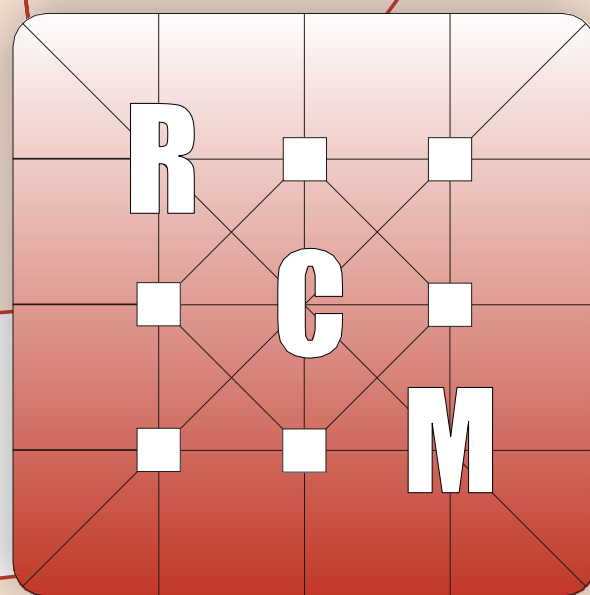


ISSN 1851-7862
Volumen XXI N° 1



CIENCIAS MORFOLÓGICAS

Publicación periódica de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de la Plata

Febrero 2021

CIENCIAS MORFOLÓGICAS

Revista de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata
Publicación periódica de trabajos científicos del área de la
Morfología

EDITOR CIENTÍFICO

Dr. Claudio G. Barbeito. Universidad Nacional de La Plata. CONICET. Argentina.

EDITORES ASOCIADOS

Lic. Rocío García Mancuso. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

Med. Vet. Mariángeles Vita. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

COMITÉ DE POLÍTICA EDITORIAL

Dra. Graciela Navone. Universidad Nacional de La Plata. CONICET. Argentina. .

Dra. Susana Salceda. Universidad Nacional de La Plata. CIC. Argentina.

PhD Gustavo Zuccolilli. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

CONSEJO CIENTÍFICO EDITORIAL

Dra. María del Carmen Carda Batalla. Universidad de Valencia. España.

Dra. Ana Lía Errecalde. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

MSc Antonio Felipe. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Argentina.

Dra. María Teresa Ferrero. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

MSc Stella Maris Galván. Universidad Nacional del Litoral. Argentina.

PhD Eduardo Gimeno. Universidad Nacional de La Plata. CONICET. Argentina.

Dra. María Elsa Gómez de Ferraris. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

Dra. Alda González. Universidad Nacional de La Plata. CONICET. Argentina.

PhD Ben Hanelt. Universidad de Nebraska. Estados Unidos.

Dr. Daniel Lombardo. Universidad Nacional de Buenos Aires. Argentina.

Dra. Inés Martín Lacave. Universidad de Sevilla. España.

Dra. Marta Graciela Méndez. Universidad Nacional de La Plata. CONICET. Argentina.

Dr. Hugo Ortega. Universidad Nacional del Litoral. CONICET. Argentina.

Dr. Martí Pomarola. Universidad Autónoma de Barcelona. España.

Dr. Enrique Portiansky. Universidad Nacional de La Plata. CONICET. Argentina.

Dra. Sara Sánchez. Universidad Nacional de Tucumán. CONICET. Argentina.

PhD Andreas Schmidt-Rhaesa. Biekefeld. Alemania.

Dr. Eduardo Tonni. Universidad Nacional de La Plata. CIC. Argentina.

Dra. Irene von Lawzewitzch. Universidad Nacional de Buenos Aires. CONICET. Argentina.

Dr. Mauricio Zamponi. Universidad Nacional de Mar del Plata. CONICET. Argentina.

Propiedad: Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata.

Sede: Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

Distribución: Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata.

AÑO 2021 VOLUMEN 21 NÚMERO 1

CIENCIAS MORFOLÓGICAS

Publicación periódica de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata
AÑO 2021, Vol. 21, N° 1

ÍNDICE

TRABAJOS ORIGINALES

- Giovanni HERRERA-SANDOVAL; FERNANDO Alonzo-Rojo; JORGE Sáenz-Mata; Cristo Omar PUENTE-VALENZUELA; David Ramiro AGUILLÓN-GUTIÉRREZ
INFLUENCIA DE SUERO FETAL BOVINO Y AMINOÁCIDOS EN LA REGENERACIÓN DE EXTREMIDADES EN LA RANA AFRICANA DE UÑAS (*Xenopus laevis*)..... 1-10
- Ana María ARAMBARRI; Marcelo Paulo HERNÁNDEZ
NUEVOS CARACTERES PARA DIFERENCIAR LAS SEMILLAS DE *DATURA FEROX* Y *D. STRAMONIUM* (SOLANACEAE) 11-18

EDITORIAL

EL LARGO ADIÓS

La publicación de este número de Ciencias Morfológicas cierra el largo proceso de la culminación de esta etapa de la revista. Las condiciones no están dadas, desde hace algunos años, para las revistas que no pueden ingresar a los lugares que las hacen reconocible para los sistemas de evaluación de la ciencia y los científicos. Algunas sociedades, como la SAREM o la Asociación de Antropología Biológica Argentina, han logrado hacer crecer sus revistas e introducirlas como opciones de publicación reconocidas; la nuestra es una sociedad local y pequeña que no puede asumir ese desafío.

Recuerdo los inicios de Ciencias Morfológicas, a principio de los 90s en el escritorio del Dr. Amado Badrán, abrochando manualmente los ejemplares. En alguno de esos números hice mi primera publicación. Luego el renacer de la revista con la Dra. Norma González y un periodo de crecimiento que incluyó la digitalización de los viejos números. Y esta última etapa, junto al equipo actual conducido por la Dra. Rocío García Mancuso, generando ideas e impulsando el crecimiento de la revista hasta que fue imposible mantener la periodicidad.

Quisimos conservar hasta el final los objetivos de la revista y los artículos de este número, muy diversos en su temática y en su origen lo demuestran.

Una etapa culmina, espero que en algún momento pueda resurgir Ciencias Morfológicas.

Hasta siempre.

Claudio G. Barbeito
Editor Científico

INFLUENCIA DE SUERO FETAL BOVINO Y AMINOÁCIDOS EN LA REGENERACIÓN DE EXTREMIDADES EN LA RANA AFRICANA DE UÑAS (*Xenopus laevis*)

INFLUENCE OF FETAL BOVINE SERUM AND AMINO ACIDS ON LIMB REGENERATION IN THE AFRICAN CLAWED FROG (*Xenopus laevis*)

Giovanni HERRERA-SANDOVAL¹; Fernando ALONZO-ROJO¹; Jorge SÁENZ-MATA¹; Cristo Omar PUENTE-VALENZUELA¹; David Ramiro AGUILLÓN-GUTIÉRREZ^{2*}

¹Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Universidad S/N, Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Durango, México. C.P. 35010.

²Laboratorio de Bioindicadores, Centro de Investigación y Jardín Etnobiológico, Universidad Autónoma de Coahuila. Dr. Francisco González 37, Viesca, Coahuila, México. C.P. 27480.

*e-mail: david_aguillon@uadec.edu.mx

RESUMEN.

La regeneración biológica es la capacidad que poseen ciertos organismos para restaurar algún tejido perdido o lesionado. Se han utilizado diversos modelos biológicos para el estudio de la regeneración como las hidras (*Hydra viridis*), las planarias (*Planaria maculata*, *P. lugubris*) y los anfibios (*Ambystoma mexicanum*, *Xenopus laevis*). En este trabajo se investigó la influencia del suero fetal bovino y aminoácidos en la regeneración de extremidades en la rana africana de uñas (*Xenopus laevis*). Se estudiaron 40 especímenes en estadio 66 a los cuales se les realizó una amputación en el área proximal de la tibia-peroné de la extremidad posterior derecha, formando cinco grupos (tratamientos) (aminoácidos, suero fetal bovino, solución fisiológica, estimulación mecánica y control) que estuvieron en fase experimental por un lapso de 78 días. Se realizaron análisis morfométricos y de mortalidad. Los resultados mostraron que no existe una diferencia significativa respecto al ancho y largo de la espícula bajo la influencia de estos tratamientos. La mortalidad fue mayor en el grupo donde se aplicó suero fetal bovino y menor en el grupo que recibió aminoácidos. Probablemente la capacidad regenerativa en el estadio 66 está más influida por el sitio de amputación que por los tratamientos.

Palabras Clave: Suero, aminoácidos, regeneración, extremidades, *Xenopus*

ABSTRACT.

Biological regeneration is the capacity that certain organisms have to restore any lost or injured tissue. Regeneration has been studied in diverse biological models, for example the hydra (*Hydra viridis*), planarian (*Planaria maculata*, *P. lugubris*), and amphibians (*Ambystoma mexicanum*, *Xenopus laevis*). In this work, the influence of fetal bovine serum and amino acids in limb regeneration in African clawed frog (*Xenopus laevis*) was investigated. Forty specimens were studied on stage 66 which underwent an amputation in the proximal tibia-fibula area of the right hind limb, forming five groups (treatments) (amino acids, fetal bovine serum, application of physiological serum, mechanical stimulation and control) that were in experimental phase for a period of 78 days. Mortality and morphometric analysis were performed. The results showed no significant difference from the width and length of the spike under the influence of these treatments. Mortality was higher in the group where fetal bovine serum was applied and lower in the group receiving amino acids. It is believed that the regenerative capacity in the stage 66 is more influenced by the amputation site than the treatments.

Keywords: Serum, amino acids, regeneration, limbs, *Xenopus*

INTRODUCCIÓN

Lo que conocemos como la regeneración biológica se ha definido tradicionalmente como la capacidad que poseen ciertos organismos vivos para restaurar algún tejido perdido o lesionado o de hacer crecer nuevamente una parte del cuerpo que se perdió por causa accidental o fisiológica (1,2,3). Pero para poder entender la regeneración debemos ver las diferencias entre la regeneración y la reparación. La reparación es un proceso en el cual se sustituye el tejido dañado o perdido por otro, pero no mantiene su identidad estructural ni funcional, en cambio, en la regeneración se conserva la estructura y funcionalidad del tejido original (4).

En la regeneración biológica hay dos mecanismos a resaltar, la morfálaxis y la epimorfosis, este último se refiere a la restauración morfológica y funcional de un tejido o estructura anatómica perdida en un adulto mediante la formación de blastema, y es el mecanismo correspondiente a la regeneración de extremidades en anfibios (4).

Inicialmente el proceso para restaurar el daño ocurre en la epidermis que se encuentra alrededor de la herida, por lo cual la epidermis comienza a recubrir el área afectada. El tiempo en el que esto ocurre es muy rápido pues se efectúa en un lapso de dos a tres días. La segunda etapa del proceso ocurre cuando la epidermis que cubrió la herida comienza a inflamarse hacia afuera creando una estructura temporal llamada blastema en la que se concentran las células para completar todo el proceso regenerativo (2,3,5,6,7). Tradicionalmente se han utilizado diversos modelos biológicos para el estudio de la regeneración, por ejemplo, las hidras (*Hydra viridis*), las planarias (*Planaria maculata*, *P. lugubris*) y los anfibios (*Ambystoma mexicanum*, *Xenopus laevis*) (1,2,8).

Se sabe que la regeneración es una capacidad evolutiva, y que las condiciones que la propician son particulares en cada especie. Se han identificado productos como el ácido retinoico, factores de crecimiento (GF) y proteínas que estimulan este proceso en vertebrados. En el caso de los GF son importantes

para algunos procesos biológicos como, por ejemplo, el FGF-10 (factor de crecimiento de fibroblastos) estimula la regeneración de extremidades en *X. laevis* (9). También Mullen et al. (10,27) mencionan que los FGF o cualquier otra molécula relacionada a FGF es o bien el agente neurotrópico de la regeneración o la vía de la función, por la que los nervios ejercen su efecto sobre la regeneración. Otro caso fue el estudio de Tanaka y Gann (11) donde realizaron una investigación de implantación de perlas empapadas con ácido retinoico para promover el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), ya que el ácido retinoico juega un papel importante tanto en la desdiferenciación de las células para formar el blastema de regeneración y en los procesos de re-especificación (12). Por otro lado, existen algunas proteínas importantes en la regeneración de musculo, hueso y nervios, como es el caso de la transferrina, ya que dicha proteína es una de las primeras sustancias requeridas para las células de blastema (13,14).

En este trabajo se pretende saber si los aminoácidos y el suero fetal bovino estimulan la regeneración de extremidades en anfibios anuros como la rana africana de uñas (*Xenopus laevis*), ya que esta especie es un organismo modelo muy importante utilizado para estudiar la embriología de los vertebrados, incluyendo procesos regenerativos, biología celular, fisiología, toxicología y bioquímica. *Xenopus laevis* es adecuada para el laboratorio ya que son resistentes, de larga vida y además pueden ser inducidas a producir huevos de una forma muy controlada y durante todo el año. En etapa embrionaria toleran una extensa manipulación, por ejemplo, de células individuales, disecciones de capas germinales o trasplantes de tejidos, además, su larva es trasparente y relativamente grande (15).

Actualmente la biología y medicina regenerativa son prioritarias debido al tipo de enfermedades que aquejan a la sociedad, por lo tanto, es de mucha importancia realizar estudios de regeneración en los distintos tipos de modelos biológicos, ya que esto conlleva a un mejor entendimiento de dicho proceso para posteriormente

poder utilizarlo en personas y lograr una recuperación de una extremidad o de algún tejido u órgano dañado.

METODOLOGÍA

Condiciones experimentales

Se realizó un experimento en el Laboratorio de Vertebrados de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, en México, para evaluar la capacidad regenerativa en la región proximal de la tibia-peroné (zeugopodio) de la extremidad posterior derecha de *Xenopus laevis* variedad albina estadio 66 (16). Se realizó la amputación en la extremidad posterior debido a que las extremidades anteriores son utilizadas en funciones vitales para el animal como son alimentación y reproducción (17).

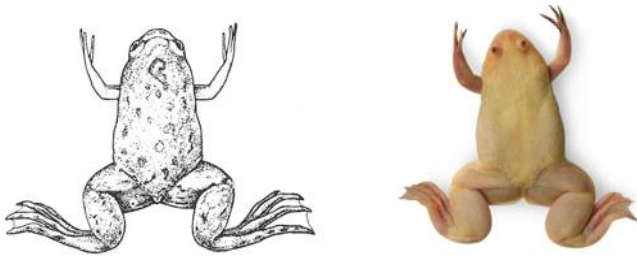


Figura 1: *Xenopus laevis* variedad albina.

Se utilizaron 40 ranas africanas de uñas (*Xenopus laevis*) obtenidas de una comercializadora en la ciudad de Monterrey, México, las cuales se colocaron en acuarios con capacidad de 40 litros con 20 litros de agua (8 individuos por acuario), ya que según Detlaf y Rudneva (18) cada organismo necesita aproximadamente de dos a tres litros de agua para permitirles nadar adecuadamente. Los organismos se alimentaron tres veces por semana con hojuela para peces y camarones secos. A las peceras se les cambió el agua los mismos días de la alimentación para evitar la formación de hongos y bacterias en el acuario, basándose en la metodología propuesta por Detlaf y Rudneva (18).

Amputación de la extremidad

En la etapa experimental se realizó una amputación en la región proximal de la tibia-peroné de la extremidad posterior derecha de *Xenopus laevis*, ya que dichos organismos tienen la capacidad regenerativa incompleta en sus extremidades en etapa adulta y una regeneración completa en estados larvarios, por lo que se buscó analizar este proceso con diferentes tipos de tratamientos por cada grupo. La amputación se realizó con medidas de seguridad para que el organismo sufriera lo menos posible al momento de realizar la amputación. Lo primero que se hizo antes de pasar a la amputación fue colocar a los organismos en una caja Petri con hielo para bajar el metabolismo del individuo y evitar movimientos bruscos al momento de amputar. En la misma caja Petri se agregó la anestesia: 0,3% de MS-222 (Metanosulfonato de tricaina $C_{10}H_{15}NO_5S$), para minimizar el dolor al espécimen. El corte se hizo de una manera perpendicular al eje próximo-distal de la extremidad con la utilización de un bisturí (Figura 2A). Después de hacer la amputación se administró un antibiótico y un antiséptico (gentamicina en agua, 1,3 mg/L y azul de metileno, 4 mg/L) (19) a los cinco acuarios, los cuales se combinan con el agua para evitar infección en el organismo, posteriormente se dejó en reposo a los individuos tres días para permitir que pierdan el estrés obtenido por el daño al que fueron sometidos.

Tratamientos

Luego de la etapa de amputación se inyectaron diferentes tratamientos a cada grupo (Figura 2B). En el grupo 1 se realizó una inyección de suero fetal bovino (SFB) (0,04 ml) (Merck, 500 ml), en el grupo 2 una inyección de producto comercial con aminoácidos (AA) (0,04 ml) (Amino, 1L), en el grupo 3 una inyección de solución fisiológica (SF) (0,04 ml) (Pisa, Cloruro de sodio 0.9 g, 500 ml), en el grupo 4 se realizó una estimulación mecánica (EM) (pinchazo con aguja, simulación de inyección) y en el grupo 5 no se aplicó ningún tipo de

estimulación (C). Las aplicaciones de los tratamientos se realizaron tres veces a la semana (lunes, martes, miércoles) del 28 de septiembre hasta el 14 de diciembre de 2015, siendo un total de 78 días, de los cuales 34 fueron de tratamiento.

Análisis morfométricos

Luego de los dos meses y medio, periodo en que la espícula ya había crecido (Figura 2C), se continuó con análisis morfométricos de las espículas en cada individuo. Para evaluar cada organismo se utilizó un estereoscopio con cámara para fotografiar las espículas, las cuales posteriormente se midieron mediante el programa ImageJ (National Institutes of Health, Estados Unidos); para llevar a cabo la medición de la longitud se tomó en cuenta la espícula desde la región proximal de la tibia-peroné (zeugopodio), hasta la parte más distal de la estructura, en el caso del ancho se midió justamente

donde comienza a regenerar la espícula (región proximal del corte) (Figura 2D).

Análisis estadísticos

Una vez obtenidos nuestros datos, se realizó una prueba de Kruskal-Wallis (MedCalc versión 13.0.6.0, 2014). Igualmente se realizó un análisis estadístico mediante las pruebas de coeficiente de correlación de Pearson, Kendall y Spearman, para conocer si existe una relación entre la longitud y el ancho de las espículas de toda la población experimental (PASW Statistics 18 versión 18.0.0, 2009) (32).

Además de los análisis morfométricos, se midió el índice de mortalidad por grupo (SFB, AA, SF, EM y C) en porcentajes. Para este análisis se consideraron aquellos individuos que perecieron durante la etapa experimental (desde la amputación hasta el último día de aplicación de los tratamientos).

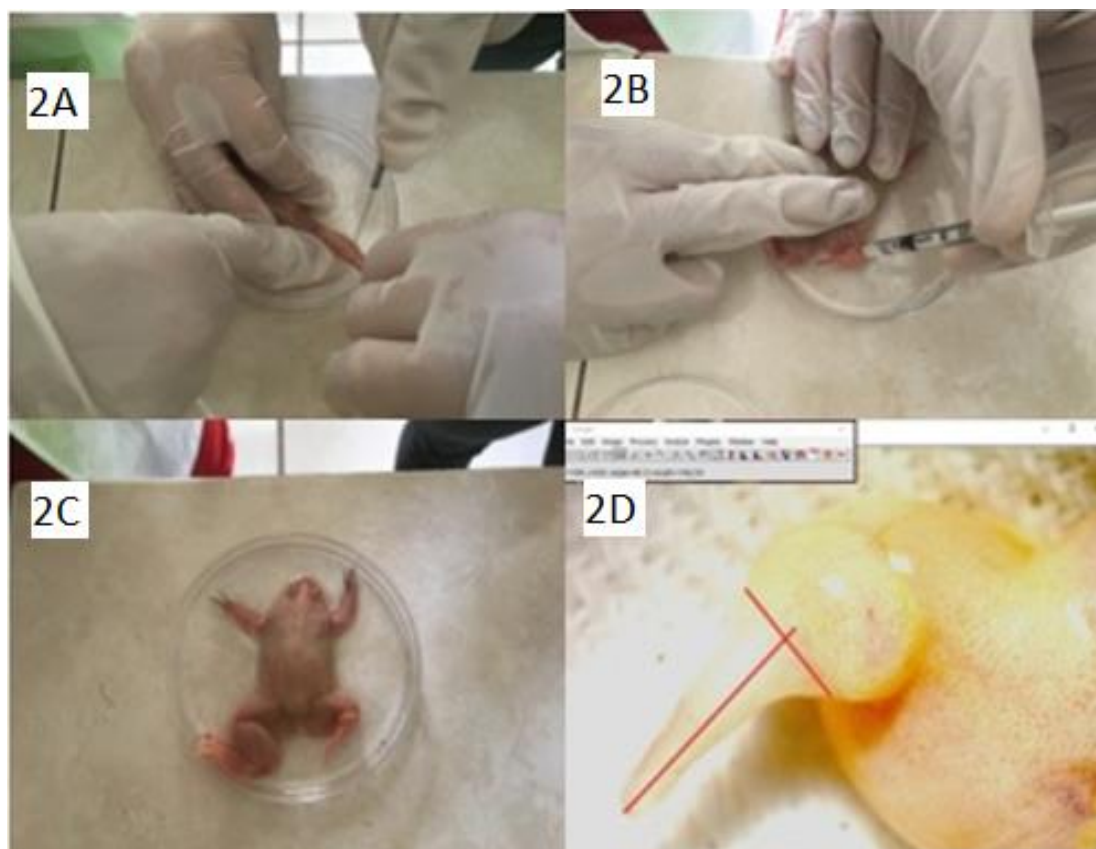


Figura 2. A) Amputación de la extremidad posterior derecha. B) Aplicación de tratamientos por inyección. C) Espícula visible D) Morfometría de la espícula

RESULTADOS

Se examinaron los efectos que tienen los aminoácidos, el suero fetal bovino, la solución fisiológica y la estimulación mecánica en la regeneración normal de *X. laevis*, estadio 66. Después de la amputación, los individuos tardaron aproximadamente de tres a cuatro horas en recubrir la herida de tejido epitelial, la cicatrización de la herida se dio adecuadamente. En segunda instancia se observó un comportamiento adaptativo a la carencia de la extremidad, ya que la funcionalidad normal del organismo fue limitada en algunos aspectos. Una vez que se comenzó con los tratamientos de aminoácidos y suero fetal bovino, los organismos respondieron adecuadamente y no mostraron ningún efecto negativo. Después de los primeros dos a tres días de inyección de aminoácidos se observó que los individuos de este grupo presentaron una cicatrización más rápida que los otros grupos, consiguiendo en menor tiempo la cicatrización total. En el cuarto día los individuos de cada grupo comenzaron a formar su blastema adecuadamente. Adicionalmente se observó que con el paso de los días el blastema se diferenciaba cada vez más. Al comienzo de la tercera semana se observó que era evidente que el crecimiento de la espícula era mucho más rápido en el tratamiento de AA, seguido del SF. Posteriormente en la sexta semana los tratamientos restantes empezaron a igualar el crecimiento de la espícula presente en los tratamientos con AA y SF.

El primer factor que se evaluó fue la longitud y ancho de cada espícula en el organismo. Como se mencionó anteriormente, se observó que las espículas presentadas en los organismos del tratamiento de AA tuvieron un crecimiento más rápido en su longitud, y en el caso de SF un crecimiento mayor en el ancho de la espícula dentro de las primeras semanas, aunque tiempo después los demás tratamientos igualaron su crecimiento con el grupo AA (Figura 3).

Una vez teniendo los datos morfométricos se aplicó una prueba estadística, lo que arrojó que no existe diferencia significativa en los tratamientos en cuanto a la longitud de la espícula ($t= 2,19$, g.l.= 4, $p=0,699$). En el caso del ancho de la espícula, la prueba estadística arrojó que no existe diferencia significativa en los tratamientos ($t=2,55$, g.l.= 4, $p=0,634$).

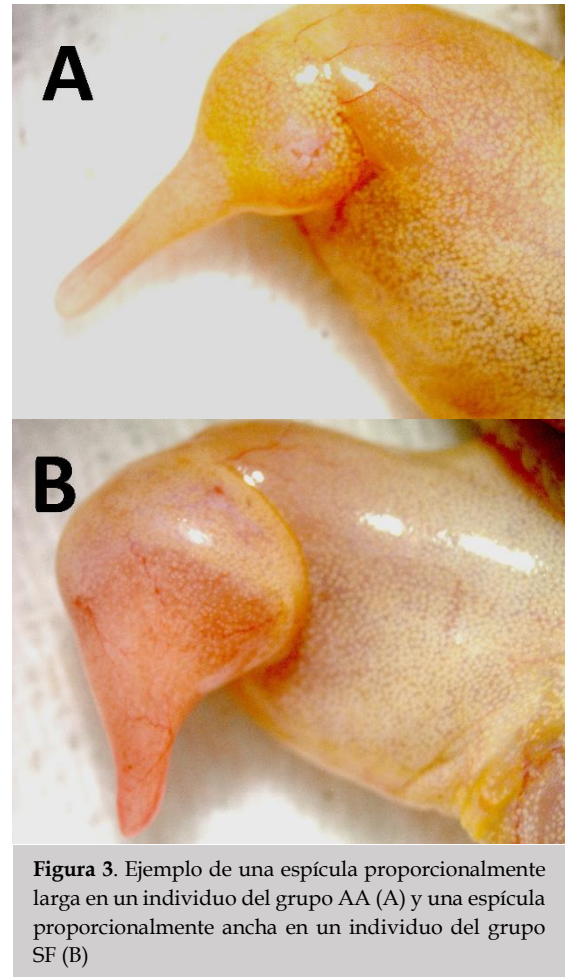


Figura 3. Ejemplo de una espícula proporcionalmente larga en un individuo del grupo AA (A) y una espícula proporcionalmente ancha en un individuo del grupo SF (B)

En segunda instancia se realizó un análisis del coeficiente de correlación de Pearson, lo que arrojó que la correlación entre lo largo de la espícula y el ancho de la misma es negativa baja ($r=0,176$), con una significancia de $p=0,399$ (Tabla 1, Figuras 4 y 5).

Por otro lado, los Coeficientes de correlación no paramétricos de Spearman y Kendall muestran valores de 0,170 y 0,127 respectivamente, (ambas negativas bajas) en cuanto a la longitud y anchura de la espícula, con significancias de $p=0,417$ y $p=0,375$, respectivamente (Tabla 2).

| Correlaciones | | Largo | Ancho |
|---------------|------------------------|-------|-------|
| Largo | Correlación de Pearson | 1 | .176 |
| | Sig. (bilateral) | | .399 |
| | N | 25 | 25 |
| Ancho | Correlación de Pearson | .176 | 1 |
| | Sig. (bilateral) | .399 | |
| | N | 25 | 25 |

Tabla 1. Datos estadísticos del coeficiente de correlación de Pearson entre la longitud y ancho de la espícula.

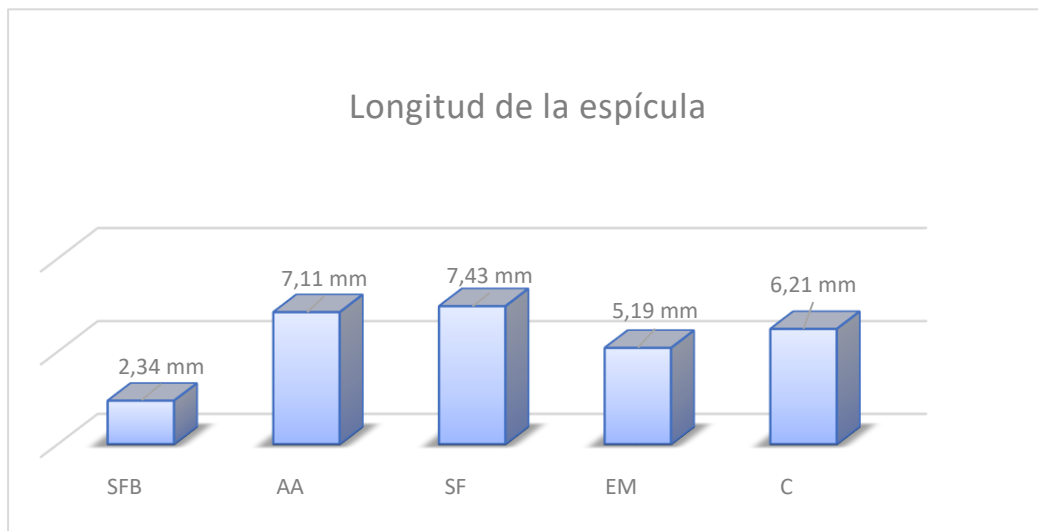


Figura 4. Longitud de la espícula en cada tratamiento.

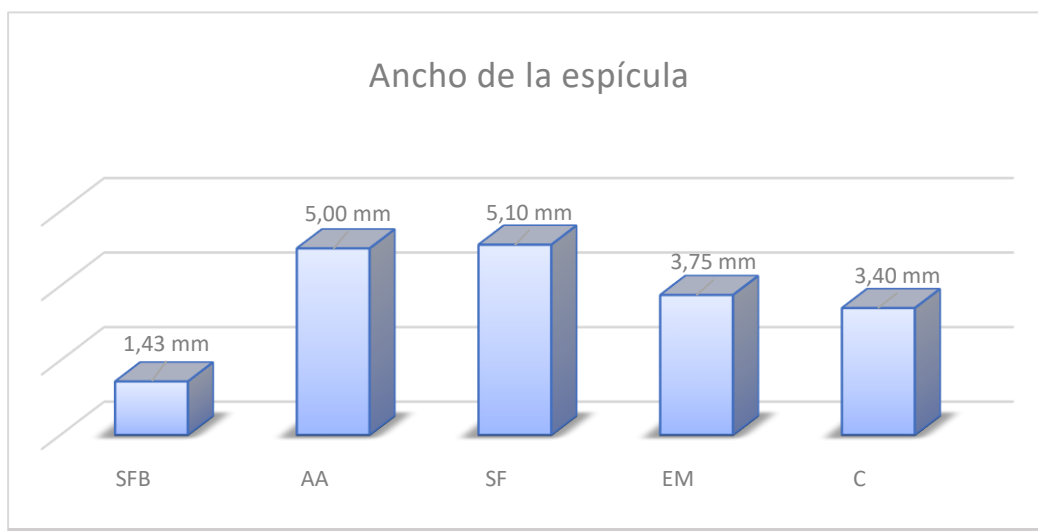


Figura 5. Ancho de la espícula en cada tratamiento.

| Correlaciones | | | Largo | Ancho |
|------------------|-------|-----------------------------|-------|-------|
| Tau_b de Kendall | Largo | Coefficiente de correlación | 1.000 | .127 |
| | | Sig. (bilateral) | . | .375 |
| | | N | 25 | 25 |
| | Ancho | Coefficiente de correlación | .127 | 1.000 |
| | | Sig. (bilateral) | .375 | . |
| | | N | 25 | 25 |
| Rho de Spearman | Largo | Coefficiente de correlación | 1.000 | .170 |
| | | Sig. (bilateral) | . | .417 |
| | | N | 25 | 25 |
| | Ancho | Coefficiente de correlación | .170 | 1.000 |
| | | Sig. (bilateral) | .417 | . |
| | | N | 25 | 25 |

Tabla 2. Datos estadísticos de Coeficientes de correlación no paramétricos de Spearman y Kendall entre el largo y ancho de la espícula.

Otro factor importante evaluado en este trabajo fue la mortalidad de los individuos en cada uno de los tratamientos. La primera fase del análisis de mortalidad fue días después de la amputación donde evaluamos la capacidad que presentaban los organismos para adaptarse al trauma sometido, en donde observamos que la mayoría de los individuos tiene una buena adaptación a este tipo de situaciones, por lo cual solo se encontraron dos individuos muertos en el periodo de cicatrización de la herida correspondiente a 3 días. Posteriormente, en la segunda fase del análisis de mortalidad, la cual se evaluó durante un periodo de 78 días, al mismo tiempo que se realizaban los tratamientos mencionados anteriormente, se observó cómo existió un declive en el número de especímenes en algunos tratamientos.

El tratamiento con un mayor número de muertes fue SFB y en el que no se registró ninguna muerte fue el grupo AA (Tabla 3).

| Tratamientos | SFB | AA | SF | EM | C |
|-----------------|-----|----|----|------|------|
| % de mortalidad | 75 | 0 | 25 | 37.5 | 37.5 |

Tabla 3. Mortalidad de cada tratamiento en porcentajes.

DISCUSIÓN

Se evaluó la capacidad de regeneración de extremidades de *Xenopus laevis* a tratamientos de

aminoácidos y suero fetal bovino. Se seleccionaron los anuros en lugar de urodelos, por las capacidades de regeneración que presentan. En el caso de los urodelos, existen organismos que presentan una regeneración completa en su etapa juvenil y adulta, mientras que algunos anuros presentan una capacidad de regeneración completa en etapas juveniles e incompletas en estado adulto (1,2,3). Esta característica presente en anuros es importante para este trabajo, porque al estar limitada la regeneración dependiendo directamente de la etapa de desarrollo, se logra observar que tanta influencia tienen los aminoácidos y suero fetal bovino en la regeneración, en etapas donde la capacidad de regeneración disminuye considerablemente.

Xenopus laevis fue seleccionada ya que después del estadio 53 y 54, su capacidad regenerativa disminuye (20), y en el presente trabajo se evaluó en el estadio 66, un estadio posterior a los mencionados anteriormente, por lo que la capacidad de regeneración es aún menor y permitiría observar de mejor manera la influencia de cada tratamiento.

Se seleccionó el corte en la región proximal de la tibia-peroné de la extremidad posterior, porque se sabe que las extremidades anteriores son de vital importancia para la especie *X. laevis*, ya que las utiliza para alimentarse y el amplexo, sin mencionar que también les ayuda a tener una buena movilidad, al contrario de sus extremidades posteriores que son utilizadas principalmente para movimiento, por lo cual amputar su extremidad posterior intervendría de una manera menor en sus actividades. Lo mencionado anteriormente coincide con lo observado por Tassava (17), respecto a la importancia que tienen las extremidades anteriores para el individuo.

Luego del corte se observó como el tratamiento de aminoácidos logro una mejor cicatrización y una velocidad de regeneración más rápida que suero fetal bovino, solución fisiológica, estimulación mecánica y control, aunque tiempo después estos mismos tratamientos igualaron la regeneración obtenida en

aminoácidos. Aguillón-Gutiérrez (22,23) menciona que proteínas biorreguladoras aisladas de suero y hueso de mamíferos, mejoraron el proceso regenerativo en *X. laevis in vivo*, pero también *in vitro*. El corte en el presente trabajo se hizo en la región proximal de la tibia-peroné de la extremidad, porque se sabe que la habilidad de *X. laevis* de regenerar depende primordialmente del nivel de amputación, mientras más distal sea la amputación, mejor se dará el proceso de regeneración (17,7), con esto se logró observar que tanta influencia tenían los tratamientos (aminoácidos, suero fetal bovino, solución fisiológica y estimulación mecánica) en la regeneración. Debido a que el corte está en la región zeugopodio, se piensa que influyó de una manera negativa en la regeneración de la extremidad, por el nivel de amputación, ya que la región en donde se amputó contiene la articulación de la rodilla, una estructura más compleja que requiere una buena capacidad regenerativa, esto tiene cierta coincidencia con lo mencionado por Aguillón-Gutiérrez (21,22), el cual menciona que los biorreguladores funcionan mejor cuando el corte es en el área proximal del fémur, ya que cuando la amputación es en partes distales los biorreguladores no tienen un efecto importante. Sin embargo otro punto a considerar son las dosis administradas, ya que las dosis que se manejaron en este trabajo dieron algunos resultados positivos en cuanto a la regeneración en las primeras etapas de este proceso con una dosis de 0.04 ml, esto es importante mencionarlo debido a que Krasnov *et al.* (23), reportan que los biorreguladores obtenidos del suero sanguíneo de mamíferos fueron más efectivos al aplicarlos en dosis bajas, mientras que los biorreguladores extraídos de hueso de mamífero resultaron con mejor efecto en la regeneración al utilizarlos en dosis muy pequeñas. Por esta razón se piensa que, al utilizar diferentes dosis de nuestro tratamiento de aminoácidos, se podría aumentar la capacidad o eficacia del proceso regenerativo en *X. laevis* por lo que se planea realizar estudios referentes a este tema.

Cabe destacar que se obtuvo la regeneración de una espícula en todos los organismos a pesar de que la amputación fue en la región zeugopodio de la extremidad, y se sabe que esto disminuye considerablemente la capacidad de regeneración (1,2,3).

La utilización del producto con aminoácidos se basó en el hecho de que aporta aminoácidos esenciales y no esenciales, las cuales ayudan en variedad de funciones en el individuo, algunos ejemplos interesantes son la regeneración de musculo, hueso y nervios. Por otro lado, también contiene vitamina A (165,00 UI) y el ácido retinoico es un metabolito de esta vitamina, esto coincide con la investigación de Tanaka y Gann (1995) (11), que utilizaron perlas empapadas de ácido retinoico para promover el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), con lo que obtuvieron que FGF es importante en la iniciación de brotes en las extremidades. Gilbert (12), menciona que el ácido retinoico juega un papel importante en la desdiferenciación de células para formar el blastema de regeneración y en los procesos de re-especificación. El segundo tratamiento fue SFB debido a que este contiene una cantidad considerable de proteínas y vitamina A, y como se mencionó anteriormente las proteínas y el ácido retinoico (metabolito de la vitamina A) ayudan a la regeneración (11,12,24). Otro factor es que el SFB es un medio ideal para el crecimiento de células *in vitro* (24,25,26), por esta razón se esperaba observar si la reproducción de células se podía duplicar *in vivo* con la aplicación de este producto. Se ha comprobado que los biorreguladores extraídos a partir de tejido ocular bovino participan activamente favoreciendo la regeneración de tejidos oculares en anfibios (26), además se seleccionó suero fetal bovino, ya que a diferencia del suero de adulto, el suero fetal bovino contiene mayores concentraciones de factores de crecimiento (24). Otro producto seleccionado fue la solución fisiológica como un control, debido a que se quería evaluar si el organismo regeneraba por la influencia de los componentes de los productos (SFB, AA) y no por estimulación de una sustancia extraña al

interior, aunque cabe destacar que se observó que el paso de esta sustancia al individuo estimuló la regeneración en cuanto al ancho de la espícula en las primeras semanas, por esta razón sería importante continuar la investigación con el uso de solución fisiológica (cloruro de sodio - NaCl, 0.9 g). En el caso de la estimulación mecánica (EM), esta se utilizó debido a que se conoce que ayuda en la regeneración en algunos organismos biológicos (28,29,30,31) por ejemplo Cezar *et al.* (29) mencionan que la estimulación directa del tejido muscular incrementa el transporte de oxígeno, nutrientes, fluidos y la eliminación de desechos desde el sitio de la lesión, que son todos los componentes vitales de la salud y la reparación del músculo, de esta forma se lograría observar que realmente la regeneración fue estimulada por los componentes de nuestros productos (AA, SFB) y no por la estimulación mecánica (pinchazo) a que fue sometido cada individuo al inyectar los tratamientos.

A pesar de que dentro de las primeras semanas AA tuvo un buen desempeño en cuanto al crecimiento de la espícula respecto a su longitud y SF en cuanto a su ancho, los análisis estadísticos arrojaron que no existe diferencia significativa en cuanto a la longitud y el ancho de la espícula en cada uno de los tratamientos.

Por otro lado en los análisis de mortalidad se obtuvo que el tratamiento con un mayor número de muertes fue suero fetal bovino (75%), esto se atribuye a que el sistema inmune del organismo actuó ante la posible amenaza de los componentes del producto creando reacciones negativas en el blastema, esto se apoya con lo mencionado por Mescher *et al.* (31), que la inmunidad cutánea es la principal barrera contra la mayoría de los patógenos ambientales e incluye células importantes para la reparación de lesiones físicas. Además, el tratamiento con aminoácidos no presentó mortalidad después de hacer la amputación, este dato es particularmente interesante, debido a que ayudo en la regeneración en las primeras semanas y a una mejor cicatrización, con lo que pensamos que los aminoácidos

pueden ayudar a los organismos en el proceso regenerativo y ante un estrés (amputación), lo que crea nuevas áreas de estudio.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se evaluó la influencia que tiene el suero fetal bovino, los aminoácidos, la solución fisiológica y la estimulación mecánica en la regeneración de extremidades posteriores en *X. laevis*, con lo que se obtuvo que no existe una diferencia significativa en los tratamientos en cuanto a la longitud de la espícula ($t=2,19$, g.l.= 4, $p=0,699$). En el caso del ancho de la espícula, la prueba estadística arrojó que no existe diferencia significativa en cada uno de los tratamientos ($t=2,55$, g.l.= 4, $p=0,634$). Probablemente fue más importante el sitio de corte (región zeugopodio) que la influencia de los tratamientos, aunque cabe destacar que en las primeras semanas de nuestro tratamiento con aminoácidos el efecto fue positivo permitiendo una mejor cicatrización y mejor regeneración de la espícula. Por otro lado el tratamiento con solución fisiológica arrojó resultados inesperados respecto a la regeneración del ancho de la espícula, dentro de las primeras semanas, por esta razón sería importante continuar la investigación con el uso de la solución fisiológica (cloruro de sodio - NaCl) y aminoácidos en diferentes etapas de desarrollo, ya que al cortar la extremidad en el estadio 66 se obtuvieron resultados positivos en la primeras semanas, por lo que se piensa que en etapas de desarrollo más tempranas los aminoácidos y la solución fisiológica podrían estimular la regeneración de extremidades. Finalmente, en los análisis de mortalidad se obtuvo que los aminoácidos tuvieron un declive del 0%, con lo que pensamos que los aminoácidos pueden ayudar a los organismos en el proceso regenerativo y ante un estrés (amputación), al contrario de suero fetal bovino el cual obtuvo un alto índice de muertes (75%), esto se atribuye a que el sistema inmune del organismo actuó ante la posible amenaza de los componentes del producto creando reacciones negativas en el blastema.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Morgan TH (1901) Regeneration. The Macmillan Company; Londres, Inglaterra.
2. Balinsky BI (1978) Introducción a la embriología. Omega, Barcelona, España.
3. Durá RMF (1988) Fundamentos de embriología y fisiología de la reproducción. UNAM, Ciudad de México, México.
4. Durán I (2009) Modelos de Regeneración. Encuent Biol 2(122):1-2.
5. Goode RP (1967) The regeneration of limbs in adult anurans. Embryol Experimental Morphol 18(2):259-67.
6. Bryant SV, Endo T, Gardiner DM (2002) Vertebrate limb regeneration and the origin of limb stem cells. Int J Dev Biol 46:887-896.
7. Mescher AL, Neff AW (2006) Limb Regeneration in Amphibians: Immunological Considerations. Sci World J 6(S1):1-11.
8. Brockes JP (1997) Amphibian Limb Regeneration: Rebuilding a Complex Structure. Science 276:81-87.
9. Yokoyama H., Ide H., Tamura K (2001) FGF-10 stimulates limb regeneration ability in *X. laevis*. Dev Biol 233:72-79.
10. Mullen LM, Bryant SV, Torok MA, Blumber B, Gardiner DM (1996) Nerve dependency of Regeneration: The role of Distal-Less and FGF signaling in amphibian limb regeneration. Dev 122:3487-3497.
11. Tanaka EM, Gann AFA (1995) The budding role of FGF. Current Biol 5(6):594-597.
12. Gilbert SF (2000) Developmental Biology. 6 ed. Sinauer, Massachusetts, Estados Unidos
13. Kiffmeyer WR, Tomusk EV, Mescher AL (1991) Axonal transport and release of transferrin in nerves of regenerating amphibian limbs. Dev Biol 147:39-402.
14. Mescher AL, Connell E, Hsu C, Patel C, Overton B (1997) Transferrin is necessary and sufficient for the neural effect on growth in amphibian limb regeneration blastemas. Dev 39:677-684.
15. Xenbase (2015) Introduction to *Xenopus*, the frog model. <http://www.xenbase.org/anatomy/intro.do> [consulta: 2018].
16. Nieuwkoop PD, Faber J (1956) Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin): A systematical and chronological survey of the development from the fertilized egg till the end of metamorphosis. North-Holland, Amsterdam.
17. Tassava RA (2004) Forelimb spike regeneration in *Xenopus laevis*: Testing for adaptiveness. J Exp Zool 301A:150-159.
18. Detlaf TA, Rudneva TB (1975) Rana africana de uñas *Xenopus laevis* Daudin. En: Modelos en biología del desarrollo, Astaurov BI (Ed) Nauka. (En ruso).
19. Carpenter JW (2006) Formulario de animales exóticos. 3ª edición. Intermédica, Buenos Aires, Argentina.
20. Dent JN (1962) Limb regeneration in larvae and metamorphosing individuals of South African clawed toad. J Morphol 110:61-77.
21. Aguillón-Gutiérrez DR (2011) Influencia de las proteínas reguladoras en la regeneración de extremidades de anfibios. LAP. (En ruso).
22. Aguillón-Gutiérrez DR (2015) Investigación sobre la influencia de bioreguladores endógenos aislados de suero sanguíneo y huesos de mamíferos, en la regeneración de extremidades de anfibios. Zhiv Biokos Sist (Sistemas Vivos y Bioinertes) 11. (En ruso).
23. Krasnov MS, Ribakova EY, Aguillón-Gutiérrez DR, Burlakova OV, Yamskova VP, Yamskov IA (2009) Study action of bioregulators from mammal serum and bone on limb amphibian regeneration *in vivo* and *in vitro*. International Congress "Low and superlow fields and radiations in biology and medicine". Saint-Petersburg, Russia.
24. Brunner D, Frank J, Appl H, Schoff H, Pfaller W, Gstraunthaler G (2010) Serum-free Cell Culture: The Serum-free Media Interactive Online Database. Altex 27:53-62
25. Castaño ME (2012) Cultivos celulares. Editorial Biogenesis, Medellín, Colombia.
26. Krasnov MS (2003) Proteínas adhesivas de las células superficiales de la retina ocular de vertebrados: propiedades y efectos biológicos. Tesis de doctorado. Instituto de Biología del Desarrollo. Academia Rusa de Ciencias. (En ruso).
27. Muller TL, Mullert VN, Reginelli A, Taylor G, Anderson R, Muneoka K (1999) Regeneration in higher vertebrates: Limb buds and digit tips. Sem Cell Dev Biol, 10:405-413.
28. Carter DR, Beaupré GS, Giori NJ, Helms JA (1998) Mechanobiology of skeletal regeneration. Clin Orthop Rel Res 355:S41-S55.
29. Cezar CA, Roche ET, Vandeburgh HH, Duda GN, Walsh CJ, Mooney DJ (2016) Biologic-free mechanically induced muscle regeneration. PNAS 113:1534-1539.
30. Hadlock T, Lindsay R, Edwards C, Smitson C, Weinberg J, Knox C, Heaton JT (2010) The effect of electrical and mechanical stimulation on the regenerating rodent facial nerve. Laryng 6:1094-102.
31. Mescher AL, Wolf WL, Moseman EA, Hartaman B, Harrison C, Nguyen E, Neff AW (2007) Cells of cutaneous immunity in *Xenopus*: Studies during larval development and limb regeneration. Dev Comp Immunol 31:383-393.
32. Zar JH (2009) Biostatistical analysis. Prentice Hall International, 5ta edición, Londres, Inglaterra.

Recibido enero 1, 2020 - Aceptado agosto 4, 2020

* Correspondencia de autor: David Ramiro Aguillón-Gutiérrez. Laboratorio de Bioindicadores, Centro de Investigación y Jardín Etnobiológico, Universidad Autónoma de Coahuila. Dr. Francisco González 37, Viesca, Coahuila, México. C.P. 27480. E-mail: david_aguillon@uadec.edu.mx

NUEVOS CARACTERES PARA DIFERENCIAR LAS SEMILLAS DE *DATURA FEROX* Y *D. STRAMONIUM* (SOLANACEAE)

NEW TRAITS TO DIFFERENTIATE *DATURA FEROX* AND *D. STRAMONIUM* SEEDS (SOLANACEAE)

Ana María ARAMBARRI¹; Marcelo Paulo HERNÁNDEZ^{1,2}

¹Área de Botánica, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Calle 60 y 119 (1900) La Plata, Argentina.

e-mail: anaramba@yahoo.com.ar; anaramba@gmail.com

RESUMEN.

En la Argentina crecen *Datura ferox* L., *D. inoxia* Mill. y *D. stramonium* L. Sin embargo, solo *Datura ferox* y *D. stramonium* son malezas tóxicas y suelen impurificar partidas de diásporas y semillas usadas como alimento, como maíz, girasol, sorgo y soja. Una correcta identificación de estas dos especies es de gran importancia, tanto por la pureza de los granos cosechados en el país, como los de intercambio. Hasta ahora, las semillas de estas dos "daturas" se distinguen por el tamaño, pero este carácter por sí solo es insuficiente, por la variabilidad existente en las muestras. Los objetivos del presente estudio fueron: analizar la estructura del tegumento seminal y establecer el grado de significancia de las diferencias halladas. Para ello, las muestras fueron procesadas mediante técnicas estándares para microscopía óptica. Los principales rasgos de diferenciación fueron: en *Datura ferox* las esclereidas de la exotesta presentaron longitud y latitud significativamente mayores que en *D. stramonium* y las mismas células en vista superficial, mostraron paredes más gruesas, con poco lóbulos, redondeados, con seno menos profundo que en *D. stramonium*. Por el contrario, el tamaño de las células de la endotesta fue significativamente mayor en *D. stramonium* que en *D. ferox*.

Palabras clave: *Datura*, esclereidas, maleza, testa, tóxica.

ABSTRACT.

Three species of *Datura* grow in Argentina: *D. ferox* L., *D. inoxia* Mill., and *D. stramonium* L. However, only *Datura ferox* and *D. stramonium* are toxic weeds and usually contaminate seed lots used as food, such as corn, sunflower, sorghum and soybeans. A correct identification of these two species is of great importance, both for the purity of the grains harvested in the country and those of interchange. At the present, the differentiation of the two species of "daturas" is made by using the seed size, however, this feature alone is not enough, because of the variability existent in different samples. Therefore, the objectives were: to deepen the knowledge of the seminal tegument structure, and to establish the significance degree from the differences found. To perform the anatomy study, conventional microscopy techniques were applied. The main features of differentiation were: the sclereids of exotesta in *D. ferox* presented length and width significantly higher than *D. stramonium*, and also, in surface view showed thicker cell walls with few and rounded lobes and sinus less deep than *D. stramonium*. For the contrary, the endotesta cell size was significantly higher than in *D. stramonium* than in *D. ferox*.

Key words: *Datura*, sclereids, testa, toxic, weed.

INTRODUCCIÓN

El género *Datura* L. (Solanaceae) es cosmopolita, crece en todo el planeta, excepto en las zonas polares. En la Argentina está representado por tres especies: *D. ferox* L. "chamico", "datura"; *D. inoxia* Mill. "metel", "trompetilla" y *D. stramonium* L. "estramonio"; "chamico", "datura". *Datura ferox* procede de Asia y está naturalizada en América (1-4). En Argentina crece desde Jujuy, Formosa y Misiones por todo el norte y centro-este del país, llegando en el sur hasta Chubut. Se puede hallar hasta 3500 m s.n.m. (5). Es una planta ruderal de zonas húmedas y suelos fértiles y maleza en cultivos de maíz, papa, girasol, sorgo y tabaco (1-3). En 1963, fue declarada plaga de la agricultura por Decreto-Ley N° 6704 (6). *Datura inoxia* procede de Centroamérica, habita regiones calurosas del país y carece de importancia por ser poco frecuente (3). Se la ha encontrado en las provincias de Catamarca, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, La Rioja, Salta, San Luis y Tucumán, creciendo hasta los 1000 m s.n.m. (5). Es una planta ruderal, frecuente en márgenes de ríos y arroyos. *Datura stramonium* también es originaria de Centroamérica y se encuentra naturalizada en América del norte, Asia, África, Australia, Macaronesia, Mozambique, España y Portugal (4). En Argentina, crece en las provincias de Buenos Aires, Corrientes, Neuquén, Salta, San Juan, se la encuentra hasta los 1500 m s.n.m. (5). Es una planta ruderal y nitrófila que crece preferentemente en suelos arenosos (1, 4, 7). Es una maleza con características morfológicas y químicas similares a *D. ferox*. Las especies de *Datura* tienen todos sus órganos tóxicos, esto se debe a que contienen alcaloides tropánicos (hiosciamina, atropina, escopolamina) (8). En la antigüedad, las especies de *Datura* se han usado para prácticas adivinatorias de chamanes o fumando sus hojas como alucinógenos en rituales de distintas culturas de México, Sudamérica, India y África (4). *Datura stramonium* figura en la Farmacopea Argentina de 1928, donde indican el uso de las hojas como "aceite de beleño compuesto" (9),

que posee acción parasimpaticolítica y antiespasmódica (4). Marzocca (1), menciona su uso como narcótico y calmante. En la Argentina, frecuentemente las semillas de *D. ferox* y también de *D. stramonium* aparecen mezcladas en alimentos, tanto para los animales como de uso humano. Los bovinos, equinos y porcinos intoxicados presentan síntomas neurológicos y digestivos. En los humanos, si bien las intoxicaciones no son usuales, suceden por accidente o consumo voluntario (8). Al respecto, Pérez Jara *et al.* (10), informan que la ingesta de infusiones de *D. stramonium* para controlar el catarro, ha producido un síndrome anticolinérgico agudo e intoxicación con pérdida de fuerzas, temblor e incapacidad de movilidad sin pérdida del conocimiento. Los autores mencionan también que las dosis menores a 0,5 mg ya provocan sequedad en la boca y, al aumentar la dosis, aparecen síntomas cardíacos y respiratorios, llegando con 10 mg o más a sufrir agitación, alucinaciones hasta el delirio y entrar en coma. Si bien, las especies de "daturas" pueden diferenciarse al estado vegetativo, frecuentemente es necesario diferenciarlas al estado de semilla pues, como se ha expresado, aparecen contaminando muestras de diásporas y semillas de cereales y oleaginosas (3). *Datura inoxia* no se ha hallado impurificando los cultivos y, sus semillas se diferencian fácilmente porque son fuertemente aplanadas y presentan un borde dorsal notablemente ondulado (4). Por el contrario, las semillas arriñonadas y lateralmente comprimidas, con hilo triangular localizado sobre el borde ventral, con superficie foveolada y color castaño oscuro hasta negro de *D. ferox* y *D. stramonium* son muy semejantes entre sí (Fig. 1). Diversos autores (4, 11-15), caracterizaron morfológicamente las semillas, citando como única diferencia entre ellas, el tamaño que oscila: 3,9-4,8 mm long. x 3,0-3,9 mm lat., en *D. ferox* y 3,1-4,0 mm long. x 2,8-3,3 mm lat., en *D. stramonium*. Sin embargo, se ha observado que el tamaño es un carácter variable, dependiendo de diversos factores como el lugar de

procedencia de la muestra, el grado de desarrollo alcanzado y el grado de madurez de la semilla. Esta variabilidad, produce una superposición de valores de longitud y latitud de las semillas que provocan dudas en la identificación.

Internamente, las semillas de la familia Solanaceae presentan un solo tegumento coriáceo (testa), provienen de un óvulo anátropo o hemianátropo (16). También es mencionado, para el género *Solanum*, el tipo hemicampilótrofo (17, 18). El tipo de embrión, es variable desde enano (e.g., *Nicotiana*) espatulado (e.g., *Cestrum*) hasta lineal en la mayoría de las Solanaceae. El embrión lineal presenta diferente grado de curvatura, desde ligeramente curvado hasta arrollado (e.g., *Datura*, *Lycopersicon*, *Nicandra*, *Physalis*, *Salpichroa*, *Solanum*) (19). El tamaño y forma del embrión tienen importancia a nivel de tribu y género. La tribu Datureae se caracteriza por tener embrión axial, fuertemente curvado rodeado por abundante endosperma (12, 16, 19) (Fig. 1). El endosperma es rico en proteínas y lípidos compuestos característicos de la familia, mencionado para *Datura* (9) y en especies de *Solanum* (17, 20-22). Varios trabajos describen la anatomía de los frutos y semillas de Solanaceae, *Salpichroa* (22) y especies del género *Solanum* (17, 18, 20, 21, 23, 24). Sobre la base de los trabajos previos y la problemática de obtener nuevos caracteres para diferenciar las semillas de *Datura ferox* y *D. stramonium*, se plantearon como objetivos: analizar, describir e ilustrar la estructura del tegumento seminal y buscar diferencias que puedan constituirse en una nueva herramienta a utilizar en el proceso de diferenciación de las dos "daturas".

MATERIALES Y MÉTODOS

Material estudiado

Fueron utilizadas semillas totalmente desarrolladas y maduras de ambas especies, conservadas en el Herbario de semillas de La Plata, Facultad de Agronomía (LPFAG), Área de Botánica, Facultad de Ciencias

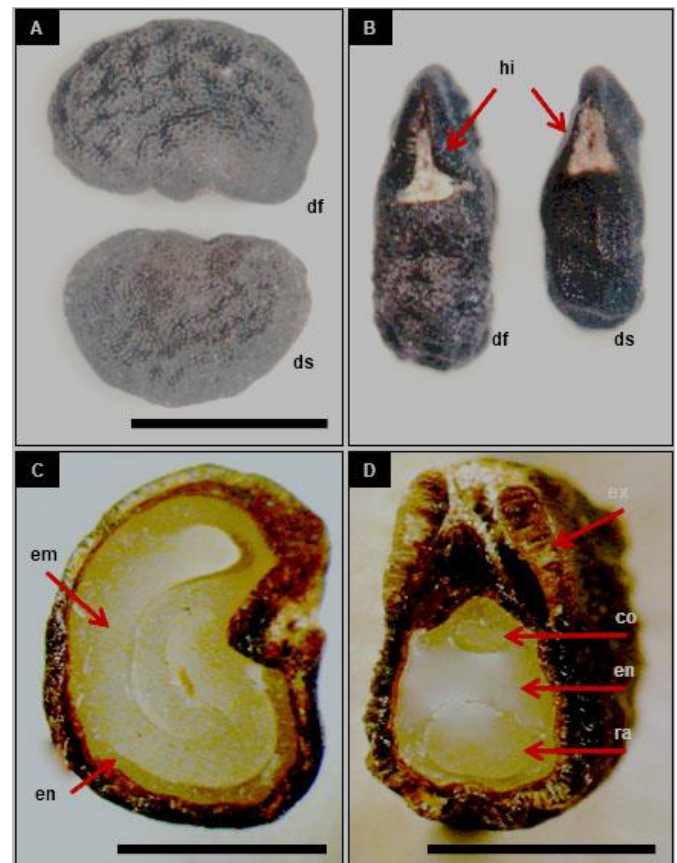


Figura 1. Morfología de las semillas de *D. ferox* y *D. stramonium*.

A: vista lateral: forma, color y superficie foveolada. B: vista hilar: hilo triangular en ambas especies. C: sección longitudinal: mostrando el endosperma que rodea al embrión axial, el cual presenta el extremo de los cotiledones dirigidos hacia afuera, alejándose de la radícula. D: sección transversal: mostrando el corte transversal de la radícula y los cotiledones, angostos, ubicados hacia el lado ventral. Escalas: A, B: 3 mm; C, D: 2 mm. Ref.: co: cotiledones; df: *D. ferox*; ds: *D. stramonium*; em: embrión; en: endosperma; ex: exotesta; hi, hilo; ra: radícula.

Agrarias y Forestales, UNLP. También fueron analizados ejemplares del Herbario de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata (LP). La nomenclatura está de acuerdo con la Flora del Cono Sur, Instituto de Botánica Darwinion, Flora del Cono Sur (25).

Datura ferox L.: ARGENTINA. Buenos Aires: Pdo. Pergamino, La Vanguardia, en cultivo de soja, 17-VII-1989, A. M. Arambarri (1807 LPFAG); Pdo. La Plata, La Plata, Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), 29-VIII-2015, S. M. Martínez Alonso (2216 LPFAG). Corrientes: Depto. Esquina, Esquina, a orillas del río Corrientes, XII-1936, A. P. Rodrigo 1008 (011592 LP).

Datura stramonium L.: ARGENTINA. **Corrientes:** Depto. Santo Tomé, Santo Tomé, 1-II-1976, *Krapovickas & Cristóbal* 29074 (LP); **San Juan:** Depto. Calingasta, Calingasta, IV-1972, *C. R. Volponi* 247 (LP). ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. **California:** Sacramento, Seed Laboratory of Food and Agriculture 5-VIII-1986, *D. Meyer* (1316 LPFAG); VIII-1988, *D. Meyer* (1539 LPFAG).

Anatomía del tegumento seminal

Para analizar las capas celulares que forman el tegumento seminal, se efectuaron cortes transversales del mismo. Se seleccionaron los cortes con el menor número de capas celulares, los que fueron montados en su estado natural y también decolorados con hipoclorito de sodio (50%), lavados y teñidos con safranina; como medio de montaje se usó gelatina-glicerina, sellando los preparados con esmalte de uñas. En estas preparaciones se analizaron los tejidos constituyentes y fue registrada la longitud de las células de la epidermis externa del tegumento seminal (esclereidas de la exotesta). El estudio, en vista superficial de la epidermis externa (exotesta) y de la epidermis interna (endotesta) del tegumento seminal, se realizó sobre material clarificado (26). En vista superficial, se midió la latitud de las células de la exotesta (tomada la distancia entre los lóbulos de las paredes anticlinal-radiales) y de la endotesta (tomada la distancia entre paredes anticlinal-radiales). Los valores de las medidas se expresaron en micrómetros (μm), sobre un promedio de más de 100 mediciones. Sobre todas las medidas registradas se aplicó el análisis estadístico para establecer el grado de significancia de las diferencias observadas. Para realizar las observaciones y mediciones se emplearon un microscopio Gemalux XSZ-H equipado con cámara Motic y software Motic Image Plus 2.0 y con el programa Image J se midieron las células, los datos se brindan en las Tablas 1 y 2.

Análisis estadístico

Sobre los parámetros evaluados – longitud de las esclereidas de la exotesta, en corte transversal del tegumento y latitud de las células de la exotesta y endotesta en vista superficial- se aplicó el análisis de la varianza (Anova). Asimismo, se realizó la prueba de Tukey de comparación múltiple de las medias para obtener grados de significancia del 5% ($P < 0.05$). Los análisis estadísticos propuestos fueron realizados con la ayuda del programa Statistica 7.0 para Windows (Figs. 3, 5).

RESULTADOS

Estructura del tegumento seminal en corte transversal

En ambas especies el tegumento seminal (testa) de una semilla madura presenta: una capa de ceras cubriendo la epidermis externa (exotesta), la cual es unistrata y está formada por células alargadas perpendicularmente a la superficie, con paredes anticlinal-radiales notablemente engrosadas y en la parte distal de las mismas, los engrosamientos a manera de “rulos” (Fig. 2A, B). Las paredes radiales están impregnadas con lignina (esclerificadas) en la mayor parte de su extensión. Sin embargo, hacia la parte media distal y hacia el interior de la célula predominan las capas de engrosamiento solo celulósicas o ligeramente lignificadas, las que se observan poco coloreadas en las preparaciones con safranina. A continuación de la exotesta, hacia el interior de la semilla, se halla la capa media formada por 2-8 capas de parénquima que contactan con la endotesta (Fig. 2A). La epidermis interna (endotesta), también es unistrata y está formada por células isodiamétricas -cuadrangulares a rectangulares en la sección transversal- con paredes levemente engrosadas, poco lignificadas, tomando coloración con la safranina (Fig. 2A, C).

| Corte transversal de la Exotesta | Especies | Longitud de las esclereidas | | | |
|----------------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | Promedio (μm) | Desviación estándar | Mínimo (μm) | Máximo (μm) |
| | <i>Datura ferox</i> | 200,42 | 17,9 | 150,47 | 237,81 |
| <i>D. stramonium</i> | 124,41 | 12,81 | 100,19 | 153,79 | |

Tabla 1. *Datura ferox* y *D. stramonium*. Tamaño de las células de la exotesta (esclereidas) en corte transversal, expresado en micrómetros (μm).

| Vista en superficie de la | Especies | Latitud de las células | | | |
|---------------------------|----------------------|----------------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | Promedio (μm) | Desviación estándar | Mínimo (μm) | Máximo (μm) |
| Exotesta | <i>Datura ferox</i> | 198,91 | 27,51 | 129,82 | 281,58 |
| | <i>D. stramonium</i> | 179,09 | 24,86 | 121,1 | 255,35 |
| Endotesta | <i>Datura ferox</i> | 2,7 | 5,09 | 19,51 | 42,89 |
| | <i>D. stramonium</i> | 34,52 | 6,09 | 23,71 | 47,85 |

Tabla 2. *Datura ferox* y *D. stramonium*. Tamaño de las células de la exotesta y de la endotesta en vista superficial, expresado en micrómetros (μm).

Las esclereidas de la exotesta en corte transversal presentaron una longitud mayor en las semillas de *D. ferox* (Fig. 2B) que en las de *D. stramonium* (Fig. 2A) (Tabla 1). El análisis estadístico de los valores de longitud de estas células indicó que la diferencia observada es significativa (Fig. 3).

Exotesta y endotesta en vista superficial

En ambas especies, las esclereidas de la exotesta vistas en superficie, son de contorno poligonal y lobuladas y las células de la endotesta son poligonales con las paredes ligeramente curvadas, engrosadas y algo lignificadas por la coloración que tomaron con la safranina, ya que dieron resultado negativo al tratarlas con Oil Red O, indicando que no las impregnan sustancias lipofílicas (Fig. 4A, B).

Las esclereidas de la exotesta presentan las paredes radiales con las capas de engrosamiento externas impregnadas con lignina y las capas internas con paredes poco impregnadas con lignina, puesto de manifiesto por la coloración con safranina; el lumen celular presenta forma estrellada (Fig. 4C, D). En la parte

distal de las paredes radiales se observan los engrosamientos notables, "rulos", de dichas paredes, con extensiones en la cara tangencial (Fig. 4E, F).

Se observó que en *D. ferox*, las esclereidas en vista superficial presentan pocos lóbulos, con senos obtusos (en U) y paredes más gruesas que aquellas de las semillas de *D. stramonium*, en la cual los lóbulos son numerosos y con senos profundos, agudos (en V o U cerrada) (Fig. 4C, D).

Las medidas de latitud de las células de la exotesta en vista superficial fueron mayores en *D. ferox* que en *D. stramonium*, mientras en la endotesta el resultado fue inverso (Tabla 2). Realizado el análisis estadístico, estas diferencias fueron significativas (Fig. 5).

Otro aspecto a considerar en la vista superficial de la cubierta seminal de las semillas de ambas *Datura*, es la presencia de ondulaciones, con áreas deprimidas (fovólas) y áreas elevadas. Internamente esto está determinado por diferente longitud de las esclereidas de la exotesta (Fig. 6A), que en superficie y con poco aumento, se manifiesta por zonas oscuras y claras (Fig. 6B). Al observar con mayor aumento las células de las

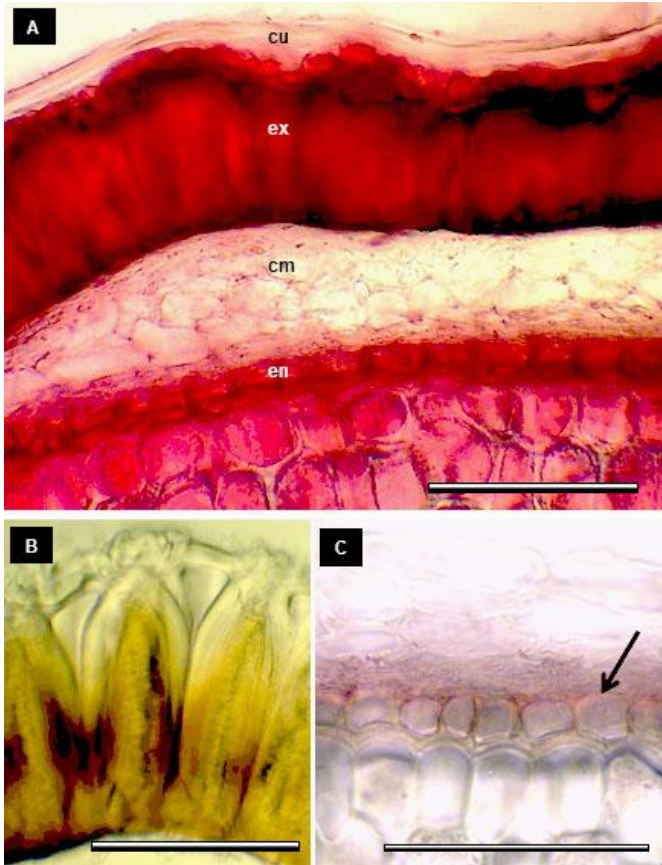


Figura 2. Estructura del tegumento seminal (testa) de *D. ferox* y *D. stramonium* en corte transversal. A. Las partes de la testa son: la cutícula cubriendo las esclereidas de la exotesta cuya parte basal está en contacto con la capa media de parénquima que termina junto a la endotesta unistrata. En la foto se observa el endosperma junto a la endotesta. B. Exotesta: detalle de las esclereidas mostrando su longitud, el engrosamiento de las paredes perpendiculares a la superficie (anticlinal-radiales) y el engrosamiento "rulos" en la parte distal de las mismas. C. Endotesta: detalle de las células cuadrangulares con paredes ligeramente engrosadas y lignificadas. Escalas: A, B: 150 μ m. C: 100 μ m. Ref.: cm: capa media; cu: cutícula; en: endotesta; ex: exotesta.

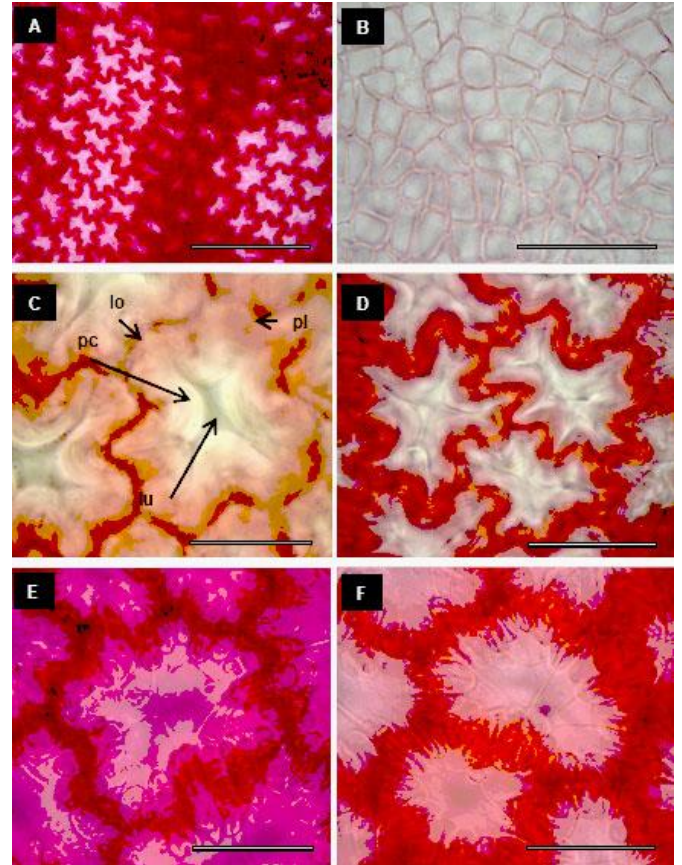
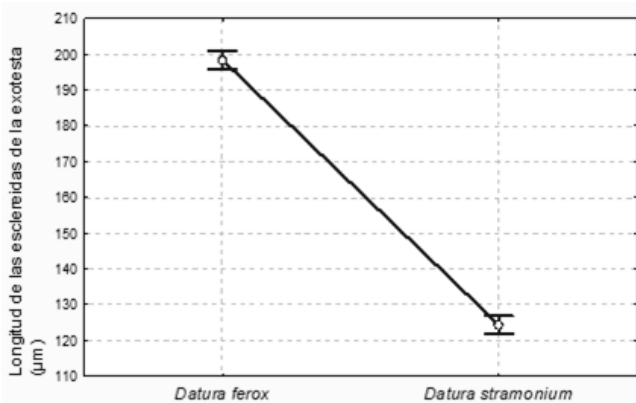


Figura 4. Exotesta y Endotesta en vista superficial. A, B. *D. stramonium*. lo: lóbulo; lu: lumen celular; pc: pared celulósica; pl: pared lignificada. A. Exotesta mostrando el contorno poligonal lobulado de las células (esclereidas). B. Endotesta mostrando las células isodiamétricas, con paredes ligeramente engrosadas y levemente lignificadas. C. *D. ferox*, células de la exotesta mostrando pocos lóbulos gruesos, senos obtusos (forma de U abierta), paredes gruesas con las capas de engrosamiento lignificadas hacia la periferia y poco o nada lignificadas hacia el lumen celular. D. *D. stramonium*, células de la exotesta mostrando numerosos lóbulos marcados con senos agudos (en V o U estrecha), las paredes engrosadas con capas de engrosamiento lignificadas hacia la periferia y poco o nada lignificadas hacia el lumen celular. E. *D. ferox*, vista de los engrosamientos distales de las paredes radiales con extensiones tangenciales. F. *D. stramonium* la misma vista que se detalló en E. Escalas: A: 400 μ m. B-F: 100 μ m



| Célula No. | Var 1 | (1) 29,725 | (2) 34,125 |
|------------|--------------------------|------------|------------|
| 1 | <i>Datura ferox</i> | | X |
| 2 | <i>Datura stramonium</i> | X | |

Figura 3. Gráfico comparativo de longitud de las esclereidas de la exotesta de *D. ferox* y *D. stramonium*. Test de Tukey. Mostrando el grado de significancia de la mayor longitud de las esclereidas de *D. ferox* respecto a la de *D. stramonium*.

zonas elevadas muestran las paredes anticlinal-radiales con sus engrosamientos, mientras que en las áreas deprimidas se observan los engrosamientos distales de las paredes radiales "rulos", con las características explicadas en los párrafos anteriores (Fig. 6C, D).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Gunn (16), señaló que en la familia Solanaceae la cubierta protectora de la semilla corresponde a un solo tegumento seminal (testa). Dottori (17) indica que el óvulo es unitegumentado. Dottori & Cosa (24); Solis *et al.* (18) en especies de *Solanum* y Wiemer *et al.* (22) en

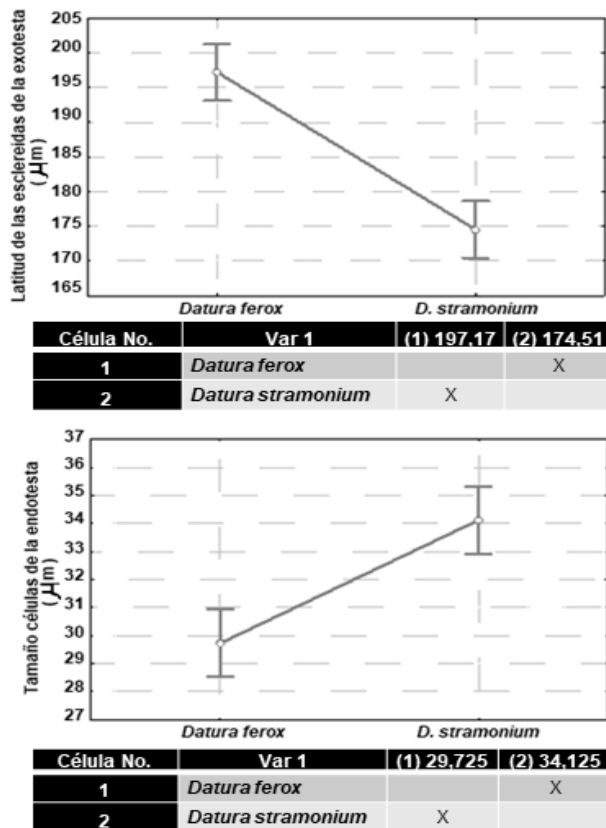


Figura 5. Gráfico comparativo de latitud de las esclereidas de la exotesta y células de la endotesta en vista superficial, de *D. ferox* y *D. stramonium*. Test de Tukey. Mostrando el grado de significancia de la mayor latitud de las esclereidas de *D. ferox* respecto a la de *D. stramonium* y el resultado inverso para las células de la endotesta.

Salpichroa origanifolia, estudiaron la formación de la semilla y describieron e ilustraron el único tegumento formado por: exotesta, capa media y endotelio. En el presente estudio hemos trabajado con semillas maduras de *Datura* y hallamos que la testa está compuesta por las mismas capas mencionadas por los investigadores mencionados, con diferencias propias a nivel de género (e.g., ausencia de pseudopelos presentes en *Salpichroa* y en la mayoría de las especies de *Solanum*); en cuanto al número de capas de parénquima formando el estrato medio se parece a las especies con presencia del mismo (e. g., *S. nigrum*) (20). La endotesta presentó características generales similares a las brindadas para *Salpichroa* y *Solanum* (17, 20-22). Romeo (27), expresó que las características de la epidermis de la testa vista en superficie son de interés para el control botánico, ya que permite diferenciar las semillas de *Datura* cuando impurifican muestras de plantas empleadas en medicina

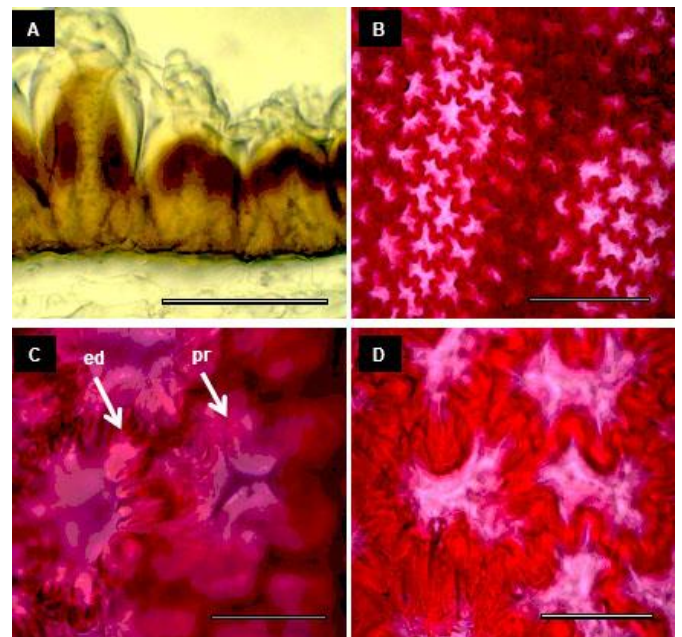


Figura 6. Irregularidad de la superficie de la testa de *Datura ferox* y *D. stramonium*. A, C: *D. ferox*. B, D: *D. stramonium*. ed: engrosamiento distal "rulos"; pr: pared radial. A: vista de la diferente longitud de las esclereidas en corte transversal que determina zonas deprimidas (fovólas) y elevadas en el tegumento seminal. B: vista en superficie de la distinta tonalidad de las áreas deprimidas y elevadas. C: vista en superficie de las esclereidas de la zona deprimida y elevada, en una célula se ven las paredes radiales y en otra, los engrosamientos de la parte distal de las paredes radiales, a nivel de la cara tangencial. D: lo mismo para *D. stramonium*. Escalas: A: 150 μ m. B-D: 400 μ m.

popular. Del análisis realizado en el presente trabajo se coincide en darle importancia a estas características ya que incluso permitieron hallar diferencias entre las especies estudiadas. En conclusión se ha profundizado el conocimiento de la anatomía de las semillas de *D. ferox* y *D. stramonium* e incorporan características estructurales del tegumento seminal que contribuyen a la diferenciación de las especies analizadas: las esclereidas de la exotesta resultaron significativamente mayores en longitud –vista en corte transversal– como en latitud –vista en superficie– en *D. ferox* que en *D. stramonium*. Por otra parte, en vista superficial, las esclereidas de *D. ferox* mostraron mayor grosor de las paredes anticlinal-radiales y menor número y profundidad de los lóbulos que en *D. stramonium*. Por el contrario, el tamaño de las células de la endotesta fue significativamente mayor en *D. stramonium* que en *D. ferox* contribuyendo también a su diferenciación.

AGRADECIMIENTOS

A los integrantes y curadores del Herbario del Museo de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de La

Plata (LP), por posibilitar la consulta de los ejemplares allí conservados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marzocca A (1957) Manual de malezas. Casa editora Coni, Buenos Aires, Argentina.
2. Marzocca A (1979) Manual de malezas. 3ra. Edición. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
3. Ragonese AE, Milano VA (1984) Vegetales y substancias tóxicas de la flora argentina. Enciclopedia Argentina de agricultura y jardinería. Segunda edición. Ed. Acmé S. A. C. I., Argentina. T 2: 268-272.
4. Gallego MJ (2012) *Datura* (134. Solanaceae). En: Flora ibérica. Vol. 11: 216-224. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid [en línea] <http://www.floraiberica.es/org/> [Consulta: 15-1-2019].
5. Zuloaga F, Morrone O, Belgrano MJ (eds.) (2008) Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 107: 1905-1908.
6. Troiani HO (2016) *Datura ferox*. En: Fernández OA, Leguizamón ES, Acciaresi HA (eds.), Malezas e invasoras de la Argentina. Descripción y reconocimiento. T 2: 814. 1ª ed. Bahía Blanca: Editorial Universidad Nacional del Sur, Edius.
7. Roncaglia R, De Marco N (2016) *Datura stramonium*. En: Fernández OA, Leguizamón ES, Acciaresi HA (eds.), Malezas e invasoras de la Argentina. Descripción y reconocimiento. T 2: 815. 1ª ed. Bahía Blanca: Editorial Universidad Nacional del Sur, Edius.
8. Bofill FX, Bofill J, Such G, Piqué E, Guitart R (2007). Dos casos de intoxicación por contaminación de maíz con *Datura stramonium* en ganado vacuno. Rev. Toxicol. 24(1): 56-58. Disponible: <http://www.redalix.org/articulo.oa?id=91924112>. [Consulta: 15-1-2019].
9. Pasqualis PE (1941) Acerca de las semillas de *Datura ferox* L., "chamico" y de su tintura alcohólica. Revista de la Universidad Nacional de Córdoba. Sección Medicina 28(1-2): 176-212 [en línea] <<https://revistas.unc.edu.ar/index.php/REUNC/article/viewFile/8761/9605>> [Consulta: 17-1-2019].
10. Pérez Jara J, Ruiz C, Pérez Ruíz D (1998) Cuadro confusional agudo en anciano por intoxicación por estramonio. Rev. Esp. Geriatr. Gerontol. 33(4): 247-249.
11. Delorit RJ (1970) An illustrated taxonomy manual of weed seeds. Agronomy publications, Wisconsin, USA.
12. Gunn C (1974) Seed characteristics of 42 economically important species of Solanaceae in the United States. U.S. Department of Agriculture, Washington DC, USA, pp. 33 [en línea] <https://naldc.nal.usda.gov/download/CAT74419459/PDF> (Consulta: 12-4-2019).
13. Petetin CA, Molinari EP (1982) Reconocimiento de semillas de malezas. Colección Científica INTA T 21, Buenos Aires, Argentina.
14. Rodríguez NE (1997) Guía ilustrada para el reconocimiento de semillas de malezas. En: Malezas reconocimiento de semillas y plántulas. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina.
15. Bianco CA, Núñez CO, Kraus TA (2000) Identificación de frutos y semillas de las principales malezas del centro de la Argentina. Editorial de la Fundación Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
16. Gunn C (1972) Seed collecting and identification. In: Seed Biology. Kozlowsky T. T. (ed.), Academic Press, New York.
17. Dottori N (1998) Anatomía y ontogenia de fruto y semilla de *Solanum juvenale* (Solanaceae). Kurtziana 26: 13-22.
18. Solís VA, Cabrera VA, Dottori N, Cosa MT (2011) Desarrollo de fruto y semilla en *Solanum argentinum* (Solanaceae). Arnaldoa 18(1): 47-55.
19. Martin AC (1946) The American midland naturalist. The University of Notre Dame, Indiana, USA.
20. Dottori N (1995) Desarrollo y estructura de fruto y semilla en *Solanum* sect. *Cyphomandropsis* (Solanaceae) de Argentina. Kurtziana 24: 83-104.
21. Dottori N, Cosa MT (1999) Anatomía y ontogenia de fruto y semilla de *Solanum hieronymi* (Solanaceae). Kurtziana 27(2): 293-302.
22. Wiemer AP, Cosa MT, Dottori N (2004) Desarrollo y estructura de fruto y semilla de *Salpichroa organifolia* (Solanaceae). Bol. Soc. Argent. Bot. 39(1-2): 41-50.
23. Dottori N, Cosa MT (2003) Desarrollo de fruto y semilla en *Solanum euacanthum* (Solanaceae). Kurtziana 30(1-2): 17-25.
24. Dottori N, Cosa MT (2007) Anatomía y desarrollo del fruto y semilla de *Solanum palinacanthum* (Solanaceae). Rev Mex Biodivers 78: 359-367.
25. Flora Cono Sur (2019) *Datura*. Instituto de Botánica Darwinion. [en línea] <<http://www.darwin.edu.ar/proyectos/floraargentina/fa.htm>> [Consulta: 10-1-2019].
26. Arambarri AM (2018) La "técnica de clarificación 5-5-5", un método natural para el tratamiento de material vegetal. Bol. Soc. Argent. Bot. 53(4): 579-586. <http://dx.doi.org/1031055/1851.2372.v53.n4>
27. Romeo RA (2014) Relevamiento de plantas empleadas en medicina popular en la provincia de Jujuy, con especial referencia al departamento Capital y alrededores. Tesis Doctoral. Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Recibido julio 7, 2019 - Aceptado septiembre 2, 2020

* Correspondencia de autor: Ana María Arambarri. Área de Botánica, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) Calle 60 y 119 (1900) La Plata, Argentina. E-mail: anaramba@yahoo.com.ar; anaramba@gmail.com