

Establecimiento de un protocolo para la conservación in vitro a mediano plazo de uña de gato (*Uncaria Tomentosa* (Willd). D.C.)

Fecha de recepción: 25/02/2011

Fecha de aceptación: 04/03/2011

Nathalie Cruz Mora¹
Mauricio Brenes Huertas²
Ana Abdelnour Esquivel³
Silvana Alvarenga Venutolo⁴

Palabras clave

Uña de gato, *Uncaria tomentosa*, conservación a mediano plazo, sacarosa, manitol.

Resumen

Aproximadamente el 25% de los medicamentos de patente posee algún componente o es derivado de plantas. La importancia farmacológica de la uña de gato (*U. tomentosa*) radica en la producción de alcaloides empleados en medicina natural por su actividad como antiinflamatorios, fortificantes del sistema inmunológico, y recientemente, para tratar el cáncer y el VIH. La técnica de cultivo *in vitro* de esta especie permite conservar material élite bajo condiciones controladas durante periodos extensos, con el fin de asegurar la explotación comercial sostenible de la especie.

La conservación a mediano plazo se puede lograr utilizando retardadores del crecimiento, osmóticos y variando las

concentraciones de nutrientes en el medio de cultivo. En la presente investigación se realizaron pruebas para determinar las variables más efectivas para la conservación a mediano plazo de genotipos de *Uncaria tomentosa* endógenos de Costa Rica.

Se ensayaron variantes en las condiciones de cultivo, como la adición de agentes osmóticos (manitol al 4 y 6% y sacarosa al 3, 4 y 6%), en el medio de cultivo M & S al 100% y al 50% de concentración de sales. Los ensayos fueron evaluados mensualmente durante cuatro meses. Se observó que los dos tratamientos en el medio al 100% de la concentración de sales y enriquecidos con concentraciones de sacarosa de 40 y 60 g/l, fueron los más efectivos para retardar el crecimiento.

Los brotes conservados a mediano plazo en ambos tratamientos regeneraron. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de plántulas regeneradas; sin embargo, en el tratamiento con sacarosa al

1. Ingeniera en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: ialnathi@hotmail.com
2. Ingeniero en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Correo electrónico: mbrenesh@gmail.com
3. Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, docente. Correo electrónico: aabdelnour@itcr.ac.cr
4. Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, docente. Correo electrónico: salvarenga@itcr.ac.cr

6% se obtuvo una regeneración del 67%, por lo que se recomienda.

Key words

Uncaria tomentosa, medium-term *in vitro* conservation, sucrose, mannitol.

Abstract

Approximately 25% of patent medicines have some component or are derived from plants. The pharmacological importance of cat's claw (*U. tomentosa*) is the production of alkaloids used in natural medicine for its anti-inflammatory activity, fortifying the immune system, and recently, to treat cancer and HIV. The technique of *in vitro* culture of this species can maintain elite material under controlled conditions for extended periods, in order to ensure sustainable commercial exploitation of the species.

The medium-term conservation can be achieved using growth retardants, osmotic and varying the concentrations of nutrients in the culture medium. In the present were determined the most effective variables for the medium-term conservation of genotypes endogenous of *Uncaria tomentosa*. Variants in the culture conditions, such as the addition of osmotic agents (mannitol at 4 and 6%, sucrose at 3, 4 and 6%) to the M & S medium at 100% and 50% salt concentration were tested.

The trials were evaluated monthly for four months. It was noted that the two treatments in the medium containing 100% of the concentration of salts and fortified with sucrose concentrations of 40 and 60 g / L, were the most effective in retarding growth. Shoots preserved in the medium term in both treatments regenerated. There were no significant differences in the amount of regenerated plantlets, however, treatment with 6% sucrose is recommended since 67% regeneration was observed.

Introducción

Las plantas son fuente de una amplia variedad de compuestos químicos,

conocidos como metabolitos secundarios, los cuales son utilizados como fármacos, pesticidas, colorantes, saborizantes y fragancias, entre otros (Trejo y Rodríguez, 2007; Palacios y Leech, 2004). Los metabolitos secundarios son compuestos que se producen naturalmente y no son vitales para el organismo que las produce (Sengbusch, 2003). Se estima que aproximadamente el 25% de los productos farmacéuticos patentados en la actualidad es derivado de plantas (Verpoorte *et al.* 1999).

Un grupo importante de metabolitos secundarios está constituido por compuestos nitrogenados, conocidos como alcaloides, de interés por sus variadas actividades fisiológicas y farmacológicas en humanos y animales, incluye la cafeína, la nicotina y la morfina (Alvarenga, 2010). Recientemente se ha descubierto su función ecoquímica en la defensa de la planta que las produce en contra de organismos patógenos y herbívoros (Palacios *et al.*, 2004).

Una de las plantas de importancia por la producción de oxi-indol alcaloides es la uña de gato (*Uncaria tomentosa*), liana tropical perenne de la familia de las rubiáceas que puede alcanzar alturas de hasta 30m. Tiene tallos leñosos provistos de espinas curvas en forma de uñas que le dan su nombre (figura 1). Presenta hojas lanceoladas, pecioladas de hasta 17cm de longitud, flores de color blanco amarillento, reunidas en racimos axilares de hasta 2cm de longitud. Es endógena del bosque lluvioso amazónico, específicamente de Perú, y puede ser encontrada en el trópico, en: Colombia, Ecuador, Venezuela, Costa Rica, Panamá, entre otros (Obregón, 1997).

Esta planta es utilizada por la medicina tradicional de grupos indígenas, principalmente de Perú, para tratar tumores, dolores articulares producidos por enfermedades reumáticas, problemas respiratorios, úlceras, enfermedades degenerativas e infecciosas, además de otras aplicaciones medicinales. El



Figura 1. Planta de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) donde se puede observar claramente la apariencia de las espinas que le dan su nombre común.

efecto inmuno estimulante de los oxindolalcaloides se ha informado en una serie de estudios y se describe en varias patentes comerciales; además, se comercializan extractos que se venden como antiinflamatorios y anticancerosos. De la *U. tomentosa* se han aislado metabolitos secundarios como terpenoides y alcaloides, y permanentemente se encuentran nuevos metabolitos útiles para la salud humana, entre ellos: alcaloides oxindoles (con propiedades anti-leucémicas), polifenoles y pequeñas concentraciones de otros metabolitos secundarios como glucósidos de ácido quinóico y tripterpenos polihidroxilados; además, se sabe que su actividad anti-inflamatoria es producida debido a la acción sinérgica de dichos metabolitos.

Su corteza resulta útil para tratar la inflamación del intestino, porque evita la producción de oxidantes (los antioxidantes endógenos pueden agotarse durante estados de inflamación crónica) y radicales libres, que son componentes integrales de las lesiones en los tejidos, mismo efecto que tienen algunos medicamentos costosos. *U. tomentosa* cuenta con gran aceptación

en la industria de los productos naturales y en la actualidad es utilizada sobre todo para estimular la función inmune, como un tónico y preventivo. Comúnmente, estos compuestos se extraen de plantas silvestres o cultivadas, lo cual tiene varias desventajas, entre ellas que su acumulación es baja y lenta, pues está regulada espacial y temporalmente. Asimismo, este método de extracción atenta contra la existencia del recurso; por lo anterior, el cultivo *in vitro* de esta especie se recomienda para la multiplicación masiva de las plantas.

La importancia de la propagación *in vitro* de la uña de gato (*U. tomentosa*) radica en la posibilidad de obtenerla durante todo el año. De esta manera, se puede dar más eficientemente la producción de metabolitos secundarios, y tener una mayor cantidad de material para los diferentes ensayos y productos; además se da una disponibilidad superior para los países que no pueden adquirir los medicamentos sintéticos con precios elevados. Aunado a esta metodología de producción, se pueden desarrollar protocolos para la conservación *in vitro* de los tejidos y células.

En general, entre los más utilizados para este propósito se encuentran las modificaciones físicas y químicas en las que crece el cultivo. Modificaciones en el medio de cultivo, principalmente la adición de agentes osmóticos, la disminución en la concentración de nutrientes, la disminución de la temperatura y luminosidad del cuarto de crecimiento son algunas de ellas. Por lo general, se recomienda la eliminación de los reguladores del crecimiento y la adición de carbón activado que elimina o reduce a niveles muy bajos la oxidación fenólica.

Las técnicas de cultivo *in vitro* ofrecen posibilidades y ventajas, tanto para la micropropagación como para la conservación de plantas de interés. La conservación a mediano plazo permite mantener la diversidad de esta especie, utilizándose como una alternativa o técnica complementaria de los mecanismos de

conservación *in situ*. Una ventaja de esta modalidad de conservación es que permite extender el tiempo entre sub cultivos, lo cual evita la contaminación por error humano, la erosión genética, la reducción de los costos en mano de obra y reactivos. Debido al interés medicinal y su importancia a nivel científico, se desarrolló esta investigación para establecer un protocolo de conservación a mediano plazo de uña de gato (*U. tomentosa* (Willd) D.C.), utilizando técnicas de crecimiento reducido *in vitro*.

Materiales y métodos

El presente estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), ubicado en el campus del Instituto Tecnológico de Costa Rica, en Cartago. Los ensayos se realizaron entre junio y noviembre del 2009. Como material experimental se utilizaron plantas de *Uncaria tomentosa* procedentes de la colección *in vitro* del CIB. Las plantas fueron multiplicadas en el medio de

cultivo estándar, que consistió en las sales y vitaminas M&S un 3% de sacarosa y 3mg/L de BAP (Bencilaminopurina). El pH se ajustó a 5,7 y el medio esterilizado por autoclave (1,2 atm de presión y 121° de temperatura durante 20 min). Estos cultivos fueron mantenidos a una temperatura aproximada de 27°C y un fotoperiodo de 16 horas luz, con una intensidad lumínica de alrededor 1900 lux antes de realizar los ensayos de conservación. Después de cuatro semanas, las plantas previamente multiplicadas se seccionaron en segmentos (microestacas) de un nudo, de aproximadamente un centímetro de longitud, sin hojas y excluyendo el ápice caulinar, para iniciar los ensayos de conservación.

Se sembraron tres microestacas por frasco en el medio de cultivo correspondiente al tratamiento por evaluar, según el ensayo descrito (cuadro 1). Para cada uno se cultivaron 12 frascos con tres microestacas cada uno.

Se evaluó semanalmente la contaminación y la oxidación en los diferentes

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo utilizados (tratamientos) para la conservación a mediano plazo de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.

Tratamiento
Control
M & S (1962) 100% + 30 g/L sacarosa + 3 mg/L BA
M & S (1962) 100% + 30 g/L sacarosa
M & S (1962) 100% + 40 g/L sacarosa
M & S (1962) 100% + 60 g/L sacarosa
M & S (1962) 100% + 40 g/L manitol
M & S (1962) 100% + 60 g/L manitol
M & S (1962) 50% + 30 g/L sacarosa
M & S (1962) 50% + 40 g/L sacarosa
M & S (1962) 50% + 60 g/L sacarosa
M & S (1962) 50% + 40 g/L manitol
M & S (1962) 50% + 60 g/L manitol

tratamientos; además, se determinó la sobrevivencia. A los dos, tres y cuatro meses de iniciado el ensayo, se promedió la altura de los explantes y se hicieron observaciones de las características que presentaban las plantas en los diferentes tratamientos.

Pasado el periodo de conservación *in vitro*, se eligieron los dos tratamientos que presentaron una alta supervivencia y un adecuado crecimiento para la conservación a mediano plazo. Las microestacas sobrevivientes fueron cultivadas en el medio de multiplicación estándar para evaluar la regeneración de plántulas después de un mes y se determinó la longitud de las plántulas y la presencia o ausencia de raíz.

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza de un diseño experimental completamente aleatorio por medio del programa estadístico Statistix 1.0 (1996) para comparar diferencias entre tratamientos. Una vez concluido el ensayo de regeneración, los dos tratamientos más efectivos se sometieron a una prueba de hipótesis para dos medias, con el fin de determinar cuál había demostrado una efectividad superior.

Resultados

Durante las evaluaciones iniciales se presentó contaminación y oxidación en algunos cultivos, que fueron excluidos del cuarto de crecimiento y no se contabilizaron en las evaluaciones mensuales. El tratamiento M & S 50% + 60 g/L manitol fue descartado completamente antes de las evaluaciones mensuales, ya que todos los individuos se oxidaron o contaminaron. Por otra parte, los brotes del tratamiento M & S 100% + 60 g/L manitol sobrevivieron dos meses, lo cual parece indicar que el manitol fue tóxico para la uña de gato.

Las evaluaciones de la altura promedio, del número de explantes oxidados y de los explantes sobrevivientes, así como las

observaciones generales para los dos y tres meses, mostraron que los brotes en el medio normal de crecimiento (Control: M&S 100% + 30g/L sacarosa + 3 mg/L BA) presentaron una altura promedio de 2,25 y 4 cm respectivamente, un bajo porcentaje de explantes oxidados a los tres meses (14,3) y altos porcentajes de explantes sobrevivientes (100 y 87,7% a los dos y tres meses respectivamente); además, presentaron hojas frondosas y vigorosas con coloración verde rojiza, raíces delgadas y cortas.

Por otra parte, cuando se eliminó la concentración de BA del medio de cultivo estándar (control), la altura promedio de los brotes fue muy similar al control, lo mismo que el porcentaje de explantes sobrevivientes y el aspecto general de estos. Sin embargo, en los tratamientos en los que se incrementó la concentración de sacarosa a 40 y 60 g/L, la altura promedio de los brotes se redujo a 1,35 y 1,1 cm respectivamente; después de tres meses de cultivo, el aspecto de los brotes fue normal.

En ambos casos la oxidación se incrementó a valores cercanos al 20%. Al comparar estos resultados con los observados en los ensayos en que se adicionó al medio de cultivo la mitad de la concentración de sales (M&S 50%) y 30, 40 y 60 g/L de sacarosa, la sobrevivencia fue alrededor del 100%, excepto en el tratamiento con 60 g/L de sacarosa, en el cual la sobrevivencia alcanzó valores cercanos al 75%.

En los ensayos en que se evaluó la respuesta de los explantes al cultivo en el medio M&S 100% con 40% y 60 g/L manitol, se observó que, a pesar de que la altura promedio fue baja, los explantes mostraron porcentajes de oxidación entre el 40 y 47% y sobrevivencia del 52 al 60% en la evaluación a los dos meses, pero a los tres meses de cultivo, la sobrevivencia disminuyó al 7 y 0% respectivamente. En general, los tratamientos con manitol mostraron crecimiento lento, hojas poco desarrolladas, rojizas y alta oxidación cuando los explantes sobrevivieron (cuadro 2).

Cuadro 2. Conservación *in vitro* de uña de gato (*Uncaria tomentosa*), después de dos y tres meses de cultivo en condiciones de crecimiento reducido *in vitro*.

Tratamiento	Altura promedio (cm)		Explantos oxidados (%)		Explantos sobrevivientes (%)		Observaciones	
	2 meses	3 meses	2 meses	3 meses	2 meses	3 meses	2 meses	3 meses
M S 100% + 30 g/L sacarosa, 3mg/L de BA	2,25	4,0	0,0	14,3	100,0	85,7	Algunas hojas con coloración rojiza. Raíces delgadas y cortas	Hojas frondosas y vigorosas
MS 100% + 30 g/L sacarosa	2,25	4,35	5,7	2,9	94,3	97,1	Crecimiento heterogéneo	Crecimiento normal
MS 100% + 40 g/L sacarosa	1,15	1,35	21,7	21,7	78,3	78,3	Coloración verde pálido o rojiza en algunas hojas	Crecimiento normal
MS 100% + 60 g/L sacarosa	0,4	1,1	25,0	20,6	75,0	79,4	Mayoría oxidada, crecimiento uniforme, en la mayoría brota una sola yema	Crecimiento normal
MS 100% + 40 g/L manitol	0,5	0,9	47,8	92,3	5,2	7,7	Crecimiento lento, alta oxidación	Explante ligeramente oxidado
MS 100% + 60 g/L manitol	0,45	-	40,0	-	60,0	-	Pocas hojas, casi todo oxidado	-
MS 50% + 30 g/L sacarosa	3,3	3,0	0,0	2,7	100,0	97,3	Alto crecimiento, algunas hojas rojizas	Hojas bajas rojizas
MS 50% + 40 g/L sacarosa	2,6	3,05	0	0	100,0	100,0	Alto crecimiento, algunas hojas rojizas, alta elongación de entrenudos	Hojas bajas rojizas
M & S 50% + 60 sacarosa	1,5	2,2	23,4	25,0	76,6	75,0	Crecimiento moderado, raíces gruesas	Hojas con bordes rojizos
MS 50% + 40 g/L manitol	0,3	1,1	0,0	0,0	100,0	100,0	Crecimiento moderado	Crecimiento normal

Después de los cuatro meses de iniciado el ensayo, aquellos explantes cultivados en los tratamientos que contenían manitol no lograron sobrevivir, pero los tratamientos con la concentración de sales completa (M&S 100%) o a la mitad (M&S 50%) con sacarosa sobrevivieron en porcentajes que variaron del 27,7% para el control (con 30 g/L sacarosa), hasta un 80% para los conservados en M&S 50% + 30 g/L sacarosa. Sin embargo, para determinar cuál fue el tratamiento más efectivo para la conservación, es decir, para extender el periodo de transferencia a medio fresco (subcultivo), es necesario considerar otras variables.

Para la conservación *in vitro* a mediano plazo, lo ideal es que el explante se mantenga con un solo brote, tenga poco incremento en longitud, sin raíces, o poco desarrolladas y con aspecto saludable. El tratamiento con las sales M&S al 100% y 60 g/L de sacarosa presentó el menor número de explantes enraizado (4); adicionalmente, el aspecto de las hojas fue verde y saludable (cuadro 3), pero además la mayoría de los explantes produjo el

desarrollo de una sola yema. Los explantes que cumplieron estos requisitos fueron los cultivados en el tratamiento en el medio M&S 100% con 60 g/L de sacarosa, ya que mostraron 52,7% de sobrevivencia y una altura promedio de 1,34 cm. (cuadro 2).

Aun cuando los explantes cultivados en los tratamientos en la concentración de sales reducida a la mitad y en las diferentes concentraciones de sacarosa lograron altos porcentajes de sobrevivencia, se puede concluir que estos tratamientos, al igual que el control, no son tan efectivos retardando el crecimiento del explante inicial, pues permitieron el rápido crecimiento y el desarrollo de raíces, por lo que estos deberán transferirse en corto tiempo a medio fresco para evitar su deterioro (cuadro 3).

Se comparó estadísticamente la efectividad en la conservación a mediano plazo de los tratamientos MS con 40g/L y MS con 60 g/L de sacarosa, entre los cuales no se observó diferencia significativa. Se encontró una diferencia altamente significativa ($P = 0.0000$) entre estos tratamientos en relación con los otros tratamientos, en

Cuadro 3. Conservación *in vitro* de uña de gato (*Uncaria tomentosa*), después de cuatro meses de cultivo en condiciones de crecimiento reducido *in vitro*.

Tratamiento	Nº explantes sobrevivientes/Nº explantes cultivados inicialmente (%)	Altura promedio (cm)	Nº de explantes enraizados	Coloración hojas
MS 100% + 30 g/L sacarosa, 3mg/L de BA	10/36 (27,7)	4,91	8	Verdes
MS 100% + 30 g/L sacarosa	22/36 (61,1)	4,90	21	Verdes
MS 100% + 40 g/L sacarosa	21/36 (58,3)	1,40	10	Verdes
MS 100% + 60 g/L sacarosa	19/36 (52,7)	1,34	4	Verdes
MS 50% + 30 g/L sacarosa	29/36 (80,5)	3,07	29	Rojas o rojo-amarillentas
MS 50% + 40 g/L sacarosa	29/36 (80,5)	3,13	29	Rojas
MS 50% + 60 g/L sacarosa	21/36 (58,3)	2,44	19	Rojas o amarillas

cuanto a la presencia de raíces. Estos dos podrían permitir un desarrollo más lento de los explantes, conveniente para la conservación a mediano plazo.

Al finalizar los cuatro meses del ensayo, los explantes provenientes de los medios M&S 100% con sacarosa (40 y 60%), fueron transferidos al medio estándar para la multiplicación de uña de gato. Después de un mes, se observó que el 40% y 67% de los explantes respectivamente fueron capaces de crecer y continuar su desarrollo normal (cuadro 4).

Discusión

Los dos tratamientos en medios con las sales y vitaminas M&S al 100% de concentración a los que se les adicionó cantidades mayores de sacarosa (40 g/L y 60 g/L) fueron los más efectivos para retardar el crecimiento.

La sacarosa tiene dos funciones en un medio de cultivo, puede servir como fuente de carbono y como agente osmótico. Si se incrementa al 4 y 5% la concentración de sacarosa en un medio rico en sales como el M&S, en muchos tipos de cultivo se producirá una inhibición progresiva del crecimiento celular, causada probablemente por la adición de sustancias osmo activas.

Los agentes osmóticos son compuestos capaces de reducir el potencial hídrico de las células. La adición de estos al medio de cultivo ha sido confirmada como un método eficiente para reducir el crecimiento e incrementar la sobrevivencia en almacenamiento de diferentes especies, esto porque son capaces de crear un estrés

osmótico que evita tanto el crecimiento del callo como la brotación. El manitol, la sacarosa y el sorbitol son algunos de los agentes osmóticos que han resultado eficientes retardadores de crecimiento.

Usualmente, altas concentraciones de sacarosa no resultan tóxicas, por lo menos a corto plazo, y el crecimiento celular puede ser reasumido cuando los tejidos y los órganos son transferidos a medios con concentraciones menores o normales de sacarosa.

Se podría concluir que los tratamientos con concentraciones de 40 y 60 g/L de sacarosa continuarían siendo los más efectivos durante periodos mayores, ya que probablemente mantengan la viabilidad de los explantes, al no agotar las sales del medio de cultivo, debido a la inhibición del crecimiento, y por lo tanto, no requerir el subcultivo en corto plazo.

Los explantes cultivados en ausencia de sacarosa o a muy bajas concentraciones de este azúcar presentaron menor incremento en crecimiento con base en el peso fresco, longitud y número de yemas producidas; sin embargo, se vio afectado el número de explantes sobrevivientes. Por otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los de Alvarenga y col (2006), en *Sechium edule*, ya que el incremento en la concentración de la sacarosa produjo un estrés osmótico tal que la tasa de crecimiento de los explantes disminuyó considerablemente.

El manitol es un azúcar alcohol, es otro agente muy utilizado para inducir estrés osmótico, con diferentes niveles de efectividad, dependiendo del cultivo en

Cuadro 4. Evaluación de la regeneración de nudos de *U. tomentosa*, en medio de cultivo de multiplicación, después de cuatro meses en condiciones de crecimiento reducido *in vitro*.

Tratamiento original	Sobrevivencia
MS 100% + 40 g/L sacarosa	40%
MS 100% + 60 g/L sacarosa	67%

el que se apliquen. Se considera que no provoca otros efectos biológicos. Tanto el compuesto como su concentración producen diferentes respuestas según la especie y el estadio fenológico del explante; sin embargo, en este trabajo, en medios con sales y vitaminas M&S (1962) al 100% y 50% de concentración, suplementados con diferentes concentraciones de manitol (4 y 6%), los explantes de *U. tomentosa* sufrieron oxidación y los cultivados en medios con concentraciones de 60g/L no sobrevivieron.

Los protocolos de conservación *in vitro* a mediano plazo emplean en forma frecuente la disminución de un 25% a un 75% tanto de las sales minerales, vitaminas como del Fe-EDTA. Se ha observado que la reducción a un 25% de las sales del medio M&S (1962) parece ser uno de los factores más importantes para mantener la viabilidad de meristemas de *Melia azedarach* conservados durante periodos mayores a un año.

En el ensayo efectuado, los dos tratamientos que mostraron un retardo en el crecimiento fueron los que consistieron de una alta concentración de sacarosa, sin reducción en la concentración de nutrientes, esto posiblemente como resultado del estrés osmótico que este carbohidrato causó. Aunque en este caso el incremento en la cantidad de sacarosa no fue tal como para triplicar la concentración inicial, sí fue suficiente para causar el estrés que provocó una reducción en el crecimiento de las microestacas de *U. tomentosa*; así resultó un método óptimo para realizar la conservación a mediano plazo, como se reporta en otras especies.

A pesar de que el manitol es un agente osmótico utilizado con frecuencia con el objetivo de retardar el crecimiento, la literatura menciona que las respuestas dependen en gran medida de la especie, el genotipo por conservar y las condiciones de cultivo. En este caso, su utilización no solo fue ineficiente en el retardo del crecimiento, sino que causó oxidación y

muerte de los explantes de la uña de gato, al punto de que estos tratamientos no pudieron ser evaluados a los cuatro meses. Por este motivo, y ante la efectiva respuesta de la sacarosa en altas concentraciones, se optó por no recomendar la utilización de manitol como fuente de carbono.

En los casos en los que se aplicó una menor concentración de nutrientes (medio de cultivo M&S (1962) al 50% no se retardó el crecimiento de las plantas. Además, las hojas, en especial las basales, presentaron una coloración amarillenta o rojiza que hace sospechar que las plantas fueron afectadas por la insuficiencia de alguno de los nutrientes que fueron agregados en una menor concentración, posiblemente el potasio, ya que los síntomas presentados en las plantas coinciden con los citados en la literatura cuando se da la deficiencia de este elemento (Azcon-Vieto y Talon, 2008).

A pesar de lo mencionado en la literatura sobre la conservación de meristemas o de especies forestales tropicales, la reducción en la concentración de nutrientes hasta un 75% es una práctica efectiva para la conservación a mediano plazo, su utilización en explantes de *Uncaria tomentosa* no resultó favorable. Ante estos hechos, igualmente se descartó el uso de menores concentraciones de nutrientes para la conservación a mediano plazo.

Los dos tratamientos con sacarosa a 40 y 60g/L, seleccionados para implementar la conservación del germoplasma de *U. tomentosa* a mediano plazo, no mostraron diferencia significativa según el análisis estadístico. Por lo tanto, pueden recomendarse indistintamente cualquiera de estos, pero debido a que la regeneración en medio de multiplicación fue superior (67%) en el tratamiento con 60g/L de sacarosa, se recomienda para la conservación de esta especie a mediano plazo.

Conclusión

Con la adición de concentraciones de sacarosa mayores a 30 g/L en un medio de cultivo, con las sales y vitaminas M&S (1962), se retardó el crecimiento de microestacas de *Uncaria tomentosa*, los explantes conservaron su capacidad de regeneración.

Por otra parte, la adición de manitol resultó en explantes oxidados y muertos, por lo que su utilización como agente osmótico en *U. tomentosa* se descartó; además, al añadir concentraciones menores de los nutrientes al medio de cultivo, el crecimiento no se retardó y se manifestaron síntomas de deficiencia nutricional. Por lo anterior, el método no es recomendado en la conservación a mediano plazo de la uña de gato. A su vez, los tratamientos de conservación que incluyeron altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo resultaron igualmente efectivos y permitieron la regeneración de las plántulas una vez transferidas al medio de cultivo estándar. Así resultó que los tratamientos más efectivos para la conservación a mediano plazo fueron M & S (1962) 100% + 40 g/L sacarosa y M & S (1962) 100% + 60 g/L sacarosa.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica por el apoyo financiero para realizar esta investigación.

Bibliografía

Aguilar, J.; Rojas, P.; Marcelo, A.; Plaza, A.; Bauer, R.; Reiningger, E.; Klaas, C. y Merfort, I. (2002). *Anti-inflammatory activity of two different extracts of Uncaria tomentosa (Rubiaceae)*. Journal of Ethnopharmacology 81, 271-276.

Alvarenga, S.; Abdelnour, A. y Villalobos, V. (2006). *Conservación in vitro de chayote (Sechium edule)*. Agronomía Mesoamericana, 18(1): 65-73. Disponible en: http://www.eefb.ucr.ac.cr/Revistas/Agronomia_

Mesoamericana/Vol.%2018(1)%202007/articulos/7.Alvarenga-Sechium.pdf. Consultado el: 14/02/2009.

Alvarenga, S. (2010). *Establecimiento in vitro y cultivo de células de la uña de gato (Uncaria tomentosa) (Willd.) D.C.* Revista Tecnología en Marcha 23(5): 24-33.

Alvarenga, S.; Arnáez, E.; Moreira, I.; Alán, E.; Romero, E.; Vargas, W.; (2008). *Domesticación de Uncaria tomentosa (uña de gato) en Costa Rica.* in: Manejo integrado de Recursos Bióticos. Rogelio Oliver, Marisela Tabaeda y Andrea Granjeno (Compiladores). AGT Editor, S.A. México. Pp: 136-146.

Azcon-Bieto, J.; Talon, M. (2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. 2da. Ed. Mcgraw-Hill-Interamericana de España. Pp. 103-143.

Bobrowski, P. J. *Methods and preparations of extracts of Uncaria species with reduced alkaloid content*. United States Patent No.: U.S 2004/0068130 A1. Apr. 8, 2004.

Engelmann, F. (1997). *In vitro conservation methods*. In: Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use. Callow, J.A., Ford-Lloyd, B.V. y Newbury, J.H. (Ed.). CAB International, Wallingford. pp. 119-161.

García, L., de Fera, M., Acosta, K. (2007). *Aspectos básicos de la conservación in vitro de germoplasma vegetal*. Biotecnología Vegetal. 7 (2): 67 – 79.

George, E. F. *Plant Tissue Culture Procedure-Background*. In: Plant Propagation by Tissue Culture. Edited by E. F.; George, M. A. Hall, and G. De Klerk 3rd. Edition. Wageningen, The Netherlands Springer. .pp:1-28. 2008.

Kitajima, M., Hashimoto, K., Sandoval, M., Norio, A. y Takayama, H. (2004). *New Oleanan-Type Triterpene and Cincholic Acid Glycosides from Peruvian "Uña de Gato" (Uncaria tomentosa)*. Chem. Pharm. Bull. 52(10) 1258—1261

Keplinger, K. H. Wagner, H. Kreutzkamp, B. *Oxindole Alkaloids Having Properties Stimulating the Immunologic System*. United States Patent #4,844,901, Jul 4.1989.

Murashige, T.; Skoog, G. (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant 15: 473-497.

Palacios, N., Burtin, D. y Leech, M. *Biología molecular, una herramienta para la bioprospección del metabolismo secundario*

- de plantas en Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología. 6 (2): 67-77
- Palacios, N. y Leech, M. (2004). *Análisis de iridoides y expresión de genes que codifican enzimas tempranas en la síntesis de alcaloides indol terpenólicos en Catharanteus roseus*. Revista Colombiana de Biotecnología. 6 (1): 36-42.
- Pero, R. W. *Method of preparation and composition of a water soluble extract of the plant species Uncaria for enhancing immune, anti-inflammatory, anti-tumor and DNA repair processes of warm blooded animal*. United States Patent No.: U.S 2001/0022981 A1. Sep. 20, 2001.
- Obregón, L. (1997) "Uña de Gato" "Cats claw" Género *Uncaria*. *Estudios botánicos, químicos y farmacológicos de Uncaria tomentosa y Uncaria guianensis*. Tercera Edición. Instituto de Fitoterapia Americano. Lima, Perú. 169pp.
- Sandoval, M., Thompson, J., Zhang, X.; Liu, X., Mannik, E., Dadowska, H., Charbonnet, R., Clark, D. y Miller, M. (1998). *Antiinflammatory Actions of Cat's Claw: the Role of NF-kB*. *Aliment Pharmacol Ther*. 12: 1279-1289.
- Scocchi, A. and Mroginski, L. (2004). *In vitro conservation of apical meristem-tip of Melia azedarach L. (Meliaceae) under slow-growth conditions*. *Phyton, Revista Internacional de Botánica Experimental*. 2004: 137-143. Buenos Aires, Argentina.
- Seguel, I. (2001). *Conservación de recursos fitogenéticos ex situ. Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur*. Disponible en: http://www.fagro.edu.uy/~fitotecnia/docs/Conservacion_de_recursos_Fitogeneticos.pdf. Consultado: 12/04/2010.
- Sengbusch, P. (2003). *The Secondary Metabolism of Plants: Secondary Defence Compounds*. Disponible en: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e20/20.htm>. Consultado: 25/06/2010.
- Shibli, R., Shatnawi, M., Subahi, W. and Ajlouni, M. (2006). *In vitro Conservation and Cryopreservation of Plant Genetic Resources: A Review*. *World Journal of Agricultural Sciences* 2 (4): 372-382.
- Thorpe, T.; Stasolla, C.; Yeung, E. C.; de Klerk, G-J.; Roberts, A. and E. F. George. *The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects and Support Sysems*. In: *Plant Propagation by Tissue Culture*. Edited by E. F.; George, M. A. Hall, and G. De Klerk. 3rd. Edition. Wageningen, The Netherlands. Springer. pp:115-173. 2008.
- Trejo, G. y Rodríguez, M. (2007). *La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales in vitro*. *Interciencia*. 32 (10): 669-674.
- Verpoorte, R.; Heijden, R.; Hoopen, H.J.G.; Memelink, J. (1999). *Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals*. *Biotechnology Letters* 21:467-479.