

PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Renealmia alpinia* (ROTTB), PLANTA CON ACTIVIDAD ANTIOFÍDICA

IN VITRO PROPAGATION OF *Renealmia alpinia* (ROTTB), PLANT AGAINST SNAKEBITE.

Juan C. ALARCÓN P.^{1*}, Diego M. MARTÍNEZ R.¹, Juan C. QUINTANA C.¹
Silvia JIMÉNEZ R.¹, Abel DÍAZ C.¹, Ivone JIMÉNEZ.²

Recibido: Marzo 11 de 2008 Aceptado: Mayo 13 de 2008

RESUMEN

La *Renealmia alpinia* (matandrea o achira de monte) es una planta que por sus efectos antiedematizantes, antihemorrágicos y neutralizantes del veneno de la serpiente *Bothrops asper* (mapaná equis), se constituye en una potencial alternativa de atención primaria en accidentes ofídicos, o en una fuente de moléculas con importancia farmacéutica. A pesar de ello, no existen estudios previos encaminados a la propagación vegetativa, la dediferenciación tisular o la producción *in vitro* de sus metabolitos. En este trabajo se evalúan bajo condiciones *in vitro* algunas variables como la altura, el número de brotes y raíces en la propagación de *R. alpinia*, así como la tasa de velocidad de multiplicación y la inducción de tejido indiferenciado en explantes foliares. La adición de 6- Bencilaminopurina (3 mg/L) promueve la propagación de esta especie vegetal, con una tasa de velocidad de multiplicación (TVM) de 1.39 brotes/semana, mientras que la inducción de tejido indiferenciado se ve favorecida por la exposición de los explantes foliares a la combinación de 2,4-D (2 mg/L) y BA (1mg/L). Adicionalmente, se detecta en el tejido foliar (de plantas crecidas *in vitro* y *ex vitro*) la presencia de cumarinas, metabolitos encontrados en algunas plantas con conocida actividad antiofídica, abriendo así la posibilidad de estudios encaminados a la producción y evaluación *in vitro* de estos y otros metabolitos con potencial interés farmacéutico.

Palabras clave: *Renealmia alpinia*, micropopagación, cumarinas, 6- Bencilaminopurina (BA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

ABSTRACT

Renealmia alpinia (matandrea or achira de monte) it`s an important plant for their neutralizing ability of both effects oedema-forming, hemorrhagic and clotting of the venom of the snake *Bothrops asper* (mapaná equis). It is a potential alternative of primary attention in ofidic accidents, or like a source of molecules with pharmaceutical importance. Despite this, there is not previous studies on this specie guided to micropropagation, tissular dedifferentiation or in vitro metabolites production. In this work was evaluated some variables as the height, the number of shoots and roots in the propagation of *R. alpinia* under in vitro conditions, as well as the rate of speed multiplication and the induction of having undifferentiated tissue in foliar explants. Addition of 6-Bencylaminopurine (3 mg/L) promotes the propagation in vitro, with a rate of speed multiplication (TVM) of 1.39 shoots/week, while the induction of having undifferentiated tissue in foliar explants was favored by both 2,4-D (2 mg/L) and BA (1mg/L)in combination. Additionally, was detected in foliar tissues (of grown plants in vitro and in vitro) coumarins, its metabolites has been found in some plants with well-known antiofidic activity, this results open possibilities of studies in order to the production and in vitro activity evaluation of metabolites with potential antiofidic activity or pharmaceutical interest.

Keywords: *Renealmia alpinia*, micropropagation, coumarins, 6- Bencylaminopurine (BA), 2,4 phenoxiacetic acid dichlore.

1 Programa de Ofidismo y Escorpionismo, Universidad de Antioquia, A. A. 1226. Medellín, Colombia

2 Estudiante, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, A. A. 1226

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: jalarcon@farmacia.udea.edu.co, (574) 2195476

INTRODUCCIÓN

La *Renalmia alpinia* (Rottb.) Maas (Zingiberácea), planta conocida vulgarmente con los nombres de guaiporé, pintura negra, jazmín de monte, matandrea o achira de monte (1,2,3), es una especie con germinación seminal poco exitosa y una propagación dependiente de la continua generación de vástagos a partir de su rizoma (4). Posee estructura herbácea musoide de altura mediana (hasta los 6 metros), olor canforáceo similar al cardamomo, pecíolos normalmente ausentes y hojas elípticas enteras (30-110 x 5-18 cm) con limbos largos y anchos que se caracterizan por el color rojizo de las nervaduras. Similar a la coloración de estas últimas, los frutos (cápsulas elipsoides de 1,5-3,5 cm coronados por restos del cáliz y con maduración progresiva) y las flores son de tonalidades relacionadas, aunque la variación involucra algunos tonos mas oscuros (tendencia al negro en los frutos), o tendencia al naranja y el rosa en las flores que se encuentran organizadas en panículas basales con brácteas de colores similares (4,5). Esta planta, cuya composición química involucra carotenoides, monoterpenos, diterpenos y sesquiterpenos (6,7,8), es típica de bosques tropicales húmedos de tierras bajas y es utilizada tradicionalmente para la extracción de tinte a partir de los frutos carnosos, la preparación de aceites a partir de semillas (2), como comestible (arilo de las semillas), en decocción o extracto etanólico como febrífugo (9), contra náuseas y vómitos (10, 11), para proteger los cultivos de maíz de roedores y aves (4) y como antiinflamatorio, antihemorrágico y neutralizante del veneno de *Bothrops atrox asper* (mapaná equis), serpiente causante del 50% a 70% de las mordeduras de reptiles en este país (9,12,13,14)

Técnicas como la desdiferenciación tisular y la producción *in vitro* de metabolitos, no han sido exploradas en esta especie vegetal, a pesar de su potencial utilización en el estudio y la producción *in vitro* de metabolitos con actividad neutralizante

de venenos de serpiente. Así, adquieren especial relevancia los trabajos encaminados a la aplicación de técnicas *in vitro*, y a la generación de plantas que, con escasa variación somaclonal, garanticen potencialmente la uniformidad en la producción y se conviertan en un mecanismo alterno de generación de metabolitos neutralizantes del veneno o, también, de interés en algunos eventos farmacológicos adicionales como el neurotóxico, el miotóxico y el agregante plaquetario (15).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Trescientas sesenta (360) plántulas obtenidas de semillas colectadas en el corregimiento de Titumate, Unguía (Chocó) (5 m.s.n.m.), germinadas en microestación biológica, e identificadas por el Herbario de la Universidad de Antioquia, sirvieron como material de partida para todos los ensayos realizados. Estas plántulas, una vez lavadas con jabón yodado y abundante agua corriente, se desinfectan por exposición a NaClO (2% V/V, 25 min.) antes de ser transferidas asepticamente a frascos de cultivo dispuestos con un medio nutritivo previamente esterilizado con calor húmedo (121°C/15psi/15 min.). Dicho medio está compuesto por las sales básicas propuestas por Murashige & Skoog (16): pH=5,8, sacarosa (30 g/l) y agar (7 g/l) con adiciones de reguladores de crecimiento tipo citoquinina (tratamientos empleados, tabla1). Una vez establecidas en condiciones *in vitro*, las plántulas se subcultivan cada cuatro semanas y se mantienen bajo condiciones controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) y fotoperiodicidad correspondiente a día largo (16h de luz, $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), evaluando semanalmente el número de brotes, la altura de las plántulas y la aparición de nuevas raíces, como respuesta variable a cada uno de los tratamientos empleados.

Tabla 1. Tratamientos empleados para la propagación *in vitro* de *Renalmia alpinia*

Tratamiento	No. de plantas	6- Bencilaminopurina (BA) mg/l	6- furfurilaminopurina (Kinetina) mg/l
1	40	0	5
2	40	0	3
3	40	0	2
4	40	0	1
5	40	5	0
6	40	3	0
7	40	2	0
8	40	1	0
Control (9)	40	0	0

La tasa de multiplicación (TVM) se calcula como la diferencia entre el número de brotes obtenidos al final del ciclo y el número de explantes introducidos al ciclo de multiplicación, dividida por el tiempo de duración del ciclo: número de brotes final –número de brotes inicial) / tiempo.

Desdiferenciación celular

Para inducir desdiferenciación tisular en segmentos de hojas (1 cm²) y de raíces (0.5 cm de longitud) provenientes de plántulas crecidas *in vitro*, los explantes se disponen en medios de cultivo compuestos por las sales básicas propuestas por Murashige & Skoog (16): pH (5,8), sacarosa

(30 g/l) y agar (7 g/l) con adiciones en concentraciones variables de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y BA (tratamientos empleados, tabla2).

Marcha fitoquímica preliminar de *R. alpinia*

El estudio fitoquímico preliminar de *R. alpinia* se realiza de acuerdo al método propuesto por Sanabria (17), con el fin de detectar sustancias vegetales presentes en hojas y rizomas tales como: alcaloides, lactonas, esteroides y/o terpenoides, flavonoides, naftoquinonas y antraquinonas, saponinas y taninos. La detección de la cumarina se realiza por el método planteado por Xorge Domínguez (18). Las pruebas se realizan por duplicado.

Tabla 2. Tratamientos empleados para la inducción de tejido indiferenciado en explantes de hojas y raíces de *Renealmia alpinia*

Tratamiento *	2,4-Diclorofenoxiacético (mg/l)	Bencilaminopurina (mg/l)
Control	0	0
1	10	0
2	15	0
3	20	0
4	25	0
5	5	1
6	10	1
7	18	1
8	18	0
9	15	1
10	20	1
11	2	1
12	25	1

Estimación cualitativa preliminar del contenido metabólico

Para comparar el contenido de metabolitos se colectan hojas del material propagado *in vitro* y hojas de plantas crecidas *ex vitro*, y se secan en estufa a 35°C durante 48 horas. Una vez secas, se les realiza percolación en etanol al 96% durante 48 horas, se concentran en rotaevaporador Büchi R-124®, y, finalmente, se almacenan a 4°C. Con los extractos obtenidos se realiza una cromatografía en capa fina utilizando sílica gel 60F-254 y tolueno: etanol (4.5:0.5) para detectar compuestos de tipo esteroi- dal, mientras que para determinar los compuestos de tipo cumarina se emplea la mezcla tolueno: éter

dietílico:ácido acético 10% (2.5:2.5:2.5)(19). Una vez concluidas las cromatografías, las placas se revelan con luz ultravioleta a 254 nm para determinar las bandas cromatográficas características.

Tratamiento estadístico

Las variables de la micropropagación (altura de la planta, número de raíces y generación de brotes) y los efectos involucrados en la inducción de tejido indiferenciado se comparan mediante análisis de varianza de mediciones repetidas en el tiempo, considerando como factor fijo el medio de cultivo con nueve tratamientos diferentes. Debido a la falta de esfericidad en los datos, se utilizó la

prueba multivariada de Pillai-Bartlett y los efectos de los tratamientos en cada variable de estudio se compararon con la prueba de Newman-Keuls. Los datos se procesaron en el paquete STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) y las pruebas se consideraron significativas con una probabilidad de error $p < 0.05$.

RESULTADOS

Generación de brotes

Al cabo de las ocho semana de cultivo, todos los medios de cultivo empleados logran inducir la producción de brotes, con un crecimiento semanal ($p < 0.001$) y diferencia entre los tratamientos ($p = 0.039$); no obstante, la prueba de Newman-Keuls no detecta diferencias significativas entre ellos (tabla 3 y figura 1), pero sí permite evidenciar que con el medio de cultivo que incluye 3mg/L de BA se obtiene el mejor promedio de inducción: 12.2 brotes luego de las ocho semanas del ensayo. Por su parte, la utilización de 6-kinetina, aunque

promueve la generación de brotes, en ninguno de los casos produce una tasa de multiplicación superior a la observada en los explantes dispuestos en los medios de cultivo control (figura 1). Los brotes generados presentan apariencia vigorosa y tonalidad verde clara (figura 2 B y D), mientras que el desarrollo de hojas es claro y sin procesos necróticos (figura 2 C).

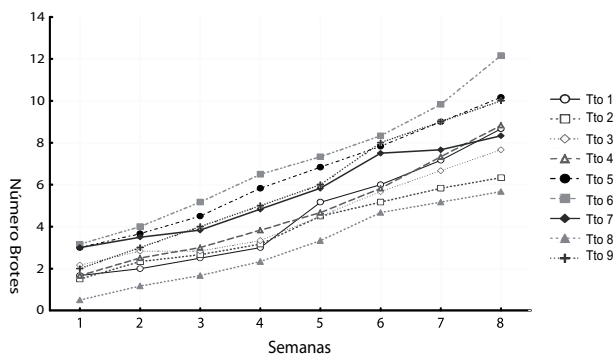


Figura 1. Número promedio semanal de brotes según el tratamiento aplicado. El tratamiento 9 corresponde al control

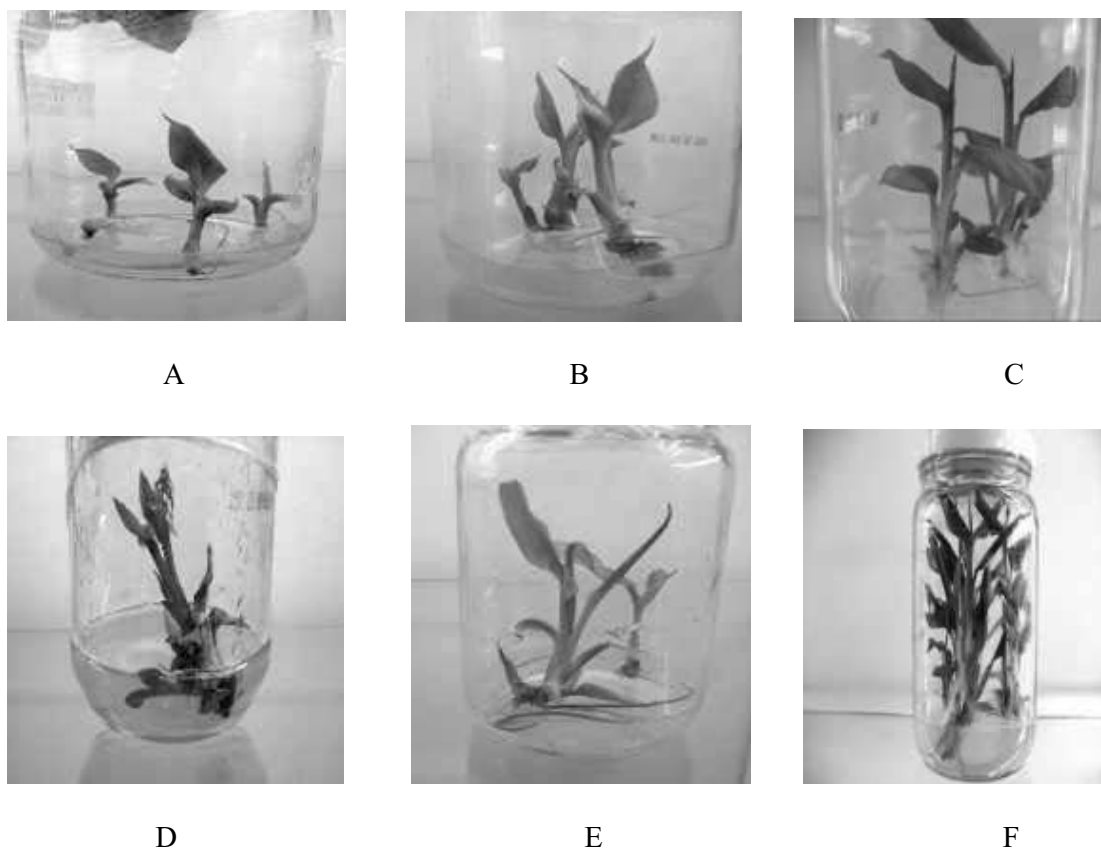


Figura 2. Micropropagación *in vitro* de *R. alpinia*. Establecimiento inicial de plántulas obtenidas por germinación (A), que desarrollan brotes laterales vigorosos (B, D), rizogénesis definida (E) y crecimiento apical notorio (C,F).

Tabla 3. Prueba de Newman-Keuls ($\alpha = 0.05$) para la comparación del número de brotes, altura de la planta y número de raíces en los diferentes tratamientos empleados en el ensayo.

Tratamiento	Número de brotes		Altura		Número de raíces	
	Media \pm DE*	Promedio de brotes en la semana 8	Media \pm DE (cm.)*	Altura promedio en la semana 8	Media \pm DE*	Promedio de raíces en la semana 8
1	4.52 \pm 3.26 ^a	8.66 \pm 4.63	6.68 \pm 1.27 ^{ab}	8.06 \pm 1.26	12.93 \pm 3.33 ^b	20.0 \pm 5.21
2	3.93 \pm 1.89 ^a	6.33 \pm 1.63	6.24 \pm 0.70 ^{ab}	7.51 \pm 0.54	12.29 \pm 2.92 ^{ab}	17.5 \pm 4.03
3	4.45 \pm 1.57 ^a	7.66 \pm 2.58	6.72 \pm 1.25 ^{ab}	8.46 \pm 1.11	13.47 \pm 1.81 ^b	20.83 \pm 2.13
4	4.70 \pm 1.48 ^a	8.83 \pm 1.83	5.82 \pm 1.00 ^{ab}	7.71 \pm 1.18	9.87 \pm 3.20 ^{ab}	16.33 \pm 3.32
5	6.35 \pm 1.56 ^a	10.16 \pm 2.48	4.71 \pm 1.36 ^a	5.43 \pm 1.44	7.64 \pm 2.85 ^a	13.66 \pm 2.94
6	7.06 \pm 2.01 ^a	12.16 \pm 2.31	6.80 \pm 2.09 ^{ab}	8.11 \pm 1.66	11.33 \pm 2.02 ^{ab}	17.66 \pm 2.16
7	5.56 \pm 2.72 ^a	8.33 \pm 3.50	7.05 \pm 1.57 ^b	8.38 \pm 1.49	10.35 \pm 3.70 ^{ab}	16.00 \pm 5.58
8	3.06 \pm 1.91 ^a	5.66 \pm 2.80	6.35 \pm 1.31 ^{ab}	8.90 \pm 1.54	11.93 \pm 2.83 ^{ab}	20.83 \pm 3.31
9**	5.87 \pm 1.94 ^a	10.00 \pm 2.82	6.10 \pm 0.33 ^{ab}	7.00 \pm 0.28	11.12 \pm 2.47 ^{ab}	17.0 \pm 2.82

* Los tratamientos con la misma letra forman grupos homogéneos.

** El tratamiento 9 corresponde al control

Altura de las plántulas multiplicadas *in vitro*

La altura de las plantas resulta influenciada por los tratamientos empleados ($p = 0.027$). La mayor altura promedio se obtiene con el tratamiento que incluye 1 mg/L de BA; sin embargo, las alturas promedio resultan similares en la semana ocho de cultivo ($p = 0.051$) (tabla 3 y figuras 2C, 2F y 3). De los resultados observados, se resalta que todos los tratamientos, excepto el cuatro (kinetina 1 mg/L), presentan promedio de altura final ligeramente superior al del control.

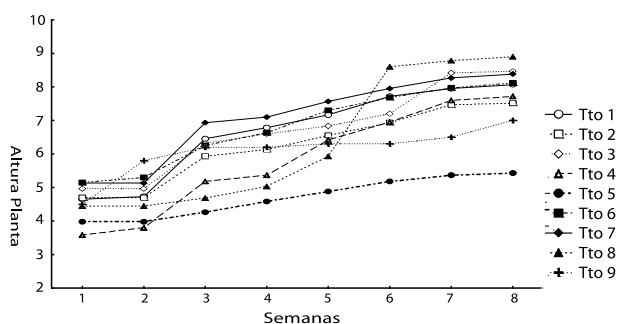


Figura 3. Altura promedio semanal de las plantas según el tratamiento aplicado. El tratamiento 9 corresponde al control

Inducción de raíces

Todos los medios nutritivos inducen la formación de raíces, siendo los tratamientos 1 (kinetina 5 mg/L) y 3 (kinetina 2 mg/L) los de mayor promedio ($p = 0.005$). La comparación de los resultados en la

semana ocho, permite establecer dos grupos muy definidos: los tratamientos 4, 5, 6 y 7 con promedios bajos y similares al del control ($p = 0.006$), y los tratamientos 1, 2, 3 y 8 con promedios más altos, similares entre sí, y destacando particularmente la adición de kinetina a una concentración de 2 mg/L que logra, después de 8 semanas, inducir el mayor número de raíces (tabla 3 y figuras 2E y 4)

Velocidad de multiplicación de las plántulas

La velocidad de multiplicación de las plántulas al utilizar 3mg/L de BA tiene una media de 1.4 brotes/semana considerando los resultados observados en las semanas cuarta y octava, y la adición de BA en concentraciones de 3 mg/L o mas, es suficiente para que se supere la velocidad de multiplicación observada en el medio control (tabla 4).

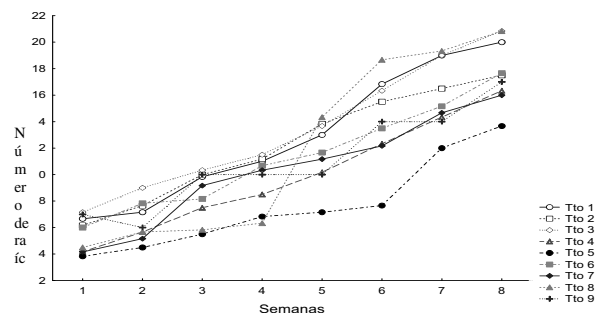


Figura 4. Número promedio semanal de raíces según el tratamiento aplicado. El tratamiento 9 corresponde al control

Tabla 4. Tasa de multiplicación (generación de nuevos brotes) en las plántulas de *Renealmia alpinia*, según los diferentes tratamientos empleados

Tratamiento	Tasa de velocidad de multiplicación (TVM)					
	Número inicial de brotes	Número de brotes en la cuarta semana	TVM. (semanas 1 a 4)	Número de brotes en la octava semana	TVM. (semanas 4 a 8)	TVM (semanas 1 a 8)
Control	1	5.00 ± 1.42	1.00	10.00 ± 2.82	1.25	1.12
1	1	3.00 ± 3.22	0.50	8.66 ± 4.63	1.41	0.95
2	1	3.16 ± 2.13	0.54	6.33 ± 1.63	0.79	0.66
3	1	3.33 ± 1.36	0.58	7.66 ± 2.58	1.08	0.83
4	1	3.83 ± 1.16	0.70	8.83 ± 1.83	1.25	0.97
5	1	5.83 ± 1.72	1.20	10.16 ± 2.48	1.08	1.14
6	1	6.50 ± 2.73	1.37	12.16 ± 2.31	1.41	1.39
7	1	4.83 ± 2.40	0.95	8.33 ± 3.50	0.87	0.91
8	1	2.33 ± 1.50	0.33	5.66 ± 2.80	0.83	0.58

Desdiferenciación celular

Todos los tratamientos empleados, a excepción del control y, con diferencias notoriamente significativas ($p < 0.001$), inducen formación de estructuras callosas con consistencia variable e influenciadas por el medio de cultivo empleado (tabla 5); de hecho, los callos obtenidos en la

cuarta semana, con el tratamiento que incluye 2 mg/L de 2,4-D en combinación con 1mg/L de BA (tratamiento generador del mayor porcentaje de callos, 68.75%) muestran una consistencia friable, de aspecto cremoso y con un color que alcanza tonalidades variables entre muy claro y ligeramente ocre (figura 5).

Tabla 5. Prueba de Newman-Keuls ($\alpha = 0.05$) para la comparación de los porcentajes promedios de inducción de tejido indiferenciado según los diferentes tratamientos empleados. Los tratamientos con la misma letra forman grupos homogéneos

Tratamiento	Porcentaje promedio de inducción de callo*	Porcentaje promedio en la cuarta semana	Porcentaje promedio en la octava semana
control	0	0	0
1	24.87 ^{bc}	8.25 ± 16.5	41.5 ± 49.88
2	33.67 ^{bcd}	30.94 ± 28.67	36.4 ± 34.28
3	3.57 ^b	1.31 ± 5.73	5.84 ± 11.91
4	8.25 ^{bc}	8.25 ± 16.5	8.25 ± 16.50
5	43.30 ^{bcd}	39.15 ± 29.91	47.45 ± 25.45
6	34.39 ^{bcd}	30.85 ± 37.42	37.92 ± 35.99
7	17.36 ^{bc}	15.36 ± 28.52	19.36 ± 30.42
8	49.75 ^{cd}	47.0 ± 39.89	52.50 ± 33.95
9	16.07 ^{bc}	10.71 ± 19.66	21.42 ± 30.37
10	21.45 ^{bc}	19.80 ± 27.82	23.10 ± 27.16
11	68.75 ^d	66.66 ± 37.63	70.83 ± 36.79
12	8.10 ^{bc}	7.60 ± 13.74	8.60 ± 14.29



Figura 5. Estructura callosa en formación luego de 4 semanas de cultivo en medio MS y 2 mg/L de 2,4-D en combinación con 1mg/L de BA

Marcha fotoquímica preliminar y estimación del contenido de metabolitos

Los metabolitos presentes, según los resultados de la marcha fitoquímica preliminar realizada a los extractos etanólicos de las hojas (provenientes de material crecido *ex vitro* e *in vitro*) y los rizomas de

material crecido *ex vitro* de *R. alpinia* son: esteroides y/o terpenoides, taninos y cumarinas (tabla 6). Estas últimas se presentan de manera común, tanto en las hojas como en los rizomas.

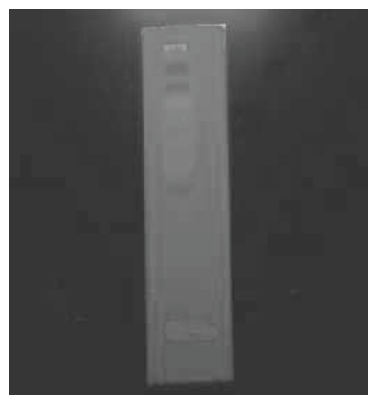
En la cromatografía en capa fina (CCF) realizada a los extractos etanólicos de las hojas (*in vitro* y *ex vitro*), se observan bandas que comprueban la presencia de los metabolitos descritos, destacándose en las dos placas y con un factor de retención de 0.98, una mancha fluorescente correspondiente a cumarinas presentes en las dos muestras (figura 6).

Tabla 6. Resultados de la marcha fitoquímica preliminar de hojas y rizomas (crecidas *ex vitro*) de *R. alpinia*.

Grupo	HOJAS	RIZOMAS
ALCALOIDES		
ESTEROIDES Y/O TERPENOIDES	+	-
FLAVONOIDES	-	-
SAPONINAS	-	-
NAFTO Y ANTRAQUINONAS	-	-
TANINOS	+	-
CUMARINAS	+	+



A



B

Figura 6. Cromatografía en capa fina (CCF) en la que se muestran los patrones cromatográficos detectados en (A) hojas *in vitro* y (B) hojas *ex vitro*. Se destacan manchas fluorescentes que corresponden a las cumarinas

Discusión

Aunque la propagación *in vitro* de esta especie no ha sido abordada en la literatura, trabajos realizados por diversos autores han mostrado algunos factores involucrados en la micropropagación de zingiberáceas (20,21); de hecho, la utilización de 6- Bencilaminopurina (BA o BAP) en combinación con ácido indolbutírico (IBA) tiene efecto promotor en la formación de brotes en *Curcuma zeodaria* (22), o de BA en combinación con ácido indolacético (IAA), en la inducción de brotes a partir de

rizomas de *Zingiber spectabile* (23). Estos efectos se evidencian de manera similar en algunas especies relacionadas, como las heliconias, pues la utilización de BA (2 a 10 mg/L) favorece la multiplicación *in vitro* de estas plantas (24), o promueve en combinación con una inhibición de la dominancia apical, la inducción masiva de brotes *in vitro* en plántulas de *Heliconia stricta* (25). De manera similar, el estudio realizado muestra la importancia de utilizar BAP en la inducción de brotes en la micropropagación de *R. alpinia*, aunque no se lograron establecer

diferencias significativas entre los tratamientos dada la variedad en las respuestas de los explantes y la consiguiente desviación que ello genera. A pesar de esto, y de manera concordante con lo propuesto por Zeng et al. (24), la mayor cantidad de brotes nuevos se obtiene al cabo de ocho (8) semanas y en los medios con un suplemento de BA a concentración de 3 mg/L.

Así pues, la respuesta de las plántulas respecto a la velocidad de propagación (producción de brotes) es mayor cuando se emplean tratamientos que incluyen la adición de BA a una concentración de 3 mg/L, y en consecuencia, la tasa de velocidad resulta significativamente mayor que la calculada para el control o para los demás tratamientos, algunos de los cuales, incluso, presentan tasas inferiores comparadas con él. Este resultado, unido a los que se observan en algunas otras variables como altura y número de raíces, permite considerar que este medio de cultivo es adecuado para la multiplicación en condiciones *in vitro* de esta especie.

En algunas especies de Zingiberáceas como *Curcuma zeodaria* se ha logrado la formación de callos utilizando combinaciones de ANA (ácido α -naftalenacético) y BA (26). En *R. alpinia*, ninguno de los medios de cultivo empleados como control permite la formación de callos; por el contrario, ésta se ve favorecida, al cabo de ocho (8) semanas, por la presencia de 2,4-D y BA en el cultivo, como lo manifiestan algunos autores (26, 27, 28) con la adición de este último regulador, pues el efecto inductor de estructuras callosas por el 2,4-D se logra incrementar con la adición de BA 1 mg/L. Esta inducción de callos representa un potencial uso para el establecimiento de suspensiones celulares y posterior escalamiento para la producción de los metabolitos secundarios, propios de la especie vegetal (29) que, en este caso, tendría potencial y futura importancia como neutralizante del veneno de la serpiente mapaná, o de alguno de los efectos colaterales originados por este veneno.

Reportes en la literatura demuestran que las cumarinas, compuestos derivados de la ruta del ácido shikímico (30), son metabolitos muy activos biológicamente y componentes importantes de la planta *Mikania glomerata* (31) cuya actividad antifúngica le confiere un porcentaje de inhibición del 100% contra la actividad fosfolipasa A_2 , inducida por el género *Bothrops*. Lo anterior, y el hecho de hallar este tipo de metabolitos en las plántulas de *R. alpinia* cultivadas *in vitro*, abren una impor-

tante posibilidad para su producción mediante suspensiones celulares. Además, podrían explicar los resultados obtenidos en trabajos anteriores realizados por Otero *et al* (9), los cuales mostraron que el extracto del rizoma de plantas crecidas *ex vitro* presenta actividad antifúngica, con un porcentaje de neutralización del veneno de *B. asper* del 100%.

CONCLUSIONES

En este estudio se logra la propagación de *Reenealmia alpinia* bajo condiciones *in vitro*, la cual es favorecida por la acción del BA, con velocidades de multiplicación hasta de 1.4 brotes/semana. Adicionalmente, en hojas provenientes de plantas crecidas tanto *in vitro* como *ex vitro* se detecta la presencia de metabolitos de tipo cumarinas, lo cual justifica posteriores evaluaciones de las actividades biológicas de estos metabolitos, la elucidación estructural de los mismos y posibilita la producción a través de procesos biotecnológicos, con el fin de buscar alternativas terapéuticas al envenenamiento producido por la mordedura de serpientes, o a los efectos colaterales ocasionados por el accidente con estos ofidios, tan frecuente en nuestro país.

AGRADECIMIENTOS

Al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) y a la Universidad de Antioquia por la financiación del proyecto EO1018.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Villalobos Contreras G. Plantas comestibles en dos comunidades de la Sierra Norte de Puebla: Xochitlán de Vicente Suárez y Zapotitlán de Méndez. [Tesis de Licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1994
2. Acero LE. Principales plantas útiles de la Amazonia Colombiana. Bogotá: Guadalupe; 1979, 263 pp.
3. Standley PC, Steyermark JA. Zingiberaceae. En: Flora of Guatemala. Fieldiana 1952; 24: 191-203
4. Macía M. *Reenealmia alpinia* (Rottb.) Mass (Zingiberaceae): Planta comestible de la Sierra Norte de Puebla (México). Anales Jardín Botánico de Madrid 2003; 60(1): 183.
5. Otero R, Fonnegra R, Jiménez S. Plantas utilizadas contra mordedura de serpientes en Antioquia y Chocó, Colombia. Medellín: Otero R, Fonnegra R, Jiménez S, (editores); 2000.
6. Lognay G, Marlier M, Severin M, Haugruge E, Gibon V, Trevejo E. On the characterization of some terpenes from *Reenealmia alpinia* Rott. (Mass) Oleoresin, Flavour Fragrance J 1991; 6 (1): 87-91
7. Zhou BN, Baj NJ, Glass TE, Malone S, Werkhoven MCM, van Troon F, et al. Bioactive labdane diterpenoids from *Reenealmia alpinia* collected in the Suriname Rainforest. J Nat Prod. 1997; 60(12): 1287-1293
8. Yang SW, Zhou BN, Malone S, Werkhoven MCM, Van Troon F, Wisse JH., et al. A new labdane diterpene from *Reenealmia alpinia* collected in the Suriname Rainforest. J Nat Prod 1999; 62(8): 1173-1174

9. Otero R, Fonnegra R, Jiménez SL, Núñez V, Evans N, Alzate SP, et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part I: Traditional use of plants. *J Ethnopharmacology* 2000A: 493-504.
10. Maas PJM. *Renalmia* (Zingiberaceae-Zingiberoideae). *Flora Neotrópica* 1977; (18): 1-161.
11. Martínez Alfaro MA, Evangelista V, Mendoza M, Morales G, Toledo G, Wong A. Catálogo de plantas útiles de la Sierra Norte de Puebla, México. México D.F: Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuadernos del Instituto de Biología 27: 1-303, ., 1995
12. Otero R, Núñez V, Jiménez SL, Fonnegra R, Osorio R, García M, et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia, Part II: Neutralization of letal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom *J Ethnopharmacology* 2000. 71: 505-511.
13. Otero R, Núñez V, Barona J, Fonnegra R, Jiménez S, Osorio RG, et al. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia, Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom, *J Ethnopharmacology* 2000c; 73: 233-241.
14. Otero R, Núñez V, Barona J, Saldarriaga M, Fonnegra R, Osorio R, et al. Neutralization of edema-forming and defibrinating effects of *Bothrops atrox asper* venom by extracts of plants used by healers in Antioquia and Chocó, Colombia. En: Cordovez JM, Abstracts XV International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Bogotá: Corcas; 2000: pp.186.
15. Gowda TV. Interaction of snake venom phospholipases A₂ with plant isolates, En: Kini RM, editor. *Venom phospholipase A₂ enzymes*. Chichester: John Wiley & Sons. 1997. p. 124-127.
16. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant* 1962; 15: 473-497
17. Sanabria A. Análisis fitoquímico preliminar. Bogotá: Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia: 1983.
18. Domínguez XA. Métodos de investigación fitoquímica, México: Limusa. 1979. p 84, 141, 151, 165, 198 – 199, 218.
19. Wagner H, Bladt S, Zgainski EM. *Plant drug analysis. A thin layer chromatography Atlas*. Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo: Springer-Verlag 2001.
20. Chithra M, Martin KP, Sunandakumari C, Madhusoodanan PV. Protocol for rapid propagation, and to overcome delayed rhizome formation in field established in vitro derived plantlets of *Kaempferia galanga* L. *Scientia Horticulturae* 2005; 104 (1): 113-120.
21. Tyagi RK, Agrawal A, Yusuf A. Conservation of Zingiber germplasm through in vitro rhizome formation. *Scientia Horticulturae* 2006; 108 (2): 210-219.
22. Loc NH, Duc DT, Kwon TH, Yang MS. Micropropagation of zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe) a valuable medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2005; 81(1): 119-122.
23. Faria RT, Illg RD. Micropropagation of Zingiber spectabile Griff. *Scientia Horticulturae* 1995; 62 (1): 135-137
24. Zeng SJ, Guo SC, Wu KL, Zhang YQ, Chen GH, Duan J. *In vitro* propagation of Heliconia plants. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* 2004; 12- 2: 153-158
25. Diniz JDN, Gomés SO, Innecco R, Almeida JL, Costa JTA. Evaluation of the apical dominante break and the BAP actions on *in vitro* multiplication of *Heliconia stricta* Huber. *Revista Ciencia Agronómica* 2004; 35. Número especial: 232-237
26. Mello MO, Melo O, Appezzato-da-Glória B. Histological analysis of the callogenesis and organogenesis from root segments of *Curcuma zedoaria* Roscoe. *Braz Arch Biol Technol* 2001. (44) No. 2
27. Bestoso F, Ottaggio L, Armirotti A, Balbi A, Damonte G., Degan P, et al *In vitro* cell cultures obtained from different explants of *Corylus avellana* produce Taxol and taxanes *BMC Biotechnol* 2006; (6): 45
28. Mihaljevic S, Bjedov I, Kovac M, Levanic DL, Jelaska S. Effect of explant source and growth regulators on *in vitro* callus of *Taxus baccata* L. *Washingtonii*. *Food Technol Biotechnol* 2002; (40):299-303
29. Ramachandra RS, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 2002; 20 (2): 101-153
30. Arango G. Introducción al metabolismo secundario, compuestos derivados del ácido shikímico. Medellín: Universidad de Antioquia; 2005.
31. Maiorano VA, Marcussi S, Daher M, Oliveira CZ, Couto LB, Gómes OA. Antiphidial properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. *J Ethnopharmacol* 2005; (102): 364-370