).

O. rosea se propaga y cultiva para fines ornamentales a partir de semillas y por estacas de tallo, en setos, macizos o arriates. Los ejemplares en una plantación tienden a generar tallos numerosos y diámetro extenso (Ramírez-Hernández, 2009).

Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la especie de interés en este estudio es la siguiente:

-Reino: Plantae, subreino: Traqueobionta (plantas vasculares), superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas), división: Magnoliophyta (plantas con flor),

clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas), subclase: Rosidae. orden: Myrtales, familia: Onagraceae, subfamilia Onagroideae, tribu: Onagreae, género: *Oenothera*, sección: *O. sec. Hartmannia* y especie: *Oenothera rosea* L. Hér. ex Ait. (CONABIO, 2009)

Generalidades morfológicas

O. rosea L. Hér. ex Ait es una herbácea anual o perenne, puede medir de 15 a 60 cm de altura; su tallo es simple o ramificado desde la base. Las hojas de esta especie son caulinas oblanceoladas (oblongo-ovadas), sinuado-dentadas a pinnatífidas, ápice agudo u obtuso, sinuado-denticuladas o pinnatífidas sobre todo en la base, las hojas superiores se van reduciendo gradualmente hacia el ápice del tallo hasta asumir la forma de brácteas linear-lanceoladas; con 1 cm de longitud y 0.6 a 2.5 cm de anchura, y su peciolo mide 1 a 2 cm de longitud. En esta especie, la planta presenta flores axilares, agrupadas en racimos; hipantio de 4 a 8 mm de longitud y estriguloso-canesciente. Los sépalos miden de 5 a 8 mm de longitud, las puntas se presentan algo bifurcadas en el botón, por lo general coherentes en la antesis; los pétalos son obovados, con longitud de 5 a 10 mm, rosados a morados en la antesis (cambiando a rojo encendido, guinda o morado al fenecer); los lóbulos del estigma son lineares, de 2 mm de longitud. Las cápsulas son obovoides, con 8 a 10 mm de longitud, por 3 a 4 (6) mm de grosor, son estrigulosas, con cuatro ángulos ligeramente alados, estrechándose abruptamente en la base en un pedicelo de 5 a 20 mm de longitud. Las semillas son oblongo-obovoides, color castaño, de 0.6 a 0.8 mm de longitud. Los nombres comunes de esta especie son: “agua de azahar” y “yerba del golpe”. Las plantas de esta especie se clasifican como arvenses que se localizan en cultivos de hortalizas, orilla de caminos, acequias y arroyos (Espinosa y Sarukhán, 1997; Rzedowski *et al.*, 2005).

La descripción morfológica anterior corresponde a plantas en etapa reproductiva, pues incluye a las flores, cápsulas y semillas. La descripción del crecimiento y desarrollo de las plantas prácticamente no existe en la literatura especializada. La caracterización de la calidad física y fisiológica de las semillas y del crecimiento y desarrollo de las plantas de esta especie es necesaria para conocer las condiciones

de siembra, producción y rendimiento de estructuras que podrían utilizarse para uso en medicina herbolaria y extracción de metabolitos secundarios y multiplicación de las plantas para ornato (Rzedowski *et al.* 2005).

Metabolitos secundarios y su efecto

Algunas evidencias formales de la importancia e interés por los metabolitos secundarios de *O. rosea* y uso potencial como planta útil en herbolaria son las siguientes. Kasay *et al.* (2013) realizaron pruebas cualitativas y mediante reacciones de coloración y precipitación demostraron la presencia de 18 taninos hidrolizables y condensados (14.22 g de ácido tánico/ 100 g y 13.16 g de ácido tánico/100 g) en la planta.

Márquez-Flores *et al.* (2009) desmostaron la actividad antiinflamatoria de los extractos acuoso (500 mg/kg de peso corporal; p.c.) y metanólico (100 mg/kg p.c.) de las plantas de *O. rosea* en el modelo del granuloma en ratas con técnicas histológicas. De acuerdo con los resultados de estos autores ambos extractos disminuyeron significativamente el proceso inflamatorio en relación con los grupos testigo y el efecto antiinflamatorio del extracto metanólico fue similar al efecto de indometacina. Este estudio evidenció que ambos extractos de *O. rosea* muestran actividad antiinflamatoria y sugieren que no son tóxicos.

Meckes *et al.* (2004) evaluaron la actividad de algunos extractos de plantas medicinales mexicanas sobre edema plantar inducido por carragenina en rata. En este estudio el extracto con metanol de *O. rosea* mostró reducción del edema de $79.8 \pm 4.1\%$ y $86.2 \pm 1.8\%$ después de 60 min y 3 h de la inyección de carragenina.

El extracto hidroalcohólico de *O. rosea* fue evaluado por Villena y Arroyo (2014). Quienes encontraron compuestos fenólicos menor presencia de carbohidratos, flavonoides, taninos, triterpenos, quinonas y alcaloides. Además, los autores evaluaron el efecto en condiciones con edema subplantar inducido con carragenina y el edema auricular inducido con xilol. Ellos comprobaron que el extracto disminuyó significativamente la inflamación aguda (60 %) la inflamación crónica (60%) y del

nivel de PCR en sangre en ratas (45%). Los autores determinaron que la dosis media del extracto sin efectos adversos fue 61 mg/kg.

Gomez-Flores *et al.* (2012) determinaron el efecto antibacteriano de *Oenothera rosea* contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Vibrio cholerae*. Ellos observaron que los extractos de metanol y acuoso inhibieron significativamente el crecimiento de todas las cepas de bacterias analizadas. El extracto de metanol inhibió hasta 55, 66 y 87 % crecimiento de *E. coli*, *S. enteritidis* y *V. cholerae*, respectivamente; mientras que el extracto acuoso indujo hasta 54, 69 y 88 % de inhibición del crecimiento bacteriano. Almora-Pinedo *et al.* (2017) concluyeron que, de acuerdo con los signos histopatológicos, la actividad antioxidante *in vivo* y los parámetros hematológicos y bioquímicos, la administración del extracto etanólico de *O. rosea* en ratas tuvo efecto protector del cáncer gástrico, generado experimentalmente. Además, aseguraron que esta especie podría evaluarse en ensayos clínicos con pacientes con el mismo padecimiento.

Literatura citada

- Almora Pinedo Y.; Arroyo-Acevedo J.; Herrera-Calderón O.; Chumpitaz-Cerrate V. M; Hañari Quispe R.; Tinco-Jayo A.; Franco-Quino C.; Figueroa-Salvador L. 2017. Preventive effect of *Oenothera rosea* on N-methyl-N-nitrosourea- (NMU) induced gastric cancer in rats. *Clinical and Experimental Gastroenterology* 10: 327–332.
- Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores, 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 1406 pp.
- Espinosa G. F.; Sarukhán, J. 1997. Manual de malezas del Valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 407 pp.

- Gomez-Flores R.; Reyna-Martínez R., Tamez-Guerra R., Quintanilla-Licea R. 2012. Antibacterial activity of *Oenothera rosea* (L 'Hér) leaf extracts. *British Journal of Medicine & Medical Research* 2: 396-404.
- Kasay M.I.; Huamán J.; Guerrero, M. 2013. Estudio cualitativo y cuantitativo de taninos de *Oenothera rosea* L' Hér. Ex Aiton. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química* 16: 13–19.
- Márquez-Flores Y. K.; Montellano-Rosales H.; Campos Aldrete M. E.; Meléndez-Camargo M. E. 2009. Anti-inflammatory activity of aqueous and methanolic extracts of *Oenothera rosea* L' Hér. ex Ait in the rat. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéutica* 40: 11–16.
- 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* 11: 446–451.
- Oenothera rosea* - ficha informativa. (n.d.). 2019. Retrieved March 6, 2019, from <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/onagraceae/oenotherarosea/fichas/ficha.htm> (Consulta: enero de 2019)
- Ramírez-Hernández, S. G. 2009. Estudio de herbáceas silvestres y su uso ornamental en áreas verdes. Tesis de Maestría en Ciencias. Postgrado en Agroecosistemas Tropicales. Colegio de Posgraduados Campus Veracruz. 100 pp.
- Villena N, C., & Arroyo A., J. 2014. Efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* (Yawar Socco) en ratas con inducción a la inflamación aguda y crónica. *Ciencia E Investigación*, 15(1), 15-19.

CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN SEMINAL, CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE *Oenothera rosea* L. 'Hér. ex Ait. EN INVERNADERO

1.1 RESUMEN

El objetivo de este estudio fue recolectar semillas silvestres de *Oenothera rosea* L. 'Hér. ex Ait para determinar su potencial germinativo, la emergencia de plántulas y desarrollo de las plantas, en condiciones protegidas, hasta el final de la etapa reproductiva. La hipótesis fue que estas semillas silvestres presentan variabilidad amplia del tamaño, latencia alta y emergencia de plántulas baja; además, que la relación entre el tamaño de la semilla y el crecimiento de las plantas es positiva. Las semillas se recolectaron en cuatro sitios en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz. Las semillas se separaron en chicas y grandes, mediante tamices. El diseño experimental fue en bloques al azar, con número variable de repeticiones: 10 para germinación y emergencia, con 15 semillas por unidad experimental, y cuatro plantas por muestreo, para evaluar el crecimiento y biomasa acumulada en las estructuras, cada 10 días, durante 110 días. Los bloques los representaron los tamaños de semillas. La biomasa seminal promedio varió entre 0.0027 y 0.0091 g. La latencia osciló ($p \leq 0.05$) entre 20 y 80 % en las semillas chicas y entre 10 y 40 % en las grandes. El tamaño de la semilla se asoció ($p \leq 0.05$) con algunas variables del crecimiento de las plantas. Este fue el caso de las plantas de semilla grande que mostraron altura del tallo (hasta 35 %), número de yemas florales (60 %), número de cápsulas maduras (el doble) y longitud de la raíz (27.2 %) mayores, en la cosecha (110 días después de la siembra), respecto a las de semillas chicas. En contraste el diámetro del tallo y la anchura, la longitud o el número promedio de las hojas durante el crecimiento o en la cosecha fueron independientes del tamaño de la semilla. Además, las plantas mostraron traslapo de las etapas fenológicas independientemente del tamaño de semilla. De acuerdo con lo anterior, la hipótesis se acepta parcialmente.

Palabras clave: crecimiento vegetativo; inflorescencias; latencia; semillas silvestres; yemas florales.

1.2 ABSTRACT

The aim of the study was to collect wild seeds of *Oenothera rosea* L. 'Her. ex Ait to determine its germinative behavior, seedling emergence, and plant development, under protected conditions, until reproductive stage. The hypothesis was that these wild seeds show wide variability in size, high latency and low seedling emergence; also, that the relationship between seed size and plant growth is positive. The seeds were collected in four sites in Barrio San Pedro Tepepa, Municipality of Tlaquilpa, Veracruz. The seeds were separated into small and large, through sieves. The experimental design was randomized blocks, with variable number of repetitions: 10 for germination and emergence, with 15 seeds per experimental unit, and four plants per sample, to evaluate the growth and biomass accumulation in the structures, every 10 days, for 110 days. Seed sizes represented each block. The average seminal biomass varied between 0.0027 and 0.0091 g. Dormancy varied ($p \leq 0.05$) between 20 and 80% in small seeds and between 10 and 40% in large seeds. Seed size was associated ($p \leq 0.05$) with some plant growth variables. This was the case of large-seeded plants that showed higher stem height (up to 35 %), number of flower buds (60 %), number of mature capsules (twice) and root length (27.2 %), at harvest (110 days after sowing), compared to those of small seeds. In contrast, the stem diameter and the width, length or average number of leaves during growth or at harvest were nondependent on seed size. In addition, plant phenologic phases overlapped regardless of seed size. According to the above, the hypothesis is partially accepted.

Keywords: vegetative growth, inflorescences, dormancy, wild seeds, floral buds.

1.3 INTRODUCCIÓN

El estudio de las malezas y arvenses en México se ha incrementado en los últimos años, según el aumento de trabajos registrados en este campo de la Biología. Estas plantas presentan dos propiedades fundamentales: resistencia a condiciones adversas para las plantas cultivadas y agresividad de crecimiento, que les confiere ventajas sobre los cultivos agrícolas, lo que incrementan el costo de producción y disminuyen los rendimientos. Sin embargo, las arvenses cumplen funciones ecológicas porque colonizan áreas con vegetación alterada o en proceso de sucesión. En estos ambientes los sistemas radiculares de las arvenses pueden ser extensos, retener el suelo y evitar el riesgo de erosión. Las arvenses proveen de néctar y polen a insectos melíferos, y fertilizan y contribuyen a la formación del suelo (Villarreal, 1983).

La caracterización del crecimiento y desarrollo arvenses *in situ* se dificulta por la asincronía entre individuos y la presencia de otras especies con las que compiten. En general, las arvenses presentan: (1) producción de numerosas semillas con tasa elevada de germinación y desarrollo en condiciones ambientales diversas, (2) crecimiento acelerado en su ciclo completo de crecimiento, (3) autocompatibilidad o autofertilización, pero no siempre son autógamas o apomícticas, (4) mecanismos diversos de dispersión, en algunos casos con estructuras morfológicas especializadas en sus frutos y semillas, (5) reproducción vegetativa alta (Baker 1974; Espinosa y Sarukhán 1997). Desde el punto de vista ecológico se reconocen dos grandes grupos, las arvenses, que se encuentran ligadas a los cultivos y las plantas invasoras, que son comunes en poblados, lotes baldíos y vías de comunicación (Rzedowski y Rzedowski 1957; Rzedowski 1978).

El desarrollo de semillas en las angiospermas es un proceso fundamental en el ciclo de vida de la planta. El crecimiento de las semillas de plantas hasta el tamaño específico de la especie está determinado por factores ambientales y señales internas de desarrollo de los tejidos maternos esporofíticos, cigóticos (Kesavan *et al.*, 2013).

Las semillas desempeñan funciones en la renovación, persistencia y dispersión de las poblaciones, regeneración del hábitat y sucesión ecológica. En la naturaleza,

la semilla es alimento básico para la fauna. Además, la producción agrícola y la alimentación humana dependen esencialmente de las semillas (Li y Li, 2015). El tamaño de la semilla es un determinante de la aptitud evolutiva y uno de los componentes más importante del rendimiento en las plantas. En comparación con las plántulas de semillas pequeñas, las semillas grandes producen más reservas y plántulas más grandes que pueden rendir mejor en condiciones desfavorables (Kitajima y Fenner, 2000). Las semillas grandes pueden carecer de latencia, evitar condiciones desfavorables, beneficiarse de la germinación temprana después de la madurez y, así, maximizar su crecimiento antes del inicio de condiciones desfavorables (Brunner *et al.*, 2015). Por lo que, la latencia y el tamaño de las semillas son adaptaciones alternativas (Rees y Venable, 2007). Sin embargo, el tamaño de las semillas está limitado por factores como el tamaño máximo de la planta adulta (Venable y Rees, 2009) y las semillas más grandes requieren cantidades mayores de asignación de recursos, lo que se asocia con número menor de semillas producidas por planta, y pueden aumentar el riesgo de depredación (Gómez y Husband, 2004). Además, las especies con plantas de semilla pequeña tienen tasa alta de crecimiento relativo; esta tasa disminuye con el crecimiento de la planta, por lo que las especies de semillas pequeñas alcanzarán tasa de crecimiento relativo mayor por su tamaño pequeño. Las diferencias en la tasa de crecimiento estandarizada por tamaño pueden deberse a diferencias en morfología, asignación de fotoasimilados o fisiología. Al respecto, Turnbull *et al.* (2012) determinaron que especies de semillas pequeñas a veces poseen adaptaciones adicionales para el crecimiento rápido por encima de su ventaja de tamaño general.

La relación positiva entre el tamaño de la semilla y la subsiguiente supervivencia de la descendencia es parte del análisis de la historia de vida de las especies. Pero, esta relación es incierta porque los estudios se han enfocado principalmente a las etapas iniciales de desarrollo, es decir en plántulas (Metz *et al.*, 2010).

La relación entre la masa de la semilla y el crecimiento se ha documentado en varios grupos de plantas (Poorter *et al.* 2008) y mostró un gradiente que en un extremo presenta especies pioneras que usan los eventos de perturbación o brechas, y en el otro extremo muestra especies lentas para colonizar o crecer, pero

que pueden sobresalir en la competencia a largo plazo (Kitajima y Myers, 2008; Pacala y Rees 1998). Las especies pioneras generalmente tendrán semillas pequeñas con tasas altas de crecimiento de la descendencia aunque la relación entre el tamaño de semilla y la tasa de crecimiento puede diferir entre hábitats y naturaleza de la competencia Turnbull *et al.* (2012).

Oenothera rosea es una herbácea anual o perenne, calificada como arvense o de brecha, y se distribuye en encinares, bosques de coníferas, pastizales y matorrales xerófilos; además, es común en los alrededores de campos de cultivo. Esta especie es relativamente común en México, ya que se ha identificado en 25 de las 33 entidades federativas (Villaseñor-Ríos y Espinosa-García, 1998). Aunque la especie se identifica como arvense, en México, Perú y otros países. Esta especie se reconoce por sus propiedades terapéuticas, ya que se usa tradicionalmente como analgésico, desinfectante, desinflamante y cicatrizante, para padecimientos digestivos y control de esterilidad, trastornos menstruales, padecimientos renales y tos y para disminuir el dolor de cabeza y estómago (Calva-Candelaria *et al.*, 2018). La infusión de esta planta se utiliza por sus efectos antibacterianos y anticoagulantes en Perú (Gómez-Flores *et al.*, 2012). De acuerdo con los signos histopatológicos, la actividad antioxidante *in vivo* y los parámetros hematológicos y bioquímicos, la administración del extracto etanólico de *O. rosea* en ratas tuvo efecto protector del cáncer gástrico, generado experimentalmente; por lo que esta especie podría evaluarse en ensayos clínicos con pacientes con el mismo padecimiento (Almora-Pinedo *et al.*, 2017).

En la literatura especializada la información de las características físicas de las semillas de *O. rosea* es mínima y sobre su fisiología no se localizó alguna referencia. Tampoco se ha documentado el crecimiento y desarrollo de las plantas. La caracterización de la calidad física y fisiológica de las semillas y del crecimiento de las plantas de esta especie es necesaria para conocer las condiciones de siembra que permitan su multiplicación, la producción y rendimiento mayor de estructuras que podrían utilizarse para uso en medicina herbolaria, materia prima para extracción de metabolitos secundarios y multiplicación para ornato.

El objetivo del presente estudio fue recolectar semillas silvestres para su caracterización, determinar su potencial germinativo, la emergencia de plántulas y desarrollo de las plantas en condiciones protegidas. La hipótesis fue que las semillas silvestres de *O. rosea* presentan variabilidad de tamaño de semillas, porcentajes de latencia altos y de emergencia de plántulas baja; además, que existe relación positiva entre el tamaño de la semilla y el crecimiento de las plantas.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Sitio experimental

El estudio se realizó en el laboratorio de Biofísica Vegetal y Fisiología Ambiental del Posgrado en Botánica y un invernadero del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Estado de México (19° 27' N, 98° 54' O y 2220 msnm).

1.4.2 Material biológico

Las capsulas de poblaciones silvestres de *O. rosea* se recolectaron, durante marzo y abril de 2018, en los alrededores de Barrio San Pedro, Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud. El clima de la región es templado húmedo con lluvias abundantes en verano (94 % de la lluvia total) (García, 1988).

Las semillas se obtuvieron de las cápsulas recolectadas de plantas individuales de cuatro poblaciones (< 100 m²) con número variable de plantas (> 50). De cada población se muestreó una planta al azar, de la que cosecharon sus cápsulas totales. Aleatoriamente se asignó un número a cada planta. Las semillas se extrajeron de las cápsulas y se mantuvieron separadas por población en bolsas de papel durante su evaluación.

1.4.3 Medición de las características físicas de la semilla

La longitud, anchura y forma de una muestra de 200 semillas se determinaron con un microscopio estereoscopio. El tamaño de la semilla se determinó con un grupo de tamices, con abertura de 0.250, 0.297, 0.354, 0.420 y 0.500 mm. Además, en muestras de 250 semillas se determinó la biomasa en una balanza analítica (con exactitud de 0.0001g).

1.4.4 Determinación de la germinación de las semillas

La germinación de las semillas se determinó en cajas Petri, con algodón y papel filtro húmedos con agua destilada, como soporte, con el método descrito por ISTA

(ISTA, 2005). Cada caja Petri con 15 semillas representó una unidad experimental y se evaluaron 10 repeticiones de cada tamaño de semilla, por individuo. Las unidades se mantuvieron a 25° C, en oscuridad, dentro de una germinadora. El recuento de las semillas germinadas se hizo cada 12 horas durante 700 h. En muestras de semillas en germinación se observaron, en microscopio estereoscópico, las estructuras de las plántulas.

1.4.5 Determinación de la emergencia de las plántulas

La emergencia de las plántulas se determinó en el invernadero. En bandejas con 200 cavidades, con turba vegetal (Peat Moss) húmeda con agua, se colocaron dos semillas por cavidad, a 1 mm de profundidad, y se aplicó riego diario con un aspersor manual. La emergencia de las plántulas se cuantificó diariamente durante 35 días. La unidad experimental la representó un bloque de 15 cavidades y se evaluaron 10 repeticiones de cada tamaño de semilla.

1.4.6 Determinación del crecimiento y desarrollo de las plantas

En vasos de unicel de 500 ml de capacidad con sustrato comercial, húmedo con agua destilada, se sembraron, a 1mm de profundidad, las semillas de cada tamaño seleccionado. La unidad experimental fue una planta por vaso.

A partir de la emergencia de las plantas se hicieron mediciones cada 10 d, durante 110 d, en las plantas de cada tamaño de semilla. Las evaluaciones incluyeron anchura y longitud de la hoja y diámetro del tallo con un vernier digital y altura de la planta con una regla flexible, se cuantificó el número de ramas principales y secundarias, hojas, yemas florales, inflorescencias, capsulas verdes y maduras (secas) y longitud de la raíz. Durante el crecimiento también se cuantificó la biomasa húmeda y seca de esas estructuras; esta última después de secar las estructuras, hasta peso constante, en estufa con aire circulante a 70 °C. La biomasa se determinó en balanza analítica (0.0001g de precisión).

1.4.7 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue de bloques al azar, con número variable de repeticiones: 10 con 15 semillas para germinación y emergencia, y cuatro plantas por muestreo, para crecimiento y biomasa acumulada cada 10 días, durante 110 días. Los bloques los representaron los tamaños de semillas seleccionados de cada uno de las cuatro poblaciones.

Las curvas de germinación y emergencia acumuladas y crecimiento se obtuvieron con el programa SigmaPlot 12.0.

Los resultados se analizaron con ANDEVA, comparación múltiple de medias con el método de Tukey ($p \leq 0.05$) y análisis de correlación de Pearson con el paquete estadístico SAS.

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Características físicas de las semillas

Las semillas silvestres fueron amarillentas, oblongas u obovoides-elipsoides y superficie punticulada (Figura 1.1 y 1.2 A); su anchura y longitud variaron de 3 a 5 μm y de 6 a 8 μm (Figura 1.2 B).



Figura 1.1. Semillas de *Oenothera rosea* recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud).

Las dimensiones de las semillas permitieron su separación en dos grandes grupos mediante tamices, con poro entre 0.500 y 0.250 mm de abertura, por lo que se clasificaron en semillas chicas y grandes. De acuerdo con esta clasificación, su biomasa promedio varió desde 0.0027 hasta 0.0091 g. La proporción de semillas en los grupos varió significativamente ($p \leq 0.5$) dentro y entre las poblaciones, con excepción de la población 2, sin diferencia entre las proporciones ($p > 0.05$). La diferencia en la biomasa media de las semillas grandes dentro de las poblaciones con diferencias significativas, representó entre 23.6 % respecto a las chicas, en la muestra 1, y 68.6 %, en la muestra 4 (Figura 1.3).

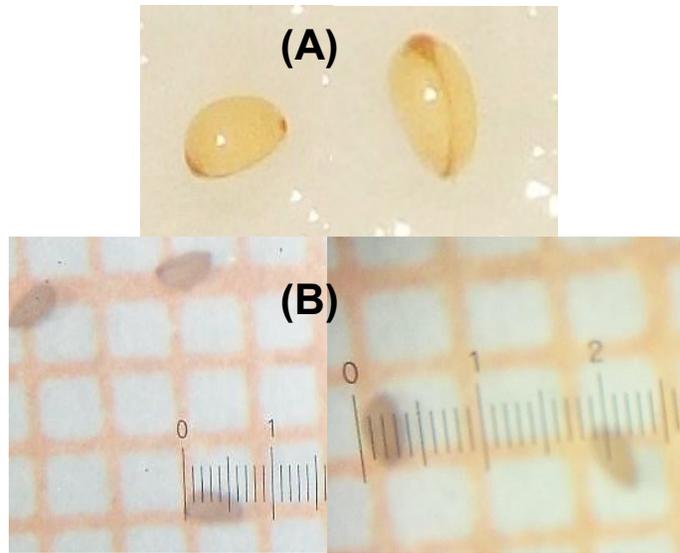


Figura 1.2. Características físicas (A) y dimensiones (B) de semillas de *Oenothera rosea* recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa Veracruz ($18^{\circ} 36' 29''$ N, $97^{\circ} 07'$ O y 2434 m de altitud).

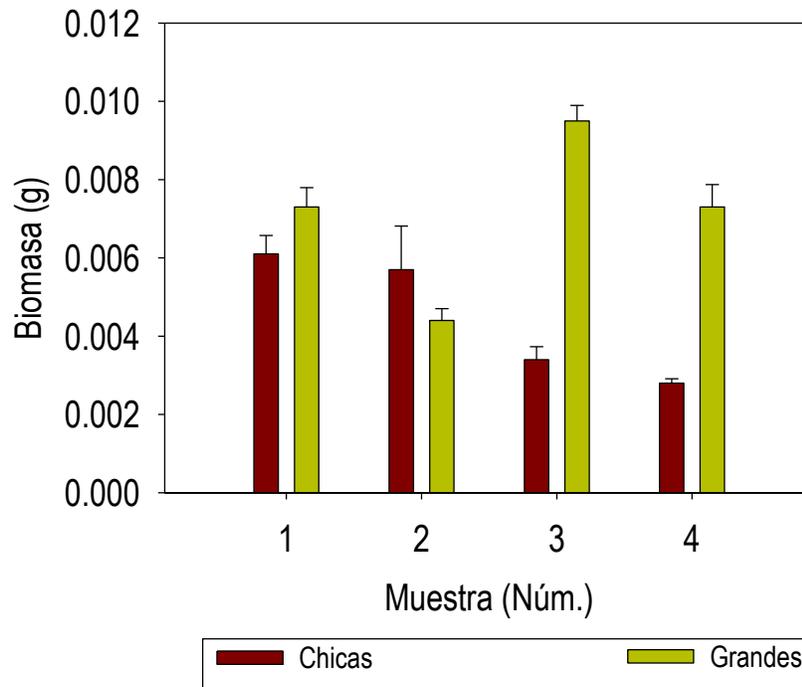


Figura 1.3. Biomasa de las semillas, separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, en chicas y grandes, de cuatro plantas (muestras) de *Oenothera rosea* recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz Entre los paralelos $18^{\circ} 34'$ y $18^{\circ} 39'$ de latitud norte; los meridianos $97^{\circ} 02'$ y $97^{\circ} 09'$ de longitud oeste; altitud entre 1 840 y 2 700 m.

1.5.2 Germinación de semillas

Una prueba preliminar de germinación, en condiciones de laboratorio (21 ± 3 °C y fotoperiodo natural), mostró que gran proporción de las semillas de las cuatro muestras eran viables y germinaban con relativa sincronía; además, en 4 o 5 días las plántulas desarrolladas adquirirían el color verde en sus hojas, característico de las plantas autótrofas (Figura 1.4). Por lo que, se aplicó el método estándar para cuantificar los parámetros de la germinación (AOSA, 1983). En este estudio, debido a las dimensiones de las semillas, la germinación se consideró exitosa cuando el hipocótilo y la raíz emergieron de entre los cotiledones y alcanzaron al menos 3 mm de longitud, equivalente al 50 % de longitud de la semilla (Figura 1.5).



Figura 1.4. Aspecto de las plántulas de *Oenothera rosea* 4-5 días después de la germinación a 21 ± 3 °C, con fotoperiodo natural, de semillas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz entre los paralelos $18^{\circ} 34'$ y $18^{\circ} 39'$ de latitud norte; los meridianos $97^{\circ} 02'$ y $97^{\circ} 09'$ de longitud oeste; altitud entre 1 840 y 2 700 m.

La germinación acumulada de las semillas generó curvas de tipo sigmoideo ($y = a/1 + e^{-(x-x_0/b)}$), con r^2 entre 0.806 y 0.910 y $p \leq 0.0001$) (Figura 3.6). Esta variable mostró

diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el tiempo para su inicio, en el porcentaje máximo acumulado y en el tiempo para alcanzar este último entre y dentro de las poblaciones. El tiempo para iniciar la germinación varió entre 72 h, en la muestra 3, y 132 h, en la muestra 4, en las semillas con ambos tamaños (Figura 3.6 A-B).

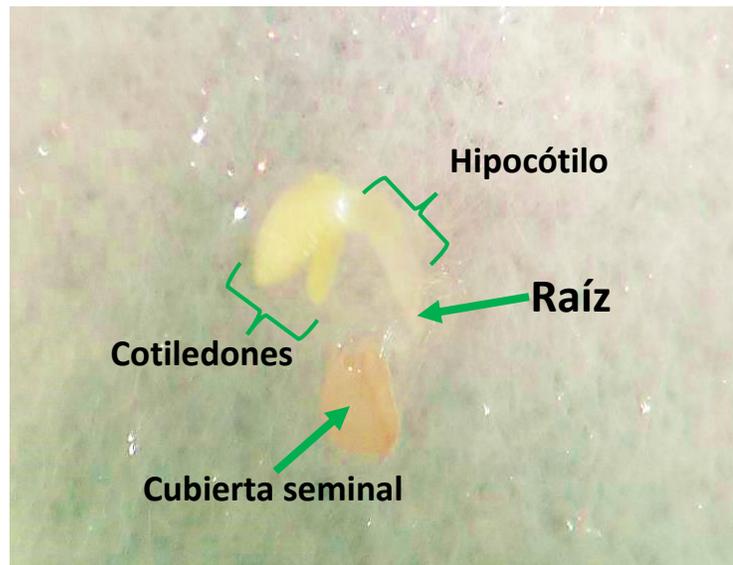


Figura 1.5. Estructuras de las semillas de *Oenothera rosea* después de cinco días en germinación a 21 ± 3 °C y en oscuridad.

La germinación seminal máxima varió entre las semillas chicas desde 21.33 %, en la muestra 4, hasta 74.7 %, en la muestra 1 (Figura 1.6 A). Entre las semillas grandes la fluctuación estuvo entre 60 %, en la muestra 4, y 88.7 %, en las muestras 1 y 3 (Figura 1.6 B). Además, el tiempo para la germinación máxima acumulada de las semillas difirió parcialmente entre tamaños de semilla y poblaciones. Independientemente del porcentaje de germinación, las semillas chicas de las poblaciones 2, 3 y 4 tardaron 360 h para obtener la germinación máxima y las de la población 1 la alcanzaron 12 h después (372 h) (Figura 3.6 A). En el caso de las semillas grandes el tiempo para obtener la germinación máxima difirió entre 324 h en la población 3, 372 h en la 2 y 384 h en la 1 y 4 (Figura 1.6 B).

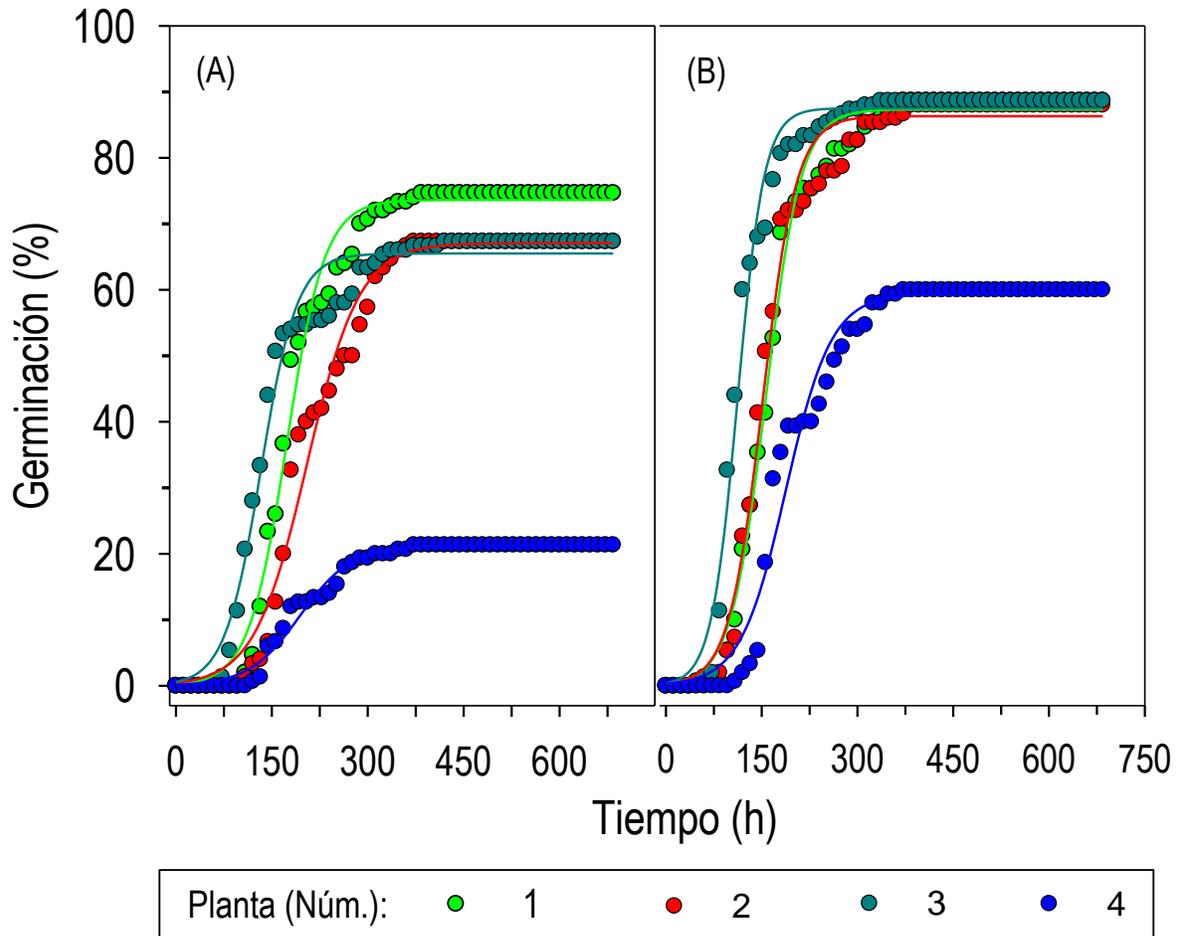


Figura 1.6. Germinación promedio acumulada a 21 ± 3 °C, en obscuridad, de las semillas chicas (A) y grandes (B), separadas a través de tamices, con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas de *Oenothera rosea* recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz ($18^{\circ} 36' 29''$ N, $97^{\circ} 07'$ O y 2434 m de altitud); $n = 10$.

1.5.3 Emergencia de las plántulas

La emergencia de las plántulas fue evidenciada por la exposición del primer par de hojas, con longitud entre 1 y 4 mm (Figura 1.7).

La emergencia acumulada de las semillas generó curvas de tipo sigmoideo ($y = a/1 + e^{-(x-x_0/b)}$, con r^2 entre 0.568 y 0.864 y $p \leq 0.0001$) (Figura 1.8). Esta variable mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el tiempo para su inicio, en el porcentaje máximo acumulado y en el tiempo para alcanzarlo entre y dentro de las poblaciones.

El tiempo para el inicio de la emergencia de las plantas a partir de las semillas chicas varió entre 7 días, en las poblaciones 3 y 4, y 10 días, en las muestras 1 y 2 (Figura 1.8 A); esto contrastó parcialmente con las semillas grandes, cuyas plántulas de las muestras 3 y 4 emergieron en promedio en 6 días y de las de las muestras 1 y 2 en 9 y 11 días (Figura 1.8 B).



Figura 1.7. Aspecto de las plántulas de *Oenothera rosea* después de un día (A) y siete días (B) de su emergencia en turba y mantenidas en invernadero con riego diario, a 20.7 °C y fotoperiodo natural.

La emergencia máxima de las plántulas a partir de las semillas chicas varió entre 56.67, en la población 2, hasta 82.67 %, en la 3 (Figura 1.8 A). En las plántulas de las semillas grandes la fluctuación estuvo entre 66.67 %, en la población 2, y 90.37 % en la 4 (Figura 1.8 B). Las plántulas de las semillas chicas de la población 4 alcanzaron el porcentaje máximo de emergencia desde los 32 DDS y entre las semillas grandes las poblaciones 1, 3 y 4 lo alcanzaron desde los 29, 30 y 34 DDS (Figura 1.8).

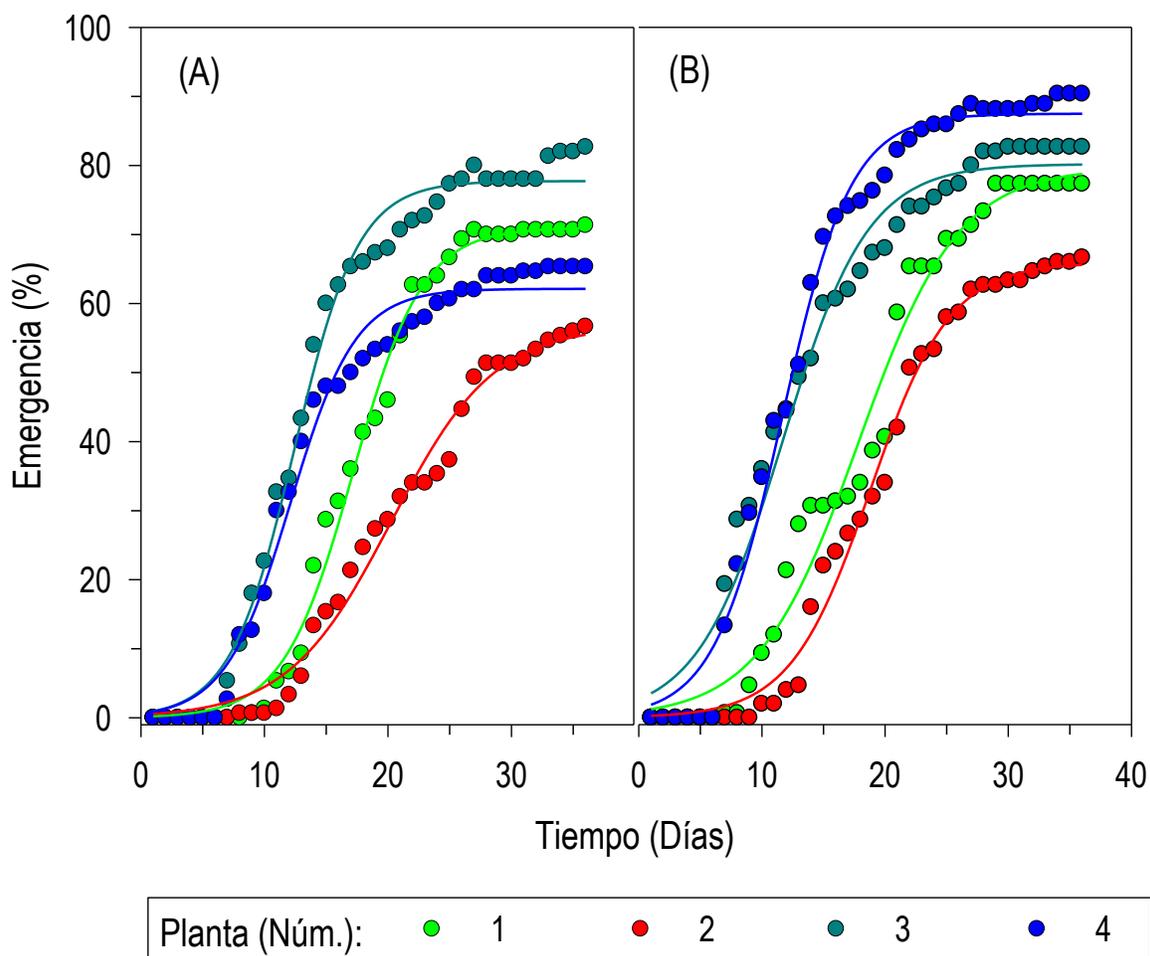


Figura 1.8. Emergencia acumulada de plántulas, a partir de semillas chicas (A) y grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas de *Oenothera rosea* recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). La siembra se hizo en turba y las unidades experimentales se mantuvieron en invernadero, con riego diario, a 20.7°C y fotoperiodo natural; n = 10.

1.5.4 Crecimiento de las plantas en invernadero

1.5.4.1 Altura

Las plantas en cultivo mostraron heterogeneidad en la altura significativa en la etapa vegetativa (Figura 1.9 A) y en floración (Figura 1.9 B).



Figura 1.9. Plantas de *Oenothera rosea* en etapa vegetativa (A) y floración (B), después 26 y 51 días de su siembra en turba y mantenidas en invernadero, con riego diario, a 21.7 ° C y fotoperiodo natural.

El incremento longitudinal del tallo durante el periodo de evaluación se consideró equivalente al crecimiento en altura de la planta. El cambio de esta variable del inicio del crecimiento al momento de la cosecha describió curvas de tipo sigmoideo ($y = a/1 + e^{-(x-x_0/b)}$, con r^2 entre 0.709 y 0.957 y $p \leq 0.0001$ en todos los casos). El crecimiento de las plantas de semilla chica mostró altura promedio máxima entre 29.08 y 36.7 cm (Figura 1.10 A) y las de semilla grande alcanzaron entre 34.30 y 39.15 cm (Figura 1.10 B). En ambos grupos el crecimiento longitudinal del tallo decayó significativamente a partir de los 80 DDS.

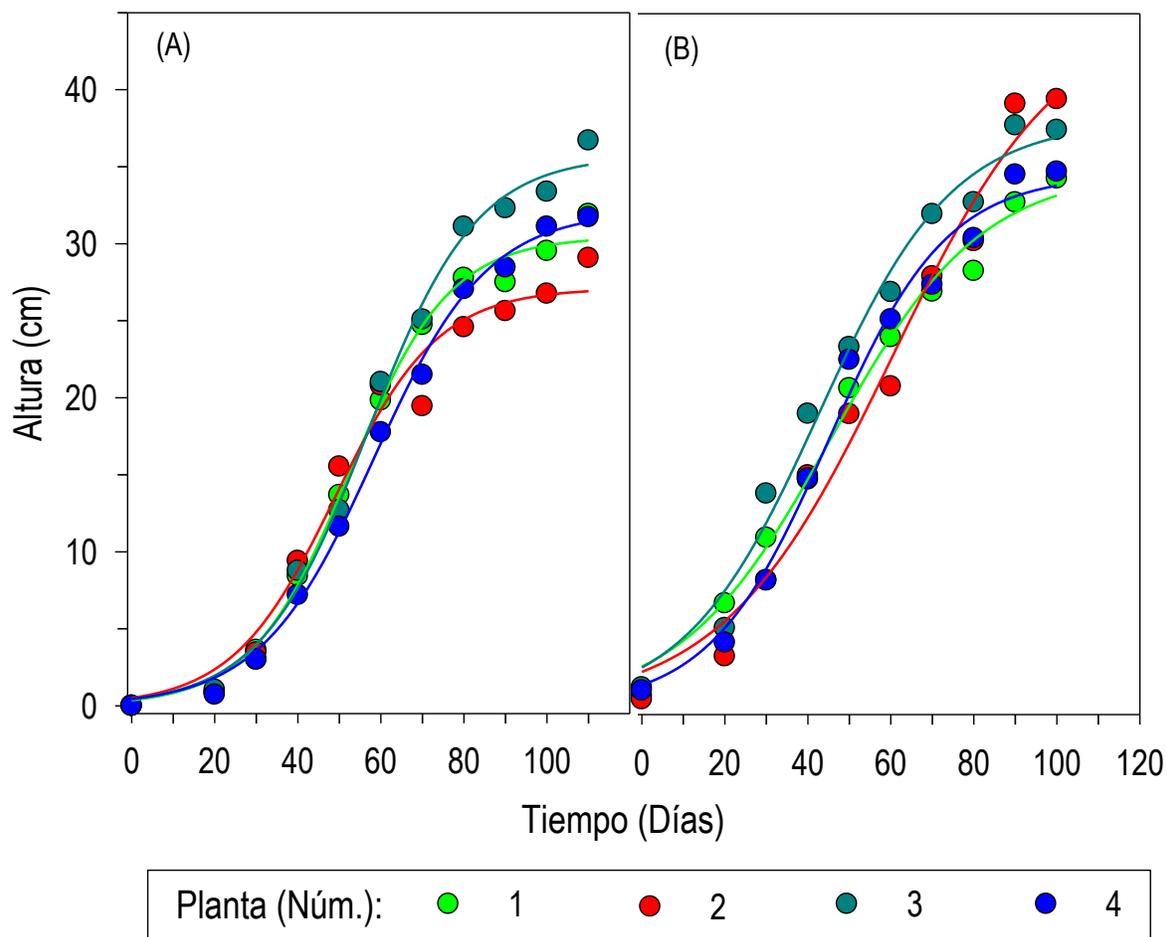


Figura 1.10. Altura del tallo de plantas de *Oenothera rosea* obtenidas de semillas chicas (A) o grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). Las plantas crecieron en invernadero, en turba, con riego diario, a 21.4 °C y fotoperiodo natural; n = 10.

1.5.4.2 Diámetro del tallo

El crecimiento transversal del tallo se ajustó al tipo polinomial de segundo orden ($y = b_0 + xb_1 + x^2b_2$; $p \leq 0.05$ en todos los casos). Las plantas de las semillas chicas mostraron diámetro máximo entre 1.955 y 2.275 cm (Figura 1.11 A) y las de las semillas grandes alcanzaron entre 1.798 y 2.473 cm (Figura 1.11 B). Con excepción

de las plantas de la de semillas grandes de la población 4, el crecimiento transversal del tallo mostraba crecimiento continuo al momento de la cosecha de las plantas.

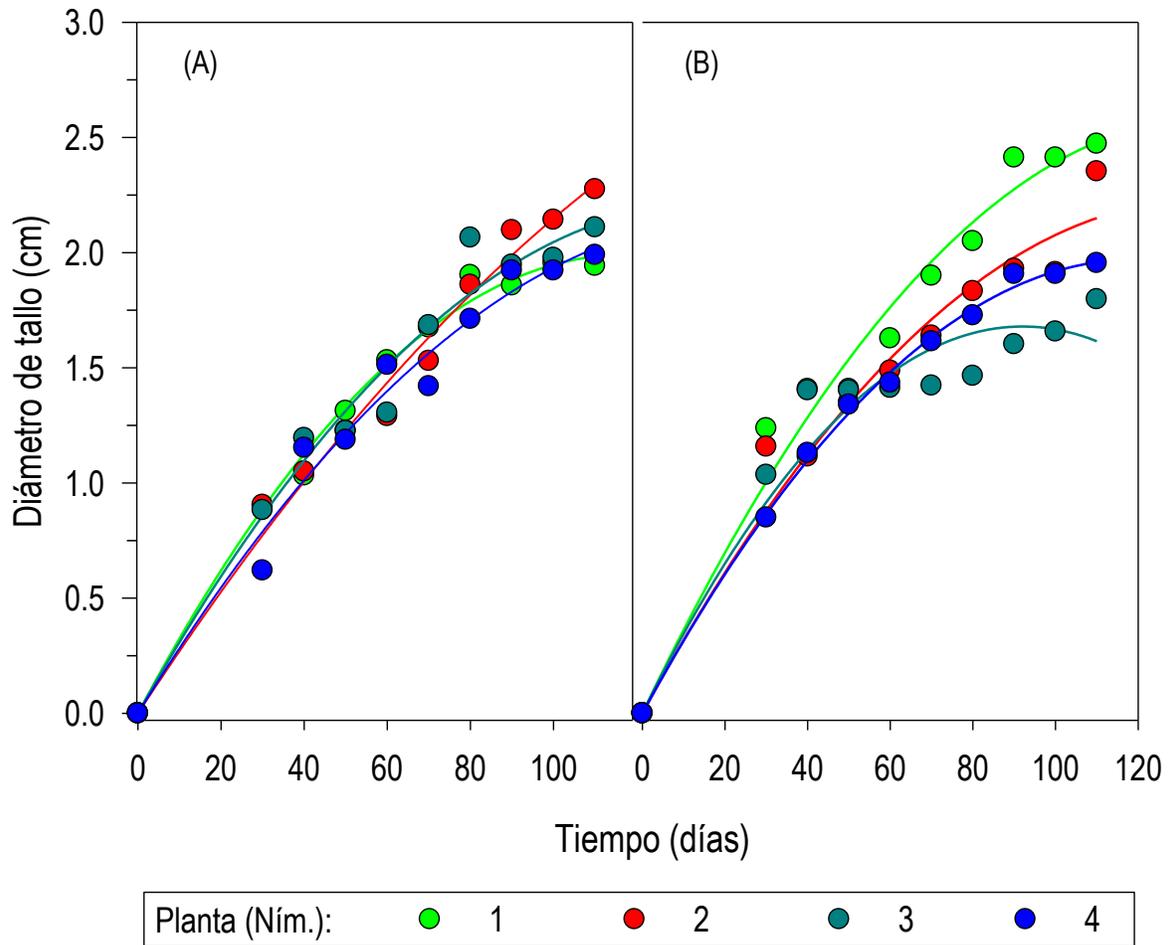


Figura 1.11. Diámetro del tallo de plantas de *Oenothera rosea* obtenidas de semillas chicas (A) o grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). Las plantas crecieron en invernadero, en turba, con riego diario, a 21.4°C y fotoperiodo natural; n = 10.

1.5.4.3 Anchura de la hoja

El crecimiento transversal promedio de la lámina foliar, durante el ciclo de crecimiento, mostró una tendencia Gaussiana ($y = y_0 + ae^{(-0.5(x-x_0/b)^2)}$); con r^2 entre

0.832 y 0.999 en todos los casos). El follaje de las plantas obtenidas con las semillas chicas mostró la anchura promedio mayor, alrededor de 12 mm, 60 DDS (Figura 1.12 A). La anchura foliar de las plantas de semilla grande incrementó del inicio hasta los 40 o 60 DDS y alcanzó valores máximos entre 10.86 y 12.48 mm. En los siguientes 40 o 50 días la anchura foliar promedio disminuyó en las plantas de los ocho grupos (Figura 1.12 B).

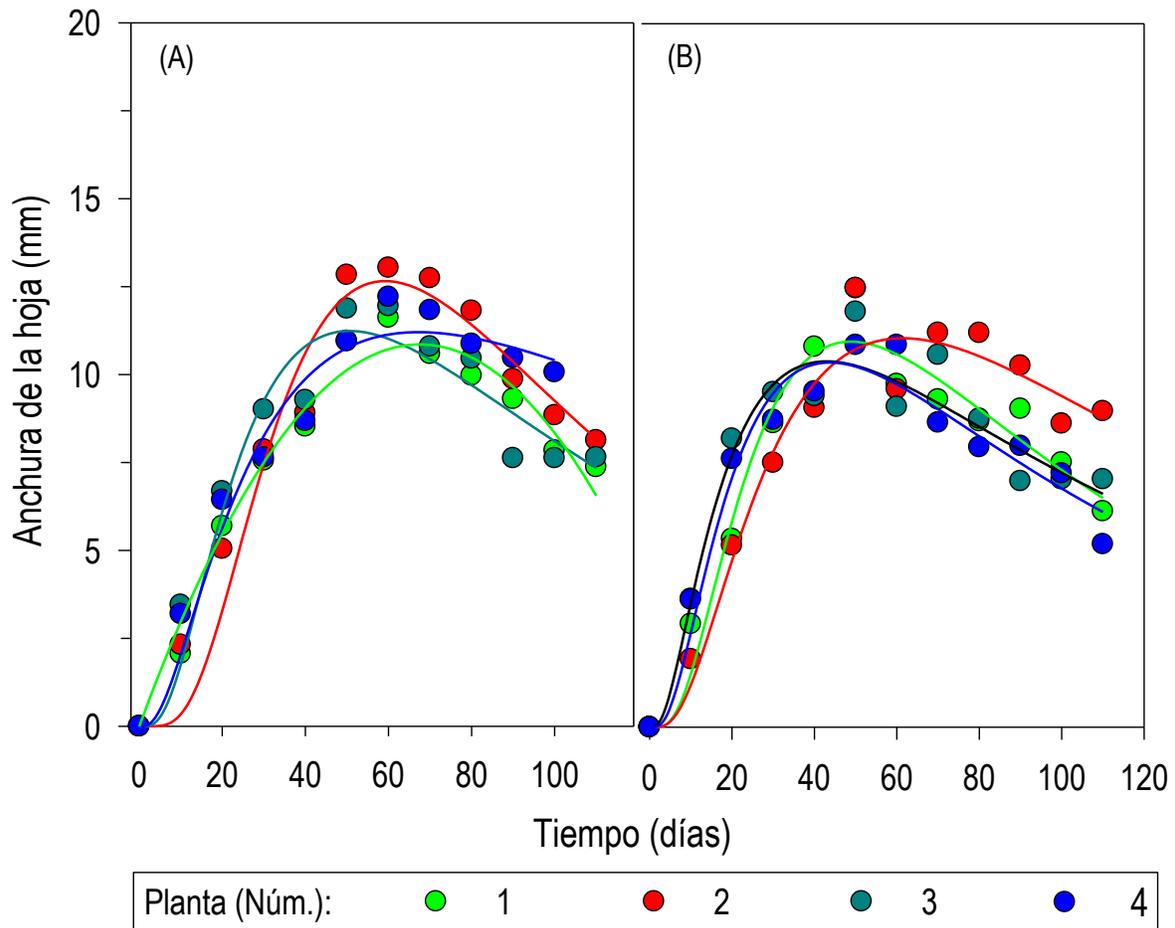


Figura 1.12. Anchura promedio de las hojas de plantas de *Oenothera rosea* obtenidas de semillas chicas (A) o grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). Las plantas crecieron en invernadero, en turba, con riego diario, a 21.4 °C y fotoperiodo natural; n = 10.

1.5.4.4 Longitud de la hoja

El crecimiento longitudinal promedio de la lámina foliar, durante el periodo de evaluación, mostró patrones diferentes dependientes del tamaño de semilla que originaron a las plantas. Las hojas en las plantas desarrolladas de las semillas chica de las cuatro poblaciones y de semilla grande de las poblaciones 1 y 4 describieron una tendencia Gausiana ($y = y_0 + ae^{(-0.5(x-x_0/b)^2)}$), con r^2 entre 0.981 y 0.999 en todos los casos. Las hojas de esas plantas mostraron longitud promedio máxima, alrededor de 12 mm, 60 DDS (Figura 1.13 A).

La anchura foliar de las plantas de semilla grande incrementó del inicio a los 40 o 60 DDS y alcanzó valores máximos entre 28.874 y 32.230 mm (Figura 1.13 A-B). En los siguientes 40 o 50 días la longitud foliar promedio disminuyó en las plantas de estos seis grupos. En contraste, la longitud foliar en las plantas obtenidas de las semillas grandes de las poblaciones 2 y se mantuvieron sin cambio con longitudes relativamente constantes, entre 28.557 y 28.874 mm (Figura 1.13 B).

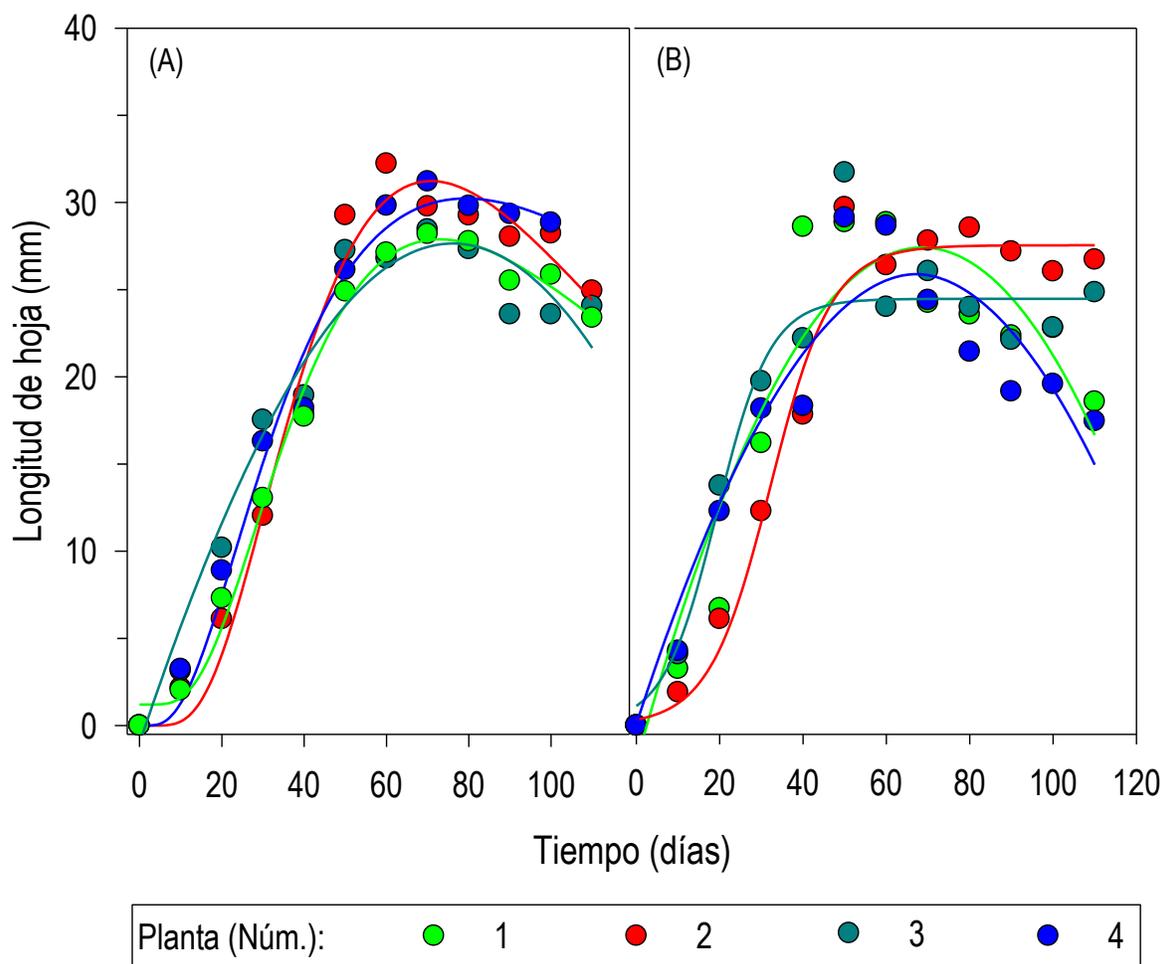


Figura 1.13. Longitud promedio de las hojas de plantas de *Oenothera rosea* obtenidas de semillas chicas (A) o grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). Las plantas crecieron en invernadero, en turba, con riego diario, a 21.4 °C y fotoperiodo natural.

1.5.4.5 Número de hoja por planta

El incremento del número de hojas en el periodo de evaluación se ajustó al tipo polinomial de segundo orden ($y = b_0 + xb_1 + x^2b_2$; $p \leq 0.05$ en todos los casos). Las plantas de las semillas de ambos tamaños expusieron hojas en el periodo completo de 110 días de cultivo. En promedio, las plantas de semillas chicas acumularon

hasta 15 y 17.5 hojas por planta y las derivadas de semilla grande presentaron máximos de 16.5 y 21.8 (Figura 1.14 A).

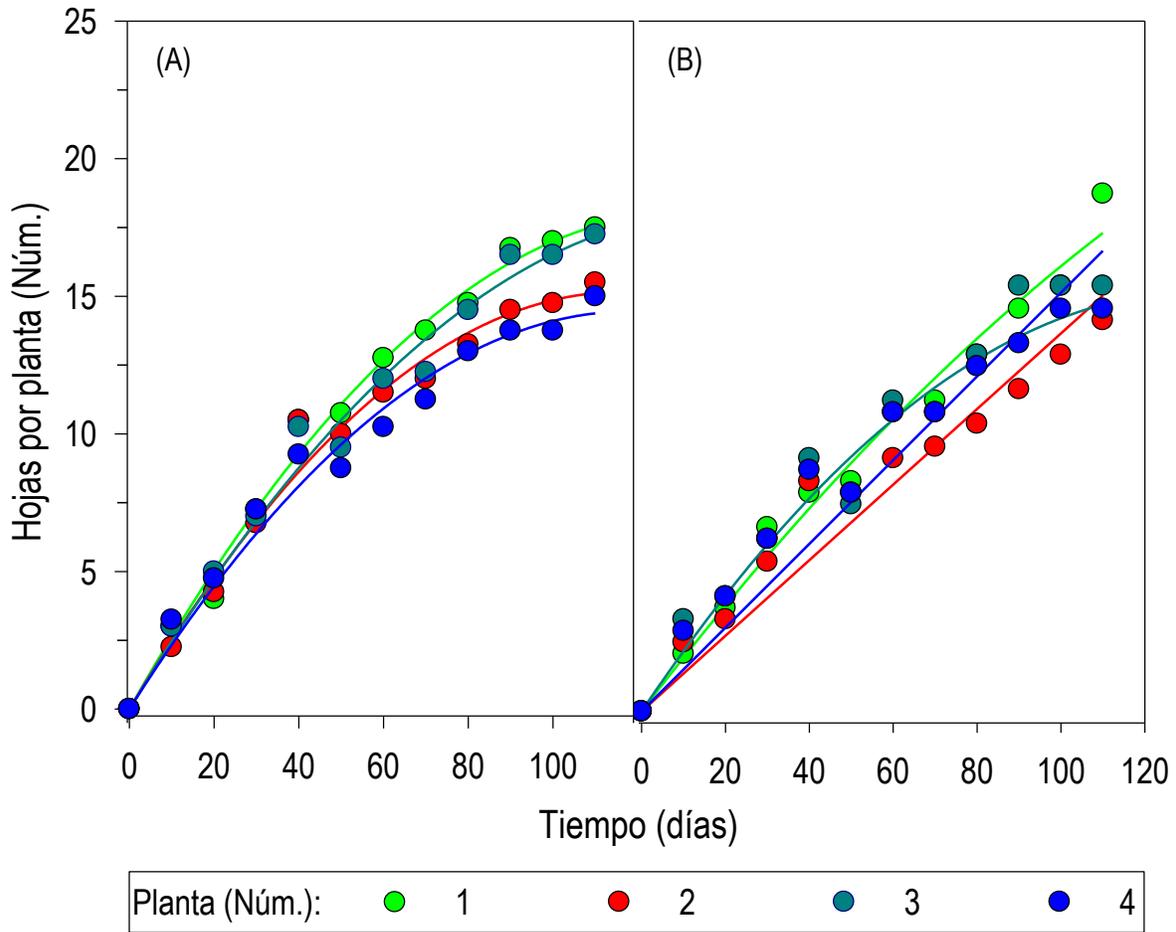


Figura 1.14. Número de hojas por planta de *Oenothera rosea* obtenidas de semillas chicas (A) o grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). Las plantas crecieron en invernadero, en turba, con riego diario, a 21.4 °C y fotoperiodo natural.

1.5.4.6 Otros componentes del rendimiento

Otras estructuras que se evaluaron, y son parte de los componentes del rendimiento, fueron ramas primarias, ramas secundarias, yemas florales, inflorescencias, cápsulas inmaduras y cápsulas maduras. Algunos de estos

componentes del rendimiento, como el número de las ramas secundarias y de las estructuras reproductivas, excepto el de las inflorescencias, continuaba incrementando independientemente del tamaño de la semilla que originó las plantas. Sin embargo, los valores máximos fueron en general mayores en las plantas obtenidas de las semillas grandes. Entre las cantidades de las estructuras destacaron las yemas florales y las cápsulas maduras, que a los 110 DDS eran 60 % y el doble más ($p \leq 0.05$) en estas plantas, respecto a las obtenidas de semillas chicas (Figura 1.15).

La biomasa se registró en hojas, tallos más ramas, raíz, yemas florales, inflorescencias y cápsulas. Las inflorescencias mantuvieron la biomasa sin cambios significativos entre los 50 y 110 DDS. En contraste, la biomasa de las yemas florales incrementó significativamente ($p \leq 0.05$) a partir de los 80 DDS. El incremento promedio mayor de estas estructuras reproductivas se observó (0.113 g) a los 100 DDS en las plantas derivadas de semillas chicas. En las plantas obtenidas de semillas grandes el incremento se mantuvo hasta los 110 DDS, pero en promedio representó (0.035 g) cerca de la cuarta parte que en las plantas derivadas de semilla chica (Figura 1.16 A-B).

El incremento significativo mayor ($p \leq 0.05$) de biomasa seca se observó, a los 110 DDS, en conjunto en el tallo y las ramas, en las hojas y en las cápsulas de ambos grupos de plantas. Sin embargo, en los tres casos las plantas obtenidas de semillas grandes presentaron hasta 40 % más que en las plantas obtenidas de semillas chicas (Figura 1.16 A-B).

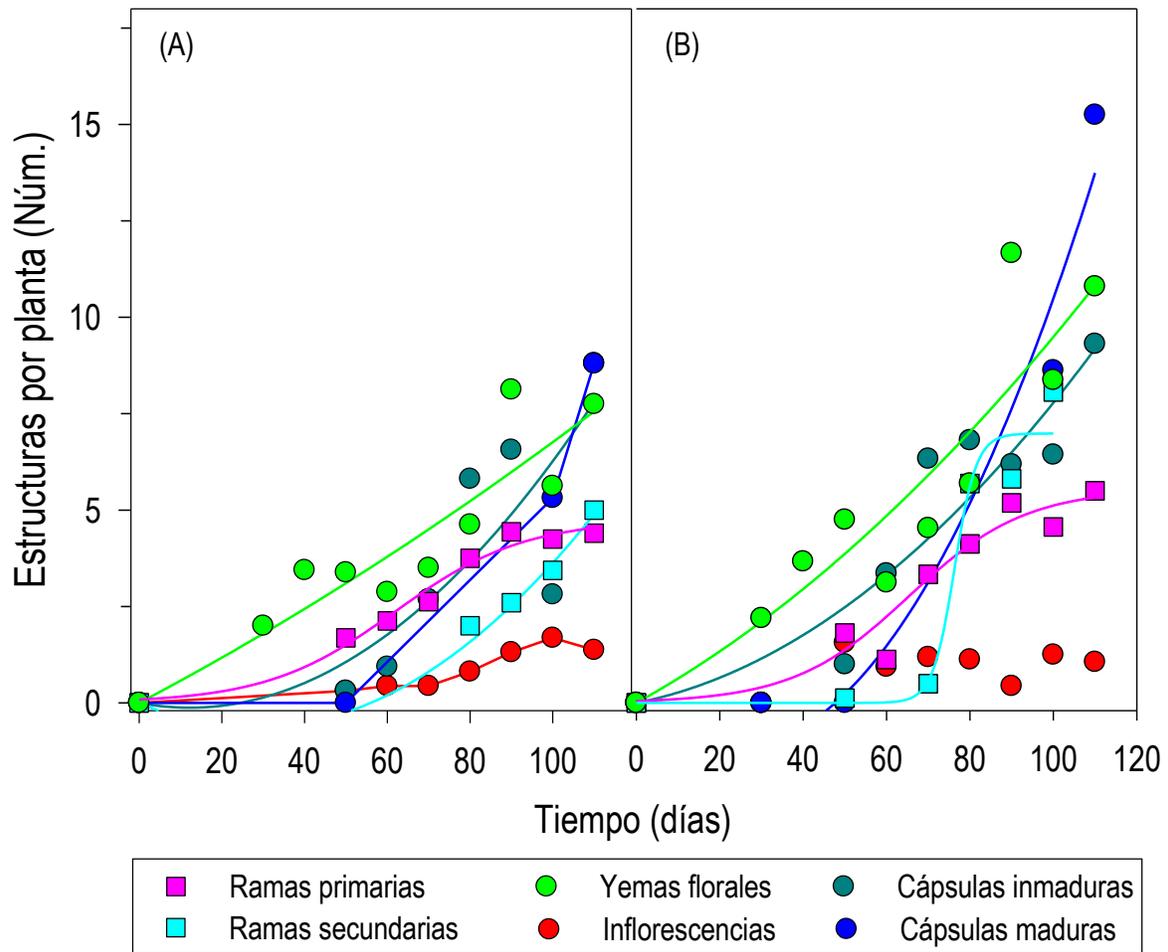


Figura 1.15. Número de estructuras vegetativas y reproductivas de plantas de *Oenothera rosea* obtenidas de semillas chicas (A) o grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). Las plantas crecieron en invernadero, en turba, con riego diario, a 21.4 °C y fotoperiodo natural.

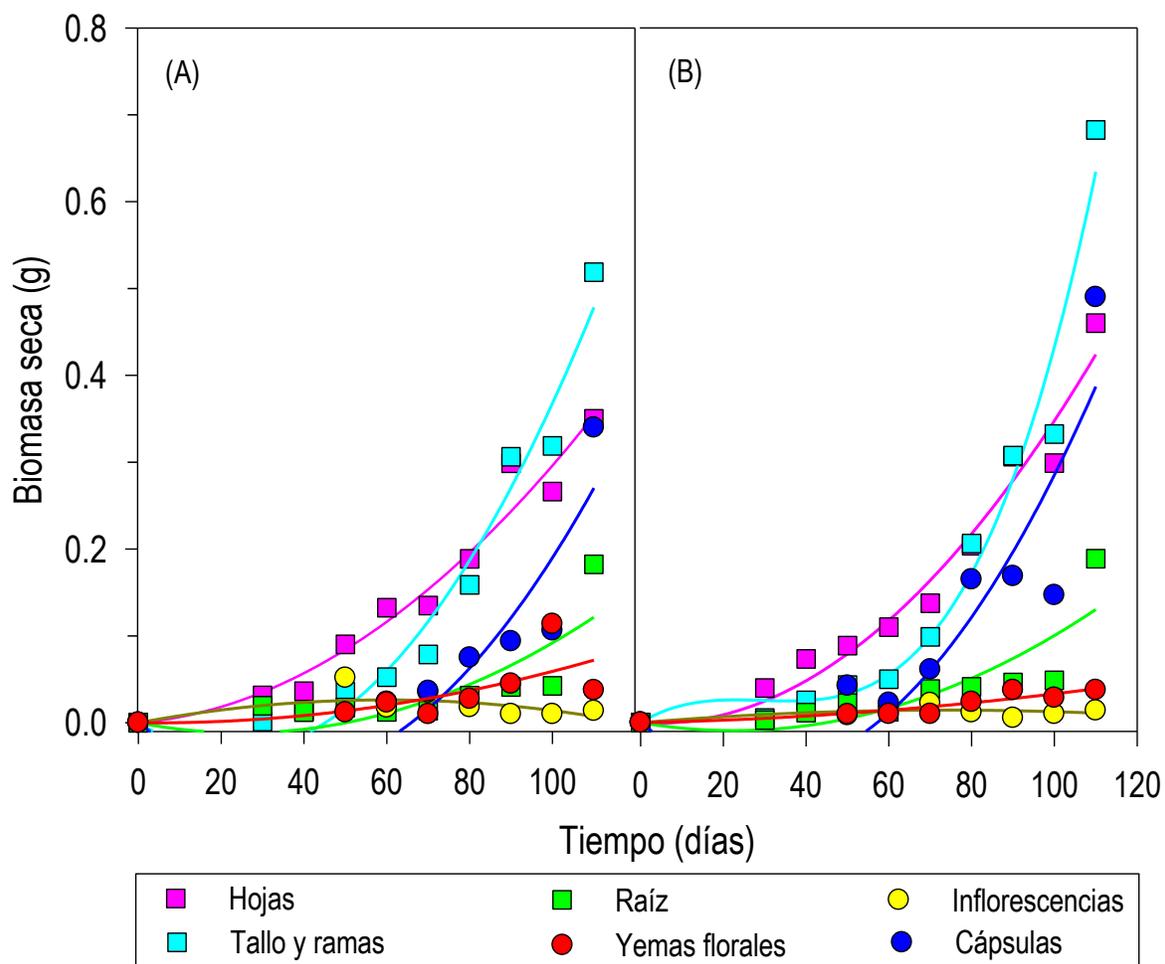


Figura 1.16. Biomasa seca acumulada en las estructuras vegetativas, estructuras reproductivas y raíz de plantas de *Oenothera rosea* obtenidas de semillas chicas (A) o grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). Las plantas crecieron en invernadero, en turba, con riego diario, a 21.4 °C y fotoperiodo natural.

Aunque la raíz tendió a incrementar su biomasa seca en los primeros 100 DDS, el incremento significativo se observó 10 días después, en ambos grupos de plantas; además, la biomasa máxima acumulada fue similar ($p > 0.05$) entre los grupos (Figura 1.16 A-B). En contraste con la estabilidad relativa de la biomasa en la raíz de ambos grupos, la longitud de esta estructura incrementó continuamente durante los 110 días. Esta característica fue significativamente diferente ($p \leq 0.05$) entre los

dos grupos de plantas a los 100 y 110 DDS. Las plantas obtenidas de las semillas grandes desarrollaron longitudinalmente hasta 27.2 % más su raíz respecto a las obtenidas de semillas chicas (Figura 1.17).

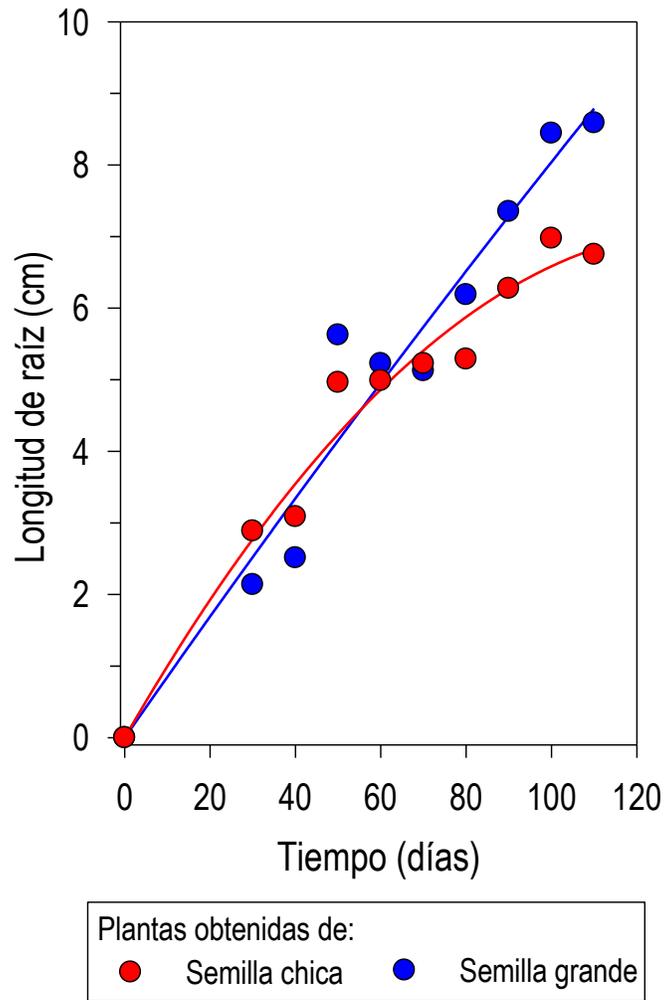


Figura 1.17. Longitud de la raíz de plantas de *Oenothera rosea* obtenidas de semillas chicas (A) o grandes (B), separadas a través de tamices con poro entre 0.500 y 0.250 mm, de cuatro plantas recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud). Las plantas crecieron en invernadero, en turba, con riego diario, a 21.4 °C y fotoperiodo natural.

1.6 DISCUSIÓN

El tamaño de la semilla es parte de la aptitud evolutiva en las plantas y un rasgo agronómico en la domesticación. Las semillas grandes acumulan más reservas nutritivas para la germinación y la emergencia de las plántulas que las semillas pequeñas y estas últimas son eficientes en la dispersión y la colonización (Moles *et al.*, 2005). En el presente estudio la variación del tamaño de semilla permitió separar sólo dos grupos de semillas, independientemente de la población. La variabilidad entre tamaños de semilla de las cuatro poblaciones de *O. rosea* mostró cierta amplitud, pero sobresalió que en dos de ellas la proporción de semillas chicas y grandes fuera significativamente similar y contrastó con las otras dos, en las que la abundancia de semillas grandes fue más del doble que las chicas. Además, la variabilidad dentro y entre poblaciones se confirmó con el coeficiente de variación (C.V.) que representó entre 8.14 %, en las semillas chicas de la población 4, y 46.81 %, en la población 2 del mismo tamaño de semillas. Desde el inicio de la agricultura, el tamaño mayor de semilla se ha seleccionado durante la domesticación de las plantas de cultivo (Fan *et al.*, 2008). En especies como *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* y *Glycine max* la variación del tamaño puede ser de varias decenas de veces. Sin embargo, la cuestión de cómo define la planta el tamaño de sus semillas es poco conocido (Li y Li, 2015).

En este estudio, para caracterizar las semillas evaluamos la variación en relación con el tamaño seminal original hasta la etapa reproductiva, incluyendo la germinación de las semillas, emergencia de las plántulas y crecimiento y desarrollo de las plantas en condiciones protegidas. Los resultados indicaron que el tamaño de semilla mayor proporciona ventajas para la germinación y el establecimiento de las plántulas; ya que sus porcentajes de germinación acumulada fueron los mayores ($p \leq 0.05$) y algunas de las variables que definen este proceso fisiológico fueron las más aceleradas que en las semillas pequeñas. Además, las semillas grandes también mostraron ventaja en el establecimiento de las plántulas. No obstante, la variabilidad en la germinación y la emergencia máxima acumulada dentro y entre poblaciones, las semillas chicas fueron notablemente más heterogéneas, ya que en el C.V. de la germinación varió entre 22.19 y 74.83 % (en las poblaciones 1 y 4) y

en la emergencia entre 18.31 y 40.47 % (en las poblaciones 3 y 4). En contraste, en ninguno de esos procesos para las semillas grandes el C.V. fue mayor de 22.22 %.

La latencia de la semilla se ha interpretado como el carácter que proporciona ventajas ecológicas y ajusta la germinación al período de crecimiento favorable. Sin embargo, muchas especies producen semillas no latentes, particularmente en bosques tropicales húmedos (Rubio de Casas *et al.*, 2017). En *O. rosea* la latencia contrastó significativamente entre los tamaños de semilla dentro y entre las poblaciones. La amplitud máxima dependiente del tamaño dentro de una misma población alcanzó 80 % de latencia en las semillas chicas y 40 % en las grandes. En contraste, las semillas chicas y grandes de otras poblaciones mostraron 23 y 10 % de latencia. Sin embargo, esas diferencias y porcentajes de latencia parecen poco relevantes ante la respuesta de las semillas para generar plántulas cuando las semillas se sembraron en turba vegetal. Aunque, el inicio de la germinación tomó entre 2 y 7 días y la emergencia entre 7 y 10 días, el incremento continuo, con tendencia sigmoidea, mostró que las semillas con la latencia mayor, las de la población 4, mostraron alrededor de 65 % (semillas chicas) y 92 % (semillas grandes) de emergencia en 32 días.

Los resultados de este estudio coincidieron parcialmente con los de Metz *et al.* (2010) en 49 especies anuales. Ellos mostraron que en las especies anuales el tamaño mayor de semilla mostró ventajas de supervivencia desde el establecimiento de las plántulas hasta la reproducción. El tamaño mayor de semilla también mostró ventaja en entornos temporalmente impredecibles. Los mismos autores observaron resultados contrastantes entre leguminosas y gramíneas y sugirieron que pueden deberse en parte a la disparidad en la latencia seminal. El efecto positivo de las semillas grandes sobre la germinación y el crecimiento temprano de las plantas se ha observado en otras especies, como trigo (*Triticum aestivum*) (Gan y Stobbe, 1995) y lenteja (*Lens culinaris*) (Erskine, 1996); en contraste, el tamaño de las semillas no mostró efecto sobre la germinación de semillas en otros estudios, en los que se evaluó lenteja y trigo de invierno (Al-Karaki, 1998; Mian y Nafziger, 1994). White *et al.* (1992) indicaron que el tamaño de la semilla estuvo asociado negativamente con el rendimiento de los cultivares de frijol

(*Phaseolus vulgaris* L.). En este caso, la variabilidad en las condiciones ambientales, como la adecuación de la humedad del suelo, se ha señalado que podría explicar algunas de las discrepancias (Jha *et al.*, 1985).

La relación positiva entre el tamaño de la semilla y la subsiguiente supervivencia de la descendencia es un supuesto clave en la teoría ecológica sobre las estrategias de la historia de la vida. Sin embargo, esta relación es incierta respecto de la supervivencia en el ciclo de la vida porque la evidencia sólida solo existe para las etapas iniciales de las plántulas. Además, Turnbull *et al.* (2012) aseguraron que las especies de semillas chicas algunas veces poseen adaptaciones adicionales, respecto a las de tamaño general, para el crecimiento acelerado. Esto conduce a que las especies de semilla chica muestren tasas de crecimiento mayores en las poblaciones en ambientes en los que la competencia es mínima.

En el presente estudio el tamaño de la semilla se asoció con ciertas variables del crecimiento de las plantas. Un caso fue la altura del tallo, que en promedio fue 12 % mayor en las plantas de semilla grande; pero, específicamente en la población 2 la diferencia alcanzó 35 %. El valor máximo de esta variable también fue heterogéneo entre y dentro de las poblaciones, independientemente del tamaño de semilla; ya que el C.V. varió entre 9.79 y 33.57 % en las plantas de semilla chica y 8.93 y 34.22 % en las de semilla grande. En contraste, salvo alguna excepción, el tamaño de la semilla del que provenían las plantas no favoreció el diámetro del tallo o la anchura, la longitud o el número promedio de las hojas durante el crecimiento en la cosecha.

Entre las variables evaluadas, las dimensiones de las hojas sobresalieron por su variabilidad, independientemente del tamaño de la semilla originaria. El C.V. de la anchura foliar, representó de 55.55 a 78.38 % en las plantas de semilla chica y en las plantas de semilla grande representó porcentajes de 66.62 a 95.52%. Además, el C.V. de la longitud foliar representó entre 56 y 79 % en las plantas de ambos tamaños de semilla. La heterogeneidad de ambas dimensiones foliares se debió a la exposición continua del follaje durante los 110 días de evaluación. En promedio durante los primeros 60 DDS las plantas de semilla chica incrementaron la anchura y la longitud de sus hojas; por lo que, cada una de estas variables incrementó casi

linealmente, en función del tiempo, en ese periodo inicial del crecimiento. Pero, en los siguientes 50 días ambas variables decayeron. La caída de la anchura y longitud promedio de las hojas se explica por la exposición de follaje nuevo, que, en este tiempo era angosto y corto por su exposición reciente. A lo anterior se sumaría el efecto de la defoliación natural en las plantas. La renovación del follaje se comprobó parcialmente con el incremento cercanamente lineal y lineal del número de hojas por planta de semilla chica y grande, respectivamente, del inicio hasta los 110 DDS. Las plantas de semilla grande de las poblaciones 2 y 3 mostraron contraste en el cambio de la longitud promedio de la hoja durante el crecimiento de las plantas. Esta variable tendió a mantenerse a partir de los 40 o 60 DDS. En contraste con la caída de la longitud foliar de las plantas de semilla chica y dos de semilla grande, estas plantas podrían haber mostrado menos defoliación, crecimiento longitudinal acelerado de las hojas expuestas en la última etapa del desarrollo o ambos.

Las etapas fenológicas de *O. rosea* mostraron traslape independientemente del tamaño de semilla. El traslape de las etapas fenológicas se ha documentado en tipos silvestres de *P. vulgaris* (Peña-Valdivia *et al.*, 2012). El crecimiento longitudinal del tallo, la exposición de follaje y ramas primarias y secundarias y el incremento de la biomasa de estas estructuras definen la etapa vegetativa en herbáceas domesticadas, como frijol, maíz, chícharo, trigo, avena y otras especies (Peña-Valdivia *et al.*, 2012). En las plantas del presente estudio estas estructuras continuaron creciendo, en longitud, número o biomasa, cuando inició y durante la etapa reproductiva. Esta última que inicia con la exposición de yemas florales continua con la exposición de inflorescencias y frutos, generalmente consume las reservas y fotoasimilados de órganos vegetativos. Por lo que, estos disminuyen o detiene su crecimiento. En las plantas de *O. rosea* además del crecimiento de estructuras vegetativas durante los 110 DDS, la exposición continua de yemas florales desde los 30 DDS se traslapó con la formación de cápsulas y su maduración. Además, las plantas de semilla grande presentaron significativamente más número y biomasa de yemas florales y cápsulas maduras en la cosecha. El crecimiento en algunas estructuras vegetativas y reproductivas fue mayor en las plantas de semilla grande y coincidió con el crecimiento mayor de la raíz. Pérez *et*

al. (2006) observaron efecto del tamaño de semilla en la longitud y biomasa seca acumulada en la raíz de plantas de maíz para forraje. Los autores señalaron que el crecimiento mayor de este órgano se asocia con el tamaño mayor del embrión de las semillas, ya que contienen más reservas que resultan en plántulas más grandes y capacidad mayor para crecer.

Los resultados permiten sugerir que en *O. rosea* existe un posible vínculo entre el control del tamaño de la semilla y el crecimiento de los órganos de la planta. Aunque, el tamaño de las semillas y de los órganos pueden estar relacionado positiva o negativamente. Al respecto, Turnbull *et al.* (2012) indicaron que las semillas y los órganos pueden poseer vías comunes y distintas para controlar su tamaño respectivo.

1.7 CONCLUSIONES

Las semillas silvestres de *O. rosea* muestran cierta homogeneidad en tamaño de semilla dentro y entre poblaciones; estas semillas expresan su potencial germinativo en condiciones estándar de laboratorio e invernadero. Las semillas de esta especie muestran entre 10 y 70 % de latencia en dependencia del tamaño de semillas y de la población. La multiplicación sexual de esta especie en condiciones protegidas permite la multiplicación y desarrollo de las plantas hasta el final de la etapa reproductiva; por lo que, en esas condiciones puede obtenerse follaje y tallos con uso potencial en herbolaria y plantas para ornato. Además, ya que, durante el desarrollo, las etapas fenológicas se traslapan por lo que las plantas en cultivo permitirían disponibilidad de plantas en las etapas diversas de desarrollo durante el cultivo.

El tamaño de la semilla está asociado significativamente la altura del tallo, el número de yemas florales, el número de cápsulas maduras y longitud de la raíz después de 110 días de cultivo. Aunque otras variables del crecimiento, como el diámetro del tallo y la anchura, la longitud o el número promedio de las hojas durante el crecimiento fueron independientes del tamaño de la semilla

1.8 LITERATURA CITADA

- Al-Kataki G. N. 1998. Seed size and Water Potential Effects on Water Uptake, Germination and Wrowth of Lentil. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 181: 237-242.
- Almora Pinedo, Y., Arroyo-Acevedo, J. L., Herrera-Calderón, O., Chumpitaz Cerrate, V. M., Hañari Quispe, R., Tinco Jayo, J. A., Figueroa Salvador, L. 2017. Preventive effect of *Oenothera rosea* on N-methyl-N-nitrosourea- (NMU) induced gastric cancer in rats. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, Volume 10, 327–332.
- Ávalos-García, A., & Pérez-Urrutia, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.
- Brakke, M. P., & Gardner, F. P. (1987). Juvenile Growth in Pigeonpea, Soybean, and Cowpea in Relation to Seed and Seedling Characteristics¹. *Crop Science*, 27(2), 311.
- Brunner, I., Herzog, C., Dawes, M. A., Arend, M., & Sperisen, C. 2015. How tree roots respond to drought. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Calva-Candelaria N., Meléndez-Camargo M. E., Montellano-Rosales H., Estrada-Pérez A. R., Rosales-Hernández M. C., Fragoso-Vázquez M. J., Martínez-Archundia M., Correa-Basurto J., Márquez-Flores J. K. 2018. *Oenothera rosea* L'Hér. ex Ait attenuates acute colonic inflammation in TNBS-induced colitis model in rats: *in vivo* and *in silico* myeloperoxidase role. *Biomed. Pharmacotherapy* 108: 852-864.
- CONABIO. 2019. Heike vibrans (ed.). Malezas de México. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/onagraceae/oenothera-rosea/fichas/ficha.htm>. enero, 2019
- Erskine W. 1996. Seed-size effects on lentil (*Lens culinaris*) yield potential and adaption to temperature and rainfall in West Asia. *The Journal of Agricultural Science*, 126(3), 335.
- Espinosa G. F., Sarukhán, J. 1997. Manual de malezas del Valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 407 pp.

- Fan C., Yu S., Wang C., Xing Y. 2008. A causal C-A mutation in the second exon of GS3 highly associated with rice grain length and validated as a functional marker. *Theoretical and Applied Genetics*. 118(3), 465–472.
- Finch-Savage W. E.; Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171: 501-5023.
- Gan Y., Stobbe E. H. 1995. Effect of variations in seed size and planting depth on emergence, infertile plants, and grain yield of spring wheat. *Canadian Journal of Plant science*,75(3), 565-570.
- García E .1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana), 4a edn. UNAM, México. 75-90
- Gomez-Flores, R., Reyna-Martínez, R., Tamez-Guerra, P., & Quintanilla-Licea, R. 2012. Antibacterial Activity of *Oenothera rosea* (L. 'Hér) Leaf Extracts. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 2(3), 396-404.
- Gómez J. M., Husband B. 2004. Bigger is not always better: conflicting selective pressures on seed size in *Quercus ilex*. *Evolution* 58: 71–80.
- ISTA. International Seed Testing Association (ISTA). 2005. International rules for seed testing. *Seed Sci. Technol.* 27 (suppl):
- Jha B. N., Sinha S. K., Singh C. N. 1985: Effect of seed size on yield in wheat. *Seed Res.* 13: 24-27.
- Kalakanavar R. M.; Shashidhara S. D.; Kulkarni G. N. 1989: Effect of grading on quality of wheat seeds. *Seed Research* 17: 182-185.
- Kesavan M., Song J. T., Seo H. S. 2013. Seed size: a priority trait in cereal crops. *Physiologia. Plantarum.* 147: 113-120.
- Kitajima K., Fenner M. 2000. Ecology of seedling regeneration. In: Fenner M. (Ed.). *Seeds: ecology of regeneration in plant communities*. Wallingford, UK: CABI Publishing, pp. 331–360.
- Kitajima K., Myers J. A. 2008. Seedling ecophysiology: strategies towards achievement of positive net carbon balance. In: Leck M. A., Parker V. T.,

- Simpson R. L. (Eds). Seedling ecology and evolution. Cambridge University Press, Cambridge, UK. Pages 172–188
- Li N., Li Y. 2015. Maternal control of seed size in plants. *Journal of Experimental Botany*, 66: 1087-1097
- Metz J., Liancourt P., Kigel J., Harel D., Sternberg M., Tielbo K. 2010. Plant survival in relation to seed size along environmental gradients: a long-term study from semi-arid and Mediterranean annual plant communities. *Journal of Ecology*, 98: 697–704.
- Milan M. A. R.; Grabe D. F. 1994: Seed size and water potential effects on germination and seedling growth of winter wheat. *Crop. Science*. 34: 169-171.
- Moles A. T., Ackerly D. D., Webb C. O., Tweddle J. C., Dickie J. B., Westoby M. 2005. A brief history of seed size. *Science* 307: 576-580.
- Pacala S. W., Rees M. 1998. Models suggesting field experiments to test two hypotheses explaining successional diversity. *Amer. Naturalist* 152: 729-737.
- Peña-Valdivia C. B., Aguirre-Rivera J. R., Arroyo-Peña V. B. 2012. El frijol: Síndrome de domesticación. Editorial del Colegio de Postgraduados. México. 198 p.
- Pérez M. C., Hernández L. A., González C. F. V., García de los Santos G., Carballo C. A., Vásquez R. T. R., Tovar G. M. R. 2006. Tamaño de semilla y relación con su calidad fisiológica en variedades de maíz para forraje. *Agricultura Técnica en México*. 32: 341-352.
- Poorter L., Wright S. J., Paz H., Ackerly D. D., Condit R., Ibarra-Manríquez G., Harms K. E., Licona J. C. 2008. Are functional traits good predictors of demographic rates Evidence from five Neotropical forests. *Ecology* 89: 1908–1920.
- Radchuk V, Borisjuk L. 2014. Physical, metabolic and developmental functions of the seed coat. *Frontiers in plant Science*. 5: 510.
- Rees M., Venable D. L. 2007. Why do big plants make big seeds *Journal of Ecology*, 95: 926–936.

- Rubio de Casas R., Willis C. G., Pearse W. D., Baskin C. C., Baskin J. M., Cavender-Bares J. 2017. Global biogeography of seed dormancy is determined by seasonality and seed size: a case study in the legumes. *New Phytol.* 214: 1527–1536.
- Rzedowski J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa, México, 432 p.
- Rzedowski, J. de Rzedowski G. C. 1957. Notas sobre la flora y la vegetación del estado de San Luis Potosí, V. La vegetación a lo largo de la carretera San Luis Potosí-Río Verde. *Acta Científica Potosina*. 1: 7-68.
- Turnbull L. A., Philipson C. D., Purves D. W., Atkinson R. L., Cunniff J., Goodenough A., Hautier Y., Houghton J., Marthews T. R., Osborne C. P., Paul-Victor C., Rose K. E., Saner P., Taylor S. H., Woodward F. I., Hector A., Rees M. 2012. Plant growth rates and seed size: are-evaluation. *Ecology* 93: 1283-1289.
- Venable D. L., Rees M. 2009. The scaling of seed size. *Journal. Ecol.* 97: 27-31.
- Villarreal Q. J. A. 1983. *Malezas de Buenavista saltillo*. UAAAN. Primera edición. Saltillo, Coahuila. 269 p.
- Villaseñor-Ríos J. L., Espinosa-García F. J. 1998. *Catálogo de malezas de México*. Fondo de Cultura Económica. 448 p.
- White I W., Singh S. P., Pino C., Rios M. J., Buddenhagen I. 1992: Effect of seed size and photoperiod response on crop growth and yield of common bean. *Field Crops Research*. 28: 295-307.
- Vivanco J. M., E. Cosío, V. V. Loyola, E. H. Flores. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia Febrero*: 68-74.

CAPÍTULO II. METABOLITOS SECUNDARIOS EN HOJAS Y TALLO DE

Oenothera rosea L. 'Hér. ex Ait

2.1 RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de los grupos principales de metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos, saponinas y terpenos en hojas y tallos de plantas recolectadas *in situ* y de las desarrolladas en invernadero con semillas chicas y grandes de *O. rosea*. Las recolectas se hicieron en marzo y abril de 2018, en cuatro poblaciones silvestres, a los alrededores de Barrio San Pedro, Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz. La hipótesis fue que los tejidos de las plantas cultivadas en condiciones protegidas contienen los mismos grupos de metabolitos secundarios que los de las plantas *in situ*. Con la prueba no paramétrica Mann-Whitney se comparó la presencia de los metabolitos en las muestras de hoja y tallo de plantas de ambas procedencias y ambos tamaños de semilla. Los extractos de acetato de etilo mostraron presencia leve de terpenos sin variabilidad entre hojas y tallos del sitio original e invernadero. En los extractos de etanol la diferencia en presencia de fenoles fue significativa ($P \leq 0.05$) entre tallos de plantas de invernadero de ambos tamaños de semilla. Los extractos de metanol mostraron diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las muestras de los sitios, en contraste con las hojas de plantas de semilla chica y grande en la presencia de alcaloides, saponinas y terpenos, y entre tallos de las plantas *in situ* e invernadero con semilla chica en flavonoides. Las plantas cultivadas en invernadero mostraron presencia menor de metabolitos secundarios.

2.2 ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the presence of the main groups of secondary metabolites: alkaloids, flavonoids, phenols, tannins, saponins and terpenes in leaves and stems of *O rosea* plants collected *in situ* and those developed in greenhouse with small and large seeds. The collections were made in March and April 2018, in four wild populations, around San Pedro District, Tepepa, Municipality of Tlaquilpa, Veracruz. The hypothesis was that the tissues of plant grown under protected conditions include the same groups of secondary metabolites as those of plants *in situ*. With the non-parametric Mann-Whitney test, the presence of metabolites in leaf and stem samples of plants from both origins and both seed sizes were compared. The ethyl acetate extracts showed slight occurrence of terpenes without variability between leaves and stems from the original site and greenhouse. Difference in the occurrence of phenols was significant ($P \leq 0.05$) between stems of greenhouse plants of both seed sizes in the ethanol extracts. The methanol extracts showed significant difference ($P < 0.05$) between site samples, in contrast to alkaloids, saponins and terpenes in leaves of small and large seed plants, and in flavonoids between stems of the *in situ* and greenhouse plants with small seed. Plants grown in greenhouse show less presence of secondary metabolites.

4.3 INTRODUCCIÓN

El metabolismo es el conjunto de reacciones bioquímicas de las células vivas con las que sintetizan sustancias complejas a partir de otras simples o degradan las complejas. Las plantas destinan una cantidad significativa del C asimilado y de la energía metabolizable a la síntesis de una variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en el desarrollo, fotosíntesis, respiración, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos o lípidos. Esos compuestos se denominan metabolitos secundarios, productos secundarios o productos naturales (Ávalos-García y Pérez-Urrutia, 2009). El conjunto de reacciones bioquímicas que sintetizan esos compuestos se denomina metabolismo secundario (Okumoto *et al.*, 2016).

Algunos de esos compuestos se han identificado como protección química contra estrés biótico y abiótico, como daño ocasionado por heridas e invasión de insectos o microorganismos patógenos (Croteau *et al.*, 2000).

El metabolismo secundario incluye biosíntesis, transformación y degradación enzimática de compuestos endógenos y se clasifican según su significación biológica y caminos metabólicos en la célula productora (Valdés y Balbín, 2000). La diversidad química de los metabolitos secundarios es amplia y sus concentraciones en todos los tejidos vegetales adultos es variable (Vivanco *et al.*, 2005). Esos compuestos varían entre poblaciones, individuos, estadios de desarrollo, tejidos y pueden presentarse específicamente en sólo un órgano (Wink, 2003).

Por lo anterior, las plantas son fuente de una diversidad de productos metabólicos con importancia comercial, ya que son materia prima en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmetológica. La riqueza de metabolitos secundarios en las plantas es evidente, pues continuamente se describen e identifican productos nuevos con actividad biológica (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Los metabolitos secundarios principales se han clasificado de acuerdo con su naturaleza química:

-Alcaloides. Estos compuestos son estructuras cíclicas, con N en estado de oxidación negativo. La distribución de los alcaloides es limitada entre los organismos vivos, gran parte de ellos es insoluble o poco soluble en agua, y forman sales al reaccionar con ácidos. Los alcaloides constituyen un grupo homogéneo por su naturaleza química, bioquímica, fisiológica y ecológica (Anaya, 2003).

-Compuestos fenólicos y polifenoles. Los compuestos fenólicos incluyen en su estructura uno o más anillos de benceno (anillos aromáticos) con grupos hidroxilo, que en la naturaleza generalmente se encuentran como glucósidos, y son semi-solubles en agua (Rasouli *et al.*, 2017). Estos compuestos desempeñan un papel crítico en la adaptación de las plantas a su entorno (Oh *et al.*, 2010). El grupo engloba más de 8 000 compuestos (Yue *et al.*, 2016).

Por su actividad como antioxidantes, los polifenoles pueden proteger las células contra el daño oxidativo y limitar en humanos el riesgo de algunas enfermedades degenerativas, asociadas al estrés oxidativo, causado por los radicales libres (Martínez *et al.*, 2002). Además, los polifenoles ha mostrado eficacia en el tratamiento de enfermedades humanas como el cáncer, diabetes mellitus, obesidad, trastornos relacionados con el envejecimiento, riesgo cardiovascular y enfermedad de Alzheimer (Nojehdehi *et al.*, 2018).

Entre los factores que pueden afectar las concentraciones de los polifenoles en las plantas están los ambientales, como la exposición al sol, disponibilidad de humedad, y otros como tipo de cultivo, nivel de maduración, tiempo de cosecha o almacenamiento (Van der Sluis *et al* 2001).

Los compuestos fenólicos se clasifican en dos grupos principales: flavonoides y no-flavonoides (Botelho *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2017). A los flavonoides, además de su actividad antioxidante comprobada, se les ha atribuido otros efectos terapéuticos como actividades cardiotónicas, antiinflamatorias, hepatoprotectora, antineoplástica, antimicrobial. antialérgicos, antiulcéricos, antiagregante plaquetario (sobre todo

antocianósidos y derivados de flavonas y flavonoles) y diuréticos (Villar, 1999; Bellester *et al.*, 2006; Barrón *et al.*, 2011).

Actualmente existe una variedad de métodos para la extracción, purificación, cuantificación e identificación de compuestos fenólicos. Existe correlación positiva entre el tipo de compuestos fenólicos y el método de extracción de fuentes naturales. Básicamente, existen cinco métodos para su extracción (Ajila *et al.*, 2011): (1) extracción con disolventes, (2) extracción de líquido presurizado, (3) extracción asistida por ultrasonido, (4) extracción asistida por microondas y (5) extracción supercrítica. Además, los procedimientos convencionales de extracción líquido-líquido y sólido-líquido se utilizan frecuentemente en estos métodos (Brglez *et al.*, 2016). Las estructuras de polifenoles son tales que cada método para su extracción tiene un protocolo de separación específico. El tiempo requerido para la extracción, la estructura química y los disolventes orgánicos son cruciales en el procedimiento de extracción. Dado que los compuestos fenólicos se unen a la matriz de la pared celular a través de un enlace glucosídico-éster, su solubilidad en agua puede ser reducida. Los estudios demostraron que varios métodos de extracción requieren un antioxidante como estabilizador básico.

Los alcoholes son otros disolventes adecuados para la extracción (Ignat *et al.*, 2011). Este es el caso del metanol y el etanol, que son los disolventes más utilizados para la separación de estilbenos de fuentes naturales. Estos disolventes también se utilizan para la extracción de otras familias de polifenoles. Los compuestos fenólicos extraídos de los tejidos pueden cuantificarse con métodos colorimétricos, como los que se usan para determinar y cuantificar fenoles totales. Es el caso del método en el que utiliza reactivo de Folin-Ciocalteu, con molibdato y tungstato sódico que son agentes oxidantes que reacciona con los fenoles (Gutiérrez *et al.*, 2018).

Taninos. Estos compuestos son fenoles secundarios con masas moleculares de 500 a más de 20000 unidades de masa atómica. Los taninos son bioactivos como antioxidantes y antimicrobianos. También se utilizan como antisépticos y astringentes (Tabasum *et al.*, 2001).

En la naturaleza se encuentran dos tipos de taninos: condensados e hidrolizables, según su estructura química. Los taninos condensados o pro-antocianidínicos, se liberan mediante hidrólisis ácida. Las antocianinas son compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides y están, en forma de pigmentos en flores, frutos, bayas y hojas con variedad de estructuras químicas y concentraciones típicas de cada tejido y especie.

Los taninos hidrolizables son más pequeños que los taninos condensados y se hidrolizan con más facilidad. La mayoría tiene masa molecular entre 600 y 3000 una, su hidrólisis ácida libera ácido gálico o ácido elágico (Álvarez, 2007).

Saponinas, del latín *sapo* que significa jabón, son compuestos glucosídicos, coloidales hidrosolubles que producen espuma cuando se agita la solución acuosa y son agentes emulsionantes. Muchos de estos glucósidos tienen la fórmula general $C_nH_{2n-8}O_{10}$, poseen en su estructura glucona y aglucona. La parte glucona la integran azúcares simples de 1 a 5 unidades y la parte aglucona, conocida como sapogenina, tiene un esqueleto de tipo triterpénico (C30) o de tipo esteroidal (C27). La diferencia entre ellos es que el tipo esteroidal ha eliminado 3 de sus radicales metilo y presenta un sistema policíclico característico de esterano; algunos de los triterpénicos no poseen el esterano y conservan los radicales metilo en su estructura (Hernández Royero, 1997; Rojas, 2015).

Saponinas. Las saponinas presentan actividades biológicas como: antimicrobiana, anticancerígena, antifúngica, antiinflamatoria, analgésica, adrenocorticotrópica, antiulcerante, hemolítica, espermicida, hipoglicemiante, insecticida, contraceptiva, cardiovascular, cicatrizante, citotóxica, espasmolítica y expectorante (Man *et al.*, 2010). Además, a las saponinas se les atribuye un efecto protector contra cáncer de estómago e intestino, unirse al colesterol alimentario en el intestino, con lo que disminuyen el colesterol sérico; también, puede captar los ácidos biliares primarios y facilitan su eliminación del cuerpo (Gee, 1989; Cheeke, 2000; Bruneton, 2001).

Terpenos. Los terpenos forman un grupo abundante de componentes vegetales con origen biosintético común. Aunque, esas estructuras proceden del mismo proceso

de condensación, el número variable de unidades isoprénicas genera estructuras químicas distintas. La ruta biogenética inicia por condensación de dos moléculas de AcCoA, lo que resulta en acetoacetil-CoA, que al condensarse con otra molécula de AcCoA origina 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA. Este compuesto se reduce químicamente y produce ácido mevalónico (3,5-dihidroxi-3-metilvaleriánico) que por fosforilación y descarboxilación se transforma en isopentenilpirofosfato (IPP), el que por isomerización da lugar a dimetilalil-pirofosfato (DAMPP), que es un compuesto altamente reactivo. La condensación, por unión “cabeza-cola” de estos dos últimos compuestos origina el geranil-pirofosfato (GPP) que posee 10 átomos de carbono y es precursor de un gran número de principios activos vegetales (monoterpenos, iridoides, algunos alcaloides, y otros). El acoplamiento a este GPP de nuevas unidades de IPP origina moléculas con peso molecular mayor, e incremento del número de carbonos de cinco en cinco: sesquiterpenos (C-15), diterpenos (C-20), triterpenos (C-30).

En el grupo de terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos, son parte del grupo de aceites esenciales obtenidos de plantas aromáticas por expresión o extracción con disolventes orgánicos y destilación. Los derivados de monoterpenos correspondientes a los iridoides, lactonas sesquiterpénicas son parte de los principios amargos y algunos diterpenos poseen actividades farmacológicas (Carreras, 2012).

Oenothera rosea es una herbácea anual o perenne, identificada como arvense porque se distribuye en los alrededores de campos de cultivo, además en encinares, bosques de coníferas, pastizales, matorrales xerófilos. Esta especie se ha identificado en 25 de las 33 entidades federativas en México (Villaseñor-Ríos y Espinosa-García, 1998). *Oenothera rosea* ha tomado relevancia por sus propiedades terapéuticas; esta especie se ha utilizado tradicionalmente como analgésico, desinfectante, desinflamante y cicatrizante, para padecimientos digestivos y control de esterilidad, trastornos menstruales, padecimientos renales y tos y para disminuir el dolor de cabeza y estómago (Calva-Candelaria *et al.*, 2018). Las infusiones de estas plantas se utilizan por sus efectos antibacterianos y

anticoagulantes en Perú (Gómez-Flores *et al.*, 2012). De acuerdo con los signos histopatológicos, la actividad antioxidante *in vivo* y los parámetros hematológicos y bioquímicos, la administración del extracto etanólico de *O. rosea* en ratas tuvo efecto protector del cáncer gástrico, generado experimentalmente; por lo que, *O. rosea* podría evaluarse en ensayos clínicos en pacientes con el padecimiento similar (Almora-Pinedo *et al.*, 2017).

En las hojas de *O. rosea* se ha identificado la presencia de flavonoides, fenoles y taninos en mayor concentración y saponinas, quinonas y alcaloides en concentraciones menores; las concentraciones menores de este último grupo de compuestos evitan la toxicidad en humanos (Huari *et al.*, 2017). Johnson *et al.* (2014) también documentaron en las hojas de esa especie flavonoides, alcaloides, quinonas, saponinas, fenoles, taninos, ácido cafeico, elágico y p-cumárico, vitamina C, calcio, fosforo y fibra (celulosa y lignina). El contenido de metabolitos secundarios del tipo fenólicos en las hojas fue mayor en la etapa de floración (Johnson *et al.*, 2014). Además, mediante grafía química, durante la floración (entre enero y marzo) se determinaron los contenidos mayores de fenoles, flavonoides y taninos (Porrás *et al.*, 2011).

Las raíces de *O. rosea* también presentó taninos, representados principalmente por ácido gálico; además, en un extracto con metanol, sus semillas presentaron entre 65 y 80 % de ácido linoleico (ácido cis-linoleico), entre 8 y 14 % de ácido gamma linolénico (cis-g-linolénico), 6 a 11 % de ácido oleico, 7 a 10 % de ácido palmítico y 1.5 a 3.5 % de ácido esteárico, aspártico y glutámico (Márquez-Flores *et al.*, 2009).

El objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de los grupos principales de metabolitos secundarios *i.e.* alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos, terpenos y saponinas en hojas y tallos de plantas desarrolladas en invernadero y compararla con la de los tejidos recolectados *in situ*. La hipótesis fue que los tejidos de las plantas cultivadas en condiciones protegidas incluyen los mismos grupos de metabolitos secundarios que los de las plantas *in situ*.

4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 Localización del sitio experimental

El estudio se realizó en los Laboratorios de Biofísica Vegetal, Fisiología Vegetal Ambiental y el laboratorio de fitoquímica del Posgrado en Botánica y un invernadero del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México (19° 27' N, 98° 54' O, 2220 m de altitud y clima Cb(w_o)(w)(i')g, con lluvias en verano e invierno frío y seco; García, 2004).

4.4.2 Tejido vegetal

Semillas de *O. rosea* se obtuvieron de cápsulas recolectadas, en marzo y abril de 2018, en cuatro poblaciones a los alrededores de Barrio San Pedro, Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz (18° 36' 29" N, 97° 07' O y 2434 m de altitud, con clima templado húmedo y lluvias abundantes en verano) (García, 1988).

Las semillas se clasificaron con un grupo de tamices, con abertura de 0.250, 0.297, 0.354, 0.420 y 0.500 mm. Las semillas seleccionadas para el estudio fueron las grandes y las chicas separadas mediante los tamices, con poro entre 0.250 y 0.500 mm de abertura.

Las semillas se sembraron en semilleros de unicel de 200 cavidades, con turba, y se mantuvieron con riego diario en invernadero.

Después de 52 días de emergidas, las plantas se trasplantaron en recipientes de poliestireno, con 80g de turba (peat moss) y se mantuvieron en el invernadero, con riego dos o tres veces por semana (10 a 40 mL de agua) (Cuadro 1 Anexo).

Las hojas y los tallos de las plantas, de ambos tamaños de semilla, en etapa de floración, cultivadas en invernadero se cosecharon para los análisis. Además, de plantas *in situ* en etapa de floración, se recolectaron al azar (en marzo a abril) hojas y tallos de las cuatro poblaciones de las que provinieron las cápsulas con semillas

para la siembra en invernadero. Los tejidos envueltos en toallas de papel humedecidas con agua se transportaron en una hielera al laboratorio.

Cinco g de tejido vegetal se deshidrataron a 40 °C. La biomasa se monitoreó hasta que las muestras mantuvieron su peso constante.

Las muestras deshidratadas se trituraron en un mortero de porcelana hasta obtener polvo fino, para completar la trituración del tallo se utilizó un molino casero (Nutr.Bullet, mod. NBR-1201, USAA).

4.4.3 Obtención de extractos

Los metabolitos se extrajeron de material vegetal seco. Al tejido triturado se le adicionó acetato de etilo, etanol o metanol, en proporción 1:5 (g: v). Las muestras se colocaron en baño ultrasónico (AutoScience AS5150B) durante 30 min, después se centrifugaron y se filtraron los extractos. Estos se almacenaron en tubos de plástico y refrigeración para su análisis.

4.4.4 Análisis de los grupos de metabolitos secundarios

Los extractos se analizaron para detectar los grupos principales de metabolitos secundarios, que incluyeron alcaloides, fenoles, flavonoides, saponinas, taninos y terpenos. En tubos de ensaye se colocó 0.5 mL de los extractos y con reactivos específicos para la detección de cada grupo de compuestos se desarrolló color, excepto para saponinas (Cuadro 2 Anexo).

La determinación de los metabolitos secundarios se determinó cualitativamente; para esto, se utilizó una escala con sistema de cruces y guiones, como sigue:

- +++**: presencia cuantiosa.
- ++**: presencia notable.
- +**: presencia leve.
- : ausencia.

4.4.5 Diseño experimental y análisis estadístico

Los datos se analizaron con la prueba no paramétrica Mann-Whitney, para comparar la presencia de metabolitos entre las muestras recolectadas *in-situ* con las de invernadero (datos en escala ordinal). El análisis se hizo con el software Rstudio. El análisis incluyó dos grupos de tejido (hoja y tallo).

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Composición de los extractos de acetato de etilo.

Los extractos de acetato de etilo de tallo y de hoja recolectadas *in situ* mostraron ausencia de alcaloides, fenoles, flavonoides, saponinas y taninos. En contraste, los extractos de ambos tejidos, con este disolvente, mostraron presencia leve de terpenos (Cuadro 5.1).

Cuadro 2.1. Metabolitos presentes en extractos obtenidos con acetato de etilo, de hojas y tallos de *Oenothera rosea* recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz.

Tejido población	Alcaloides	Fenoles	Flavonoides	Saponinas	Taninos	Terpenos
Hojas						
M1	—	—	—	—	—	+
M2	—	—	—	—	—	+
Tallo						
M1	—	—	—	—	—	+
M2	—	—	—	—	—	+

M1, M2: muestras de las poblaciones 1 y 2, recolectadas *in-situ*.

Los extractos de acetato de etilo de tallo y de hoja de las plantas cultivadas en invernadero también mostraron ausencia de alcaloides, fenoles, flavonoides, saponinas y taninos. Como en el caso de las plantas *in situ*, ambos tejidos, con este disolvente mostraron presencia leve de terpenos (Cuadro 5.2).

Cuadro 2.2. Metabolitos presentes en extractos obtenidos con acetato de etilo, de hojas y tallos de plantas de *Oenothera rosea* cultivadas en invernadero en Montecillo, Estado de México.

Tejido población	Alcaloides	Fenoles	Flavonoides	Saponinas	Taninos	Terpenos
Hojas						
M1	—	—	—	—	—	+
M2	—	—	—	—	—	+
Tallo						
M1	—	—	—	—	—	+
M2	—	—	—	—	—	+

M1, M2: muestras de las poblaciones 1 y 2, cultivadas en invernadero en Montecillo, Estado de México.

4.5.2 Composición de los extractos de etanol

Los grupos de alcaloides y saponinas en los extractos con etanol de tallos y hojas cosechados *in situ* (Cuadro 5.3) y cosechados en invernadero (Cuadro 5.4 y 5.5) estuvieron ausentes.

En contraste, en los extractos con etanol de las hojas cosechadas *in situ* se observó presencia de fenoles. La presencia de este grupo de compuestos varió entre las hojas de las poblaciones, de presencia cuantiosa en la población 1 a presencia notable en las poblaciones M2 y M3 y leve en la población 4 (Cuadro 5.3).

También en los extractos con etanol de los tallos cosechadas *in situ* se observó presencia de fenoles, en proporción variable, entre las poblaciones. La presencia fue cuantiosa en la población 1, 2 y 3 y fue notable en la población 4 (Cuadro 5.3). Los flavonoides en los extractos de etanol de hojas y tallos cosechados *in situ* prácticamente estuvieron ausente; la excepción fueron los tallos de la población 3, los que mostraron presencia leve de este grupo (Cuadro 5.3).

La presencia de taninos en el extracto de etanol mostró heterogeneidad entre las muestras cosechadas *in situ*. En el caso de las hojas de las poblaciones 1 y 2 la presencia de taninos fue cuantiosa y notable; en contraste, los tallos de las

poblaciones 3 y 4 no mostraron presencia de este grupo de metabolitos. En el caso de los extractos de etanol de los tallos cosechados *in situ* únicamente los de la población 4 mostraron ausencia de taninos; los de las otras poblaciones mostraron presencia leve y notable (Cuadro 5.3).

Cuadro 2.3. Metabolitos presentes en extractos obtenidos con etanol, de hojas y tallos de *Oenothera rosea* recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz.

Tejido población	Alcaloides	Fenoles	Flavonoides	Saponinas	Taninos	Terpenos
Hoja						
M1	—	+++	—	—	++	++
M2	—	++	—	—	+	+
M3	—	+	—	—	—	+
M4	—	+	—	—	—	+
Tallo						
M1	—	+++	—	—	+	+
M2	—	+++	—	—	++	++
M3	—	+++	+	—	+	++
M4	—	++	—	—	—	+

En los tallos y las hojas de las plantas de las cuatro poblaciones *in situ* los extractos de etanol mostraron presencia variable de terpenos.

En los extractos de etanol de las hojas cosechadas *in situ*, la presencia de terpenos fue leve, con excepción de la población 1 que mostró presencia notable; y en los tallos fue cuantiosa y notable entre las poblaciones (Cuadro 5.3).

En general, en los extractos de etanol de hojas y tallos de las plantas cultivadas, a partir de semilla chica, en invernadero el grupo de los fenoles fue menos abundante que los cosechados *in situ* (Cuadro 5.3 y 5.4). En las hojas de esas plantas cultivadas en invernadero, provenientes de la población 1 los fenoles estuvieron ausentes y en las otras fue notable. En los tallos de las plantas cultivadas los extractos de etanol mostraron presencia notable y cuantiosa de fenoles (Cuadro 5.4).

Cuadro 2.4. Metabolitos presentes en extractos obtenidos con etanol, de hojas y tallos de plantas obtenidas de semilla chica de *Oenothera rosea* cultivadas en invernadero en Montecillo, Estado de México.

Tejido población	Alcaloides	Fenoles	Flavonoides	Saponinas	Taninos	Terpenos
Hoja						
M1	—	—	—	—	—	++
M2	—	—	—	—	—	++
M3	—	—	—	—	—	+
Tallo						
M1	—	+	—	—	—	++
M2	—	++	—	—	—	+
M3	—	+	—	—	—	+

M1, M2 Y M3: muestras de las poblaciones 1 a 3, cultivadas en invernadero en Montecillo, Estado de México.

Como fue el caso de alcaloides y saponinas, el grupo de flavonoides estuvo ausente en los extractos de etanol de las hojas y tallos de las plantas de semilla chica y semilla grande, también cultivadas en invernadero (Cuadro 5.4 y 5.5). Además, en los extractos de etanol de hojas de las plantas, de semilla chica, cultivadas en invernadero la presencia del grupo de taninos fue leve en la población 3, en las hojas de las otras y en los tallos de todas las poblaciones estuvo ausente (Cuadro 5.4).

En las hojas y tallos de las plantas de ambos tamaños de semilla los extractos con etanol la presencia del grupo de terpenos fue notable y leve, no estuvieron ausentes (Cuadro 5.4 y 5.5).

Cuadro 2.5. Metabolitos presentes en extractos obtenidos con etanol, de hojas y tallos de plantas obtenidas de semilla grande de *Oenothera rosea* cultivadas en invernadero en Montecillo, Estado de México.

Tejido población	Alcaloides	Fenoles	flavonoides	Saponinas	Taninos	Terpenos
Hoja						
M1	—	+	—	—	-	+
M2	—	+	—	—	-	+
M3	—	++	—	—	+	+
Tallo						
M1	—	+	—	—	—	+
M2	—	++	—	—	—	+
M3	—	—	—	—	+	++

M1, M2 Y M3: muestras de las poblaciones 1 a 3, cultivadas en invernadero en Montecillo, Estado de México.

4.5.3 Composición de los extractos de metanol

Los extractos con metanol de tallos y hojas cosechadas de las poblaciones *in situ* mostraron presencia leve de alcaloides, con excepción de los tallos de la población 3. En el mismo extracto la presencia del grupo de fenoles en los tallos fue notable y en las hojas además de notable fue leve en las poblaciones 3 y 4. Además, en los extractos con metanol la presencia de flavonoides y saponinas en tallos y hojas fue leve, en algún caso fue notable y en las poblaciones 3 y 4 el primer grupo estuvo ausente en las hojas de la población 3 y 4, el segundo grupo estuvo ausente en los tallos de estas mismas poblaciones. Los grupos de taninos y terpenos en este extracto mostraron presencia notable y leve en hojas y tallos; con excepción de las hojas de las poblaciones 3 y 4 en el caso del primer grupo de compuestos y del segundo grupo en los tallos de las mismas poblaciones (Cuadro 5.6).

Cuadro 2.6. Metabolitos presentes en extractos obtenidos con metanol, de hojas y tallos de *Oenothera rosea* recolectadas en Barrio San Pedro Tepepa, Municipio de Tlaquilpa, Veracruz

Tejido Población	Alcaloides	Fenoles	Flavonoides	Saponinas	Taninos	Terpenos
Hojas						
M1	+	++	+	+	++	+
M2	+	++	+	++	++	+
M3	+	+	—	+	++	+
M4	+	+	—	+	++	+
Tallo						
M1	+	++	++	++	++	+
M2	+	++	+	+	++	+
M3	—	++	+	—	++	+
M4	+	++	+	—	++	+

M1, M2, M3 y M4: muestras de las poblaciones 1 a 4, recolectadas *in-situ*.

Metabolitos que se detectaron para los extractos obtenidos de muestras de invernadero con semilla chica: presencia notable en ambos tejidos (tallo y hoja) de fenoles, presencia notable en M1, M3 de hoja y M1 de tallo aunado a esto presencia leve en M2 de hoja y M2 y M3 de tallo en taninos, todas las muestras de hoja tuvieron presencia notable y muestras de tallo presencia leve de terpenos asimismo no se detectaron la presencia de alcaloides, flavonoides y saponinas.

Cuadro 2. 7. Metabolitos presentes en extractos obtenidos con metanol de hojas y tallos de plantas obtenidas de semilla chica de *Oenothera rosea* cultivadas en invernadero en Montecillo, Estado de México.

Tejido Población	Alcaloides	Fenoles	Flavonoides	Saponinas	Taninos	Terpenos
Hojas						
M1	—	++	—	—	++	++
M2	—	++	—	—	+	++
M3	—	++	—	—	++	++
Tallo						
M1	—	++	—	—	++	+
M2	—	++	—	—	+	+
M3	—	++	—	—	+	+

M1, M2 Y M3: muestras de las poblaciones 1 a 3, cultivadas en invernadero en Montecillo, Estado de México.

Cuadro 2.8. Metabolitos presentes en extractos obtenidos con metanol de hojas y tallos de plantas obtenidas de semilla grande de *Oenothera rosea* cultivadas en invernadero en Montecillo, Estado de México.

Tejido Población	Alcaloides	Fenoles	Flavonoides	Saponinas	Taninos	Terpenos
Hojas						
M1	—	++	—	—	++	++
M2	—	+	+	—	++	++
M3	—	+	+	—	+++	++
Tallo						
M1	+	++	—	—	+	+
M2	-	++	+	—	++	++
M3	-	++	+	—	+++	++

M1, M2 y M3: muestras de las poblaciones 1 a 3, cultivadas en invernadero en Montecillo, Estado de México.

4.6 DISCUSIÓN

El contenido cuantitativo y cualitativo de las extracciones de metabolitos, a partir de tejidos vegetales, depende de factores como la polaridad del disolvente utilizado y de la concentración de los metabolitos. Para este fin, los disolventes utilizados frecuentemente son etanol, metanol, acetona y sus mezclas con agua, en proporciones diferentes; sin embargo, no existe un método para la extracción o disolvente definido. Además, la extracción exitosa también depende de la naturaleza química de los compuestos a extraer (Amyrgialakiu *et al.* 2014, Gironi *et al.* 2011).

En el presente estudio los extractos con acetato de etilo mostraron presencia leve de terpenos independientemente del tejido analizado y sitio en que las plantas crecieron, sin diferencias entre ellos ($P > 0.05$; Anexo). El grupo de sustancias que se clasifican como terpenos son aromáticas, con carácter lipídico y pueden estar prácticamente en todas las plantas y en diversos órganos, como raíces, tallos, hojas, flores y fruto (Vásquez *et al.*, 2001).

Actualmente, el cáncer gástrico se considera un problema de salud pública en todo el mundo. El uso de plantas medicinales para la prevención de enfermedades crónicas, como el cáncer, es una alternativa de la medicina tradicional. Almora-Pinedo *et al.* (2017) señalaron que *O. rosea* podría ser una opción para el tratamiento de esa enfermedad y entre los fitoquímicos constituyentes de esta especie están los terpenos.

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser constitutivos, es decir están en plantas sanas en sus formas biológicamente activas, otros están como precursores inactivos y se activan en respuesta al daño tisular o a la presencia de patógenos. Los efectos medicinales beneficiosos de los tejidos vegetales o sus extractos frecuentemente resultan de la combinación de esos metabolitos secundarios en la planta. De acuerdo con Jain *et al.* (2019), del total de metabolitos secundarios en el diccionario de productos naturales 33 000 son terpenos, 16 000

son alcaloides y 8,182 son flavonoides. Estos fitoquímicos también tienen un papel ecológico y participan en la protección de las plantas contra el estrés biótico o abiótico (Weisshaar y Jenkins, 2019). La presencia de terpenos en ambos tejidos de *O. rosea*, independientemente del sitio de cultivo, concordó con esos datos de abundancia. En contraste, los alcaloides estuvieron ausentes en los extractos de *O. rosea*, independientemente del tejido, sitio de crecimiento de las plantas y disolvente usado, salvo una excepción.

En el presente estudio el acetato de etilo, por su naturaleza química, fue parcialmente adecuado para solubilizar y extraer los seis grupos de metabolitos analizados, ya que estuvieron ausentes los alcaloides, fenoles, flavonoides, saponinas y taninos. En contraste, las diferencias en los grupos extraídos con etanol fueron significativas ($P \leq 0.05$; Anexo). Este disolvente mostró presencia leve, notable o cuantiosa de fenoles, flavonoides y taninos. En el caso de fenoles, el etanol mostró presencia cuantiosa en los tallos cosechados *in-situ* y en las hojas de alguna de las poblaciones. Con este disolvente se demostró que la presencia de fenoles varió en las hojas de las plantas cultivadas en el invernadero y dependió del tamaño de la semilla que originó a las plantas cultivadas; su presencia se restringió únicamente en las hojas de las plantas obtenidas de semilla grande. La presencia del grupo de fenoles en *O. rosea* coincidió con el resultado documentado por Almora-Pinedo *et al.* (2017). Estos investigadores determinaron la presencia de metabolitos secundarios en extracto de *O. rosea* con etanol y entre los grupos que observaron estaba el de los compuestos fenólicos. Villena y Arroyo (2014) determinaron en el extracto *O. rosea* (Yawar Socco) con etanol de la presencia de flavonoides, taninos, cumarinas, quinonas y saponinas. Los autores no mostraron la cantidad de cada grupo de metabolito, pero comprobaron el efecto en la inflamación aguda y crónica debido a inhibición de la prostaglandina sintetasa, reducción del nivel de prostaglandina en el proceso inflamatorio.

Los saponósidos (saponinas) son heterósidos cuya genina puede ser esteroídica (hespirostano o furostano) o triterpénica (oleonano, ursano, damarano); se conoce

que las especies vegetales con saponinas y triterpenoides son antiinflamatorios (Villena y Arroyo, 2014).

El disolvente que extrajo y mostró la presencia de los seis grupos de metabolitos evaluados en el presente estudio fue el metanol acuoso. Con este disolvente además de demostrar la presencia de los seis grupos en proporciones variables ($P \leq 0.05$; Anexo), se confirmó que variaron entre los tejidos evaluados y que son independientes de la población de procedencia y del tamaño de semilla del que se obtuvieron las plantas. Con el metanol acuoso, en general las muestras cosechadas *in-situ* mostraron consistentemente presencia notable de fenoles y taninos independientemente del tejido y de la población y en la mayoría de los casos también de saponinas. Además, el metanol acuoso evidenció la presencia leve, pero persistente, de terpenos independientemente del tejido y de la población. Estos resultados mostraron que el tipo de metabolitos secundarios de *O. rosea* presentes en los tejidos analizados de las poblaciones recolectadas fueron notablemente más solubles en metanol acuoso que en acetato de etilo y etanol acuoso. Por lo que, para los estudios próximos, para el análisis e identificación de esos metabolitos se recomienda dar preferencia a la extracción con ese alcohol.

El metanol acuoso permitió confirmar las diferencias de presencia y abundancia de los cinco grupos de fitoquímicos en las plantas, en dependencia del tamaño y origen de las semillas que se usaron para multiplicar las plantas en invernadero. Los alcaloides y las saponinas no se acumularon en estas plantas o se sintetizaron en proporciones suficientemente bajas para que con las pruebas aplicadas se detectaran. Además, se observó que la presencia de flavonoides en las plantas cultivadas en invernadero es dependiente del tamaño de semilla. Únicamente las semillas grandes originaron plantas con este grupo de metabolitos.

Las diferencias en el tipo y proporción de fitoquímicos extraídos de los tejidos de *O. rosea* con distintos disolventes del presente estudio coincidió con los resultados de Gomez *et al.* (2012). Estos autores compararon dos tipos de extracto de *O. rosea* en la inhibición del crecimiento de cepas bacterianas. El resultado fue que el

extracto de metanol inhibió mayormente el crecimiento de *E. coli*, *S. enteritidis* y *V. cholerae*, con hasta 55, 66 y 87 % y el extracto acuoso lo inhibió 54, 69 y 88 %. Los resultados también confirmaron que el testigo con metanol y el vehículo acuoso no alteraron el crecimiento bacteriano. Los autores concluyeron que el efecto antibacteriano de los extractos de *O. rosea* puede usarse como tratamiento adyuvante de las enfermedades causadas por las enterobacterias estudiadas.

4.7 CONCLUSIONES

El acetato de etilo fue el disolvente menos eficiente para extraer los metabolitos secundarios de hojas y tallos de *O. rosea*.

El metanol permitió la detección de los seis grupos de metabolitos secundarios más comunes en las plantas, *e.i.*, alcaloides, fenoles, flavonoides, saponinas, taninos y terpenos.

Las muestras de las plantas *in situ* mostraron presencia mayor de metabolitos secundarios, en mezclas acuosas de metanol y etanol, respecto al etanol.

La presencia de metabolitos secundarios es mayor en las plantas que crecen *in situ* respecto a las cultivadas en invernadero y entre estas, las de semilla grande muestran presencia mayor de metabolitos secundarios. Esto último se demostró en los extractos de metanol, que fue el disolvente que extrajo el mayor número de esos grupos.

En general los tallos de *O. rosea* mostraron presencia mayor de metabolitos secundarios que las hojas.

4.8 LITERATURA CITADA

- Abasum T., S. Ahmad, N. Akhlaq, R. Ahman. 2001. Estimation of tannins in different food products. *International Journal of Agriculture and Biology* 3(4): 529-530.
- C.M. Ajila, S.K. Brar, M. Verma, R.D. Tyagi, S. Godbout & J.R. Valéro 2011 Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends, *Critical Reviews in Biotechnology*, 31:3, 227-249
- Anaya A. 2003. *Ecología Química*. Primera Edición. México, Editorial Plaza y Valdés. 216-228.
- Álvarez J. 2007. Tanino: La revolución enológica. *Revista de Enología* 2(4):1-15.
- Almora-Pinedo Y., J. Arroyo-Acevedo, O. Herrera-Calderón, V. Chumpitaz-Cerrate, R. Hañari-Quispe, A. Tinco-Jayo, L. Figueroa-Salvador. 2017. Efecto preventivo de *Oenothera rosea* en el cáncer gástrico inducido por N-metil-N-nitrosourea (NMU). *Gastroenterología Clínica y Experimental* 10: 327–332.
- Amyrgialaki, E.; Makris, D.P.; Mauromoustakos, A.; Kefalas, P. 2014. Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products* 59:216-222
- Ávalos-García A., Pérez-Urrutia, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal* 2(3): 119–145.
- Barrón R, García R, Soto M, Colinas T, Kite G. 2011. Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Revista Mexicana de Fitogenética*, 34(3):151-157.
- Ballester I, Camuesco D, Gálvez J, Sánchez de Medina F, Zarsuelo A. 2006. Flavonoides y enfermedad inflamatoria intestinal. *Ars Pharmaceutica*, 47(1):5-21.
- Brglez Mojzer, Eva; Knez Hrnčič, Maša; Škerget, Mojca; Knez, Željko; Bren, Urban. 2016. "Polifenoles: métodos de extracción, acción antioxidante, biodisponibilidad y efectos anticancerígenos". *Moléculas* 21, no. 7: 901.
- Brglez Mojzer, Eva & Knez hrncic, Masa & Škerget, Mojca & Knez, Željko & Bren, Urban. 2016. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*. 21. 901.

- Calva-Candelaria, Natalia; Meléndez-Camargo, María Estela; Montellano-Rosales, Hortensia; Estrada-Pérez, Alan R; Rosales-Hernández, Martha C; Fragoso-Vázquez, M Jonathan; Martínez-Archundia, Marlet; Correa-Basurto, José; Márquez-Flores, Yazmín K. 2018 *Oenothera rosea* L'Hér. ex Ait attenuates acute colonic inflammation in TNBS-induced colitis model in rats: in vivo and in silico myeloperoxidase role. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Vol: 108 852-864
- Carreras L. 2012. Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud Beneficial health properties of iridoids terpenes 32(3): 81–91.
- Croteau R., T. M. Kutchan, N. G. Lewis. 2000. Natural products (Secondary metabolites). In: B. Buchanan, W. Grissem, R. Jones R. (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Vol. 24. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. pp. 1250-1318.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. Instituto de Geografía, México, Distrito Federal, México, 205 p.
- García, E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. Instituto de Geografía, México, Distrito Federal, México, 205 p.
- Gironi, F.; Piemonte, V. 2011. Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. *Chemical Engineering Research and Design* 89:857-862.
- Gómez-Flores R., R. Martínez R., P. Tamez-Guerra, R. Quintanilla-Licea. 2012. Actividad antibacteriana de los extractos de hojas de *Oenothera rosea* (L. 'Hér). *Revista de Avances en Medicina e Investigación Médica* 2(3): 396-404.
- Gutiérrez D, Ortiz C, Mendoza C. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. Santiago de Querétaro, México.
- Hernández, R. 1997 Obtención de crudos de saponinas hipocolesteromizantes del *Chenopodium quinoa* Willd. *Rev. Cubana Medicina Militar*; 26(1):55-62.

- Huari E. De la Cruz D. 2017. Efecto terapéutico del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* A. "chupasangre", en forma de crema farmacéutica. Repositorio de Tesis - UNMSM. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V.I. 2011 A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126(4): 1821-1835.
- Johnson M., A. Ives, J. Ahern, J. Salminen. 2014. Macroevolution of plant defenses against herbivores in the evening primroses. *New Phytologist* 203(1): 267-79.
- Man S, Gao W, Zhang Y, Huang L & Liu C 2010. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents. *Fitoterapia* 81: 703–714
- Martínez F. S., G. J. González, J. M. Culebras, M. J. Tuñón. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* 17(6): 271-278.
- Márquez-Flores Y., H. Montellano-Rosales, M. Campos A., M. Meléndez-Camargo. 2009. Anti-inflammatory activity of aqueous and methanolic extracts of *Oenothera rosea* L' Hér. ex Ait in the rat. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 40(3): 11-16.
- Van der Sluis AA, Dekker M, de Jager A, Jongen WM. 2001. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *J Agric Food Chem*; 49: 3606-3613.
- Van der Sluis, A. A., Dekker, M., de Jager, A., & Jongen, W. M. F. 2001. Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple: Effect of Cultivar, Harvest Year, and Storage Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8): 3606–3613.
- Oh, S.-Y., Kang, S.-G., & Chiu, P. C. 2010. Degradation of 2,4-dinitrotoluene by persulfate activated with zero-valent iron. *Science of The Total Environment*, 408(16): 3464–3468.
- Oh, H., Reddy, B. V. V. G., & Irvine, K. D. 2009. Phosphorylation-independent repression of Yorkie in Fat-Hippo signaling. *Developmental Biology*, 335(1): 188–197

- Okumoto, S., Funck, D., Trovato, M., & Forlani, G. 2016. Editorial: Amino Acids of the Glutamate Family: Functions beyond Primary Metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- Pérez-Alonso N., E. Jiménez. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal* 11(4): 195-211.
- Porras H., C. M. Fuertes, D. Whu, B. Jurado. 2011. Efecto antiagregante plaquetario in vivo y fibrinolítico del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea* Aiton “chupasangre”. *Revista de la Sociedad Química Perú* 77(3): 225-34.
- Rasouli, H., Farzaei, M. H., & Khodarahmi, R. 2017. Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*, 8 (4): 281–2941-42.
- Nojehdehi, S., Soudi, S., Hesampour, A., Rasouli, S., Soleimani, M., & Hashemi, S. M. 2018. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cell-derived exosomes on experimental type-1 autoimmune diabetes. *Journal of Cellular Biochemistry*.1-11
- Rojas R, Doroteo V, Diaz C, Vaisberg A, Neira M y Terry C. (2013). Actividad antioxidante, anti-elastasa, anti-colagenasa, protectora contra los rayos UV-B, promotora de síntesis de colágeno in vitro y estudios de seguridad/eficacia de extractos de *Bixia Orellana* (“Achiote) y *Oenothera rosea* (“Chupasangre). Lima. Perú.16
- Tian, T., Liu, Y., Yan, H., You, Q., Yi, X., Du, Z., Su, Z. 2017. agriGO v2.0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Research*, 45(W1): W122–W129.
- Valdés R., M. I. Balbín. 2000. Curso de fisiología y bioquímica vegetal. Universidad Nacional de Ciencias Agrarias de la Habana, Cuba. 89 p.
- Vásquez O., A. Alva, J. Marreros. 2001. Extracción y caracterización del aceite de jengibre (*Zingiber officinal*). *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria* 1(1): 38-42.
- Villena N. C., J. L. Arroyo A. 2014. Efecto antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* (Yawar Socco) en ratas con inducción a la inflamación aguda y crónica. *Ciencia e Investigación* 15(1): 15-19.

Vivanco J. M., E. Cosio, V. V. Loyola, E. H. Flores. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. Investigación y Ciencia Febrero: 68-74.

5 DISCUSIÓN GENERAL

Las semillas grandes acumulan más reservas nutritivas para la germinación y la emergencia que las plántulas de las semillas pequeñas y estas últimas son eficientes en la dispersión y la colonización (Moles *et al.*, 2005). En el presente estudio la variación del tamaño de semilla permitió separar dos grupos de semillas, independientemente de la población. La variabilidad dentro y entre poblaciones se confirmó con el CV que representó entre 8.14 % en las semillas chicas de la población 4 y 46.81 % en las de la población 2. Las semillas de tamaño mayor muestran ventajas para germinar y establecer las plántulas ($p \leq 0.05$) y las variables que definen este proceso fisiológico fueron más aceleradas que en las semillas pequeñas. Además, de la variabilidad en la germinación y la emergencia máxima acumulada dentro y entre poblaciones, las semillas chicas fueron notablemente más heterogéneas, de acuerdo con el C.V. de la germinación, entre 22.19 y 74.83 %, en las poblaciones 1 y 4, y en la emergencia entre 18.31 y 40.47 %, en las poblaciones 3 y 4. En contraste, el C.V. en esos procesos de las semillas grandes fue menor a 22.22 %. La latencia de la semilla parece un carácter que proporciona ventajas ecológicas y ajusta la germinación al período de crecimiento favorable. Sin embargo, muchas especies producen semillas no latentes, particularmente en bosques tropicales húmedos (Rubio de Casas *et al.*, 2017). En *O. rosea* la amplitud máxima de latencia varió entre las poblaciones y en algunas representó 80 % en las semillas chicas y 40 % en las grandes. En contraste, las semillas chicas y grandes de otras poblaciones mostraron 23 y 10 % de latencia. Pero las diferencias en el porcentaje de latencia no afectaron la emergencia de plántulas. En el presente estudio el tamaño de la semilla se asoció con la altura del tallo que en promedio fue 12 % mayor en las plantas de semilla grande y en la población 2 la diferencia alcanzó 35 %. El valor máximo de esta variable también fue heterogéneo entre y dentro de las poblaciones, independientemente del tamaño de semilla (C.V. entre 9.79 y 33.57 % en las plantas de semilla chica y 8.93 y 34.22 % en las de semilla grande). En contraste, las dimensiones de las hojas sobresalieron por su variabilidad, independientemente del tamaño de la semilla originaria durante el crecimiento de las plantas; el C.V. de la anchura foliar varió de 55.55 a 78.38 % en

las plantas de semilla chica y de 66.62 a 95.52 % en las plantas de semilla grande. Además, la variabilidad también se observó en la longitud (de 56 a 79 % en las plantas de ambos tamaños de semilla). La heterogeneidad del tamaño de las hojas se debe a la exposición continua del follaje durante los 110 días de evaluación, esta característica del traslape de etapas fenológicas, vegetativa y reproductiva, es típica de especies silvestres (Aguirre *et al.*, 2003; Peña-Valdivia *et al.*, 2012). En las plantas del presente estudio sus estructuras continuaron creciendo, en longitud, número o biomasa, cuando inició y durante la etapa reproductiva. Las plantas de semilla grande presentaron significativamente más número y biomasa de yemas florales y cápsulas maduras en la cosecha. El crecimiento en algunas estructuras vegetativas y reproductivas fue mayor en las plantas de semilla grande y coincidió con el crecimiento mayor de la raíz. El crecimiento mayor de los órganos se asocia con el tamaño mayor del embrión de las semillas, ya que contienen más reservas que resultan en plántulas más grandes.

Las diferencias entre las plantas de tamaño distinto de semilla, cultivadas en condiciones protegidas, también se observaron en la presencia de los metabolitos secundarios en hoja y tallo, pero sin una tendencia reconocible. Además, también hubo diferencias entre las poblaciones *in situ*. Aunque, los integrantes de cada grupo de metabolitos secundarios extraídos no se identificaron, la diferencia en la presencia relativa o ausencia de los grupos solubilizados en etanol y metanol acuosos las diferencias fueron evidentes. En el caso de los extractos de acetato de etilo mostraron presencia leve de terpenos, independientemente del tejido o sitio de crecimiento de las plantas ($P > 0.05$; Anexo). La presencia de terpenos en ambos tejidos de *O. rosea*, independientemente del sitio de cultivo, concordó con esos datos de abundancia. En contraste, los alcaloides estuvieron ausentes en los extractos de *O. rosea*, independientemente del tejido, sitio de crecimiento de las plantas y disolvente usado, salvo una excepción. Los grupos extraídos con etanol fueron significativos ($P \leq 0.05$; Anexo). Este disolvente mostró presencia leve, notable o cuantiosa de fenoles, flavonoides y taninos. En el caso de fenoles, el etanol mostró presencia cuantiosa en los tallos cosechados *in-situ* y en las hojas de alguna de las poblaciones. Con este disolvente se demostró que la presencia de

fenoles varió en las hojas de las plantas cultivadas en el invernadero y dependió del tamaño de la semilla que originó a las plantas en el invernadero; su presencia se restringió únicamente en las hojas de las plantas de semilla grande. El metanol acuoso extrajo y mostró la presencia de los seis grupos de metabolitos evaluados en el presente estudio y contrastó con el acetato de etilo y etanol acuoso. Con este disolvente además de demostrar la presencia de los seis grupos en proporciones variables ($P \leq 0.05$; Anexo), se confirmó la variación entre los tejidos y que la variación fue independiente de la población de procedencia y del tamaño de semilla del que se obtuvieron las plantas. Con el metanol acuoso, en general las muestras cosechadas *in situ* mostraron consistentemente presencia notable de fenoles y taninos independientemente del tejido y de la población y en la mayoría de los casos también de saponinas. Además, el metanol acuoso evidenció la presencia leve, pero persistente, de terpenos independientemente del tejido y de la población. Estos resultados mostraron que el tipo de metabolitos secundarios de *O. rosea* presentes en los tejidos analizados de las poblaciones recolectadas fueron notablemente más solubles en metanol acuoso que en acetato de etilo y etanol acuoso.

El metanol acuoso permitió confirmar las diferencias de presencia y abundancia de los cinco grupos de fitoquímicos en las plantas, en dependencia del tamaño y origen de las semillas que se usaron para multiplicar las plantas en invernadero. Los alcaloides y las saponinas no se acumularon en estas plantas o se sintetizaron en proporciones suficientemente bajas para que con las pruebas aplicadas se detectaran. Además, se observó que la presencia de flavonoides en las plantas cultivadas en invernadero es dependiente del tamaño de semilla. Únicamente las semillas grandes originaron plantas con este grupo de metabolitos. Las diferencias en el tipo y proporción de fitoquímicos extraídos de los tejidos de *O. rosea* con distintos disolventes del presente estudio coincidió con los resultados de Gámez-Flores *et al.* (2012). Por lo que, se recomienda para los estudios próximos, para el análisis e identificación de esos metabolitos dar preferencia a la extracción con ese alcohol.

6 CONCLUSIONES GENERALES

- Las semillas silvestres de *O. rosea* son relativamente homogéneas en tamaño, dentro y entre poblaciones y muestran hasta 70 % de latencia dependiente del tamaño de semillas y de la población.
- La multiplicación por semilla de esta especie en condiciones protegidas permite obtener plantas que en etapa reproductiva muestran presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios, *i. e.*, alcaloides, flavonoides, fenoles, taninos, terpenos y saponinas, en cantidad variable. *i.e.*, cuantiosa, notable y leve.
- Las plantas de *O. rosea* crecen y se desarrollan en ambiente protegido y su crecimiento depende del tamaño de semilla y de la población de la que provienen.
- Las plantas difieren en su composición de metabolitos secundarios en dependencia de la población en la que crecen y del tamaño de semilla de las origina. El acetato de etilo es el disolvente menos eficiente para extraer los metabolitos secundarios de hojas y tallos de *O. rosea*, metanol permitió la detección de los seis grupos de metabolitos secundarios más comunes en las plantas, *e.i.*, alcaloides, fenoles, flavonoides, saponinas, taninos y terpenos.
- Las muestras de las plantas *in situ* mostraron presencia mayor de metabolitos secundarios, en mezclas acuosas de metanol y etanol, respecto al etanol.
- La presencia de metabolitos secundarios es mayor en las plantas que crecen *in situ* respecto a las cultivadas en invernadero y entre estas, las de semilla pequeña muestran presencia mayor de metabolitos secundarios. Esto último se demostró en los extractos de metanol, que fue el disolvente que extrajo el mayor número de esos grupos.
- En general los tallos de *O. rosea* mostraron presencia mayor de metabolitos secundarios que las hojas.

6.1 Literatura citada

- Anaya A. 2003. Ecología Química. Primera Edición. México: editorial Plaza y Valdés: 216-228
- Aguirre R. J. R.; C. B. Peña-Valdivia; J. S. Bayuelo-Jiménez. 2003. Morphology, phenology and agronomic traits of two wild Mexican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) populations under cultivation. South African Journal of Botany 69(3): 410-421.
- Ávalos-García, A., & Pérez-Urrutia, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal, 2(3), 119–145. Retrieved from <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/798/814>
- Álvarez J. 2007. Tanino: La revolución enológica mito o realidad. Revista Enología, 2(4):1-15.
- Carreras, L. 2012. Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud Beneficial health properties of iridoids terpenes, 32(3), 81–91.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G. 2000. Natural products (Secondary metabolites). pp. 1250-1318. In: B. Buchanan., W. Gruissem., and R. Jones R. (eds.). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Vol. 24. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. 1367 p
- Gómez-Flores R., R. Reyna-Martínez, P. Tamez-Guerra, R. Quintanilla-Licea. 2012. Antibacterial activity of *Oenothera rosea* (L 'Hér) leaf extracts. Br. J. Med. Med. Res. 2: 396–404.
- Moles A. T., Ackerly D. D., Webb C. O., Tweddle J. C., Dickie J. B., Westoby M. 2005. A brief history of seed size. Science 307: 576–580.
- Gonzales J, Lechuga A, Serrano C. 2000. Estudio fitoquímico comparativo de *Oenothera rosea* y *Oenothera multicaulis* (Yawar chonqa). Revista. SITUA.: 67-72.
- Ibarra-cantún, D., Delgado-alvarado, A., Herrera-cabrera, B. E., Soto-Hernández, R. M., Salazar-rojas, V. M., & Aguilar, M. I. 2018. Effect of the environmental condition of, 24(2): 151–165.

- Johnson M.T.J., Ives A, R, Ahern J, Salminen J-P. 2014. Macroevolution of plant defenses against herbivores in the evening primroses. *New Phytologist*. 203(1):267- 79.
- Martínez F.S., González G.J., Culebras J.M., Tuñón M.J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes, *Nutrición Hospitalaria*, Vol. 17 No.6, 271-278.
- Narayama K., Reddy R., Sripal M., Chaluvadi M.R, Krishna D.R. 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical, effects and therapeutic potencial, *Indian Journal Pharmacology*, Vol. 33: 2-16.
- Peña-Valdivia C. B., Aguirre-Rivera J. R., Arroyo-Peña V. B. 2012. El frijol: Síndrome de domesticación. Editorial del Colegio de Postgraduados. México. 198 p.
- Pérez-alonso, N., & Jiménez, E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro, 11(4): 195–211
- Pezzuto, JM. 1995. Natural product cancer chemoprotective agents. En: Arnason JT, Mata R, Romeo JT (Eds). *Recent advances in phytochemistry. Phytochemistry of medicinal plants*, 29: 19-45
- Porras H, Fuertes CM, Whu D, Jurado B.2011. Efecto antiagregante plaquetario in vivo y fibrinolítico del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera rosea Aiton* “chupasangre”. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(3): 225-34.
- Rubio de Casas R., Willis C. G., Pearse W. D., Baskin C. C., Baskin J. M., Cavender-Bares J. 2017. Global biogeography of seed dormancy is determined by seasonality and seed size: a case study in the legumes. *New Phytol*. 214: 1527-1536.
- Tabasum, S., Ahmad, S., Akhlaq, N., & Rahman, K. 2001. Estimation of tannins in different food products. *International Journal of Agriculture and Biology*, 4: 529-530.
- Taboada R. 2013. Estandarización de una técnica de extracción de ADN y un Sistema de amplificación PCR-SSR para *Oenothera rosea* (chupasangre), *Oenothera multicaulis* (chupasangre de puna) y *Oenothera tetraptera* (chupasangre gigante). Tesis Ingeniero Biotecnólogo. Arequipa: Universidad Católica de Santa María, 194 pp

- Valdés, R. & Balbín, María Irene. 2000. Curso de fisiología y bioquímica vegetal. UNAH. La Habana, Cuba. 89 p.
- Vivanco J. M., E. Cosío, V. V. Loyola, E. H. Flores. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. Investigación y Ciencia Febrero: 68-74.

ANEXOS

Cuadro 1. Pesos del suelo utilizado para el trasplante de plantas de *O. rosea*.

#vaso	Vaso (g)	Peat moss (g)	H2O (ml)	48 hrs
1	4.40	80.00	400	337.09
2	4.36	80.00	400	369.60
3	4.43	80.00	400	370.78
4	4.62	80.00	400	372.15
5	4.39	80.00	400	355.44
6	4.43	80.00	400	370.45
7	4.41	80.00	400	365.17
8	4.51	80.00	400	328.65
9	4.34	80.00	400	348.19
10	4.41	80.00	400	325.75

Cuadro 2. Análisis preliminar para la identificación de compuestos fitoquímicos en *Oenothera rosea* con material vegetativo obtenida de las semillas reproducidas en invernadero y recolectadas en *in situ*.

	Alcaloides	Fenoles	Flavonoides	Saponinas	Taninos	Terpenos
Muestra	0.5ml extracto -HCL10% (5-6 gotas) -Agitar -Baño maría (5 minutos) 3 gotas de dragendorf	0.5ml extracto 0.5 ml reactivo Foli- cicalteu 10% -0.5ml solución básica (carbonato 5%)	0.5ml extracto Tira pequeña de magnesio HCL(gotas)	0.5ml extracto 1ml agua destilada	0.5ml extracto Cloruro férrico 3% (3 gotas)	0.5ml extracto Anhídrido acético (3 gotas) Ácido sulfúrico(3 gotas)
Control positivo	10 mg Lupinus 0.5ml Metanol HCL 10% (5 a 6 gotas) Baño maría (5 minutos) 3 gotas de dragendorf	Acido gálico (punta de espátula) 0.5ml metanol 80% 0.5ml reactivo Foli- cicalteu 10% 0.5ml solución básica (carbonato 5%)	Quercetina (punta de espátula) 0.5ml metanol 80% Tira pequeña de magnesio HCL(gotas)	10mg zacate chi-chi 1ml agua destilada	Acido tánico (punta de espátula) 0.5ml agua destilada Cloruro férrico 3% (3 gotas)	Ácido masticadienoico (punta de espátula) 1ml de cloruro de metilo
Control negativo	0.5 ml Metanol 1ml HCL 10% Baño maría (5 minutos) 3 gotas de dragendorf	0.5ml metanol 80% 0.5 ml reactivo Foli- cicalteu 10% 0.5ml solución básica (carbonato 5%)	0.5ml metanol 80% Tira pequeña de magnesio HCL(gotas)	1ml agua destilada	0.5ml agua destilada Cloruro férrico 3% (3 gotas)	1ml cloruro de metilo Anhídrido acético (3 gotas) Ácido sulfúrico (3 gotas)
Presencia	Color naranja brillante	Azul intenso	Rosa a rosa salmón además de efervescencia	Formación de espuma por más de un minuto	Azul oscura	Morado oscuro