



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
INSTITUTO DE HORTICULTURA

RESPUESTAS MORFOGÉNICAS *in vitro* Y CARACTERIZACIÓN
FITOQUÍMICA DE LA *Euphorbia nutans* Lag.

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

PRESENTA:

DANIEL AGUILAR JIMÉNEZ



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

Chapingo, México. Mayo de 2015.

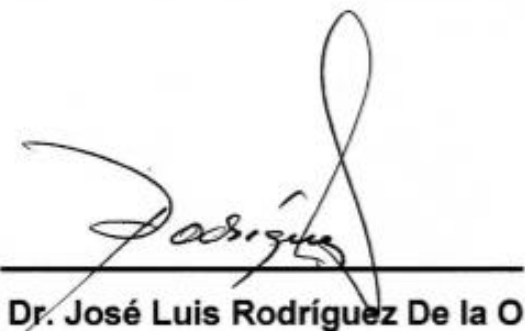


**RESPUESTAS MORFOGÉNICAS *in vitro* Y CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA
DE LA *Euphorbia nutans* Lag.**

Tesis realizada por el Ing. Agr. Daniel Aguilar Jiménez, bajo la
dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo
y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Director:



Dr. José Luis Rodríguez De la O

Asesor:



Dr. Benito Reyes Trejo

Asesor:



Dr. Juan Martínez Solís

DEDICATORIAS

A DIOS (*Yo Soy el que Soy*) por darme la vida y con ello la oportunidad de poder llegar a ser alguien, de poder trascender en este mundo y aportar un granito de arena en la construcción de una sociedad mejor para el destino y misión que tengamos.

A la Sra. Minerva Gil Hernández, mi amiga, abuela y madre, por todo su apoyo, consejos y ánimo en este camino recorrido, a quien no tengo cómo pagarle sino sólo tratando de hacer lo mejor que puedo en cada actividad que desarrollo.

A mis hermanos Pablo Aguilar Jiménez y Gildardo Jiménez Martínez, que gracias al soporte que me han brindado he logrado superar varios obstáculos y llegar a ésta meta. Además, junto con mi demás familia son el entusiasmo que me inspira para seguir adelante y poder triunfar.

Al Dr. José Luis Rodríguez De la O, mi amigo y maestro de quien siempre he recibido su apoyo, consejos y ánimo para superarme académica y personalmente desde que tuve el honor y dicha de conocerlo el 09 de mayo del año 2005 durante mi estancia pre-profesional en UACH y poder titularme como T.S.U. en Agrobiotecnología.

Al Dr. Benito Reyes Trejo por ser un gran ejemplo a seguir, además de ser una excelente persona y a quien también admiro y respeto mucho como profesional y como el gran ser humano que es.

Al Dr. José Guadalupe Álvarez Moctezuma, quien también desde el 09 de mayo del 2005 tuve la fortuna de conocerlo y aprender de él para mi formación profesional y personal. Descanse en paz un gran guerrero apasionado y entregado con su trabajo. †

Al Dr. Juan Martínez Solís, por brindarme de su tiempo y atención y enseñarme que “lo que vale la pena de hacerse, vale la pena de hacerse bien” y que el esfuerzo siempre trae mejores recompensas.

A Anayeli Rojas De Jesús, mi novia, por ser una mujer muy trabajadora, humilde y perseverante, y por formar parte de esta gran experiencia apoyándome con su entusiasmo y en la colecta de plantas y semillas.

En general, dedico este humilde trabajo a todas aquellas personas que tienen el coraje de luchar por sus sueños, de ser perseverantes y salir adelante pese a las circunstancias o a sus circunstancias, porque el éxito no es un fin, sino un camino.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo por brindarme la oportunidad de estudiar en esta maravillosa Institución educativa y de investigación.

A CONACYT por brindarme la Beca para estudios de Posgrado, ya que sin ella no hubiese sido posible alcanzar este sueño y meta.

A la M. en C. Ernestina Cedillo Portugal y al Dr. Victor W. Steinmman por su fundamental apoyo en la identificación botánica de la planta *Euphorbia nutans* Lag.

A Todas mis profesoras y Todos mis profesores del Posgrado de Biotecnología Agrícola, porque son Excelentes docentes e investigadores y muy Profesionales entregados y comprometidos con su quehacer.

Al Dr. Juan Martínez Solís, por darme la oportunidad de foguarme en la parte molecular, cuya herramienta me será de gran utilidad en mi vida profesional, además de sus observaciones para una mejor elaboración del presente trabajo.

Al Profesor Ricardo Gaspar Hernández, Técnico Académico del laboratorio de Biología molecular, por toda su paciencia y solidaridad durante mi estancia en dicho laboratorio.

A la Dra. Diana Guerra Ramírez por haber sido una excelente instructora y amiga durante mi fogueo en esta maravillosa disciplina “Fitoquímica”.

Al Dr. Holbert Zulueta Prada por ser un excelente ser humano y brindarme su amistad y confianza así como su apoyo e instrucción cada que me asaltaba alguna duda.

Al Dr. José Luis Rodríguez De la O y familia por toda la confianza y soporte brindado en mi camino y formación profesional desde T.S.U. hasta este momento.

Al Dr. Benito Reyes Trejo por la confianza y oportunidad de involucrarme y entrenarme en ésta otra maravillosa ciencia que es la fitoquímica.

A la Dra. Matilde Villa García y a la M. en C. Jessica Miriam Medrano Hernández, por brindarme su valiosa amistad y auxilio durante mi instrucción en el Laboratorio de Fitoquímica.

A la Dra. Gisela M. Peña Ortega por su paciencia, oportunidad y apoyo en el análisis e interpretación de los resultados sobre marcadores moleculares en *Euphorbia nutans* Lag., resultados que no se presentan en la tesis pero que se publicaran mediante un artículo científico.

Al Ing. Eduardo Rodríguez Hernández y Familia por todo el apoyo que me han brindado y considerarme parte de ella desde que tuve la dicha y honor de conocerlos en mis estudios de bachillerato.

A mis compañeras y compañeros de clase: María del Carmen Herrera Villaseñor, Rocio Cuellar Olalde, Victor Ruíz Hernández y Jeferson Pérez Uvaldo, con quienes pasé momentos muy agradables y fueron como hermanos durante estos dos años de formación profesional. GRACIAS COLEGAS!!!

DATOS BIOGRÁFICOS

DANIEL AGUILAR JIMÉNEZ, egresó como Técnico en Suelos y Fertilizantes nivel medio superior en el CECYTE plantel Tehuitzingo (2000-2003) obteniendo el 1er lugar de su generación, logrando así, la “Beca a la Excelencia” para estudiar T.S.U. en Agrobiotecnología en la Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros (UTIM) (2003-2005) fogueándose en la Técnica “Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*” durante una Estancia en el Departamento de Fitotecnia de la UACH (Mayo 2005-Junio 2006) aprobando por Unanimidad con Mención Honorífica. Concluyó sus estudios como Ing. en Agronomía en UNIDES (2008-2011) aprobando por Unanimidad con Mención Honorífica al mismo tiempo que trabajaba como Técnico laboratorista en UTIM. En el campo agrícola ha trabajado el cultivo de maíz, pepino, jitomate, sandía, huitlacoche y papaya. Como T.S.U (2005-2007) fue Enlace Administrativo (SAGARPA-SENASICA) en la Oficina de Inspección de Sanidad Agropecuaria (OISA) en Aduana de Carga del Aeropuerto Internacional de la Ciudad de México (AICM) (OISA 47-1) y en la OISA 47-0 ubicada en la Sala “E” del AICM, también fue personal de apoyo en el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) obteniendo un reconocimiento del Jefe de la OISA 47-0 en sala “E” del AICM por su contribución como Enlace Administrativo a dicha oficina. En UTIM, participó como Técnico Laboratorista en las Prácticas Académicas de Genética general y Biotecnología Vegetal del 2007-2011. Fue nombrado por el Director del Programa Educativo de Agrobiotecnología de la UTIM como Jefe del Laboratorio de “Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro*” a partir de mayo de 2011 a diciembre de 2012. Participó en el Diseño de la Licencia Profesional sobre Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro* en base a Competencias Profesionales en conjunto con expertos franceses y otras UTs durante junio de 2011. Fue Profesor por Asignatura en UTIM de enero de 2011 a diciembre de 2012. Así mismo, ha asesorado y colaborado en la revisión de 3 tesis de ingeniería en Biotecnología Agrícola y una de T.S.U. en Agrobiotecnología. Además ha hecho algunas publicaciones en la revista UTIM y 2 en revistas indexadas y ha participado como ponente en 9 congresos nacionales y 5 internacionales.

RESPUESTAS MORFOGÉNICAS *in vitro* Y CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE LA *Euphorbia nutans* Lag.

***In vitro* MORFOGENETICS RESPONSES AND PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF *Euphorbia nutans* Lag.**

Daniel Aguilar Jiménez¹; José Luis Rodríguez De la O²

RESÚMEN

Se realizó la obtención de respuestas morfogénicas *in vitro* y caracterización fitoquímica de la *Euphorbia nutans* Lag. con el objetivo de contar con un protocolo de propagación masiva de esta planta, además de conocer los metabolitos secundarios presentes en ella y poder realizar una comparación fitoquímica de los extractos de plantas silvestres con callos obtenidos *in vitro*. Para el cultivo *in vitro* se emplearon las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) al 100 %. La mejor respuesta para formación de brotes a partir de hojas fue promovida con ácido indol-3-acético (AIA) más 6-Benciladenina (BA) y la formación de raíz con ácido naftalenacético (ANA) más BA. El análisis cromatográfico de los extractos reveló la presencia de β -sitosterol, estigmasterol, β -lupeol, acetato de α y β -amirina y un tipo iridoide no reportado en plantas de esta familia.

PALABRAS CLAVE: *In vitro*, callo, fitoquímica, β -lupeol, iridoide.

ABSTRACT

Morphogenic responses *in vitro* and phytochemical characterization of *Euphorbia nutans* Lag. was done in order to have a protocol for mass propagation of this plant, in addition to knowing the secondary metabolites present in it and to make a phytochemical comparison of the wild plant extracts with calluses obtained *in vitro*. *In vitro* culture used inorganic salts Murashige and Skoog (1962) 100 %. The best response for shoot formation from leaves was promoted with indole-3-acetic acid (AIA) plus 6-benzyladenine (BA) and root formation with naphthaleneacetic acid (ANA) plus BA. The extracts chromatographic analysis revealed the presence of β -sitosterol, stigmasterol, β -lupeol, acetate of α and β -amyrin and an iridoid type not reported in plants of this family.

KEYWORDS: *In vitro*, callus, phytochemical, β -lupeol, iridoid.

Alumno de la tesis¹

Director de la tesis²

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
PROBLEMÁTICA.....	2
JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA.....	2
OBJETIVO GENERAL.....	3
HIPÓTESIS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS.....	10
LITERATURA CITADA.....	12
CAPITULO I	
GERMINACIÓN <i>in vitro</i> DE SEMILLAS DE <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	16
RESUMEN.....	16
INTRODUCCIÓN.....	17
MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
CONCLUSIONES.....	29
LITERATURA CITADA.....	29
CAPITULO II	
EVALUACIÓN DE RESPUESTAS MORFOGÉNICAS <i>in vitro</i> EN <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	32
RESUMEN.....	32
INTRODUCCIÓN.....	32
MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
CONCLUSIONES.....	55

LITERATURA CITADA.....	55
CAPITULO III	
ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS DE <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	59
RESUMEN.....	59
INTRODUCCIÓN.....	60
MATERIAL Y MÉTODOS.....	62
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	66
CONCLUSIONES.....	89
LITERATURA CITADA.....	90
CAPITULO IV	
OBTENCIÓN Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE CALLOS <i>in vitro</i> EN <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	95
RESUMEN.....	95
INTRODUCCIÓN.....	96
MATERIAL Y MÉTODOS.....	98
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	101
CONCLUSIONES.....	112
LITERATURA CITADA.....	112
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	114

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
INTRODUCCIÓN GENERAL	
Cuadro 1. Comparación de los sistemas de clasificación según Cronquist (1981) y APG III (2009).....	10
CAPITULO I	
Cuadro 1. Longitud de plántulas y raíz obtenidas de la germinación de semillas <i>in vitro</i> de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	26
CAPITULO II	
Cuadro 1. Tratamientos para evaluar las respuestas morfogénicas <i>in vitro</i> de los tejidos de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. con AIA + BA.....	36
Cuadro 2. Tratamientos para evaluar las respuestas morfogénicas <i>in vitro</i> de los tejidos de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. con ANA + BA.....	36
Cuadro 3. Número y longitud de brotes y raíz <i>in vitro</i> a partir de hojas de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. con AIA y BA.....	40
Cuadro 4. Número y longitud de brotes y raíz <i>in vitro</i> a partir de hojas de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. con ANA y BA.....	43
Cuadro 5. Número y longitud de brotes y raíz <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodales de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. con AIA y BA.....	46
Cuadro 6. Número y longitud de brotes y raíz <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodales de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. con ANA y BA.....	48
Cuadro 7. Número y longitud de brotes y raíz <i>in vitro</i> a partir de ápices de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. con AIA y BA.....	51
Cuadro 8. Formación y longitud de brotes y raíz <i>in vitro</i> a partir de ápices de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. con ANA y BA.....	52
CAPITULO III	
Cuadro 1. Proporciones de disolventes (fase móvil), fracciones obtenidas y metabolitos secundarios identificados en la columna del extracto hexanico de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	68

Cuadro 2. Proporciones de disolventes (fase móvil), fracciones obtenidas y metabolitos secundarios identificados en la columna del extracto de diclorometano de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	80
--	----

Cuadro 3. Proporciones de disolventes (fase móvil), fracciones obtenidas y metabolitos secundarios identificados en la columna del extracto metanolico de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	84
--	----

CAPITULO IV

Cuadro 1. Tratamientos para evaluar la inducción de callo <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodales en la <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	99
--	----

Cuadro 2. Inducción de callos <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodales de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	102
---	-----

Cuadro 3. Inducción de callos <i>in vitro</i> a partir de hojas completas y segmentos foliares de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	104
--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Figura 1. Características morfológicas y botánicas de un ejemplar de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	6
Figura 2. Colecta de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	7
Figura 3. Ejemplar de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. en el Herbario Jorge Espinosa, Sala de Preparatoria agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.....	8
Figura 4. Diagrama simplificado que ilustra el árbol filogenético de las angiospermas.	9
Figura 5. Acercamiento de la imagen del sistema de clasificación de la familia Euphorbiaceae en base al método APG III (2009)	9

CAPITULO I

Figura 1. Germinación de semillas de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. bajo dos condiciones de luz <i>in vitro</i>	21
Figura 2. Semillas de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. germinadas <i>in vitro</i> en cuatro tratamientos diferentes y con tres posiciones sobre el medio de cultivo para cada tratamiento.....	23
Figura 3. Respuestas a la germinación <i>in vitro</i> de semillas de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. a los 30 días después de su establecimiento.....	24
Figura 4. Germinación y desarrollo <i>in vitro</i> de plántulas de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	27

CAPITULO II

Figura 1. Obtención de brotes en hojas <i>in vitro</i> de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. en medio MS 100 % + suplementos + BA y AIA.....	41
Figura 2. Raíces <i>in vitro</i> a partir de hojas de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. en MS 100 % + suplementos + ANA y BA.....	44
Figura 3. Respuestas <i>in vitro</i> en segmentos nodales de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. en medio MS 100 + suplementos.....	49

Figura 4. Respuestas morfogénicas <i>in vitro</i> a partir de ápices de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. en medio MS 100 % + suplementos.....	53
---	----

Figura 5. Aclimatización de Plántulas de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. obtenidas <i>in vitro</i>	54
---	----

CAPITULO III

Figura 1. Cromatografía en capa delgada (CCD).....	65
--	----

Figura 2. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear modelo 400 MR DD2 Agilent.....	66
---	----

Figura 3. Proceso de obtención de los tres diferentes extractos vegetales de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	67
---	----

Figura 4. Estructura molecular del acetato de α -amirina (1).....	69
--	----

Figura 5. Espectro de infrarrojo de acetato de α -amirina de las fracciones 139-148 del extracto hexánico de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	70
--	----

Figura 6. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de α -amirina de las fracciones 139-148 del extracto hexánico de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	71
---	----

Figura 7. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C a 400 MHz en CDCl_3 de α -amirina del extracto de hexano de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	72
--	----

Figura 8. Patrón de acoplamiento tipo doble de dobles para el protón H_3 base de β -hidroxi del anillo de ciclohexano en el β -lupeol.....	73
---	----

Figura 9. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de β -lupeol obtenido de las fracciones 200-223 del extracto de hexano de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	74
--	----

Figura 10. Estructura molecular del β -lupeol (2) identificado del extracto de hexano de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	75
---	----

Figura 11. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C a 400 MHz en CDCl_3 de β -lupeol obtenido de las fracciones 200-223 del extracto de hexano de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	76
--	----

Figura 12. Estructura molecular de β -sitosterol aislado de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	77
--	----

Figura 13. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de β -sitosterol obtenido de las fracciones 252-303 del extracto de hexano de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	78
Figura 14. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C a 400 MHz en CDCl_3 de β -sitosterol obtenido de las fracciones 252-303 del extracto de hexano de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	79
Figura 15. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de una mezcla de β -lupeol y probablemente 24-metilen-cicloartan- 3β -ol, además de otras impurezas no terpenoidales del extracto de diclorometano de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	82
Figura 16. Estructura molecular del 24-metileno-cicloart- 3β -ol (4).....	83
Figura 17. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de las fracciones 1-40 del extracto de metanol de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	85
Figura 18. Estructura molecular del estigmasterol identificado del extracto de metanol de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	86
Figura 19. Posibilidad estructural del iridoide glicosilado aislado del extracto de metanol de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	86
Figura 20. Expansión del espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H a 400 MHz en D_2O de un posible iridoide aislado a partir de las fracciones 511-570 del extracto metanólico de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	87

CAPITULO IV

Figura 1. Formación de callos a partir de segmentos nodales de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. bajo condiciones <i>in vitro</i>	103
Figura 2. Callos formados en hojas completas <i>in vitro</i> de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	105
Figura 3. Respuestas a la formación de callo <i>in vitro</i> en segmentos de lámina foliar media incluyendo la nervadura central de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	107

Figura 4. Obtención <i>in vitro</i> de callos friables a los 7 días de cultivo a partir de segmentos de lámina foliar de <i>Euphorbia nutans</i> Lag. con la nervadura central hendida por la mitad y en un medio de cultivo MS 100 % + BA y ANA 10 mg·L ⁻¹	108
Figura 5. Placa cromatográfica en capa delgada para comparar los metabolitos obtenidos en extractos de plantas silvestres vs extractos de callos <i>in vitro</i> de <i>Euphorbia nutans</i> Lag.....	111

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las plantas que pertenecen a la familia Euphorbiaceae pueden ser árboles, arbustos, hierbas o plantas trepadoras y en común, todas ellas tienen látex y pueden ser plantas monoicas o dioicas (Stevens *et al.*, 2001). Bingtao Li *et al.* (2008) menciona 322 géneros y 8,910 especies. Es considerada la sexta familia más diversa entre las Angiospermas después de Orchidaceae, Compositae, Leguminosae, Gramineae y Rubiaceae (Radcliffe-Smith, 1987) de tal modo que se han realizado numerosos trabajos de investigación científica mediante el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (Kondamudi, *et al.*, 2009) así como estudios fitoquímicos sobre plantas de esta familia (Euphorbiaceae) (Lynn y Clevette, 1987; Kheyrodin y Ghazvinian, 2012 y Zedan *et al.*, 2013).

Dentro de la familia Euphorbiaceae se encuentra la planta *Euphorbia nutans* Lag., de nombre común: “siridonia”, la cual crece por lo regular donde hay asentamientos humanos en la Mixteca de Puebla, en particular en Acatlán de Osorio, Tulcingo del Valle, Tecamatlán, Tehuitzingo, Izúcar de Matamoros, La Trinidad Tepango y Atlixco, sin descartar otros lugares de nuestro país (Toledo, 1994). Es una planta herbácea, generalmente anual y a veces perenne, por lo común erecta o ascendente pero se puede encontrar raramente rastrera o postrada, y como característica sus hojas pueden presentar una mancha de color rojo generalmente en el centro (Rzedowski y Rzedowski, 2001). No obstante, en la Mixteca Poblana ésta planta sólo es considerada como maleza en los terrenos de cultivo, principalmente de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y cachuate (*Arachis hypogaea*), empleándola de forma empírica por algunas personas como infusión para sanar padecimientos de gastritis así como para cicatrizar heridas externas, llegando a tener resultados palpables en una semana.

No obstante, de los numerosos estudios sobre micropropagación y análisis fitoquímicos en Euphorbiaceae, no hay algún estudio científico sobre *Euphorbia nutans* Lag. en el buscador “Scopus” de la UNAM, donde únicamente se encontró un artículo publicado por Atwell (2000) en el que se le describe como una maleza

de difícil control en el cultivo de algodón en Estados Unidos. Por lo tanto, este trabajo genera los primeros estudios científicos a nivel mundial sobre la planta mencionada.

PROBLEMÁTICA

Las plantas de la familia Euphorbiaceae son difíciles de trabajar mediante el cultivo de tejidos (Lee *et al.* 1982; Tideman y Hawker 1982; Ripley y Preece 1986; Dewir *et al.*, 2005), particularmente por la falta de un protocolo eficaz para su regeneración *in vitro* (Bin Xu *et al.*, 2008). Además, se desconoce por completo qué metabolitos secundarios puede tener *Euphorbia nutans* Lag.

Por lo tanto ¿Se podrán establecer las condiciones *in vitro* que permitan la propagación de esta especie así como su aclimatación *ex vitro*? En caso de lograr la propagación *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. ¿Se podrán aislar y determinar, mediante análisis fitoquímico, la presencia de metabolitos secundarios de interés fármaco-biológico tanto en plantas silvestres como en material vegetal *in vitro*?

JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

El manejo celular *in vitro* permitirá entender y comprender en mejor forma, desde el punto de vista biológico, su tipo de reproducción y factores asociados a él. También, su manejo *in vitro* permitirá contar con un protocolo de regeneración celular y de diferentes respuestas morfogénicas que den la pauta para entender la posible causa del por qué no se ha tenido éxito en el manejo celular *in vitro* en otras especies cercanas o similares a ella. Además, esto permitirá contar con la disposición de material vegetal suficiente para la extracción de sus respectivos metabolitos secundarios de importancia una vez aislados e identificados mediante técnicas fitoquímicas y de espectrometría en material vegetal silvestre. Así mismo, esto da la posibilidad de abrir la puerta a la industria farmacéutica para la obtención y aplicación, en mejor forma, de dichos metabolitos secundarios, con lo cual se le estaría dando un “valor agregado” a esta especie vegetal que hasta el momento pasa desapercibida y/o sólo es considerada como maleza en los terrenos de cultivo y en los caminos.

OBJETIVO GENERAL

Obtener respuestas morfogénicas *in vitro* para la propagación masiva de *Euphorbia nutans* Lag. y realizar un análisis y comparación fitoquímica de los extractos de plantas silvestres con material vegetal obtenido *in vitro* de plantas colectadas en la Mixteca Poblana para caracterizarla fitoquímicamente.

Objetivos específicos

Establecer condiciones que permitan promover las respuestas morfogénicas a partir de diferentes explantes cultivados *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag.

Identificar metabolitos secundarios en *Euphorbia nutans* Lag. mediante RMN ^1H y RMN ^{13}C y comparar en placas cromatográficas los metabolitos secundarios de material vegetal obtenido *in vitro* vs extractos de plantas silvestres.

HIPÓTESIS

Las respuestas morfogénicas *in vitro* en *Euphorbia nutans* Lag. serán promovidas por el tipo, concentración y/o combinación de fitorreguladores en el medio de cultivo y no estarán condicionadas por el tipo de explante empleado.

La presencia de metabolitos secundarios en *Euphorbia nutans* Lag. variaran en extractos de plantas silvestres respecto al material vegetal obtenido *in vitro* debido a las diferentes condiciones nutritivas y ambientales en el laboratorio.

REVISIÓN DE LITERATURA

Descripción de las Euphorbiaceas

Las plantas que pertenecen a la familia Euphorbiaceae pueden ser árboles, arbustos, hierbas o plantas trepadoras con látex, plantas monoicas o dioicas. Frutos generalmente capsulares y separándose en 3 cocos, o a veces abayados o drupáceos; semillas con una cubierta seca o carnosa, frecuentemente carunculadas y generalmente con endosperma (Stevens *et al.*, 2001).

Webster (1994) cita alrededor de 8,700 especies ubicadas en 320 géneros de la familia Euphorbiaceae siendo una de las más grandes a nivel mundial ocupando el sexto lugar en diversidad después de las familias: Orchidaceae, Asteraceae, Fabaceae, Poaceae y Rubiaceae. No obstante, Bingtao Li *et al.* (2008) refieren 322 géneros y 8,910 especies. Su distribución es subcosmopolita pero se encuentra mejor representada en zonas tropicales y subtropicales, no obstante, los géneros *Croton* y *Euphorbia* también se han encontrado en zonas templadas (Martínez *et al.*, 2002), alcanzando su máxima diversidad y abundancia en bosques tropicales caducifolios (Steinmann, 2002).

Ésta familia es de suma importancia para uso medicinal, industrial, alimenticio y ornamental (Steinmann, 2002) y se reconocen 43 géneros y 782 especies (Rzedowski, 1991) de la familia Euphorbiaceae en México, donde el 57 % son endémicas al país. Por otra parte Martínez *et al.* (2002) citan 50 géneros y 826 especies incluyendo introducidas y/o cultivadas, de las cuales 55.52 % son endémicas de México (Rzedowski; 1991), no obstante, Martínez *et al.* (2002) calcularon que el endemismo nacional para *Euphorbia* es del 58.6 %, pues de 447 especies endémicas de México, el 41.6 % son endémicas locales, es decir, su crecimiento se restringe a un lugar en particular en el país. Dentro de su gran diversidad se encuentran especies cultivadas, plantas en peligro de extinción (Lee *et al.* 1982; Tideman y Hawker 1982; Ripley y Preece, 1986; Dewir *et al.* 2005), así como como malezas que no se han estudiado y pueden tener un uso muy importante.

Género *Euphorbia*

Es un género de plantas de la familia Euphorbiaceae muy extenso, variable y distribuido mundialmente, siendo uno de los más diversos en cuanto a forma y tamaño. Además, tienen una alta especialización en la inflorescencia: el ciatio, que agrupa a flores unisexuales en característicos pseudantios que se agrupan en cimas principalmente. Estos consisten en una flor central pistilada rodeada de cinco grupos de flores con estambres. Todas las flores están en un involucre con cuatro glándulas en los márgenes. La flor central femenina abre antes que las masculinas,

funcionando cada ciatio como una flor protoginia hermafrodita. Las glándulas del ciatio producen néctar, y la polinización es principalmente zoófila. El ciatio la hace parecer tanto a una flor hermafrodita que Linneo y otros autores la interpretaron como una flor verdadera. Sin embargo, J. B. Lamarck, constató que el ciatio era una inflorescencia y así se la sigue reconociendo (Steinmann, 2002).

El género *Euphorbia* posiblemente el segundo género más grande de la flora de México, después de *Salvia*. No obstante, hay floras regionales donde las euforbiáceas no han sido tratadas, tal es el caso de la flora regional de Veracruz y la del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla. En el estado de Puebla, Steinmann (2002) cita 29 especies con diversidad y endemismo de 177 especies que pertenecen a géneros con una revisión moderna. El mismo autor concluye que hasta el año 2002 menos del 25 % de las Euphorbiaceae han sido sometidas a una revisión y que hacen falta datos acerca de fitogeografía, anatomía, biología de la polinización y números cromosómicos. De lo anterior, en el trabajo realizado por Martínez *et al.* (2002) sobre los géneros de la familia Euphorbiaceae en México y en el trabajo de Steinmann (2002) sobre diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México, no se menciona a la especie *Euphorbia nutans* Lag.

***Euphorbia nutans* Lag.**

La clasificación taxonómica se llevó a cabo gracias a la colaboración y apoyo de la **M. C. Ernestina Cedillo Portugal**, Profesora-investigadora del Departamento de Preparatoria Agrícola, **Herbario Jorge Espinosa Salas de la Universidad Autónoma Chapingo**, y al **Dr. Víctor W. Steinmann**. Botánico que se desempeña como investigador en el "Instituto de Ecología" del Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán, realizando sistemática de la familia Euphorbiaceae y Urticaceae en la florística de México.

Por lo tanto y de acuerdo a dos sistemas de clasificación: 1) Sistema de clasificación de Cronquist (1981) (tradicional) y 2) Sistema APGIII (Angiosperm Phylogeny Group III), que es la nueva forma de clasificación de plantas con flores (Stevens, 2001) queda *Euphorbia nutans* Lag. de la siguiente manera:

Método de Cronquist (1981).

Con base a lo citado por Lagasca y Segura (1816), y Rzedowski y Rzedowski (2001):

Reino: Plantae

División: Tracheophyta (plantas vasculares)

Subdivisión: Spermatophytina (plantas con semillas)

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Subclase: Rosidae

Familia: Euphorbiaceae

Orden: Euphorbiales

Género: *Euphorbia*

Especie: *nutans* Lag.

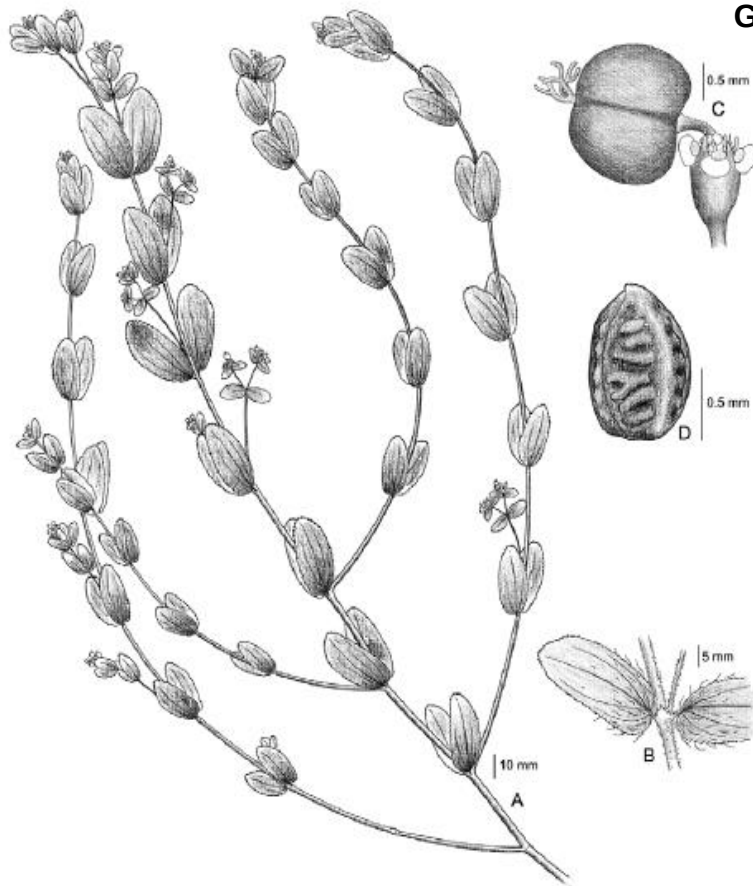


Figura 1. Características morfológicas y botánicas de un ejemplar de *Euphorbia nutans* Lag. A) Hábito de crecimiento B) Hojas y estípulas C) Ciato y fruto D) Semilla.

Fuente: Hossein y Riina (2001).



Figura 2. Colecta de *Euphorbia nutans* Lag. A) y B) *Euphorbia nutans* Lag. en un campo de futbol soccer en Izúcar de Matamoros C) y F) *Euphorbia nutans* Lag. en un cultivo de caña de azúcar en Izúcar de Matamoros E) *Euphorbia nutans* Lag. en calles de la Trinidad Atlixco D) Látex de *Euphorbia nutans* Lag. G) y H) Ejemplar de *Euphorbia nutans* Lag para su clasificación taxonómica.

Es importante destacar que un ejemplar se encuentra registrado con **número de registro: 25193** en el **herbario Jorge Espinosa Salas de la Universidad Autónoma Chapingo**, y el otro en el "Instituto de Ecología", Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán.

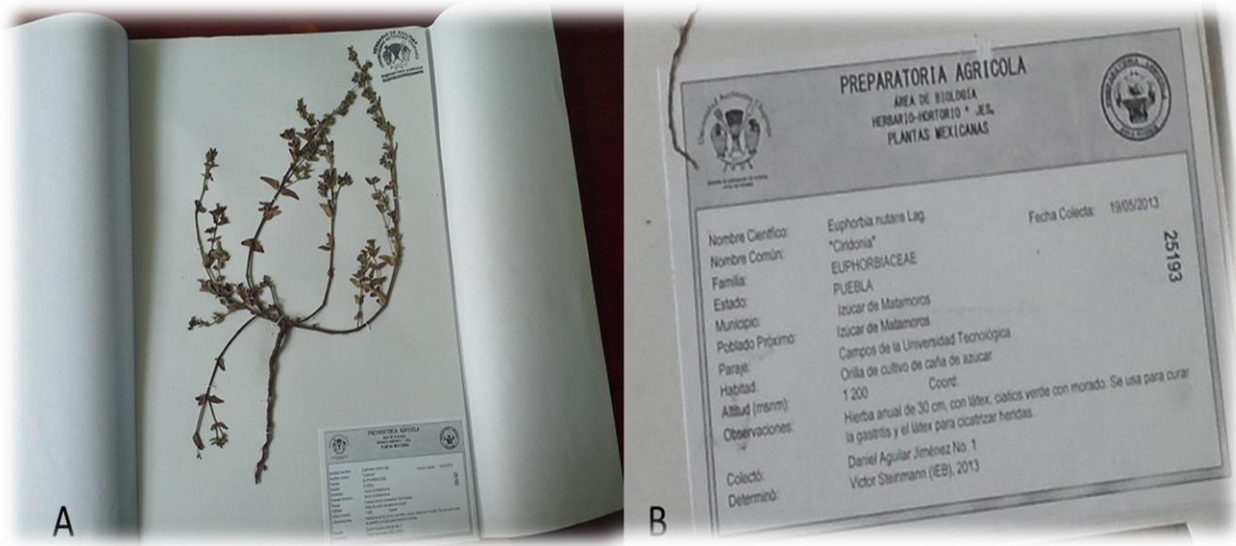


Figura 3. Ejemplar de *Euphorbia nutans* Lag. en el Herbario Jorge Espinosa, Sala de Preparatoria agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

Método APGIII

Este sistema es la última versión del sistema para la clasificación de las angiospermas según criterios filogenéticos. Fue publicado en 2009 por un vasto grupo de investigadores que se autodenominó APG III. Esta versión sucede y reemplaza a aquellas publicadas en 1998 (denominada APG I) y en 2003 (APG II). El sistema es diferente de las anteriores aproximaciones al ordenamiento de las angiospermas, que estaban basadas principalmente en criterios morfológicos. El sistema APG III, al igual que las dos versiones anteriores, se basa en datos moleculares, secuencias de ADN del núcleo celular, de la mitocondria y del cloroplasto, y en el análisis filogenético de los mismos. Intenta, de este modo, ordenar la diversidad de las angiospermas sobre la base de su filogenia, es decir, recuperando la evidencia de una serie de eventos únicos que comprende la historia evolutiva de este grupo de plantas. A través de la filogenia se puede comenzar a entender la diversificación, las regularidades en los patrones de la evolución, o simplemente sugerir cambios evolutivos individuales dentro de un clado. De este modo, se descubrieron relaciones entre las angiospermas que obligaban a deshacerse de muchas hipótesis largamente aceptadas acerca de su evolución

(Stevens, 2001). APG III ordenó y agrupó a las angiospermas en 415 familias, la mayor parte de las cuales se halla incluida en algunos de los 59 órdenes aceptados por este sistema. Tales órdenes, a su vez, se distribuyen en clados (Stevens, 2001).

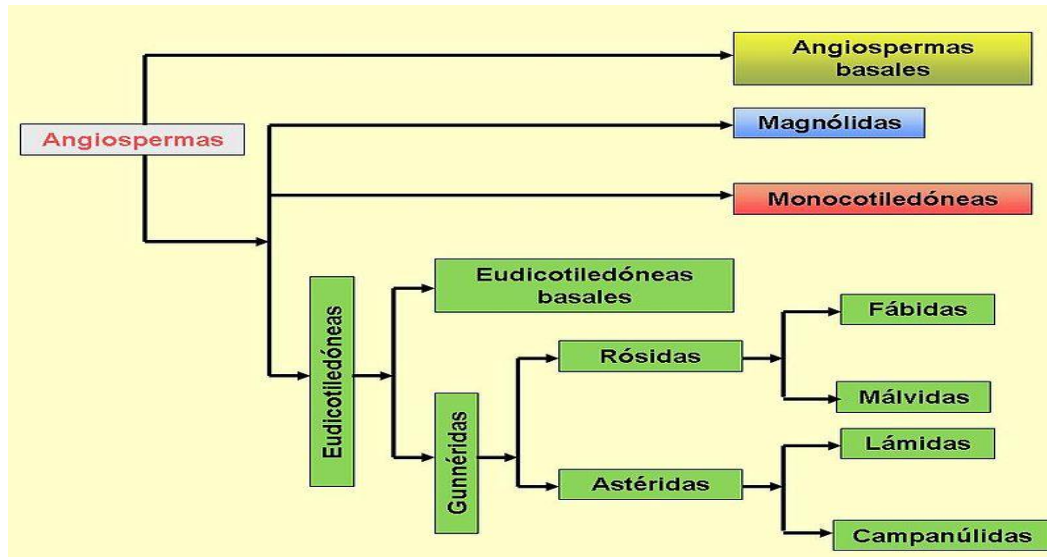


Figura 4. Diagrama simplificado que ilustra el árbol filogenético de las angiospermas. Se muestran los grandes grupos de angiospermas (angiospermas basales, magnólicas, monocotiledóneas y eudicotiledóneas) en diferentes colores. Basado en APG III (2009).

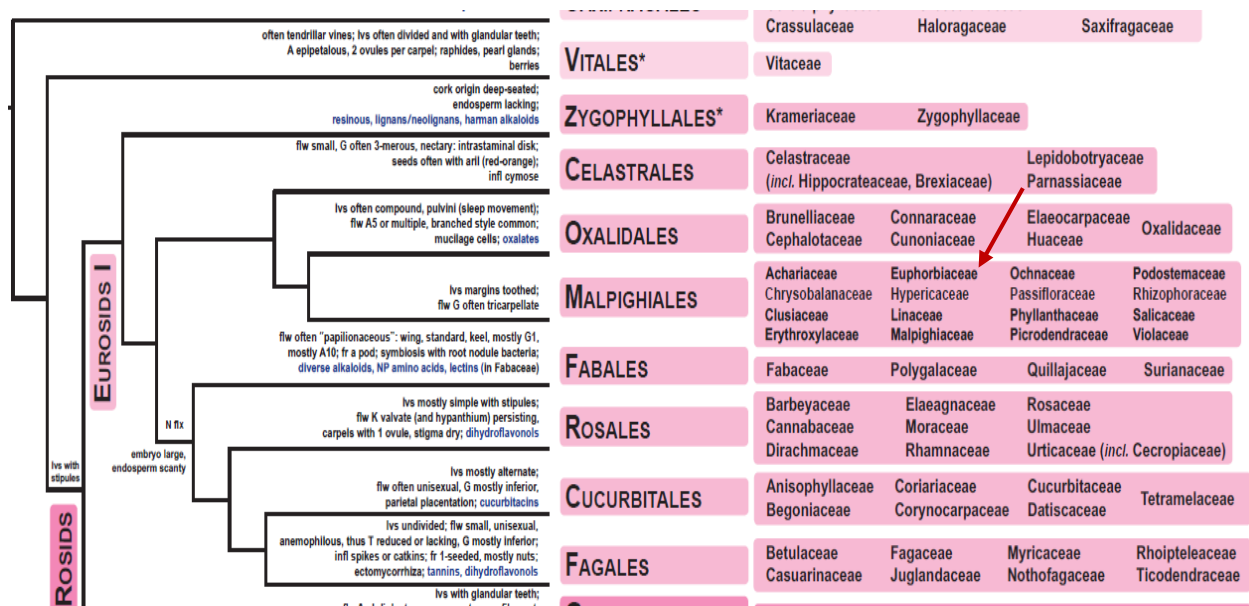


Figura 5. Acercamiento de la imagen del sistema de clasificación de la familia Euphorbiaceae en base al método APG III (2009) (Stevens, 2010).

Al ser el género *Euphorbia* uno de los más grandes y complejos entre las fanerógamas, muchos botánicos han hecho esfuerzos infructuosos para subdividirlo en otros más pequeños. Es por ello que, según recientes estudios de secuencia de ADN la mayoría de los más pequeños "géneros satélite" del gran género *Euphorbia* anidan en él. En consecuencia estos táxones, junto con el nunca aceptado *Chamaesyce* así como el más pequeño *Cubanthus* Millsp. *Elaeophorbia*, *Endadenium*, *Monadenium*, *Synadenium* y *Pedilanthus* fueron transferidos a *Euphorbia* por Steinmann y Porter (2002), Steinmann (2003) y Bruyns *et al.* (2006); incluso, la subtribu íntegra Euphorbiinae ahora consiste únicamente en el género *Euphorbia*.

Cuadro 1. Comparación de los sistemas de clasificación según Cronquist (1981) y APG III (2009). Fuente: Idárraga *et al.* (2011).

Sistema de clasificación de Cronquist	APG III
Agavaceae	Asparagaceae, Xanthorrhoeaceae
Alliaceae	Amaryllidaceae
Clusiaceae	Calophyllaceae, Clusiaceae, Hypericaceae
Cochlospermaceae	Bixaceae
Cuscutaceae	Convolvulaceae
Eremolepidaceae	Santaleaceae
Euphorbiaceae	Euphorbiaceae, Peraceae, Phyllanthaceae
Flacourtiaceae	Achariaceae, Malvaceae, Salicaceae

El cuadro anterior muestra algunas familias que han sido modificadas como resultado de haber sido ya sea incorporadas en diferentes familias tradicionalmente aceptadas, segregadas en varias familias (Cronquist) o incluidas en nuevas familias recientemente descritas (APG III)

FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS

Cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro*

Se define como el cultivo de células y/o tejidos de una planta en recipientes estériles y de forma aséptica bajo condiciones nutritivas y ambientales controladas (Pierik,

1991). Considerándose cinco etapas como las principales para llevar a cabo el ciclo completo del cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro*: Etapa 0 (Pre acondicionamiento y tratamiento fitosanitario del material original), Etapa I (Establecimiento *in vitro* de explantes), Etapa II (Multiplicación del material vegetal), Etapa III (Enraizamiento *in vitro* de los brotes obtenidos), Etapa IV (Aclimatación de las plántulas obtenidas *in vitro* bajo condiciones de invernadero) (Hurtado y Merino, 2000). En la actualidad, el medio de cultivo mayormente empleado en el cultivo de células y tejidos vegetales *in vitro* es el de Murashige y Skoog (MS) (1962), aunque hay muchos otros y algunos de ellos sólo son variaciones del medio MS, y a ello se debe el éxito de muchas especies cultivadas para la propagación masiva o la obtención de metabolito secundarios (Calva y Pérez, 2005).

Fitoquímica

La química de las plantas o fitoquímica (Albornoz, 1980) es la disciplina que se encarga del estudio químico de todas las sustancias presentes en ellas. Y de acuerdo con Harborne (1984), involucra una enorme cantidad de sustancias orgánicas que son elaboradas y acumuladas por las plantas como metabolitos primarios y secundarios, su biosíntesis, distribución y función biológica. Por lo tanto, la fitoquímica es fundamental para la obtención de principios activos de plantas medicinales fundamentándose en el aislamiento, purificación e identificación estructural de los mismos mediante técnicas analíticas (cromatografía en columna y capa delgada) y métodos de identificación y caracterización (espectrometría de masas, espectroscopía y resonancia magnética nuclear) (Reyes Trejo, 1991).

No obstante, para poder aislar los metabolitos de una determinada planta primero se debe de aplicar algún método de extracción, los cuáles se clasifican de la siguiente forma:

- a) Extracción mecánica: por expresión y por insiciones.
- b) Destilación: por arrastre de vapor.

- c) Extracción con disolventes: discontinua (maceración, digestión, infusión, decocción) y continua (percolación, soxhlet) (Albornoz, 1980; Harborne, 1984; Reyes Trejo, 1991).

Posteriormente a la obtención del extracto vegetal, de acuerdo con Harborne (1984), se debe de llevar a cabo la separación de sus diferentes compuestos por medio de técnicas cromatográficas, y en la actualidad las más comunes son: cromatografía en capa delgada (TLC), cromatografía por gravedad en columna, cromatografía gas-líquido (GLC) y cromatografía de líquidos altamente presurizada (HPLC). Donde la selección de la técnica cromatográfica, de acuerdo con Reyes Trejo (1991), dependerá de la solubilidad y volatilidad de los compuestos que se van a separar.

Así mismo, una vez obtenido alguno o algunos metabolitos más o menos puros, puros es lo ideal, es imprescindible emplear uno o varios métodos de identificación y caracterización de los compuestos como es la espectrometría de masas, la espectroscopía infrarroja, espectroscopía ultravioleta y visible, espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y difracción de rayos-X (Albornoz, 1980; Alejandro Domínguez, 1985; Reyes Trejo, 1991).

LITERATURA CITADA

- Albornoz, M. Américo. 1980. Productos naturales. Sustancias y drogas extraídas de las plantas. Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela. 615 p.
- Alejandro, Domínguez Xorge. 1985. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial LIMUSA S. A. de C. V. 281 p.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society. 161:105-121.
- Atwell, K., Stone, T. and Heering, D. 2000. Roundup Ready (glyphosate-tolerant) ultra-narrow row cotton weed control and production costs. In: Dugger P,

- Richter D (Editores), Journal 2000 Proceedings Beltwide Cotton Conferences, San Antonio, USA. 2:1491.
- Bin Xu, Wenhao, D. and Wun, S. Ch. 2008. An Efficient Method for *in vitro* Regeneration of Leafy Spurge (*Euphorbia esula* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 44(6):548-556.
- Bingtao Li, Huaxing, Q., Jin-shuang, Ma., Hua, Z., Michael, G. Gilbert Hans-Joachim (Hajo) E., Stefan, D., Petra, H., Lynn, J. G., Maria, V. and Gordon, D. McPherson. (2008). Flora of China. September. 2008. Sitio web: <http://www.efloras.org>, dated 22nd.
- Bruyns, P. V., Mapaya, R. J. and Hedderson, T. 2006. A new subgeneric clasification for *Euphorbia* (Euphorbiaceae) in southern Africa base don ITS and *psbA-trnH* sequence data. – *Taxon*. 55:397-420.
- Calva, C. G. y Pérez, V. J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria*. 10 de noviembre 2005. 6(11) - ISSN: 1067-6079.
- Cronquist, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants (Columbia University Press, New York, 1981).
- Dewir, Y. H., Chakrabarty, D., Hahn E. J. and Paek, K. Y. 2005. Reversion of inflorescence development in *Euphorbia millii* and its application to large-scale micropropagation in an air-lift bioreactor. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 80:581-587.
- Harborne, H. B. 1984. *Phytochemical Methods* (A guide to modern techniques of plant analysis). Second edition, Chapman and Hall, New York, pp: 1-36.
- Hosseini, P. A. and Riina, R. 2001. A Synopsis of *Euphorbia* subgen. *Chamaesyce* (Euphorbiaceae) in Iran. *Annales Botanici Fennici*. 48(4):313.
- Hurtado, M. D. V. y Merino, M. E. 2000. Cultivo de Tejidos Vegetales. 5ª reimpresión. Trillas S.A. de C.V. México, D.F. 232 p.
- Idárraga, P. A. y Callejas P. R. 2011. Análisis florístico de la vegetación del Departamento de Antioquia. En: A Idárraga, R del C Ortiz, R Callejas and M Merello (eds.). *Flora de Antioquia: catálogo de las plantas vasculares*. Vol. II. Editorial D'Vinni, Bogotá, Colombia.

- Kheyroodin, H. and Ghazvinian, K. 2012. Bioactive and Toxic Products found in *Euphorbia Sp.* J. Rec. Adv. Agri. 1(4):103-111.
- Kondamudi, R. K. and Sri, R. M., Pullaiah, T. 2009. Euphorbiaceae - a critical review on plant tissue culture. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 10(3):313-335.
- Lee, C. W., Jeckes, J. and Thomas, J. C. 1982. Culture Propagation of *Euphorbia lathyris*, Horticultural Science. 17:533-553.
- Lynn, K. R. and Clevette-Radford, N. A. 1987. Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. Phytochem. 26(4):939-944.
- Martínez, G. M., Jaime, J. R., Ramiro, C. D., Edgar, J. A., Roberto, G., Angélica, C. and Ricardo, M. H. 2002. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica. 73(2):155-281.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Pierik, R. L. M. 1991. Commercial aspects of micropropagation. In Horticulture New technologies and Applications. (eds) Prakash JK and Pierik RLM, Dordrecht, Netherlands, pp: 141-153.
- Radcliffe-Smith A. 1987. Euphorbiaceae (part 1). In: Polhill, R. M. (Editor). Flora of Tropical East África. A. A. Balkema, Rotterdam, Netherlands. 407 pp.
- Reyes, T. B. 1991. Plantas medicinales y fitoquímica. En: Plantas medicinales de México. Introducción a su estudio. Eric Estrada Lugo (Editor), pp: 452-492.
- Ripley, K. P. and Preece, J. E. 1986. Micropropagation of *Euphorbia lathyris* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 5(3):213-218.
- Rzedowski, J. 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. Acta Botánica Mexicana. 14:3-22.
- Rzedowski, G. C. y Rzedowski, J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán). 1406 pp.
- Steinmann, V. W. 2002. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. Acta Bot. Mex. 61:61-93.

- Steinman, V. W. 2003. The submersion of *Pedilanthus* into *Euphorbia* (Euphorbiaceae). *Acta Botánica Mexicana*. 65:45-50.
- Steinmann, V. W. and Porter, J. M. 2002. Phylogenetic relationships in Euphorbieae (Euphorbiaceae) based on ITS and *ndhF* sequence data. – *Ann. Missouri Bot. Garden*. 89:453-490.
- Stevens, W. D., Ulloa, U. C., Pool, A. y Montiel, O. M. (eds.), 2001. Flora de Nicaragua. Vol. 85, tomos I, II y III. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis, Missouri.
- Stevens, P. F. (2001). Angiosperm Phylogeny Website Versión 9, Junio 2008 y actualizado desde entonces. Sitio web: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> Fecha de acceso: 30 de octubre de 2014.
- Stevens, P. F. 2010. APweb – www.mobot.org/MOBOT/research/APweb Fecha de acceso: 30 de octubre de 2014.
- Tideman, J. and Hawker, J. S. 1982. *In vitro* propagation of latex-producing plants. *Ann. Bot.* 49:273-279.
- Toledo, V. M. 1994. La diversidad biológica de México. *Revista Ciencias*. 34:43-59.
- Webster, G. L. 1994. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 81:33-144.
- Zedan, Z. I., Amany, S. A. and Wael, M. A. M. 2013. Chemical and Biological Studies of *Euphorbia Aphylla*. ISSN: 2320-3358, *Journal of natural remedies*. 13(1). www.jnronline.com.

CAPITULO I

GERMINACIÓN *in vitro* DE SEMILLAS DE *Euphorbia nutans* Lag.

RESUMEN

La planta *Euphorbia nutans* Lag., considerada con propiedades medicinales ha mostrado dificultades para establecerse bajo condiciones *in vitro* mediante ápices, segmentos nodales y tejidos de hoja, por lo que este trabajo se llevó a cabo para determinar el tratamiento que permita la obtención de plantas *in vitro*. Se aplicaron dos métodos de desinfestación de semillas para el establecimiento *in vitro* y se empleó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) 100 % más suplementos, adicionando por separado los reguladores de crecimiento vegetal: BA, AG₃ y AIA en 1.0 mg·L⁻¹. La germinación *in vitro* se evaluó en presencia y ausencia de luz y tres diferentes posiciones de las semillas en el medio de cultivo. Los resultados indican que el tratamiento con AG₃ favoreció la germinación de semillas *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. y la posición de la semilla en el medio de cultivo sí influye en ello ya que se obtuvieron mejores resultados en dos tratamientos al colocarla superficialmente. Así mismo, la presencia de luz juegan un papel fundamental para el proceso de germinación *in vitro* de semillas de *Euphorbia nutans* Lag. (2.7 % de semillas germinadas a las dos semanas y 22.7 % a los 60 días) y en obscuridad hubo nula germinación aún a los 60 días de cultivo *in vitro*. Muriendo la mayoría después de dos meses de cultivo *in vitro* sin pasar los 1.5 cm de longitud. Finalmente, el 100 % de la germinación tuvo éxito al emplear 3 mg·L⁻¹ de nitrato de plata (AgNO₃). Para las respuestas a la germinación se utilizó el modelo de regresiones lineal con una significancia de $p \leq 0.01$ con los datos obtenidos cada semana de cultivo y se utilizó la prueba de la prueba de Tukey ($p=0.05$) para comparar la media del efecto de los tratamientos sobre número y longitud de brotes y raíz.

Palabras clave: Reguladores de crecimiento, luz, obscuridad, profundidad.

INTRODUCCIÓN

La germinación *in vitro* de semillas de *Euphorbia* ha sido poco reportada. En semillas de la *Givotia rottleriformis* Griff (Euphorbiaceae) la germinación aumentó en un 90 % con AG₃ (3 %) después de 36 horas a la siembra (Rambabu *et al.*, 2005). Rambabu *et al.* (2006) presentaron un protocolo para la germinación de *Givotia rottleriformis* (var. Tel. Thella Poniki) mediante el cultivo de embriones zigóticos *in vitro* en un medio de Murashige y Skoog adicionado con 30 g·L⁻¹ de sacarosa obteniendo el 100 % de germinación y encontrando que una concentración mayor o menor a 30 g·L⁻¹ la germinación era menor o se promovía la formación de callo, así el crecimiento de las plántulas obtenidas fue promovido por la adición de 100 mg·L⁻¹ de tirosina en el medio de cultivo, las plántulas germinadas que se mantuvieron en presencia de 0.2-0.4 mg·L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) y 0.3-0.5 mg·L⁻¹ de ácido indol-3-butírico (AIB) fueron anormales, logrando una supervivencia del 60-70 % en la aclimatación de las plántulas obtenidas. Kamatham *et al.* (2012) colocaron semillas de *Givotia rottleriformis* Griff a diferentes temperaturas (35-65 °C) por 24 horas en un medio de cultivo de Murashige y Skoog con los macronutrientes diluidos a la mitad de su concentración, resultando 55 °C como la mejor temperatura para activar la emergencia de los embriones zigóticos logrando una frecuencia de germinación del 96.5 %, además, las plantas obtenidas mostraron un crecimiento superior (37.8 cm) y número de hojas (11.8). Sri y Chandrasekhara (2014), reportaron la germinación de semillas sin testa de *Drypetes roxburghii* (Euphorbiaceae), las cuales fueron cultivadas en un medio de cultivo de Murashiige y Skoog suplementado con 1.4 µM de AG₃ + 0.01 % de carbón activado, resultando una máxima germinación de las semillas de 83.30 ± 0.63 %. Todo parece indicar que el AG₃ tiene un papel primordial para activar la germinación de semillas de plantas de la familia Euphorbiaceae. Como es evidente, la germinación de semillas de Euphorbiaceae ha sido estudiada pero los resultados indican que cada género y especie presenta dificultades particulares para lograr una germinación exitosa. Por lo tanto, en semillas de *Euphorbia nutans* Lag. se plantea determinar el mejor tratamiento con los reguladores de crecimiento: ácido indol-3-acético (AIA), N-6-benciladenina (BA) y ácido giberélico (AG₃), que permita la obtención de plantas

de *Euphorbia nutans* Lag. a partir de semillas *in vitro* bajo condiciones de luz y oscuridad y a partir de ahí inducir respuestas morfogénicas *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

La presente investigación se realizó con semillas de *Euphorbia nutans* Lag. colectadas en Izúcar de Matamoros, Puebla, México, durante el mes de Julio del año 2013 en el Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos Vegetales *in vitro* del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Proceso de desinfestación

Para el establecimiento *in vitro* se aplicaron dos métodos de desinfestación de semillas: a) lavar las semillas con agua y jabón y enjuagar con agua de llave, después colocar en alcohol 70 % v/v durante 1 minuto, en seguida enjuagar con agua de llave y sumergirlas en una solución de cloro 15 % v/v (Cloralex) por 15 minutos, enjuagar tres veces con agua destilada estéril en campana de flujo laminar de aire, y b) lavar las semillas con agua y jabón, enjuagar con agua de llave y colocar en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante 2 horas en agitación.

Condiciones de cultivo *in vitro*

Se empleó el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) 100 %, suplementado con myo-inositol $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, tiamina-HCl $0.40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, sacarosa $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; adicionando por separado los reguladores de crecimiento vegetal: AIA (T4), AG₃ (T3) y BA (T2) en $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, más 0.7 % de agar y ajustando la solución final de los tratamientos a un pH de 5.7 ± 0.01 . Formando cuatro tratamientos en total con el control (T1), el cual únicamente tiene las sales MS 100 % más suplementos pero sin reguladores de crecimiento. Después de diluir el agar en el medio de cultivo se vertieron 20 mL en cada frasco de vidrio con volumen de 100 mL cada uno y se taparon con tapas de polipropileno para esterilizarse por 20 minutos en una

autoclave de vapor de agua tipo horizontal a una temperatura de 121 °C y a 1.5 kg·cm² de presión.

Después de realizada la siembra *in vitro* de las semillas, los frascos de cultivo fueron incubados a 26 ± 2 °C, donde la mitad de repeticiones (tres) de todos los tratamientos se mantuvieron 24 horas con luz artificial mediante lámparas de luz blanca, y la otra mitad se mantuvieron en absoluta oscuridad.

Variables evaluadas

Contaminación por hongos y/o bacterias: Se consideraron frascos de cultivo contaminados si se observaban crecimientos de micelio o placas bacterianas.

Porcentaje de germinación *in vitro* en luz y en oscuridad: Los tratamientos se dividieron en dos partes iguales y una parte (tres frascos por tratamiento) se colocó en el área de incubación bajo lámparas de luz blanca artificial y la otra parte se colocó en una incubadora que se mantuvo cerrada para evitar la presencia de luz.

Número y longitud de brotes: Al final del experimento se retiraron los brotes de los frascos de cultivo y se colocaron bajo hojas milimétricas para contarse y medirse con una regla.

Número y longitud de raíz: Mismo procedimiento empleado para número y longitud de brotes.

Necrosis: Se consideraron semillas y/o tejidos necrosados cuando presentaron una apariencia café-obscura o con liberación de fenoles en el medio de cultivo.

Presencia o ausencia de callo: Se considera presencia de callo cuando resulta un crecimiento celular desorganizado en la base de las plantas.

Posición de la semilla en el medio de cultivo. A: posición superficial de la semilla, B: semilla ligeramente dentro del medio de cultivo, C: semilla completamente dentro del medio de cultivo; considerando cinco semillas por frasco con seis repeticiones por tratamiento.

Análisis de datos

Para las respuestas a la germinación se utilizó el modelo de regresiones lineal con una significancia de $p \leq 0.01$ con los datos obtenidos cada semana de cultivo. Para las variables: número y longitud de brotes y de raíz, se utilizó un análisis de varianza completamente al azar en la evaluación del efecto final de cada tratamiento utilizando la prueba de Tukey ($p=0.05$) para comparar los efectos medios de los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contaminación por hongos y/o bacterias

Los métodos de desinfestación de semillas con cloro al 15 % v/v por 15 minutos y con H_2O_2 en agitación por dos horas fueron óptimos evitando la presencia tanto de hongos como bacterias en el medio de cultivo. Esto resulta de importancia porque a pesar de que el embrión viene cubierto por una testa que lo protege y aísla del medio exterior pueden traer microorganismos contaminantes adheridos, por lo que necesariamente tienen que someterse a un proceso de desinfestación eficiente (Kondamudi *et al.*, 2009), y así, tener éxito en el cultivo *in vitro* ya que se han presentado casos donde la presencia de microorganismos evitan la manipulación celular *in vitro* y por ende la obtención de respuestas morfogénicas.

Además, el empleo de alcohol al 70 % v/v más hipoclorito de sodio 15 % v/v ha sido reportado ampliamente como lo mencionan Asma *et al.* (2008) además de Tween-20 como un agente tenso activo. En explantes de *Euphorbia pulcherrima* el alcohol e hipoclorito de sodio fueron reportados por Bidarigh y Azarpour (2013), utilizando el primero al 10 % por 30 segundos y después hipoclorito de sodio al 30 % por 10 minutos, igualmente enjuagando tres veces con agua destilada estéril bajo flujo laminar de aire, actividades que se pueden reducir con el empleo de H_2O_2 , sin embargo, se debe de tener en cuenta que el H_2O_2 degrada materia orgánica y puede ser potencialmente dañino al estar en contacto directo con tejidos vegetales (ASTRE, 2004; citado por Flores *et al.*, 2008) por lo que su empleo debe de aplicarse sólo para la desinfestación de semillas.

Germinación de semillas *in vitro* en presencia de luz y en oscuridad

Los resultados demuestran que en éste género la ausencia de luz influye inhibiendo la morfogénesis y la germinación *in vitro* de semillas de *Euphorbia nutans* Lag. A las tres semanas en oscuridad no se activó la germinación y por ello, algunos frascos se sacaron a la luz y eso favoreció la germinación de algunas semillas (5 %), en cambio, en luz las semillas iniciaron su germinación antes de dos semanas, además el porcentaje de germinación a los 60 días fue mayor (22.7 %) (Figura 1).

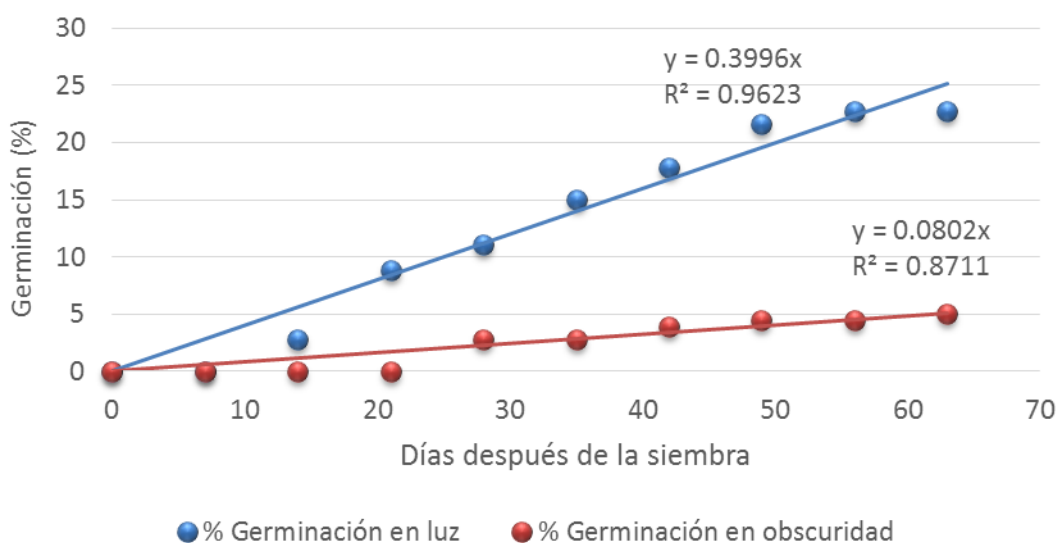


Figura 1. Germinación de semillas de *Euphorbia nutans* Lag. bajo dos condiciones de luz *in vitro*. Cada punto representa el porcentaje calculado cada semana de incubación, $p \leq 0.01$.

Los resultados demuestran que la presencia de luz tiene un papel primordial en la germinación *in vitro* de las semillas de esta especie, esto se debe gracias a que la luz ejerce un efecto estimulador para la germinación, lo cual coincide con Sunandakumari *et al.* (2005), quienes reportaron el efecto de la luz en la morfogénesis de *Euphorbia nivulia* Buch, en tanto que, en oscuridad las respuestas fueron inhibidas. En otro trabajo, la germinación de semillas *in vitro* de chile piquín (*Capsicum annuum*) también mostró un mayor porcentaje de germinación en condiciones de luz que en oscuridad (Datos aún sin publicar), lo que puede indicar

que al ser especies silvestres, tanto chile piquín como *Euphorbia nutans*, cuentan con algún mecanismo fisiológico que les permite germinar en ciertas condiciones, pues los lugares donde se encuentran por lo general son suelos ligeros y delgados.

Efecto de reguladores de crecimiento vegetal en la germinación *in vitro*

El efecto de los reguladores de crecimiento vegetal para promover la germinación *in vitro* de semillas de *Euphorbia nutans* Lag. jugó un papel importante así como la posición de la semilla en el medio de cultivo. El AG₃ activó la germinación en un 60 % (Figura 2, T3) resultados que coinciden con otros trabajos en germinación *in vivo* como es Rambabu *et al.* (2005) quienes también emplearon AG₃ para promover la germinación de semillas de *Givotia rottleriformis* Griff (Euphorbiaceae) alcanzando un 90 % de semillas germinadas en comparación con el testigo con sólo el 5 %. Sri y Chandrasekhara (2014) con semillas frescas de *Drypetes roxburghii* (Euphorbiaceae) y AG₃ reportaron la germinación de un 83.30 ± 0.63 % removiendo la testa de las semillas cultivadas en un medio de cultivo de Murashige y Skoog suplementado con 1.4 μ M de AG₃ + 0.01 % de carbón activado, y posiblemente a ello, obtuvieron resultados superiores a *Euphorbia nutans*, además de que las semillas de *Euphorbia nutans* son muy pequeñas y sería difícil removerles la testa. La respuesta de la germinación a AG₃ puede deberse gracias a que es estimulador de la germinación y además coordina la movilización de las reservas, pues la presencia de giberelinas inducen genes que llevan a la síntesis de α -amilasas, enzimas hidrolíticas que van a romper macromoléculas (almidón) y donde estas moléculas van a pasar al embrión para poder ser utilizadas. La presencia del AIA (T4) fue el segundo tratamiento en favorecer la germinación de las semillas de *Euphorbia nutans* Lag. en un 33.3 % (Figura 2), esto puede ser por el efecto de AIA sobre el “ablandamiento” o despolimerización de la pared celular y la estimulación radicular con lo cual el embrión puede tomar más nutrientes para su activación (Taiz y Zeiger, 2006)

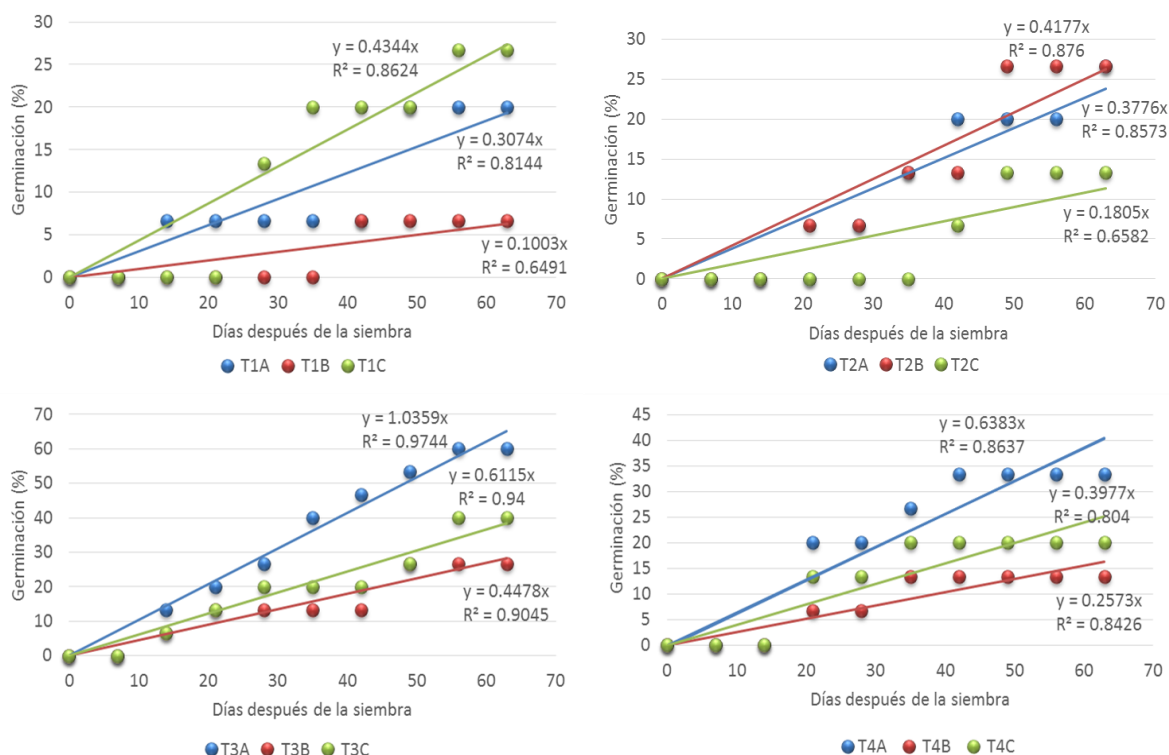


Figura 2. Semillas de *Euphorbia nutans* Lag. germinadas *in vitro* en cuatro tratamientos diferentes y con tres posiciones sobre el medio de cultivo para cada tratamiento. a) Tratamiento testigo (T1), b) Tratamiento con BA $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (T2), c) Tratamiento con AG₃ $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (T3), d) Tratamiento con AIA $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (T4). T: tratamiento; A: posición superficial de la semilla; B: semilla ligeramente dentro del medio de cultivo; C: semilla completamente dentro del medio de cultivo.

La presencia de la citocinina BA (T2) mostró un porcentaje similar de germinación al tratamiento control (T1) (26.6 %) a pesar de ser un movilizador de nutrientes que participa en romper la dormancia de yemas y también en promover la germinación (Taiz y Zeiger, 2006). La posición de las semillas de forma superficial dentro del medio sí presentó un efecto importante, pues como se puede observar en los tratamientos T3 y T4 (Figura 2) el porcentaje de semillas germinadas se vio muy favorecida bajo esta condición, seguida en los otros dos tratamientos. Este efecto puede ser gracias a que la posición superficial de las semillas no sólo las mantiene con buena humedad y nutrientes sino también con una humedad relativa alta y con

mayor capacidad de intercambio gaseoso, lo que resulta estimulador para la germinación del embrión (Taiz y Zeiger, 2006).

Pero a pesar de los resultados obtenidos en la germinación en presencia de luz (22.7 %) y al efecto del AG₃ (60 %) sobre germinación de semillas de *Euphorbia nutans* Lag. éstas no se desarrollaron ni crecieron de forma normal y presentaron la “triple respuesta al etileno” (Figura 3) muriendo la mayoría después de dos meses de cultivo, resultados similares a los obtenidos en *Capsicum annuum* L. var. *glabioscorum* (Resultados sin publicar) y a los obtenidos por Bello-Bello *et al.* (2010) en *Capsicum chinense* J.

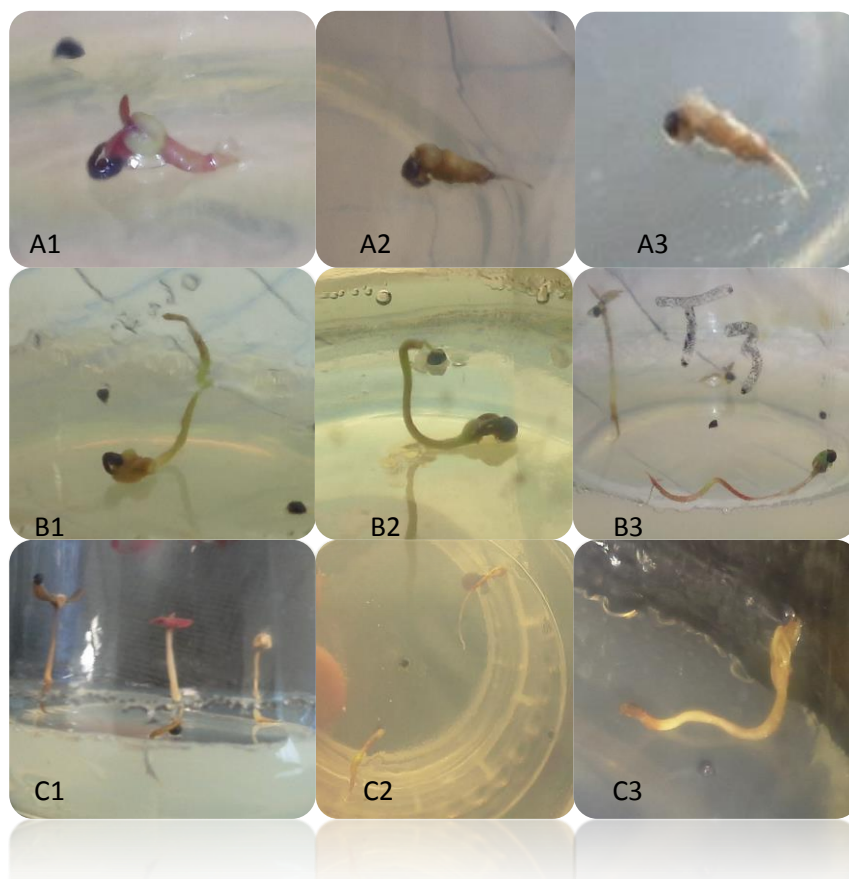


Figura 3. Respuestas a la germinación *in vitro* de semillas de *Euphorbia nutans* Lag. a los 30 días después de su establecimiento.

Además, se observa claramente la deformación de la raíz e incluso de la plántula emergiendo (Figura 3, A), así como problemas de gravitropismo negativo (Figura 3,

B), lo cual se podría entender en el tratamiento control ya que no contiene reguladores. No obstante, el tratamiento con auxina (AIA) favoreció el gravitropismo positivo (Taiz y Zeiger, 2006), sin embargo, las plántulas que logran emerger y presentan un gravitropismo positivo en raíz y negativo en tallo también presentaron un crecimiento muy lento y con color púrpura, muriendo a las 8-9 semanas a consecuencia del daño que sufre la raíz (Figura 3, C), lo que coincide con lo reportado por Ortiz *et al.* (2009) quienes reportan daños en raíces de *Arabidopsis thaliana* a causa de la alta concentración de nitratos o nitrógeno en forma de amonio en el medio de cultivo y el medio de Murashige y Skoog (1962) conlleva una alta cantidad de estas sales inorgánicas. Debido a ello, se realizaron tratamientos con sales MS diluidas al 75, 50 y 35 % de su concentración, colocando de manera superficial a las semillas en el medio de cultivo ya que fue la posición que mejor resultados brindó anteriormente, pero los resultados fueron similares consumando que las semillas de *Euphorbia nutans* Lag. necesitan de aireación (oxigenación) para una correcta germinación, además de la presencia de luz como un estimulador de ésta (Sunandakumari *et al.* 2005).

Formación y longitud de brotes y raíz *in vitro*

Los tratamientos no favorecieron la formación de brotes a pesar de que el T2 tiene BA como regulador de crecimiento, citocinina que ha sido reconocida como promotora en la inducción y/o proliferación de brotes adventicios (Buchanan *et al.*, 2000; Taiz y Zeiger, 2006). Así mismo, la formación de raíz fue sólo la raíz principal, y en la mayoría de los casos, sin raíces secundarias tanto en el tratamiento control (T1) como en el tratamiento que contenía AIA como auxina, la cual está reportada para favorecer dicha respuesta (Buchanan *et al.*, 2000; Taiz y Zeiger, 2006). Las raíces en el tratamiento con AIA fueron más largas, sin embargo, como muestran los resultados en el Cuadro 1 no hay diferencias estadísticas ($p=0.05$) entre la comparación de medias con los tratamientos 3A y 3B.

Además, la apariencia de las plántulas obtenidas con la citocinina BA (C1) y la auxina AIA (C3), ambas en $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, al parecer fue inhibido obteniendo: cero

formaciones de brotes así como de raíz, y además la raíz principal muestra daños graves y las plántulas no crecieron más de 1.5 cm en 9 semanas, quedando también demostrada la inhibición del efecto de AG₃, donde uno de sus principales beneficios es inducir la elongación de plantas (Taiz y Zeiger, 2006).

Cuadro 1. Longitud de plántulas y raíz obtenidas de la germinación de semillas *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag.

Tratamiento	Variables	
	Longitud de brotes (cm)	Longitud de raíces (cm)
4A	0.72 ab	1.02 a
4B	0.65 ab	1.0 a
4C	0.7 ab	0.9 a
3A	1.075 a	0.712 ab
3B	0.875 a	0.45 abc
3C	0.633 ab	0.233 bc
2A	0.525 b	0.15 c
2B	0.55 b	0.175 c
2C	0.4 b	0.1 c
1A	0.6 ab	0.166 c
1B	0.55 ab	0.15 bc
1C	0.725 ab	0.225 bc

Respuestas de semillas germinadas *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. por tratamiento. Los tratamientos que tienen la misma letra, no son estadísticamente diferentes (Tukey, $p = 0.05$).

Necrosis y presencia o ausencia de callo en semillas *in vitro*

La presencia posible de fenoles u otras sustancias en los tejidos de raíz y tallo, principalmente provocaron el necrosamiento (color café oscuro) a partir de la quinta semana de emergidas, los cotiledones se tornaron de color púrpura y nunca

se llegó al desarrollo de una hoja “verdadera” o completa y el 100 % de las plántulas emergidas murieron a las 10 semanas, (Figura 4).

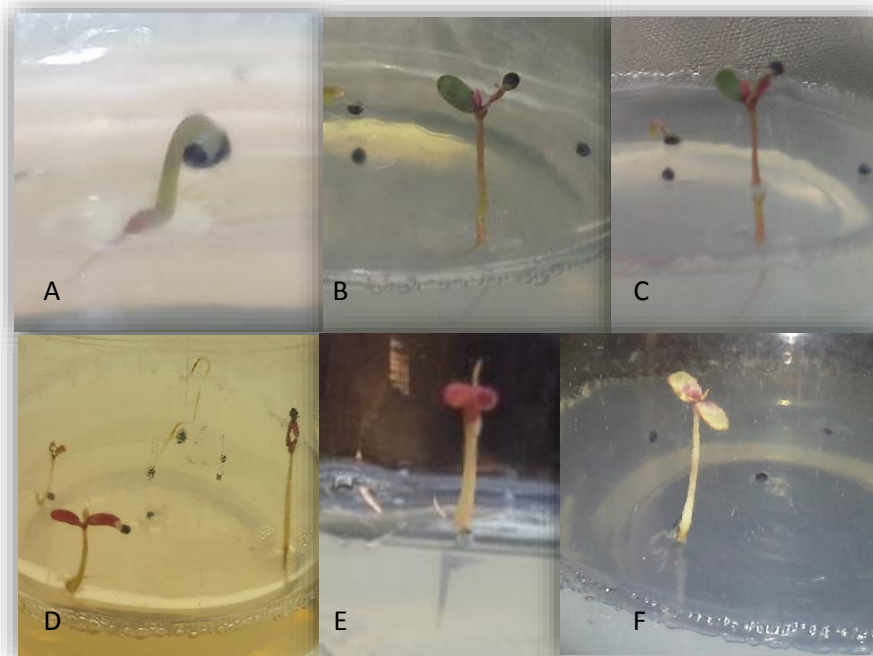


Figura 4. Germinación y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Euphorbia nutans* Lag. A) Emergencia de plántula, B y C) Crecimiento de plántulas a las tres semanas de emergidas, D y E) Plántulas con raíces y tallo necrosado, y cotiledones con coloración púrpura a las cinco semanas de cultivo, F) Plántula muerta a las diez semanas de emergida.

La presencia de callo nunca se observó en las plántulas obtenidas mediante la germinación de semillas *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag., no obstante, Rambabu *et al.* (2006) obtuvieron callos en raíces en presencia de 0.2-0.4 mg·L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) y 0.3-0.5 mg·L⁻¹ de ácido indol-3-butírico (AIB), lo que indica que las dos auxinas reportadas por Rambabu *et al.* (2006) son más afines para plantas de Euphorbiaceae. Pese a, sí coinciden los resultados obtenidos en esta investigación con lo reportado por Rambabu *et al.* (2006) en la obtención de plántulas anormales mediante semillas de *Givotia rottleriformis* germinadas *in vitro*. Por lo tanto, puede ser que las semillas de *Euphorbia nutans* Lag., al igual que otras especies de la misma familia, sean muy sensibles a los reguladores de crecimiento

vegetal, e incluso a concentraciones muy bajas ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) como lo mencionado por Rambabu *et al.* (2006) y por los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, dichas afirmaciones no coinciden con las respuestas obtenidas en el tratamiento control, el cual presenta ausencia de reguladores de crecimiento vegetal y aun así brindó resultados similares a los tratamientos con AG_3 y con AIA, pero no con BA, lo que indica que hay reguladores de crecimiento vegetal específicos para especies de esta familia, al menos para *Euphorbia nutans* Lag., al igual que concentraciones y combinaciones adecuadas de estos.

Adición de nitrato de plata en el medio de cultivo

Debido a los resultados obtenidos (triple respuesta al etileno) en semillas germinadas *in vitro*, resultados en diferentes tejidos como explantes de *Euphorbia nutans* Lag. en pruebas preliminares con ácido ascórbico $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido cítrico $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, carbón activado 1 % y polivinil-pirrolidona (PVP) $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ como antioxidantes en el medio de cultivo (Hurtado y Merino, 2000) y a la observación de semillas germinadas *in situ*, las cuales se desarrollaron con normalidad llegando a florecer a los 27 días después de sembradas, se dedujo que el problema en los recipientes de cultivo *in vitro* era la presencia de etileno ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$), regulador de crecimiento en forma de gas y el cual provoca la senescencia de las plantas siendo inducido por estrés (Taiz y Zeiger, 2006). Por lo tanto, al ser una molécula gaseosa ésta se concentra en los recipientes de cultivo ya que éstos se encuentran sellados mediante una película plástica para evitar la entrada de microorganismos, con lo cual afecta a la respiración celular uniéndose a receptores de membrana de la mitocondria y al sobresaturarla evita la transferencia de electrones para la síntesis de ATP (Adenosin-tri-fosfato) el cual es fundamental para la elaboración de lípidos, carbohidratos, aminoácidos, y otros, además de mandar señales de alerta y activar la muerte celular (Taiz y Zeiger, 2006); situación que no pasa con las semillas y plantas *in situ*, pues al haber aireación el etileno que se produce es liberado rápido sin llegar a causar estos daños.

Por ello, se decidió recurrir a un inhibidor de la función del etileno como es el nitrato de plata (AgNO_3) en $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ favoreciendo el 100 % de la germinación de semillas

de *Euphorbia nutans* (20 tubos de ensaye cada uno con una semilla) al cabo de una semana, y en dos semanas las plantas medían entre 7 y 9 cm de longitud. Por lo tanto, se cree que no sólo el ácido absícico y el ácido giberélico regulan en mayor grado el proceso de germinación, sino también el etileno.

CONCLUSIONES

El método de desinfestación de semillas de *Euphorbia nutans* Lag. para su establecimiento *in vitro*, de los dos evaluados, es indistinto ya que con ambos métodos no hubo la presencia de contaminantes.

La presencia de luz influyó positivamente en el porcentaje de germinación de las semillas *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. en porcentaje con respecto a las que se colocaron en obscuridad.

El tratamiento con AG₃ favoreció la germinación de semillas *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. respecto a los demás tratamientos, además, se muestra que la posición superficial de la semilla en el medio de cultivo obtuvo los mejores resultados en dos tratamientos.

La presencia de AgNO₃ en el medio de cultivo permite la germinación exitosa de semillas de *Euphorbia nutans* Lag., lo que indica que el etileno juega un papel importante en la inhibición de la germinación de semillas de *Euphorbia nutans* Lag.

LITERATURA CITADA

- Asma, N., Kashif, A. and Saifullah, K. 2008. *In vitro* propagation of *Croton* (*Codiaeum variegatum*), Pakistan Journal of Botany. 40:99-104.
- Bello-Bello, J. J., Canto-Flick, A., Balam-Uc, E., Gómez-Uc, E. and L.-Robert M. 2010. Improvement of *in vitro* proliferation and elongation of habanero pepper shoots (*Capsicum chinense* Jacq.) by temporary immersion. Hortscience. 45(7):1093–1098.
- Bidarigh, S. and Azarpour, E. 2013. Effect of BA and GA₃ application on Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) under *In-Vitro* conditions. International Journal of Agriculture and Crop Sciences (IJACS). 5(10): 1053-1057.

- Flores, A., Álvarez-Moctezuma J. G., Rodríguez de la O, J. L., Corona, A. A. 2008. Germinación *in vitro* de semillas de *Nolina parviflora* (H.B.K.) Hemsl. Foresta veracruzana. 10(2):27-33.
- Hidenobu, U., Kiyoshi, O., Masashi, S., Hirofumi, Y., Toshiya, M., Kanji, O. 2010. Triterpenoid levels are reduced during *Euphorbia tirucalli* L. callus formation. Plant Biotechnology. 27: 105-109.
- Hurtado, M. D. V. y Merino, M. E. 2000. Cultivo de Tejidos Vegetales. 5ª reimpresión. Trillas S.A. de C.V. México, D.F. 232 p.
- Jamal, A. H. S., Mark, F. A. and Stephen, M. D. 1993. Effect of 2,4-D on leafy spurge (*Euphorbia esula*) viable seed production. Weed Technology. 7: 76-78
- Kamatham, S., Rajesh, Y., Padmaja, G. 2012. Temperature pre-treatment of seeds for overcoming the zygotic embryo dormancy of *Givotia rottleriformis* Griff. under *in vitro* conditions. The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology. 6:19-23.
- Kondamudi, R., Sri-Rma, M. K., Pullaiah, T. 2009. Euphorbiaceae - a critical review on plant tissue culture. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 10(3):313-335.
- Murashige, T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Ortiz-Castro, R., Martínez-Trujillo, M., López-Bucio, J., Cervantes, C. y Carreón, A. 2009. Restauración del crecimiento radical por nutrimentos inorgánicos en *Arabidopsis thaliana* L. expuesta a cromo. Terra latinoamericana. 27(2):97-103.
- Ortuño O. L., Manzo G. A., Peña L. A. 1998. Cultivo de anteras en tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Revista Chapingo, Serie Horticultura. 4(1): 39-43.
- Rambabu, M., Ujjwala, D., Ugandhar, T., Praveen, M., Upender, M. and Swamy, N. R. 2005. Effect of GA₃ on enhancement of *in vivo* seed germination in *Givotia rottleriformis* (Euphorbiaceae) an endangered forest tree. Indian Forestry. 131:25-30.

- Rambabu, M., Upender, D. U., Ugandhar T., Praveen M. and Rama, S. N. 2006. *In vitro* zygotic embryo culture of an endangered forest tree *Givotia rottleriformis* and factors affecting its germination and seedling growth. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 42:418-421.
- Sri-Rama, M. K. and Chandrasekhara, R. M. 2014. Micropropagation and conservation strategies of the potentially medicinal and economically important tropical deciduous tree - *Drypetes roxburghii* (Wall.) Hurursawa. *Journal of Medicinal Plant Research*. 8(20):870-880.
- Sunandakumari, C., Zhang C. L., Martin K. P., Slater A., Madhusoodanan, P. V. 2005. Effect of auxins on indirect *in vitro* morphogenesis and expression of gusA transgene in a lectinaceous medicinal plant, *Euphorbia nivulia* Buch.-Ham. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 41(5):695-699.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2006. Fisiología Vegetal. Publicacions de la Universitat I de Catellón. Vol II. Traducido de la 3ra edición. 1338 p.
- Zhang, H. and Forde, B. 2000. Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany*. 51:51-59.

CAPITULO II

EVALUACIÓN DE RESPUESTAS MORFOGÉNICAS *in vitro* EN *Euphorbia nutans* Lag.

RESUMEN

La *Euphorbia nutans* Lag. es una planta con propiedades medicinales para tratar problemas de gastritis; no obstante, se carece de estudios científicos por lo que se propone el presente estudio en cultivo de tejidos vegetales *in vitro* con la intención de contar con un protocolo eficiente para su micropropagación. Se evaluaron diferentes tejidos vegetales como explantes y los reguladores de crecimiento vegetal: 6-Benciladenina (BA), ácido naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-acético (AIA) en un medio de cultivo básico con las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) 100 %, suplementado con 3 % de azúcar de mesa, 100 mg·L⁻¹ de mio-inositol, 0.7 % agar-agar y 0.40 mg·L⁻¹ de tiamina-HCl. Los datos de las variables: formación y longitud de brotes, número y longitud de raíz se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza completamente al azar y finalmente se aplicó la prueba de Tukey (p=0.05) para definir la significancia del efecto de los tratamientos. Los resultados indican que la combinación de BA con AIA fue más eficiente para la obtención de brotes mediante organogénesis directa a partir de lámina foliar y la combinación de BA con ANA fue mejor para la inducción de raíz. En segmentos nodales y ápices, también se lograron respuestas morfogénicas donde el efecto de los reguladores de crecimiento fue similar a lo ocurrido en hojas. Finalmente, las plantas obtenidas *in vitro* se aclimataron exitosamente en invernadero con un 90 % de sobrevivencia.

Palabras clave: Morfogénesis, organogénesis, reguladores de crecimiento, aclimatación.

INTRODUCCIÓN

El empleo del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* en géneros y especies de Euphorbiaceae ha sido limitado para *Euphorbia nutans* Lag. a pesar de haber

diversos trabajos sobre cultivo de células y tejidos vegetales en Euphorbiaceae desde hace tiempo (Nataraja *et al.*, 1973; Gunatilleke y Samaranayake, 1988; Davis y Olson, 1993; Yamuna *et al.*, 1995; Bhagwat *et al.*, 1996; Qurashi y Mishra, 1998). Otros resultados importantes de plantas medicinales como *Phyllanthus amarus*, planta de otra familia a Euphorbiaceae pero con rasgos similares morfológicamente, es reportado por Bhattacharyya y Bhattacharya (2001) logrando el 80 % de sobrevivencia. No obstante, plantas de Euphorbiaceae con valor ornamental como *Euphorbia pugniformis* es reportada por Balotis y Papafotiou (2003). En otro estudio, se reporta la propagación *in vitro* de *Jatropha curcas* cultivadas en el medio MS + N6-bencil-amino-purina (BAP) en 2 mg·L⁻¹ y AIA (0.5 mg·L⁻¹) logrando del 60-70 % de sobrevivencia de las plantas en suelo (Rajore y Batra, 2005). También, Kaewsuwan *et al.* (2005) reportan la propagación *in vitro* de *Mallotus repandus* (Euphorbiaceae) y un año después Villaluz (2006) desarrolló un protocolo para la propagación rápida y masiva de *Manihot esculenta*. Más recientemente, Asma *et al.* (2008) mencionan la micropropagación de *Codiaeum variegatum* (Euphorbiaceae) en medio MS + BAP (0.5 mg·L⁻¹) + peptona (25 mg·L⁻¹) + extracto de malta (25 mg·L⁻¹), lo cual mejoró la formación de brotes, y el enraizamiento se llevó a cabo en un medio MS + ácido indol-butírico (IBA) en 2 mg·L⁻¹, donde finalmente las plántulas obtenidas se aclimataron con un 95 % de supervivencia.

Como es evidente, se han empleado diferentes tejidos vegetales como explante, y en el caso de meristemas, Pierik (1991) menciona que los meristemas nodales son una importante fuente de tejido para la micropropagación, donde las plantas cultivadas a partir de estos son comparativamente más resistente a la variación genética ya que no necesitan desdiferenciarse para volverse a diferenciar como el caso de explantes nodales de *Euphorbia pulcherrima*, que al ser cultivadas en un medio de cultivo MS + ANA, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), kinetina (KIN) y 2-isopentil-adenina (2i-p) generaron callo embriogénico (Jasrai *et al.*, 2003). De igual forma, se han empleado segmentos nodales en *Euphorbia tirucalli* (Uchida *et al.*, 2004), en *Mallotus repandus*, donde BAP originó brotes múltiples y ANA originó raíz (Prathantharug *et al.*, 2007). También se ha reportado el cultivo de hojas *in vitro* como explantes en *Manihot esculenta* (Ma y Xu, 2002), en *Croton urucurana*

(Lima *et al.*, 2008). En otra publicación, Martín *et al.*, (2005) informaron del efecto de las auxinas en la morfogénesis directa *in vitro* de las células del mesófilo de *Euphorbia nivulia*, donde KIN redujo la tasa de morfogénesis y BAP indujo la embriogénesis somática. Así mismo, la combinación de BA con ANA y AIA tuvo un efecto positivo en la morfogénesis. En información más reciente, Bin *et al.* (2008) mencionan la propagación *in vitro* de *Euphorbia ésula* en un medio MS más BAP y AIB, obteniendo brotes directamente de la base del explante o a partir de callos después de 30 días de cultivo. También se reporta la propagación *in vitro* de *Ricinus cummunis* L. por Sujatha *et al.* (2008) y por Kamrun y Rita (2012). Dinum y Brian (2010) mencionan la brotación *in vitro* de *Euphorbia pulcherrima* mediante BA y AIA, y Bidarigh y Azarpour (2013) informan sobre el efecto de BA y AG₃ sobre *Euphorbia pulcherrima* Willd. En este año, Salamma y Ravi (2014) reportan la propagación *in vitro* de *Croton scabiosus* Bedd. en un medio MS adicionado con BAP y AIA. Así mismo, las respuestas morfogénicas se deben al efecto de la temperatura, luz, pH, reguladores del crecimiento y la orientación del explante en el medio de cultivo. Estos factores tienen un gran efecto sobre la respuesta del explante pero hay muy pocos trabajos donde se han considerado estos aspectos (Kondamudi *et al.*, 2009), y uno de ellos es mencionado hace ya tiempo por Ripley y Preece (1986) en *Euphorbia lathyris*. Basándose en los antecedentes, el objetivo de la presente investigación es analizar diferentes tipos de explantes y medios de cultivo para la obtención de respuestas morfogénicas *in vitro* en *Euphorbia nutans* Lag.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

La presente investigación se realizó durante el año 2014 utilizando hojas, segmentos nodales y ápices de *Euphorbia nutans* Lag., colectadas en Izúcar de Matamoros, Puebla, México. El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos Vegetales *in vitro* del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Proceso de desinfestación

Para el establecimiento *in vitro*, los tejidos vegetales se lavaron con agua corriente y jabón; después se colocaron en alcohol 70 % v/v durante 30-60 segundos y posteriormente se enjuagaron con agua de llave. Enseguida los tejidos fueron sumergidos 15 minutos en una solución de cloro 15 % v/v (Cloralex) y se trasladaron a la campana de flujo laminar; transcurridos los 15 minutos se lavaron tres veces con agua destilada estéril para poder ser sembrados en sus respectivos tratamientos.

Condiciones de cultivo *in vitro*

El medio de cultivo base fueron las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) 100 %, suplementado con myo-inositol 100 mg·L⁻¹, tiamina-HCl 0.40 mg·L⁻¹, sacarosa 30 g·L⁻¹ y AgNO₃ 3 mg·L⁻¹, adicionando por separado los reguladores de crecimiento vegetal: AIA, ANA y BA, más 0.7 % de agar-agar y ajustando la solución final de los tratamientos a un pH de 5.7 ± 0.01. Después de diluir el agar en el medio de cultivo, éste se vertió en tubos de ensayo en una cantidad de 10 mL por tubo y se taparon con tapas de polipropileno para esterilizarse por 20 minutos en una autoclave de vapor de agua tipo horizontal a una temperatura de 121 °C y a 1.5 kg.cm² de presión. Después de realizada la siembra *in vitro* de los tejidos, los tubos de cultivo fueron incubados a 26 ± 2 °C y con 24 horas con luminosidad 16 hrs luz y 8 de oscuridad con lámparas fluorescentes de luz blanca.

Tratamientos

Para evaluar las variables *in vitro* se combinaron BA con AIA y nuevamente BA ahora con ANA para tener un conocimiento más amplio sobre las respuestas morfogénicas de los tejidos de esta planta bajo el efecto de diferente auxina y una misma citocinina (Cuadro 1 y 2).

Cuadro 1. Tratamientos para evaluar las respuestas morfogénicas *in vitro* de los tejidos de *Euphorbia nutans* Lag. con AIA + BA.

No. de Tratamiento	AIA mg·L-1	BA mg·L-1
1	0	0
2	0	0.5
3	0	1
4	0.5	0
5	0.5	0.5
6	0.5	1
7	1	0
8	1	0.5
9	1	1

Cuadro 2. Tratamientos para evaluar las respuestas morfogénicas *in vitro* de los tejidos de *Euphorbia nutans* Lag. con ANA + BA.

No. de Tratamiento	ANA mg·L-1	BA mg·L-1
1	0	0
2	0	0.5
3	0	1
4	0.5	0
5	0.5	0.5
6	0.5	1
7	1	0
8	1	0.5
9	1	1

Variables evaluadas

Contaminación por hongos y/o bacterias: Se consideraron frascos de cultivo contaminados si se observaban crecimientos de micelio o placas bacterianas.

Número y longitud de brotes: Al final del experimento se retiraron los brotes de los frascos de cultivo y se colocaron bajo hojas milimétricas para contarse y medirse con una regla.

Número y longitud de raíz: Mismo procedimiento empleado para número y longitud de brotes.

Necrosis: Se consideraron semillas y/o tejidos necrosados cuando presentaron una apariencia café-obscura o con liberación de fenoles en el medio de cultivo.

Presencia o ausencia de callo: Se considera presencia de callo cuando resulta un crecimiento celular desorganizado en la base de las plantas.

Posición de hojas en el medio de cultivo: Se evaluaron dos posiciones: El haz de la lámina foliar hacia arriba del medio de cultivo y la posición del haz hacia abajo o en contacto con el medio de cultivo.

Análisis de datos

Para la obtención de datos de respuesta se consideraron 10 repeticiones por tratamiento tomando un tubo de ensaye como unidad experimental con un explante y registrando las observaciones cada semana durante 8 semanas. Se utilizó un análisis de varianza completamente al azar en la evaluación final de cada tratamiento sobre las variables: número y longitud de brotes y de raíz, y se aplicó la prueba de Tukey ($p=0.05$) para definir la diferencia entre los efectos medios de los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contaminación por hongos y/o bacterias

Posteriormente a la siembra *in vitro* de los tejidos como: hojas, segmentos nodales y ápices, no presentaron presencia de hongos o bacterias contaminantes, lo cual indica que el método de desinfestación, en este contexto el establecimiento *in vitro* resultó muy eficiente, resultados que coinciden a los reportados por Asma *et al.* (2008) y a lo sugerido por Kondamudi *et al.* (2009), ya que el establecimiento de los diferentes tejidos también tuvieron éxito y se pudo llevar a cabo el experimento. Sin embargo, este método de desinfestación no debe considerarse universal ya que depende del tipo de tejido, especie y procedencia de los explantes tal y como lo reportan Bidarigh y Azarpour (2013) en *Euphorbia pulcherrima* citando hipoclorito de sodio y alcohol etílico al 10 % por 30 segundos, y no necesariamente al 15 % por 15 minutos.

Cultivo de hojas *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag.

Los resultados demostraron que la polaridad o posición del haz de la hoja sobre el medio de cultivo jugó un papel muy importante al igual que la combinación de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. En este caso fue más eficiente la posición del envés en contacto con el medio de cultivo (haz hacia arriba) para la obtención y longitud de brotes (Cuadro 3), resultados similares al efecto de BA + AIA en $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en explantes de *Glochidion multiloculare* (Yamuna *et al.* (1995). Para la formación y longitud de raíz, la posición del haz y/o envés de las hojas no fue significativa, sino el tratamiento empleado (T7) con AIA en $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. En el Cuadro 3, se muestra que los resultados coinciden con Davis y Olson (1993) en *Euphorbia esula*, pero el tratamiento 4 con sólo AIA no favoreció la formación de raíz en ninguna de las dos posiciones de la lámina foliar en *Euphorbia nutans* Lag.

Los resultados obtenidos con AIA y BA difieren al combinar AIA y BA (Cuadro 4), estableciendo que el tipo de auxina afecta de manera distinta las respuestas organogénicas en lámina foliar de *Euphorbia nutans* Lag. Siendo mejor la combinación de BA+ AIA para la formación de brotes mediante organogénesis directa, ya que posiblemente en esta especie active genes para células especializadas tipo SAM. Ma y Xu (2002) en *Manihot esculenta* obtuvieron brotes empleando BAP y Kaewsuwan *et al.* (2005) en *Mallotus repandus* con BA, resultados que no coinciden con los obtenidos en los tratamientos 2 y 3 (Cuadro 4) y sólo parece ser que la posición de la hoja favoreció la formación de brotes (Cuadro 3) de manera esporádica.

Por otra parte, Bidarigh y Azarpour (2013) emplearon BA y AG_3 *in vitro* en *Euphorbia pulcherrima* Willd, encontrando que el efecto de BA en el género *Euphorbia* no es muy eficiente. Salamma y Ravi (2014) en la propagación *in vitro* de *Croton scabiosus* Bedd. en un medio MS adicionado con $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BAP y $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AIA obtuvieron 5.37 ± 0.12 brotes; Bhattacharyya y Bhattacharya (2001) en *Phyllanthus amarus* mencionan el empleo de BAP, KIN y AIA en $0.1\text{-}1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, donde KIN es

más eficiente para la regeneración de brotes *in vitro*, sin embargo, su efecto es mayor al combinarse con AIA, demostrando que la adición de AIA + BA al medio de cultivo MS juega un papel muy importante para la formación de brotes *in vitro* en Euphorbiaceas, de igual forma, Rajore y Batra (2005) coinciden en *Jatropha curca* al emplear BA 2 mg·L⁻¹ + AIA 0.5 mg·L⁻¹, y a los resultados obtenidos en los tratamientos 6, 8 y 9 en este trabajo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Número y longitud de brotes y raíz *in vitro* a partir de hojas de *Euphorbia nutans* Lag. con AIA y BA.

Tratamiento	No. de brotes		Long. de brotes (cm)		No. de raíz		Long. de raíz (cm)	
	Haz arriba	Haz abajo	Haz arriba	Haz abajo	Haz arriba	Haz abajo	Haz arriba	Haz abajo
1. MS (1962) 100 % + suplementos	0	0	0	0	0	0	0	0
2. MS (1962) 100 % + suplementos + BA 0.5 mg·L ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0
3. MS (1962) 100 % + suplementos + BA 1.0 mg·L ⁻¹	0	2 a	0	2 a	0	0	0	0
4. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 0.5 mg·L ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0
5. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 0.5 mg·L ⁻¹ + BA 0.5 mg·L ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0
6. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 0.5 mg·L ⁻¹ + BA 1.0 mg·L ⁻¹	3.66 b	0	0.75 a	0	0	0	0	0
7. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 1.0 mg·L ⁻¹	0	0	0	0	5 a	5.2 a	20.9 a	20.6 a
8. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 1.0 mg·L ⁻¹ + BA 0.5 mg·L ⁻¹	14 a	0	0.6 a	0	0	0	0	0
9. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 1.0 mg·L ⁻¹ + BA 1.0 mg·L ⁻¹	19.6 a	0	0.45 a	0	0	0	0	0

Respuestas organogénicas *in vitro* en hojas de *Euphorbia nutans* Lag., por tratamiento. Los tratamientos que tienen la misma letra, no son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05).

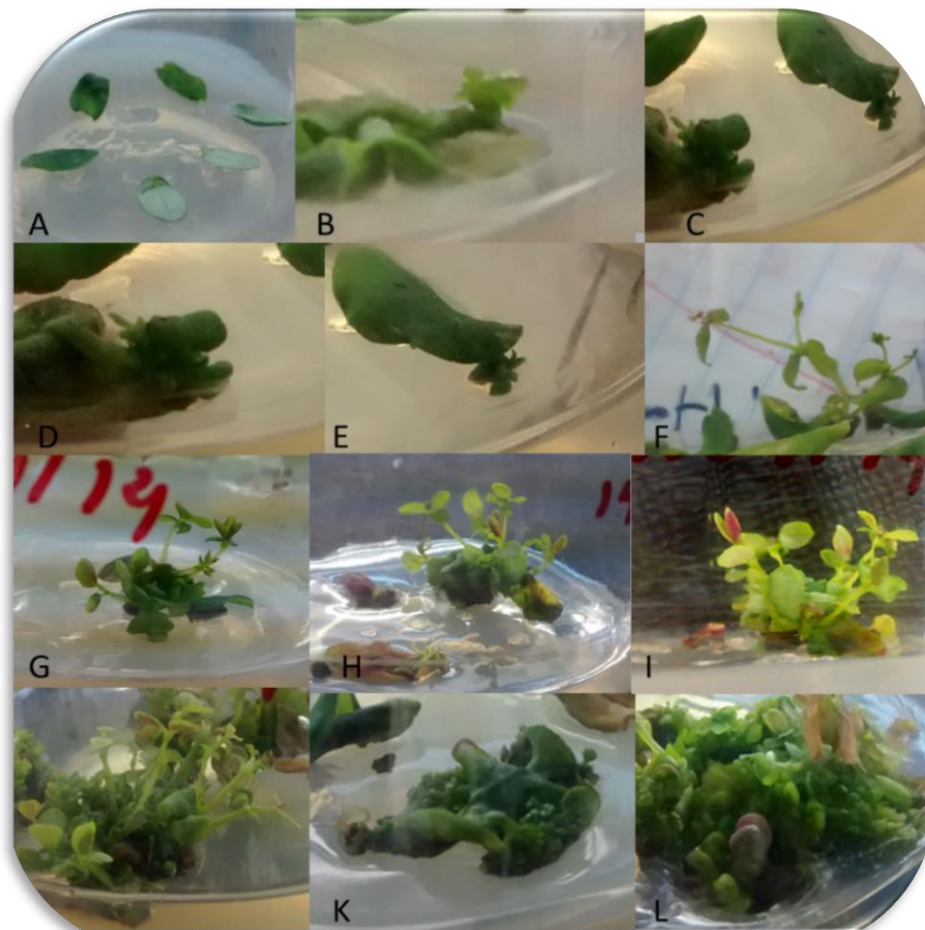


Figura 1. Obtención de brotes en hojas *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. en medio MS 100 % + suplementos + BA y AIA. A) Establecimiento de hojas con haz hacia arriba y hacia abajo, B) Formación directa de brotes en hojas con haz hacia abajo, C-E) Formación directa de brotes en hojas con haz hacia arriba, F-J) Formación y longitud de brotes con 0.5 mg·L⁻¹ AIA + 1.0 mg·L⁻¹ BA, K y L) Formación de brotes con 1.0 mg·L⁻¹ AIA + 0.5 mg·L⁻¹ BA y 1.0 mg·L⁻¹ AIA + 1.0 mg·L⁻¹ BA respectivamente, a las 8 semanas de cultivo.

Los resultados en el Cuadro 4 no coinciden con Ma y Xu (2002) en *Manihot esculenta*, refiriéndose principalmente a la proliferación de brotes, pues mencionan a ANA como un regulador eficiente en la obtención de embriones somáticos o brotes múltiples a partir del cultivo de hojas, y en el presente trabajo los resultados con 0.5 y 1.0 mg·L⁻¹ de ANA fueron nulos en la obtención de brotes (tratamientos 4 y 7).

También Ma y Xu (2002) mencionan a BAP como una citocinina eficiente para la formación de brotes a partir de hojas en *Manihot esculenta*, pero en *Euphorbia nutans* Lag. empleando BA en 0.5 y 1.0 mg·L⁻¹ no favorecieron dicha respuesta, pues aunque son citocininas muy similares, está claro que su mecanismo de acción es diferente para cada especie. Martin *et al.*, (2005), señaló que la KIN redujo las respuestas morfogénicas y que BAP indujo la embriogénesis somática, concluyendo que tanto el tipo de reguladores así como la concentración son factores fundamentales en las respuestas morfogénicas *in vitro*.

Los resultados combinando BA, ANA y AIA tuvieron un efecto positivo en las respuestas morfogénicas, BA y AIA favorecieron la formación de brotes a partir de lámina foliar en mayor cantidad que BA + ANA, y ANA tuvo efecto favorable en la formación de raíces en lámina foliar de *Euphorbia nutans* Lag., no así para formación de brotes en combinación con BA. Resultados que coinciden con Balotis y Papafotiou (2003) en *Euphorbia pugniformis*, empleando BA y ANA en 0.1 mg·L⁻¹ para la inducción de brotes en ápices de brotes laterales (yemas axilares), estos reguladores en bajas concentraciones resultan eficientes para inducir la brotación múltiple *in vitro* en *Euphorbias*.

Cuadro 4. Número y longitud de brotes y raíz *in vitro* a partir de hojas de *Euphorbia nutans* Lag. con ANA y BA.

Tratamiento	No. de brotes		Long. de brotes (cm)		No. de raíz		Long. de raíz (cm)	
	Haz arriba	Haz abajo	Haz arriba	Haz abajo	Haz arriba	Haz abajo	Haz arriba	Haz abajo
1. MS (1962) 100 % + suplementos	0	0	0	0	0	0	0	0
2. MS (1962) 100 % + suplementos + BA 0.5 mg·L ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0
3. MS (1962) 100 % + suplementos + BA 1.0 mg·L ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0
4. MS (1962) 100 % + suplementos + ANA 0.5 mg·L ⁻¹	0	0	0	0	3.95 c	3.48 b	11.5 c	10.65 c
5. MS (1962) 100 % + suplementos + ANA 0.5 mg·L ⁻¹ + BA 0.5 mg·L ⁻¹	1.5 a	1.7 a	0.65 a	0.55 a	0	0	0	0
6. MS (1962) 100 % + suplementos + ANA 0.5 mg·L ⁻¹ + BA 1.0 mg·L ⁻¹	0	0	0	0	0	0	0	0
7. MS (1962) 100 % + suplementos + ANA 1.0 mg·L ⁻¹	0	0	0	0	15.38 a	7.58 a	18.2 a	17.7 a
8. MS (1962) 100 % + suplementos + ANA 1.0 mg·L ⁻¹ + BA 0.5 mg·L ⁻¹	0	0	0	0	7.88 b	8.9 a	15.45 b	17 a
9. MS (1962) 100 % + suplementos + ANA 1.0 mg·L ⁻¹ + BA 1.0 mg·L ⁻¹	0	0	0	0	5.56 c	4.75 b	14.48 b	12.35 b

Respuestas organogénicas *in vitro* en hojas de *Euphorbia nutans* Lag., por tratamiento. Los tratamientos que tienen la misma letra, no son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05).

La inducción de raíz (Cuadro 4), coincide con Kaewsuwan *et al.* (2005) quienes obtuvieron raíces con ANA (32.23µM). Ricardo *et al.* (2007) utilizaron segmentos de tallo de *Manihot esculenta* en el medio de cultivo MS con ANA para inducir y desarrollar brotes y raíz. En *Euphorbia turicalli* las raíces de los brotes fueron inducidas en el medio LS + ANA (0.02 mg·L⁻¹) seguido de medio LS como medio

basal, teniendo éxito para obtener plántulas completas con raíz aún sin auxinas (Uchida *et al.*, 2004). Prathanturarug *et al.* (2007) en *Mallotus rapandus* usaron ANA para inducir raíces en brotes obtenidos. Asma *et al.* (2008) crecieron los ápices de los brotes de *Codiaeum variegatum* en un medio MS + 2 mg·L⁻¹ de AIB, el cual resultó eficiente en la inducción de raíces en plantas de Euphorbiaceae.

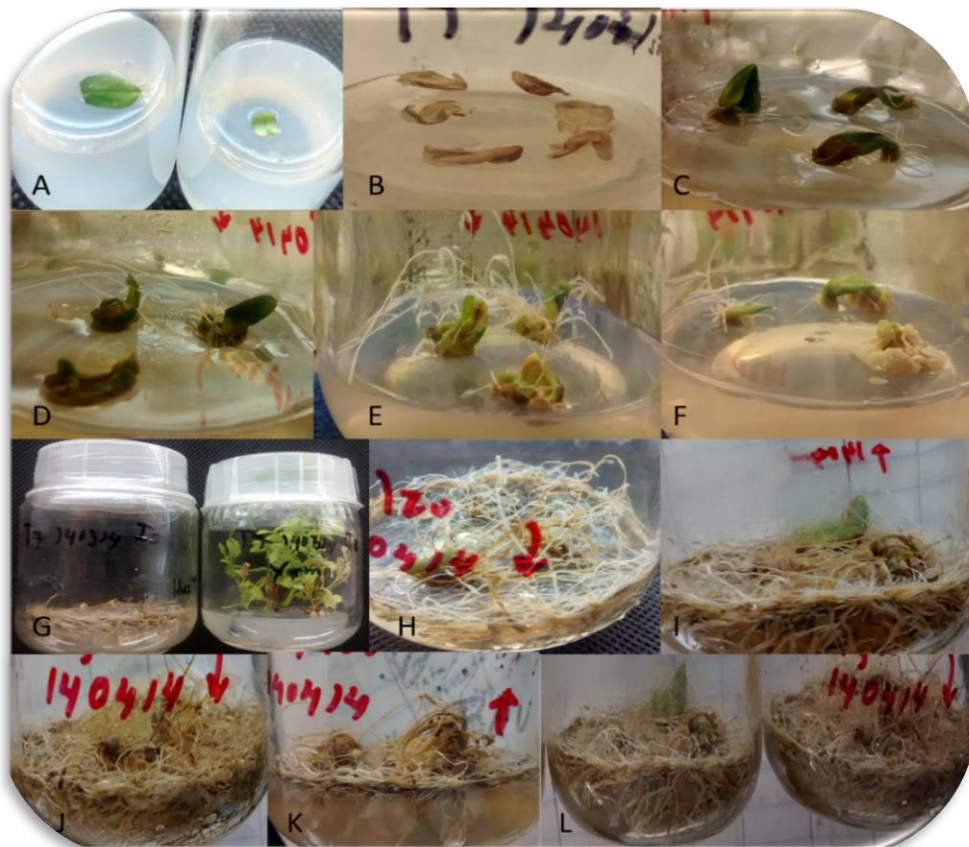


Figura 2. Raíces *in vitro* a partir de hojas de *Euphorbia nutans* Lag. en MS 100 % + suplementos + ANA y BA. A) Establecimiento *in vitro* de hojas con el haz hacia arriba y hacia abajo o en contacto con el medio, B) Hojas sin respuesta, C y D) Formación de raíz tratamiento con 0.5 mg·L⁻¹ de ANA, E y F) Formación de raíz con 1.0 mg·L⁻¹ de BA y ANA, G-L) Formación de raíces con 1.0 mg·L⁻¹ de ANA a las 8 semanas de cultivo.

Cultivo de segmentos nodales *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag.

Para la inducción de brotes múltiples a partir de segmentos nodales, las combinaciones de AIA + BA y ANA + BA (Cuadro 5 y 6, respectivamente) no fueron favorables, no obstante, Bhagwat *et al.* (1996) en *Manihot esculenta* reportaron la brotación empleando un medio MS + BA (2.2 μM) + AG₃ (1.6 μM) y en *Euphorbia nutans* los segmentos nodales, en los tratamientos 6 y 7 del Cuadro 6, formaron brotes múltiples en la base del tallo, resultados esperados en el tratamiento 6 (1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA + 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA) por la presencia de BA; sin embargo, en el tratamiento 7 con ANA en 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ también se obtuvo esa respuesta. Es interesante cómo en tejidos de hoja favorecen la formación de raíces y en segmentos nodales favorecen la formación de brotes no sólo a partir de las yemas axilares, sino directamente del tallo en contacto con el medio de cultivo. Siendo estadísticamente similares todos ellos a los tratamiento 5 y 8 (Cuadro 5) considerados como los más sobresalientes. El tratamiento 4 fue el mejor en favorecer la formación de raíz a partir de segmentos nodales (Cuadro 5), sin embargo, aparentemente es rebasado por el tratamiento 4 del Cuadro 6, diferentes auxinas pero en la misma concentración (0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) lo que indica que el efecto de las auxinas es diferente para esta variable en *Euphorbia nutans* Lag. y a mayor concentración de ANA la formación de raíces es más eficiente (tratamiento 7 y 8 del Cuadro 6), pero no es así cuando a dicha concentración de ANA se combina con BA.

Cuadro 5. Número y longitud de brotes y raíz *in vitro* a partir de segmentos nodales de *Euphorbia nutans* Lag. con AIA y BA.

Tratamiento	Número de brotes por segmento nodal	Longitud de brotes por segmento nodal (cm)	Número de raíz en segmento nodal	Longitud de raíz en segmento nodal
1. MS (1962) 100 % + suplementos	1.8 ab	11.95 a	2.4 c	17.3 a
2. MS (1962) 100 % + suplementos + BA 0.5 mg·L ⁻¹	1.9 ab	9.95 ab	3.0 c	4.0 c
3. MS (1962) 100 % + suplementos + BA 1.0 mg·L ⁻¹	2.3 ab	10.05 ab	2.75 c	5.65 bc
4. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 0.5 mg·L ⁻¹	2.1 ab	9.25 ac	9.45 a	2.15 d
5. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 0.5 mg·L ⁻¹ + BA 0.5 mg·L ⁻¹	2.3 a	13.3 ad	3.15 bc	8.5 b
6. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 0.5 mg·L ⁻¹ + BA 1.0 mg·L ⁻¹	2 ab	14.4 ad	4 b	8 b
7. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 1.0 mg·L ⁻¹	2.1 ab	5.75 b	1.32 d	2.5 cd
8. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 1.0 mg·L ⁻¹ + BA 0.5 mg·L ⁻¹	2.4 a	5.65 b	0	0
9. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 1.0 mg·L ⁻¹ + BA 1.0 mg·L ⁻¹	1.3 b	5.25 b	0	0

Respuestas organogénicas *in vitro* en segmentos nodales de *Euphorbia nutans* Lag., por tratamiento. Los tratamientos que tienen la misma letra, no son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05).

Johnson y Manickam (2003), cultivaron segmentos nodales de *Baliospermum montanum* en un medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) + BAP (3.10µM) obteniendo buenos resultados, al igual que Ghanti *et al.* (2004) en *Phyllanthus amarus* a partir del cultivo de ápices de brotes, segmentos nodales e internodales, evaluando el efecto de diferentes concentraciones de BAP, KIN y agua de coco, lo que indica que BAP es mejor que BA para inducir la brotación múltiple *in vitro* de plantas de Euphorbiaceae. En tejidos internodales de *Euphorbia tirucalli* cultivados en un medio Linsmaier y Skoog (LS) + TDZ (0.02 mg·L⁻¹) indujeron yemas adventicias y el enraizamiento empleando el medio LS + ANA (0.02 mg·L⁻¹) logrando plántulas completas (Uchida *et al.*, 2004), resultados que indican que hay otros

reguladores, como TDZ, con buenos resultados en Euphorbiaceae; además, emplearon ANA y un medio base sin reguladores, resultados que coinciden con los obtenidos en este trabajo con ANA favoreciendo la formación de raíz, pero depende del tipo de tejido vegetal ya que los segmentos nodales también generaron raíces en un medio base sin la necesidad de auxinas (tratamiento 1 del Cuadro 5 y 6).

Las respuestas logradas para *Euphorbia nutans* Lag. no coinciden con lo reportado por Bin *et al.* (2008) en *Euphorbia ésula* en un medio MS más BAP y AIB, quienes obtienen brotes directamente de la base del explante y en callos después de 30 días de cultivo. Dinum y Brian (2010) mencionan que la brotación *in vitro* de *Euphorbia pulcherrima* fue mediante el cultivo de yemas axilares y apicales con BA y AIA en el medio MS, pero en este caso, tanto para AIA y ANA + BA, los brotes que se reportan son únicamente las yemas axilares preexistentes y desarrolladas formando más segmentos nodales.

Cuadro 6. Número y longitud de brotes y raíz *in vitro* a partir de segmentos nodales de *Euphorbia nutans* Lag. con ANA y BA.

Tratamiento	Número de brotes por segmento nodal	Longitud de brotes por segmento nodal (cm)	Número de raíz en segmento nodal	Longitud de raíz en segmento nodal (cm)
1. MS (1962) 100 % + suplementos	0.8 cd	10.2 ab	2.54 d	17.75 ab
2. MS (1962) 100 % + suplementos + BA 0.5 mg·L ⁻¹	0.75 d	11.5 a	2.5 d	5.0 d
3. MS (1962) 100 % + suplementos + BA 1.0 mg·L ⁻¹	1.6 b	10.65 a	2.65 d	5.42 d
4. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 0.5 mg·L ⁻¹	1.8 ab	7.95 b	11.68 b	14.95 b
5. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 0.5 mg·L ⁻¹ + BA 0.5 mg·L ⁻¹	2.1 a	8.85 ab	5.66 c	9.5 c
6. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 0.5 mg·L ⁻¹ + BA 1.0 mg·L ⁻¹	2.2 a	11.2 a	4.34 c	9 c
7. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 1.0 mg·L ⁻¹	2.25 a	7.25 bc	16.78 a	19.42 a
8. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 1.0 mg·L ⁻¹ + BA 0.5 mg·L ⁻¹	1.0 cd	9.65 ab	13.72 b	17.5 ab
9. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 1.0 mg·L ⁻¹ + BA 1.0 mg·L ⁻¹	1.2 c	4.64 c	2.75 d	6.88 cd

Respuestas organogénicas *in vitro* en segmentos nodales de *Euphorbia nutans* Lag., por tratamiento. Los tratamientos que tienen la misma letra, no son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05).

Salamma y Ravi (2014) reportaron la propagación *in vitro* de *Croton scabiosus* Bedd. en un medio MS adicionado con 0.5 mg·L⁻¹ BAP y 2.5 mg·L⁻¹ AIA obteniendo 5.37 ± 0.12 brotes, resultados similares con los obtenidos en este trabajo (ANA + BA), principalmente en los tratamientos 4, 5, 6 y 7 del Cuadro 6, sin embargo la adición de AIA + BA al igual que lo mencionado por Salamma y Ravi (2014) aparentemente fue mejor (Cuadro 5).

Con respecto a las respuestas para la formación y longitud de raíz, los resultados obtenidos coinciden con Kaewsuwan *et al.* (2005), Ricardo *et al.* (2007), Uchida *et al.* (2004) en *Euphorbia turicalli* y con Prathanturarug *et al.* (2007) en *Mallotus rapandus* empleando ANA. Asma *et al.* (2008) reportaron el empleo de 2 mg·L⁻¹ de AIB en *Codiaeum variegatum* con resultados similares a AIA en este estudio, pero

adicionalmente inhibe su efecto por la presencia de BA, y donde ANA es más eficiente para esta respuesta aún en presencia de BA. Los resultados con BA y ANA, ambos en $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (tratamiento 9) indujeron la formación de callo en la parte basal de los segmentos nodales (Figura 3).



Figura 3. Respuestas *in vitro* en segmentos nodales de *Euphorbia nutans* Lag. en medio MS 100 + suplementos. A) Segmentos nodales, B y E) Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales, D y C) Yemas axilares a partir de segmentos nodales en medio MS 100 %, F) Segmentos nodales con ANA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, G) Segmentos nodales con ANA $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, H) Segmentos nodales con ANA + BA ambos $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, I-J) Segmentos nodales con ANA + BA ambos $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y K) Inducción de callo en la base en segmentos nodales con ANA + BA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a las 8 semanas de cultivo.

Cultivo de yemas apicales *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag.

El cultivo de ápice o yemas apicales en la familia Euphorbiaceae fue reportada por Gunatilleke y Samaranayake (1988) mediante ápices de brotes para la

micropropagación de *Hevea brasiliensis*. Yamuna *et al.* (1995) con ápices de brotes de *Glochidion multiloculare* obtuvieron brotes múltiples con BA y AIA ambos en $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, en *Euphorbia esula* Davis y Olson (1993) usaron el AIA para inducir raíces, los resultados obtenidos dependen de la especie micropropagada así como del tipo y concentración de reguladores de crecimiento vegetal. En este trabajo la combinación de los reguladores AIA + BA y ANA + BA en tejidos de hoja y segmentos nodales brindaron respuestas favorables pero con mucha variación para la formación de brotes *in vitro*, incluso en algunos tratamientos la inducción de brotes fue nula (Cuadro 7 y 8) y sólo se promovió el crecimiento y desarrollo del ápice, llegando incluso a florecer *in vitro* (Cuadro 7, 8 y Figura 4).

Otros reportes exitosos en la familia Euphorbiaceae los citan Bhattacharyya y Bhattacharya (2001) en *Phyllanthus amarus* con un medio MS + KIN y/o BAP con AIA en $0.1\text{-}1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, y Balotis y Papafotiou (2003) en *Euphorbia pugniformis* en un medio MS enriquecido con $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA y $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA, así como Rajore y Batra (2005) en *Jatropha curcas* en un medio MS adicionado con BAP ($2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y AIA ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), aunando a Villaluz (2006) quién desarrollo un protocolo de rápida propagación masiva de *Manihot esculenta* a partir de meristemas empleando AG₃, BAP y ANA (0.25 , 0.1 y $0.$, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente), por su parte Asma *et al.* (2008) cita a *Codiaeum variegatum* (Euphorbiaceae) con un medio MS + BAP ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) + peptona ($25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) + extracto de malta ($25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), y actualmente, Salamma y Ravi (2014) mencionan la propagación *in vitro* de *Croton scabiosus* Bedd. con un medio MS adicionado con $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP y $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ AIA.

Cuadro 7. Número y longitud de brotes y raíz *in vitro* a partir de ápices de *Euphorbia nutans* Lag. con AIA y BA.

Tratamiento	Número de brotes por ápice	Longitud de ápice (plántula) (cm)	Número de raíz en ápice	Longitud de raíz en ápice (cm)
1. MS (1962) 100 % + suplementos	0	11.3 b	3.2 b	4.45 b
2. MS (1962) 100 % + suplementos + BA 0.5 mg·L ⁻¹	0	13.5 a	2.5 c	5.95 b
3. MS (1962) 100 % + suplementos + BA 1.0 mg·L ⁻¹	0	11.05 abc	2.55 c	6.4 b
4. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 0.5 mg·L ⁻¹	0	9.75 bc	5.6 a	5.05 b
5. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 0.5 mg·L ⁻¹ + BA 0.5 mg·L ⁻¹	0	5.05 d	0	0
6. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 0.5 mg·L ⁻¹ + BA 1.0 mg·L ⁻¹	0	4.65 d	0	0
7. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 1.0 mg·L ⁻¹	0	14.55 a	4.25 a	9.7 a
8. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 1.0 mg·L ⁻¹ + BA 0.5 mg·L ⁻¹	0	5.6 d	0	0
9. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 1.0 mg·L ⁻¹ + BA 1.0 mg·L ⁻¹	0	9.4 bc	0	0

Respuestas organogénicas *in vitro* en ápices de *Euphorbia nutans* Lag., por tratamiento. Los tratamientos que tienen la misma letra, no son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05).

Se puede concebir una mayor afinidad de ANA que AIA en tejidos de *Euphorbia nutans* Lag. para la inducción de raíz y pero AIA en combinación con BA mejora la formación de brotes principalmente a partir de lámina foliar, lo que demuestra que en *Euphorbia nutans* Lag. pueden inferir células especializadas como los meristemas RAM y SAM (Pautler *et al.*, 2013; Jiang y Feldman, 2005) distribuidas en ella, pues se debe de tomar en cuenta que dicha especie es considerada una planta silvestre que crece en ambientes críticos de temperatura y humedad.

Cuadro 8. Formación y longitud de brotes y raíz *in vitro* a partir de ápices de *Euphorbia nutans* Lag. con ANA y BA.

Tratamiento	Número de brotes por ápice	Longitud de ápice (plántula) (cm)	Número de raíz en ápice	Longitud de raíz en ápice (cm)
1. MS (1962) 100 % + suplementos	0	15.2 a	3 cd	4.66 c
2. MS (1962) 100 % + suplementos + BA 0.5 mg·L ⁻¹	0	12.75 b	2.2 d	4.2 c
3. MS (1962) 100 % + suplementos + BA 1.0 mg·L ⁻¹	0	9.5 c	2.75 cd	5.5 bc
4. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 0.5 mg·L ⁻¹	0	9.75 c	6.33 b	8.75 b
5. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 0.5 mg·L ⁻¹ + BA 0.5 mg·L ⁻¹	0	10.65 bc	3.25 c	7 b
6. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 0.5 mg·L ⁻¹ + BA 1.0 mg·L ⁻¹	0	7.85 cd	2.75 cd	8.48 b
7. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 1.0 mg·L ⁻¹	0	14.5 ab	9.5 a	12.5 a
8. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 1.0 mg·L ⁻¹ + BA 0.5 mg·L ⁻¹	0	6.45 d	2.5 cd	7.68 b
9. MS (1962) 100 % + suplementos + AIA 1.0 mg·L ⁻¹ + BA 1.0 mg·L ⁻¹	0	7 d	2.66 cd	4.5 c

Respuestas organogénicas *in vitro* en ápices de *Euphorbia nutans* Lag., por tratamiento. Los tratamientos que tienen la misma letra, no son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05).

Otro dato interesante, es que en los resultados presentados en el Cuadro 7 y 8 para los tratamientos 2 y 3 donde sólo había BA, hubo presencia de raíz, respuestas que parecen coincidir con Pautler *et al.* (2013) y Jiang y Feldman (2005), quienes mencionan que los genes para activar la respuesta para formación de raíz no siempre se ven favorecidos sólo por auxinas, sino también por la presencia de citocininas, ya que las rutas de señalización celular a nivel genético, bioquímico y molecular son muy complejas. No obstante, en el Cuadro 8 también se demuestra la eficiencia de ANA para inducir raíces en tejidos de *Euphorbia nutans* Lag. con relación a AIA (Cuadro 7).



Figura 4. Respuestas morfológicas *in vitro* a partir de ápices de *Euphorbia nutans* Lag. en medio MS 100 % + suplementos. A) Ápices de *Euphorbia nutans* Lag. con una semana de establecidas en el medio MS 100 %, B) Ápices con dos semanas de establecidas en AIA 1.0 mg·L⁻¹, C) Respuestas de ápices a las tres semanas con AIA 1.0 mg·L⁻¹ (Cuadro 7), D y E) Ápices a las dos semanas en medio MS 100 %, F) Respuesta de ápices en tratamientos con AIA + BA, G) Respuesta de ápices con AIA + BA 1.0 mg·L⁻¹ (Cuadro 7), H) Florecimiento de ápices a las 4 semanas en tratamientos con BA + AIA y BA + ANA.

Con base a los resultados aquí obtenidos y a los del capítulo uno (I) se piensa que el etileno juega un papel regulando la función de los demás fitorreguladores ya que la inhibición de éste con AgNO₃ en el tratamiento testigo no sólo favoreció el crecimiento de los explantes sino también hubo formación de estructuras globulares (pro-embriónicas) en la base de los brotes y además la formación de raíces adventicias a lo largo de los tallos. Sin embargo, en el quinto subcultivo, las plantas se murieron, posiblemente por la inhibición de la función del etileno.

Finalmente, las plántulas obtenidas se transfirieron a un sustrato comercial (Peat moss) previamente humedecido. Para ello, las plantas se sacaron de los recipientes

de cultivo con ayuda de unas pinzas de disección y se pusieron en una solución de fungicida (manzate) $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ durante 2 minutos y posteriormente se colocaron en los orificios del sustrato, el cual se colocó en vasos de unicel, finalmente, los vasos con las plántulas se cubrieron con una bolsa de polipapel cada una y se serraron con ayuda de una liga. Ahí permanecieron por 3 semanas y posteriormente se retiró la bolsa. Con ello, se logró la aclimatación del 90 % de las plántulas obtenidas *in vitro*, el 10 % de pérdida fue por ataques de hongos durante dicho proceso.

Los resultados son similares a los obtenidos por Bhattacharyya y Bhattacharya (2001) en *Phyllanthus amarus* con un 80 % de supervivencia de brotes en aclimatación, a lo mencionado por Villaluz (2006) en *Manihot esculenta* con un 95 % de supervivencia, a lo mencionado por Prathanturarug *et al.* (2007) en *Mallathus rapandus* y a lo publicado por Martin *et al.* (2005) en *Euphorbia nivulia* con un 90 % de éxito durante la aclimatación. Sin embargo, sí son resultados superiores a los reportados por Rajore y Batra (2005) en *Jatropha curcas* con un 60-70 % de supevivencia (Figura 5).



Figura 5. Aclimatización de Plántulas de *Euphorbia nutans* Lag. obtenidas *in vitro*. A-C) Plántulas sumergidas en una solución de fungicida, D) Colocación de plántulas en sustrato, E y F) Plántulas en proceso de aclimatación, G) Plántula aclimatada

en tres semanas, H-I) Planta en invernadero tres semanas después de su aclimatización.

CONCLUSIONES

Se logró el establecimiento *in vitro* de la planta *Euphorbia nutans* Lag. a partir de tejidos de hoja, segmentos nodales y ápices.

Se logró establecer un protocolo para su micropropagación en un medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) 100 % más suplementos y empleando AIA, ANA y BA para inducir organogénesis directa a partir de lámina foliar.

La posición de la hoja jugó un papel importante siendo la posición con el haz hacia arriba sobre el medio de cultivo la que mejor respuestas brindó para la formación de brotes; para la formación de raíces la posición de la hoja fue indistinta.

BA inhibe el efecto de AIA en la formación de raíz pero no el de ANA en todos los explantes evaluados, pero ANA inhibió la función de BA en la formación de brotes a partir de tejidos de hoja. Sin embargo, las respuestas obtenidas con AIA y ANA no son estadísticamente diferentes para la longitud de las yemas apicales.

En el quinto subcultivo, las plantas se murieron, posiblemente por la inhibición de la función del etileno.

LITERATURA CITADA

- Asma, N., Kashif, A. and Saifullah, K. 2008. *In vitro* propagation of *Croton* (*Codiaeum variegatum*). Pakistan Journal of Botany. 40(1):99-104.
- Bidarigh, S. and Azarpour, E. 2013. Effect of BA and GA₃ application on poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) under *In-Vitro* conditions. International Journal of Agriculture and Crop Sciences (IJACS). 5(10):1053-1057.
- Balotis, G. and Papafotiou M.. 2003. Micro propagation and stability of *Euphorbia pugniformis* cristate form. Acta Horticulturae, (ISHS). 616:471-474.

- Bhagwat, B., Vieiral, L. G. F. and Erickson, L. R. 1996. Stimulation of *in vitro* shoot proliferation from nodal explants of Cassava by thidiazuron, benzyladenine and gibberellic acid. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 46:1-7.
- Bhattacharyya, R. and Bhattacharya, S. 2001. High frequency *in vitro* propagation of *Phyllanthus amarus* Schum. y Thonn. by shoot tip culture. *Indian Journal Experimental Biology*. 39:1184-1187.
- Bin-Xu, Wenhao, D., Wun, S. Ch. 2008. An efficient method for *in vitro* regeneration of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 44(6):548-556.
- Davis, D. G. and Olson, P. A. 1993. Organogenesis in Leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*. 29:97-101.
- Dinum, P. and Brian, W. T. 2010. Poinsettia ‘Prestige™ Red’ (*Euphorbia pulcherrima*) *in vitro* propagation. *Hortscience*. 45(7):1126–1128.
- Ghanti, K. S., Govindaraju, B., Venugopal, R. B., Rao, S. R., Kaviraj, C. P., Jabeen, F. T. Z., Barad, A. and Rao, S. 2004. High frequency shoot regeneration from *Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn. *Indian Journal Biotechnology*. 3:103-107.
- Gunatilleke, I. D. and Samaranayake, C. 1988. Shoot tip as a methods of micropropagation of *Hevea brasiliensis*. *Journal of Rubber Research Institute of Sri Lanka*. 68:33-44.
- Jasrai, Y. T., Thaker, K. N. and D'Souza, M. C. 2003. *In vitro* propagation of *Euphorbia pulcherrima* Willd. through somatic embryogenesis. *Plant Tissue Cult*. 13(1):31-36.
- Jiang, K. and Feldman, L. J. 2005. Regulation of root apical meristem development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 21:485–509.
- Johnson, M. and Manickam, V. S. 2003. *In vitro* micropropagation of *Baliospermum montanum* (Willd.)-Muell. Arg. a medicinal plant. *Indian Journal Experimental Biology*. 41:1349-1351.

- Kaewsuwan, S., Soonthornchareonnon, N. and Prathantharug, S. 2005. *In vitro* propagation of *Mallotus repandus* (Willd.) Mull.- Arg. Acta Hort. 676: 95-101.
- Kamrun, N. and Rita, S. B. 2012. *In vitro* Propagation from Shoot tip explants of castor oil plant (*Ricinus communis* L): A bioenergy plant. Canadian Journal on Scientific and Industrial Research. 3(5):254-255.
- Kondamudi, R., Sri, R. M. K., Pullaiah, T. 2009. Euphorbiaceae - a critical review on plant tissue culture. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 10(3):313-335.
- Lima, E. D., Paiva, R., Nogueira, R. C., Soares, F. P., Emrich, E. B., and Silva, Á. A. N. 2008. Callus induction in leaf segments of *Croton urucurana* Baill. Cienciae Agrotecnologia. 32(1):17-22.
- Ma, G. and Xu, Q. 2002. Induction of somatic embryogenesis and adventitious shoots from immature leaves of Cassava. Plant Cell Tissue Organ Culture. 70: 281-288.
- Martin, K. P., Sunandakumari, C., Chithra, M., Madhusoodanan, P. V. 2005. Influence of auxins in direct *in vitro* morphogenesis of *Euphorbia nivulia*, a lectinaceous medicinal plant. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. 41(3):314-319.
- Nataraja, K., Chennaveeraiah, M. S., Girigowda, P. 1973. *In vitro* production of shoot buds in *Euphorbia pulcherrima*. Curr Sci. 42:577–578.
- Pautler, M., Wakana, T., Hiro-Yuki, H. and Jackson, D. 2013. Grass meristems I: Shoot apical meristem maintenance, axillary meristem determinacy and the floral transition. Plant Cell Physiol. 54(3):302–312.
- Prathantharug, S., Soonthornchareonnon, N., Chuakul, W., Phaidee, Y. and Saralamp, P. 2007. An improved protocol for micropropagation of *Mallotus repandus* (Willd.) Mull.-Arg. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 43(3):275-279.
- Quraishi, A. and Mishra, S. K. 1998. Micropropagation of nodal explants from adult trees of *Cleistanthus collinus*. Plant Cell Rep.17:430-433.

- Rajore, S. and Batra, A. 2005. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. *Journal Plant Biochemistry*. 14:73-75.
- Ricardo, D. M., Mirta, M. F., Gonzalez, A. M. and Mroginski, A. L. 2007. *In vitro* cultured primary roots derived from stem segments of *Cassava (Manihot esculenta)* can behave like a storage organs. *Annals Botany*. 99:409-423.
- Ripley, K. P. and Preece, J. E. 1986. Micropropagation of *Euphorbia lathyris* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 5(3):213-218.
- Salamma, S. and Ravi, P. R. B. 2014. *In vitro* propagation of *Croton scabiosus* Bedd. (Euphorbiaceae), an endemic and vulnerable tree species. *Journal of advances in biotechnology*. 3(3):229-249.
- Sujatha, M., Reddy, T. P., Mahasi, M. J. 2008. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. *Biotechnology Advances*. 26:424–435.
- Uchida, H., Osamu, N., Motoyasu, O., Masataka, K., Yoshihito, K., Katsuyuki, T. Y., Hideya, F., Takiko, S., Kanji, O. 2004. Plant regeneration from internode explants of *Euphorbia tirucalli*. *Plant Biotechnology*. 21(5):397–399.
- Villaluz, Z. A. 2006. Improvement of *in vitro* techniques for rapid meristem development and mass propagation of Philippine Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Journal of Food Agriculture and Environment*. 4:220-224.
- Yamuna, P., Das, S., Jha, T. B. and Jha, S. 1995. Regeneration and multiplication of shoots in *Glochidion multiloculare* Mull-Arg. *J. Herbs, Spices Med. Plants*. 3(1):67-74.

CAPITULO III

ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS DE *Euphorbia nutans* Lag.

RESUMEN

Euphorbia nutans Lag. es una planta con propiedades medicinales y es empleada de forma empírica en infusión para tratar problemas de gastritis y su látex como cicatrizante de heridas externas en Izúcar de Matamoros, Puebla (Mixteca Poblana). No obstante, en la Mixteca Poblana sólo es considerada una maleza en los terrenos de cultivo, principalmente de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y cacahuete (*Arachis hypogaea*) encontrándose de forma arvense y ruderal. Se inició un estudio fitoquímico de *Euphorbia nutans* a partir de sus extractos de la planta seca y molida (3.55 Kg), uno con hexáno (C₆H₁₄), con cloruro de metileno (CH₂Cl₂) y otro con metanol (CH₃OH), mismos que fueron analizados mediante cromatografía en columna con silicagel y se monitorearon mediante cromatografía en capa delgada (CCD). Los metabolitos secundarios aislados se sometieron a estudios de Resonancia Magnética Nuclear de ¹H y de ¹³C (RMN ¹H y ¹³C). Del extracto de hexano se identificaron: Estigmasterol, β-sitosterol, Acetato de α-y β-amirina y β-lupeol. Del extracto de diclorometano se aisló e identificó β-lupeol, estigmasterol y β-sitosterol, pero además de ello, se encontró una mezcla del triterpeno β-lupeol y posiblemente el cicloartano: 24-metileno-cicloart-3β-ol. Finalmente, en el extracto de metanol se identificó un metabolito secundario tipo iridoide, el cual no está reportado en plantas de Euphorbiaceae, siendo este estudio el primero en reportarlo así como el primer estudio fitoquímico que se describe para la planta *Euphorbia nutans* Lag.

Palabras clave: Metabolitos secundarios, medicinal, cromatografía, fitoquímica.

INTRODUCCIÓN

La familia Euphorbiaceae comprende alrededor de 8,700 (Webster, 1994) a 8,910 especies (Bingtao Li *et al.*, 2008) en todo el mundo, donde estas se caracterizan por producir un latex lechoso tóxico que puede causar irritación en la piel (Ávila *et al.*, 2010). Por otra parte, de los 320 géneros de *Euphorbia* a nivel mundial (Webster, 1994) o 322 géneros mencionados por Bingtao Li *et al.* (2008), Steinmann (2002) reconoce 43 géneros y 782 especies, citadas por Rzedowski (1991), de la familia Euphorbiaceae en México, donde el 57 % son endémicas del país. No obstante, Martínez *et al.* (2002) citan 50 géneros y 826 especies de la familia Euphorbiaceae, incluyendo introducidas y/o cultivadas, calculando que el endemismo nacional para *Euphorbia* es del 58.6 %, ya que de 447 especies endémicas de México el 41.6 % son endémicas locales, es decir, sólo crecen en sitios específicos, y dentro de los estados con mayor número de especies en esta categoría se encuentran Oaxaca, Jalisco, Baja California, Guerrero, Chiapas y Michoacán. Entre su gran diversidad se encuentran especies cultivadas, plantas en peligro de extinción (Lee *et al.* 1982; Ripley y Preece 1986; Dewir *et al.* 2005), así como especies solamente consideradas como malezas o malas hierbas. Por ejemplo en el estado de Puebla se encuentra el caso de la planta *Euphorbia nutans* Lag., (Rzedowski, 1991) donde específicamente en la región de Izúcar de Matamoros es empleada para tratar problemas gástricos y cicatrización de heridas externas teniendo resultados favorables en una semana de tratamiento (información aportada por pobladores de dicho lugar). Por otro lado, se han efectuado numerosos estudios bioquímicos del latex de plantas de la familia Euphorbiaceae (Lynn y Clevette, 1987), De *Euphorbia segetalis* L. se aislaron hexacosanol, cycloartenol, 24-metileno-cicloartanol, β -lupeol y β -sitosterol (J. L. Bretón *et al.*, 1970), de *E. maculata*, Matsunagaa *et al.* (1988) reportan el aislamiento de acetato de β -amirina, acetato de taraxeriol, acetato de lupenil, 3 β -acetoxi-30-norlupan-20-ona, α -amirenonol y β -sitosterol, en *E. chamaesyce* se aislaron los triterpenos, glutinol, 3 β -hidroximultiflor-8-en-7-ona y cicloart-23Z-en-3 β , 25-diol (Reiko *et al.*, 1996), en *E. maculata* también se aislaron e identificaron diferentes taninos (Yoshiaki *et al.*, 1997), Li-Yan Wang *et al.* (2003) mencionan la obtención de cuatro triterpenos de tipo eufano, kansenona,

kansenonol, 11-oxo-kansenonol, kansenol a partir de un extracto de EtOH de *E. kansui*, junto con α -eufol, en *E. guyoniana*, Haba *et al.* (2009) reportan el aislamiento a partir del extracto de cloroformo de las raíces de *E. guyoniana* dos diterpenos *ent*-abietatrieno junto con cicloartano que es un triterpeno conocido, Qi Tang *et al.* (2012) reportan la obtención de prostratina, un éster de forbol tigliano con promesa para el tratamiento del VIH, identificado y cuantificado en los extractos de raíz de *E. fischeriana* en China, Kheyrodin y Ghazvinian (2012) mencionan diferentes productos tóxicos y bioactivos que se encuentran presentes en *Euphorbia Sp.*, tales como ésteres metílicos y derivados, así como poliésteres de diterpeno y otros compuestos de terpeno, así mismo mencionan kaempferol, 3-angelato de ingenol, escopoletina, 3-O-glucopiranosido de kaempferol, quercetina, ácido vanílico. De *E. hyberna* se aislaron e identificaron cuatro triterpenoides (Ferreira *et al.*, 2013), en *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) se encontró epicatequina (Abdul *et al.*, 2012), en *E. stenoclada* el principal compuesto encontrado fue la quercetina (Chaabia *et al.*, 2007), en *E. aphylla* también se han aislado compuestos como los triterpenos β -amirona y euphol, dos esteroides como β -sitosterol y glucosido β -sitosterol y compuestos fenólicos como ácido gálico, entre otros (Zedan *et al.*, 2013), Harpalani *et al.* (2011) mencionan la presencia de hidratos de carbono, triterpenoides y saponinas en la *Euphorbia antiquorum* Linn. Así mismo, en el año 2013 se publicó una revisión sobre el aislamiento, estructura, actividad biológica, y síntesis de diterpenos de *Euphorbia*, destacándose principalmente a los rosanos, *ent*-Abietanos, Atisanos, *ent*-Kauranos, Casbanos, Jatrophanos, Lathiranos, Mirsinanos, Premirsinanos, Ciclomirsinanos, Daphnanos, Tiglianos, Ingenianos, Paralinos y Peplanos; además se menciona que tienen diferentes actividades biológicas como actividad antitumoral, antiinflamatoria, antimicrobiana, antiviral, antibacteriana, actividad en la relajación vascular, efecto neuroprotector, actividad plaguicida y moluscicida (Vasas y Hohmann, 2013). No obstante, la planta *Euphorbia nutans*. no tiene algún estudio fitoquímico que indique algunos metabolitos secundarios que puedan ser de interés farmacéutico o brinden información científica sobre ella, a pesar de que la familia Euphorbiaceae es

considerada como plantas con propiedades medicinales también en otros países (Sükran Kültür, 2007).

Debido a los antecedentes citados, el objetivo del presente trabajo de investigación fue extraer los metabolitos secundarios de la planta *Euphorbia nutans* Lag. mediante maceración, separarlos a través de técnicas cromatográficas e identificarlos y caracterizarlos con ayuda de la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para saber qué tipos de metabolitos secundarios biosintetiza dicha planta y mediante revisión de literatura publicada estar al tanto de su probable uso potencial e importancia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Euphorbia nutans Lag. fue colectada en el mes de septiembre de 2014 en Izúcar de Matamoros, Puebla. Un espécimen de herbario fue depositado en el Herbario-Hortorio Jorge Hernandez Espinosa, del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo con número de registro: 25193. Fue identificado por la M. C. Ernestina Cedillo Portugal, Profesora-investigadora del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, y por el Dr. Víctor W. Steinmann, Botánico que se desempeña como investigador en el "Instituto de Ecología" del Centro Regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán.

Obtención de extractos

Los extractos se obtuvieron a partir de los 3.534 Kg de material vegetal seco y molido mediante maceración con diferentes disolventes siguiendo un orden ascendente de polaridad. Para ello se colocó el material vegetal en un garrafón de vidrio y se añadieron 12 litros de hexano (C_6H_{14}) dejándolo reposar por 3 días, se filtró el extracto y se eliminó-recuperó el disolvente por destilación a vacío con ayuda de un rota-vapor Büchi Heating Bath B-491, esta operación se repitió tres veces. Posteriormente a esto, se agregaron 10 litros de cloruro de metileno (CH_2Cl_2) y

finalmente también se agregaron 10 litros de metanol (CH_3OH) realizándose las actividades indicadas en la primera operación para obtener 107.1 g de extracto hexanico, 85.8 g de extracto de diclorometano y 167.6 g de extracto de metanol.

Análisis de extractos por cromatografía en columna

a) Análisis del extracto de hexano por cromatografía en columna

El extracto de hexano fue tratado con metanol para precipitar grasas y ceras bajo refrigeración durante una noche, posteriormente se filtró y el filtrado líquido fue procesado por adición de repetidos volúmenes de metanol hasta obtener un extracto de hexano libre de grasas. Emseguida se colocó una columna de vidrio de 4.5 cm de diámetro x 130 cm de largo en un soporte universal asegurándose con pinzas; después se le colocó una porción de algodón en el fondo, se adicionó hexano y se empacó con 250 g de silicagel 60 (granulometría 0.063-0.200 mm, Merck) suspendida en hexano. Entonces 10 g de extracto hexanico desengrasado disuelto en 10 mL de hexano se aplicó en la columna con ayuda de un embudo, la polaridad de la fase móvil se fue aumentando con cantidades crecientes de acetato de etilo (AcOEt) según fue necesario. Se colectaron las fracciones o particiones de 20 mL cada una, a excepción de la fracción 0 (cero) que fue de 500 mL. Las fracciones reunidas se concentraron con ayuda de un rota-vapor Büchi Heating Bath B-491.

b) Análisis del extracto de diclorometano por cromatografía en columna

Se tomaron 40 g de extracto de diclorometano (CH_2Cl_2) y se disolvieron con un poco de cloruro de metileno (CH_2Cl_2) para pre adsorberlo con 40 g de silicagel 60 (Merck) en un vaso de precipitados de 1000 mL, cuya mezcla se homogenizó lo mejor posible con ayuda de una espátula de acero inoxidable y se dejó una noche para que se eliminara el disolvente y poder obtener un polvo homogéneo. A continuación se aplicó a una columna de vidrio de 10 cm de diámetro x 80 cm de largo y se empezó a eluir con hexano y mezclas de hexano/ AcOEt para incrementar la polaridad según fue necesario. Finalmente se midió el volumen de cambio el cual

fue de 1100 mL, se agregó el extracto pre adsorbido y se obtuvieron fracciones de 50 mL cada una, las cuales se concentraron sobre un baño de agua.

c) Análisis del extracto de metanol por cromatografía en columna

En este caso también se pesaron 40 g de extracto de diclorometano (CH_2Cl_2) y se disolvieron con un poco de cloruro de metileno (CH_2Cl_2) para pre adsorberlo con 40 g de silicagel 60 (Merck) en un vaso de precipitados de 1000 mL, cuya mezcla se homogenizó lo mejor posible y se dejó una noche para que se eliminara el disolvente y poder obtener un polvo homogéneo. En seguida el extracto pre adsorbido se aplicó a una columna de vidrio de 6.5 cm x 80 cm empacada con 500 g de silicagel 60, se midió el volumen de cambio que fue de 1000 mL y se empezó a eluir con cloruro de metileno y mezclas de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ en cantidades crecientes de polaridad y al final con metanol, se recogieron fracciones de 200 mL cada una y se concentraron en un rotavapor Büchi R-3.

Para el seguimiento de los metabolitos obtenidos mediante la separación por cromatografía en columna, se empleó la cromatografía en capa delgada (CCD) mediante placas de silicagel (TLC Silica gel 60 F₂₅₄ 25 Aluminium sheets 20 x 20 cm) de 5 x 3 cm o según el caso, la visualización de los compuestos en las placas se llevó a cabo bajo lámparas SPECTROLINE de luz UV de onda corta y onda larga (254 nm y 365 nm); posteriormente, las placas se revelaron químicamente utilizando sulfato sérico amoniacal y/o ácido fosfomolibdico con calentamiento, realizado con ayuda de una secadora para cabello o con una parrilla de calentamiento, y de esta forma determinar cuándo cambiar de polaridad del disolvente (fase móvil). La observación del perfil de las manchas en las placas permitió decidir cuáles fracciones o particiones reunir así como los metabolitos candidatos para ser analizados por RMN, como se muestra en la Figura 1.

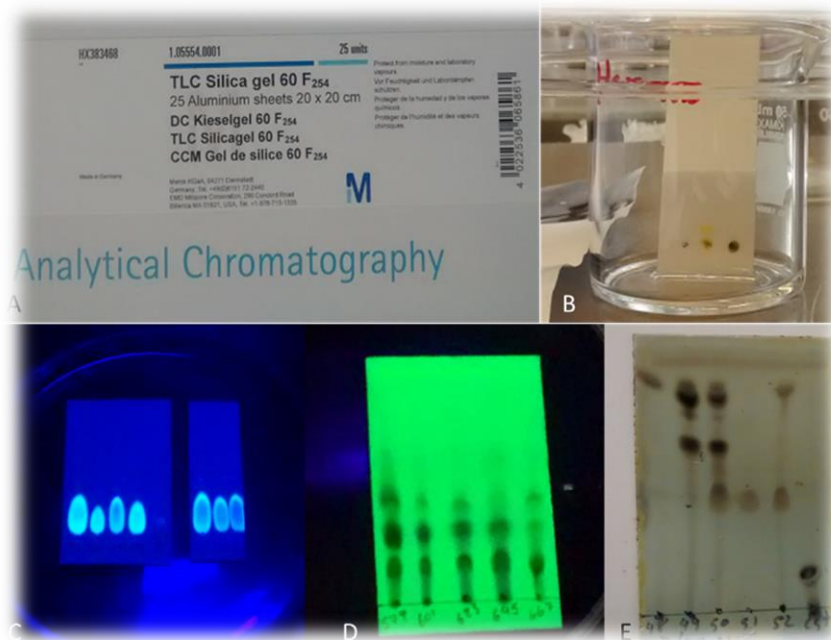


Figura 1. Cromatografía en capa delgada (CCD). A) Tipo de placas TLC empleadas, B) Elución de la placa cromatografica, C) Placas cromatograficas vistas en luz UV de onda larga, D) Placas cromatograficas vistas en luz UV de onda corta y E) Placa cromatografica después de revelarse y exponerse a calor.

Análisis e identificación de los metabolitos secundarios obtenidos

El análisis de los metabolitos secundarios se llevó a cabo mediante espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de protón y carbono (RMN de ^1H y RMN de ^{13}C) se determinaron mediante un espectrómetro a 400 MHz modelo 400 MR DD2 Agilent (Figura 2). Todos los espectros fueron tomados utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3). El desplazamiento químico esta dado en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento están dadas en Hertz (Hz). También se realizó un análisis de literatura para corroborar los datos obtenidos de dichos metabolitos. La elucidación estructural de algunos metabolitos secundarios también se confirmó mediante su espectro de infrarojo y su comparación en cromatografía de capa delgada con muestras de referencia disponibles en el laboratorio.



Figura 2. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear modelo 400 MR DD2 Agilent.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Mediante un diagrama de flujo se presentan los resultados sobre el peso de los extractos vegetales (Figura 3) preparados a partir de *Euphorbia nutans*. La identificación de los metabolitos se discute a partir del fraccionamiento de cada extracto mediante cromatografía en columna, así como la discusión de sus posibles usos e importancia basada en publicaciones encontradas mediante el la base de datos denominada SCOPUS.

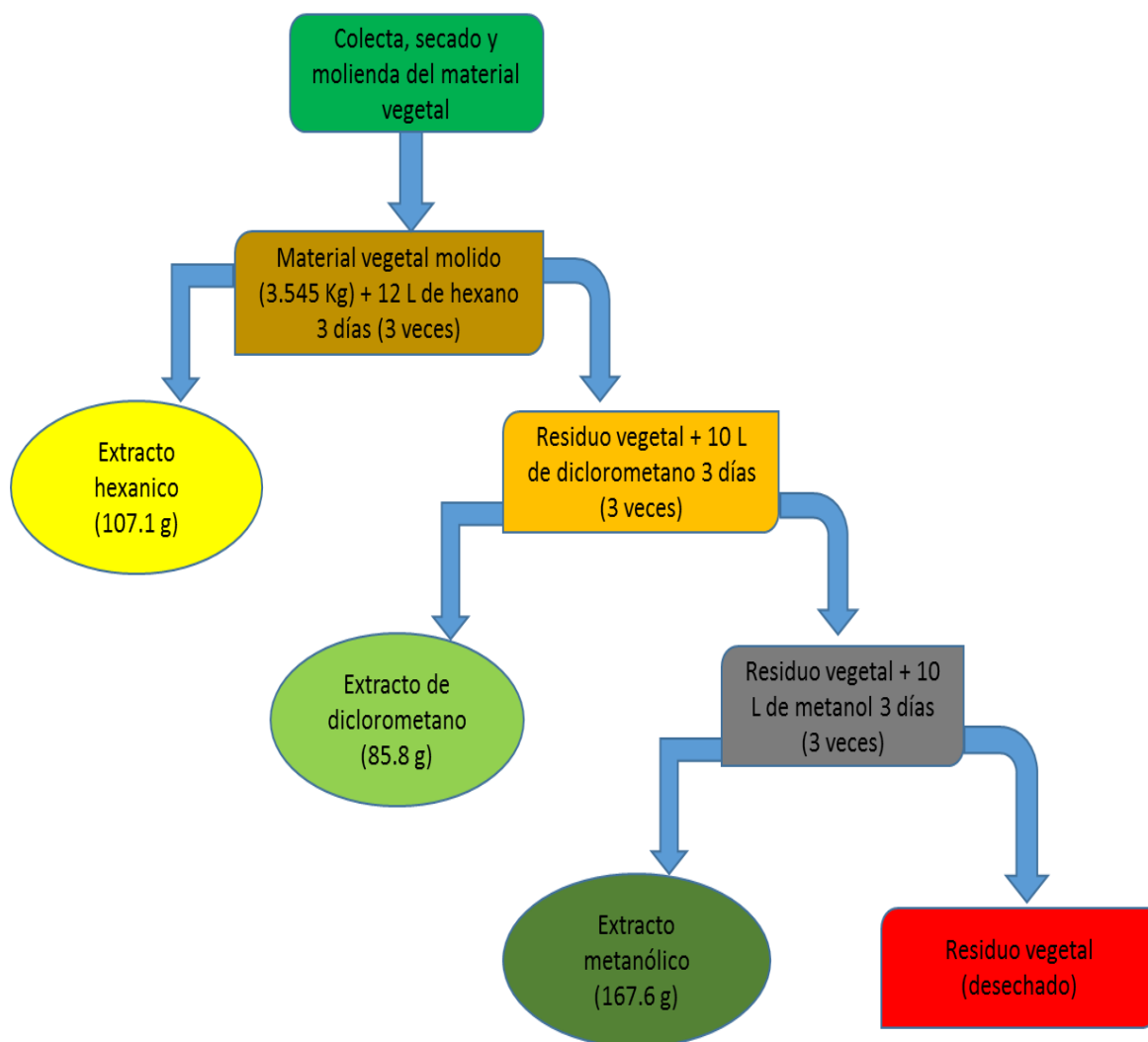


Figura 3. Proceso de obtención de los tres diferentes extractos vegetales de *Euphorbia nutans* Lag.

a) Metabolitos secundarios obtenidos del extracto de hexano

En el Cuadro 1 se muestra la distribución y agrupamiento de las fracciones o particiones obtenidas de la columna cromatográfica y los diferentes metabolitos secundarios que fueron identificados en este extracto.

Cuadro 1. Proporciones de disolventes (fase móvil), fracciones obtenidas y metabolitos secundarios identificados en la columna del extracto hexánico de *Euphorbia nutans* Lag.

Fase móvil	No. de fracciones	Metabolitos identificados	Observaciones
Hexano	0-95	-----	No se revelan con sulfato sérico amoniacal, sólo con ácido fosfomolibdico.
Hexano:AcOEt (95:5)	96-138	-----	-----
Hexano:AcOEt (95:5)	139-148	Acetato de α -amirina (1)	Identificados con RMN de ^1H , ^{13}C e infrarojo (Figura 4).
Hexano:AcOEt (95:5)	149-199	-----	-----
Hexano:AcOEt (9:1)	200-223	β -lupeol (2)	Identificado con RMN de ^1H , ^{13}C y mediante muestras de referencia en CCD.
Hexano:AcOEt (9:1)	224-251	-----	-----
Hexano:AcOEt (9:1)	252-303	β -sitosterol (3) estigmasterol (4) y β -lupeol (2).	Se acetilaron y después se identificaron con RMN de ^1H , ^{13}C (Figura 11) y mediante muestras de referencia en CCD.
Hexano:AcOEt (9:1)	304-953	-----	-----
Hexano:AcOEt (8:2)	954-1153	-----	-----
Hexano:AcOEt (5:5)	1154-1289	-----	-----
AcOEt	1290-1395	-----	-----
CH_3OH (Metanol)	1396-1434	-----	-----

De la fracción 139-148 eluida con Hexano/AcOEt (95:5) de la columna cromatográfica del extracto de hexano de *Euphorbia nutans*, se observó un sólido cristalino cuyo espectro de infrarojo (Figura 5) mostró bandas intensas en 1720 cm^{-1} y 1240 cm^{-1} que fueron asignadas para un grupo éster (Silverstein *et al.* 2005). En tanto que en su espectro de RMN de ^1H (Figura 6) se observó una señal triple a 5.2 ppm que integró para un hidrógeno misma que fue asignada a un hidrógeno de alqueno, también se observó una señal con multiplicidad doble de doble que integró

para un hidrógeno base de un grupo acetato, dato que fue corroborado en una señal simple e intensa a 2.1 ppm que integró para tres hidrógenos de un grupo metilo (CH_3^-) del grupo funcional éster tipo acetato ($\text{CH}_3\text{-COO}^-$). Así mismo, a frecuencias bajas entre 0.7 y 1.2 ppm se observó un conjunto de siete señales simples e intensas que indican que la estructura molecular es la de un triterpeno. La información anterior fue corroborada en el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 7) al observarse 32 señales de resonancia de las cuales en 171.07 ppm se reconoció al carbono del grupo carbonilo de éster y se observó que las señales en 121.57 y 145.19 ppm correspondieron al enlace doble ($\text{C}=\text{C}$) de este triterpeno al comparar su punto de fusión de 228-230 °C con el descrito en la literatura ($pF=227^\circ\text{C}$, Windholz y Budavari, 1976), por lo tanto se concluyó que este triterpeno corresponde al acetato de α -amirina (1), triterpeno conocido cuya estructura molecular se muestra en la Figura (4).

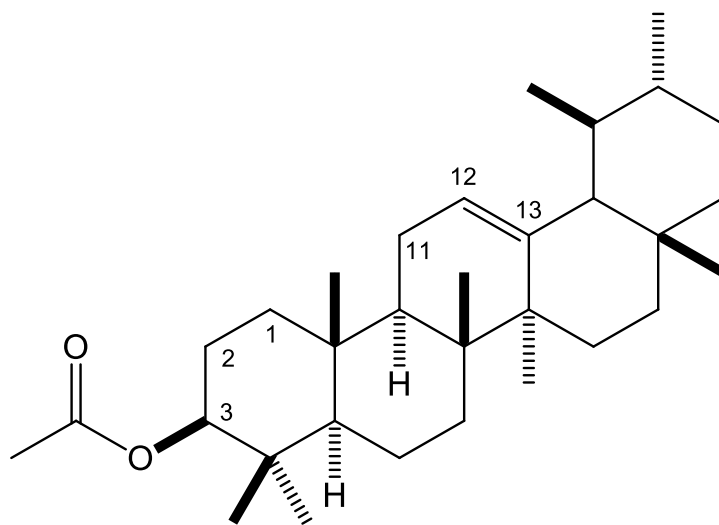


Figura 4. Estructura molecular del acetato de α -amirina (1).



Agilent Technologies

Sample ID: acetato de amidina
Sample Scans: 32
Background Scans: 32
Resolution: 8 cm⁻¹
System Status: Good
File Location: C:\Program Files\Agilent\MicroLab PC\Results\acetato de amidina_2014-07-16T13-50-20.a2r

Method Name: Metodo ATR
User: admin
Date/Time: 7/16/2014 1:48:02PM
Range: 4,000.00 - 650.00
Apodization: Happ-Genzel

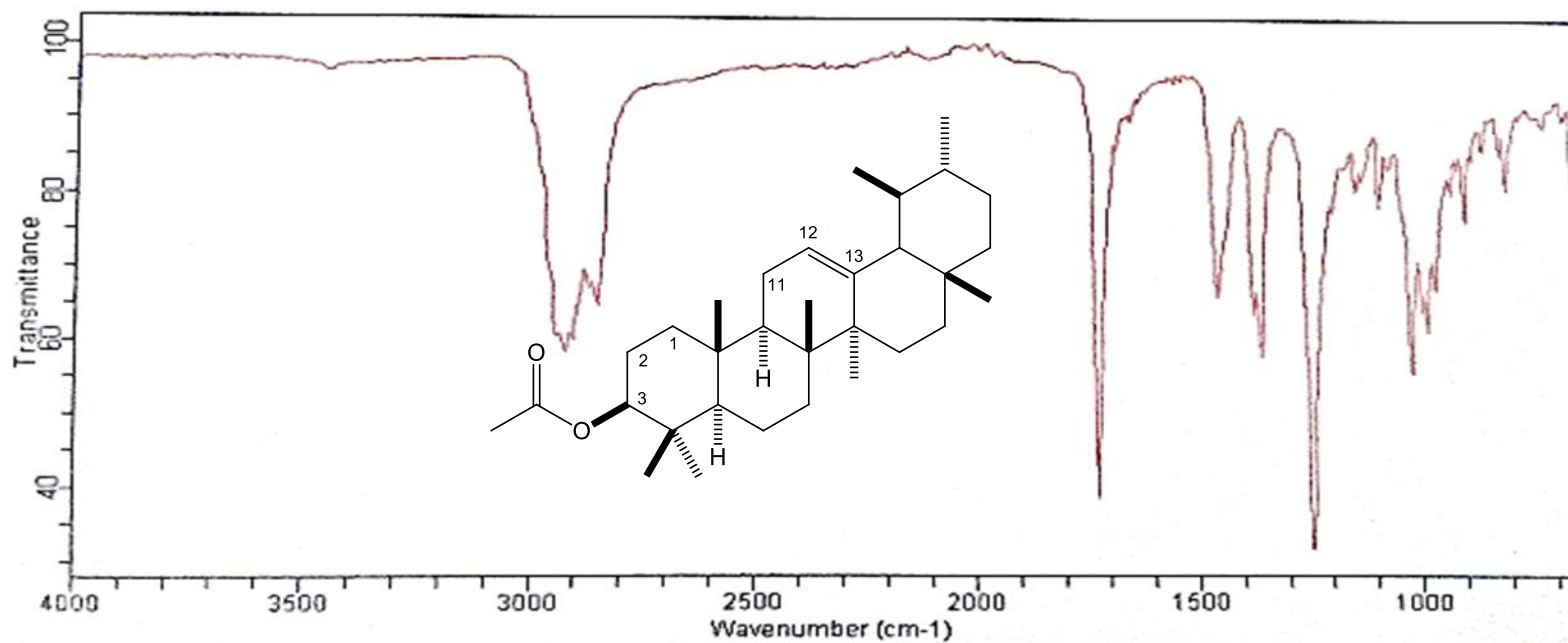


Figura 5. Espectro de infrarrojo de acetato de α -amirina de las fracciones 139-148 del extracto hexánico de *Euphorbia nutans* Lag.

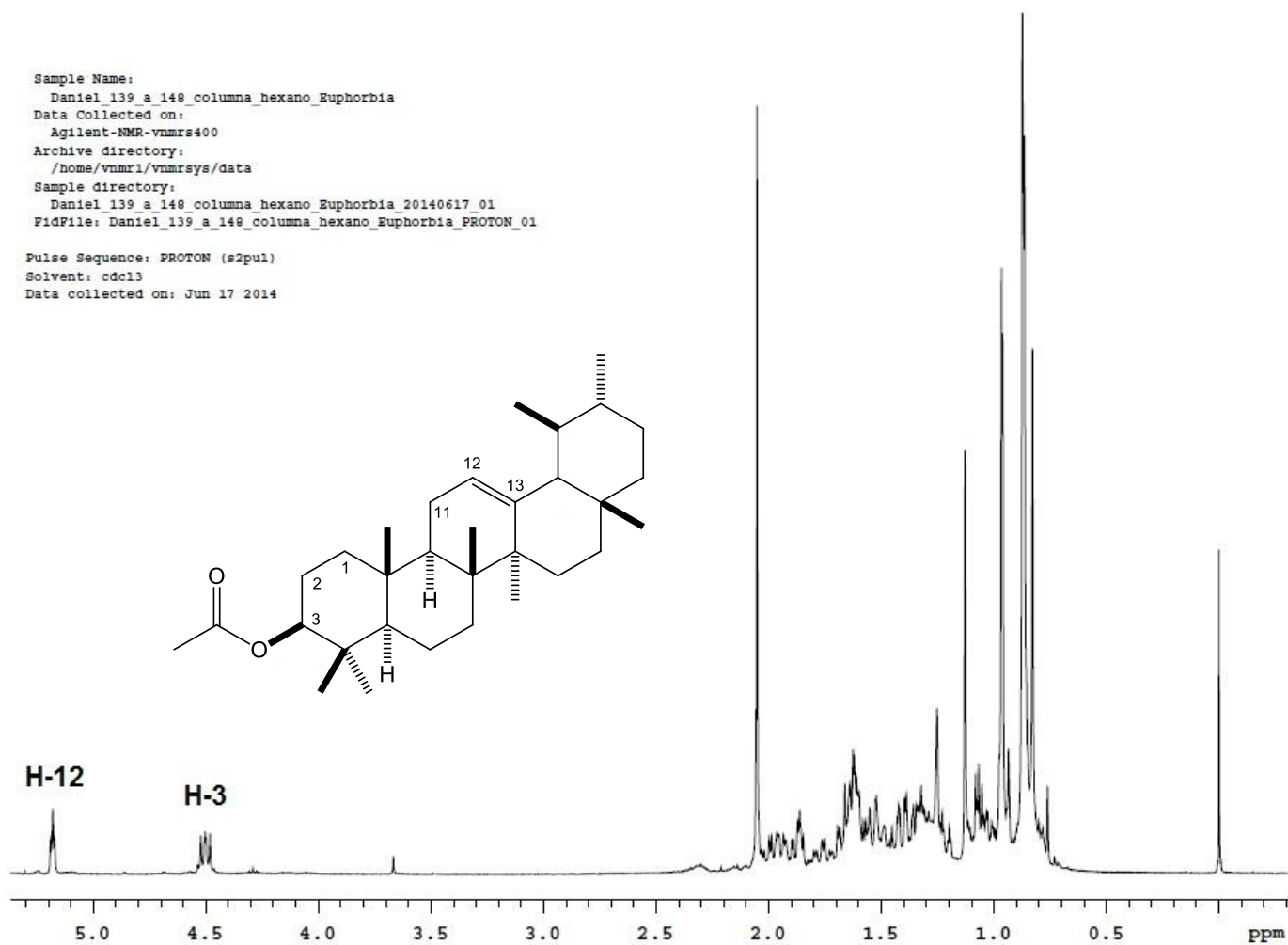


Figura 6. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de α -amirina de las fracciones 139-148 del extracto hexanico de *Euphorbia nutans* Lag.

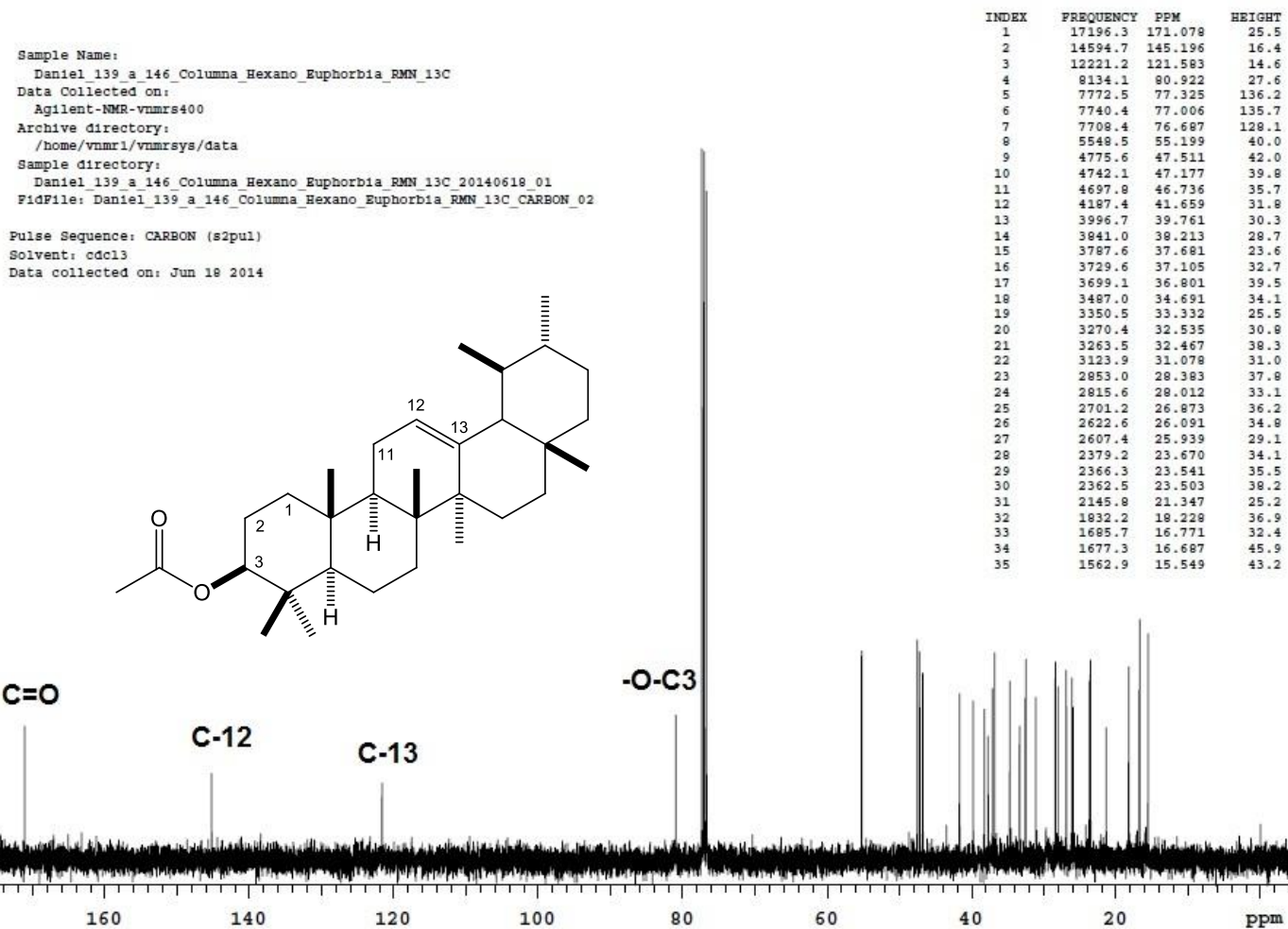


Figura 7. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C a 400 MHz en CDCl_3 de α -amirina del extracto de hexano de *Euphorbia nutans* Lag.

De las fracciones 200-223 eluidas con Hexano/AcOEt (9:1) de la cromatografía en columna del extracto hexánico de *Euphorbia nutans* se observó una sustancia con aspecto amorfo pero quedó cromatográficamente homogénea. Al determinar sus espectros de RMN de ^1H (Figura 9) se observaron a 4.56 y 4.59 ppm dos señales múltiples e intensas que integran para un protón cada una y de acuerdo con este desplazamiento químico, corresponden a los protones de un enlace doble exocíclico, otra señal importante en 3.18 ppm se asignó a un sistema de tipo doble de dobles que al integrar para un protón correspondió al protón base de un alcohol secundario en un anillo de ciclo hexano, es decir, se muestra (Figura 8) la sección de la molécula de β -lupeol donde se muestra la disposición del grupo hidroxilo (-OH) que desarrolla el patrón de acoplamiento del protón H_3 , tipo doble de dobles en la ampliación del espectro de RMN en 3.18 ppm.

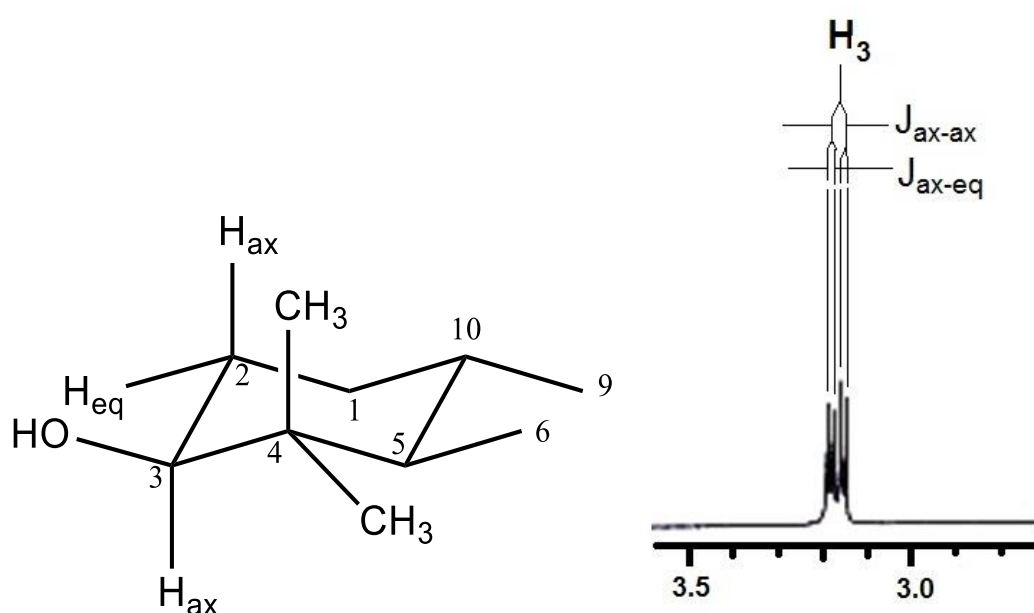


Figura 8. Patrón de acoplamiento tipo doble de dobles para el protón H_3 base de β -hidroxi del anillo de ciclohexano en el β -lupeol.

Sample Name:
 beta lupeol
 Data Collected on:
 Agilent-NMR-vnmrs400
 Archive directory:
 /home/vnmr1/vnmrsys/data
 Sample directory:
 beta_lupeol_20140617_01
 FIDFile: beta_lupeol_PROTON_01

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
 Solvent: cdcl3
 Data collected on: Jun 17 2014

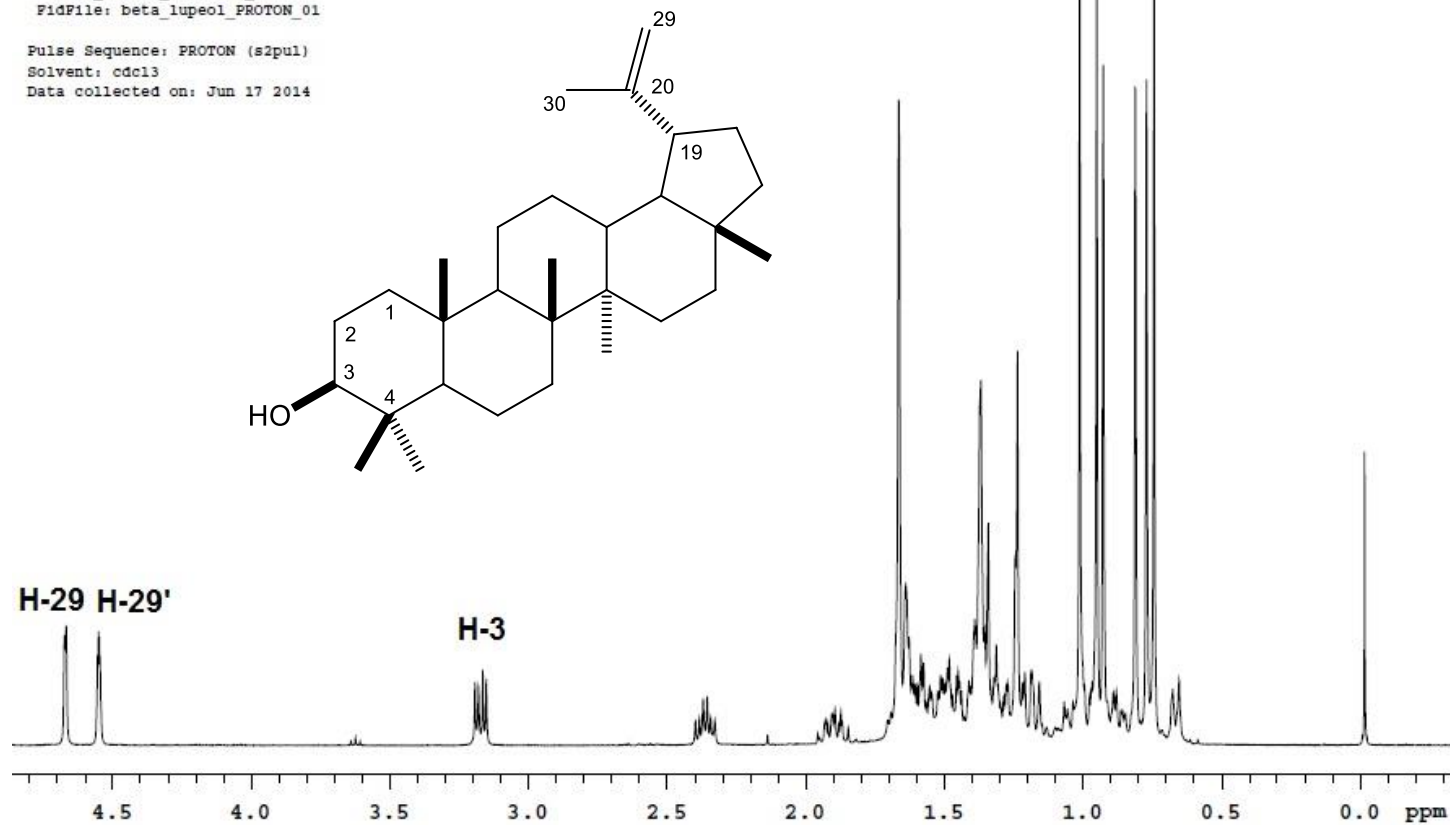


Figura 9. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ de β-lupeol obtenido de las fracciones 200-223 del extracto de hexano de *Euphorbia nutans* Lag.

Por otro lado, en el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 11) de la fracción 200-223 se observaron 30 señales de resonancia que indican la naturaleza triterpénica de la sustancia de abundancia mayoritaria en esta fracción, algunas señales importantes en este espectro son las ubicadas en 78.97 ppm para un carbono base de grupo hidroxilo (-OH), en 109.31 y 150.96 ppm de un enlace doble (C=C). Al comparar sus datos espectroscópicos con los descritos para β -lupeol (2) (Figura 10) y desarrollar una placa cromatográfica con una muestra auténtica, se concluyó que se trata de esta sustancia natural (Verdezoto, 2012).

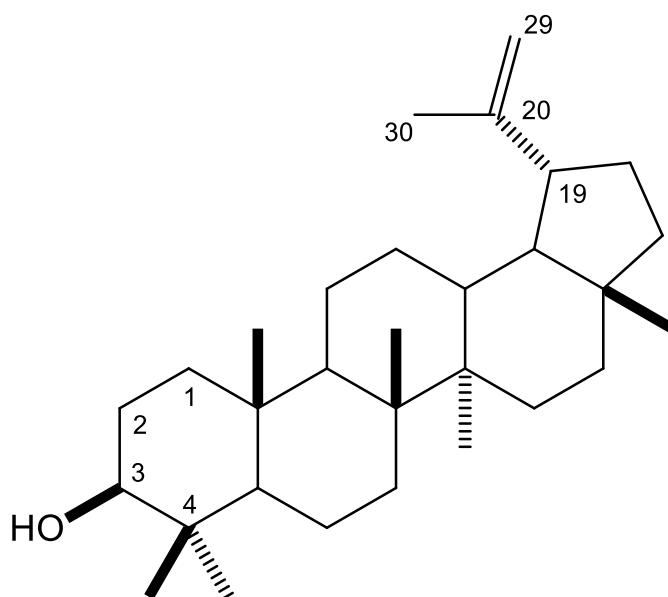


Figura 10. Estructura molecular del β -lupeol (2) identificado del extracto de hexano de *Euphorbia nutans* Lag.

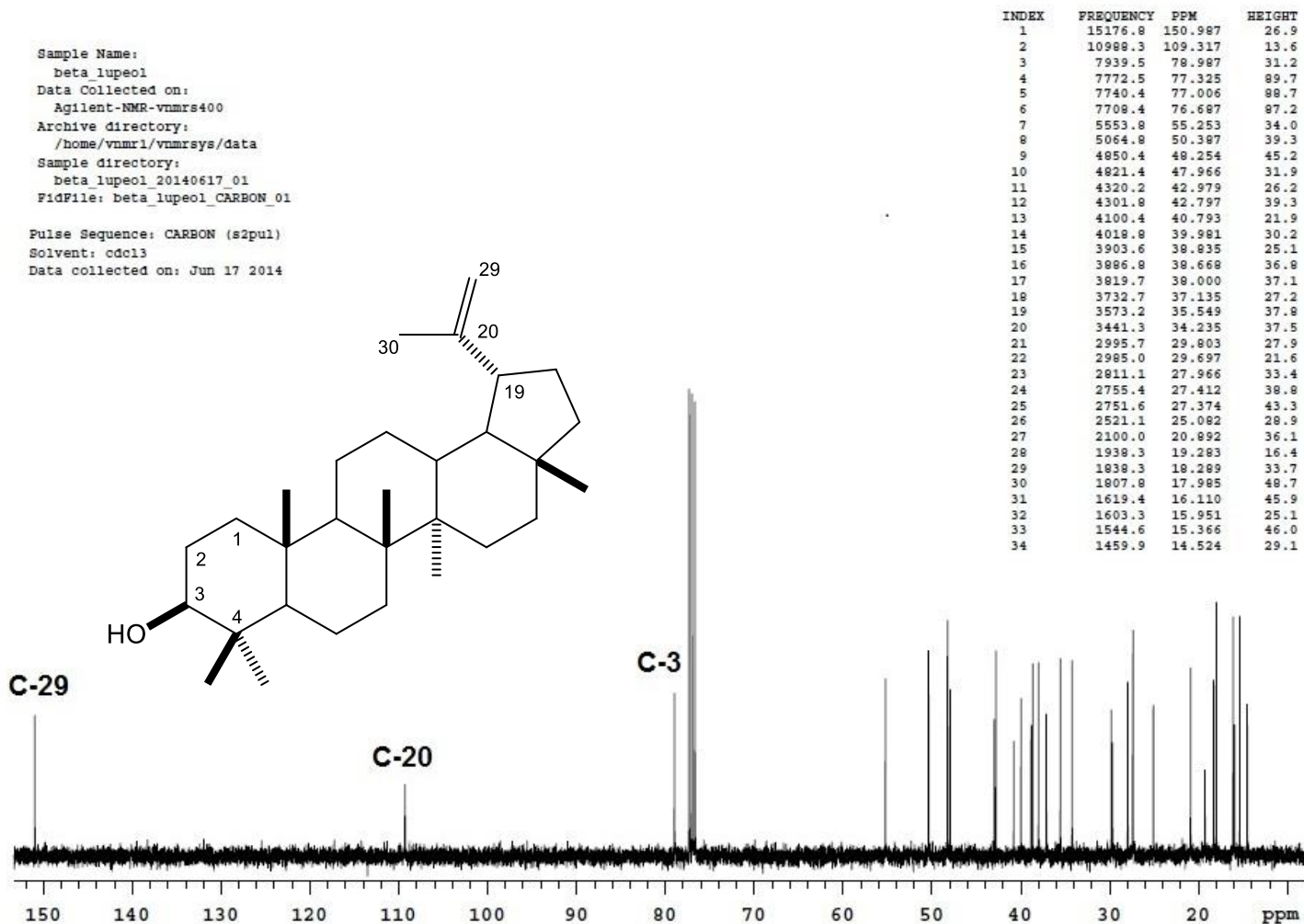


Figura 11. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C a 400 MHz en CDCl_3 de β -lupeol obtenido de las fracciones 200-223 del extracto de hexano de *Euphorbia nutans* Lag.

De las fracciones 252-303 de la columna cromatográfica eluidas con Hexano/AcOEt (9:1) del extracto de *Euphorbia nutans*, se observó una mezcla que mayoritariamente contiene β -sitosterol (3) ya que en su espectro de RMN de ^1H (Figura 13) se detectó una señal en 5.35 ppm que integra para un hidrógeno de alqueno ($\text{C}=\text{C}-\text{H}$) además de otra señal múltiple en 3.51 ppm que integra para un protón base grupo alcohol (OH). En su espectro de RMN de ^{13}C (Figura 14) se observaron señales que corresponden a este esteroide muy ampliamente distribuido en la naturaleza. Al determinar su punto de fusión de 127-128 °C y compararlo con el informado en la literatura (128-131 °C) corresponde a esta sustancia que además fue aplicada a una placa cromatográfica junto con una muestra auténtica de β -sitosterol, coincidiendo con lo publicado por Verdezoto (2013), su estructura molecular se muestra en la Figura 12.

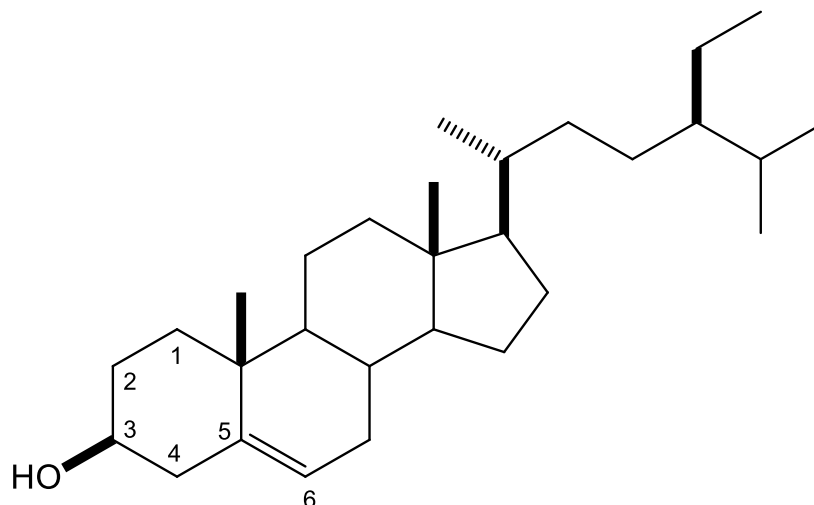


Figura 12. Estructura molecular de β -sitosterol aislado de *Euphorbia nutans* Lag.

Sample Name:
 Daniel_F252-277_col_hexano_Euphorbia
 Data Collected on:
 Agilent-NMR-vnmrs400
 Archive directory:
 /home/vnmr1/vnmrsys/data
 Sample directory:
 Daniel_F252-277_col_hexano_Euphorbia_20140609_01
 FidFile: Daniel_F252-277_col_hexano_Euphorbia_PROTON_01

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
 Solvent: cdcl3
 Data collected on: Jun 9 2014

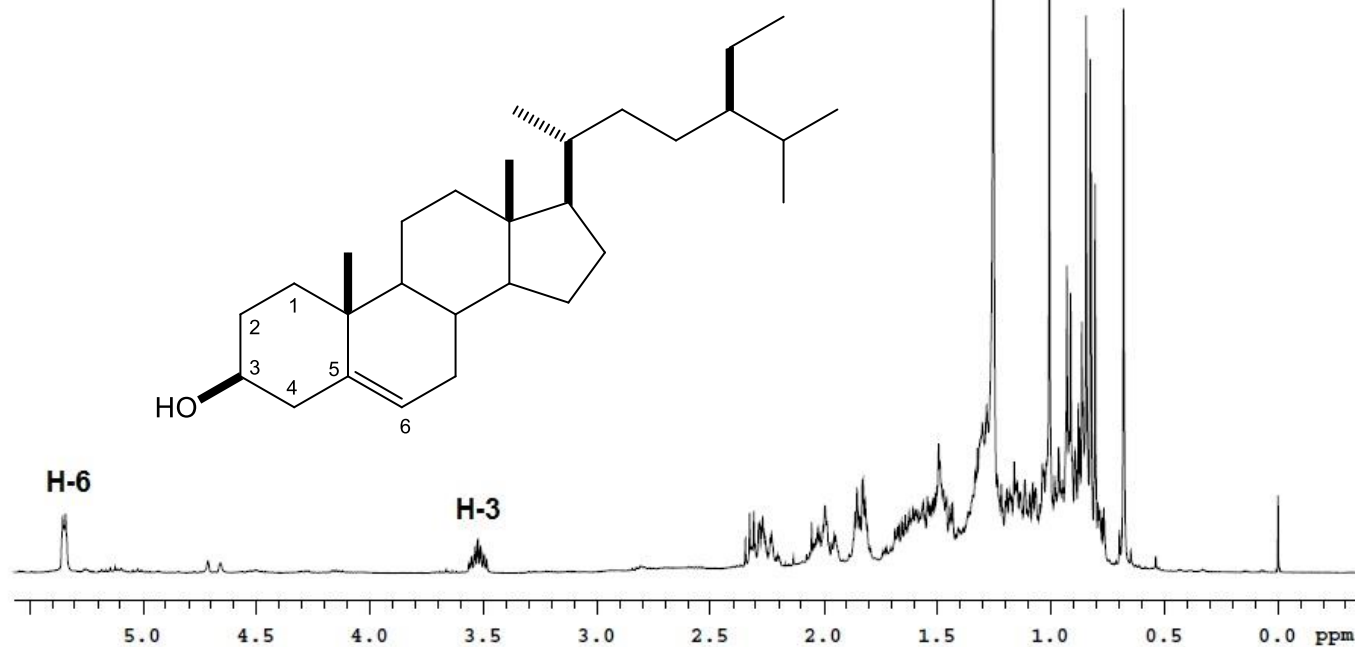


Figura 13. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de β -sitosterol obtenido de las fracciones 252-303 del extracto de hexano de *Euphorbia nutans* Lag.

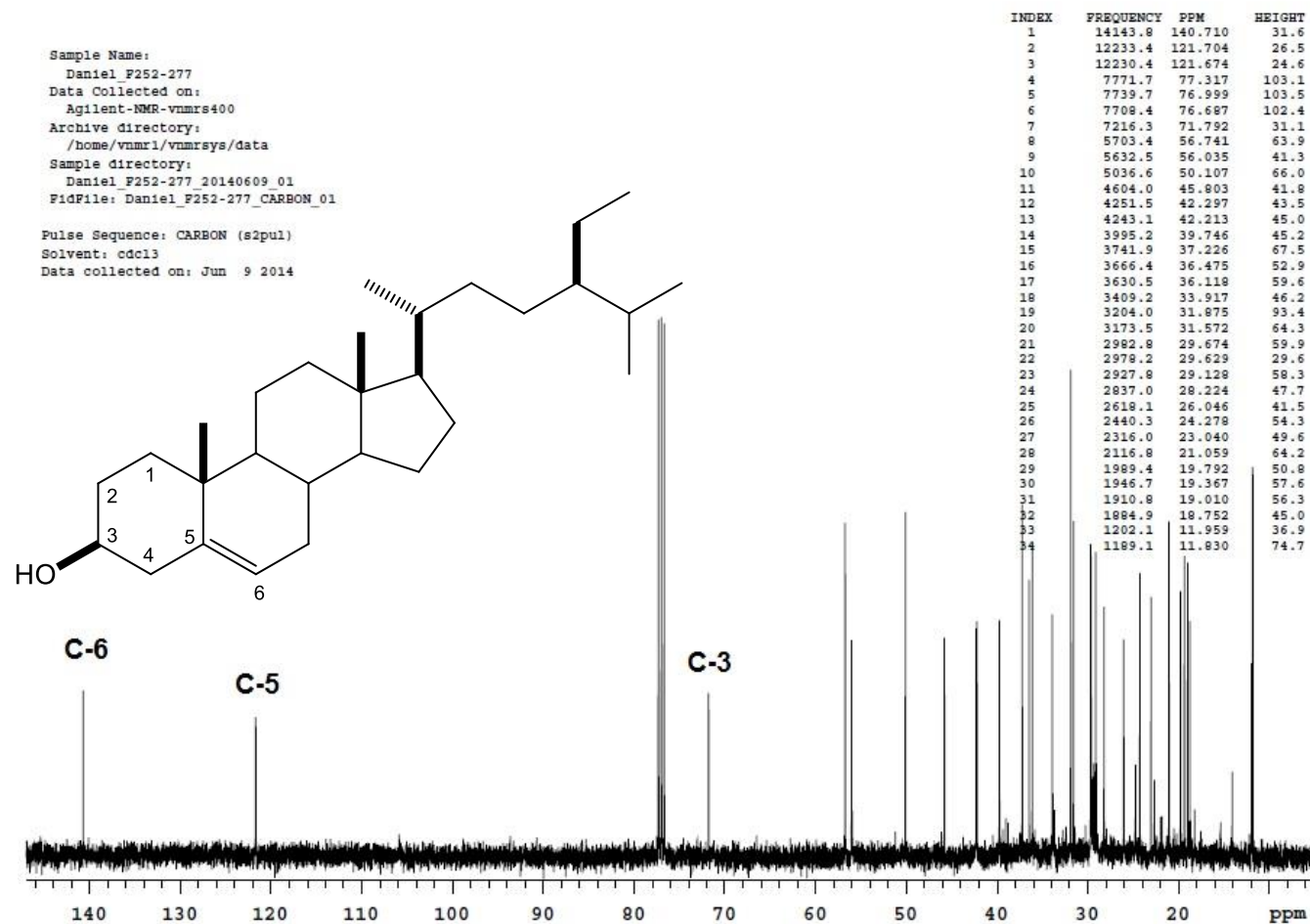


Figura 14. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C a 400 MHz en CDCl_3 de β -sitosterol obtenido de las fracciones 252-303 del extracto de hexano de *Euphorbia nutans* Lag.

b) Metabolitos secundarios obtenidos del extracto de diclorometano

En el Cuadro 2 se muestra la distribución y agrupamiento de las fracciones o particiones obtenidas de la columna cromatografica y los diferentes metabolitos secundarios que fueron identificados en este extracto.

Cuadro 2. Proporciones de disolventes (fase móvil), fracciones obtenidas y metabolitos secundarios identificados en la columna del extracto de diclorometano de *Euphorbia nutans* Lag.

Fase móvil	No. de fracciones	Metabolitos identificados	Observaciones
Hexano	1-36	-----	-----
Hexano:AcOEt (95:5)	37-96	-----	-----
Hexano:AcOEt (95:5)	97-100	β -sitosterol.	Identificados con RNM de ^1H , ^{13}C .
Hexano:AcOEt (95:5)	101-126	Mezcla de cicloartanos, β -lupeol y otros.	Acetilados.
Hexano:AcOEt (95:5)	127-271	-----	-----
Hexano:AcOEt (9:1)	272-535	-----	-----
Hexano:AcOEt (85:15)	536-711	-----	-----
Hexano:AcOEt (8:2)	712-876	-----	-----
Hexano:AcOEt (7:3)	877-1041	-----	-----
Hexano:AcOEt (6:4)	1042-1206	-----	-----
Hexano:AcOEt (5:5)	1207-1371	-----	-----
AcOEt	1372-1547	-----	-----
CH ₃ OH (Metanol)	1548-1679	-----	-----

De las fracciones 97-100 eluidas con Hexano/AcOEt (95:5) del extracto de diclorometano de *Euphorbia nutans* analizado por cromatografía en columna se aisló e identificó β -sitosterol (3). Finalmente de las fracciones 101-126 eluidas con

la misma polaridad anterior, se detectaron al menos tres sustancias naturales, una de ellas correspondió a β -lupeol (2) por la presencia de señales en 4.56 y 4.69 ppm en el espectro de RMN de ^1H (Figura 15), así como en 3.18 y 2.39 ppm se observaron señales múltiples que ubican a este triterpeno, en el mismo espectro de RMN ^1H se observa además un conjunto de dos señales en 0.56 y 0.35 ppm que integran para un hidrógeno cada una y además son señales diagnósticas para hidrógenos pertenecientes a un ciclopropano del tipo de los cicloartanos (Joseph-Nathan y Díaz, 1980).

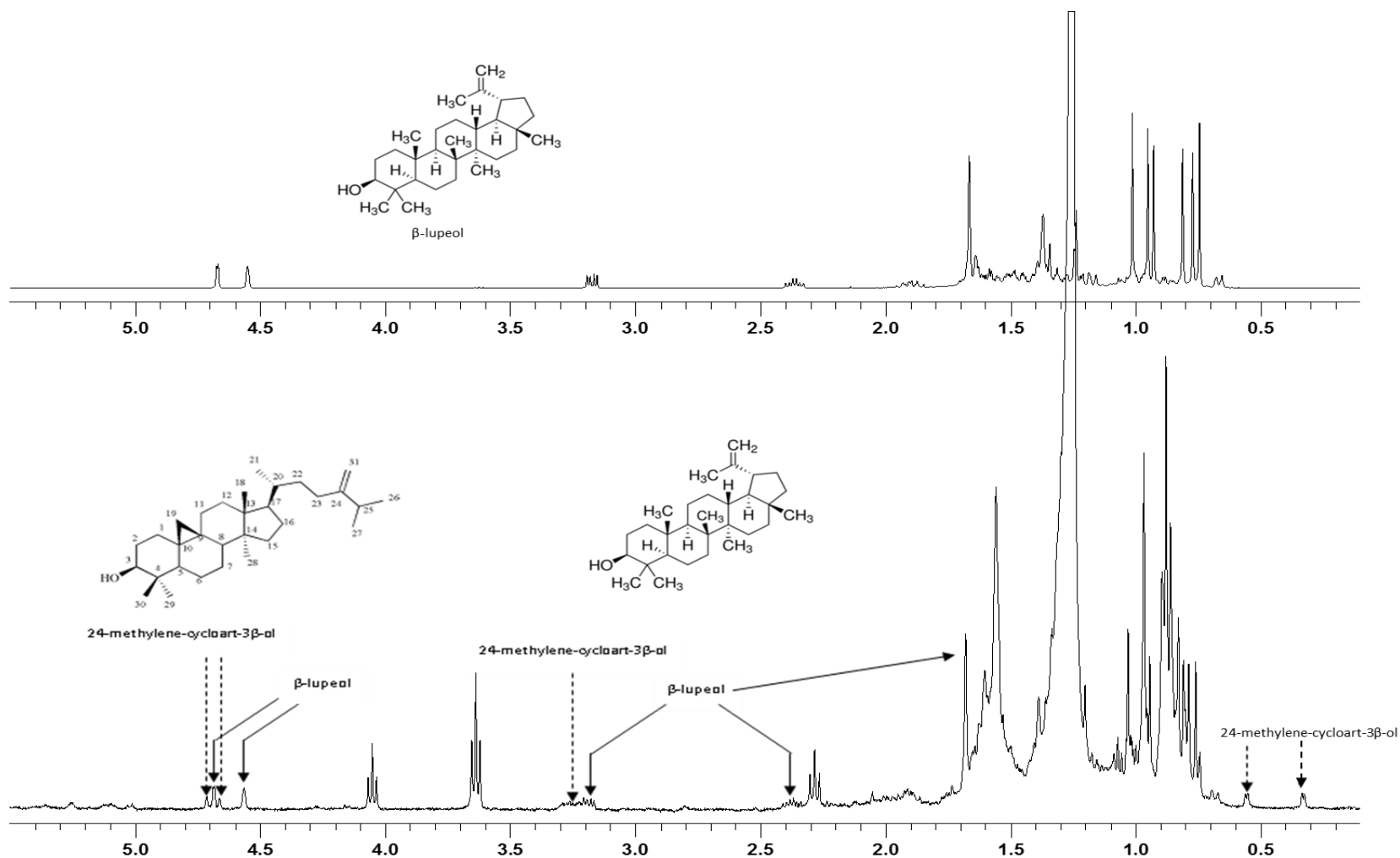


Figura 15. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de una mezcla de β -lupeol y probablemente 24-metilen-cicloartan-3 β -ol, además de otras impurezas no terpenoidales del extracto de diclorometano de *Euphorbia nutans* Lag.

Así mismo, en 4.73 y 4.68 ppm se observa un sistema que ubica a un grupo metileno de alqueno terminal y una señal múltiple en 3.25 ppm para un hidrógeno base de alcohol (-OH), estas señales podrían ubicar la presencia de 24-metileno cicloartanol (4) en esta mezcla, según datos reportados para este producto natural (Banadian *et al.*, 2014), en la Figura 16 se muestra la estructura molecular de este producto natural.

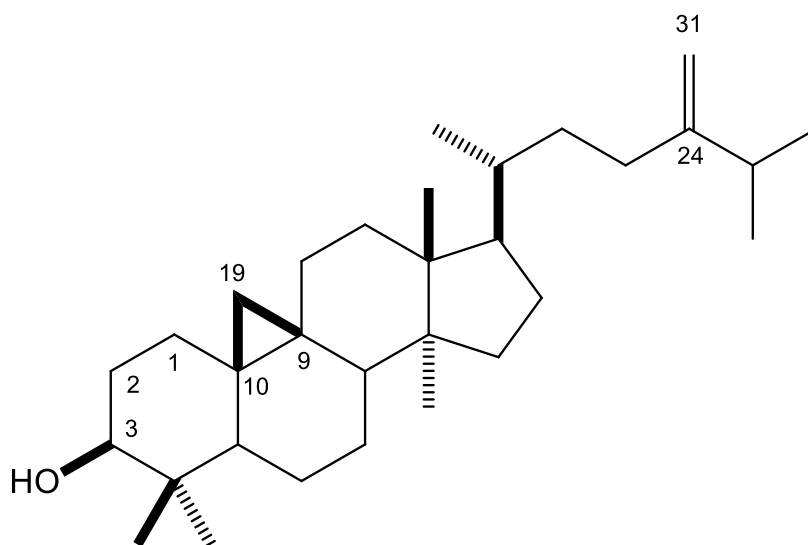


Figura 16. Estructura molecular del 24-metileno-cicloart-3β-ol (4).

c) Metabolitos secundarios obtenidos del extracto de metanol

En el Cuadro 3 se muestra la distribución y agrupamiento de las fracciones o particiones obtenidas de la columna cromatografica y los diferentes metabolitos secundarios que fueron identificados en el extracto metanólico de *Euphorbia nutans* Lag.

Cuadro 3. Proporciones de disolventes (fase móvil), fracciones obtenidas y metabolitos secundarios identificados en la columna del extracto metanolico de *Euphorbia nutans* Lag.

Fase móvil	No. de fracciones	Metabolitos identificados	Observaciones
CH ₂ Cl ₂	1-40	Estigmasterol y β -sitosterol	Mezcla y corroborados mediante placa de CCD y RMN de ¹ H
CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH (95:5)	41-400	-----	-----
CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH (9:1)	401-440	-----	-----
CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH (8:2)	441-470	-----	-----
CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH (7:3)	471-510	-----	-----
CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH (1:1)	511-570	Tipo Iridoide	En la fracción 553 mediante RMN de ¹ H
CH ₃ OH	571-660	-----	Metabolitos secundarios interesantes no identificados

En las fracciones 1 a 40 eluidas con CH₂Cl₂ del extracto de metanol de *Euphorbia nutans*, aplicado a una columna cromatográfica empacada con silicagel, se identificaron tanto β -sitosterol como estigmasterol por la inspección de su espectro de RMN de ¹H (Figura 17), además muestras auténticas de β -sitosterol y estigmasterol (5) fueron utilizadas en el desarrollo de una placa cromatográfica y cuya comparación evidenció la presencia de estos dos metabolitos secundarios, la estructura del estigmasterol se muestra en la Figura 18.

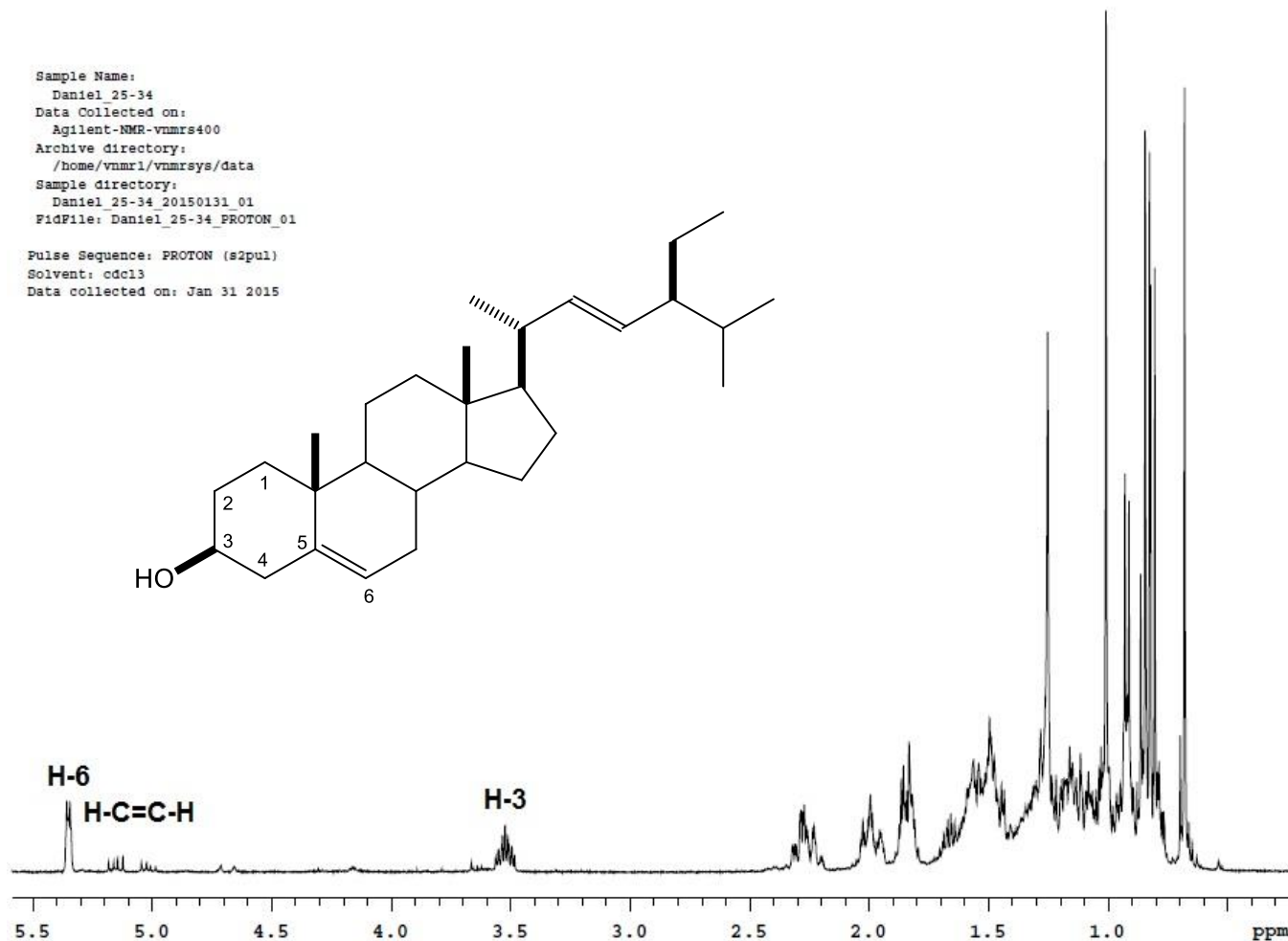


Figura 17. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de las fracciones 1-40 del extracto de metanol de *Euphorbia nutans* Lag.

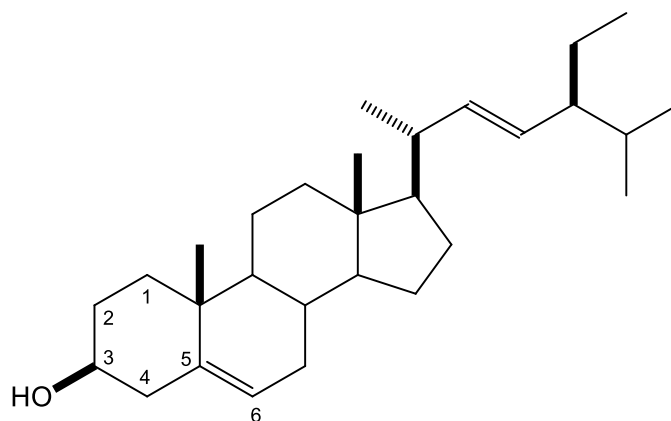


Figura 18. Estructura molecular del estigmasterol identificado del extracto de metanol de *Euphorbia nutans* Lag.

Finalmente, de las fracciones 511-570 eluidas con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) se aisló una sustancia sólida, mediante su espectro de RMN ^1H determinado en D_2O (Figura 20) se observaron señales en 6.4 ppm que pueden corresponder a un hidrógeno de alqueno ($\text{C}=\text{C}-\text{H}$); en 4.25 ppm se observa una señal que puede asignarse a un hidrógeno base de oxígeno, y entre 4.0 y 3.0 ppm se detectaron señales que pudieran representar a una sección de un azúcar unido a un iridoide, dada la insolubilidad de esta sustancia en disolventes orgánicos y solamente soluble en agua (Dinda *et al.*, 2007), una posibilidad estructural se presenta en la Figura 19, que requiere de más estudios para establecer la estructura correcta de la molécula mencionada.

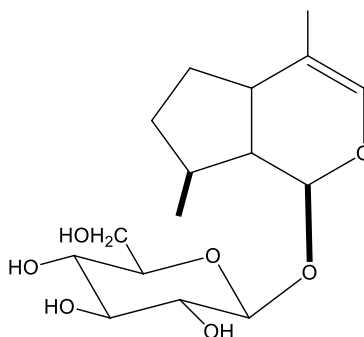


Figura 19. Posibilidad estructural del iridoide glicosilado aislado del extracto de metanol de *Euphorbia nutans* Lag.

Sample Name:
 Daniel_551
 Data Collected on:
 Agilent-MMR-vnmr400
 Archive directory:
 /home/vnmr1/vnmrsys/data
 Sample directory:
 Daniel_551_20150131_01
 FidFile: Daniel_551_PROTON_01
 Pulse Sequence: PROTON (zgpg30)
 Solvent: d2o
 Data collected on: Jan 31 2015

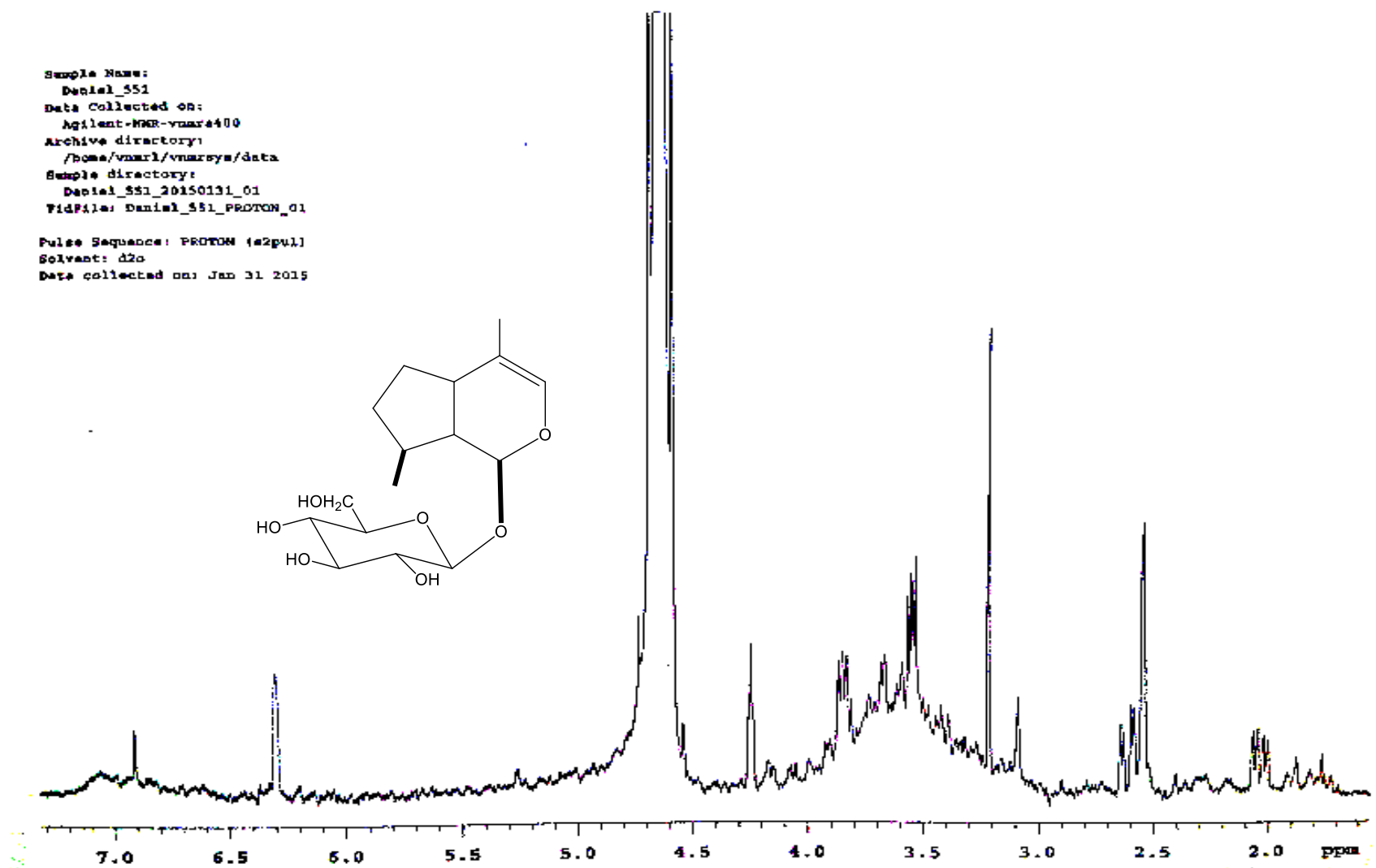


Figura 20. Expansión del espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ¹H a 400 MHz en D₂O de un posible iridoide aislado a partir de las fracciones 511-570 del extracto metanolico de *Euphorbia nutans* Lag.

d) Importancia biológica de los metabolitos secundarios obtenidos en los extractos de *Euphorbia nutans* Lag.

La α -amirina es una sustancia que parece conferir una actividad anti-úlceras (Navarrete et al., 2002) y generalmente posee propiedades anti-inflamatorias y anti-tumorales (Fernandes et al., 2003). Incluso, Oliveira et al. (2004a) observaron 72 % y 89 % de gastro-protección en las dosis orales de 200 y 400 mg/kg de resina cruda de *Protium heptaphyllum*, respectivamente en ratas. Por otra parte, Oliveira et al. (2004b) mencionan que la mezcla de α y β -amirina muestra una gastro-protección máxima del 67 % a la dosis de 100 mg/kg en ratas. Los datos citados respaldan la idea de que el metabolito secundario α -amirina es uno de los principales responsables de la actividad gastro-protectora que tiene *Euphorbia nutans* Lag.

El metabolito secundario β -lupeol tiene importancia medicinal como agente terapéutico y quimiopreventivo para el tratamiento de la inflamación y el cáncer, y de gran variedad de trastornos incluyendo también la inhibición de tumores del cáncer de próstata en humanos (M. Saleem et al., 2009), actividad antioxidante (Andrikopoulus et al., 2003), reduce la síntesis de triglicéridos y colesterol en las células de hepatoma humano (Mizuho Itoh et al., 2009), ataca selectivamente a las células humanas enfermas e insalubres sin afectar las células normales y saludables (Saleem y Siddique, 2011), además es de utilidad para estudiar cómo es que se ha dado la evolución de especies (Herrera et al. 1998).

El estigmasterol y β -sitosterol son típicos de encontrarse en las plantas (Marín et al., 2008; Zedan et al., 2013) y a pesar de ello se consideran importantes ya que presentan actividades biológicas muy favorables, por ejemplo, el β -sitosterol tiene actividad antimicótica y antibacteriana además de actuar como inhibidor de la promoción de tumores *in vivo* (Yasukawa et al., 1991), y el estigmasterol exhibe un efecto inhibitorio sobre la transcriptasa reversa del VIH (Akihisa et al., 2001).

De los cicloartanos son pocos los reportes de su actividad farmacológica (Gutiérrez y Rojano, 2009), sin embargo, su importancia radica en ser considerados como

marcadores químico-taxonómicos específicos del género *Euphorbia* (Ayatollahi et al., 2011).

Respecto a los iridoides, se han utilizado como marcadores químicos para los superordenes Corniflorae, Gentianiflorae, Loasiflorae y Lamiiflorae pero no para Euphorbianaes (Euphorbiaceae), siendo en este sentido la primera vez que se reporta un metabolito secundario tipo iridoide, en caso de confirmarse así, para este superorden. En quimiosistemática el valor de los iridoides tiene un significado importante en la clasificación, filogenia y evolución de las plantas (Sampaio-Santos, 2001). También los iridoides están relacionados como parte del mecanismo de defensa de las plantas frente a herbívoros o patógenos (Bowers y Stamp, (1993). Además, estos compuestos presentan propiedades benéficas sobre la función hepática y biliar y también han mostrado actividad anti-inflamatoria, antimicrobiana, antitumoral y antiviral, y se han utilizado como antídoto en el envenenamiento producido tras el consumo de hongos venenosos del género *Amanita* (López et al., 2012), además de ser mencionados por diferentes fuentes como preventivos de la vejez prematura.

Con base a los resultados obtenidos en *Euphorbia nutans* Lag., al uso gastro-protector de forma empírica y a los datos publicados por otros autores sobre los beneficios que ofrecen estos metabolitos (β -sitosterol, estigmasterol, α y β -amirina y β -lupeol), puede ser que la interacción de estos principalmente, y otros, sean los que le dan dicha característica medicinal a la planta *Euphorbia nutans* Lag.

CONCLUSIONES

Se efectuó el estudio fitoquímico de *Euphorbia nutans* Lag., mediante espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C , así como de infrarrojo de los compuestos seleccionados, se lograron identificar los metabolitos secundarios: Estigmasterol, β -sitosterol, β -lupeol, acetato de α -amirina, posible cicloartano al igual que un compuesto de tipo iridoide.

Con base a la literatura consultada, esta planta puede ser de considerable importancia como medicinal ya que los metabolitos que contiene juegan un papel fundamental al aportar muchos beneficios a la salud humana.

LITERATURA CITADA

- Abdul, A. Z., Abdul, A. R., Asokan, B., Kannappan, G., Chinnaperumal, K., Gandhi, E. 2012. Evaluation of medicinal plant extracts and isolated compound epicatechin from *Ricinus communis* against *Paramphistomum cervi*. Parasitology Research. 111(4):1629-1635.
- Akihisa, T., Ogihara J., Kato, J., Yasukawa, K., Ukiya M., Yamanouchi S. and Oishi K. 2001. Lipids. 36:507-512.
- Ávila, L., Perez, M., Sanchez-Duffhues, G., Hernandez-Galan, R., Munoz, E., Cabezas, F. 2010. Effects of diterpenes from latex of *Euphorbia lactea* and *Euphorbia laurifolia* on human immunodeficiency virus type 1 reactivation. Phytochem. 71(2-3):243-248.
- Ayatollahi, A. M., Mustafa, G., Suleiman, A., Ahmad M. M, Omer, M. A., Mohsen, S., Gholamhossein, F. and Hamid, M. 2011. Cycloartanes from *Euphorbia aellenii* Rech. F. and their Antiproliferative Activity. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 10(1):105-112.
- Bingtao, L., Huaxing, Q., Jin-shuang, M., Hua, Z., Michael, G., Gilbert, Hans-Joachim, E., Stefan, D., Petra, H., Lynn, J. G., Maria, V. and Gordon, D. McPherson. 2008. Flora of China. (11):163. <http://www.efloras.org>, dated 22nd September. 2008.
- Bowers, M. and Stamp, N. 1993. Effects of planta age, genotype and herbivory on *Plantago* performance and chemistry. Ecology. 74:178-179.
- Chaabia, M., Freund-Michelb, V., Frossardb, N., Randrianasoac, A., Andriantsitohainad, R., Lobstein, A. 2007. Anti-proliferative effect of *Euphorbia stenoclada* in human airway smooth muscle cells in culture. Journal of Ethnopharmacology. 109(1):134–139.
- Dewir, Y. H., Chakrabarty, D., Hahn, E. J. and Paek, K. Y. 2005. Reversion of inflorescence development in *Euphorbia millii* and its application to large-

- scale micropropagation in an air-lift bioreactor. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 80:581-587.
- Dinda, B., Debnath, S., Harigaya, Y. 2007. Naturally Occurring Iridoids. A Review, Part 1. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 55(2):159-222.
- Fernandes, J., Castilho, R. O., Costa, M. R., Wagner-Souza, K., Kaplan, M. A. C., Gattass, C. R. 2003. Pentacyclic triterpenes from *Chrysobalanaceae* species: cytotoxicity on multidrug resistant and leukemia cell lines. *Cancer Lett.* 190:165-169.
- Ferreira, A. M., Carvalho, M. J., Sequeira, M. M., Silva, A. M., Carvalho, L. H. 2013. Chemical constituents of *Euphorbia hyberna* L. (Euphorbiaceae). *NCBI. Nat. Prod. Res.* 27(3):282-285.
- Gutiérrez, A. P. y Rojano, A. B. 2009. Docking de cicloartanos inhibidores de tirosinasa. *Vitae*. 16(2):245-251.
- Haba, H., Catherine, L., Laurence, M., Christophe, L., Hassina, H., Mohammed, B. 2009. Ent-abietane diterpenoids from *Euphorbia guyoniana* Boiss. and Reut. *Biochemical Systematics and Ecology*. 37:504–508.
- Harpalani, A. N., Ashok, D. T., Kishor, V. O., Ravindra, V. K., Rajkumar, V. S. 2011. Anti-Inflammatory and Anti-Arthritic Potential of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Euphorbia antiquorum* Linn. *Pharmacologyonline*. 2:287-298.
- Herrera, J. B. R., Bonnie, B., William, K. W. and Seichi, P. T. M. 1998. Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* lupeol synthase gene. *Phytochemistry*. 49(7):1905-1911.
- Joseph-Nathan, P. y Díaz, T. E. (1980). *Introducción a la Resonancia Magnética Nuclear*. Editorial Limusa, México, p 28.
- Kheyrodin, H. and Ghazvinian, K. 2012. Bioactive and toxic products found in *Euphorbia Sp.* *J. Rec. Adv. Agri.* 1(4):103-111.
- López, C. N., Miguel, M., Aleixandre, A. 2012. Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*. 32(3):81-91.
- Lee, C. W., Jeckes, J. and Thomas, J. C. 1982. Culture Propagation of *Euphorbia lathyris*, *Horticultural Science*. 17:533 -553.

- Li-Yan, W., Nai-Li, W., Xin-Sheng, Y., Syohei, M. and Susumu, K. 2003. Euphane and tirucallane triterpenes from the roots of *Euphorbia kansui* and their *in vitro* effects on the cell division of *Xenopus*. J. Nat. Prod. 66(5):630–633.
- Lynn, K. R., Clevette-Radford N. A. 1987. Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. Phytochem. 26(4):939-944.
- Marín, M. R., Rodny, M. De O. P., Adonis, B. A. and Alejandro, N. V. L. 2008. Caracterización por cromatografía de gases/espectrometría de masas del extracto apolar de las hojas de *Clusia minor* L. Lat. Am. J. Pharm. 27(5):747-751.
- Martínez, G. M., Jaime, J. R., Ramiro, C. D., Edgar, J. A., Roberto, G., Angélica, C., Ricardo, M. H. 2002. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica. 73(2):155-281.
- Matsunagaa, S., Reiko, T., Masao, A. 1988. Triterpenoids from *Euphorbia maculata*. Phytochemistry. 27(2):535–537.
- Mizuho, I., Kazuyuki, H., Yukie, A., Fumiko, K., Gen, T., Junichiro, T., Hiroki, S., Keishi, H. 2009. Lupeol reduces triglyceride and cholesterol synthesis in human hepatoma cells. Phytochemistry Letters. 2:176-178.
- Mohammad, S. 2009. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. NIH, Cancer Lett. 285(2):109–115.
- Navarrete, A., Trejo, M. J. L., Reyes, T. L. 2002. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. J Ethnopharmacol. 79:383-388.
- Oliveira, F. A., Vieira-Junior, G. M., Chaves, M. H., Almeida, F. R. C., Lima, Jr. R. C. P., Santos, F. A., Rao, V. S. N. 2004a. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. Pharmacological Research. 49(2):105–111.
- Oliveira, F. A., Vieira-Junior, G. M., Chaves, M. H., Almeida, F. R. C., Santos, K. A., Martins, F. S., Silva, R. M., Santos, F. A., Rao, V. S. N. 2004b. Gastroprotective effect of the mixture of α - and β -amyrin from *Protium*

- heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *Planta Médica*. 70(8):780-782.
- Qi, T., Zhiheng, S., Zhentai, H., Xiaojun, M., Derong, X., Yanhai, L., Haibo, C., Xuesong, W., Xiaoying, Q., Angela, H., Hongwei, L., Dizhou, G., Deyou, Q. 2012. LC–MS method for detecting prostratin in plant extracts and identification of a high-yielding population of *Euphorbia fischeriana*. *Phytochemistry Letters*. 5:214-218.
- Reiko, T., Tomoko, I., Shunji, K., Wasuke, K., Shunyo, M. 1996. A 3,4-seco-8 β H-fernadienoic acid and other constituents from *Euphorbia chamaesyce*. *Phytochemistry*. 41(4):1163-1168.
- Ripley, K. P. and Preece, J. E. 1986. Micropropagation of *Euphorbia Lathyris* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 5(3):213-218.
- Rzedowski, J. 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana*. 14:3-22.
- Saleem, M. and Siddique, H. R. 2011. Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies. *Life Sciences*. 88:285-293.
- Sampaio-Santos, M. I. 2001. Biosynthesis significance of iridoids in chemosystematics. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 12(2):144-153.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. State University of New York, College of Environmental Science y Forestry: JOHN WILEY y SONS, INC.
- Steinmann, V. W. 2002. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Bot. Mex*. 61:61-93.
- Sükran, K. 2007. Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*. 111:341-364.
- Vasas, A. and Hohmann, J. 2013. *Euphorbia* Diterpenes: Isolation, structure, biological activity, and synthesis (2008–2012). *Chemical reviews*. American Chemical Society Publications. [Pubs.acs.org/CR](https://pubs.acs.org/CR).

- Verdezoto, J. 2013. Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios mayoritarios presentes en el extracto metanólico de *Sapium lateriflorum* (Euphorbiaceae). Química Central. 3(1):37-42.
- Webster, G. L. 1994. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. Ann. Missouri Bot. Gard. 81:33-144.
- Windholz, M. and Budavari, S. 1976. An encyclopedia of chemicals and drugs. En The Merk Index (Ninth Edition, pp: 84) RAHWAY, N. J., U.S.A.: MERK and CO., INC.
- Yasukawa, K., Takido, M., Matsumoto, T., Takeuchi, M. and Nakagawa, S. 1991. J. Oncology. 41:72-76.
- Yoshiaki, A., Keita, K., Tsutomu, H., Takuo, O., Takashi, Y., Isao, A., Takeshi, S., Sansei, N. 1997. Four new hydrolyzable tannins and an acylated flavonol glycoside from *Euphorbia maculata*. Canadian Journal of Chemistry. 75(6):727-733.
- Zedan, Z. I., Amany, S., Wael, M. A. M. 2013. Chemical and biological studies of *Euphorbia Aphylla*. ISSN: 2320-3358, Journal of natural remedies. 13(1). www.jnronline.com.

CAPITULO IV

OBTENCIÓN Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE CALLOS *in vitro* EN *Euphorbia nutans* Lag.

RESUMEN

La propagación mediante el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* no sólo se aplica para cubrir la demanda de plantas, rescate y conservación de diversas especies vegetales, sino también para tener material vegetal con el fin de obtener metabolitos secundarios. Pero existe incertidumbre acerca de qué tanto influye el nivel de diferenciación y/o especialización celular *in vitro* en la biosíntesis y obtención de metabolitos secundarios que normalmente se encuentran en plantas silvestres o en campo. Por ello que se emplearon hojas, segmentos de lámina foliar y segmentos nodales de *Euphorbia nutans* Lag., planta con propiedad medicinal como cicatrizante y para tratar la gastritis, con el objetivo de obtener callos *in vitro* y posteriormente realizar un análisis fitoquímico para comparar los resultados con los obtenidos de plantas silvestres. Se evaluaron reguladores de crecimiento vegetal como 6-Benciladenina (BA), kinetina (Kin), 2-iso-pentiladenina (2i-p), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y Thidiazuron (TDZ), todos a 10 mg·L⁻¹ y en diferente combinación en un medio de cultivo básico con las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) 100 % más suplementos. El análisis fitoquímico de los callos obtenidos se hizo mediante comparación en placas cromatográficas (CTL) y espectroscopía de RMN de ¹H. Los datos del peso de los callos se analizaron mediante un análisis de varianza completamente al azar en la evaluación del efecto final de cada tratamiento y se aplicó la prueba de Tukey (p=0.05) para definir la diferencia entre los efectos medios de los tratamientos. Los resultados indican que el tipo de explante así como el tipo y combinación de reguladores de crecimiento juegan un papel fundamental en la formación de callos en *Euphorbia nutans* Lag., y el análisis fitoquímico de los callos reveló diferencia en los metabolitos y ausencia de los más abundantes en plantas silvestres.

Palabras clave: Hojas, ápices, metabolitos, fitoquímica, cromatografía.

INTRODUCCIÓN

Pierik (1990) define “callo” como tejido constituido por células diferenciadas que se desarrollan en respuesta a una lesión química o física en condiciones hormonales determinadas, el cual se puede obtener a partir de un fragmento de tejido y sólo algunas de las células del callo exhiben la totipotencia celular, y esta habilidad de diferenciarse en tejidos, órganos e incluso embriones, las hace capaces de regenerar plantas enteras. Por otra parte, Kondamudi *et al.* (2009) mencionan que en muchos experimentos de cultivo de tejidos, como primer paso es necesaria la inducción de callo (conjunto de células en crecimiento desorganizado) a partir del explante donde el callo se produce en respuesta a una lesión del tejido, y además, el cultivo de callo se utiliza para estudiar el aislamiento de protoplastos, tipos de células, la selección celular, la embriogénesis somática, la organogénesis y la producción de metabolitos secundarios. En Euphorbiaceae Lee y Starratt (1972) cultivaron raíces de plántulas de *Euphorbia esula* y *Euphorbia cyparissias* para obtener callos con ácido α -naftalenacético (ANA), siendo mejor fitohormona que kinetina (Kin), 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indolacético (IAA) o ácido-4-amino-3,5,6 tricloropicolínico (picloram), y el ácido giberélico no tuvo algún efecto. Ripley y Preece (1986) mencionan que la citocinina 6-benciladenina (BA) no fue necesaria para la proliferación de brotes axilares en *Euphorbia lathyris* L., pero si para la producción de callos y brotes adventicios. En *Mallotus philippensis*, Abbas (1993) obtuvo un callo en continuo crecimiento en medio MS + 2,4-D (5.78 μ M) + Kin (2.5 μ M). Jasrai *et al.* (2003) en *Euphorbia pulcherrima* reporta la inducción de callos rojos en un medio MS suplementado con 2-iso-penteniladenina (2i-p) (9.8 μ M) y ANA (2.69 μ M). Pickens *et al.* (2005) en *Euphorbia pulcherrima* reporta a tidiazurón (TDZ) en concentraciones entre 2.3 y 23.0 μ M causando hiperhidricidad de brotes, y la mayoría de los callos y brotes se obtuvieron a partir de secciones de la vena media de las hojas cultivadas *in vitro* en el medio que contiene 8.8 a 13.3 μ M de BA y 17.1 μ M de AIA durante un mes. Bin Xu *et al.* (2008) plantean un protocolo de regeneración celular para *Euphorbia esula* L. mediante un medio de cultivo MS adicionado con 6-bencilaminopurina (BAP) (1.11 μ M) + ácido indolbutírico (AIB) (1.97 μ M) donde después de 30 días de cultivo obtuvieron brotes de forma directa

e indirecta. En *Euphorbia pulcherrima*, Dinum y Brian (2010) mencionan el cultivo de yemas apicales y axilares en un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) + BA y BA + AIA que produjeron principalmente un callo rojo (10 μM BA), similar a lo reportado por Jasrai *et al.* (2003) así como algunos callos blancos (10 μM BA + 4 μM AIA) y color gris-verde después de un mes de cultivo. En el año 2011 se reporta la micropropagación de *Ricinus communis* a partir de tejidos de hojas cotiledonales donde el mejor porcentaje de formación múltiple de brotes fue 90 %. Además, la mejor respuesta de inducción de callo friable y de color marrón blanquecino a partir del mismo tipo de explantes fue también del 90 % en el medio MS con la adición de 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA más 2.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP (Shagufta *et al.*, 2011). Por otra parte, el cultivo de células y tejidos vegetales fue introducido a finales de los años 60 del siglo XX como una alternativa posible para el estudio y producción de metabolitos secundarios (Bourgaud *et al.*, 2001) y a partir de entonces se han realizado numerosos estudios con el objetivo de incrementar y obtener los compuestos deseados. Sin embargo, Kreis (2007) menciona que no es posible producir todos los compuestos en células indiferenciadas (callos) en igual cantidad y calidad que los obtenidos en las plantas madre, ya que muchos metabolitos se sintetizan integrados a eventos de diferenciación celular. No obstante, Janarthanam *et al.* (2010) en *Stevia rebaudiana* (Asteráceae) mencionan el cultivo de explantes foliares y segmentos nodales para la obtención de callo con el fin de analizar los metabolitos aislados y compararlos con los que se obtienen de plantas provenientes de campo, el cual fue abundante (11.6 g) a partir de explantes foliares cultivados en un medio MS que contenía 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA, 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D y 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Kin. Más recientemente, Safdar y Alveena (2013) en *Momordica charantia* cv. Jaunpuri (Cucurbitaceae) mencionan a los reguladores de crecimiento vegetal: BAP, AIA, y 2,4-D en medio MS para inducir la callogénesis y extraer los principios activos ahí generados, resultando BAP más 2,4-D como la mejor combinación en diferentes concentraciones para la inducción de callo a partir de diferentes explantes de plántulas *in vitro*. Con base a los antecedentes sobre inducción de callo en plantas de la familia Euphorbiaceae, al empleo de los citados reguladores de crecimiento vegetal tanto en plantas de dicha familia como de otras y a la nula información

generada y publicada en este tema sobre la *Euphorbia nutans* Lag., especie con alto potencial de uso farmacológico, se plantearon como objetivos: a) Evaluar diferentes explantes *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. bajo el efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal y sus combinaciones para la obtención de callo y b) Extracción de metabolitos secundarios a partir de los callos obtenidos *in vitro* y su comparación mediante cromatografía en placa delgada con metabolitos obtenidos de plantas madre.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

La presente investigación se realizó durante el año 2014 a partir de hojas y segmentos nodales de plantas de *Euphorbia nutans* Lag. obtenidas y mantenidas bajo condiciones *in vitro* en el Laboratorio de Cultivo de Células y Tejidos Vegetales *in vitro* del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Condiciones de cultivo *in vitro*

El medio de cultivo empleado fueron las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962) 100 %, suplementado con myo-inositol 100 mg·L⁻¹, tiamina-HCl 0.40 mg·L⁻¹, sacarosa 30 g·L⁻¹; adicionando por separado los reguladores de crecimiento vegetal: Kin, 2i-p, BA, ANA, 2,4-D y TDZ, más 0.7 % de agar-agar, 3 mg·L⁻¹ de AgNO₃ y ajustando la solución final de los tratamientos a un pH de 5.7 ± 0.01. Después de diluir el agar en el medio de cultivo, éste se vertió en tubos de ensaye en una cantidad de 10 mL por frasco y se taparon con tapas de polipropileno para esterilizarse por 20 minutos en una autoclave de vapor de agua tipo horizontal a una temperatura de 121 °C y a 1.5 kg·cm² de presión. Después de realizada la siembra *in vitro* de los tejidos, los tubos de cultivo fueron incubados a 26 ± 2 °C y con 24 horas de luz artificial mediante lámparas de luz fluorescente blanca.

Tratamientos

Para evaluar las variables en este trabajo se elaboró un cuadro para combinar las citocininas con las auxinas y así tener diferentes tratamientos. Por lo tanto, los tratamientos para el cultivo de segmentos nodales se muestran en el Cuadro 1. El tratamiento para evaluar las respuestas en hojas únicamente fue BA + ANA, ambos reguladores de crecimiento vegetal en $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, esta concentración se determinó con base a resultados de bioensayos previos con $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA + ANA, $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA + ANA y $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA + ANA, donde $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de concentración de ambos reguladores dio las mejores respuestas.

Cuadro 1. Tratamientos para evaluar la inducción de callo *in vitro* a partir de segmentos nodales en la *Euphorbia nutans* Lag.

Tratamiento	Reguladores de crecimiento vegetal $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$					
	Kin	2i-p	BA	ANA	2,4-D	TDZ
1	10			10		
2		10		10		
3			10	10		
4	10				10	
5		10			10	
6			10		10	
7	10					10
8		10				10
9			10			10
10	---	---	---	---	---	---

Tratamiento 10: Tratamiento control o testigo. Únicamente las sales MS 100 % (1962) más suplementos.

Variables evaluadas

Contaminación por hongos y/o bacterias: Se consideraron frascos de cultivo contaminados si se observaban crecimientos de micelio o placas bacterianas.

Necrosis: Se consideraron semillas y/o tejidos necrosados cuando presentaron una apariencia café-obscura o con liberación de fenoles en el medio de cultivo.

Porcentaje de respuesta a la formación de callo: Se considera formación de callo cuando resulta un crecimiento celular desorganizado en segmentos nodales, hojas completas y segmentos foliares de *Euphorbia nutans* Lag. El porcentaje expresado es la diferencia del total de explantes con respuesta a callo.

Posición de hojas en el medio de cultivo: Se evaluaron dos posiciones: El haz de la lámina foliar hacia arriba del medio de cultivo y la posición del haz hacia abajo o en contacto con el medio de cultivo.

Presencia de metabolitos secundarios: Se comparó la presencia de metabolitos secundarios en extractos de callos vs extractos de plantas silvestres mediante placa cromatográfica.

Extracción de metabolitos secundarios a partir de callo

La extracción de los metabolitos secundarios se llevó a cabo mediante la técnica de reflujo por dos horas tres veces y con tres disolventes diferentes de menor a mayor polaridad (Hexano, Diclorometano y Metanol, respectivamente) cada uno, concentrándose el extracto de cada disolvente con ayuda de un Rota vaporador. La cantidad de callos fue de 3.41 g después de dejarse a temperatura ambiente y fuera de los frascos de cultivo por 24 hrs.

Análisis de datos

Para la obtención de datos de respuesta se consideraron 10 repeticiones por tratamiento para segmentos nodales y para hojas y segmentos foliares se consideraron cinco repeticiones por tratamiento tomando un tubo de ensaye como unidad experimental con un explante y registrando las observaciones cada semana durante 8 semanas. Se utilizó un análisis de varianza completamente al azar en la evaluación final de cada tratamiento y se aplicó la prueba de Tukey ($p=0.05$) para definir la diferencia entre los efectos medios de los tratamientos empleando el paquete estadístico SAS.

Los metabolitos secundarios de los callos sólo se compararon mediante placas cromatográficas en capa delgada (CCD) con los metabolitos secundarios de los

extractos obtenidos de plantas silvestres de *Euphorbia nutans* Lag. y los cuales se analizaron mediante Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN ^1H).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contaminación y necrosis de tejidos

En este trabajo no se presentó contaminación de los tejidos vegetales empleados, lo cual es lógico ya que provinieron de plantas bajo condiciones asépticas *in vitro*. No obstante, todos los tejidos se necrosaron, lo cual puede deberse a la exposición de estos al calor generado por el mechero ya que al provenir de frascos bajo condiciones *in vitro* y con alta humedad relativa (probablemente más del 90%), sus tejidos de protección no estén bien desarrollados o están muy turgentes y por ende mucho más sensibles al aire caliente que los explantes provenientes de plantas de campo.

Cultivo de segmentos nodales

La obtención de respuestas en la inducción de callo para esta variable estuvo influenciada por la combinación de distintos tipos de reguladores de crecimiento, principalmente por el tipo de auxina empleado, pues como es evidente, en los tratamientos 1, 2 y 3 sí se apreció respuesta para la inducción de callo, los cuales corresponden a los tratamientos con Kin + ANA, 2i-p + ANA y BA + ANA, respectivamente, a excepción del tratamiento 4 que tiene Kin + 2,4-D y también favoreció dicha respuesta. Por lo tanto, estos resultados no coinciden con lo que menciona Pierik (1990) y Kondamudi *et al.* (2009), ya que la formación del callo no se dio en la parte donde se realizó el corte del tejido, sino en el segmento nodal donde existen yemas axilares (Figura 1) y tejidos con crecimiento activo. Así mismo, el peso de los callos en los cuatro tratamientos que favorecieron ésta respuesta no fue significativo, lo que indica que los segmentos nodales como explantes no son idóneos para inducir dicha respuesta (Cuadro 2), sin embargo, el tratamiento con 2i-p + ANA fue el que mayor favoreció el porcentaje de respuesta (90 %) seguido de Kin + ANA y Kin + 2,4-D (ambos 70 %) lo que indica que la respuesta para

formación de callo depende del tipo de citocinina combinado con ANA, pues 2,4-D es está reportado para formar callo se vió inhibido por las citocininas y sólo con Kin tuvo cierta respuesta (70 %), y de igual forma ANA + BA tuvo menor respuesta (40 %) que con Kin y 2i-p.

Cuadro 2. Inducción de callos *in vitro* a partir de segmentos nodales de *Euphorbia nutans* Lag.

Tratamiento	Porcentaje de respuesta (%)	Características del callo		Peso de callo (g)
		Color	Textura	
1	70	Marrón/cremoso	Compacta	0.0321 a
2	90	Cloróticos	Compacta	0.0381 a
3	40	Gris oscuro	Compacta	0.0401 a
4	70	Gris oscuro	Compacta	0.0245 a
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-

Respuestas a la formación de callo *in vitro* en segmentos nodales de *Euphorbia nutans* Lag., por tratamiento. Los tratamientos que tienen la misma letra, no son estadísticamente diferentes (Tukey, $p=0.05$).

Por otra parte los resultados tienden a ser similares a los datos reportados por Lee y Starratt (1972) en raíces de plántulas de *Euphorbia esula* y *Euphorbia cyparissias* para obtener callos mediante el uso de ANA, siendo mejor para ello que Kin, AIA, picloram y 2,4-D. También en *Euphorbia pulcherrima*, Dinum y Brian (2010) reportan la obtención de callo a partir de yemas apicales y axilares empleando un medio de cultivo MS adicionado con BA + AIA e incluso adicionado únicamente con BA, al igual que lo reportado por Jasrai *et al.* (2003).

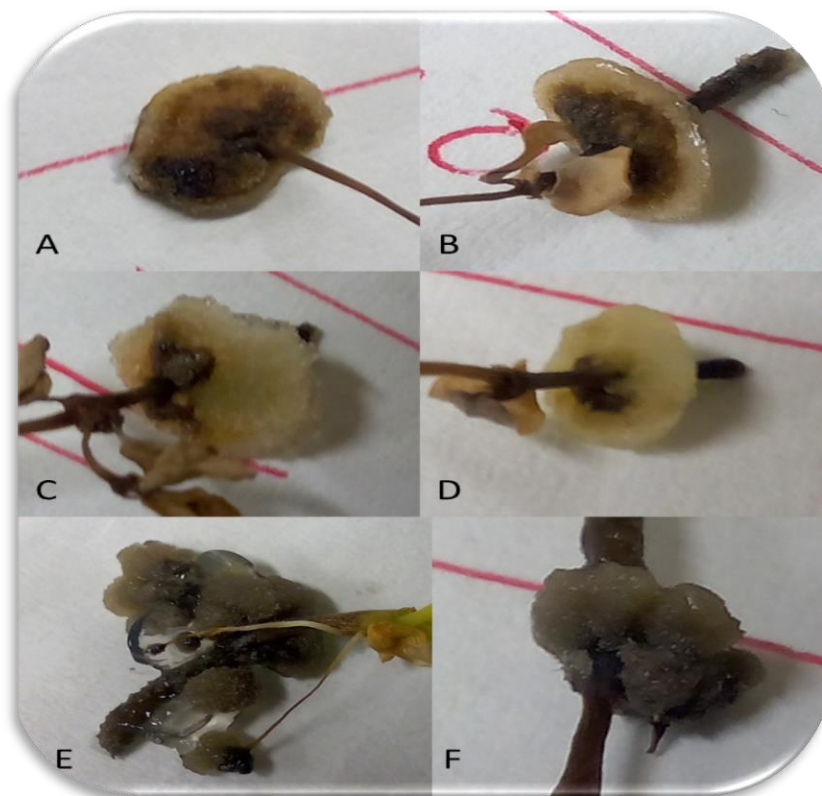


Figura 1. Formación de callos a partir de segmentos nodales de *Euphorbia nutans* Lag. bajo condiciones *in vitro*. A y B) Callos obtenidos con Kin + ANA, C y D) Callos obtenidos con 2i-p + ANA, E) Callos obtenidos con BA + ANA, F) Callos obtenidos con Kin + 2,4-D.

Por otra parte, Ripley y Preece (1986) mencionan que BA no es necesaria para la proliferación de brotes axilares en *Euphorbia lathyris* pero sí fue fundamental para la obtención de callo y brotes adventicios, sin embargo, en este trabajo parece ser que BA no es favorable para dicha respuesta, a excepción del tratamiento 3, lo que indica que en combinación con 2,4-D y TDZ no es apropiada al igual que la concentración empleada como lo reporta Janarthanam *et al.* (2010) en *Stevia rebaudiana* (Asteráceae) al obtener callo para el análisis de metabolitos secundarios empleando $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ANA + $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de 2,4-D y $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Kin, por lo que tal vez BA muestre mejores respuestas a menores concentraciones e incluso con ANA u otros reguladores de crecimiento vegetal como lo citado por Bin Xu *et al.* (2008) en *Euphorbia ésula* al obtener brotes a partir de callo después de treinta días

de cultivo *in vitro* en un medio MS adicionando BAP y AIB, o a lo reportado por Safdar y Alveena (2013) en *Momordica charantia* cv. Jaunpuri (Cucurbitaceae) donde emplearon BAP, AIA Y 2,4-D siendo mejor la combinación BAP + 2,4-D.

Cultivo *in vitro* de hojas completas vs segmentos foliares

Los resultados indican que la posición del haz de la hoja sobre el medio de cultivo no fue importante para la formación de callo como se aprecia en el Cuadro 3, sino al contacto de la parte basal de la hoja con éste, pues como se aprecia en la Figura 2 B-C y D-E, el callo se formó en el peciolo de las hojas, por lo tanto, la formación de callo será positiva siempre y cuando la hoja lleve parte del peciolo y éste quede en contacto con el medio de cultivo, independientemente de si el haz foliar se coloca hacia arriba o hacia abajo sobre el medio de cultivo.

Cuadro 3. Inducción de callos *in vitro* a partir de hojas completas y segmentos foliares de *Euphorbia nutans* Lag.

Explante	Porcentaje de respuesta (%)	Características del callo		Peso de callo (g)
		Color	Textura	
Hoja completa HazA	100	Verde claro	Poco cristalino	0.0174 a
Hoja completa HazB	40	Clorótico	Poco cristalino	0.0113 a
Segmento foliar HazA	100	Verde limón	Friable	0.8830 b
Segmento foliar HazB	100	Verde limón	Friable	0.8220 b

Respuestas a la formación de callo *in vitro* en segmentos nodales de *Euphorbia nutans* Lag., por tratamiento. Los tratamientos que tienen la misma letra, no son estadísticamente diferentes (Tukey p=0.05).

En este caso las respuestas obtenidas sí corresponden a lo citado por Pierik (1990) y Kondamudi *et al.* (2009) referente a la necesidad de causar una herida para inducir la respuesta callogénica (Figura 2, 3 y 4). Dicho resultado también obedece a lo

mencionado por Jaideep y Martin (2002) quienes mencionan la importancia de los microtúbulos y microfilamentos de actina así como el citoesqueleto en el control de la morfogénesis de las plantas; y como es evidente, en ninguna otra parte de la hoja se indujo la formación de callo sino sólo en el peciolo, el cual fue “herido” con el bisturí, dejando así las moléculas celulares en contacto directo con el medio de cultivo dándose de esta forma la actividad celular y la consecuente inducción de callo. Pero es fundamental que el tejido herido quede en contacto con el medio de cultivo, ya que los peciolo heridos que quedaron sin contacto con el medio no tuvieron respuestas. Resultados que son similares al cultivarse segmentos de hojas, las cuales también fueron segmentadas con una navaja de bisturí y es en todo el contorno donde se aprecia la inducción de callo (Figura 3 B y C).

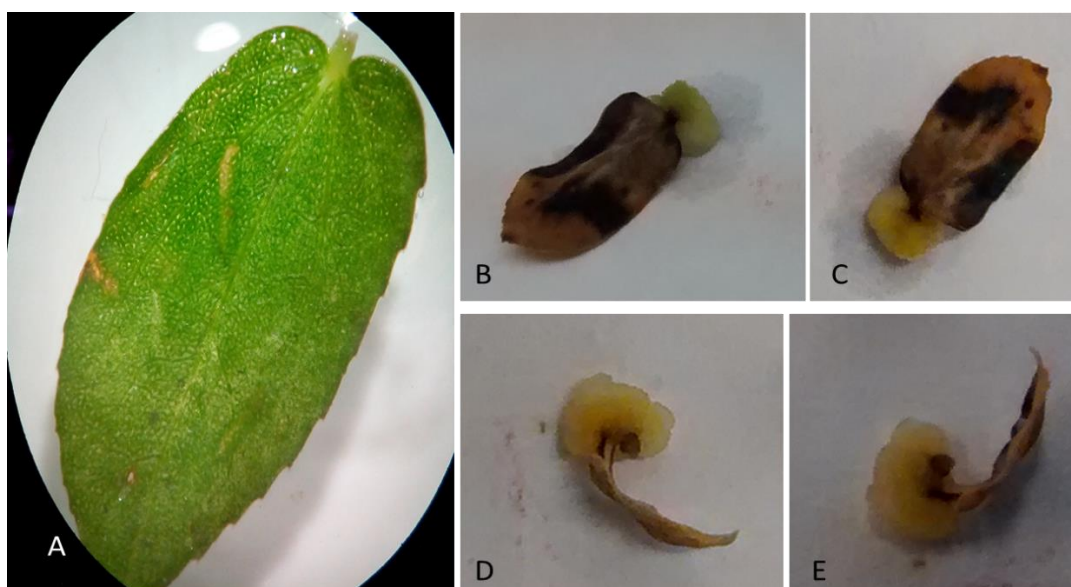


Figura 2. Callos formados en hojas completas *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. A) Hoja completa de *Euphorbia nutans* Lag., B) y C) Respuesta para formación de callo en hojas completas con el haz hacia arriba, D y E) Respuesta para formación de callo en hojas completas con el haz hacia abajo.

Šamaj *et al.* (2004) mencionan que la morfogénesis y el control de la polaridad en las plantas dependen de las moléculas de la pared celular, el citoesqueleto y la señalización celular. Encontrándose proteínas de arabinogalactano (AGPS) como

los primeros componentes moleculares que aparecen en la matriz extracelular que cubre las superficies de las células vegetales embriogénicas y organogénicas, y en este trabajo con *Euphorbia nutans* donde el segmento foliar no conserva su recubrimiento, la respuesta morfogénica es nula. Por lo tanto, es de menester importancia tratar de dañar lo menos posible a los tejidos cuando se manipulan con el material de disección, así como al ser manipulados para su desinfestación al iniciarse un establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

Con respecto al callo formado en este trabajo, Dinum y Brian (2010) en *Euphorbia pulcherrima* mencionan el cultivo de yemas apicales y axilares en un medio de cultivo MS + BA y BA + AIA que produjeron principalmente un callo rojo, similar a lo reportado por Jasrai *et al.* (2003), además de algunos callos color blanco y color gris-verde después de un mes de cultivo, resultados parecidos a los obtenidos en *Euphorbia nutans* Lag. (Figura 3). Es importante aclarar que las tonalidades color rojo aparecieron después de 3 semanas de cultivo *in vitro* y no fue una coloración homogénea del callo, sino sólo en ciertos sitios similar a lo que sucede en las hojas de las plantas en campo (Figura 3 A y F).

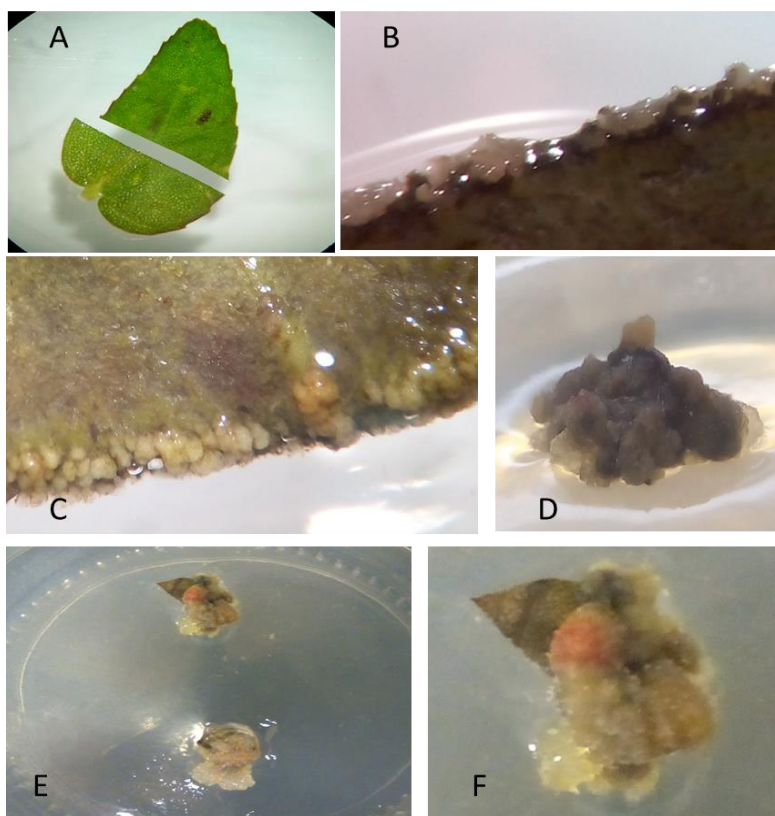


Figura 3. Respuestas a la formación de callo *in vitro* en segmentos de lámina foliar media incluyendo la nervadura central de *Euphorbia nutans* Lag. A) Restos de hoja después de aislar la parte media, B) Protuberancias en la parte superior de la lámina foliar con haz hacia arriba, C) Inicio de respuesta a callo en el margen foliar herido con el bisturí D) Formación de callo a partir del segmento de lámina foliar a los 30 días de cultivo *in vitro* E) Formación de callo en segmento de lámina foliar a los 15 días después de cultivo *in vitro* F) Callo con coloración rojiza.

Por otra parte, la inducción y formación de callo friable en explantes foliares de *Euphorbia nutans* Lag. sucedió cuando se tomaron segmentos de lámina foliar media y se escindió la nervadura central justo por la mitad (Figura 4). Las respuestas fueron muy favorables para formación de callo independientemente de la posición del explante, resultados que también refuerzan a lo citado por Šamaj *et al.* (2004) y Jaideep y Martin (2002) sobre la importancia de exponer dichas estructuras celulares directamente con el medio de cultivo. Así mismo, Pickens *et al.* (2005) mencionan que la mayoría de los callos y brotes en *Euphorbia pulcherrima*

se obtuvieron a partir de secciones de la vena media de las hojas cultivadas *in vitro* con BA y AIA durante un mes, y Shagufta *et al.* (2011) menciona tejidos de hojas cotiledonales de *Ricinus communis* para inducción de callo. De acuerdo a los resultados obtenidos para esta respuesta en *Euphorbia nutans* Lag. y a lo citado también por Ripley y Preece (1986) en *Euphorbia lathyris* con BA para formación de callo, Jasrai *et al.* (2003) y Dinum y Brian (2010) en *Euphorbia pulcherrima* empleando BA y AIA, se puede ver que BA juega un papel muy importante para la formación de callo con o sin auxinas, dependiendo de la concentración, planta y tejido a emplear.

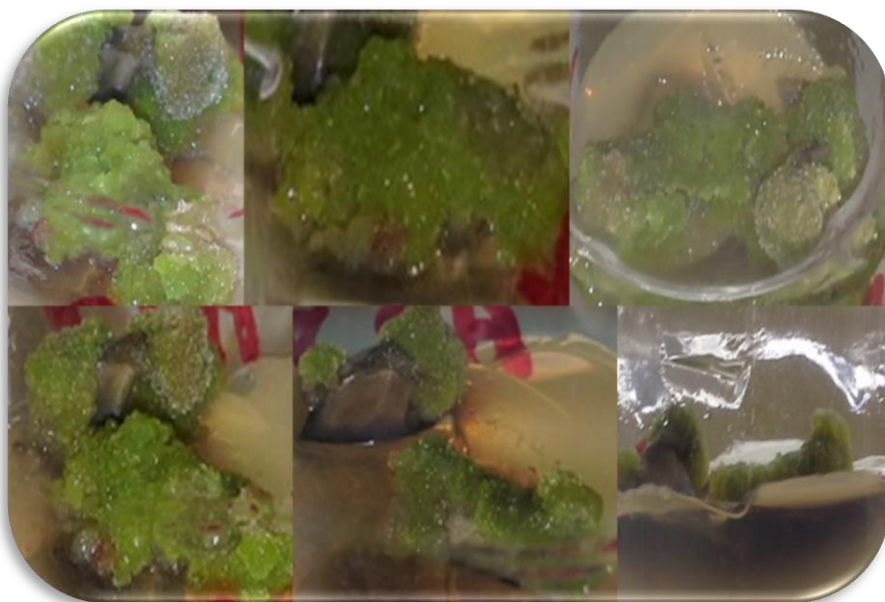


Figura 4. Obtención *in vitro* de callos friables a los 7 días de cultivo a partir de segmentos de lámina foliar de *Euphorbia nutans* Lag. con la nervadura central hendida por la mitad y en un medio de cultivo MS 100% + BA y ANA 10 mg·L⁻¹.

Producción de metabolitos secundarios a partir de callos obtenidos *in vitro*

El análisis de los metabolitos secundarios mediante cromatografía en capa delgada (CCD) reveló diferencias entre los metabolitos obtenidos de callos producidos *in vitro* con respecto a los obtenidos de plantas silvestres (Figura 5). Por lo tanto, y con base a estos resultados sí se está y no de acuerdo a lo mencionado por Kreis (2007). Sí se está de acuerdo respecto a la posibilidad de no poder obtener los mismos

metabolitos en la misma cantidad y calidad a partir de células indiferenciadas, ya que en la placa cromatográfica (Figura 5) se pueden observar algunas diferencias entre metabolitos obtenidos de plantas silvestres y metabolitos obtenidos a partir de callos, principalmente en los metabolitos obtenidos con hexano, donde en el primer carril (metabolitos obtenidos con hexano a partir de plantas silvestres) se pueden apreciar dos bandas señaladas con una flecha que corresponde a dos posibles metabolitos no presentes en el extracto hexánico de callos; sin embargo, debe de considerarse que el extracto de hexano de plantas silvestres sufrió un tratamiento previo para desengrasarlo. Además, también es lógico que haya variaciones entre las dos formas de obtener metabolitos secundarios ya que las condiciones en campo de las plantas madre es muy diferente a las condiciones controladas del manejo celular *in vitro*. En campo las plantas responden a una gran variación de condiciones ambientales mediante la biosíntesis de los metabolitos secundarios que son los que les ayudan a sobrevivir bajo tales situaciones de estrés (Taiz y Zeiger, 2006; R. Verpoorte *et al.*, 2000). Y no se está de acuerdo, parcialmente, con Kreis (2007) ya que se puede apreciar en la placa cromatográfica (Figura 5) para los extractos con cloruro de metileno (CH_2Cl_2) y con metanol (CH_3OH), carriles 4 y 6 respectivamente de extractos de callos, la presencia de la mayoría de los metabolitos presentes en extractos de plantas de campo, y además, se pueden observar otros metabolitos (señalados con flechas) que no se presentan en los extractos con los mismos disolventes para plantas silvestres (Figura 5, carriles 4 y 5). Resultados que coinciden con los obtenidos por Janarthanam *et al.* (2010) en *Stevia rebaudiana* en células cultivadas no diferenciadas.

No obstante, los resultados son diferentes a los reportados por Safdar y Alveena (2013) quienes emplearon diferentes explantes a partir de plántulas de *Momordica charantia* cv. Jaunpuri obtenidas *in vitro*, encontrando que los tejidos vegetales de las plantas cultivadas en campo contienen relativamente más metabolitos secundarios que los callos a partir de plántulas *in vitro*, sin embargo, al emplear cotilenodos como explantes para formar callo, observaron que los metabolitos secundarios obtenidos eran comparativamente similares con ligeras variaciones,

incluso al comparar la extracción de metabolitos de entrenudos de plantas crecidas en campo con los obtenidos en cultivos de callo, en ambos casos se encontró el ácido Alfa-eleosteárico, un ácido graso específico de *Momordica*. Por lo tanto, se cree que es posible no sólo la obtención de los metabolitos secundarios obtenidos de plantas madre, sino también otros que pueden ser de mucha importancia farmacológica o según el interés que se tenga, a partir del cultivo de células indiferenciadas (callos) bajo condiciones *in vitro* y llegar a controlar su producción mediante el empleo de elicitores celulares y cultivos específicos (Baldi *et al.*, 2007; Sakunphueak y Panichayupakaranant, 2010).

Los metabolitos secundario obtenidos a partir de plantas silvestres en el extracto de hexano son: Beta-sitosterol, estigmasterol, Beta-lupeol y alfa-amirina; en el extracto de diclorometano se identificaron: Beta-sitosterol, estigasterol, Beta-lupeol y posibles cicloartanos; en el extracto metanólico un metabolito interesante de tipo iriodeno. La diferencia como se puede apreciar en la figura 5 en el extracto de hexano de plantas silvestres con respecto a extracto de hexano de callos es muy poca, además, las bandas que no aparecen en el extracto de hexano de callo pueden deberse a algunas “grasas”, ya que dicho disolvente es más a fin para la extracción de estas, y tomar en cuenta que las plantas en campo tienen que producir más sustancias de protección y/o reserva y muchas de ellas son ceras. Sin embargo y de acuerdo a la placa CCD (Figura 5) en los extractos de callos con cloruro de metileno y metanol aparentemente no sólo se obtuvieron los metabolitos secundarios que se encuentran en plantas silvestres sino también otros, lo que indica que la producción de callos *in vitro* a partir de tejidos de la *Euphrasia nutans* Lag. puede ser una herramienta imprescindible en la obtención de metabolitos secundarios de interés sin la necesidad de llegar a la diferenciación y especialización celular *in vitro*, lo cual, puede proyectarse a una escala semicomercial para la industria farmacéutica. No obstante, es fundamental identificar qué metabolitos “nuevos” son los que se biosintetizan *in vitro* y de esta forma saber si son o no de interés, o en su defecto, corroborar si alguno (s) es inhibido bajo estas condiciones.

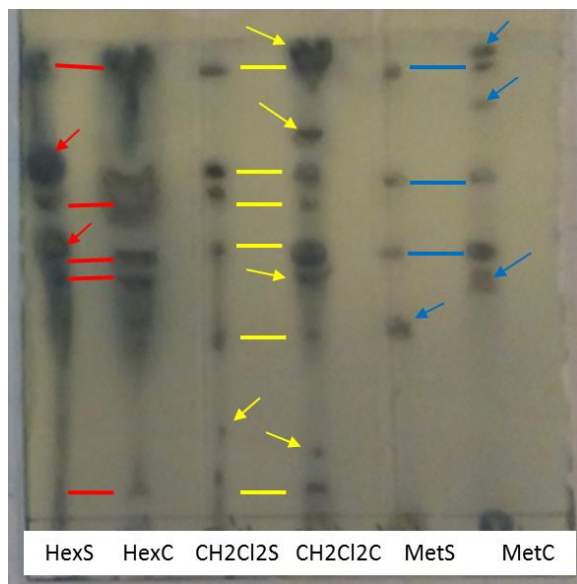


Figura 5. Placa cromatográfica en capa delgada para comparar los metabolitos obtenidos en extractos de plantas silvestres vs extractos de callos *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. HexS: Extracto hexánico de plantas silvestres, HexC: Extracto hexánico de callos, CH₂Cl₂S: Extracto con diclorometano de plantas silvestres, CH₂Cl₂C: Extracto con diclorometano de callos, MetS: Extratcto con metanol de plantas silvestres, MetC: Extracto con metanol de callos.

No obstante, los resultados obtenidos a partir del análisis mediante RMN ¹H revelaron que no se biosintetizó β-lupeol, metabolito secundario más abundante en el extracto de diclorometano de plantas silvestres y también presente en el extracto de hexano, sin embargo, en el extracto de metanol de callos se identificó demasiada sacarosa mediante RMN ¹H. Esto indica que posiblemente las condiciones del manejo celular *in vitro* inhibieron la biosíntesis de metablitos secundarios y que los tejidos no diferenciados no son eficientes para ello o que la inhibición del etileno mediante nitrato de plata (AgNO₃⁻) fue la causa de ello. Por lo tanto, es importate ajustar las condiciones más idóneas que nos permitan las respuestas deseadas a partir de cultivos diferenciados como indiferenciados *in vitro*.

CONCLUSIONES

Se obtuvo la inducción de callo a partir de segmentos nodales de *Euphorbia nutans* Lag., donde el tipo, concentración y combinación de reguladores de crecimiento vegetal juegan un papel importante, siendo 2i-p + ANA los reguladores de crecimiento que mayor porcentaje de respuesta favorecieron (90 %).

La obtención de callos friables con un color verde limón y de excelente apariencia se obtuvieron con BA + ANA ambos en 10 mg·L⁻¹ mediante segmentos de lámina foliar media con la nervadura central seccionada justo por la mitad, favoreciendo así la formación de callos independientemente de la posición del tejido en el medio de cultivo en una semana.

La presencia de metabolitos secundarios a partir de extractos de callos obtenidos *in vitro* y de plantas silvestres revelaron, mediante placas cromatográficas, la presencia de los mismos metabolitos secundarios tanto en plantas silvestres como en callos además de otros, no obstante, el análisis mediante RMN ¹H de metabolitos secundarios a partir de callos reveló que no se trataba de los mismos metabolitos secundarios presentes en plantas silvestres, sino la ausencia de ellos.

LITERATURA CITADA

- Abbas, N. 1993. Studies on somatic embryogenesis and organogenesis in three economic plants, *Mallotus philippensis*, *Aleurites fordii* - mature endosperm, *Trachyspermum ammi*, seedling explants. Thesis submitted to University of Delhi, India.
- Baldi, A., Bisaria, V. S., Srivastava. 2007. Biotechnological approaches for the production of some promising plant-based chemotherapeutics. Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application. Wiley-VCH, Weinheim. 117-156.
- Bin-Xu, Wenhao, Dai., Wun, S. Ch. 2008. An efficient method for *in vitro* regeneration of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 44 (6):548-556.

- Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*. 161:839-851.
- Dinum, P. and Trader, W. B. 2010. Poinsettia 'Prestige™ Red' (*Euphorbia pulcherrima*) *In Vitro* Propagation. *Hortscience*. 45(7):1126–1128.
- Jaideep, M., Hülkamp M. 2002. Microtubules and Microfilaments in Cell Morphogenesis in Higher Plants. *Current Biology*. 12(19):R669–R676.
- Janarthanam, B., Gopalakrishnan M. and Sekar, T. 2010. Secondary Metabolite Production in Callus Cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* 45(3), 243-248.
- Jasrai, Y. T., Thaker, K. N. and D'Souza, M. C. 2003. *In vitro* Propagation of *Euphorbia pulcherrima* Willd. Through Somatic Embryogenesis. *Plant Tissue Cult.* 13(1):31-36.
- Kreis, W. 2007. *In-vitro* culturing techniques of medicinal plants. *Medicinal plant biotechnology: From basic research to industrial application*. Wiley-VCH, Weinheim. 157-185.
- Kondamudi, R., Sri, R. M. K., Pullaiah, T. 2009. Euphorbiaceae - a critical review on plant tissue culture. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10 (3): 313-335.
- Lee, T. T. and Starratt, A. N. 1972. Growth substance requirements and major lipid constituents of tissue cultures of *Euphorbia esula* and *E. cyparissias*, *Canadian Journal Botany*. 50:723-726.
- Pickens, K. A., Cheng, Z. M., Trigiano, R. N. 2005. Axillary bud proliferation and organogenesis of *Euphorbia pulcherrima* winter rose. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. Volume 41, Issue 6, pp 770-774.
- Pierik, R. L. M. 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Sao Paulo: M. Nijoff. Brazil, 329 p.
- Verpoorte, R., Heijden, R., Memelink, J. 2000. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research*. 9(4-5): 323-343.
- Ripley, K. P. and Preece, J. E. 1986. Micropropagation of *Euphorbia lathyris* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 5(3):213-218.

- Safdar, A. and Alveena, T. 2013. Analysis of secondary metabolites in callus cultures of *Momordica charantia* cv. Jaunpuri. *Biologia (Pakistan)*. 59(1):23-32.
- Sakunphueak, A. and Panichayupakaranant, P. 2010. Increased production of naphthoquinones in *Impatiens balsamina* root cultures by elicitation with methyl jasmonate. *Bioresource Technology*. 101:8777-8783.
- Šamaj, J., Baluška, F., Hirt, H. 2004a. From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity. *Journal of Experimental Botany*. 55:189-198.
- Shagufta, N., Fozia, T., Sumera, J., Saiqa, I., Farah, A. N. M. and Aamir, A. 2011. Micropropagation and callogenesis of a recalcitrant species *Ricinus communis*. *Pak. J. Bot.*, 43(5):2419-2422.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 2006. Fisiología Vegetal. Publicacions de la Universitat I de Catellón. Vol II. Traducido de la 3ra edición. 1338 p.

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

Se llevó a cabo la propagación *in vitro* y aclimatación exitosa de la *Euphorbia nutans* Lag., así como la obtención de diferentes respuestas morfogénicas *in vitro* mediante el empleo de BA, AIA y ANA como reguladores de crecimiento vegetal, donde se mostró que la interacción de diferente auxina con la misma citocinina promueve diferentes respuestas morfogénicas, lo cual da la pauta para seguir realizando investigaciones a nivel, celular, bioquímico, genético y molecular sobre esta planta y poder entender mejor cómo interactúan los primeros y segundos mensajeros sobre la expresión de genes para dichas respuestas.

Así mismo, se cree que el etileno juega un papel crucial y de vital importancia en la supervivencia de ciertas especies vegetales como es el caso de la *Euphorbia nutans* Lag. ya que al ser inhibida su función con AgNO₃ permitió su establecimiento y manejo celular *in vitro*, sin embargo, después del cuarto subcultivo las plantas *in vitro* mostraron muerte celular. Resultados muy similares a los obtenidos en *Capsicum annuum* L. var. *glabriusculum* con AgNO₃ y cuyas plantas también se

murieron y ambas especies liberaron una bacteria sobre el medio de cultivo. En *Euphorbia nutans* fue de color rosa y en *Capsicum annuum* fue de color blanco transparente.

Además, parece ser que la inhibición de la función del etileno afecto negativamente la biosíntesis de algunos metabolitos secundarios en callos *in vitro*, pues en extractos de plantas silvestres se encontraron de forma abundante.

Se logró la caracterización fitoquímica de la *Euphorbia nutans* Lag. ya que se identificaron algunos metabolitos secundarios definidos como: β -sitosterol, estigmasterol, β -lupeol, acetato de α -amirina, posibles cicloartanos y uno parecido a un iridoide, los cuales pueden servir como marcadores quimiotaxonómicos para esta planta.

Así mismo, la plana *Euphorbia nutasn* Lag. puede ser una planta modelo para estudiar la inducción de metabolitos secundarios *in vitro*, la función principal del etileno en plantas de ese tipo, caracteres de herencia mendeliana simple ya que su ciclo de vida es muy corto, y para realizar ingeniería genética de plantas en la sobreexpresión de genes para biosíntesis de metabolitos específicos y en conjunto con técnicas fitoquímicas, se puedan aislar, identificar y cuantificar.

Finalmente y como resultado de este trabajo de investigación nace la iniciativa de estudiar la función de los metabolitos secundarios extraídos de cada planta sobre ella misma así como en otras plantas mediante el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* y de esta forma estudiar si la presencia de dicho (s) metabolito (s), o bajo qué condiciones, funciona (n) como elicitor (es) e induce (n) la biosíntesis de algún (os) metabolito (s) secundario (s) en particular sin la necesidad de recurrir a la transgénesis o a la cis-génesis, concepto al que se propone llamar “cis, trans-metabolismo”.