

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN

DIRECCIÓN DE PROYECTOS

Informe Final de Investigación

*“ ESTABLECIMIENTO DEL PROTOCOLO DE
MICROPROPAGACIÓN PARA LA PLANTA MEDICINAL
PHYLLANTHUS NIRURI (EUPHORBIACEAE) ”*



**Marcela Jiménez Peralta, Estudiante
Escuela de Ingeniería en Biotecnología**

**Profesoras Asesoras: M. Sc. Silvana Alvarenga
M. Sc. Elizabeth Alan**

***Centro de Investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica.
Cartago, Costa Rica***

2002

Agradecimientos

A Dios por acompañarme en cada momento de mi vida y darme la capacidad de realizar esta investigación.

A todos los que por medio de sus conocimientos o materiales aportados permitieron el desarrollo de la misma.

Un agradecimiento especial a las profesoras M. Sc. Silvana Alvarenga y M. Sc. Elizabeth Alan por su colaboración y apoyo en el desarrollo de esta investigación.

A Álvaro Coto y Martha Monge por su valiosa colaboración y apoyo.

Muchas Gracias !!

Índice General

Agradecimientos	1
Índice General.....	2
Índice de Figuras.....	3
Índice de Cuadros	4
Resumen	5
Revisión de Literatura.....	6
<i>Plantas Medicinales</i>	6
<i>Cultivo de Tejidos</i>	8
<i>Reguladores de Crecimiento</i>	9
Auxinas	10
Giberelinas	11
Citocininas.....	11
Ácido Abscísico.....	11
Etileno	12
<i>Inducción de la Germinación</i>	12
Tratamientos para eliminar la latencia	13
<i>Phyllanthus niruri (Euphorbiaceae)</i>	15
Objetivos	18
<i>Objetivo General</i>	18
<i>Objetivos Específicos</i>	18
Material y Métodos	18
<i>Ubicación del proyecto</i>	18
<i>Recolección del material</i>	18
<i>Obtención y desarrollo de vitroplantas</i>	19
<i>Respuestas Morfogénicas al BA y al ANA</i>	20
Resultados y Discusión	21
<i>Obtención y desarrollo de vitroplantas</i>	21
<i>Respuestas Morfogénicas al BA y al ANA</i>	23
Conclusiones y Recomendaciones	31
Anexo A.....	35
<i>Análisis Estadísticos (Generados por el programa Statistic)</i>	35

Índice de Figuras

Figura 1. Estructuras de hormonas vegetales.....	10
Figura 2. Mapa del lugar de recolección de la planta <i>Phyllanthus niruri</i>	19
Figura 3. Semilla germinada de <i>P.niruri</i> (Tratamiento inmersión en AG₃ por 4h),.....	23
luego de 15 días de inoculada	23
Figura 4. Promedios de la producción de yemas y brotes comparando los diferentes reguladores de crecimiento (ANA, BA) presentes en los medios de cultivo	24
Figura 5. Desarrollo de las vitroplantas en medio MS con reguladores de crecimiento diferentes (A: 1 mg/L BA, B: 3 mg/L BA y C: 2 mg/L AG₃)	26
Figura 6. Promedios de brotes producidos con tres concentraciones diferentes de BA.....	27
Figura 7. Promedios de yemas producidas con tres concentraciones diferentes de BA.....	28
Figura 8. Micropropagación de <i>P.niruri</i> en medio enriquecido con ANA en diferentes concentraciones. (1: 1mg/L; 2: 3mg/L y 3: 5mg/L).....	29
Figura 9. Promedios de brotes producidos con tres concentraciones diferentes de ANA	29
Figura 10. Promedios de yemas producidas con tres concentraciones diferentes de ANA	30

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Composición de cuatro medios básicos (MB) para el cultivo <i>in vitro</i> de tejidos.....	9
Cuadro 2. Descripción de los tratamientos físicos y químicos realizados a las semillas para inducir la germinación.....	20
Cuadro 3. Porcentaje de germinación obtenidos por los diferentes tratamientos de inducción realizados	22
Cuadro 4. Prueba de Tukey (HSD) para la comparación de la producción de <i>YEMAS</i> por tratamiento (BA, ANA)	24
Cuadro 5. Prueba de Tukey (HSD) para la comparación de la producción de <i>BROTOS</i> por tratamiento (BA, ANA)	25
Cuadro 6. Prueba de Tukey (HSD) para la comparación de medias entre la producción de <i>BROTOS</i> para los dos tratamientos en sus diferentes concentraciones.....	26
Cuadro 7. Prueba de Tukey (HSD) para la comparación de medias entre la producción de <i>YEMAS</i> para los dos tratamientos en sus diferentes concentraciones.....	27

Resumen

Phyllanthus niruri es una planta medicinal nativa de América, bastante común en terrenos húmedos y sombreados. Esta planta es usada popularmente para la expulsión de cálculos renales y biliares, como antiespasmódico, diurético, como auxiliar en la eliminación del ácido úrico, además ha sido probada como control contra el SIDA, presentando una acción promisorio. La presente Investigación permitió analizar el efecto de diferentes tratamientos en la inducción de germinación (inmersión en AG₃, KNO₃, Agua destilada y escarificación con agua caliente) de la planta medicinal *Phyllanthus niruri* y la respuesta morfogénica de ésta a dos reguladores de crecimiento BA y ANA, en concentraciones de 1, 3 y 5 mg/L. Se determinó el porcentaje de germinación para evaluar la obtención y el desarrollo de las vitroplantas. Para valorar la respuesta morfogénica al BA y ANA se determinó la cantidad de yemas y brotes. El análisis de los datos, fue realizado mediante el programa *Statistic*, con un modelo lineal categórico, además se realizó el estudio de medias utilizando la prueba de Tukey. Con el tratamiento de inmersión en AG₃ (4h) se obtuvo el porcentaje más alto de germinación (60%). Se determinó que el tratamiento con 3mg/L de BA fue el que generó los mejores resultados en cuanto al número de yemas y brotes, siendo este significativamente diferente a los demás tratamientos, con una exactitud del 0.05 y una precisión del 95%.

Palabras claves: *Phyllanthus niruri*, Cultivo de Tejidos, Micropropagación, Ácido Naftalenacético (ANA), Bencil Adenina (BA), Ácido Giberélico (AG₃).

Plantas Medicinales

La llamada ciencia terapéutica data desde la remota antigüedad. Las hierbas se utilizaban 2 500 años antes de Cristo. La naturaleza ha sido, sin duda, el primer médico, el primer venero de remedios, la primera farmacia, el primer hospital al que acudió el hombre.

La humanidad, por observación propia, ha constatado que las hierbas contienen cierto poder curativo. Así comenzaron las investigaciones y mediante experimentos, se descubrió que determinadas hierbas son buenas por el contenido medicinal que presentan (Ocampo y Maffioli, 1985)

En muchos de los países desarrollados se ha expandido un vasto recurso de plantas medicinales y/o aromáticas. Estas plantas han sido utilizadas por más de un milenio por los seres humanos en remedios caseros, productos farmacológicos y/o fragancias. Esta relación cercana entre hombre y el ambiente que le rodea continúa aún en nuestros días en una gran porción de las personas que habitan dichos países desarrollados (Monge, 2002).

Existen razones de sobra; de índole práctica, fisiológica, científica, ecológica y/o económica para proteger especies, subespecies y variedades de plantas medicinales contra una posible extinción. Se puede afirmar que existe mucho interés en la conservación y correcta utilización de plantas silvestres que están presentes en nuestros ecosistemas en forma natural, con el fin de incrementar su utilidad y valor económico; y a su vez protegerlas. La proliferación del interés por utilizar las plantas medicinales ha intensificado sin duda dicha práctica; en los casos donde hay una gran demanda y un valor elevado, pueden significar un peligro real para determinadas especies (Gómez, 1987).

Alrededor del 80% de la población de los países desarrollados utilizan medicinas tradicionales extraídas de dichas plantas en el cuidado de su salud. Los productos farmacológicos modernos contienen al menos 25% de sustancias provenientes de una planta y/o análogos sintéticos que tratan de imitarlos. China, la India, Sri Lanka entre

otros países reconocen oficialmente el uso de medicinas tradicionales en sus sistemas de salud.

Los métodos tradicionales para la extracción y utilización de los compuestos activos de interés en las plantas medicinales presentan una serie de desventajas, las cuales pueden ser eliminadas mediante la implementación de tecnologías modernas sostenibles. Cabe resaltar que los métodos tradicionales dependen del estado actual de la tecnología disponible. Dichas técnicas pueden ser modificadas y mejoradas utilizando las tecnologías de punta para mejorar, establecer, reproducir y controlar en una forma deseable el desarrollo de las plantas (FAO, 1997).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80% de la población de los países en desarrollo acuden primero a medicinas tradicionales para solventar sus problemas de salud. Los sistemas de medicina tradicional más reconocidos son los de Ayurvedic, Unani y el Sistema de Medicina Tradicional China (TCM). Aunado a ello, existe una gran cantidad de sistemas de medicina tradicional no documentados a nivel mundial (Monge, 2002).

En Costa Rica la gran biodiversidad de especies animales y vegetales, aunado a la gran riqueza de hábitats, ha favorecido el conocimiento y la aplicación de nuevas medicinas caseras.

En nuestro país los aborígenes conocían sobre el uso de las plantas medicinales; Tribus como los Bribrís contaban con la ayuda del "Sukia" el cual era brujo, médico y hechicero.

Los Bruncas masticaban unas plantas de la familia Piperaceae para suprimir el dolor y mitigar el hambre, usaban el cedrón para bajar la fiebre y los helechos para bajar la presión arterial.

Los Curanderos más respetados fueron los Cabécares y se les pagaba solamente sí el enfermo sanaba, ellos se especializaban de 2 a 6 años según su capacidad y como una prueba debían pasar los tres primeros días sin comer. En las curaciones se usaban hierbas, bejucos, cáscaras y otras partes de la planta (Monge, 2002). La demanda de la mayoría de las personas en los países industrializados por plantas medicinales ha sido satisfecha por herbalistas indiscriminados que extraen el material esporádicamente de los bosques. Como

resultado muchas de estas especies de plantas se han extinguido y otras están en peligro. Por esto se hace necesario que se introduzca un sistema de cultivo para dichas plantas con el fin de aprovechar dichos recursos sin hacer daños a la biodiversidad. Una de estas técnicas es el cultivo de tejido. En el caso específico de *P. niruri* es de suma importancia la implementación de dicha técnica debido a sus múltiples usos medicinales y a la necesidad de propagación masiva para la comercialización, por otro lado mediante esta técnica se pueden seleccionar las plantas con características sobresalientes y obtenerla en grandes cantidades en un espacio reducido y con condiciones controladas.

Cultivo de Tejidos

El cultivo de tejidos se refiere al cultivo de células, tejido u órganos de plantas en un medio que le aporte los nutrientes necesarios para su desarrollo. Al cultivo de tejidos vegetales también se le conoce como micropropagación o propagación vegetal *in vitro*. (Dodds y Roberts, 1982).

Para que se pueda dar un cultivo *in vitro*, las células allí establecidas para crecer requieren una variedad de nutrimentos orgánicos e inorgánicos; estos requerimientos se demuestran fácilmente en órganos y tejidos extirpados en plantas superiores e inferiores. Los nutrimentos orgánicos, al igual que los inorgánicos, se requieren en dos niveles: uno macro y uno micro. Generalmente, las células en crecimiento pueden fabricar sus proteínas a partir de fuentes adecuadas de nitrógeno y carbohidratos suministradas por el medio de cultivo; sin embargo, existe además una cantidad de sustancias orgánicas adicionales que se requieren en cantidades mínimas y que son muy activas en el crecimiento. Por esto y mucho más, deben existir medios de cultivos que reúnan los nutrientes generales para el crecimiento de toda clase de células vegetales para poder realizar cultivos *in vitro*.

Uno de los primeros medios de cultivo patentados fue el de Murashige y Skoog en 1962, el cual hoy en día es el uno de los más comerciales por su bajo costo y generales para muchos tipos de células vegetales (Cuadro 1)

Generalmente se hace referencia al conjunto de componentes a+b+c como al medio basal (MB), y algunas de sus formulaciones se encuentran en el cuadro 1

Cuadro 1. Composición de cuatro medios básicos (MB) para el cultivo *in vitro* de tejidos.

COMPONENTES	MS	B5	N6	Wh
NH_4NO_3	1650	-	-	-
KNO_3	1900	2500	2830	80
KH_2PO_4	170	-	400	-
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	150	166	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	250	185	737
$(NH_4)_2SO_4$	-	134	463	-
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	-	-	-	288
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	-	150	-	19
KCl	-	-	-	65
Na_2SO_4	-	-	-	200
KI	0.83	0.75	0.80	0.75
H_3BO_3	6.20	3.00	1.60	1.50
$MnSO_4 \cdot H_2O$	-	10.00	-	-
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22.30	-	4.40	6.65
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.60	2.00	1.50	2.67
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	0.25	-	-
H_2MoO_4	-	-	-	0.001
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025			

Contenidos en cada medio (mg/L) (Owen y Miller, 1992)

Reguladores de Crecimiento

El desarrollo normal de una planta depende de la interacción de factores externos: luz, nutrientes, agua y temperatura e internos: hormonas. Una definición abarcativa del término hormona es considerar bajo este nombre a cualquier producto químico, de naturaleza orgánica, que sirve de mensajero y que, producido en una parte de la planta, tiene como "blanco" otra parte de ella. Las plantas tienen cinco clases de hormonas.

Las fitohormonas pertenecen a cinco grupos conocidos de compuestos que ocurren en forma natural, cada uno de los cuales exhiben propiedades fuertes de regulación del crecimiento en plantas. Se incluyen al etileno, auxina, giberelinas,

citoquininas y el ácido abscísico, cada uno con su estructura particular y activos a muy bajas concentraciones dentro de la planta (González *et al.*, 1999).

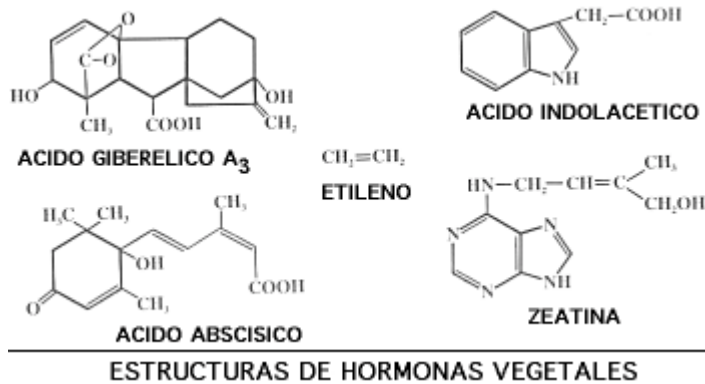


Figura 1. Estructuras de hormonas vegetales

Cuando la planta germina, comienzan a actuar algunas sustancias hormonales que regulan su crecimiento desde esa temprana fase: las fitohormonas, llamadas giberelinas, son las que gobiernan varios aspectos de la germinación; cuando la planta surge a la superficie, se sintetizan las hormonas llamadas auxinas, las que aceleran su crecimiento vertical, y, más tarde, comienzan a aparecer las citocininas, encargadas de la multiplicación de las células y que a su vez ayudan a la ramificación de la planta (González *et al.*, 1999)

Auxinas

El nombre auxina significa en griego "crecer" y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación. La Auxina es miembro de un grupo de hormonas vegetales; son sustancias naturales que se producen en las partes de las plantas en fase de crecimiento activo y regulan muchos aspectos del desarrollo vegetal. Afectan al crecimiento del tallo, las hojas y las raíces y al desarrollo de ramas laterales y frutos. Las auxinas influyen en el crecimiento de estos órganos vegetales estimulando la elongación o alargamiento de ciertas células e inhibiendo el crecimiento de otras, en función de la cantidad de auxina en el tejido vegetal y su distribución (Lucas, 2002).

Giberelinas

El Ácido Giberélico (AG_3) fue la primera de esta clase de hormonas en ser descubierta. Las giberelinas son sintetizadas en los primordios apicales de las hojas, en puntas de las raíces y en semillas en desarrollo. Su principal función es incrementar la tasa de división celular (mitosis).

Además de ser encontradas en el floema, las giberelinas también han sido aisladas de exudados del xilema, lo que sugiere un movimiento más generalmente bidireccional de la molécula en la planta.

Citocininas

Las citocininas son hormonas vegetales naturales que estimulan la división celular en tejidos no meristemáticos. Inicialmente fueron llamadas quininas, sin embargo, debido al uso anterior del nombre para un grupo de compuestos de la fisiología animal, se adaptó el término citocinina (citocinesis o división celular). Son producidas en las zonas de crecimiento, como los meristemas en la punta de las raíces. La zeatina es una hormona de esta clase y se encuentra en el maíz (*Zea*). Las mayores concentraciones de citocininas se encuentran en embriones y frutas jóvenes en desarrollo, ambos sufriendo una rápida división celular.

Ácido Abscísico

El ácido abscísico (ABA), conocido anteriormente como dormina o abscisina, es un inhibidor del crecimiento natural presente en plantas. Químicamente es un terpenoide. El ácido abscísico es un potente inhibidor del crecimiento que ha sido propuesto para jugar un papel regulador en respuestas fisiológicas tan diversas como el letargo, abscisión de hojas y frutos y estrés hídrico, y por lo tanto tiene efectos contrarios a las de las hormonas de crecimiento (auxinas, giberelinas y citocininas). El ácido abscísico se encuentra en todas las partes de la planta, sin embargo, las concentraciones más elevadas parecen estar localizadas en semillas y frutos jóvenes y la base del ovario.

Etileno

El etileno, siendo un hidrocarburo, es muy diferente a otras hormonas vegetales naturales. Aunque se ha sabido desde principios de siglo que el etileno provoca respuestas tales como geotropismo y abscisión, no fue sino hasta los años 1960s que se empezó a aceptar como una hormona vegetal. Se sabe que el efecto del etileno sobre las plantas y secciones de las plantas varía ampliamente. Ha sido implicado en la maduración, abscisión, senectud, dormancia, floración y otras respuestas. El etileno parece ser producido esencialmente por todas las partes vivas de las plantas superiores, y la tasa varía con el órgano y tejido específicos y su estado de crecimiento y desarrollo (González *et al.*, 1999).

Inducción de la Germinación

Existen muchas especies de plantas que poseen algún impedimento para que germinen sus semillas. Esto puede deberse a varias causas entre las que son más frecuentes (Patiño *et al.*, 1983; Willan, 1991):

- El medio no es favorable para el crecimiento vegetativo a causa de una escasa disponibilidad de humedad, aireación o por una temperatura inadecuada. A este tipo de inhibición se le llama quiescencia, o
- Las condiciones del medio son adecuadas, pero el organismo tiene una combinación fisiológica tal que impide su crecimiento. Este tipo de inhibición se denomina *latencia, dormancia o letargo*.

En la naturaleza, el efecto de esos controles es preservar las semillas y regular la germinación de manera que coincida con períodos del año en que las condiciones naturales son favorables para la supervivencia de las plántulas. En consecuencia, los mecanismos de control de la germinación existen como una adaptación para la supervivencia natural de las especies. Estos mecanismos son en particular importantes para plantas que crecen en donde ocurren condiciones ambientales extremas, como en los desiertos o en las regiones frías, en donde las condiciones ambientales, después de

la diseminación de las semillas, pueden no ser favorables para la germinación inmediata (Hartmann y Kester, 1988; Willan, 1991).

Para terminar con la latencia, algunas semillas necesitan estar húmedas y a bajas temperaturas por un período de varios meses, esta condición se podría cumplir en lugares donde cae nieve en invierno. En zonas áridas, en ciertas especies, las semillas sólo germinan si se presenta una lluvia lo suficientemente abundante para asegurar el establecimiento de las plántulas. Otras especies requieren de iluminación para germinar, evitando así que el proceso se desarrolle cuando las semillas están enterradas profundamente o son muy sombreadas por otras plantas (Patiño *et al.*, 1983; Willan, 1991).

En resumen, la latencia de las semillas termina cuando existe algún estímulo ambiental que anuncie que las condiciones son favorables para el desarrollo de la planta.

Tratamientos para eliminar la latencia

Los tratamientos para eliminar la latencia son (Patiño *et al.*, 1983; Hartmann y Kester, 1988):

a) Estratificación

Consiste en colocar las semillas embebidas de agua, en capas o estratos húmedos, usando como sustrato arena. El período de estratificación varía según la especie. Se utiliza para superar latencias provenientes del embrión.

- Cálida. Si la estratificación se realiza a temperaturas altas (22 a 30 °C).
- Fría. Si la estratificación se realiza a temperaturas bajas (0 a 10 °C).

En el vivero también se puede estratificar empleando el mismo suelo o algún otro sustrato húmedo. La estratificación fría se realiza en invierno y la cálida en verano.

b) Escarificación

Es cualquier proceso de romper, rayar, alterar mecánicamente o ablandar las cubiertas de las semillas para hacerlas permeables al agua y a los gases.

- Mecánica. Consiste en raspar la cubierta de las semillas con lijas, limas o quebrarlas con un martillo. Si es a gran escala se utilizan maquinas especiales como tambores giratorios recubiertos en su interior con papel lija, o combinados con arena gruesa o grava.
- Con agua caliente. Se colocan las semillas en un recipiente en una proporción de 4 a 5 veces su volumen de agua caliente a temperatura entre 77 y 100 °C. De inmediato se retira la fuente de calor y las semillas se dejan remojar durante 12 a 24 horas en el agua que se va enfriando gradualmente. Las semillas se deben sembrar inmediatamente después del tratamiento.
- Con ácido. Las semillas secas se colocan en recipientes no metálicos y se cubren con ácido sulfúrico concentrado en proporción de una parte de semilla por dos de ácido. Durante el período de tratamiento las semillas deben agitarse regularmente con el fin de obtener resultados uniformes. El tiempo de tratamiento varía según la especie. Al final del período de tratamiento se escurre el ácido y las semillas se lavan con abundante agua para quitarles el restante.

c) *Lixiviación*

El propósito es remover los inhibidores remojando las semillas en agua corriente o cambiándoles el agua con frecuencia. El tiempo de lixiviación es de 12 a 24 horas.

d) *Combinación de tratamientos*

Se utiliza en semillas de especies que tienen más de un tipo de letargo.

e) *Hormonas y otros estimulantes químicos*

Existen compuestos que sirven para estimular la germinación, entre los más usados están: nitrato de potasio, tiourea, etileno, ácido giberélico (AG₃), citocininas, entre otros. Todo este tipo de sustancias se emplean a diferentes concentraciones y tiempos de remojo, dependiendo de la especie de que se trate (Acuña, 2002).

Phyllanthus niruri (Euphorbiaceae)

Es una hierba anual, erguida y pequeña crece de 30 a 40 centímetros de altura y es nativa del bosque lluvioso del Amazonas y otras áreas tropicales incluyendo las Bahamas, el Sur de la India y China. El género *Phyllanthus* contiene alrededor de 600 especie de arbustos, árboles e hierbas anuales o bianuales distribuidas a través de las regiones tropicales y subtropicales de ambos hemisferios. *Phyllanthus niruri* es bastante predominante en el Amazonas y otros bosques lluviosos (Raintree Nutricion, 2000)



Es una planta ramificada, glabra, de hojas compuestas, pinnadas, con pinnas opuestas oblongas a lanceoladas, redondeadas, flores imperfectas pequeñas (3-4 mm de diámetro) nacen en las axilas de las hojas, monoicas, corto pediceladas en los dos sexos, blancas, los frutos se desarrollan en la parte inferior del raquis, cápsulas deprimidas, muy pequeñas (3.5 mm de diámetro), con seis semillas retorcidas en sentido longitudinal, con diminutas estrías transversales, con dos lados planos y uno convexo. Las semillas miden de 0.8-1.0 mm de diámetro (Correa *et al.*, 1991; Cárdenas *et al.*, 1972)

Es bastante común en terrenos húmedos y es particularmente frecuente en la planicie litoral. Es considerada una planta ruderal y espontánea común en terrenos sombreados en donde alcanza el mayor desarrollo (Melillo, 1999 y Bachaul, 2001). Las plantas ruderales son aquellas que surgen en caminos pavimentados o bien pueden ser observadas en terrenos baldíos. En Brasil, la mayor parte de las plantas ruderales tienen importancia fitoterapéutica. Algunas especies conocidas como flora medicinal están dentro de este tipo de plantas como por ejemplo: quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*), *Bidens pilosa* y *Emilia sonchifolia*, citando solo algunas de las más famosas.

Todas las plantas ruderales invariablemente son de porte pequeño, muchas veces rastreras con flores pequeñas (Bachaul, 2001).

Conocida comúnmente como: Riñoncillo, Quebra-pedra, Erva-pombinha, Bahupatra, Bhuiamla, Bhuy amalaki, Niruri y Stone Breaker. Pertenece a la familia Euphorbiaceae y es ampliamente usada en la medicina tradicional para favorecer la expulsión de cálculos renales o biliares, molestias de la vejiga, retención urinaria, diabetes, afecciones del hígado, como diurético, entre otras (Melillo,1999).

Esta planta ha sido encontrada a lo largo de Costa Rica en Áreas de conservación como: La Amistad Pacífico, Tempisque, Pacífico Central, La Amistad Caribe, Arenal y Cordillera Volcánica Central (Instituto Nacional de Biodiversidad, 1997). Es una planta espontánea, común en terrenos húmedos y sombreados, donde consigue alcanzar el mayor desenvolvimiento (Buchaul, 2001).

La planta tiene variados usos y un gran potencial económico y medicinal. Las especies del género *Phyllanthus* han sido investigadas como antiviral. En los estudios apoyados por la Central de Medicamentos (CEME) en Brasil, se sugiere la utilización potencial, no solo como efecto lítico y/o preventivo en la formación de cálculos urinarios, sino también su posible utilización en pacientes hiperuricémicos y en aquellos con insuficiencia renal. (Melillo,1999). *Phyllanthus niruri* es la más efectiva de un grupo relacionado de especies. Los científicos no han identificado el ingrediente responsable de los efectos medicinales de esta planta, pero la hierba ha mostrado un grupo de enzimas que juegan un papel crucial en la reproducción del virus de la Hepatitis B (Lancet, 1988). Es de muy fácil manejo agronómico, no presenta muchas exigencias, por lo cual podría ser de gran interés para agricultores que deseen cultivarla.

Se le ha llamado Chanca Piedra porque ha sido usada por generaciones, por los indígenas del Amazonas como un remedio efectivo para eliminar cálculos biliares y de riñón y para otros problemas de relacionados. La planta se emplea para otras numerosas condiciones incluyendo cólicos, diabetes, disentería, fiebre, gripe, tumores, ictericia, dispepsia, entre otras.

Se usa extensamente en la medicina de hierbas en Sudamérica, como el remedio más popular para la eliminación de cálculos biliares y de riñón a través del continente. En la medicina de hierbas Peruana, se usa también para la hepatitis, las

infecciones urinarias, y como diurético. En la medicina de hierbas Brasileña se le llama *Quebra Pedra* y se considera un remedio excelente para quitar el ácido úrico de la orina y para eliminar piedras. En la India le llaman *Pitirishi* o *Budhatri*, y es utilizado como un remedio casero común para el asma, la bronquitis y la tos, la sed extrema, la anemia, la ictericia y la tuberculosis.

Phyllanthus niruri ha estado sujeta a muchos estudios desde mediados de los años sesentas con el fin de determinar los componentes activos y sus actividades farmacológicas. Los Indios y grupos de investigación Brasileños fueron los primeros en realizar estos estudios. Los usos tradicionales de esta planta en la eliminación de piedras en el riñón y cálculos biliares han sido validados por investigaciones clínicas. En 1999 un estudio clínico realizado con extractos de *P. Niruri* exhibió un efecto poderoso y efectivo en la inhibición de la formación de cristales de oxalato de calcio (Compuesto de la mayoría de las piedras en los riñones). La actividad antiespasmódica de los alcaloides presentes en Chanca Piedra fue documentada por investigadores brasileños a mediados de los años ochenta.

En un estudio realizado en 1985 por investigadores Indios demostraron que la protección del hígado es mediada por la *Phyllantina* y a la *Hipophyllantina* presente en esta planta. La actividad analgésica se demostró en 1994 y 1995 por otro grupo de investigadores Brasileños. Los efectos diuréticos e hipoglicémico se documentaron en 1995 en un estudio en humanos realizado que demostró un efecto diurético significativo.

La investigación más reciente en Chanca Piedra revela que tiene actividad antiviral para controlar el virus de la inmunodeficiencia humana(VIH). Un grupo de investigación en 1992 descubrió que el extracto *Phyllanthus niruri* inhibe la transcriptasa HIV-1. en 1996 una investigación realizada por Myers de Bristol Squibb aislaron un componente responsable de esta actividad al que denominaron "*niruriside*". *P. niruri* con sus muchos usos efectivos para una gran cantidad de enfermedades es uno de los remedios más importante que viene del bosque lluvioso y ha ganado mucha popularidad a nivel del mundo. Lo más importante es que no se han informado efectos tóxicos en ninguno de las investigaciones clínicas realizadas ni en sus muchos años de uso en la medicina de hierbas (Raintree Nutricion, 2000).

Objetivo General

Estudiar y desarrollar un eficiente protocolo de micropropagación para la planta medicinal *Phyllanthus niruri*

Objetivos Específicos

- Realizar estudios *in vitro* de germinación de la semilla.
- Establecer el cultivo *in vitro* de *P.niruri* y lograr su micropropagación.
- Estudiar la respuesta morfogénica de los explantes ante el efecto de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (ANA, BA) en el medio de cultivo

Material y Métodos

Ubicación del proyecto

La investigación sobre el establecimiento de un protocolo de micropropagación para la planta medicinal *Phyllanthus niruri* fue realizada en el Laboratorio del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB), ubicado en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago.

Recolección del material

La recolección del material vegetal fue realizada en los alrededores del Río Macho ubicado en Orosí (1480 msnm), Cartago (Figura 2). Se extrajeron plantas completas las cuales se mantuvieron por un tiempo en el invernadero ubicado en el ITCR hasta que fueron utilizadas. También se tomaron muestras de esta planta de los alrededores del ITCR. Los frutos se mantuvieron al sol cubiertos con papel toalla para evitar la pérdida de las semillas al momento de la expulsión. Según la literatura la maduración de los frutos y las semillas de esta planta es muy irregular, por lo que la

selección de ambos se realizó de forma empírica a través de la observación. Se tomó como criterio los frutos de mayor tamaño y las semillas de coloración café. Las semillas de color café presentan un porcentaje de germinación significativamente superior a las semilla amarillas (Oliveira *et al.*, 1996).

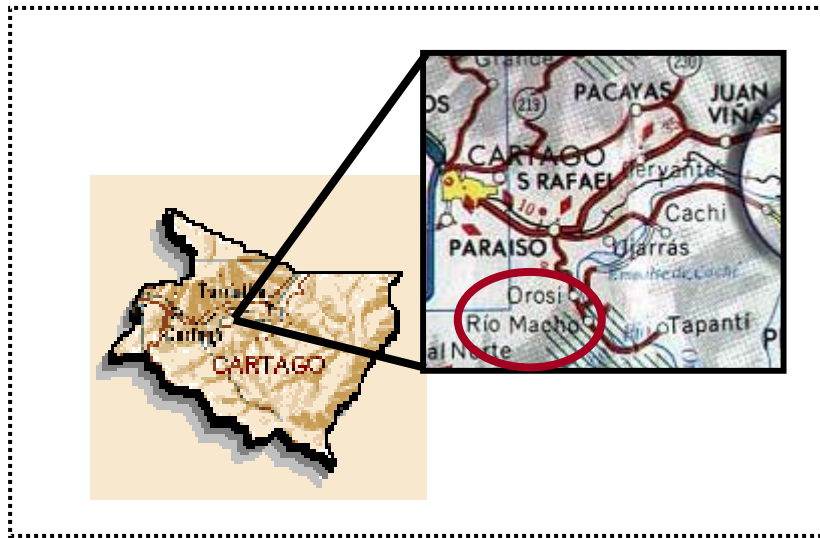


Figura 2. Mapa del lugar de recolección de la planta *Phyllanthus niruri*

Obtención y desarrollo de vitroplantas

Para la obtención y desarrollo de las vitroplantas (materia prima para el desarrollo de dicha investigación), se tomaron las semillas como explantes iniciales. Las cuales fueron esterilizadas superficialmente con una solución comercial de hipoclorito de sodio (2,5% de cloro activo), con 2-3 gotas de champú *Meneen* (sustitución del Tween 20) por 30 minutos, luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril por diez minutos en la cámara de flujo laminar. Para romper la dormancia de las semillas se utilizaron diferentes métodos. Posteriormente se cultivaron en medio Murashige & Skoog (MS, 1962), suplementado según el tratamiento realizado. (Cuadro 2). Las condiciones de crecimiento fueron $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 16 horas luz de fotoperíodo. Se determinó el porcentaje de germinación para el análisis de esta prueba.

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos físicos y químicos realizados a las semillas para inducir la germinación

<i>ID**</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Descripción</i>	<i>Procedimiento</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Medio de cultivo</i>
<i>A</i>	Sin tratamiento	Control	---	---	MS*
<i>B</i>	Medio con AG ₃ (2mg/L)	Regulador de crecimiento	Adición al medio	---	MS* + 2mg/ml AG ₃
<i>C</i>	AG ₃ (2mg/L)	Regulador de crecimiento	Inmersión	4h	MS*
<i>D</i>	AG ₃ (2mg/L)	Regulador de crecimiento	Inmersión	6h	MS*
<i>E</i>	AG ₃ (2mg/L), previo a la inoculación se colocaron en agua caliente	Regulador de crecimiento y escarificación con agua caliente	Inmersión	4h en AG ₃ 10 min Agua Hirviendo	MS*
<i>F</i>	AG ₃ (2mg/L), previo a la inoculación se colocaron en agua caliente	Regulador de crecimiento y escarificación con agua caliente	Inmersión	4h en AG ₃ 10 min Agua Hirviendo	MS* + 2mg/ml AG ₃
<i>G</i>	AG ₃ (2mg/L)	Regulador de crecimiento	Inmersión	24 h	MS*
<i>H</i>	Nitrato de potasio (KNO ₃) al 2%	Agente Químico	Inmersión	24 h	MS*
<i>I</i>	Semillas mantenidas durante 24 h en agua destilada	---	Inmersión	24 h	MS*

* MS: MS suplementado con 3% de sacarosa y 0.2% de phytagel

** ID: Identificación

Respuestas Morfogénicas al BA y al ANA

Se siguió la metodología propuesta por Catapan *et al.* (2001). Una vez que las plántulas habían crecido y alcanzado una altura adecuada, se cortaron e inocularon nudos individuales en orientación vertical para establecer el cultivo de yemas. Se inocularon en medio Murashige y Skoog (MS, 1962). Se probaron los efectos separados de los siguientes reguladores de crecimiento en la iniciación de yemas: 6-

Bencil Adenina (BA) y Ácido Naftalen Acético (ANA) en concentraciones de 1, 3 y 5 mg/L. En todos los medios, los valores de pH fueron ajustados a 5,8 antes de autoclavar a 121°C por 20 minutos. Los experimentos para inducir el cultivo de yemas fueron incubados a 25°C y 16 horas de fotoperíodo. Se compararon los diferentes tratamientos en cuanto a número de brotes y yemas producidas. Los datos fueron analizados estadísticamente por medio del programa Statistic con el Modelo Lineal Categórico. Se realizó la prueba de Tukey para comparar los diferentes tratamientos.

Resultados y Discusión

Obtención y desarrollo de vitroplantas

La desinfección de los explantes (semillas), se realizó según la metodología propuesta por Catapan *et al.* (2001) los cuales establecieron el protocolo de micropropagación de *Phyllanthus stipulatus*, este se tomó como referencia para iniciar el establecimiento del protocolo de *P. niruri* debido a que esta planta pertenece al mismo género y tienen algunas



características en común. La desinfección (hipoclorito de sodio, 3 gotas de champú Meneen por 30 minutos, y agua destilada estéril por diez minutos) mostró ser muy efectiva con un porcentaje de contaminación entre 30-34%, el cual por tratarse de explantes provenientes de campo se considera que es aceptable.

Se realizaron pruebas de germinación de la semilla (Figura 3), ya que estudios conducidos por Figueira *et al.* (1998), con seis especies de *Phyllanthus* (*P.niruri*, *P.tenellus*, *P.amarus*, *P.urinaria*, *P.carolinensis* y *P.sp*) demostraron que las semillas presentan dormancia, principalmente en los primeros cuatro meses después de la cosecha. Unader *et al.* (1995) también citan la dormancia de las semillas recién cosechadas. Una vez analizados los datos obtenidos de los diferentes tratamientos evaluados, se logró determinar parcialmente cual fue el más apto para la inducción a germinación de *Phyllanthus niruri*. En el Cuadro 3, se puede apreciar que el porcentaje más alto se alcanzó mediante la aplicación del tratamiento C (Inmersión con AG₃

durante 4h), a una concentración de 2mg/L con un 60% de semillas germinadas. Con el tratamiento *B* (Adición de AG₃; 2mg/L al medio) se obtuvo un porcentaje de germinación muy similar al Testigo (*A*). Cabe mencionar que los tratamientos: inmersión en AG₃ (24h); KNO₃ y Agua (Tratamientos *G*, *H* e *I* respectivamente) no lograron superar al testigo, el cual alcanzó un 35% de germinación. De los tratamientos físicos (*E* y *F*), la escarificación con agua caliente inhibió totalmente la germinación.

Cuadro 3. Porcentaje de germinación obtenidos por los diferentes tratamientos de inducción realizados

<i>ID**</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Descripción</i>	<i>Proced.</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Medio de cultivo</i>	<i>% Germin</i>
<i>A</i>	Sin tratamiento	Control	---	---	MS*	35
<i>B</i>	Medio con AG ₃ (2mg/L)	Regulador de crecimiento	Adición al medio	---	MS* + 2mg/ml AG ₃	34
<i>C</i>	AG ₃ (2mg/L)	Regulador de crecimiento	Inmersión	4h	MS*	60
<i>D</i>	AG ₃ (2mg/L)	Regulador de crecimiento	Inmersión	6h	MS*	18
<i>E</i>	AG ₃ (2mg/L), previo a la inoculación se colocaron en agua caliente	Regulador de crecimiento y escarificación con agua caliente	Inmersión	4h en AG ₃ 10 min Agua Hirviendo	MS*	0
<i>F</i>	AG ₃ (2mg/L), previo a la inoculación se colocaron en agua caliente	Regulador de crecimiento y escarificación con agua caliente	Inmersión	4h en AG ₃ 10 min Agua Hirviendo	MS* + 2mg/ml AG ₃	0
<i>G</i>	AG ₃ (2mg/L)	Regulador de crecimiento	Inmersión	24 h	MS*	13
<i>H</i>	Nitrato de potasio (KNO ₃) al 2%	Agente Químico	Inmersión	24 h	MS*	11
<i>I</i>	Semillas mantenidas durante 24 h en agua destilada	---	Inmersión	24 h	MS*	14

* MS: MS suplementado con 3% de sacarosa y 0.2% de phytigel

** ID: Identificación

Se puede observar que a pesar de los diferentes tratamientos realizados el porcentaje de germinación obtenido no fue el óptimo en la mayoría de los casos, el que dio mejores resultados fue en el que se utilizó la hormona de crecimiento ácido giberélico (AG_3) el cual además de estimular el alargamiento celular de los entrenudos del tallo y los pedúnculos florales, rompen la dormancia de gran número de semillas y brotes. Cuando la planta germina, comienzan a actuar algunas sustancias hormonales que regulan su crecimiento desde esa temprana fase: las fitohormonas, llamadas giberelinas, son las que gobiernan varios aspectos de la germinación (Hormonas vegetales..., 2002). Sin embargo, se requiere más investigación para facilitar y aumentar los porcentajes de germinación al máximo de *P.niruri*. Aquí se presentan bases para posteriores diseños experimentales que permitan encontrar métodos eficientes para promover la germinación de sus semillas.



Figura 3. Semilla germinada de *P.niruri* (Tratamiento inmersión en AG_3 por 4h), luego de 15 días de inoculada

Respuestas Morfogénicas al BA y al ANA

Los datos obtenidos se analizaron mediante promedios según el número de brotes y yemas producidas en los diferentes medios de cultivo estudiados, al mismo tiempo estos datos se corroboraron con el programa *Statistic (Linear Models, One way, categorical)* (Anexo A). Por medio de estas pruebas estadísticas se determinó que el medio de cultivo enriquecido con el regulador de crecimiento BA (tomando en cuenta

todas las concentraciones) es el más efectivo para el desarrollo de las estacas inoculadas presentando un mayor número de brotes y yemas. (Figura 4; Cuadros 4 y 5).

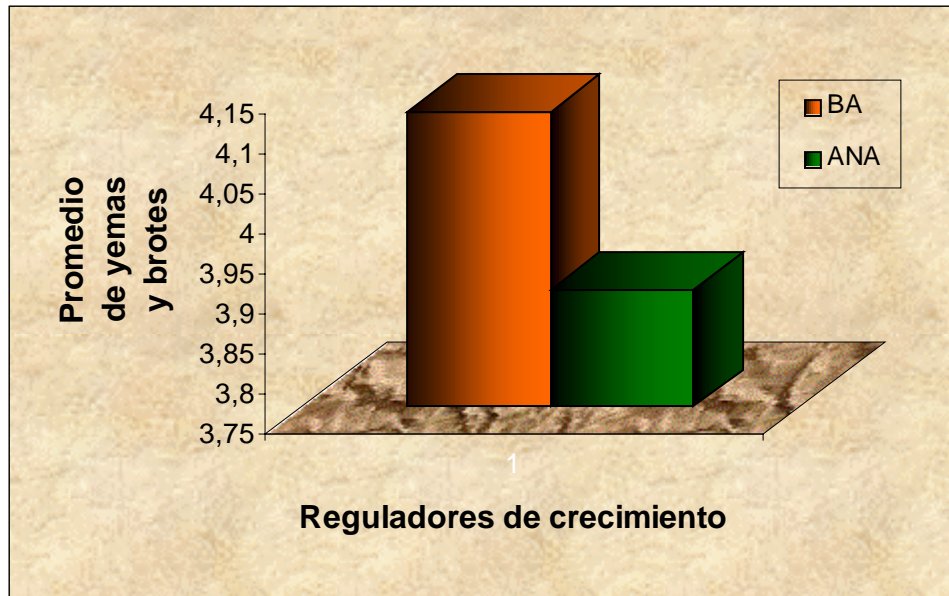


Figura 4. Promedios de la producción de yemas y brotes comparando los diferentes reguladores de crecimiento (ANA, BA) presentes en los medios de cultivo

Cuadro 4. Prueba de Tukey (HSD) para la comparación de la producción de YEMAS por tratamiento (BA, ANA)

<i>Tratamiento</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Medio con BA	21.756*	I
Medio con ANA	3.6795*	..I

* Las medias de los tratamientos son significativamente diferentes entre sí.

Cuadro 5. Prueba de Tukey (HSD) para la comparación de la producción de *BROTOS* por tratamiento (BA, ANA)

<i>Tratamiento</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Medio con BA	4.9615	I
Medio con ANA	0.5769	..I

* Las medias de los tratamientos son significativamente diferentes entre sí.

Respecto a las concentraciones de BA estudiadas se obtuvo una diferencia significativa entre las concentraciones analizadas (1, 3 y 5 mg/L). La concentración de 5 mg/L inhibió el desarrollo de los explantes. (Cuadros 6 y 7; Figuras 6 y 7). Estos datos demuestran que la especie se comporta de una forma eficiente a una concentración mínima de esta citoquinina. Este desarrollo favorable fue ocasionado por las propiedades que le confirió al medio las concentraciones de BA adicionadas, la cual promueve la división celular y la elongación de yemas. Pillay y Railton (1983) demostraron que la Bencil Adenina incrementa en grado notable la elongación de las yemas laterales de chícharo (Salisbury y Ross, 1994). En la figura 5, se demuestra como la concentración de 1 mg/L de BA promovió la elongación de las plántulas, no así la ramificación como lo logró la concentración 3 mg/L, en ambas concentraciones se dio la formación de un callo, sin embargo la regeneración fue directa ya que este era de carácter basal. Un comportamiento similar se dio en el tratamiento con ANA, en las tres concentraciones analizadas se formo un callo basal. (Figura 8) Las plántulas derivadas de la introducción de las semillas realizada en medio MS con AG₃, no formaron callo, por el contrario se dio la formación de raíces. (Figura 5, C)



Figura 5. Desarrollo de las vitroplantas en medio MS con reguladores de crecimiento diferentes (A: 1 mg/L BA, B: 3 mg/L BA y C: 2 mg/L AG₃)

Cuadro 6. Prueba de Tukey (HSD) para la comparación de medias entre la producción de *BROTOS* para los dos tratamientos en sus diferentes concentraciones

<i>Tratamiento</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>	<i>Media*</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BA	1	8.5962	I
	2	6.2885	..I
	3	00000I
ANA	4	0.9400I
	5	0.7308I
	6	0.0926I

* Las medias del tratamiento BA son significativamente diferentes entre sí. Mientras que para el tratamiento ANA estas no son significativamente diferentes

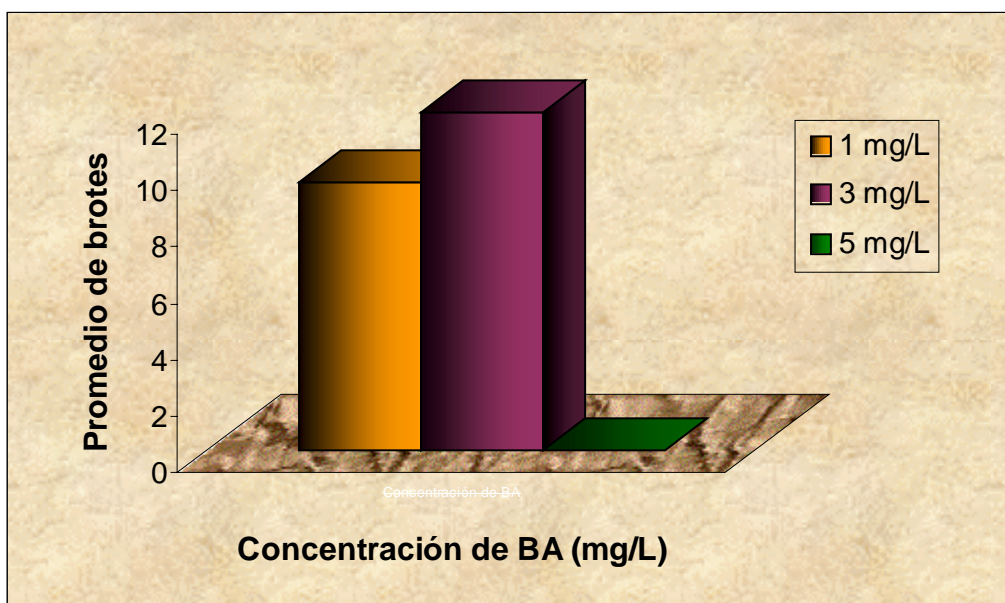


Figura 6. Promedios de brotes producidos con tres concentraciones diferentes de BA

Cuadro 7. Prueba de Tukey (HSD) para la comparación de medias entre la producción de YEMAS para los dos tratamientos en sus diferentes concentraciones

<i>Tratamiento</i>	<i>Concentración (mg/L)</i>	<i>Media*</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
BA	1	42.058	I
	2	23.212	..I
	3	00000I
ANA	4	6.8000I
	5	4.2308I
	6	0.2593I

* Las medias del tratamiento BA son significativamente diferentes entre sí. Mientras que para el tratamiento ANA estas no son significativamente diferentes

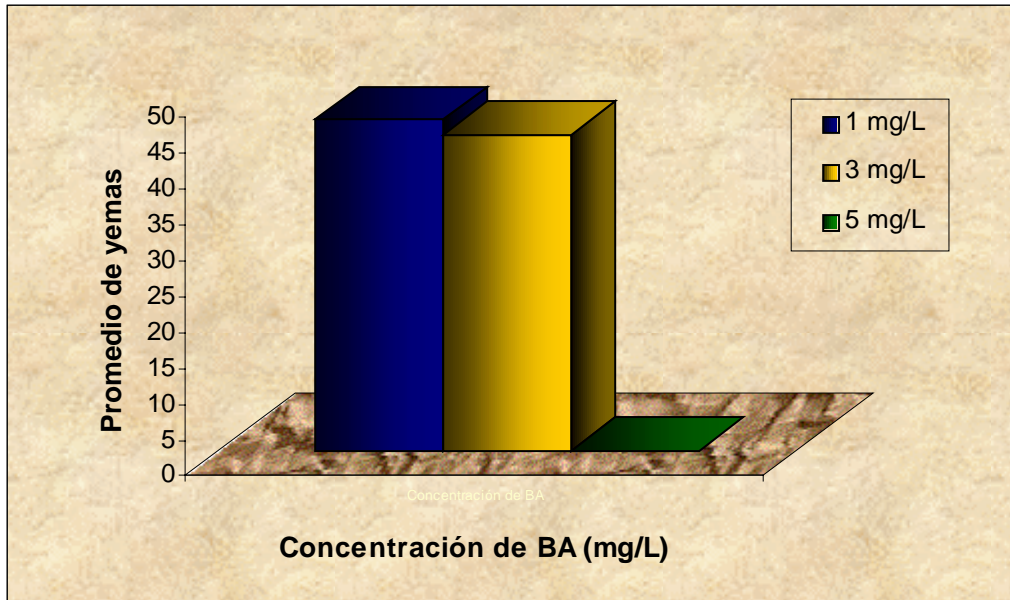


Figura 7. Promedios de yemas producidas con tres concentraciones diferentes de BA

Por otro lado, las concentraciones de ANA según los análisis estadísticos no muestran diferencia significativa alguna, (Cuadro 6 y 7; Figuras 9 y 10), en cuanto la producción de yemas y brotes, las auxinas afectan al crecimiento del tallo, las hojas y las raíces y al desarrollo de ramas laterales y frutos. Las auxinas influyen en el crecimiento de estos órganos vegetales estimulando la elongación o alargamiento de ciertas células e inhibiendo el crecimiento de otras, en función de la cantidad de auxina en el tejido vegetal y su distribución (Lucas, 2002). Sin embargo, esta especie no tuvo una respuesta adecuada a esta hormona produciendo un número muy bajo de yemas y brotes en comparación con el tratamiento con BA. Por el contrario se mostró una inducción de formación de callos basal conforme las concentraciones aumentaban. (Figura 8)



Figura 8. Micropropagación de *P. niruri* en medio enriquecido con ANA en diferentes concentraciones. (1: 1mg/L; 2: 3mg/L y 3: 5mg/L)

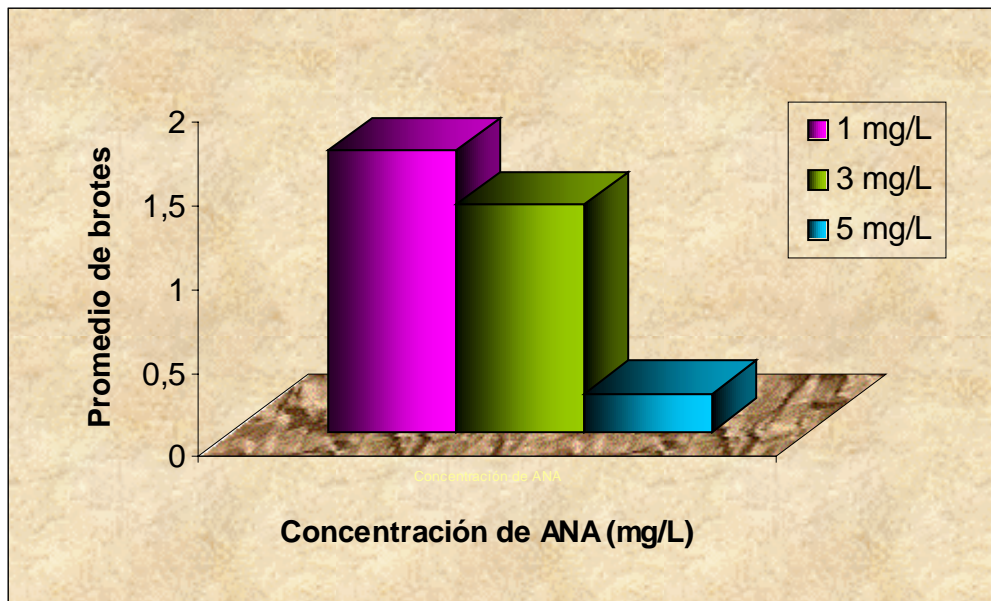


Figura 9. Promedios de brotes producidos con tres concentraciones diferentes de ANA

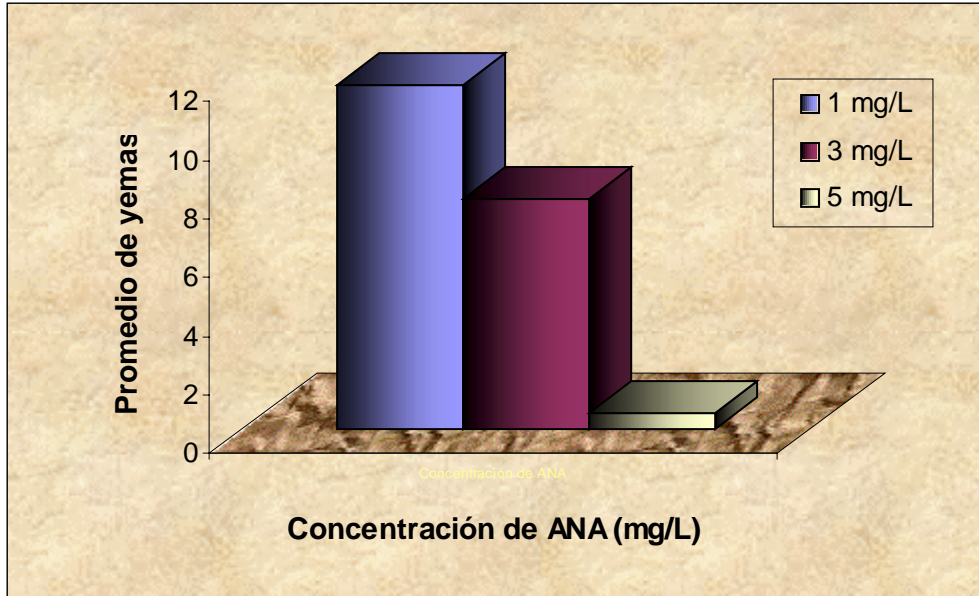


Figura 10. Promedios de yemas producidas con tres concentraciones diferentes de ANA

Conclusiones y Recomendaciones

■ La desinfección propuesta por Catapan *et al.* (2001) fue exitosa para esta especie, obteniéndose entre un 30-34% de contaminación, la cual se considera baja para explantes provenientes de campo.

■ *P.niruri* es una especie que presenta un periodo de dormancia significativo, el cual fue superado con mayor eficiencia por el tratamiento de las semillas en inmersión con AG₃ durante 4h. Sin embargo, se recomienda más investigación para lograr un incremento en el porcentaje de germinación.

■ La presencia de 3 mg/L de Bencil Adenina (BA) en el medio de cultivo MS (1962) suplementado con 3% de sacarosa y 0.2% de phytigel permitió una mayor producción de brotes y yemas, sugiriéndose este como el medio más óptimo para la micropropagación de la especie.

■ Se recomienda hacer estudios de las etapas de enraizamiento y aclimatación para la posible comercialización de la misma.

- Acuña, M. 2002. ¿Por qué se aplican tratamientos pregerminativos a las semillas?. Centro de Semillas de Árboles Forestales. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile. Disponible en:
http://www.uchile.cl/facultades/cs_forestales/publicaciones/cesaf/n14/4.html
- Buchaul, R. 2001. *Phyllanthus niruri* – Euphorbiaceae. Saúde com as plantas medicinais. Ciência e Sabedoria Popular se afinam na Fitoterapia. Brasil. Disponible en: http://www.geocities.com/buchaul/plest_phyllanthus.htm
- Catapan, E., Fleith, M., y Viana, A. 2001. *In vitro* culture of *Phyllanthus stipulatus* (Euphorbiaceae). Revista Brasileira de Botânica 24:1. <http://www.scielo.br/>
- Cárdenas, J. *et al.* 1972. Tropical Weeds, Malezas Tropicales. Volumen I. Instituto Colombiano Agropecuario. Bogotá, Colombia. 175p
- Correa, C; Ming, L; *et al.* 1991. Cultivo de plantas Mediciniais, Condimentares e Aromáticas. EMATER-Paraná. 114p. Mencionado en : Melillo, 1999
- Doods, H. y Roberts, W. 1982. Experiments in plant tissue culture. New York (USA): Cambridge University Press.
http://www.qro.itesm.mx/servicios_int/bioingenieria/introduccion.htm
- Figueira, G.M.; Pereira, B. *et al.* 1998. Estudos Sobre a Germinacao de Quebra Pedra. XV Simposio de Plantas Mediciniais do Brasil
- González, A; Raciman, J y Aguirre M. 1999. Hormonas Vegetales. Disponible en: <http://fai.unne.edu.ar/biologia/planta/auxinas.htm>
- Hartmann, H. Y Kester, d. 1988. Propagación de Plantas. México D.F. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. 760 p. Mencionado en Acuña, 2002.
- Instituto Nacional de Biodiversidad, 1997. Lista de especímenes de *Phyllanthus niruri*. Disponible en: <http://www.inbio.ac.cr>
- Lancet. 1988. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. 2(8614):764-6. Disponible en:<http://www.scielo.br/>
- Lucas, E. 2002. Auxinas. Chosica – Perú . Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos10/auxinas/auxinas.shtml>
- Melillo, P., 1999. Agrotecnología para el cultivo de Quebra-pedra o erva-pombinha. Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de Plantas Medicinales Iberoamericanas. 334-340.

Monge, R. 2002. Plantas Medicinales Cuara o Folklore. Programa Educación Biológica ACG. Disponible en:
<http://www.acguanacaste.ac.cr/rothschildia/v4n2/textos/plantas.html>

Ocampo, R y Maffioli, A. 1985. El uso de algunas plantas medicinales en Costa Rica. Volumen 1. Editorial Trejos. San José, Costa Rica. 95p

Oliveira, E.; Randi, A.; *et al.* 1996. Polimorfismo em Sementes de Algumas Espécies de *Phyllanthus* (*Euphorbiaceae*) e enraizamiento de *P. niruri*. XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. 72-73p. Mencionado en Melillo, 1999.

Owen H.R. and Miller A.R. 1992. An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28: 147-150. Disponible en:
<http://aggie-horticulture.tamu.edu/tisscult/database/media/mssalts.html>

Patiño F.; De la Garza, P.; Villagómez, Y.; Talavera, I. y Camacho, F. 1983. Guía para la recolección y manejo de semillas de especies forestales. México D.F. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. Subsecretaría Forestal. Boletín Divulgativo N° 63. 181 p. Mencionado en Acuña, 2002.

Salisbury, B. Y Ross, C. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. Cuarta Edición. California, Estados Unidos. 759p.

Raintree Nutricion, 2000. Database entry for Chanca Piedra - *Phyllanthus niruri*. Raintree Nutrition, Inc., Austin, Texas. Disponible en:
<http://www.rain-tree.com/chanca.htm>

Unader, D.W.; Bryan, H.H. *et al.* 1995. Factors Affecting Germination and Stand Establishment of *Phyllanthus amarus* (*Euphorbiaceae*). *Eco. Bot.* 49: 49-55.

Willian, R.L. 1991. Guía para la manipulación de semillas forestales, estudio con especial referencia a los trópicos. FAO Montes 20/2. 502 p. Mencionado en Acuña, 2002.

Anexos

Anexo A

Análisis Estadísticos (Generados por el programa *Statistic*)

1. Comparación de la producción de yemas por tratamientos (1: BA, 2: ANA)

ONE-WAY AOV FOR YEMAS BY TRATAMIE

TRATAMIE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
1	21.756	156	25.121
2	3.6795	156	5.8980
TOTAL	12.718	312	18.246

CASES INCLUDED 312 MISSING CASES 0

PRUEBA DE TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF YEMAS BY TRATAMIE

TRATAMIE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
1	21.756	I
2	3.6795	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 2.772 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 4.0492
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 2.0660

2. Comparación de la producción de brotes por tratamiento (1: BA, 2: ANA)

ONE-WAY AOV FOR BROTES BY TRATAMIE

TRATAMIE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
1	4.9615	156	5.9773
2	0.5769	156	0.9090
TOTAL	2.7692	312	4.2752

CASES INCLUDED 312 MISSING CASES 0

PRUEBA DE TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF BROTES BY TRATAMIE

TRATAMIE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
1	4.9615	I
2	0.5769	.. I

ALL 2 MEANS ARE SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 2.772 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.9487
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.4841

3. *Comparación de producción de yemas por concentraciones (1: 1mg/L BA; 2: 3mg/L BA; 3: 5mg/L BA; 4: 1mg/L ANA; 5: 3mg/L ANA y 6: 5mg/L ANA)*

ONE-WAY AOV FOR YEMAS BY CONCENT

CONCENT	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
1	42.058	52	16.558
2	23.212	52	27.180
3	0.0000	52	0.0000
4	6.8000	50	7.7407
5	4.2308	52	4.9965
6	0.2593	54	0.9553
TOTAL	12.718	312	13.518

CASES INCLUDED 312 MISSING CASES 0

PRUEBA DE TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF YEMAS BY CONCENT

CONCENT	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
1	42.058	I
2	23.212	.. I
4	6.8000 I
5	4.2308 I
6	0.2593 I
3	0.0000 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.029 REJECTION LEVEL 0.050
 STANDARD ERRORS AND CRITICAL VALUES OF DIFFERENCES
 VARY BETWEEN COMPARISONS BECAUSE OF UNEQUAL SAMPLE SIZES.

4. *Comparación de producción de yemas por concentraciones (1: 1mg/L BA; 2: 3mg/L BA; 3: 5mg/L BA; 4: 1mg/L ANA; 5: 3mg/L ANA y 6: 5mg/L ANA)*

ONE-WAY AOV FOR BROTES BY CONCENT

CONCENT	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
1	8.5962	52	3.6582
2	6.2885	52	7.4052
3	0.0000	52	0.0000
4	0.9400	50	1.1851
5	0.7308	52	0.7950
6	0.0926	54	0.3512
TOTAL	2.7692	312	3.4237

CASES INCLUDED 312 MISSING CASES 0

PRUEBA DE TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS OF BROTES BY CONCENT

CONCENT	HOMOGENEOUS MEAN	GROUPS
1	8.5962	I
2	6.2885	.. I
4	0.9400 I
5	0.7308 I
6	0.0926 I
3	0.0000 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.029 REJECTION LEVEL 0.050
 STANDARD ERRORS AND CRITICAL VALUES OF DIFFERENCES
 VARY BETWEEN COMPARISONS BECAUSE OF UNEQUAL SAMPLE SIZES.