

"ESTUDIO MICROSCÓPICO DE LA HOJA
DE THYMUS BAETICUS BOISS. EX LACAITA
IN VIVO E IN VITRO".

CABO, M.M.; CABO, J.; CABO, M.P.; CASTILLO, M.J.;
CRUZ, T.; JIMENEZ, J.

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA. FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

RESUMEN

Hemos realizado un estudio histológico de las hojas de *Thymus baeticus* Boiss. ex Lacaita, tanto "in vivo" como "in vitro". Para el estudio de las hojas "in vitro" se utilizaron las procedentes de cultivo de órganos. En cambio las hojas "in vivo" fueron las recolectadas en Lanjarón (Granada). Ambas muestras poseen glándulas oleosas similares, que recuerdan el tipo general de las *Labiatae*; en cambio, hemos observado notables diferencias en cuanto a los pelos. Se estima que este hecho se debe al entorno: las plantas cultivadas crecen en condiciones óptimas, por lo que no desarrollan sus mecanismos de defensa, como han de hacerlo las plantas silvestres. Estas conclusiones se ven reforzadas por el estudio de las hojas en polvo.

ABSTRACT

We performed an histologic study comparing "in vivo" and "in vitro" leaves of *Thymus baeticus* Boiss. ex Lacaita. "In vitro" leaves were obtained through organ culture, whereas wild material -"in vivo" leaves- was collected in Lanjarón (Granada, España). Both samples showed similar oil-glands, which resembled the general pattern in *Labiatae*; however, we noticed remarkable differences as far as shape and hairs were concerned. These facts are thought to be caused by the environment: cultured plants grow in optimum conditions, so they do not develop their defensive mechanism as much as wild plants do. These conclusions are reinforced by the study of powdered leaves.

INTRODUCCION

Las plantas aromáticas -y en especial las especies autóctonas de Andalucía- constituyen desde tiempo atrás una línea de investigación fundamental en nuestro Departamento (CRUZ et al., 1989a; CRUZ et al., 1989b; CABO et al., 1990). Profundizar en su estudio, abordando nuevas posibilidades metodológicas, es lo que intenta este trabajo.

Las técnicas de cultivo de tejidos y órganos vegetales "in vitro" han conocido un auge extraordinario en las últimas décadas. La propagación de clones de interés es uno de sus ámbitos de aplicación más difundidos. Sabidas son las dificultades que ha de vencer el método a la hora de readaptar las jóvenes plantas a las condiciones "extra vitrum" (PIERIK, 1990). En el presente estudio se ponen de manifiesto algunas de las peculiaridades que esta modalidad de cultivo confiere a las plantas de *Thymus baeticus* Boiss. ex Lacaita -en concreto a sus hojas- y que harán necesario un delicado proceso de aclimatación.

MATERIALES Y METODOS

*1ª PARTE: CULTIVO

-Establecimiento de un stock de plantas madre: se llevó a cabo enraizando en invernadero esquejes de *Thymus baeticus* Boiss. ex Lacaita recolectados en Lanjarón (Granada, España), en las condiciones siguientes: sustrato: TRIOHUM substrat 1, humedad: 75-80%, temperatura: 18-25°C

-Explantos inicial: constituido por porciones apicales de unos 10 mm de longitud, previamente descontaminadas empleando hipoclorito sódico como agente desinfectante (2,5 g de cloro activo/l).

-Medio de cultivo: de MURASHIGE y SKOOG (1962) modificado, en el que los macroelementos han sido reducidos a la mitad de su concentración. Las soluciones minerales se solidifican añadiendo bacto-agar DIFCO en una proporción de 8 g/l. Como fuente de carbono se ha incorporado sacarosa (30 g/l). El pH final se ajusta a 5,8 antes de la esterilización. Esta se efectúa en autoclave a 120°C y 1 Kg/cm² durante 20 minutos, para volúmenes de 20 ml.

Los medios son renovados cada cuatro semanas en cultivo, según el esquema siguiente:

- 1º) Medio de establecimiento: incorpora carbón activo (2g/l)
- 2º) Medio de multiplicación: incluye 0,25 mg/l de bencilaminopurina
- 3º) Medio de e

-Recipientes: tubos de vidrio borosilicico de 25 x 150 mm

-Condiciones en la cámara de cultivo: fotoperiodo: 16 h/día, temperatura: 18-23°C, humedad relativa: 70% ± 5, iluminación: 1000 lux.

*2ª PARTE: ESTUDIO HISTOLOGICO

-Muestra:

-hojas jóvenes, correspondientes al crecimiento anual, de *Thymus baeticus* Boiss. ex Lacaita, recolectadas en Lanjarón (Granada, España)

-hojas de la misma especie, esta vez de plantas obtenidas mediante propagación vegetativa "in vitro", según el protocolo de cultivo que se detalla en la primera parte: "cultivo".

-Instrumental:

- microtomo de mano tipo Ranvier
- microscopio binocular JENAVAL CARL ZEISS.

Los cortes histológicos se observaron, según los casos, bajo los aumentos de 32, 125, 250 y 400.

-Reactiv

-aclarantes: agua, hipoclorito sódico en solución acuosa al 20% (EVANS, 1991), hidrato de cloral/glicerina/agua 5:3:2 (v/v/v) (LYNCH et al., 1972; CABO y PARDO, 1974)

-tinción de lignina: floroglucina clorhídrica (solución alcohólica de floroglucina al 1,25% a la que se añade, en el momento de su empleo, ácido clorhídrico concentrado 1:1 (v/v) (CABO y PARDO, 1974)

RESULTADOS Y DISCUSION

Las hojas procedentes de plantas silvestres de *Thymus baeticus* Boiss. ex Lacaita (FOTOGRAFIA N° 1) poseen una organización histológica típica correspondiente a un mesofilo heterogéneo asimétrico:

-epidermis del haz con estomas y numerosos pelos tectores, en su mayoría pluricelulares y de pared verrugosa; típicas glándulas esenciales esferoidales sentadas.

-parénquima en empalizada, formado por un estrato de células alargadas de forma poliédrica

-parénquima lagunar compuesto por varios estratos de células dejando espacios intersticiales entre ellas

-epidermis del envés, también provista de pelos y estomas

El corte histológico practicado a estas hojas pone de manifiesto, además, su característica forma revoluta.

Al estudiar la hoja pulverizada, observamos como elementos característicos:

-pelos tectores uni- y pluricelulares, Alguna glándula de las antes descritas

-elementos conductores, aislados o agrupados en paquetes. En su mayoría corresponden a vasos espiralados. Mediante tinción con floroglucina clorhídrica se evidencia su parcial lignificación.

Los cortes efectuados en hojas de plantas obtenidas vía propagación "in vitro", revelan igualmente una organización correspondiente a un mesofilo heterogéneo asimétrico (FOTOGRAFIA N° 2). En ellos están presentes los elementos señalados para las hojas de campo. Encontramos, sin embargo, que el carácter revoluto de la hoja se encuentra visiblemente atenuado. Otro rasgo distintivo estriba en los pelos tectores, menos abundantes y en su mayoría unicelulares en las hojas de los cultivos. Las glándulas esferoidales sentadas que encontramos son las típicas de labiadas.

Mediante el correspondiente estudio micrográfico de las hojas pulverizadas se confirma la presencia de pelos tectores, predominantemente unicelulares y de pared verrugosa. Visualizamos asimismo vasos espiralados, aislados y en paquetes, escasamente lignificados

Si comparamos el estudio histológico realizado sobre ambos tipos de hoja (campo y cultivo "in vitro") observamos:

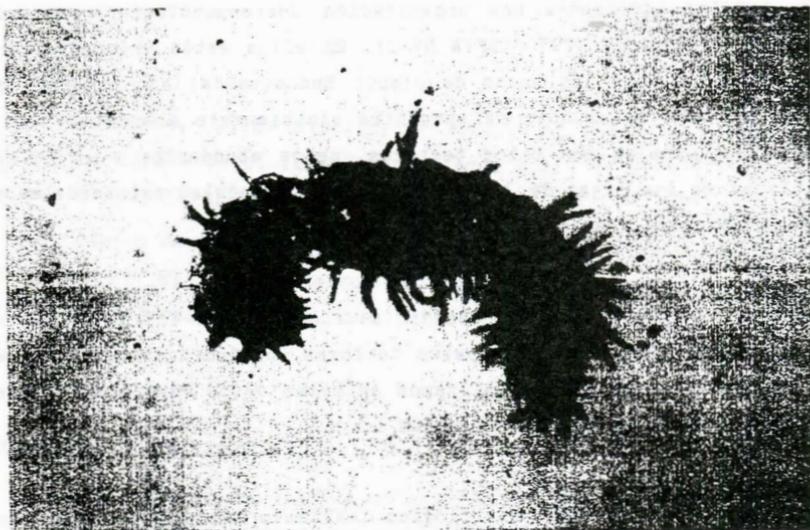
- La hoja desarrollada "in vitro" presenta bordes menos revueltos. Esto es lógico, teniendo en cuenta que el carácter más o menos revuelto de la hoja constituye un mecanismo de defensa frente a la adversidad del entorno. MORALES (1986), en su completa monografía sobre los géneros *Thymus* y *Thymbra* en la Península Ibérica, recoge el hecho de que especies taxonómicamente próximas a *Thymus baeticus* han desarrollado hojas planas, puestas a la sombra y con abundancia de agua.

- otro mecanismo defensivo que se encuentra menos desarrollado "in vitro" es el indumento. Tanto el número de pelos tectores como su grado de desarrollo (predominio de pelos unicelulares) es inferior.

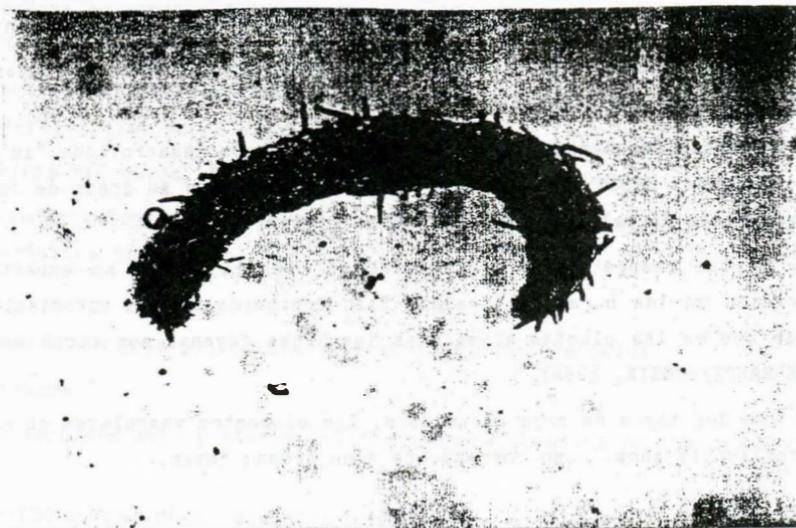
-En lo que respecta a las glándulas de esencia, éstas no experimentan modificación en las hojas cultivadas. Ello concuerda con la apreciación general de que en las plantas aromáticas las hojas jóvenes son ricas en esencia (FERNANDES-COSTA, 1986)

-En los dos tipos de hoja estudiados, los elementos vasculares se presentan poco lignificados, como corresponde a un órgano joven.

En resumen, se puede concluir que las características observadas corresponden a un organismo joven en el que además, en el caso de las plantas cultivadas, los mecanismos defensivos propios del vegetal en su entorno natural, se encuentran poco desarrollados.



FOTOGRAFIA N° 1.- Vista del corte histológico de la hoja de *Thymus baeticus* procedente de campo (x 32).



FOTOGRAFIA N° 2.- Vista del corte histológico correspondiente a hoja de *Thymus baeticus* cultivado "in vitro" (x 32).

BIBLIOGRAFIA

- CABO, M.M.; CABO, J.; CASTILLO, M.J.; CRUZ, T.; JIMENEZ, J.: "Etude de l'essence de *Thymus baeticus* Boiss.". Plantas medicinales et phytothérapie, 1990; 3, 197-202.
- CABO, J.; PARDO, P.: "Guía de Prácticas de Farmacognosia y Farmacodinamia". Granada, 4ª ed., Gráficas del Sur, 1974; 96, 110.
- CRUZ, T.; CABO, M.M.; JIMENEZ, J.; ZARZUELO, A.: "Composition and pharmacological activity of the essential oil of *Satureja obovata*. II- Spasmolytic activity". Fitoterapia, 1989a; 3, 247-251.
- CRUZ, T.; JIMENEZ, J.; ZARZUELO, A.; CABO, M.M.: "The spasmolytic activity of the essential oil of *Thymus baeticus* Boiss. in rats". Phytotherapy research, 1989b; 3, 106-108.
- EVANS, W.C.: "Farmacognosia de Trease y Evans". México, 13ª ed., Interamericana, 1991; 836.
- FERNANDES-COSTA, A.: "Farmacognosia". Lisboa, Calouste Gulbenkian, vol I, 4ª ed., 1986; 370.
- LYNCH, M.; RAPHAEL, S.; MELLOR, L.: "Métodos de laboratorio". México, 2ª ed., Interamericana, 1972; 1186.
- MORALES, R.: "Taxonomía de los géneros *Thymus* excluida la sección *Serpyllum* y *Thymbra* en la Península Ibérica". Ruizia, 1986; 3, 8.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.: "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". Physiol. Plant, 1962; 15, 473-497.
- PIERIK, R.L.M.: "Cultivo *in vitro* de las plantas superiores". Madrid, Mundi-Prensa, 1990; 186.