

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa



Casa abierta al tiempo

Establecimiento de cultivos celulares de *Justicia spicigera* Shulth

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA
P R E S E N T A
MAYLETH MENDOZA ZÚÑIGA

Co-Directores de Tesis

Dr. Francisco Cruz Sosa

Dra. Leticia Buendía González

México, D.F.

Noviembre del 2010

22 de Noviembre del 2010

El Jurado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación idónea de los resultados

“Establecimiento de cultivos celulares de *Justicia spicigera* Shulth”

Que presentó la alumna: Mayleth Mendoza Zúñiga

Co-dirección: Dr. Francisco Cruz Sosa



Dra. Leticia Buendía González



Lector: Dra. Ma. Elena Estrada Zúñiga



DÉDICATORIAS

Gracias Dios por prestarme esta vida para existir y darme cada instante y momento con las personas que me has puesto a lado de mi y las que en mi camino he encontrado, te debo todo y me has dado tanto, me basta tocar mi corazón, mirar al cielo y saber que siempre estas conmigo .

A los Ángeles de mi vida, la fuente de mis luchas y éxitos, los cuales siempre he admirado y amado tanto. Gracias papas

Mami gracias por enseñarme tanto de la vida, por tu carácter para salir siempre adelante en las pruebas siempre con una gran fortaleza , por tu lucha para vernos aquí donde estamos , por tus sacrificios , fe, amor , palabras, consejos y sobre todo por ser una gran amiga en todo este camino y a lo largo de mi vida.

Papa gracias por permitirme terminar este sueño y este escalón más en vida

A mis hermanos (Lupita y Omar), por estar y disfrutar todos los momentos tanto en las dificultades como en las alegrías. Lupita sobran las palabras pues se que parte de este esfuerzo ha sido tuyo, por hacer el día mas tranquilo, ameno y lleno de alegría, esos instantes juntas siempre serán los mejores gracias te quiero mucho

A los dos grandes amores de mi vida raziél y omarcito que llenan hasta lugar más vacío con su risa y presencia por hacernos los días tan eternos y felices cuando están en casa. Gracias Ise por tu apoyo en todo momento, por tus palabras y ayuda. Saben que a todos y cada uno de ustedes los amo mucho

A mi gran segunda familia (López-Abraham) los cuales siempre los tengo presentes por su apoyo inmenso, por todas aquellas tardes sin fin que nunca terminaban, por abrirnos las puertas de su casa pero también de su corazón. No terminaría de mencionarlos pero a todos y cada uno de ustedes gracias por estar siempre ahí.

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA por ser testigo de mi crecimiento profesional por ser la casa de estudios que me alojo y permitió crecer en la investigación, sintiendo un orgullo a la culminación de este proyecto. Gracias UAM-I

Al Dr. Francisco Cruz Sosa el cual me apoyo para la realización y culminación de este proyecto, por la oportunidad brindada para mi desarrollo académico y permitir ser parte de su equipo de investigación, por los comentarios, aportaciones y observaciones. Gracias

A la Dra. Leticia Buendía González por su guía en la realización de este proyecto, por todas sus enseñanzas en las técnicas de cultivo *in vitro* así como todas las aportaciones en este proyecto, por los cuestionamientos durante el desarrollo de este trabajo con el fin siempre de hacer mejores cosas y mejor investigador, pero sobre todo por encontrar una mano amiga en quien poder apoyarme. Gracias

Dra. Ma. Elena Estrada Zúñiga, por sus conocimientos y aportaciones brindadas en este proyecto y en mi desarrollo profesional, por la paciencia, ayuda y apoyo a lo largo de esta formación pero sobre todo por confiar y creer en mí, por enseñarme y dirigirme en el camino hacia la investigación. Con cariño y admiración Gracias

Dr. Juan Orozco Villafuerte, por ser parte del equipo del laboratorio el cual siempre es grato convivir y aprender de su investigación. Gracias

Al Dr. Jaime Vernon Carter por el apoyo económico y el equipo de laboratorio prestado para la culminación de este proyecto. Gracias

A mis compañeros de laboratorio R-003 (Male, Lety, Alejandro, Toñito, Juan, panchito, Bere, Amalia, Mireya) por hacer agradable la jornada diaria de trabajo y amenizar con su risa todos los momentos, por su ayuda, presencia y apoyo. Muchas gracias

Mis compañeros de seminario y catedráticos que compartieron con nosotros sus conocimientos por las atinadas observaciones para formar mejores estudiantes, aprendí de cada uno de ustedes lo cual siempre era grato convivir (Dra. Clara Pelayo, Dra. Elsa Bosques Molina, Dr. Ramon, Dr. Francisco).

ÍNDICE

CONTENIDO		Pág.
	ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
	ÍNDICE DE CUADROS.....	v
	ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
	INDICE DE ANEXOS	vii
	SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	viii
1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Biología vegetal y el cultivo de tejidos vegetales.....	3
1.1.1	Producción de metabolitos secundarios.....	6
1.1.2	Micropropagación.....	8
1.1.3	Estudio de genética de las células de plantas, fisiología, bioquímica y patología.....	8
1.2	Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales.....	9
1.2.1	Fuente de explantes.....	9
1.2.2	Asepsia.....	9
1.2.3	Componentes nutricionales del medio de cultivo.....	9
1.2.3.1	Sales inorgánicas.....	10
1.2.3.1.1	Macronutrientes.....	10
1.2.3.1.2	Micronutrientes.....	11
1.2.3.2	Agentes quelatos.....	12
1.2.3.3	Compuestos orgánicos.....	12
1.2.3.4	Principales medios de cultivo empleados en el cultivo de tejidos vegetales...	13

1.2.3.5	Reguladores de crecimiento vegetal (RCV).....	14
1.2.4	Condiciones de incubación: luz, temperatura y pH.....	19
1.2.5	Factores que afectan el cultivo <i>in vitro</i>	19
2	ANTECEDENTES.....	22
2.1	<i>Justicia spicigera</i>	22
2.1.1	Descripción botánica.....	22
2.1.1.1	Taxonomía.....	22
2.1.2	Distribución geográfica.....	23
2.1.3	Morfología.....	23
2.1.4	Importancia e usos.....	24
2.1.4.1	Información etnobotánica.....	24
2.1.4.2	Estudios fitoquímicos.....	26
2.1.4.3	Estudios farmacológicos.....	29
3	JUSTIFICACIÓN.....	33
4	HIPÓTESIS.....	34
5	OBJETIVOS.....	34
5.1	Objetivo general.....	34
5.2	Objetivos particulares.....	34
6	MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
6.1	Material vegetal.....	36
6.2	Establecimiento de cultivos asépticos.....	36
6.3	Medio de cultivo.....	38
6.4	Inducción de callo.....	38

6.5	Condiciones de incubación.....	40
6.6	Mantenimiento de las líneas celulares.....	40
6.7	Análisis estadístico.....	41
6.8	Estudio Fitoquímica.....	41
6.8.1	Obtención del extracto de callo de <i>J. spicigera</i>	41
6.8.2	Obtención del extracto de hojas de <i>J. spicigera</i>	41
6.8.3	Cromatografía en capa fina.....	41
6.8.4	Cromatografía en columna.....	42
6.8.5	Análisis de los extractos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	42
7	RESULTADOS	43
7.1	Establecimiento de cultivos asépticos.....	43
7.1.1	Desinfección superficial.....	43
7.2	Inducción de callo.....	39
7.2.1	Efecto de la auxina 2,4-D en la inducción de callo	44
7.2.2	Efecto de las auxinas ANA, 2,4,5-T, y PIC en la inducción de callo.	50
7.3	Mantenimiento de las líneas celulares.....	54
7.4	Condiciones del HPLC.....	55
8	CONCLUSIONES.....	59
9	PESPECTIVAS.....	59
10	BIBLIOGRAFÍA.....	60
	ANEXOS.....	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Ensayos realizados para la desinfección de hojas de <i>J. spicigera</i>	37
Tabla 2	Tratamientos evaluados en el M1 en la inducción de callo en explantes de <i>J. spicigera</i>	39
Tabla 3	Tratamientos evaluados en el M2 para la inducción de callo en explantes foliares de <i>J. spicigera</i>	39
Tabla 4	Desinfestación de explantes foliares de <i>J. spicigera</i>	43
Tabla 5	Características morfológicas de callo de explantes foliares de <i>J. spicigera</i> bajo los reguladores 2,4-D+BAP.....	46
Tabla 6	Características morfológicas de callo de explantes foliares de <i>J. spicigera</i> bajo los reguladores 2,4-D+KIN.....	49
Tabla 7	Características morfológicas de callo de explantes foliares de <i>J. spicigera</i> bajo la influencia de las auxinas:2,4,5-T, ANA, BAP y la citocinina BAP en los medios M1 y M2.....	53
Tabla 8	Porcentaje de oxidación de cultivos de callo seleccionados para el establecimiento de líneas celulares de <i>J. spicigera</i>	54
Tabla 9	Tiempo de retención de los estándares.....	56
Tabla 10	Contenido de metabolitos secundarios en extractos metanólicos de cultivos <i>in vitro</i> y hojas de <i>Justicia spicigera</i>	57

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Clasificación de los metabolitos secundarios producidos por las plantas.....	7
Cuadro 2	Función fisiológica de los RCVs en plantas enteras.....	15
Cuadro 3	Función de los RCVs en el crecimiento y desarrollo de cultivos <i>in vitro</i>	18
Cuadro 4	Principales estrategias utilizadas para controlar la oxidación en explantes durante el establecimiento de cultivos <i>in vitro</i>	21
Cuadro 5	Clasificación taxonómica de <i>J. spicigera</i>	23
Cuadro 6	Estudios farmacológicos de Kaemferol y β -sitosterol en diversas líneas celulares (animales).....	29
Cuadro 7	Estudios farmacológicos llevados a cabo sobre <i>Justicia spicigera</i>	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Cultivo de células y órganos vegetales.....	5
Fig.2	Ejemplar adulto de <i>Justicia spicigera</i> (muitle).....	19
Fig.3	Descripción taxonómica de <i>J. spicigera</i> y su distribución geográfica.....	24
Fig.4	Estructura química del Kaempferol.....	27
Fig.5	Estructura química del β -sitosterol.....	28
Fig.6	Esquema del plan de trabajo.....	35
Fig. 7	Hojas inmaduras de la parte apical de la planta <i>J.spicigera</i> usadas para los cultivos <i>in vitro</i>	36
Fig. 8	Esquema para el establecimiento de cultivos asépticos de <i>J. spicigera</i>	37
Fig.9	Inducción de callo en explantes foliares de <i>J. spicigera</i>	44
Fig. 10	Distintas morfologías del callo producido en explantes foliares de <i>J. spicigera</i> después de 2 subcultivos.....	44
Fig.11	Cultivo de callos a los 90 días de <i>J. spicigera</i>	55
Fig.12	Cromatograma de muestras de cultivo de callo de <i>J. spicigera</i> proveniente de M2 con ANA 1.0 mg l ⁻¹ + 0.5 mg l ⁻¹ BAP.....	57

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A	Vitaminas empleadas en los diferentes medios de cultivo.....	76
Anexo B	Composición del medio de cultivo MS.....	77
Anexo C	Composición de los medios de cultivo utilizados en el cultivo in vitro.....	78
Anexo D	Curvas patrón para los estándares para la determinación de metabolitos secundarios.....	80
Anexo E	Cromatogramas.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ANA	Ácido naftalenacético
AC	Ausencia de callo
B	Callo de color blanco
BAP	Bencilaminopurina
B5	Medio de cultivo Gamborg
CC	Callo compacto
CF	Callo friable
2,4-D	Ácido 2,4-diclofenoxiacético
2,4,5-T	Ácido triclofenociacético
DPPH	2-2-difenil-1-picrilhidrazilo
HPLC	Cromatografo liquido de alta resolución
KIN	6 furfural aminopurina ó Cinetina
MS	Medio de cultivo Murashige y Skoog
RCV	Reguladores de crecimiento vegetal
SD	Desviación estándar
SA	Solución antioxidante (ácido cítrico +ácido ascórbico)
T	Callo de apariencia transparente
PVP	Polivinil Pirrolidona
Tr	Tiempo de retención

1. INTRODUCCIÓN

El conocimiento que hoy poseemos sobre las plantas procede de una rica diversidad de sociedades y de culturas. En general se puede afirmar que, si bien los grupos humanos han empleado mayoritariamente las plantas de su entorno, desde los primeros momentos se produjo un rico intercambio de conocimiento y prácticas relativas a éstas tanto desde el punto de vista medicinal, como alimenticio, comercial, cosmético, conservante, aromatizante entre otros (Fresquet, 2000). Sin embargo, la mayor aplicación que el ser humano le ha dado a las plantas ha sido en la medicina, puesto que ha tenido que enfrentarse a la enfermedad y para ello ha recurrido a los remedios que ofrece la naturaleza, por razones lógicas el reino vegetal ha salido siempre vencedor en la elección, por una parte, las plantas son abundantes y se extienden por toda la superficie terrestre, por otra, poseen una amplia variedad de virtudes curativas y una buena manejabilidad; lo que ha permitido que sean ampliamente explotadas para la producción de principios terapéuticos.

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, más del 80% de la población mundial, especialmente en los países en desarrollo, utiliza tratamientos tradicionales a base de plantas para sus necesidades de atención primaria de salud. No obstante, en esos países ha ocurrido una pérdida importante del conocimiento tradicional sobre el uso de plantas medicinales y además, su disponibilidad se ha visto reducida por la degradación de los ambientes naturales, sobre todo en la región tropical. En países en vías de desarrollo como México, las plantas con usos medicinales es una práctica habitual entre las comunidades indígenas, ya que se ha difundido ampliamente en los diferentes sectores de la población de las zonas urbanas (Lozoya, 1994). Estas prácticas se asocian con la amplia diversidad vegetal de nuestro territorio y, al extenso conocimiento etnomédico de las culturas Mesoamericanas (Bye *et al.*, 1995a, 1995b), su aporte en la herbolaria se calcula en más de 5000 especies con atributos medicinales (15 % de la flora total); sin embargo en México, y en

todo el mundo, la validación química farmacológica y biomédicas se ha llevado a cabo solo en el 5% de estas especies. La riqueza etnobotánica de México se encuentra poco explotada desde el punto de vista científico y ejemplos selectos de la literatura recientemente demuestran el potencial terapéutico de la flora medicinal de nuestro país.

Las plantas siguen siendo la base de lucha contra la enfermedad en centenares de sociedades aborígenes e indígenas ya que se han confirmado y aprobado algunas de las propiedades farmacológicas de los vegetales mediante la medicina tradicional (Callejo, 1996; Govil *et al.*, 2002). Al respecto, actualmente se sabe que las propiedades curativas de las plantas se asocian a la producción de metabolitos secundarios, compuestos sumamente activos que las facultan para interactuar con su medio ambiente; estos le permiten a la planta en gran medida la capacidad de sobrevivir ante condiciones de estrés abiótico provocado por exceso o insuficientes intensidades de luz, temperatura, viento, nutrientes, falta o exceso de agua, salinidad, entre otros, ó ante el estrés biótico provocado por agentes patógenos como virus, hongos y bacterias, herbívoros o nematodos (Buchanan *et al.*, 2000).

Las investigaciones con plantas contemplan un planteamiento experimental que involucra la selección del material vegetal por criterios etnobotánicos y el empleo de bioensayos para validar la actividad farmacológica de las fuentes vegetales empleadas como materias primas (Mata, 1993; Berlin *et al.*, 1996). Por otro lado la utilización de cultivo *in vitro*, para la producción de fármacos naturales constituye una tecnología de vanguardia que ha ganado prestigio internacional, debido a la posibilidad de ser aplicada en la mayoría de las especies vegetales y al potencial de algunos sistemas de cultivos para la producción de principios terapéuticos de utilidad farmacéutica a una escala industrial (Stanford *et al.*, 1996). Estas tecnologías ofrecen beneficios importantes ya que permiten la producción controlada y permanente de los principios biodinámicos deseados y, en algunos casos, un incremento considerable en su productividad que permite plantear esquemas de escalamiento en biorreactores (Wink, 1999a, 1999b).

1.1 Biotecnología vegetal y el cultivo de tejidos vegetales

Dicho conocimiento, ha dado pauta a que la investigación no ocurra únicamente a nivel fitoquímico para con los metabolitos secundarios, sino para aprovechar los componentes sintetizados por las plantas y conocer de esta manera la regulación de una vía metabólica en particular donde las posibilidades serán mayores de producir el compuesto deseado en mayor cantidad. En este contexto la biotecnología, ciencia de naturaleza multidisciplinaria que se define como la aplicación de organismos, componentes o sistemas biológicos para la obtención de bienes y servicios juega un papel importante con la técnica de cultivo *in vitro*, la cual presenta un gran potencial para contribuir a prácticas de economía sustentable, proveyendo de fuentes renovables de alimentos, productos químicos, fármacos y energía con mínimo o nulo impacto ambiental. (Smith, 1996).

La utilización del cultivo *in vitro*, durante los últimos años ha tenido un desarrollo que permite ser aplicada prácticamente a todas las especies de las plantas. Técnica que abre posibilidades para la producción de fármacos naturales, potencial de algunos sistemas de cultivos para la producción de principios terapéuticos de utilidad farmacéutica a una escala industrial, solución de problemas agrícolas y para desarrollar sistemas de explotación comercial, convirtiéndose así en un área de la biotecnología de gran potencial económico (Stanford *et al.*, 1996).

El cultivo *in vitro* o cultivo de tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, de cualquier parte viva de la planta colocada sobre un medio nutritivo artificial, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos (Fig. 1) (Street, 1977). La técnica se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Bhojwani & Razdan, 1983).

Suele dividirse la técnica de cultivo en cinco clases: a) cultivo de callos, b) cultivo de células en suspensión, c) cultivo de órganos, d) cultivo de meristemos y morfogénesis para el propósito de propagación y e) cultivo de protoplastos (Gamborg *et al.*, 1995) (Fig. 1).

El cultivo de tejidos vegetales ofrece varias ventajas sobre la recolección de plantas silvestres y el desarrollo en cultivos de campo, entre las cuales se pueden mencionar: 1) Independencia de las condiciones ambientales; 2) permite la manipulación de las variables físicas y químicas con alta precisión bajo condiciones homogéneas constantes; 3) establece un sistema definido en el lugar donde se requiere del producto; 4) menores tiempos de producción.

La particular ventaja del cultivo de tejidos es que se pueden ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en el material vegetal cultivado. Además, esta técnica permite realizar estudios del tipo fisiológico, bioquímico, morfológico, metabólico y genético de manera más fina sobre especies particulares (Barba *et al.*, 2001).

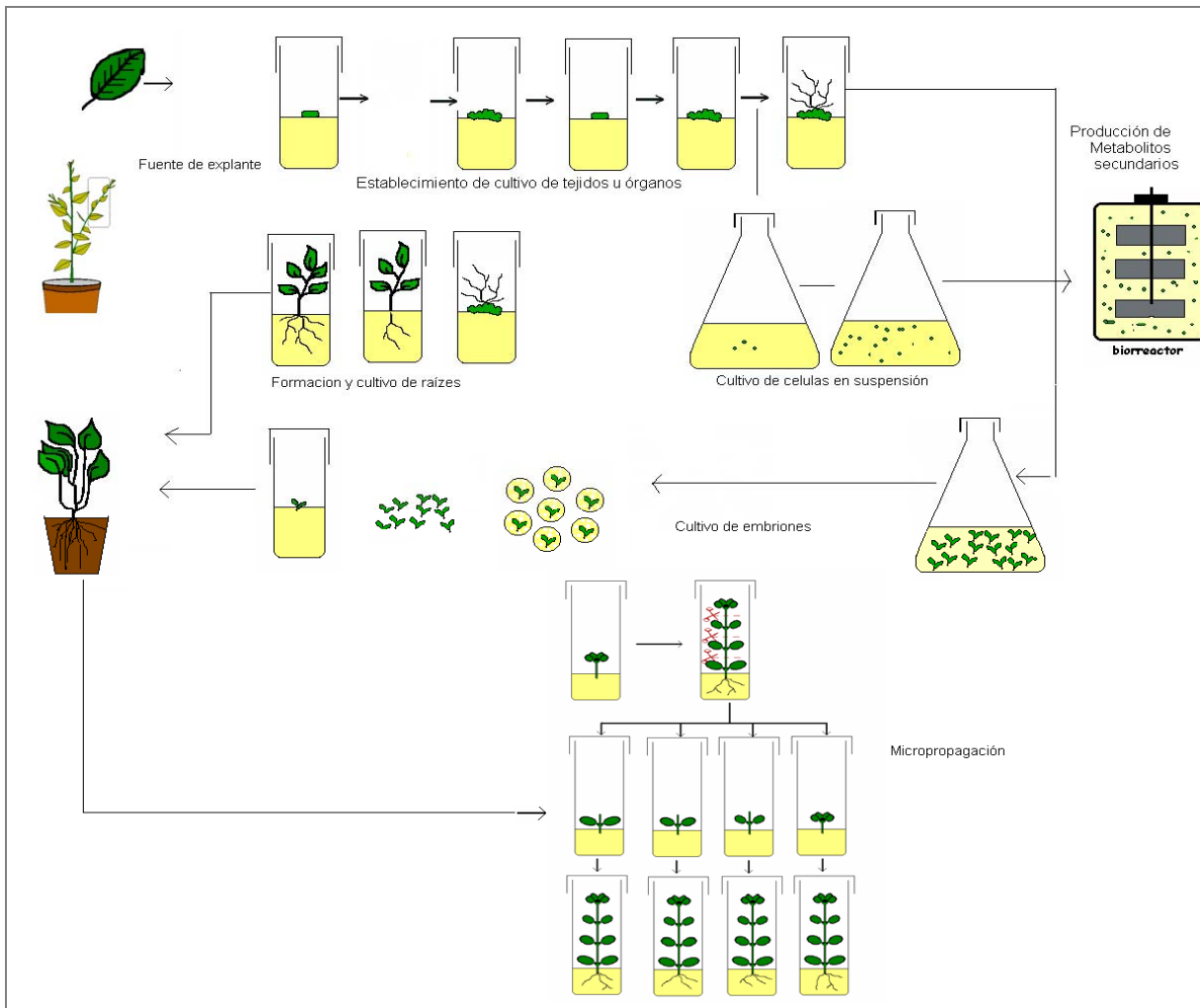


Fig. 1 Cultivo de células y órganos vegetales (Adaptado de Malajovich, 2007).

La aplicación del cultivo de tejidos vegetales, tiene la finalidad principal de utilizar los cultivos en la investigación y en la producción comercial de productos vegetales y plantas, cuyo resultado más visible es un aceleramiento del estudio de los recursos con que contamos con la finalidad de estudiar éstos de una manera que no afectemos los recursos vegetales naturales disponibles (Hurtado & Merino, 2001). Por lo que, tiene tres aspectos principales de aplicación: 1) la producción de metabolitos secundarios, 2)

micropropagación y 3) el estudio de la genética de las células de plantas, fisiología, bioquímica y patología (Jiang, 2001).

1.1.1 Producción de metabolitos secundarios

Las plantas producen una enorme diversidad bioquímica de compuestos conocidos como metabolitos secundarios, como mecanismo de defensa ante su imposibilidad de huida frente a agresiones en el medio ambiente (Harbone, 1993). Éstos pueden ser divididos en cuatro grandes grupos de acuerdo a la ruta de biosíntesis que proceden en: i) fenoles o fenilpropanoides (derivados de la ruta del ácido shikímico o de la ruta del malónico), ii) alcaloides (derivados de diversas rutas, Cuadro 1), iii) terpenoides o terpenos (derivados de la ruta del ácido mevalónico o de la ruta del metileritritol fosfato), y iv) policétidos (derivados de la ruta del policétido); para cada tipo de metabolito secundario se han clasificado varios grupos (Cuadro 1). Debido al costo energético que implica su síntesis, la producción de metabolitos secundarios obedece al tipo, tiempo y duración del estímulo o condición de estrés bajo el cual se hallen las plantas (Bryant *et al.*, 1992). Estos compuestos son principios activos de industrias como la farmacéutica, alimenticia y agrícola en aplicaciones como: fármacos, saborizantes, aromas, colorantes, etc. Sin embargo, debido a que no siempre es fácil aislar el compuesto de interés de la planta intacta, algunos metabolitos son producidos en pequeñas cantidades, en un tipo particular de células; por lo que el cultivo *in vitro* surge como la alternativa para producir estos compuestos de alto valor agregado de forma continua y bajo condiciones controladas (Wink, 1999). Consiste en un cultivo en suspensión de células u órganos productores de metabolitos secundarios, los cuales están distribuidos en un medio de cultivo líquido en constante movimiento (Street, 1977; Hurtado & Merino, 2001). El cultivo *in vitro* se utiliza no sólo como una biofábrica de compuestos bioactivos, sino también se emplea para conocer la rutas bioquímicas de síntesis de metabolitos secundarios y permite estudiar los mecanismos bioquímicos que regulan su biosíntesis (El-sayed & Verpoorte, 2002), también puede usarse para redireccionar el metabolismo secundario, mediante inductores bióticos o abióticos que permitan lograr el incremento de la producción de los metabolitos de interés (Brincat *et al.*, 2002; Sasson, 1991) y para la selección de alguna línea celular de alta producción de

metabolito (Scrags, 1987; Whitmer *et al.*, 1998; Grzela & Janiszowska, 2002). Sin embargo en la producción de metabolitos secundarios en plantas usando el cultivo *in vitro* de células pueden determinarse productividades bajas, por lo que para incrementar el rendimiento de producción se emplean diversas estrategias como: inmovilización de células, uso de elicitors bióticos y abióticos para aumentar en corto tiempo su producción, permeabilización del metabolito para facilitar el proceso de extracción, generación de líneas celulares altamente productoras con la ayuda de la ingeniería genética, cultivo de células y órganos a escala en birreactor, etc. (Ravishankar & Ramachandra, 2000; Dixon, 1985; Ravishankar & Venkataraman, 1993; Buitelaar & Tramper, 1992; Fowler & Stafford, 1992; Payne *et al.*, 1991). El éxito de esta técnica ha llegado a nivel comercial como la Shikonina de *Lithospermum erythrorhizon*, Gingenósido de *Panax ginseng*, Taxol de *Taxus brevifolia* (Ravishankar & Ramachandra, 2000).

Cuadro 1. Clasificación de los metabolitos secundarios producidos por las plantas.

Fenilpropanoides	Alcaloides	Terpenoides	Policetidos
Fenólicos simples	Derivados de ornitina	Monoterpenos	Quinonas
Derivados del ácido benzoico	Derivados de lisina	Sesquiterpenos	Gamma-pironas
Estilbenos	Derivados de ácido nicotínico	Diterpenos	
Coumarinas	Derivados de tirosina	Triterpenos	
Lignina	Derivados de triptófano	Tetrapenos	
Lignanos	Derivados de histidina		
Flavonoides	Derivados de reacciones de aminación		
Antocianinas	Derivados de ácido antranílico		
Taninos hidrolizables	Otros		
Taninos condensados			

Adaptación de Stockit *et al.*, 1995; Kegg pathway database.

1.1.2 Micropropagación

La propagación de plantas *in vitro* es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica. Permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, embriones y obtener individuos selectos en forma rápida, en un medio de cultivo específico (hormonas, minerales, vitaminas, fuente de carbono, agente gelificante, agua, etc.) y condiciones ambientales controladas (temperatura, humedad y luz) (Barba *et al.*, 2001). Una vez ajustados los protocolos para la especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso de modo de llevarlo a mayor escala de producción, constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura, ya que se usa en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales.

1.1.3 Estudio de genética de las células de plantas, fisiología, bioquímica y patología.

La ingeniería genética de plantas ha ofrecido soluciones parciales a la lucha contra insectos, hongos y virus. El estudio y la comprensión de los mecanismos por los cuales las plantas responden a las condiciones de estrés permiten su utilización para el diseño de estrategias biotecnológicas, por ejemplo en la producción de compuestos de interés o en la adaptación de especies agrónomicamente importantes a condiciones extremas. Se ha reportado avances con respecto a la obtención de plantas resistentes a la salinidad de los suelos, problema que se calcula que en 20 años ocasionará el 30% de las pérdidas en la agricultura así mismo el empleo de especies para realizar procesos de biorremediación de suelos y efluentes contaminados con productos químicos o metales pesados. (Golan-Goldhirsh *et al.*, 2004; Doran 2009; Zhang, 2001; Larcher, 1995; Herrera *et al.*, 2008; Lasat, 2002). La producción de proteínas específicas, donde se pueden utilizar plantas enteras, órganos seleccionados o cultivos *in vitro* como sistemas de producción y acumulación de proteínas propias y transgénicas (Cannon *et al.*, 2003)

1.2. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales

1.2.1 Fuente de explantes

La elección del explante (parte separada de un vegetal, llámese protoplasto, célula, tejido, u órgano) constituye el primer paso para el establecimiento del cultivo, esta basado en el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. Es frecuente, que en condiciones idénticas de medio y ambiente, las respuestas *in vitro* del cultivo de un determinado explante de una especie difieran con el cultivar empleado .

También se considera otros factores que inciden en en la respuesta del explante cultivado como son: la época del año, crecimiento, nutrición, estrés y desarrollo de las planta donante, características que influirán de manera directa el desarrollo exitoso del cultivo *in vitro* (Pierik, 1990).

1.2.2 Asepsia

La asociación explante-medio y condiciones físicas en que normalmente se incuban los medios de cultivo conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos principalmente bacterias y hongos, los cuales pueden destruir tales cultivos , competir con el explante por el medio de cultivo o modificar las condiciones del medio; por ello, evitar la contaminación por microorganismos es un aspecto para que se tenga éxito en el establecimiento de un cultivo y esto se logra mediante el: 1) trabajar en ambientes adecuados, 2) esterilizar los medios de cultivo, 3) desinfección superficial de los explantes para liberarlos de microorganismos exógenos con el uso de etanol (70 % v/v), hipoclorito de sodio (NaOCl) del 1 al 3 %. Con menor frecuencia se usan el hipoclorito de calcio $[Ca(OCl)]_2$, del 6 al 12 % y el cloruro de mercurio ($HgCl_2$) del 0.1 al 1.5 % así como antibióticos y fungicidas, 4) manejar adecuadamente las normas de asepsia en el sembrado del cultivo (Harisha, 2007)

1.2.3 Componentes nutricionales del medio de cultivo

Los componentes del medio constituyen un factor importante y preponderante para obtener una adecuada respuesta en el explante (Gamborg *et al.*, 1976; Seabrook, 1980; Villalobos, 1980; Leifert *et al.*, 1995). Fueron establecidos a partir de las exigencias internas de las plantas, con

modificaciones para atender las necesidades específicas *in vitro*. Así mismo, varios compuestos son adicionados para suprimir las necesidades metabólicas, energéticas y estructurales de la célula ya que las mismas vías bioquímicas básicas que operan en las plantas son mantenidos en los cultivos *in vitro*. Entre los componentes del medio de cultivo se encuentran los nutrientes minerales que deben proveer macro y micronutrientes a los explantes, composición que varía según la especie vegetal, el tipo de explante y los resultados esperados. Además deben de proveer de sustancias orgánicas, reguladores de crecimiento, entre otros componentes que se describen a continuación.

1.2.3.1 Sales inorgánicas

1.2.3.1.1 Macronutrientes

Según la Association for Plant Physiology los elementos requeridos por las plantas en grandes cantidades (0.5 mmol L^{-1}) son referenciados como macroelementos, además del carbono, hidrógeno y oxígeno, los elementos más demandados por las plantas son: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre (N, P, K, Ca, Mg y S) (Rout *et al.*, 2000; Pierik, 1990).

El nitrógeno es importante ya que forma parte de la estructura de las moléculas proteicas, ácidos nucleicos, porfirinas que intervienen en la fotosíntesis, en general es un elemento esencial porque determina en gran medida la tasa de crecimiento del tejido; al comparar con el ión nitrato NO^{-3} (es la forma más oxidada del nitrógeno), el ión amonio, NH^{+4} es la forma más reducida; las plantas utilizan nitrógeno reducido para su metabolismo, y dentro de las plantas el nitrógeno existe casi en su mayor parte en la forma reducida (Taiz & Zeiger, 2007).

El fósforo interviene en la estructura de las moléculas nucleicas y en la síntesis de compuestos de alta energía, además de que participa en la activación de diversas enzimas (Taiz & Zeiger, 2007).

El potasio es necesario para la división celular normal, síntesis de carbohidratos y clorofila, y asimilación de nitrógeno, importante en la apertura y cerrado de estomas; los iones de potasio son rápidamente transportados a través de las membranas y dos de las funciones más importantes son regular el pH y el ambiente osmótico de las células (George, 1993; Bayley, 1972; Cakmak, 2008).

El calcio es un constituyente de la pared celular en forma de pectato de calcio y esta involucrado en la plasticidad de las células, ya que la remoción de calcio incrementa la permeabilidad y la plasticidad de la membranas, también está involucrado en la organización de cromatina en la mitosis y es activador de enzimas (fosfolipasa, arginina-cinasa, ADP fosfatasa y adonil cinasa). El magnesio es importante en los procesos de fotosíntesis y metabolismo de carbohidratos, constituyente de la clorofila, agente de unión de ribosomas (síntesis de proteínas) (Cakmak & Schjoerring, 2008). El azufre está presente en algunas proteínas en forma de aminoácidos azufrados y constituyentes de vitaminas (tiamina y biotina), coenzima A, enzimas (grupos sulfidrilos), síntesis de esteroides y lignina, importante en la fotosíntesis (síntesis de ferredoxina); el azufre es absorbido como SO_4^{-2} .

1.2.3.1.2 Micronutrientes

Son requeridos a más bajas concentraciones y los más importantes son fierro, manganeso, zinc, boro, cobre, cobalto y molibdeno; los últimos cinco son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos (Bhojwani & Razdan, 1983).

El fierro es requerido para la formación de los precursores de clorofila, componente de varias flavoproteínas (peroxidasas y catalasas). El manganeso es necesario para el mantenimiento de la ultraestructura y el proceso fotosintético, activador de enzimas en: ciclo de Krebs, reducción de nitratos y oxidación del ácido indolacético (AIA). El cobre y zinc se requieren en la oxidación e hidroxilación de compuestos fenólicos. Molibdeno y fierro forman parte de las enzimas nitrato reductasa y nitrogenasa. El cobalto es el metal componente de la vitamina B₁₂, la cual está involucrada en la síntesis de ácidos nucleicos. El boro es necesario para el

mantenimiento de la actividad meristemática, así mismo, en la síntesis de bases nitrogenadas en particular del uracilo, el cual interviene en el transporte de azúcares y almidón dentro de la planta y facilita el transporte a través de membranas (Rout *et al.*, 2000).

1.2.3.2 Agentes quelantes

Son compuestos orgánicos que son capaces de formar complejos con cationes metálicos, en los que el metal es sostenido por medio de enlaces, forman un complejo en forma linear o de anillo (EDTA = ácido etilendinitrotetraacético), generalmente el hierro es adicionado en esta forma a una concentración de 20 a 40 mg L⁻¹ ya que de esta manera se suministra de forma secuestrada y se prolonga su disponibilidad (Pierik, 1990).

1.2.3.3 Compuestos orgánicos

El crecimiento y morfogénesis en el cultivo de tejidos vegetales depende en gran medida del uso de sustancias orgánicas como azúcar, vitaminas y aminoácidos. La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente usada a una concentración de 2% a 3% (p/v), esto dependiente del tipo de especie, por ejemplo, ocasionalmente se utiliza glucosa en cultivos de monocotiledoneas (Hurtado & Merino, 2001).

Las vitaminas son requeridas para el éxito del cultivo de tejidos, su requerimiento varia con la especie, el genotipo y probablemente a la capacidad de síntesis del explante, las vitaminas más frecuentemente usadas en el medio de cultivo para tejidos vegetales son: tiamina (B₁), ácido nicotínico (niacina) y piridoxina (B₆) (Anexo A) las cuales son adicionadas al medio para asegurar que no ocurra deficiencias y algunas de ellas se utilizan para estimular procesos de crecimiento específico (George, 2008).

El mio-inositol ha sido clasificado dentro de las vitaminas, sin embargo es un azúcar-alcohol. Estudios realizados por Jacquiot (1951) al suministrar 20-1000 mg L⁻¹ retardo la necrosis pero la proliferación de callo no fue promovida. Murashine y Skoog (1962) lo incorporaron en combinación con tiamina, ácido nicotínico y piridoxina para el cultivo de *Carharanthus roseus*

y *Nicotiana tabacum*, los cuales obtuvieron resultados favorables en la velocidad de crecimiento de callo e inducción de callogénesis.

Con respecto a los requerimientos de aminoácidos, estos pueden ser agregados en forma de una mezcla como el hidrolizado de caseína o de manera individual: asparagina, glutamina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico y tirosina. Se usa los isómeros L, ya que los D son ineficaces. La L-serina es utilizada en la iniciación de embriones haploides en cultivo de anteras; la L-tirosina es importante en la formación de tallos de cultivos de callos (Hurtado & Merino, 2001; Pierik, 1990)

1.2.3.4 Principales medios de cultivo empleados en cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

Entre los medios más usados en cultivos *in vitro* están: MS = Murashige *et al.*, 1962; SH = Schenk and Hildebrandt, 1972; B5 = Gamborg *et al.*, 1968; Nitsch = Nitsch 1969; White = Chite, 194; LM = Linsmair and Shook, 1965; WPM = Lloyd y McCown, 1980 (Anexo B).

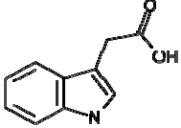
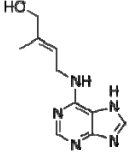
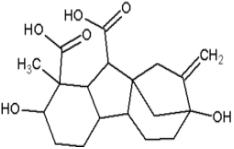
El MS es reportado en la literatura como un medio basal estándar, fue desarrollado sobre el análisis de componentes presentes en el cultivo *in vitro* de explantes de tabaco, la cantidad alta de sales minerales presentes en esta formulación, iones de NO_3^- incluidos como NH_4NO_3 o bien KNO_3 e iones K^+ son adicionados al medio como KNO_3 y KH_2PO_4 , a menudo es utilizado en el cultivo de tejidos ya que da resultados satisfactorios principalmente en el desarrollo de callos en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas; de forma similar el medio SH ha demostrado efectividad en el cultivo *in vitro*; a diferencia del MS, el mio-inositol está en cantidades mayores que los demás medios (ver Anexo B). El medio MS y B5 son reportados como medio estándar los cuales son sugeridos cuando no se conoce información reportada de la especie (Bhojwani & Razdan, 1983; Murashige & Skoog, 1962). El medio LM es una revisión del medio MS, en sus componentes orgánicos se modifica únicamente tiamina y mio-inositol. El medio WPM fue formulado para el cultivo en de plantas leñosas y la cantidad de sales es menor que el MS (Trigano & Gray, 1966). El G5 fue diseñado para el

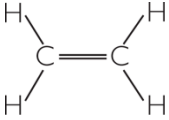
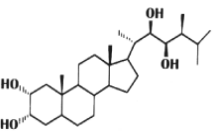
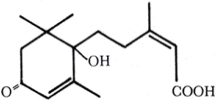
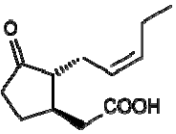
cutivo de callos de *Glycine max* (soya), conteniendo en mayor proporción nitrato que amonio. Recientemente diversos tipos de medio de cultivo han sido desarrollados para determinadas especies y de igual manera para los explantes (Harisha, 2007) (Ver Anexo C). La elección del medio nutritivo dependerá de la planta con la que se trabaja (Hurtado, 2001; Pierik, 1990).

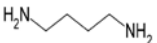
1.2.3.5 Reguladores de crecimiento vegetal (RCV)

Debido a que el desarrollo de las plantas es continuo, su vida esta gobernada por la integración de las condiciones ambientales en las cuales esta creciendo, su estado fisiológico y estado de desarrollo. La forma de integrar y regular esta formación, es a través de moléculas de señalización, lo que permite un control. A dichas moléculas se les llama reguladores de crecimiento vegetal, o bien cuando son producidos por las plantas (endógenas) se les denominan fitohormonas. Los reguladores de crecimiento son sustancias orgánicas que actúan como mensajeros químicos en la regulación de los procesos fisiológicos (crecimiento diferenciación, desarrollo e interacción con el medio ambiente) de las plantas y los tejidos cultivados *in vitro*. Se caracterizan por actuar a muy bajas concentraciones (10^{-6} M), son transportados desde el sitio de síntesis al sitio de acción, actúan uniéndose de forma no covalente, así mismo, el tipo y concentración de reguladores de crecimiento varía de acuerdo al tipo de planta y tejido propuesto. (Ottoline, 1998; Kyte & Kleyn, 2003; Morgan, 1990). No obstante, las cantidades endógenas de fitohormonas pueden no ser suficientes para establecer cultivos *in vitro*, por lo que deben ser adicionados selectivamente al medio de cultivo. Las hormonas vegetales más importantes son: auxinas, giberelinas, citocininas, el etileno, y un grupo de inhibidores; además se ha establecido relevancia de las poliaminas, ácido jasmonico y los brasinoesteroides (Cuadro 2,3). Todas ellas son químicamente diferentes y se sintetizan en los órganos: raíz, tallo, hoja, fruto, semilla, etc; sin embargo, algunas de ellas tienen sitios más específicos (Cuadro 2) (Bidwell, 1979; Niklas, 2000; Taiz & Zeiger, 2004). Por ende la regulación de la expresión de eventos fisiológicos en las plantas y en el cultivo *in vitro* está en función del tipo de hormonas presente y su concentración (Cuadro 2,3).

Cuadro 2. Función fisiológica de los RCVs en plantas enteras

Tipo de fitohormona y molécula representativa	BIOSÍNTESIS	TIPO DE TRANSPORTE	EFECTOS FISIOLÓGICOS
<p>Auxinas</p>  <p>Ácido 3-indolacético (AIA)</p>	<p>Es en meristemos apicales de tallos, raíces, hojas y frutos</p> <p>Vía de Trp (Indolanina)</p>	<p>Polarizado y difusión</p> <p>No polar en el floema</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve el crecimiento en tallos, coleoptidos, dominancia apical. • Formación de raíces adventicias • Inhibe el crecimiento en raíces en concentraciones bajas • Favorecen la floración • Retardan la abscisión de hojas, flores y frutos jóvenes
<p>Citocininas</p>  <p>Zeatina (Zea)</p>	<p>Principalmente en el citosol de las células meristemáticas de raíz, embriones y hojas</p>	<p>De las raíces son movilizadas por el xilema hacia la hoja u otros órganos</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve la división celular, formación y crecimiento de brotes laterales, movilización de nutrientes hacia las hojas, germinación de semillas, desarrollo de brotes, expansión celular. • Retrasan la senescencia de las hojas • Estimula la producción de ácido nítrico.
<p>Giberelinas</p>  <p>Acido Giberélico (GA3)</p>	<p>En ápices de tallos, raíces, hojas, partes florales, semillas y embriones.</p> <p>Vía de Acetil-CoA por el acetato mevalonato</p>	<p>Por el floema junto con los productos de la fotosíntesis y también con el xilema</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula la elongación de tallos y germinación • A nivel de células de la aleurona, estimula la síntesis y secreción de α-amilasa y la síntesis de enzimas hidrolíticas • Inducen la partenocarpia (formación de frutos sin fertilización), floración de días largos.

<p>Etileno</p> 	<p>En casi todos los órganos pero en mayor concentración en zonas meristemáticas. Su biosíntesis es a partir de aminoácidos (Met)</p>	<p>Se transporta de célula a célula en el simplasto y floema</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Promueve la maduración de frutos y germinación • Florece la epinastia de hojas, la senescencia de hojas, abscisión de hojas y frutos, formación de hojas y frutos • Formación de raíces adventicias • Induce la expansión celular lateral • Pone fin a la dominancia de brotes
<p>Brasinoesterooides</p>  <p>Brasinólido</p>	<p>En todos los tejidos vegetales</p> <p>Su biosíntesis es a partir del escueleno (triterpeno)</p>	<p>-----</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Favorece la elongación y división celular de tallos, el desenrollamiento de hojas, el crecimiento de tubos polínicos y germinación. • Promueve la diferenciación del xilema • Inhibe el crecimiento de las raíces • Retarda la abscisión de hojas
<p>Ácido abscísico</p> 	<p>En hojas, semillas, frutos, brotes, raíces, tallos. Es un terpenoide derivado de la vía de los acetato, mevalonato, mediante la ruta indirecta del β-caroteno</p>	<p>Se moviliza por el xilema y el floema. El movimiento es lento, no polar en todas las direcciones</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Favorece el desarrollo de semillas, el crecimiento de raíces y la senescencia de hojas • Inhibe la producción de enzimas inducibles por las giberelinas • Promueve el cierre de estomas en respuestas a estrés • Incrementa la conductividad hídrica y el flujo de iones en raíces
<p>Jasmonatos</p>  <p>Acido jasmónico</p>	<p>En ápices de tallos, hojas jóvenes, frutos inmaduros y raíces</p> <p>Deriva del ácido linoleico</p>	<p>----</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Inhiben la elongación de raíces, germinación y crecimiento de semillas • Promueve la formación de raíces adventicias, la biosíntesis de etileno, la senescencia de hojas, el cierre de estomas, la degradación de la clorofila y resistencia a patógenos. • Inhibe la producción de α-galactosidasa en semillas

Poliaminas		
	Proviene del aminoácido Arg y de la Lys	---
Putrescina		<ul style="list-style-type: none">• Favorece la floración y estimula la senescencia en hojas cortadas• Incrementa la tolerancia al estrés• Promueve la división celular.

Tomado de Gómez & Garcia, 2006; Davies, 1995; Palme *et al.*, 1990; Moore, 1989.

Cuadro 3. Función de los RCVs en el crecimiento y desarrollo de cultivos *in vitro*.

Tipo de RCV	RCV comúnmente empleados en CTV	RESPUESTA <i>in vitro</i>
Auxinas	Ácido 3- indolacético (AIA, natural)	Formación de raíces adventicias
	Ácido 3-indobutírico (IBA)	Inducción de embriones somáticos, formación de raíces
	Ácido α -naftalenacético (ANA)	Formación y crecimiento de callo, células en suspensión a concentración de 2-20 μ M. En la inducción de raíz es utilizado en combinación con 2,4-D de 0.2-2 μ M
	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético 2,4-D	Inhibición de la elongación de raíces, mas común para la inducción y mantenimiento de callo y células en suspensión, para el estado de dediferenciación usualmente se usa a concentración de 1-50 μ M en combinación con ANA
Citocininas	6-bencilaminopurina (BAP)	Formación de brotes adventicios (1-10 μ M). Para la inducción de callo y células en suspensión (0.5-5.0 μ M). Se usa frecuentemente en combinación KIN para una rápida inducción de brotes, yemas o meristemas (5-50 μ M)
	Cinetina (KIN)	Inhibición de la elongación de brotes axilares /yemas adventicias y meristemas a altas concentraciones (20-50 μ M). Se utiliza a menores concentraciones (1-20 μ M) para la inducción de callo y crecimiento.
	Zeatina (Zea)	Inhibición de la senescencia de las hojas
Giberelinas	Ácido giberélico	Estimulación de la elongación de hojas Rompimiento de la dominancia de semillas y brotes
Ácido abscísico	Ácido abscísico	Estimulación de la maduración de embriones Promoción de la abscisión de hojas Inducción de la dominancia de semillas, brotes

Tomado de Harisha, 2007.

1.2.4 Condiciones de incubación: luz, temperatura y pH

En el cultivo *in vitro*, los principales parámetros físicos a controlar son la calidad e intensidad de luz empleada y la temperatura, dado que la luz de día es remplazada por fuentes de luz artificial con diferente espectro, tales cambios pueden inducir respuesta inhibitoria del crecimiento de células y tejidos vegetales, en otros casos la luz puede incrementar, generalmente el fotoperiodo es de 16 h luz con una irradiancia de $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Por otra parte, la temperatura se mantiene en un intervalo de 25-27 °C; se sabe que la humedad de la cámara de crecimiento influye sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro*, ya que una humedad elevada alrededor del 30% dentro de la cámara conlleva a un incremento en la contaminación (Pierik, 1990). Así mismo, la influencia del pH en el medio de cultivo influye en el crecimiento y desarrollo del explante; generalmente se reportan rangos entre 5 y 6.5 como el óptimo ya que si cada valor se lleva a extremos (menores o muy ácidos y elevados o muy básicos) frenan el crecimiento *in vitro*.

1.2.5 Factores que afectan el cultivo *in vitro*

Los cambios en la morfología y desarrollo de plantas micropropagadas, así como el crecimiento y diferenciación de células cultivadas *in vitro*, se ven afectadas por factores como: balance de reguladores de crecimiento vegetal (exógeno o endógeno), la fuente de carbono y los minerales disponibles en el medio de cultivo, las condiciones físicas (luz temperatura y humedad). Esto es importante ya que no solo se ve afectado el crecimiento de las células y su respuesta morfológica si no de igual manera los compuestos que las células producen ante condiciones determinadas.

Uno de los principales problemas que se presentan durante el establecimiento de cultivos *in vitro* es el ennegrecimiento de los explantes, resultado de la oxidación de polifenoles que son exudados al medio los cuales pueden llegar a impedir el establecimiento de los cultivos (Matos *et al.*, 2000). Este fenómeno ocurre debido a un incremento en la actividad metabólica de las células que están alrededor del área del daño del tejido, las cuales se dividen rápidamente y lo envuelven, lo que implica la producción de polifenoles para

endurecer las paredes celulares y proteger la planta contra un posible ataque de patógenos (Karp, 1998; Novoa et al., 2001; Turrens, 2003). Lo que ha llevado al diseño de estrategias para reducir el problema (Cuadro 4), las cuales se reporta han tenido éxito en el control de los problemas de oxidación en explantes permitiendo de esta manera el establecimiento de cultivo de tejidos vegetales (Aliyu ,2005; Sáenz *et al.*, 2005; Sánchez-Cuevas&Salaverría, 2004).

El carbón activado adsorbe todo tipo de sustancias por lo que es posible que remueva compuestos fenólicos o bien absorber componentes del medio de cultivo requeridos para inducir alguna respuesta morfogénica (Azofeifa, 2009); la L-cisteína agregada al medio reduce la actividad de la polifenol oxidasa (Bonja & Durzan, 1982); el PVP es una poliamida el cual al ser adicionado al medio absorbe sustancias de tipo fenol con la unión de iones hidrógeno, previniendo la oxidación y polimerización de éstas sustancias exudadas por el explante, es también aplicado como tratamiento al momento de separar el explante de la planta donadora (Amin & Jaiswal, 1988), como pretratamiento anterior o posterior al proceso de desinfección (Gannoun *et al.*, 1995; Figuereido *et al.*, 2001). En ambos casos, los explantes son inmersos en la solución de PVP.

Cuadro 4. Principales estrategias utilizadas para controlar la oxidación en explantes durante el establecimiento de cultivos *in vitro*

Tipo de estrategia
-Uso de explantes en estado juvenil o de material en crecimiento activo
-Crecimiento del explante bajo condiciones de incubación de baja luminosidad o en oscuridad
-Crecimiento del explante bajo condiciones de incubación a una temperatura baja
-Subcultivos frecuentes
-Cultivo en medio líquido
-Uso de adsorbentes como: carbón activado, PVP, cisteína entre los más usados, en la preparación del explante para su cultivo o adición al medio de cultivo
-Uso de antioxidantes en la preparación del explante para su cultivo o adición al medio de cultivo
-Selección del medio de cultivo
-Selección de los reguladores del crecimiento
-Cambio del potencial osmótico del medio de cultivo
-pH del medio de cultivo bajo

Azofeita, 2009

2. ANTECEDENTES

2.1 *Justicia spicigera*



Fig. 2 Ejemplar adulto de *Justicia spicigera* (muitle).

2.1.1 Descripción botánica

2.1.1.1 Taxonomía

El muitle (*Justicia spicigera*) (Fig. 2) es una planta medicinal integrante de la familia de las Acantháceas (Acanthaceae) (Cuadro 5), familia que reúne 256 géneros y 2770 especies de zonas tropicales y subtropicales. Incluye géneros de interés medicinal, como *Justicia*, dentro de la cual existen numerosas especies que presentan actividad biológica como *J. secunda* Vahl, *J. procumbens* Linn, *J. pectoralis* Jacq, *J. simplex* Vahl, *J. insularis*, *J. secunda* Vahl las cuales sintetizan diversos tipos de lignanos conocidos por su actividad citotóxica como la justicidina A y B que han demostrado actividad anti-leucémica antiinflamatorias y analgésicas; prostadilidina A, B y C con acción antidepresiva (Ghosal *et al.*, 1979; Okigawa *et al.*, 1970; Boluda *et al.*, 2005) y se ha reportado incluso su acción insecticida contra la larva de *Aedes aegypti* que trasmite el dengue (Chariandy *et al.*, 1999; Joseph & Gleye, 1988). Durante la revisión de la familia se encontró que en México aparece una diversificación de especies, mas de 380, las cuales pueden encontrarse en cada estado de la república (Thomas, 2004); sin embargo existe escasa literatura de la especie *J. spicigera*, algunos tratados de botánica usan como sinónimo de *J. spicigera* a *J. ghiesbreghtiana* ya

que por taxonomía reportan similitudes (Daniel, 2002; Domínguez, 1990). La clasificación actual comprende 36 géneros y 27 especies (Plant databases), también conocido como hierba del limalín, hierba azul, hierba tinta, mohuite o muicle.

Cuadro 5 Clasificación taxonómica de *J. spicigera*

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i> – plantas vasculares
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i> – Dicotiledóneas
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Scrophulariales</i>
Familia	<i>Acanthaceae</i>
Genero	<i>Justicia</i>
Especie	<i>Justicia spicigera</i> Schltld. – mohintli

Tomado de USD Natural resources Conservation service: Plant database

2.1.2 Distribución geográfica

J. spicigera es una planta originaria de México, que crece en los Estados de Chiapas, Nayarit, San Luís Potosí, Valle de México, Veracruz, Puebla, Morelos, Tlaxcala, Yucatán e Hidalgo (Martínez, 1996; Hersch-Martínez, 1997) (Fig. 3A). Se encuentra presente en diversos climas desde cálido, seco y templados a un nivel del mar hasta los 3000 m. Cultivada en huertos familiares, crece a orillas de caminos (Callejo, 1996), y de igual forma crece en matorrales y bosques (Monrroy *et al.*, 2007).

2.1.3 Morfología

Planta que casi siempre se encuentra como arbusto de 1 a 1.5m de altura, ramificado, sus hojas son largas y vellosas (Fig. 3B). Las flores de 3 a 3.5 cm se encuentran en la parte apical de la planta, comúnmente de color anaranjado, pero algunas veces rojo pálido en forma de tubos que terminan rasgándose, formándose un labio (Fig. 3B). Los frutos son capsulares ovoides con 2 a 4 semillas (Martínez, 1992; Cevallos & Sergio, 1998).

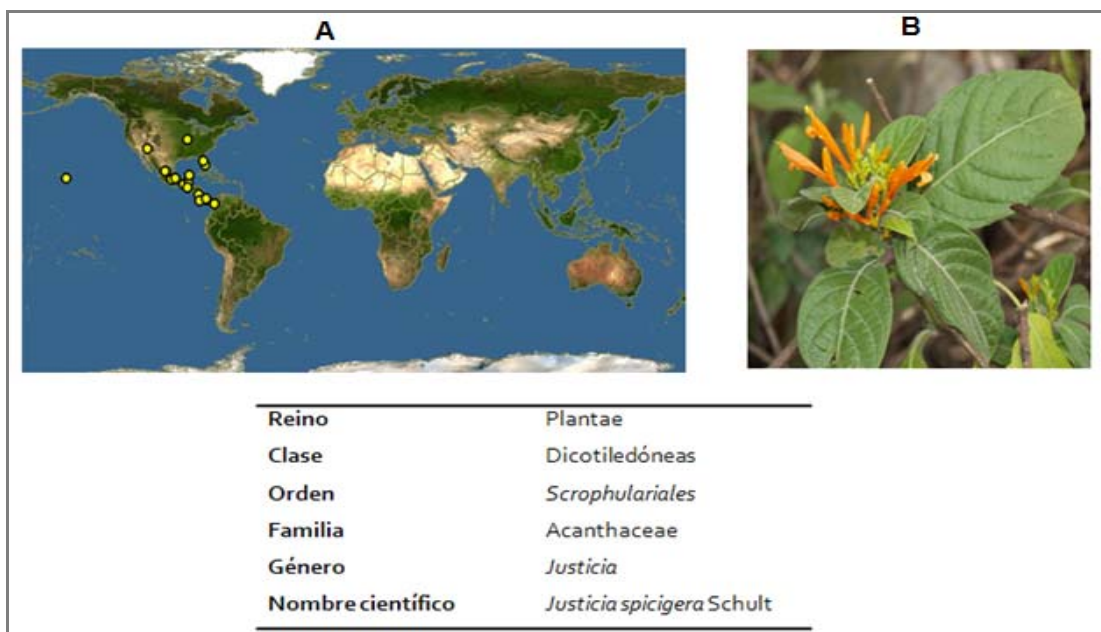


Fig. 3 Descripción taxonómica de *J. spicigera* y su distribución geográfica. **A** Distribución geográfica, **B** Flor y hojas. Tomado de IBUNAM y DiscoverLife <http://www.discoverlife.org/mp/20?Kind=Justicia+spicigera>; <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PV525864>

2.1.4 Importancia e usos

2.1.4.1 Información etnobotánica

El muile provee de algunos de los colorantes usados extensamente en la tradición popular, de él se logra el rosa mexicano, el violeta y el azul, además es una planta utilizada por algunas etnias de México como tónico sanguíneo, estimulante, antidisentérico, antipirético, antiespasmódico, antiinflamatorio, para aliviar trastornos menstruales, anemia, nervios, insomnio, bronquitis, desordenes intestinales incluyendo náuseas, diarrea y vomito, para tratar el cáncer, infecciones renales y anemia (García, 2008; Azpeitia, 1996) en cualquiera de los padecimientos se utilizan a menudo las hojas y las ramas; para afecciones antiparasitarias (intestinales) se hace una infusión con las hojas de esta planta, hojas de epazote (*Teloxys ambrosioides*) y estafiate (*Artemisia ludovisiana*).

Sepúlveda *et al.*, 2009 reporta la actividad antioxidante, contenido de fenoles totales y contenido total de flavonoides en tres órganos de la planta (tallos, hojas y flores), en dos tipos de extractos (acuoso y metanólico); evaluando la actividad antioxidante por DPPH, fenoles totales determinado por Folin-Ciocalteu y flavonoides totales por un método colorimétrico basado en el tricloruro de aluminio bajo condiciones ácidas. Valores bajos de IC_{50} (Índice de inhibición obtenida) indican una alta actividad antiradical como fuente de actividad captadora del radical DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo). Los resultados muestran que para un mismo órgano de la planta, en diferente extracto (metanólico y acuoso) el orden de capacidad antioxidante y fenoles totales cambia drásticamente; extractos metanólicos poseen alta capacidad antioxidante (hojas \geq flores \geq tallos) que los extractos acuosos (tallos \geq flores \geq hojas). El contenido total de fenoles fue de 1.33 a 5.01g GAE/100 peso seco, para un mismo solvente donde la cantidad más alta fue encontrada en hojas y flores, el contenido de flavonoides entre 0.18-1.30 CE/100 peso seco. Valores reportados por otras especies de la familia (Acanthaceae) indican diferentes valores de capacidad antioxidante, fenoles totales y contenido de flavonoides dependiente de la especie de la planta y el extracto en el que se encuentra. Los extractos metanólicos de hojas de *J. spicigera* muestran actividad antioxidante con una IC_{50} de $48.86 \mu\text{gml}^{-1}$ siendo más alta que lo reportado para *Dicliptera verticillata* (IC_{50} $785 \mu\text{gml}^{-1}$), similares resultados se muestran en el contenido total de fenoles (5.01 g GAE/100g peso seco), siendo más alto en las flores comparado con otras plantas como *Dicliptera verticillata* (2.82 g GAE/100g peso seco). El estudio hace énfasis en la distribución diferente de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante encontrada en los órganos de la planta de *J. spicigera*, donde extractos metanólicos de las hojas poseen más alta capacidad antioxidante que los extractos metanólicos de tallos con alto contenido fenólico. La alta capacidad antioxidante encontrada en partes aéreas (hojas y flores) de *J. spicigera* muestra que el contenido de fenoles y flavonoides contribuyen a esta capacidad relacionando al uso de estas partes en la tradición popular como anti-inflamatoria, anticancerígena y depurativa.

2.1.4.2 Estudios fitoquímicos

La planta produce metabolitos secundarios del tipo fenólico, como los taninos, lignanos, flavonoides y algunos compuestos fenólicos simples, estos son sintetizados primariamente por productos de la ruta del ácido shikimico, los cuales pudieran estar asociados a su propiedad curativa (Martínez, 1996). Se ha reportado en hojas de muitle alantoina (compuesto nitrogenado derivado de las purinas), flavonoides como la Kaempferitrina y su bis-ramnósido Kaempferol (Euler *et al.*, 1982), terpenoides como el β -glucosil-O-sitosterol, y la criptoxantina (caroteno) (Domínguez *et al.*, 1990).

La alantoína es un producto del metabolismo de las purinas. Su principal efecto es ser fuerte estimulador de la proliferación celular y reconstrucción de tejido. Niveles de alantoína se han evaluado e indican que es un marcador sensitivo de estrés oxidativo como el glutatión y la cisteína (Yardim-Akaydin *et al.*, 2004). En la industria cosmética, la alantoína tiene la ventaja de no ser toxica ni irritante a la piel ya que su uso es recomendado para el tratamiento de úlceras, heridas de curación lenta y utilizada en quemaduras como cicatrizante (®Merk 2010). La FDA 2007 establece que actúa como protector de la piel en preparaciones que la contengan entre 0.5-2.0%.

El Kaempferol (Fig. 4) es un flavonoide natural que se encuentra presente en algunas plantas, principalmente encontrado en Te, brócoli y ginkgo (Zhang, 2008); es un antioxidante potente que ayuda a prevenir el daño oxidativo de las células, lípidos y ADN, además de prevenir la arteriosclerosis (Watell *et al.*, 2003). Se ha confirmado que el Kaempferol actúa como agente quimiopreventivo, demostrando así ser el principal inhibidor de la formación de cáncer en las células (Wang *et al.*, 2005). Estudios *in vitro* realizados por Kowaski *et al.*, 2005 muestran que el kaempferol inhibe la proteína quimiotactica de monocitos 1(MCP-1) la cual juega un papel importante en los inicios de la formación de la placa arterosclerótica; así mismo López-Sánchez *et al.*, 2007 mencionan que el Kaempferol ayuda a prevenir la arteriosclerosis inhibiendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la formación de plaquetas

en la sangre, también, a través de la captación de macrófagos de un compuesto oxidado (oxLDL). Zheng *et al.*, 2001, demuestran que el kaempferol puede tener beneficios para las personas que tienen riesgo de cáncer, ya que en líneas celulares pancreáticas (MIA PaCa-2 y Panc-1) se muestra un efecto anti-cáncer, en tratamiento con kaempferol por 4 días muestra MIA PaCa-2 proliferación celular significativamente inhibida y proliferación de células Panc-1. Estudios realizados por Vivek *et al.*, 2008 encuentran que el kaempferol induce apoptosis en células glioma (neoplasia que se produce en el cerebro espinal) por un elevado estrés intracelular (incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) acompañada con un decremento en agentes de actividad antioxidante (superóxido dismutasa (SOD-1) y tioredoxina (TRX-1) (Cuadro 6).

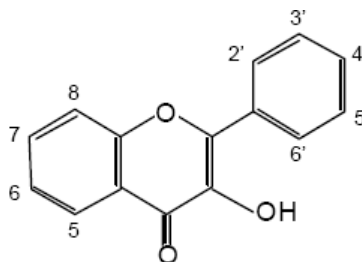


Fig. 4 Estructura química del Kaempferol.

El β -sitosterol (Fig. 5) es el esteroles más abundante en las plantas y ampliamente distribuido. Este esteroles, relacionado estructuralmente con el colesterol, contiene un grupo β -etilo en el C-24 del esqueleto del colesterol, lo que lo hace más lipofílico. Desde los pasados 10 años el papel de los sitosteroles en la salud humana y de los animales ha sido establecido, dando énfasis, tanto *in vitro* como *in vivo*, en su actividad inmunológica y anti-inflamatoria (Bouic, 1996, 1999, 2001; Gómez, 1999). Así mismo ha demostrado su efectividad clínica como agente capaz de disminuir los niveles de colesterol, así como en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna (Becker *et al.*, 1993; Pelleiter *et al.*, 1995; Berges *et al.*, 1995; Gerber, 2002; Tapiero, 2003). Prieto *et al.*, 2006 comprueban el efecto *in vivo* en ratas Wistar y ratones Swiss del β -sitosterol en un modelo de dermatitis de contacto por hipersensibilidad retardada (DTH) ensayado en modelos de liberación de eicosanoides en leucositos

polimorfonucleares de rata y plaquetas humanas estimuladas con ionóforo A23817 en incubaciones de 15 min. Obteniendo a las 24 enzimas implicadas en la iniciación del fenómeno inflamatorio (cascada del ácido araquidónico), indicando así, que este compuesto puede modular el edema mediado por respuesta celular sin ningún efecto a corto plazo en la cascada del ácido araquidónico (Cuadro 6).

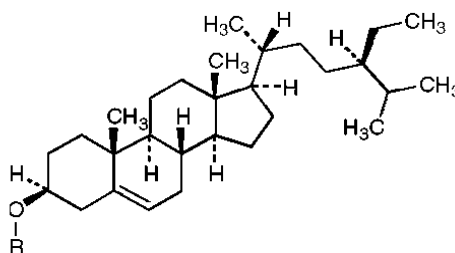


Fig. 5 Estructura química del β -sitosterol.

Cuadro 6 Estudios farmacológicos de Kaempferol y β -sitosterol en diversas líneas celulares (animales).

Tipo de Compuesto	Línea celular	Efecto	Referencia
Kaempferol	MIA PaCa-2 y Panc-1	Inhibición de proliferación de células de la línea celular 79% a 45.7% Reducción de la 3H-timidina	Zheng <i>et al.</i> , 2001 Zhang <i>et al.</i> , 2008
	Osteoclastos	Inhibición de resorción ósea, apoptosis celular	Watell <i>et al.</i> , 2003
	Musculo liso vascular de ratas	Apoptosis , fragmentacion de ADN inducido por 7 β -hidroxicoolesterol revenida con (10-30 μ M) de Kaempferol	Ruiz <i>et al</i> ; 2005; López-Sánchez <i>et al.</i> , 2007
	LN229, U87MG, T98G	Disminución de la expresión Bcl2. Potencial mitocondrial alterada activación caspasa-3. Apoptosis en células glioma.	Vivek; 2008;
β -sitosterol	DTH	Reducción de edema inducido por oxazolona	Prieto <i>et al.</i> , 2006

MIA PaCa-2, Panc-1, células pancreáticas; DTH, dermatitis de contacto por hipersensibilidad retardada; LN229, U87MG, T98G, líneas celulares humanas de glioblastoma; Bcl-2 proteína que regula los procesos de permeabilización mitocondrial y constituye un punto clave en la vía intrínseca de apoptosis celular; 3H-Timidina, precursor del ADN usado como indicador en la síntesis de ADN; caspasas, mediadoras esenciales en procesos de apoptosis , muerte celular programada, procesos morfogénéticos del desarrollo embrionario (lo que su fallo propicia desarrollo de tumores y enfermedades autoinmunes).

2.1.4.3 Estudios farmacológicos

Este arbusto posee escasa información sobre sus propiedades biológicas, a nivel extracto se ha comprobado sus actividades antimicrobianas y anti-protozoaria (Cuadro 7). Extractos etanólicos de hojas de *Justicia spicigera* Schlecht muestran actividad contra el parásito *Giardia* al ser evaluados en medio TYL-S-33 usando topozoides de *Giardia* donde cambios a nivel celular son observados (pérdida de tamaño, forma y daño en la estructura nuclear, así como rompimiento del nucleoesqueleto de las proteínas).

En el 2006 Macotela evaluó 14 extractos de planta medicinales conocidas por sus propiedades (anti-diarreicas, anti-protozoarias) usando topozoides de *Giardia* los cuales fueron incubados con los extractos de la plantas, la viabilidad de topozoides fue determinada usando MTT(3-[4,5-dimetiltrazol-2-il]2,5) como prueba negativa (topozoides con extracto de planta) y como control positivo (incubado con tinidazol), los resultados muestran que el orégano *Lipia berrabdiari* planta que se ha reportado ser potente contra tinidazol (droga comunmente utilizada contra protozoarios) muestra similares índices de mortalidad que *J. spicigera* (*J. spicigera*= 91 ± 0.5 ; *L. berrandieri*= 90 ± 0.6) siendo estas los dos mejores resultados anti -giardia.

Cáceres, *et al.*, 2000 realizó pruebas de citotoxicidad en extractos acuosos de *Justicia spicigera* en líneas de células leucémicas (TF1 TB1), carcinoma cervical (CALO, INBL) y células multipotentes hematopoyéticas 32D y fibroplastos normales (3T3) (como control). Estudios previos revelan que el extracto acuoso de muile no muestra tener actividad hematopoyética *in vitro* tanto en progenitores hematopoyéticos de células humanas como de ratón, de lo anterior estudios recientes revelan que extractos acuosos de *J. spicigera* inducen la apoptosis de líneas celulares leucémicas TF1 (control), pero no en la línea celular TB-1 transfectadas con el proto-oncogen bcl-2 (inhibidor de la apoptosis), entonces se demostró que el efecto es dependiente a la dosis y en estrecha relación con el ciclo celular independiente del estado de transformación de las células. Experimentos adicionales a ello, con fibroblastos de ratón (3T3) y dos líneas celulares carcinoma cervical CALO e INBL, las células presentan cuerpos apoptóticos que indica la principal causa de muerte por apoptosis, esto soporta la evidencia de que *J. spicigera* tiene actividad citotóxica por inducir muerte celular.

Vega-Ávila *et al.*, 2009 en un estudio de extractos acuosos y etanólicos de las partes aéreas de *J. spicigera* y otras tres plantas medicinales (*Ibervillea sonora*, *Cucurbita ficifolia*, *T. lucida*) las cuales fueron ensayadas usando dos líneas celulares T47D (cáncer de seno) y Hela (cáncer cérvico) usando como control positivo la colchicina (fármaco antimitótico que

inhibe la división celular en metafase o anafase) en los resultados todas presentaron inhibición de crecimiento del 50% (ED_{50}) y citotoxicidad de ($ED_{50} \leq 20 \mu\text{g ml}^{-1}$) a líneas celulares T47D y solo el extracto etanólico de *J. spicigera* mostró el mejor efecto citotóxico a Hela (cáncer cervico) con una ($ED_{50} 5.59 \mu\text{g ml}^{-1}$) en comparación con las otras plantas *T. lucida* ($ED_{50} \geq 50 \mu\text{g ml}^{-1}$) *I. sonorae* ($ED_{50} \geq 50 \mu\text{g ml}^{-1}$). Este estudio corrobora uno de sus populares usos para el tratamiento de cáncer.

Otras especies de *Justicia* han sido analizadas por sus propiedades medicinales. Extractos (tallos y hojas) de *J. secunda* fueron evaluadas en 3 fracciones: n-hexano 1.31 g (FHX), 2.64 g cloroformo (FCH) y 13.27 solución acuosa liofilizada (FOH) fueron sometidas a dos ensayos 1) antibacterial (usando como control un disco antibiótico BBL) y 2) citotóxico (fracción FOH), los resultados muestran actividad bactericida contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, microorganismos responsables de afecciones gastrointestinales (Herrera *et al.*, 2002). Un estudio de toxicidad evaluado con *A. salina* (bioensayo usado ampliamente para monitorear la presencia toxica de componentes antitumorales) demuestra alto potencial citotóxico con un valor de $LC_{50} 37.93 \mu\text{g ml}^{-1}$ alrededor de lo que marca la literatura como potencialmente citotóxico $LC_{50} 37.93 \mu\text{g ml}^{-1}$. De *J. procumbes* usada en la medicina china para la fiebre y el cáncer, se han aislado dos lignanos (justicidina A) (con citotoxicidad KB = cáncer farolaringal) con $DC_{50} \leq 1.0 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Furamiya, 1986). En *J. pectoralis* se han aislado lignanos (justicidina B) en extractos etanólicos mostrando actividad citotóxica *in vitro* 9PS (leucemia murine) en líneas celulares $ED_{50} 3.3 \mu\text{g ml}^{-1}$, 9KB ($ED_{50} 7.3 \times 10^{-2} \mu\text{g ml}^{-1}$) e inactiva a NSCLN6 (carcinoma bronquial en líneas celulares humanas) (Joseph, 1988).

Cuadro 7 Estudios farmacológicos llevados a cabo sobre *Justicia spicigera*.

Extracto de la planta	Actividad Biológica	Modelo biológico	Referencia
Tallo y hojas, etanólico	Antibacteriana	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Herrera <i>et al.</i> , 2002.
Hojas, etanólico	Anti-protozoaria	<i>Giardia duodenalis</i>	Ponce-Macotela <i>et al.</i> , 1994 2001, 2006.
Planta metanólico	Anti-inflamatoria	Edema inducido por carrageno en ratas	Meckes <i>et al.</i> , 2004.

3. JUSTIFICACIÓN

La demanda mundial de fármacos derivados de plantas, provoca una disminución importante de los recursos vegetales naturales, ya que requiere de grandes cantidades de material vegetal, lo que pone en riesgo la permanencia de la especie vegetal en su hábitat natural; así como una cantidad variable del producto obtenido y la falta de disponibilidad del material vegetal en cualquier época del año. Recientemente menos del 10% del total de las plantas que se estima hoy en el planeta (promedio de 250.000) han sido evaluadas con fines terapéuticos (Verpoorte, 2000) y cerca del 15.000 plantas medicinales ya estarían amenazadas o en extinción según la lista de la International Union for the conservation of Nature and Natural Resources (UICN) 2000 (Buitrón, 2007). Por otra parte, no existe suficiente información sobre la abundancia y distribución de las plantas medicinales, menos aún, sobre los efectos de su extracción en las poblaciones naturales (Caniago&Siebert, 1998). Por esta razón es necesaria la búsqueda de alternativas de producción de medicamentos naturales que puedan interesar a investigadores y empresarios hacia la producción de compuestos bioactivos, que además involucren el diseño y aplicación de nuevas tecnologías de producción. *Justicia spicigera* es una de las plantas medicinales más utilizada en el antiplano Mexicano por su actividad antimicrobiana y anti-cancerígena; así mismo los compuestos bioactivos presentes en ella tienen una alta capacidad antioxidante esto aunado a que es una especie poco estudiada. Es necesario, entonces, hacer esfuerzos para evitar la pérdida definitiva del conocimiento tradicional sobre plantas medicinales, no solo para preservar esta herencia cultural, sino también para registrar la información sobre ciertas especies útiles, que podrían ser relevantes para el desarrollo de nuevas fuentes de medicamentos y de otros beneficios para la humanidad, contribuyendo, al mismo tiempo, a proteger la biodiversidad (Akerlele, 1993; Katewa *et al.*, 2004). Por ello la biotecnología, mediante el cultivo de tejidos vegetales, es una alternativa al posibilitar la obtención rápida, masiva y controladamente de la planta sin afectar la disponibilidad de los recursos vegetales naturales, por lo que establecer cultivos celulares de *J. spicigera* proveerá de material vegetal que servirá para posteriormente, obtener conocimiento sobre su aspectos fisiológicos y bioquímicos de la especie, ya que al no existir reportes para el cultivo *in vitro* de *Justicia spicigera* es necesario partir de la determinación de las condiciones y requerimientos nutricionales, hormonales y ambientales para el establecimiento de cultivos celulares que presenten características físicas y morfogenéticas adecuadas para la producción de metabolitos secundarios de interés industrial.

4. HIPÓTESIS

Justicia spicigera (mutille) produce metabolitos secundarios de interés farmacológico (kaempferol y quercitina), entonces el manejo adecuado del medio de cultivo y reguladores de crecimiento vegetal (auxina: 2,4-D, PIC, 2,4,5-T, ANA y dos citocininas: KIN y BAP), permitirá el establecimiento de cultivos *in vitro* capaces de biosintetizarlos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Establecer cultivos celulares a partir de explantes foliares inmaduros de *Justicia spicigera*

5.2 Objetivos particulares

1. Establecer cultivos asépticos de *Justicia spicigera*.
2. Evaluar el efecto de diferentes reguladores de crecimiento vegetal (RCV) auxinas: 2,4-D, PIC, 2,4,5-T, ANA; citocininas: KIN y BAP en explantes foliares inmaduros de *Justicia spicigera* sobre la inducción de callo.
3. Proliferación y mantenimiento de los cultivos provenientes de los tratamientos que induzcan los mayores porcentajes de callo friable y crecimiento rápido de *Justicia spicigera*.
4. Análisis fitoquímico de los cultivos celulares.

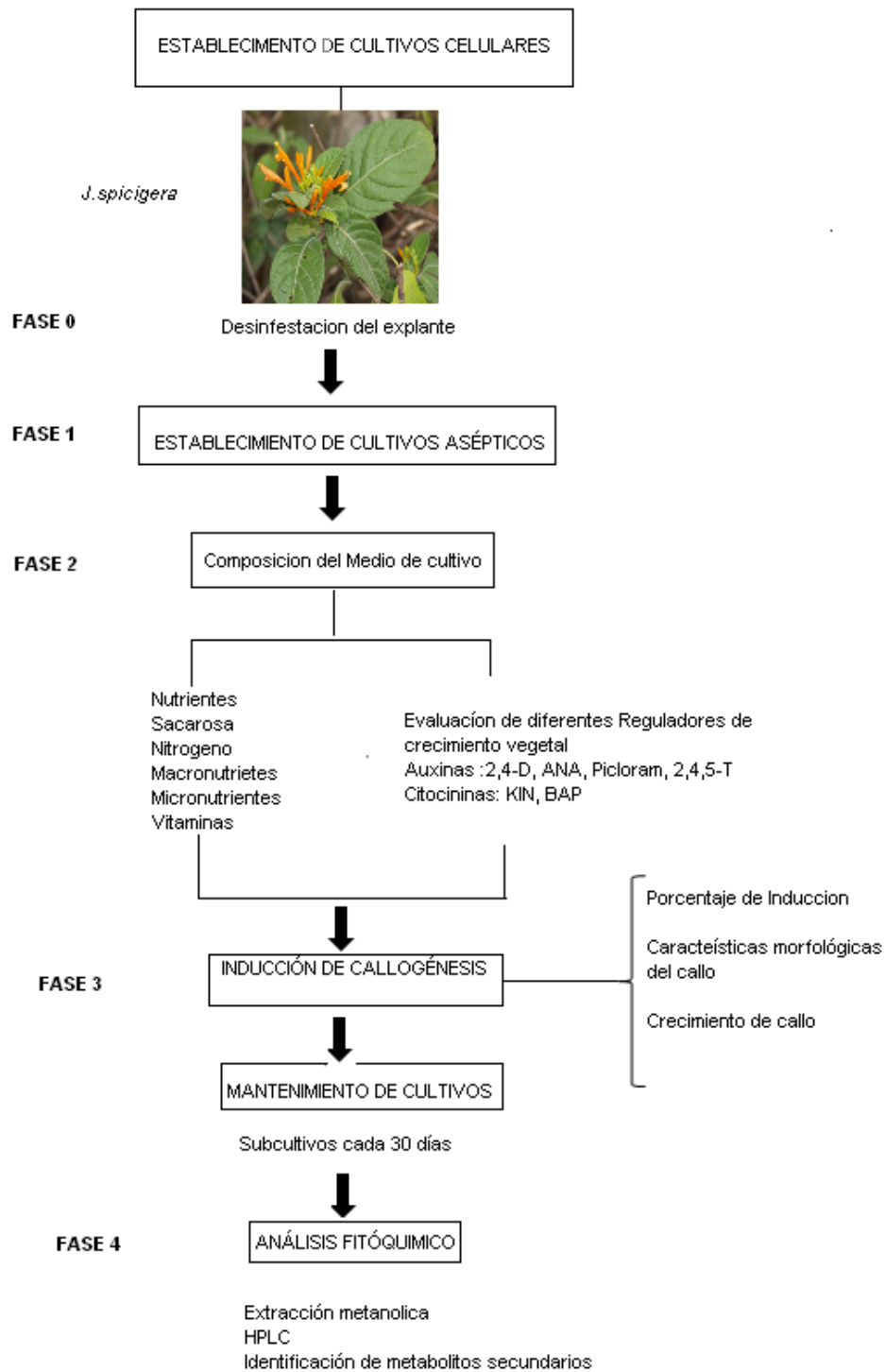


Fig. 6 Esquema del plan de trabajo

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material Vegetal

Ejemplares adultos de *Justicia spicigera* fueron adquiridos en invernaderos de la Ciudad de México, las plantas fueron mantenidas y acondicionadas en el invernadero de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). Las plantas fueron empleadas como fuente de explantes para la inducción de callo (Fig. 7).



Fig. 7 Hojas inmaduras de la parte apical de la planta *J.spicigera* usada para los cultivos *in vitro*

6.2 Establecimiento de cultivos asépticos

Hojas jóvenes inmaduras de *Justicia spicigera* (Fig. 7), fueron desinfectadas superficialmente al ser lavadas con una solución jabonosa durante 15 min eliminando el exceso de jabón bajo el chorro de agua, seguido de una inmersión en etanol al 70% (v/v) durante 1 min, utilizado para romper la tensión superficial y más accesible a la acción de los agentes desinfectantes; Bhojwani & Razdan (1983) señalan que altas dosis de etanol en un corto tiempo de inmersión es suficiente para la desinfección de la mayoría de los tejidos evitando así su deshidratación y daño. Para determinar el mejor método de desinfección superficial las hojas fueron sumergidas en soluciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) a diferentes concentraciones y tiempos (Tabla 1).

Cada tratamiento con lotes de 10 unidades por duplicado; suplementados con 5 gotas de Tween 20 l⁻¹, agente que disminuye la tensión superficial permitiendo mejor contacto superficial del explante con la solución desinfectante. Posteriormente, en condiciones asépticas en el interior de una campana de flujo laminar, fueron lavadas con tres cambios de agua estéril. Finalmente, las hojas fueron seccionadas, para obtener los explantes, en porciones de 5 x 5 mm, excluyendo las porciones basales y apicales. Con el objetivo de evitar la oxidación de los explantes, las hojas fueron fragmentadas bajo su inmersión en una solución antioxidante (100 mg l⁻¹ de ácido cítrico y 150 mg l⁻¹ de ácido ascórbico) durante el proceso de siembra (Fig. 8).

Tabla 1. Ensayos realizados para la desinfección de hojas de *J. spicigera*.

Tratamiento	Dosis
1	0.6% hipoclorito de sodio/15 min
2	0.6% hipoclorito de sodio/30 min
3	1.2% hipoclorito de sodio/15 min
4	1.2% hipoclorito de sodio/30 min

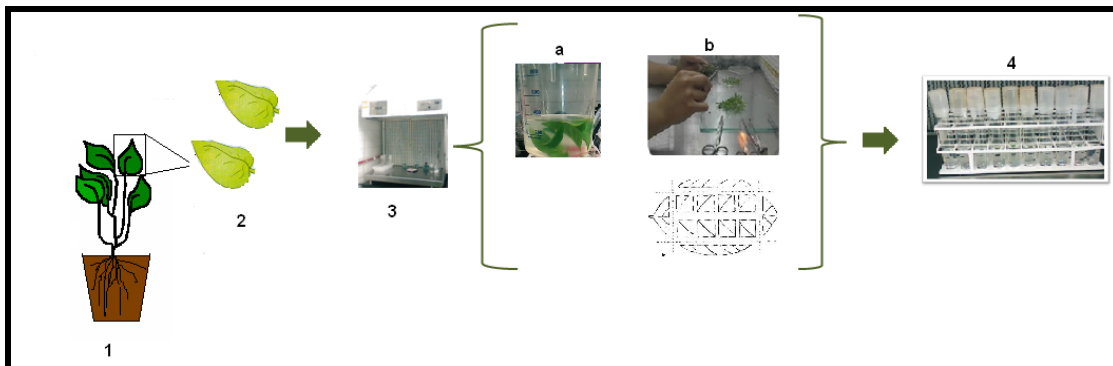


Fig. 8 Esquema para el establecimiento de cultivos asépticos de *J. spicigera*. 1 Planta fuente de explantes; 2 Hojas juveniles; 3 Desinfección superficial; 3a Enjuagues en solución hipoclorito de sodio; 3b Segmentación de hojas; 4 Siembra en medio de cultivo

6.3 Medio de cultivo

Los explantes fueron sembrados en medio de cultivo sólido Murashige y Skoog (MS; 1962) (Anexo C) al 50% de su concentración y suplementado con 30g l⁻¹ de sacarosa, 2g l⁻¹ de phytigel como gelificante, adicionado con 100mg l⁻¹ de ácido cítrico y 150mg l⁻¹ de ácido ascórbico.

6.4 Inducción de callo

Los explantes foliares fueron sembrados en tubos de cultivo (25x150mm) conteniendo 15 ml de medio MS (M1) a la mitad de su concentración suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal (auxinas y citocininas) de manera individual y sus combinaciones (Tabla 2):

M1 Medio MS al 50% de su concentración original, suplementado con 30 g l⁻¹ de sacarosa y 2 g l⁻¹ de phytigel como gelificante, adicionado con 100 mg l⁻¹ de ácido cítrico, 150 mg l⁻¹ de ácido ascórbico y las siguientes concentraciones y tipos de RCV:

RCV para M1 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) [0.0,0.5,1.0,1.5,2.0] + kinetina (KIN) [0.0,0.5,1.0,1.5,2.0] y 2,4-D [0.0,0.5,1.0,1.5,2.0] + 6-benciladenina (BAP) [0.0,0.5,1.0,1.5,2.0], con un diseño factorial (5x5).

Con el fin de incrementar el porcentaje de inducción de callo se evaluó una composición diferente del medio de cultivo (M2), adicionando hidrolizado de caseína, como una fuente adicional de nitrógeno y la concentración de las vitaminas fue duplicada. La composición del medio M1 y M2 fue evaluada con los siguientes RCV (Tabla 3):

M2 Medio MS al 50% de su concentración original, suplementado con 30 g l⁻¹ de sacarosa y 2 g l⁻¹ de phytigel adicionado con 200 mg l⁻¹ de hidrolizado de caseína y 100% de vitaminas.

RCV para M1 y M2 BAP [0.0, 0.5] + ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) [0.0, 0.1,0.5,1.0] + ácido naftalenacético (ANA) [0.0, 0.1,0.5,1.0] y Picloram (PIC) [0.0, 0.1,0.5,1.0] con un diseño factorial (2x4x3)(Tabla 3).

Tabla 2. Tratamientos evaluados en el M1 en la inducción de callo de explantes de *J. spicigera*.

AUXINA 2,4-D(mg l ⁻¹)	CITOCININA KIN (mg l ⁻¹)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
0	D ₀ K ₀	D ₀ K ₁	D ₀ K ₂	D ₀ K ₃	D ₀ K ₄
0.5	D ₁ K ₀	D ₁ K ₁	D ₁ K ₂	D ₁ K ₃	D ₁ K ₄
1.0	D ₂ K ₀	D ₂ K ₁	D ₂ K ₂	D ₂ K ₃	D ₂ K ₄
1.5	D ₃ K ₀	D ₃ K ₁	D ₃ K ₂	D ₃ K ₃	D ₃ K ₄
2.0	D ₄ K ₀	D ₄ K ₁	D ₄ K ₂	D ₄ K ₃	D ₄ K ₄

	BAP (mg l ⁻¹)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
0.0	D ₀ B ₀	D ₀ B ₁	D ₀ B ₂	D ₀ B ₃	D ₀ B ₄
0.5	D ₁ B ₀	D ₁ B ₁	D ₁ B ₂	D ₁ B ₃	D ₁ B ₄
1.0	D ₂ B ₀	D ₂ B ₁	D ₂ B ₂	D ₂ B ₃	D ₂ B ₄
1.5	D ₃ B ₀	D ₃ B ₁	D ₃ B ₂	D ₃ B ₃	D ₃ B ₄
2.0	D ₄ B ₀	D ₄ B ₁	D ₄ B ₂	D ₄ B ₃	D ₄ B ₄

Tabla 3. Tratamientos evaluados en el M2 para la inducción de callo en explantes foliares de *J. spicigera*

AUXINA 2,4,5-T(mg l ⁻¹)	CITOCININA BAP (mg l ⁻¹)	
	0.0	0.5
0.0	T ₀ B ₀	T ₀ B ₁
0.1	T ₁ B ₀	T ₁ B ₁
0.5	T ₂ B ₀	T ₂ B ₁
1.0	T ₃ B ₀	T ₃ B ₁

ANA	CITOCININA BAP (mg l ⁻¹)	
	0.0	0.5
0.0	A ₀ B ₀	A ₀ B ₁
0.1	A ₁ B ₀	A ₁ B ₁
0.5	A ₂ B ₀	A ₂ B ₁
1.0	A ₃ B ₀	A ₃ B ₁

Picloram	CITOCININA BAP (mg l ⁻¹)	
	0.0	0.5
0.0	T ₀ B ₀	T ₀ B ₁
0.1	T ₁ B ₀	T ₁ B ₁
0.5	T ₂ B ₀	T ₂ B ₁
1.0	T ₃ B ₀	T ₃ B ₁

Todos los medios fueron ajustados a pH 5.8 con NaOH y HCl 1N, antes de ser esterilizados en la autoclave a 121°C durante 18 min. Un explante fue sembrado en cada tubo de cultivo. Cada tratamiento consistió de 10 unidades experimentales y por triplicado, posteriormente fueron sellados con parafilm. Se cuantificó el número de explantes que formaron callo en los distintos tratamientos durante las primeras semanas de cultivo (30 días). Una vez que ocurrió la inducción de callo en cada tratamiento se evaluaron las siguientes variables:

a) Porcentaje de inducción: el cual se determinó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inducción} = \frac{\text{No. de explantes con respuesta}}{\text{No. explantes totales}} \times 100$$

b) Característica del callo: friabilidad

c) Crecimiento rápido

6.5 Condiciones de incubación

Los cultivos fueron incubados, bajo un fotoperíodo de 16 h luz blanca fluorescente a una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y bajo una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Realizando subcultivos cada 30 días después de la evaluación de respuesta de explante.

6.6 Mantenimiento de las líneas celulares

Las porciones friables de los callos producidos en los diferentes tratamientos evaluados, fueron subcultivadas cada 15 días en los 3 primeros subcultivos y evitar la oxidación y el necrosamiento de los explantes, posteriormente se realizó la transferencia a medio fresco cada mes. Los tratamientos con altos porcentajes de inducción y con callo friable fueron seleccionados para su proliferación.

En los cultivos seleccionados fueron evaluados tres tipos de compuestos considerados como antioxidantes, en conjunto con la solución antioxidante antes mencionada (ácido ascórbico+ ácido cítrico): a) carbón activado 1g l^{-1} , b) L-cisteína 100mg l^{-1} y c) polivinilpirrolidona (PVP) 250mg l^{-1} .

6.7 Análisis estadístico

Los datos del porcentaje de explantes (segmentos de hoja), que produjeron callo fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA) usando el software estadístico NCSS versión 5 (Wireframe Graphics, Kaysville, UT, USA) (NCSS 2001). La comparación de medias fue realizada usando la prueba de Tukey al 5% de nivel de probabilidad para todos los tratamientos.

6.8 Estudio Fitoquímico

6.8.1 Obtención del extracto de callo

Se tomaron 3g de biomasa fresca (0.6180 en peso seco) de los cultivos que presentaron mayor producción de callo, se agregaron 50 ml de metanol, por cada 100 mg de muestra en peso seco. Las muestras se colocaron 30 minutos en reflujo a 65°C para la extracción, posteriormente fueron filtradas y evaporadas. Los extractos metanólicos fueron concentrados, bajo presión reducida en un Rotavapor (Buchi RE - 111; Buchi Laboratoriums-Tecnick AG, Flawil, Switzerland), a un volumen final de 1 ml y almacenados en frascos ámbar a 4±2°C hasta su análisis.

6.8.2. Obtención del extracto de hojas de *J. spicigera*

Hojas inmaduras de *J. spicigera* fueron cortadas y pesadas (3 g), secadas a 60°C en una estufa y posteriormente las muestras secas fueron desengrasadas usando hexano durante 24 horas a temperatura ambiente, filtradas y concentradas bajo presión reducida en un Rotavapor (Buchi RE -111; Buchi Laboratoriums-Tecnick AG, Flawil, Switzerland). Las muestras se colocaron 30 minutos en reflujo a 65°C para la extracción metanólica (conservando la proporción mencionada en el punto anterior), posteriormente fueron filtradas y concentradas a 1ml y almacenadas en frascos ámbar a 4±2°C hasta su análisis.

6.8.3. Cromatografía en capa fina

La detección de metabolitos secundarios (ácido cafeico, quercitina, quercitina 3-O-glucósido, kaempferol 3-O-glucósido, kaempferol 3-O-rutinósido, kaempferol y verbascósido) se efectuó en cromatoplasmas (Merck 5554) usando estándares (solución metanólica, 0.2 mg ml⁻¹; Sigma, Extrasynthese). Para kaempferol se usó una

mezcla de acetato de etilo:metanol:agua (100:15:5) como fase móvil, mientras que para los restantes se empleó una mezcla de diclorometano:metanol (8:2) como fase móvil.

6.8.4 Cromatografía en columna

Debido a que los concentrados presentaron precipitados después del tiempo de almacenaje, cuya re-solubilización no fue obtenida con MeOH, se procedió a efectuar cromatografía en columna para obtener fracciones solubles para su posterior análisis en HPLC. El concentrado del extracto metanólico de callos se fraccionó en una columna de vidrio de 15 cm de altura empacada con 2.5 g de silica gel (tamaño de partícula 60-200 mm), utilizando como eluyentes: hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol. Las fracciones fueron colectadas en volúmenes de 10 ml para posteriormente ser concentradas en un rotavapor, a 1 ml, a presión reducida, a una temperatura de 50-60 °C y fueron almacenados en frascos ámbar a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

6.8.5 Análisis de los extractos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

El equipo de HPLC consistió en un Cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies serie 1100 con bomba cuaternaria (G1311A; Alltech Co. USA), equipado con una columna Econosil C₁₈ (4.6 mm x 250 mm, 5 μ ; Alltech Co. USA) y un detector de arreglo de fotodiodos (DAD, G1315B; Alltech Co. USA). Cada muestra de extracto metanólico concentrado y las soluciones estándar fueron filtradas (0.45 μm , filtro de nylon) antes de ser inyectadas en el equipo de HPLC. Para procesar los datos y para la adquisición de datos del detector se usó el software cromatográfico CHEMSTATION (Rev. A.08.03; Agilent Technologies). Para identificar y cuantificar los metabolitos secundarios presentes en las muestras, se utilizaron los datos de los respectivos tiempos de retención y las áreas de los picos de las curvas de calibración. Cada muestra fue inyectada tres veces ($n=3$). Para evaluar la producción de (ácido cafeico, quercitina, quercitina 3-O-glucósido, kaempferol 3-O-glucósido, kaempferol 3-O-rutinósido, kaempferol y verbascósido etc). Soluciones stock de los estándares (0.2mg/ml de verbascósido (Extrasynthese, Francia) y caféico (Sigma Chemco.EUA) fueron preparados en metanol. Cada solución stock fue diluida para obtener concentraciones de 40, 80, 120 y 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$, las cuales fueron utilizadas para obtener una curva patrón (Anexo D).

7. RESULTADOS

7.1 Establecimiento de cultivos asépticos

7.1.1 Desinfección superficial

Se evaluaron cuatro tratamientos de desinfección para obtener cultivos asépticos de explantes foliares de *Justicia spicigera*, modificando la concentración y tiempo de exposición de la solución de hipoclorito de sodio. El método de desinfección superficial donde se obtuvo el 100% de cultivos asépticos fue para 70% de etanol durante 1 min, 1.2% hipoclorito de sodio (NaOCl) por 30 min suplementado con 5 gotas de Tween 20 l⁻¹ (Tabla 4). Por lo que bajo esta metodología fueron sembrados todos los explantes para los posteriores experimentos. La presencia de contaminantes externos afectan el desempeño de los explantes en condiciones *in vitro*, haciendo indispensable el uso de técnicas que permitan la desinfección superficial. El uso de la solución antioxidante (ácido cítrico y ácido ascórbico) durante la siembra fue indispensable para evitar la oxidación de los explantes.

Tabla 4 Desinfección de explantes foliares de *J. spicigera*.

Tratamiento		% Contaminación
1	0.6% hipoclorito de sodio/15 min	70%
2	0.6% hipoclorito de sodio/30 min	60%
3	1.2% hipoclorito de sodio/15 min	40%
4	1.2% hipoclorito de sodio/30 min	0%

7.2 Inducción de callo

Los explantes foliares de *J. spicigera* formaron callo como tiempo mínimo de 13 días de cultivo bajo aquellos tratamientos que fueron capaces de inducir dicha respuesta (Gráfico 1-3, Tabla 5-7), iniciando por la elongación del explante y proliferación de células en el punto de corte y en las nervaduras centrales (Fig. 9). Los callos formados cubrieron la totalidad del segmento foliar a los 28 días de cultivo, donde se observó callos con distintas morfologías (Fig.10, Tabla 5-7).

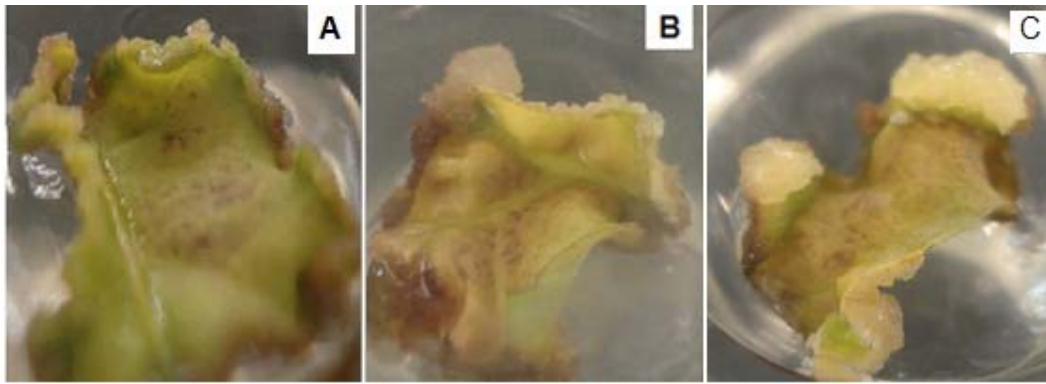


Fig. 9 Inducción de callo en explantes foliares de *J. spicigera*. **A** Formación de callo en las orillas y nervaduras centrales del explante a los 19 días en el medio M1: 0.5 mg l^{-1} 2,4-D + 0.5 mg l^{-1} KIN, **B** Inducción de callo a los 13 días en M2: con 0.1 mg l^{-1} ANA + 0.5 mg l^{-1} BAP, **C** Inducción de callo a los 19 días en el medio M2: con 0.1 mg l^{-1} ANA + 0.5 mg l^{-1} BAP.



Fig. 10 Distintas morfologías del callo producido en explantes foliares de *J. spicigera* después de 2 subcultivos. **A** Callo transparente/amarillo con porciones friables del M2: con 0.1 mg l^{-1} ANA + 0.5 mg l^{-1} BAP, **B** Explante totalmente cubierto de callo friable transparente a los 28 días de incubación en M2: con 0.1 mg l^{-1} ANA + 0.5 mg l^{-1} BAP.

7.2.1 Efecto de la auxina 2,4-D en la inducción de callo

Al realizar el análisis del efecto de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), los resultados mostraron que la formación de callo dependió de la concentración y tipo de combinación de auxina/citocinina. Se observó que la combinación de auxina 2,4-D con la citocinina BAP promovió altos porcentajes de inducción de callo a concentraciones altas de la auxina pero la morfología de callo que se observó, en su mayoría de los callos inducidos, fueron compactos y duros, excepciones en los tratamientos de $1.5\text{-}2.0 \text{ mg l}^{-1}$ 2,4-D en combinación $1.5\text{-}2.0 \text{ mg l}^{-1}$ BAP (D3B3, D3B4, D4B3 y D4B4) que

aunque presentaron un porcentaje alto de inducción de callo (de 83-93%), produjeron porciones pequeñas de callo friable (Gráfico 1). La estructura de callo presento una coloración blanca y verde/Amarillo compacta (Tabla 5), que al ser transferidos a medio fresco nuevo, al cabo de 4 ciclos de subcultivos el crecimiento del callo fue lento. Resultados contrarios fueron registrados por González-Paneque *et al.*, 2003 en cultivos de boniato a partir de raíces tuberosas donde se obtuvieron limbos foliares, el mayor porcentaje de inducción en formación de callo registrado fue a bajas concentraciones de auxina y citocinina 0.1 mg l⁻¹2,4-D + 0.2 mg l⁻¹ BAP, con características de callo con apariencia amarillenta y disgregable.

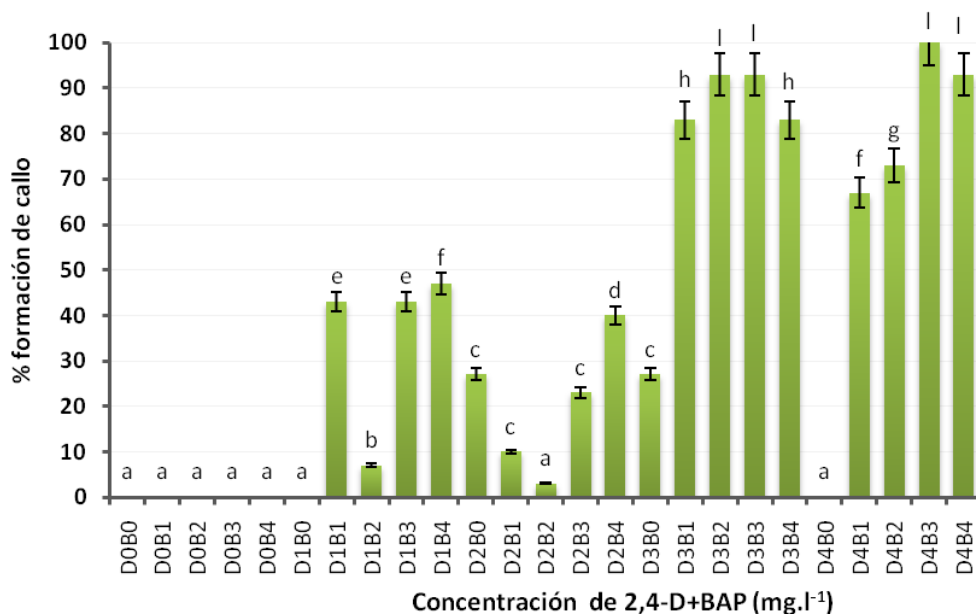


Gráfico 1. Efecto de diferentes concentraciones y combinaciones de auxina 2,4-D y citocinina BAP en la inducción de callo a partir de explantes foliares de *J. spicigera*. Promedio de 3 experimentos±SD. Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey (P≤ 0,05)

Tabla 5. Características morfológicas de callo de explantes foliares de *J.spicigera* bajo los reguladores 2,4-D+BAP

Clave de tratamiento	RCV (mg l ⁻¹)		CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DEL CALLO	
	Auxina	Citocinina	Tipo de callo	Coloración
	2,4-D	BAP		
DOBO	0.0	0.0	AC	--
DOB1	0.0	0.5	AC	--
DOB2	0.0	1.0	CC	--
DOB3	0.0	1.5	AC	--
DOB4	0.0	2.0	AC	--
D1BO	0.5	0.0	AC	--
D1B1	0.5	0.5	CC	B/V
D1B2	0.5	1.0	CC	B
D1B3	0.5	1.5	CF++	A
D1B4	0.5	2.0	CC+	B
D2BO	1.0	0.0	CF	A
D2B1	1.0	0.5	CC+	B
D2B2	1.0	1.0	CC	B
D2B3	1.0	1.5	CC++	B
D2B4	1.0	2.0	CC+	B/V
D3BO	1.5	0.0	CC	A/B
D3B1	1.5	0.5	CC++++	V/B
D3B2	1.5	1.0	CC++++	V/B
D3B3	1.5	1.5	CF+	A
D3B4	1.5	2.0	CF++	A
D4BO	2.0	0.0	AC	--
D4B1	2.0	0.5	CF+	A
D4B2	2.0	1.0	CC	A
D4B3	2.0	1.5	CC+++	A
D4B4	2.0	2.0	CC+	V/A

AC=ausencia de callo CC=callo compacto CF=callo friable A=amarillo V=verde T= callo transparente B= blanco
BE=blanco esponjoso C=café + Producción de callo

Por otro lado, cuando se analizó el efecto de 2,4-D en combinación con la auxina KIN se observan altos porcentajes en la formación de callo cuando la auxina se combinó con concentraciones bajas de citocinina, y particularmente la combinación 1.0 mg l^{-1} 2,4-D + 0.5 g l^{-1} de KIN (D2K1) mostró mayor producción de callo friable (77% de inducción) en el explante en comparación con las demás combinaciones evaluadas (Gráfico 2). En dichos tratamientos se observó una respuesta morfológica de callo adecuada para con fines de establecer cultivos de células en suspensión (Tabla 6) ya que la disgregación celular o friabilidad permite obtener un sistema más homogéneo y por tanto más sincronizado para con su crecimiento y producción de metabolitos secundarios comparado con un cultivo en suspensión del tipo agregado o compacto. No obstante, al comparar los porcentajes de inducción para callo friable los tratamientos consistiendo de la combinación 2,4-D+KIN con respecto a los de la combinación 2,4-D+BAP fueron menores. Además, los callos friables derivados de los tratamientos bajo la combinación 2,4-D+KIN al ser transferidos a medio fresco nuevo presentaron una mayor velocidad de crecimiento que los callos provenientes de los tratamientos 2,4-D+BAP.

Resultados similares a los obtenidos en cultivos de hoja jóvenes de *Aloe vera* donde altas concentraciones de auxina y bajas de citocinina (2 mg l^{-1} 2,4-D + 1 mg l^{-1} KIN) se obtuvieron menores porcentajes de inducción (68%) comparados con los registrados para las combinaciones de 2,4-D+ BAP donde se obtuvo la mayor inducción (80-95%) en las concentraciones de 1 mg l^{-1} 2,4-D + 2.0 mg l^{-1} BAP (Matos-Acurero, 2007). Contrario a lo que se observó en cultivos de hoja de *Artemisia scoparia* donde altas concentraciones de 2,4-D (1.0 , 2.0 mg l^{-1}) en combinación con bajas concentraciones de citocinina BAP (0.5 , 1.0 mg l^{-1}) induce porcentajes de inducción bajos (10-20%) con una respuesta callogénica pobre y un callo compacto (Aslam; 2006).

La acción de la auxina 2,4-D con las dos citocininas muestra una mejor respuesta en inducción de callo en la mayoría de las concentraciones utilizadas al ser combinada con KIN, incluso el efecto de la auxina sola es de 27% aumentando significativamente al ser combinada con la citocinina (Gráfico 1 y 2), así mismo el efecto de esta auxina se ha demostrado que induce la expresión de varios genes relacionados con el estrés en células de alfalfa (*Medicago sativa*) (Györgyey *et al.*, 1991; Davletova *et al.*, 2001).

En general en esta evaluación la inducción estuvo asociado con la presencia de 2,4-D ya que se reporta como una auxina potente en la desdiferenciación de tejidos (George, 1993; Murashige, 1974); sin embargo el efecto en la morfología del callo y crecimiento no fue favorable para generar suficiente biomasa, esto se explica pues los tejidos de distintas especies vegetales presentan diferencias en su capacidad de respuesta por la edad, etapa fenológica, tipo de explante, así como la cantidad de hormona endógenas y proteínas receptoras (Fehér *et al.*,2003).

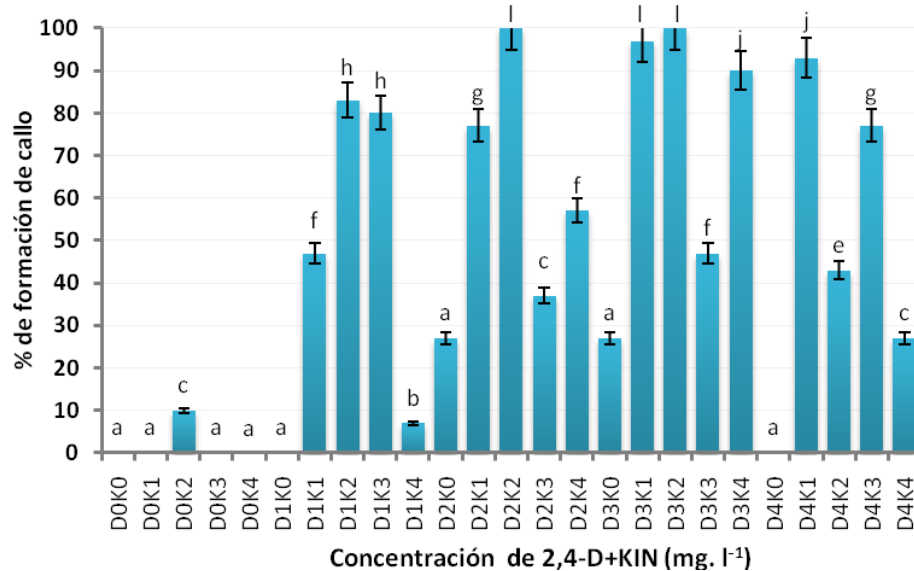


Grafico 2. Efecto de diferentes concentraciones y combinaciones de auxina:2,4-D y la citocinina KIN en la inducción de callo a partir de explantes foliares de *J. spicigera*. Promedio de 3 experimentos \pm SD. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabla 6. Características morfológicas de callo de explantes foliares de *J. spicigera* bajo los reguladores 2,4-D+KIN

Clave de tratamiento	RCV (mg l^{-1})		CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS	
	Auxina	Citocinina	Tipo de callo	Coloración
	2,4-D	KIN		
DOKO	0.0	0.0	AC	--
DOK1	0.0	0.5	AC	--
DOK2	0.0	1.0	CC	Amarillo
DOK3	0.0	1.5	AC	--
DOK4	0.0	2.0	AC	--
D1KO	0.5	0.0	AC	--
D1K1	0.5	0.5	CF+	V/B/A/T
D1K2	0.5	1.0	CC	V/B
D1K3	0.5	1.5	CC++++	V/B/A
D1K4	0.5	2.0	CC++	V/B
D2KO	1.0	0.0	AC	--
D2K1	1.0	0.5	CF+++	V/B
D2K2	1.0	1.0	CC+++	V/B
D2K3	1.0	1.5	CF++	V/A
D2K4	1.0	2.0	CC++++	B
D3KO	1.5	0.0	AC	--
D3K1	1.5	0.5	CC	V/B/A
D3K2	1.5	1.0	CC+++	V/B
D3K3	1.5	1.5	CC	B
D3K4	1.5	2.0	CC	A
D4KO	2.0	0.0	AC	---
D4K1	2.0	0.5	CC	A
D4K2	2.0	1.0	CC	A
D4K3	2.0	1.5	CC	B
D4K4	2.0	2.0	CC	BI

AC=ausencia de callo CC=callo compacto CF=callo friable A=amarillo V=verde T= callo transparente B= blanco
BE=blanco esponjoso C=café + Producción de callo

7.2.2 Efecto de las auxinas ANA, 2,4,5-T, y PIC en la inducción de callo.

El porcentaje de inducción bajo las combinaciones de las tres auxinas ANA, 2,4,5-T y PIC + BAP fue afectado al modificar la composición del medio de cultivo (M1: medio MS 50% y M2: MS 50%+hidrolizado de caseína+vitaminas) (Gráfico 3). Cuando los tratamientos fueron derivados de la composición del medio M1, la combinación de ANA y BAP mostró los mejores resultados en la inducción de callo y friabilidad en los explantes foliares de *J. spicigera*, comparados con los otros arreglos hormonales evaluados (2,4,5-T ó PIC + BAP) (Gráfico 3). El significativamente mayor porcentaje de inducción de callo se observó en los explantes tratados con 0.1mg l⁻¹ de ANA combinado con 0.5 mg l⁻¹ BAP (A1B1; 86%), presentando un callo friable, sin embargo la producción es baja y el crecimiento lento en comparación con la concentración de 1.0 mg l⁻¹ de ANA + con 0.5 mg l⁻¹ BAP (A3B1) donde el porcentaje es menor (53%), pero las características morfológicas (friabilidad) y el crecimiento del callo son mayores. En general, los explantes que fueron sembrados en medio basal 50% presentaron una buena formación de callo con alto grado de crecimiento y de respuesta en los tratamientos conteniendo ANA+BAP presentando una proliferación continua del callo aun después de ser subcultivado.

Resultados opuestos fueron observados para cultivos de explantes de hoja derivados de plántulas germinadas *in vitro* de *Saussurea obvallata* (Asteraceae), donde se registro la mayor inducción (100%) en la combinación hormonal de 2.5 µM (~0.56 mg l⁻¹) de BAP + 10 µM (~1.86 mg l⁻¹) de ANA, mientras que en la misma combinación donde se registro la mayor inducción en *J. spicigera* (A2B1) (0.5 + 0.5 mg l⁻¹, respectivamente), en *S. obvallata* se registro solo un 50% de inducción (Dhar&Joshi, 2005). Haciendo de manifiesto la importancia de la participación de la auxina en conjunto con la citocinina para alcanzar altos valores de inducción.

Al comparar estos datos con lo reportado en *Artemisia absinthium* cuyos brotes obtenidos por micropropagación (2 años) fueron usados como explantes. Se evaluaron diferentes concentraciones de BAP (0.2, 0.5, 1.0 mg l⁻¹) con ANA (0.1, 0.5 mg l⁻¹), todas las concentraciones en esta combinación presentaron altos porcentajes de inducción (100%) con características morfológicas de callo friable (Nin *et al.*, 1996). Haciendo hincapié en la importancia de realizar un barrido hormonal con las diferentes auxinas y citocininas que permitan determinar las

mejores características morfológicas del callo y porcentajes de inducción para posteriores estudios.

Por otro lado, cuando los tratamientos ANA, 2,4,5-T y PIC + BAP fueron derivados del medio de cultivo M2 se obtuvo que la combinación hormonal de ANA y BAP que produjo el mayor porcentaje de inducción con respecto a M1 (0.5/0.5 mg l⁻¹), produjo menores porcentajes de inducción para M2, sin embargo el callo mostro mayor friabilidad y crecimiento. Resultado opuesto al efecto que presentaron las combinaciones en las que las auxinas PIC y 2,4,5-T estuvieron involucradas, donde altos porcentajes de inducción de callo fueron registrados pero con características desfavorables del callo como la necrosis y la producción de callo compacto, que no son adecuadas para posteriormente establecer el cultivo en suspensión (Tabla 7).

La poca influencia de estas últimas combinaciones de reguladores puede deberse a que los niveles usados de estos reguladores fueron mayores o menores que las concentraciones requeridas para establecer el nivel hormonal endógeno adecuado que influya positivamente en la capacidad de desdiferenciación. Lo anterior obedece a que la respuesta del explante está en función de los niveles o concentraciones de RCV de este durante el cultivo *in vitro* (Fehér *et al*; 2003), además el cambio de medio de cultivo afectó los porcentajes de inducción al combinar las tres auxinas, lo que nos manifiesta que la respuesta *in vitro* depende también de la composición del medio (Margara, 1988; Pierik, 1990). Por otro lado, Donoso (1998) hace hincapié en que la condición fisiológica de la planta donante tiene una marcada influencia sobre la respuesta *in vitro*, probablemente como resultado de su interacción con la disponibilidad de nutrientes, niveles endógenos de los reguladores de crecimiento y los principales aminoácidos libres, cuyas proporciones y cantidades varían en las distintas épocas del año.

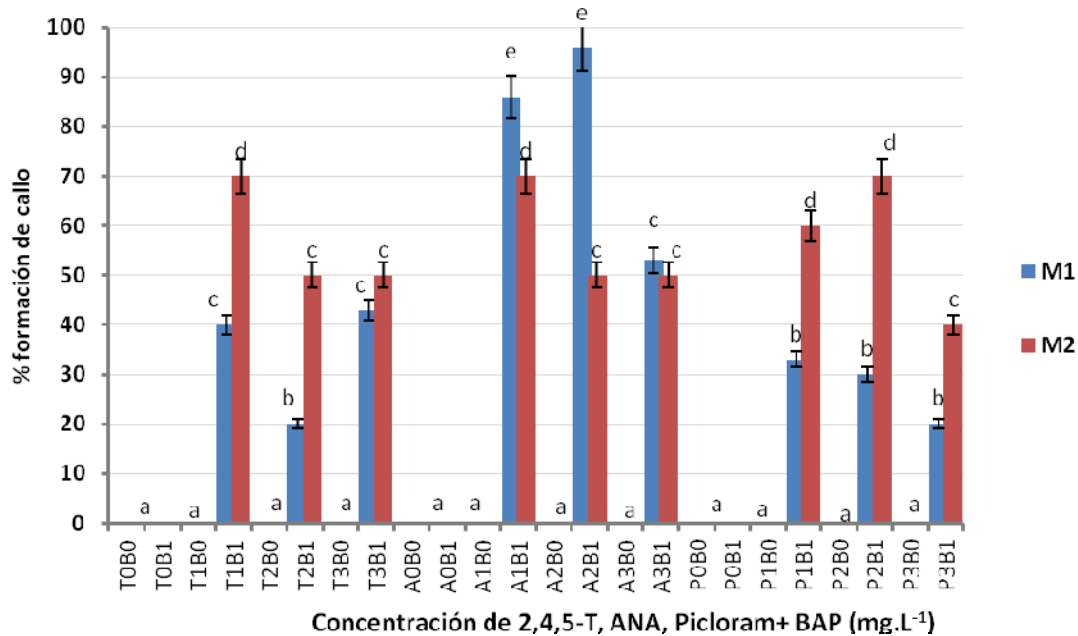


Grafico 3 Efecto de diferentes con las concentraciones de auxina:2,4-D, ANA, PIC, y la citocinina BAP en la inducción de callo a partir de explantes foliares de *J. spicigera* en medio de cultivo M1(MS al 50%) y M2(MS al 50%+hidrolizado de caseína+vitaminas). Promedio de 3 experimentos±SD.Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo a Tukey ($P \leq 0,05$)

El tiempo de inducción de callo fue afectado al modificar el medio (M2) únicamente en los tratamientos con ANA y BAP, siendo menor tiempo en que comienza la formación del callo en los tratamientos evaluados con el medio modificado (8 días) comparados con los tratamientos con las mismas concentraciones de el medio original (M1) (13 días). No obstante, M2 no tuvo un efecto favorable a los 30 días de cultivo ya que se observo un necrosamiento de los explantes.

Los cultivos de callo provenientes del tratamiento conteniendo ANA 1.0 mg l^{-1} + 0.5 mg l^{-1} BAP (A3B1) y formulación M1 fueron seleccionados por presentar altos porcentajes de inducción, crecimiento acelerado y presentar alta friabilidad, además de los callos inducidos con 1.0 mg l^{-1} de 2,4-D + 0.5 mg l^{-1} KIN (D2K1), para su mantenimiento, proliferación y posterior análisis.

Tabla 7. Características morfológicas de callo de explantes foliares de *J. spicigera* bajo la influencia de las auxinas: 2,4,5-T, ANA, BAP y la citocinina BAP en los medios M1 y M2.

Medio de cultivo			CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS			
			M1		M2	
Clave de tratamiento	RCV (mg l ⁻¹)		Tipo de callo	Coloración	Tipo de callo	Coloración
	Auxina	Citocinina				
	2,4,5-T	BAP				
T0B0	0.0	0.0	AC	---	AC	---
T0B1	0.0	0.5	AC	---	AC	---
T1B0	0.1	0.0	AC	---	AC	---
T1B1	0.1	0.5	CC ⁺⁺	C	CC ⁺⁺	V/C
T2B0	0.0	0.0	AC	---	AC	---
T2B1	0.5	0.5	CC ⁺	V/A	CC ⁺	V/C
T3B0	1.0	0.0	AC	---	AC	---
T3B1	1.0	0.5	CC ⁺	V/T	CC ⁺	V/C
	ANA	BAP				
A0B0	0.0	0.0	AC	---	AC	---
A0A1	0.0	0.5	AC	---	AC	---
A1B0	0.1	0.0	AC	---	AC	---
A1B1	0.1	0.5	CF ⁺	A/C/T	CF ⁺	A/C/T
A2B0	0.5	0.0	AC	---	AC	---
A2B1	0.5	0.5	CF ⁺⁺	V/C/T/BE	CF ⁺⁺	V/C/T/BE
A3B0	1.0	0.0	AC	---	AC	---
A3B1	1.0	0.5	CF ⁺⁺⁺	C/T/BE	CF ⁺⁺⁺	C/T/BE
	Picloram	BAP				
P0B0	0.0	0.0	AC	--	AC	--
P0B1	0.0	0.5	AC	---	AC	---
P1B0	0.1	0.0	AC	---	AC	---
P1B1	0.1	0.5	CF ⁺⁺⁺	C	CF ⁺⁺⁺	V/A, C
P2B0	0.5	0.0	AC	---	AC	---
P2B1	0.5	0.5	CC ⁺	V	CC ⁺	C
P3B0	1,0	0.0	AC	---	AC	---
P3B1	1.0	0.5	CC ⁺	V/T	CC ⁺	T y café

AC=ausencia de callo CC=callo compacto CF=callo friable A=amarillo V=verde T= callo transparente B= blanco BE=blanco esponjoso C=café + Producción de callo

7.3 Mantenimiento de las líneas celulares

Los cultivos de callo derivados de los tratamientos 1.0 mg l^{-1} de 2,4-D + 0.5 mg l^{-1} KIN (D2K1), y ANA 1.0 mg l^{-1} + 0.5 mg l^{-1} BAP (A3B1) con formulación M1 que fueron seleccionados por presentar altos porcentajes de inducción, las mejores características morfológicas como la friabilidad, una velocidad de crecimiento rápida mantuvieron dichas características después de 7 subcultivos. No obstante, éstos presentaron problemas de oxidación y para mantener estas líneas celulares seleccionadas se evaluaron tres formulaciones de ácidos cítrico y ascórbico adicionadas de otros compuestos empleados como antioxidantes (Tabla 8), esto con la finalidad evitar la oxidación y posterior necrosamiento de los callos. Los resultados obtenidos mostraron que la L-cisteína presento el menor porcentaje de oxidación en ambos tipos de callo en comparación con el PVP y el carbón activado, además de evitar el necrosamiento (Fig.11) se observo un rápido desarrollo del callo, esto puede ser debido al doble efecto que tiene la cisteína ya que además de servir como antioxidante ofrece nitrógeno orgánico más fácilmente disponible y suple rápido los requerimientos (George&Sherrington, 1984).

Tabla 8. Porcentaje de oxidación de cultivos de callo seleccionados para el establecimiento de líneas celulares de *J. spicigera*.

Antioxidantes en el medio de cultivo	% de explantes oxidados	
	ANA 1.0 mg l^{-1} + 0.5 mg l^{-1} KIN	2,4-D 0.1 mg l^{-1} + 0.5 mg l^{-1} KIN
Ácido ascórbico + ácido cítrico (SA)	72.0 e	65.0 d
SA+ L-cisteína (100 mg l^{-1})	10.0 ± 14.1^b	7.0 ± 13.1^a
SA +Carbón activado (1 g l^{-1})	30.0 ± 14.1^c	10.0 ± 13.1^b
SA + PVP (250 mg l^{-1})	70.0 ± 14.1^e	60.0 ± 13.1^d

Datos provenientes de la media \pm SD lotes de de 5 cultivos por duplicado

Al finalizar los 6 meses de mantenimiento de los cultivos de callo, únicamente el tratamiento conteniendo ANA 1.0 mg l^{-1} + 0.5 mg l^{-1} BAP produjo suficiente biomasa para los posteriores análisis fitoquímicos, por lo cual el contenido de los metabolitos secundarios solo fue determinado cuantitativa y cualitativamente en estos callos.

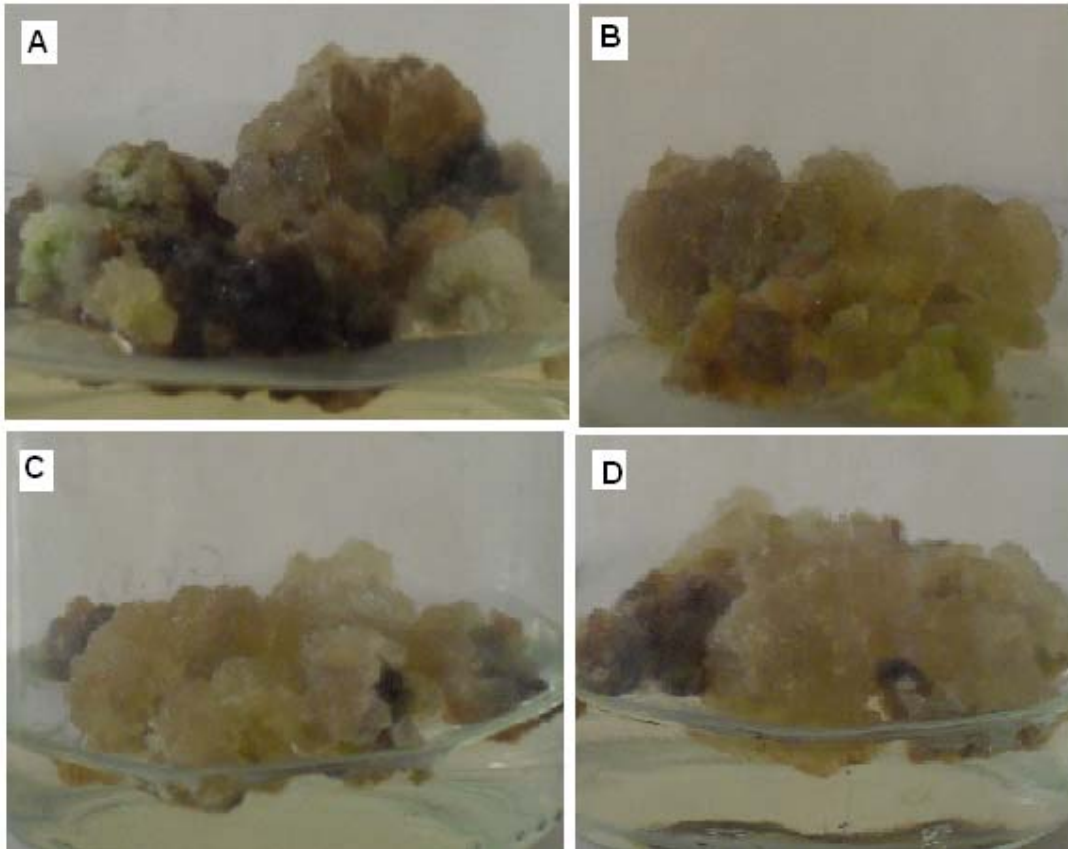


Fig.11 Cultivo de callos a los 90 días de *J. spicigera*. **A** callo producido M1 (SA) conteniendo 0.1 mg l^{-1} 2,4-D + 0.5 mg l^{-1} KIN, **B** callo producido en M1 1.0 mg l^{-1} 2,4-D + 0.5 mg l^{-1} KIN (SA+L-cisteina), **C** callo producido (SA) en M2 1.0 mg l^{-1} ANA + 0.5 mg l^{-1} BAP, **D** callo producido (SA+L-cisteina) en M2 conteniendo 1.0 mg l^{-1} ANA + 0.5 mg l^{-1} BAP.

7.4 Condiciones del HPLC

El análisis por TLC evidenció la presencia de la mayoría de los metabolitos secundarios (Quercitina, quercitina -3-O-glucósilada, cafeico, verbascósido). Posteriormente se procedió a la estandarización de las condiciones de trabajo para el HPLC para el análisis cuantitativo por HPLC haciendo uso de los estándares comerciales (sigma; Extrasynthese) como referencias para la identificación de los metabolitos secundarios de interés.

Las condiciones del HPLC que permitieron la separación de los estándares consistieron de la fase móvil: solución al 0.3% (v/v) de ácido fosfórico (A) y acetonitrilo (B), un volumen de inyección de 20 μ l, un flujo de 1 ml min^{-1} . El sistema fue corrido con un programa en gradiente para la fase móvil como sigue: de 85% a 75% de A durante 23 min, y finalmente de 75% a 60% de A durante 17 min. Las longitudes de onda para DAD fueron 350nm (Kaempferol 3-O-rutinósido y Kaempferol 3-O-glucósido), 330nm (Ácido cafeíco y verbascosido), 254nm (Quercitina y Quercitina 3-O-glucósido). Bajo dichas condiciones de operación se obtuvieron distintos tiempos de retención (Tr) entre los estándares (Tabla 9, Anexo E).

Tabla 9. Tiempo de retención de los estándares.

	Estándar	Tr
a	Ácido cafeíco	7.45
b	Verbascosido	11.38
c	Quercitina 3-O glucósido	14.51
d	kaempferol 3-O rutinósido	17.18
e	kaempferol 3-O-glucósido	18.21
f	Quercitina	27.21
g	Kaempferol	32.22

El análisis por HPLC corrobora los resultados determinados por TLC. Además, el análisis por HPLC permitió la detección de la mayoría de los metabolitos secundarios en los tres sistemas analizados: extracto metanólico de callo, fracción de acetato de etilo y extracto de hoja (Tabla 10). Se observó que en la fracción de acetato de etilo el ácido cafeíco fue el metabolito mayoritariamente presente (12.10 mg g^{-1}), seguido de la quercitina (10.03 mg l^{-1}), la Quercitina 3-O-glucósido (7.54 mg l^{-1}), mientras que kaempferol 3-O-glucósido, Kaempferol 3-O-rutinósido y verbascósido fueron detectados en concentraciones bajas ($4.68, 1.74, 0.65 \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente) (Tabla 10, Fig.12). Mientras que en las muestras metanólicas de callo, los compuestos que presentaron una concentración mayoritaria fue la Quercitina 3-O-glucósido y Kaempferol 3-O-rutinósido ($10.62 \text{ mg l}^{-1}, 10.60 \text{ mg l}^{-1}$, respectivamente) (Tabla 10).

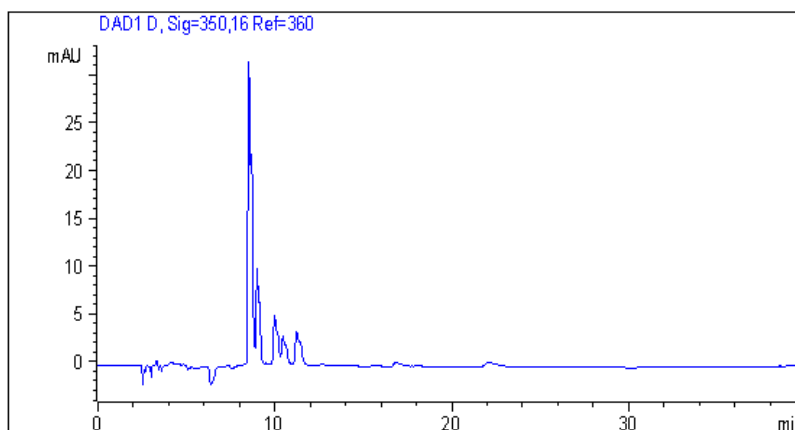


Fig. 12 Cromatograma de muestras de cultivo de callo de *J. spicigera* proveniente de M2 con ANA 1.0 mg l⁻¹ + 0.5 mg l⁻¹ BAP.

Tabla 10. Contenido de metabolitos secundarios en extractos metanólicos de cultivos *in vitro* y hojas de *Justicia spicigera*.

Metabolitos secundarios	concentración (mg g ⁻¹) peso seco							
	Cultivo <i>in vitro</i>			Hojas				<i>in vitro</i>
	Callo	Fracción acetato de etilo	Hoja	* <i>Ginkgo biloba</i>	** <i>B. cordata</i>	*** <i>Allium</i>	*** <i>Brassica oleraceae</i>	*** <i>Pisum sativum</i>
Ac. Cafeico	-----	12.10±3.67	-----	0.0742	1.67	----	----	----
Verbascósido	1.10±0.51	0.65±0.15	-----	-----	10.10	----	----	----
Quercitina	6.1313±1.07	10.03±3.04	0.6401±0.98	-----	-----	0.004	0.002	0.5
Quercitina 3-O-glucósido	10.626±0.21	7.54±2.54	0.9306±0.2	^a 0.224	----	----	----	----
Kaempferol	-----	-----	0.3801±0.34	-----	----	0.006	0.1	----
Kaempferol 3-O-glucósido	4.6841±1.10	4.6841±1.10	0.5848±1.0	^b 0.756	----	----	----	----
Kaempferol 3-O-rutinósido	10.60±0.54	1.74±0.52	0.1769±0.50	----	----	----	----	----

Datos correspondientes a la media de tres replicas

*Zheng & Wang, 2001 ^a datos expresados como miligramos equivalentes de quercitina-3-O-(1 -2)-ramnosil-(1 6)-glucosido; ^b miligramos equivalentes de Kaempferol-3-O-(1 -2)-ramnosil-(1 6)-glucosido

**Estrada; 2009

***Phytochemical and Ethnobotanical databases

----- Datos no reportados

En general como se observa en la tabla 10 los cultivos *in vitro* de callo de *J. spicigera* produjeron concentraciones altas de metabolitos secundarios en comparación con las hojas y lo reportado por otras especies de amplia capacidad antioxidante como *Ginkgo biloba*, *Allium*, *Brassica oleraceae*, *Pisum sativum*. Por consiguiente los cultivos *in vitro* de tejidos representan una fuente potencial para la producción de metabolitos evitando la depredación de plantas silvestres.

CONCLUSIONES

- Se estableció el cultivo aséptico de hojas inmaduras de *J. spicigera* con las siguientes condiciones: 70% de alcohol durante 1min; hipoclorito de sodio al 1.2 % por 30 minutos.
- Se obtuvo una respuesta favorable al combinar auxina/citocina: inducción, crecimiento y desarrollo del callo.
- La L-cisteína es el suplemento que tuvo el significativamente el mayor efecto para evitar la oxidación de los cultivos de callo.
- El tratamiento conteniendo 0.5 mg/L BAP y 1.0 mg/L ANA fue seleccionado al presentar un alto porcentaje de inducción de callo (86%) y una proliferación celular mayor en explantes foliares de *J. spicigera*.
- Los cultivos de callo establecidos de *J. spicigera* (Muitle) retuvieron la capacidad de síntesis de metabolitos secundarios de interés farmacológico (kaempferol 3-O-rutinósido y Quercitina 3-O-glucósido, bajo el efecto de 1mg l⁻¹ ANA +0.5 mg l⁻¹ BAP, incluso incrementado su producción 10 veces mas que lo producido en hojas silvestres (callo 10.60 mg g⁻¹ vs. Hoja 0.17 mg g⁻¹ kaempferol 3-O-rutinósido) y (callo 10.62 mg g⁻¹ vs. 0.93 mg g⁻¹ Quercitina 3-O-glucósido).

PERSPECTIVAS

- ❖ Establecimiento del cultivo en suspensión con los cultivos del tratamiento seleccionado, caracterizando la línea celular en términos de la producción de los metabolitos secundarios.
- ❖ Evaluar elicitores (bióticos y abióticos) y componentes del medio (C,N,P,S) para incrementar la producción de los metabolitos secundarios.

BIBLIOGRAFÍA

- Akerele O, Heywood V, Syng H (1992). Book review: The conservation of Medicinal plants. *Journal of Applied Ecology* 29:540-547.
- Akerele O (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. Foro Mundial de la Salud, 14: 390-395.
- Aliyu O (2005). Application of tissue cultura to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding. An appraisal. *African Journal of Biotechnology* 4: 1485-1489.
- Amin M, Jaiswal V (1988) Micropropagation as anaid to rapid cloning of a guava cultivar. *Scintia Horticulturae* 36: 89-95.
- Arias M, Angarita MJ, Aguirre AM, Restrepo JM, Montoya C (2009). Estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios en cultivo de células vegetales. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín* 62(1):4881-4895.
- Aslam N, Zia M, Chaudhary-Fayyaz M (2006). Callogenesis and direct organogénesis of *Artemisia scoparia*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9(9): 1783-1786.
- Azofeita A (2009) Revisión bibliográfica. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20(1):153-175.
- Azpeitia MG (1996). Estudio químico de *Justicia spicigera* Schletcht [Tesis Licenciatura]. México. UNAM 53pp.
- Barba AA, Luna RBS (2001) Micropropagación de plantas. Trillas. México, D.F 107pp.
- Bayley JM, King J, Gamborg Y (1972). The ability of amino compounds and conditioned medium compounds and conditioned medium to alleviate the reduced nitrogen requirement of soybean cells grown in suspension cultures. En: Staba EJ (1982). *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. Editorial Press, Inc Pág. 30.
- Becker M, Staab D, von Bergmann K (1993). Treat-ment of several familial hipercolesterolemias in lingchildhood with sitosterol and sitostanol. *Journal of Pediatrics* 122: 292-296.

- Berges RR, Windeler J, Trampisch HJ (1995) Senge, and the β -sitosterol study group Randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of β -sitosterol in patients with benign prostatic hyperplasia. *The Lancet*. 345:1529-1532.
- Berlin E.A., Berlin B, Lozoya X, Meckes M, Tortoriello J, Villareal M.L. (1996). The scientific basic of gastro intestinal herbl medicine among the highland Maya of Chiaas, Mexico. En: Naked Science. L Nalder (eds). Editorial Routledge, New York Pag: 43-68.
- Bhojwani S.S., Razdan M.K., (1983) Plant tissue culture: theory and practice. Elseiver Science Publishers, New York, U.S.A. 776pp.
- Bidwell, RGS (1979). Fisiología vegetal. AGT Editor, S.A. México, D.F. 409-438 pp.
- Boluda CJ, Duque B, Gulyas G, Aragon Z, Diez F (2005). Lignanos: actividad farmacológica. *Revista Fitoterapia* 5(2): 135-147.
- Bonja J, Durzan D, (1982). Tissue culture in forestry. Nijhoff Junk Publiseshers. London England 420 pp.
- Bouic PJ, Etsebeth S, Liebenberg RW, Albrecht CF, Pegel K, Van Jaarsveld PP. (1996) beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. *International Journal and Immunopharmacology* 18(12):693-700.
- Bouic PJ, Clark A, Lamprecht J, Freestone M, Pool EJ, Liebenberg RW, Kotze D, van Jaarsveld PP. (1999). The effects of β -sitosterol (BSS) and β -sitosterol glucoside (BSSG) misture on selected immune parameters of marathon runners: inhibition of post marathon immune suppression and inflammation. *International Journal Sports Medicine* 20(4):258-62.
- Bouic PJ (2001). The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a reviuw of the past 10 years old. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 4: 471-5

- Buchanan BB, Grissem W, Jones RL (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plants Physiologists, Maryland USA.*
- Buitelaar RM, Tramper J (1992). Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review. *Journal Biotechnology*. 23:111–43.
- Buitrón X. 2007 Las plantas medicinales y aromáticas en América del sur: balance entre conservación, desarrollo y rescate de conocimientos: Boletín especies amenazadas No.12. <http://www.sur.iucn.org/listaroja/boletin/boletin12/index.htm>
- Brincat M, Gibson D, Shuler M (2002). Alteration in taxol production in plant cell culture via manipulation of the phenylalanine ammonia lyase pathway. *Biotechnology Progress* 18: 1149-1156.
- Bryant JP, Reichardt PB and Clausen TP (1992). Chemically mediated interactions between woody plants and browsing mammals. *The Journal of Range Management* 45: 18-24.
- Bye R (1995). Ethnobotany of the Mexican tropical dry forests. En: Bullocks S.T., Mooney H.A & Medina E (eds). *Seasonally tropical dry forest* Cambridge University Press. Cambridge. Pág 423-438.
- Bye R, Linares E, Estrada E (1995). Biological diversity of medicinal plants in Mexico: En: Arnason JT, Mata R, Romeo JT (eds). *Phytochemistry of Medicinal Plants. (Recent Advances in Phytochemistry, vol.29)*. Plenum Press, New York. Pág: 65-82.
- Cáceres Cortés, Benchengroun M, Guerin B (2000). La citotoxicidad in vitro de *Justicia spigera* (“muñile”) en líneas celulares hematopoyéticas y no hematopoyéticas E3 dependiente del ciclo celular. *Gaceta Médica México* 136 (2):175-178.
- Chariandy CM, Seafort CE, Phelps RH, Pollard GV, Khambay BP (1999). Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *Journal of Ethnopharmacology* 64: 265-270.
- Calva G, Esparza F, Pérez J, Martínez V.M., Silva S, López C (2002). Plantas como biorreactores para la producción de biomoléculas y remoción de xenobióticos. XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería. Avances y Perspectivas vol. 21.

- Cakmak I, Schjoerring JK, (2008). Research. Special topics potassium and magnesium. *Physiologia Plantarum* 133:623.
- Callejo J (1996). La historia oculta del mundo vegetal. Lo otro. Madrid, España, p. 89.
- Caniago S, Siebert S (1998). Medicinal plants ecology, knowledge and conservation in Kalimantan, Indonesia. *Society for Economic Botany* 52: 229-250.
- Cannon R, Dewhurst R.E, Crane M, Callghan A (2003). Haem peroxidase activity in *Daphnia magna*: a biomarker for sub-lethal toxicity assessments of kerosene-contaminated ground-water. *Ecotoxicology*, 12: 387-395.
- Cevallos-Ferriz; Sergio R S (1998). Las plantas con flores. México. Ed. Ciencias .Pag:52-57.
- Davletova ST, Meszaros P, Miskolezi A, Oberschall K, Torok D, Dudits, Deak M (2001). Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. *Journal of Experimental Botany* 52: 215-221.
- Daniel TF (2002). New and reconsideren Mexican Acanthaceae IX. *Justicia*. Proceedings of the California Academy of sciences 53: 37-49.
- Davies JP (1995). Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. (2da edición) Editorial Kluwer Academic Publishers pp
- Dhar U, Joshi M (2005). Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): Effect of explants type, age and plant growth regulators. *Plant Cell Reports* 24: 195-200.
- Discover Life. Distribución geográfica. <http://www.discoverlife.org/mp/20?Kind=Justicia+spicigera>. Consultada el 21 Agosto 2010
- Dixon RA, Paiva NL (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7: 1085-1095

- Dixon RA (1985). Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. *In Plant Cell Culture: A Practical Approach*, Oxford, Inglaterra, IRL Press Limited Pág. 1-20.
- Domínguez XA, Achenbach H, González Ch, Ferré-D' Amore AR (1990). Estudio químico del "muñile" (*Justicia spicigera*). *Revista Química Latinoamericana* 21: 142-143.
- Donoso I (1998). Desarrollo de técnicas de cultivo in vitro de bayas de vis. Memoria Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Escuela Agronomía, Universidad de Chile. 73 p
- Dr. Duke's, phytochemical and ethnobotanical database: <http://www.ars-grin.gov/duke>.
- Doran PM (2009). Application of Plant Tissue cultures in Phytoremediation Research: incentives and limitantions. *Biotechnology and Bioengineering*, 103: 60-76.
- El Sayed M and Verpoorte R (2002). Effect of phytohormones on growth and alkaloid accumulation by a *Catharanthus roseus* suspension cultures fed with alkaloid precursors tryptamine and loganin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 625-270.
- Estrada-Zúñiga ME, Cruz-Sosa F, Rodriguez-Monrroy M, Verde-Calvo JR, Vernon-Carter EJ (2009). Phenylpropanoid production in callus and cell suspension cultures of *Buddleja cordata* Kunth. *Plant Cell Tissues Organ Culture* 97:39-47
- Euler KL, Alam M (1982). Isolation of Kaempferitrin from *Justicia spicigera*. *Journal of Natural Products* 45:220-221.
- FDA (Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos .2007. Código de Regulaciones Federales 21CFR347 [En línea]
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=347%showFR=1&subpartNode=21:5.0.1.1.21.2>.
- Féher A, Pasternack T, Dudist D (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant cell Tissue Organ Culture* 74: 201-228.
- Figueredo SFL, Albarello N, Viana VRC (2001). Micropropagation of *Rollinia mucosa* (JACQ) BAILL. *In vitro Cellular and Development Biology Plant* 37:471-475.

- Fowler MW, Stafford A (1992). Plant cell culture process systems and product synthesis. In: Fowler MW, Warren GS, editors. *Plant Biotechnology*. Oxford: Pergamon pp. 79–98.
- Fresquet F (2000). Plantas y medicinas. *Revista de Fitoterapia* 49:5-7.
- Fukamiya N, and Lee -K-H (1986) Antitumor agents, 81. Justicidin-A and diphyllin, two cytotoxic principles from *Justicia procumbens*. *Journal of Natural Products* 49 (2):348-350.
- Gannoun S, Lionakis S, Gerasopoulos D, Kaska N, Kuden A, Ferguson L, Michailides T (1995). Aspects of *in vitro* culture of *Pistacla terebinthus* and *P. vera*. *Acta Horticulturae*: 419:201-206.
- Gamborg O, Miller R, Ojima K (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 8: 586-589.
- Gamborg O, Phillips GC (1995). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Fundamental Methods)*. Springer-Verlang Berlín Heidelberg Pag:45-90.
- García, E (2008). Protección y estabilización de compuestos fenólicos obtenidos a partir de muile (*Justicia spicigera*), por medio de su interacción intermolecular con proteína de soya. [Tesis de Maestría]. México D.F. Universidad Autónoma Metropolitana. p 7.
- Gerber GS (2002). Phytotherapy for benign prostatic hyperplasia. *Current Urology Reports* 3:285-291.
- George EF, Sherrington PD (1984). *Plant propagation by tissue culture: Handbook and directory of commercial laboratories*. Eversley, England. Exegetics Limited 709 p.
- George E (1993). *Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology*. 2ed. Exergetics Limited. Inglaterra. 574 p.
- George E (2008). *Plant propagation by tissue culture* 3rd ed. Springer 115-173 p En: The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems.

- Ghosal S, Banerjee S, Srivastava RS, (1979). Simplexolin a new lignan from *Justicia simplex*. *Phytochemistry* 18: 503-505.
- Grzelak A and Janiszowska W (2002). Initiation and growth characteristics of suspension cultures of *Calendula officinalis* cell. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71:29-40.
- Golan- Goldhirsh, Barazi AD, Nepovim A, Soudek P, Smircek S, Dufkova L, Sarka K, Kim, Y, Schröder P, Vanek T (2004). Plant response to heavy metal and organics pollutants in cell culture and whole plant level. *Journal of Soils and Sediments*, 4:133-140.
- Gómez C.A, García A.P, (2006) Fitohormonas: Metabolismo y modo de acción. University Jaume.
- Gómez M.A., Scienz M.T., Garcia M.D., y Fernandez M.A (1999) Study of the topical anti-inflammatory activity of *Achillea ageratum* on chronic and acute inflammation models. *Zeitschrift Naturforsch* 54c:937-941.
- Gonzalez-Paneque OS, Milanés-Vega I, Silva-Pulpo JJ, Espinoza-Reyes A, Acosta-Pompa L (2003). Determinación de las concentraciones adecuadas de 2,4-D y BAP para la inducción de callos morfogénicos de boniato. *Bioteología Vegetal* 3(1): 25-39.
- Govil J, Pandey J, Shivakumar B, Singh V (2002). Recent progress in medicinal plants, Vol. 5-crop improvement, production technology, trade and commerce. SCI Tech Publishing LLC. 1st edition. Houston, USA.
- Györgyey JA, Gartner K, Nemeth Z, Magyar Z, Hirt H, Heberle-Boors, Dudits D (1991). Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Molecular Biology*. 16: 99-1007.
- Harborne, J.B (1993). Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press. London. 318 pp.
- Harisha S (2007). Biotechnology procedures and experiments handbook. Ed. Engineering series infinity Science Press. 9: 477-601.
- Hurtado D, Merino M (2001). Cultivo de tejidos vegetales. Trillas. México, D.F 232pp.

- Herrera H. G, Rodríguez D.M, Guerrero Z.A (2008). Evaluación del crecimiento, actividad de hemoperoxidasas y remoción de fenantreno de los cultivos celulares de *Fouquieria splendens* y *Fouquieria fasciculata*. *Polibotanica*. No. 025.
- Herrera-Mata H, Rosas-Romero A, Oscar-Crescente V (2002). Biological activity of "Sanguinaria" (*Justicia secunda*) extracts. *Pharmaceutical Biology* 40(03): 206-212.
- Hersch-Martinez P (1997). Medicinal plants and regional traders in Mexico: Physiographic differences and conservational challenge. *Economy Botany* 51(2): 107-120
The New York Botanical Garden, Bronx, NY 10458 U.S.A
- IBUNAM Instituto de Biología Universidad Autónoma de México:
<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PV525864>. Consultada el 30 Agosto 2010.
- Jacquot C (1951). Action of meso-inositol and of adenine on bud formation in the cambium tissue of *Ulmus campestris*. *Comptes Rendus Académie des Sciences Paris* 233: 815-817.
- Jiang J (2001). Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, Vol.72.
- Joseph HJ, Gleye CM (1988). Justicidin B, a cytotoxic principle from *Justicia pectoralis*. *Journal of natural products* 51: 599-600.
- Karp G (1998). *Biología celular y molecular*. Traducido por Dr. Pérez J. UNAM. McGraw-Hill. Interamericana. Mexico D.F. 746 pp
- Katewa S, Chaudhary B, Jain A (2004) Folk herbal medicines from tribal area of Rajasthan, India. *Journal Ethnopharmacology*. 92: 41-46.
- Kegg Pathway Database: <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>. Consultada el 30 de Septiembre de 2010

- Kowalski J, Samojejedny A, Paul M, Metsz G, Wilczok T (2005). Effect of kaempferol on the production and gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in 1774.2 macrophages. *Pharmacological Reports* 57: 107-112.
- Kyte L, Kleyn Y (2003). Plantas from test tubes. An introduction to micropopagation. 3a edición. Timber press Portland Oregon, 240 p.
- Larcher W (1995). Physiological Plant Ecology, Berlin, Heideberg, Springer-Verlang, 506.
- Lasart MM (2002). Phytoextraction of toxic metals: A Reviuw of Biological Mechanisms *Journal of Environmental Quality* 31: 109-12.
- Laukkanen H, Rautiainen L, Taulavuori E, Hohtola A (2000). Changess of cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiology* 20:467-475.
- Leifer C, Kenneth P, Lumsden PJ (1995). Mineral and carbohidrate nutrition of plant cell and tissue culture. *Critical Reviews in Plant Science* 14(2): 83-109.
- Linsmair EM, Shook F, (1965). Organic growth factor requirements of *tabacco* tissues cultures. *Physiologia Plantarum* 18: 100-127.
- López-Sánchez C, Martín-Romero FJ, Fei-Sun LL, Samban-Arias AK, García-Martínez V (2007). Blood micromolar concentrations of kaempferol afford protection against ischemia/reperfusion-induced damage in at brain. *Brain Research* 1182:123-137.
- Lotfy D. Ismail, Lorenz P, Frank R. Stermitz. (1988). Isolation and synthesis of an α acid derivative from *Justicia ghiesbreghtiana*. *Journal of Naural Products*. 61: 1174-1176.
- Lloyd, McCown B (1980). Commercial feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings* 30:421-427.
- Lozoya-Legorreta X (1994). Plantas, medicina y poder: breve historia de la herbolaria mexicana. México, D.F. Procuraduría Federal del Consumidor; Editorial Pax, México. 176 pp.

- Margara J (1988). Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Las meristemas y la organogénesis. Madrid España. Mundi Prensa. 232
- Martínez M (1992a). Las plantas medicinales de México. Ed. Botas. Sexta edición. México.
- Martínez M (1996b). Plantas medicinales mexicanas. Ed. Botas. México, D.F
- Mata R (1993). Chemical studies and biological aspects of some mexican plants used in traditional medicine. En: Phytochemical potential of tropicals plants. Downum, K.R. Romero J.T (eds) Editorial :Plenum Press, New York. Pág. 41-64.
- Matos- Acurero A (2007). Inducción de callo en plantas silvestres de zábila (*Aloe vera*) con diferentes combinaciones de 2,4-D, BAP y Kinetina. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*. Volumen 41 No. 4: 503-516.
- Merk Chemicals International www.merk-chemicals.com/ronacare-allantoin/MDA_CHEM-101015/P_1X6B.S1LUxcAAAEWzuAfVhTI?WFSimpleSearch_NameOrID=allantoin&BackButtonText=search+results. Consultada el 18 de septiembre del 2010
- Meckes M, Davis-Rivera AD, Nava-Aguilar V, Jiménez A (2002). Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine*11:446-451.
- Moore-Thomas C (1989). Biochemistry and physiology of plant hormones (2da edición), Springer Verlag, London.
- Monroy-Ortiz C, Castillo-España P (2007). Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. 2a. Edición. p.39 -CONABIO. ISBN: 968 878 277 7.
- Morgan P (1990). Effects of abiotic stresses on plant hormone systems.. En: Alscher R and Cumming J (Eds). Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanism. *Plant Biology*. Wiley- Liss, USA.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Murashige T, Skoog F (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annales Plant Physiology* 25: 135-166

- Muñoz de Malajovich MA, (2006). Biotecnología. En: El cultivo de células y tejidos. Editorial Universidad Nacional de Quilmes (eds) (Colección de Biomedicina) Bernal, Buenos Aires. 424 pp.
- Nin S, Morosil E, Schiff S, Bennicci A (1996). Callus cultures of *Artemisia absinthium* L.: initiation, growth optimization and organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45: 67-72
- Nitsh JP, Nitsh C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.
- Niklass KJ(2000). The evolution of plant body plans a Biomechanical Respective. *Annals of Botany* 85: 411-438.
- Novoa A, Motidome M, Mancini-Filho J, Linares A, Tanae M, Torres L, Lapa A (2001). Actividad antioxidante y ácidos fenólicos de alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G. Gmelin) Howe. *Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas* 37:373-382
- Okigawa M, Maeda T, Kawano N (1970a). Isolation and structure of three new lignans from *Justicia procumbens* var. *leucantha*. *Tetrahedron* 26: 4301-4305.
- Okigawa M, Maeda T, Kawano N (1970b). Isolation of neojustin from *Justicia procumbens*. Var. *leucantha*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 18: 862-863.
- Ottoline H.M. 1988. Plant hormones. *Current biology* 8: R5-R7.
- Palme K, Hesse T, Moore I, Campos N, Feldwisch C, Hesse F, Schell J (1990). Review Hormonal modulation of plant growth: the role of auxin perception. Mechanism of Development. *Elsevier Scientific Ireland Publishers* 33:97-106.
- Payne GF, Bringi V, Prince C, Shuler ML.(1991) Plant cell and tissue culture in liquid systems. Munich: *Hanser Publishers* Pag: 1–10.
- Pelletier X, Belbraouet S, Mirabel F, Peerrin JL, Pages X, Debry G (1995). A diet moderately enriched in phytosterols lowers plasma cholesterol concentrations in normocholesterolemic humans. *Annals Nutrition and Metabolism* 39: 291-295.
- Peter J. Davies (1995). Plant hormones: physiology, biochemistry, and molecular biology.

- Dordrecht; Boston: Kluwer Academic.
- Pierik, LM (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores. Madrid España. Editorial Mundi-Prensa. 326pp.
- Plant database. Natural Resources Conservation Service. USDA (United States Department of Agriculture).
<http://plants.usda.gov/java/nameSearch?keywordquery=justicia+spicigera&mode=scinam&submit.x=0&submit.y=0> Consultada 8 de septiembre 2010
- Ponce-Macotela M, Navarro-Alegría I, Martínez-Gordillo MN, Álvarez-Chacon R (1994). In vitro effect against *Giardia* of 14 plants extracts. *Revista Investigación Clínica* 46: 343-347.
- Ponce-Macotela M, Rufino-González Y, de la Mora-de la Mora JL, González-Maciel A, Reynoso-Robles, Marínez-Gordillo MN (2001b). Mortality and morphological changes in *Giardia duodenalis* induced by exposure to ethanolic extracts of *Justicia spicigera*. *Proc. West Pharmacol Soc* 44:151-152.
- Ponce-Macotela M, Rufino-González Y, de la Mora-de la Mora JL, González-Maciel A, Reynoso-Robles, Marínez-Gordillo MN (2006c). Oregano (*Lippia* spp.) Kills *Giardia intestinalis* trophozoites in vitro: anti-giardiasic activity and ultrastructural damage. *Journal of Parasitology Research* 98:557-560.
- Prieto JM, Recio MC, Giner RM (2006). Anti-inflammatory activity of β -sitosterol in a model of ozazolone induced contact-delayed-type-hypersensitivity. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 5(003):57-62.
- Rainer W, Bussmann (2005). Book review En: Recent progress in medicinal plants, Vol.5-crop improvement, production technology, trade and commerce 1st edition. En: Govil J, Pandey J, Shivakumar B, Singh (eds). SCI Tech Publishing LLC. Houston, USA. *Phytomedicine* 12 (1):161.
- Rayen P, Evert R, Eichohorn (1999). Biology of Plants. W.H. Freeman and Company Worth Publishers .

- Ravishankar GA, Ramachandra Rao S. (2000). Biotechnological production of phyto-pharmaceuticals *International Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics* 4:73–102.
- Ravishankar GA, Venkataraman LV. Role of plant cell culture in food biotechnology: current trends, limitations and future prospects (1993). In: Plant biotechnology: commercial prospects and problems. Prakash J, Pierik RLM, (eds). Edit. Oxford IBH Press New Delhi, Pág: 255–74.
- Rout R, Samantaray S, Das P (2000). In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology advances*. 18: 91-120.
- Ruiz E, Padilla E, Redondo S, Gordillo-Moscoso A, Tejerina T (2006). Kaempferol inhibits apoptosis in vascular smooth muscle induced by a component of oxidized LDL. *European Journal of Pharmacology* 529: 79-83.
- Sáenz L, Souza R, Chan JL, Azpeitia A, Oropeza C (2005).-14C-2,4-dichlorophenoxyacetic acid uptake and formation of embryogenic call in *coconut* plumular explants cultures on active charcoal-free media. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28(02):151-159.
- Sánchez-Cuevas MC, Salaverría JL (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria ananassa* Duch.). *Revista UDO Agrícola* 4(1):21-26.
- Sasson A (1991). Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological and economic aspects. *Options Méditerranéennes-Serie Séminaires*-N.14: 59-74.
- Scragg A, Morris P, Allan EJ, Bond P, Fowler MW (1987). Effect of scale-up on serpentine formation by *Catharanthus roseus* suspension cultures. *Enzyme Microbiology Technology* 9:619-624.
- Seabrook E.A. (1980). Establecimiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos vegetales. Chapter 1 en: Plant tissue culture as source of Biochemicals CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. Pág. 1-20.

- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.
- Scrags A (2000). Plant cell culture, physicochemical effects on growth. En: Encyclopedia of cell technology, vol.2. Raymond E (eds). Editorial Spier Wiley-Interscience Publication, Nueva York, U.S.A. Pág: 1009-114.
- Sepúlveda G, Reina C, Chaires L, Bermudez K, Rodríguez M (2009). Antioxidant activity and content of phenolic and flavonoids from *Justicia spicigera*. *Journal of Biological Sciences* 9(6):629-632.
- Smith JE (1996). Biotechnology. Cambridge University Press.
- Stanford A, Murris P, Fowler M (1996). Plant cell biotechnology: a prespective enzyme and microbial technology. 8: 577-640
- Stockigt J, Obitz P, Flakenhagen H, Lutterbach R, Endress R (1995). Natural products and enzymes from plant cell cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 43:914–20.
- Street HE (1977). Applications of cell suspension cultures. En: Plant cell, tissue and organ culture. Reinert J, Bajaj YPS (eds.). Editorial: Springer-Verlag, Berlin, Pág: 649-667.
- Taiz L, Zeiger E (2007). Fisiología Vegetal. Editorial Universitat Jaume. 1ra edición pp.
- Tang W, Harris L, Outhavong V, Newton R (2004). Antioxidants enhance *in vitro* plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill). *Plant Cell Reports* 22: 871-877.
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD (2003). Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 57: 321-325.
- Thomas DF (2004). Further range extensions of Mexican Acanthaceae. *PoliBotanica* No.018: 1-12.
- Trejo G, Rodríguez M (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *Interciencia* ISSN (versión impresa): 0378-

1844.

Turrens J (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology* 552: 335-344.

USD Natural Resources Conservation service: Plant database
<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profiles&symbol=Planta&display=63>

Vega- Avila E, Espejo-Serna A, Alarcón-Aguilar F, Velazco-Lezama, R (2009). Cytotoxic Activity of Four Mexican Medicinal Plants. *Proc.West. Pharmacol. Soc.* 52: 78-82.

Verpoorte R (2000). Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *Journal of Pharmacy Pharmacology* 52: 253-262.

Villalobos VM (1980) . Plantas libres de virus. Ciencia y Desarrollo. CONACYT (México). 33:35-49.

Vivek S, Joseph C, Ghosh S, Agarwal, Kumar M, Sen E (2007). Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. *Molecular Cancer Therapeutics* 6: 2544-2553.

Wang Y, Cao J, Weng JH, Zeng S (2005). Simultaneous determination of quercetin, kaempferol and isorhamnetin accumulated human breast cancer cells, by high-liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39:328-333.

Watell A, Kamel S, Mentaverri R, Lorget F, Prouillet C, Petit PJ, Fardelonne P, Brazier M (2003). Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on *in vitro* osteoclastic bone resorption. *Biochemical Pharmacology* 65:35-42.

Whitmer S, Canel C, Hallard D, Goncalve C, Verpoorte R (1998). Influence of precursor availability on alkaloid accumulation by transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology* 116:853-857.

- Wink M (1999). Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. En: Biochemistry of plant secondary metabolism. *Annual Plant Reviews*. 2: 358.
- Wink M (1999). Functions of plants secondary metabolites and their exploitation in biotechnology. Vol 3. Sheffield Academic Press Pag: 1-17, 197-198.
- White P (1943). A Handbook of plant tissue culture Lancaster: Jacques Catell. Pág: 277.
- Michael Wink Ed. Sheffield Academic Press LDT. USA-Cánada.
- Yardim-Akaydin S, Sepici A, Ozkan Y (2004). Oxidation of Uric Acid in Rheumatoid Arthritis: Is Allantoin a Marker of Oxidative Stress?. *Free Radical Research* 38(6):623-628.
- Zhang Y, Chen AY, Li M, Chen C, Yao Q (2008). *Ginkgo biloba* extract kaempferol inhibits cell proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Journal of Surgical Research*. 148 (1): 17-23.
- Zheng W, Shioow Y, Wang (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal Agricultural Food Chemistry* 49 :(11).

ANEXO A

Vitaminas empleadas en diferentes medios de cultivo (mg l⁻¹)

Compuesto	Constabel, 1958	Gamborg, 1963	Morel & Wetmer, 1952	Nickell & Maretaki, 1969	White, 1963
Ácido pámico benzoico	---	0.2	---	---	---
Ácido ascórbico	10	0.4	---	---	---
Biotina	0.1	0.00025	0.01	0.01	---
Cloruro de Colina	10	0.2	---	---	---
Cianocobalamina	---	---	---	---	---
Ácido fólico	1.0	0.015	---	---	---
Ácido nicotínico	0.5	0.5	1.0	2.8	0.5
Pantotenato de calcio	10	0.4	1.0	---	---
Cloruro de piridoxina	---	0.5	1.0	0.2	0.1
Riboflavina	0.1	0.015	---	0.2	---
Cloruro de tiamina	0.1	0.5	1.0	0.03	0.1

ANEXO B

. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)

Sales de macronutrientes (mg. l ⁻¹)		Sales de micronutrientes (mg. l ⁻¹)	
NH ₄ NO ₃	1650	KI	0.83
KNO ₃	1900	H ₃ BO ₃	6.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
		CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
		Na ₂ -EDTA	37.3
		FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8

Composición de vitaminas Murashige y Shook (1962)

VITAMINAS	
Myo-Inositol	100mg. l ⁻¹
Glicina	2 mg. l ⁻¹
Ácido nicotínico	0.5 mg. l ⁻¹
Piridoxina-ClH	0.5 mg. l ⁻¹
Tiamina	0.1mg. l ⁻¹

ANEXO C

FORMULACIÓN DE LOS DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN CULTIVO DE TEJIDOS *in vitro*

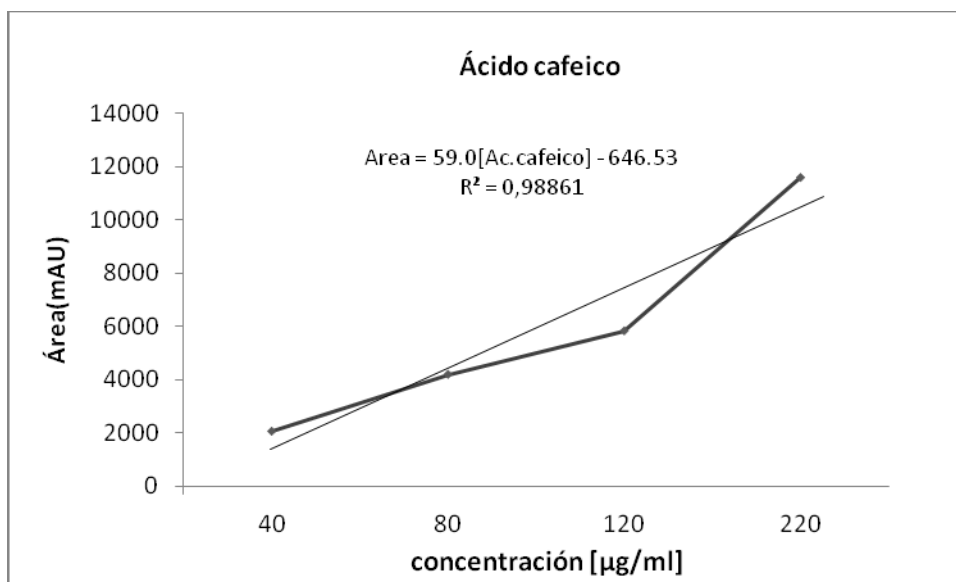
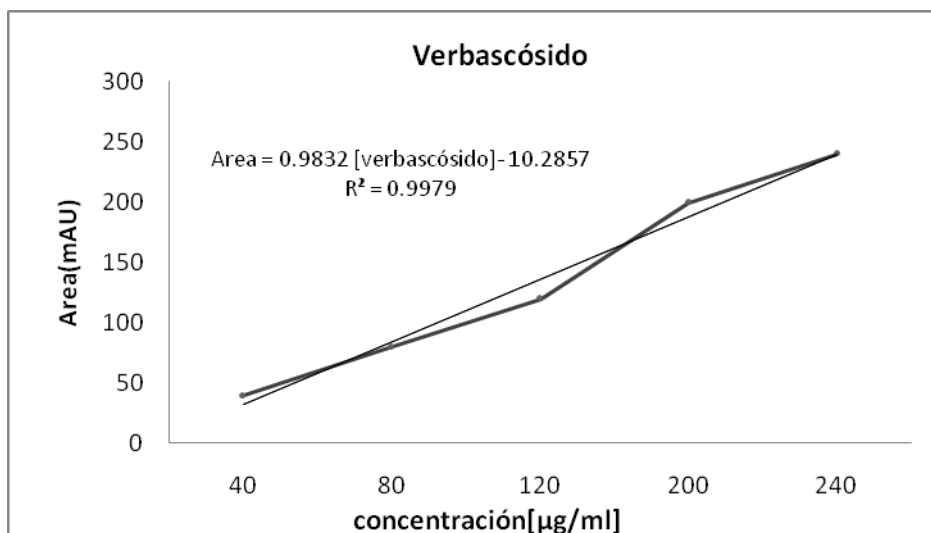
Compuesto	LM	Gamborg
KNO ₃	18.79 mM	24.73 mM
NH ₄ NO ₃	20.61 mM	---
(NH ₄) ₂ SO ₄	---	1.01 mM
KH ₂ PO ₄	1.26 mM	---
NaH ₂ PO ₄	---	1.09 mM
CaCl ₂	2.99 mM	1.02 mM
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.50 mM	1.01 mM
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.11 mM	0.11 mM
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.10 mM	0.10 mM
FeNa EDTA	0.10 mM	0.10 mM
H ₃ BO ₃	0.10 mM	38.52 mM
KI	5.00 mM	4.52 mM
MnCl ₂ H ₂ O	0.10 mM	59.16 mM
NaMoO ₄ 2H ₂ O	1.03 mM	1.03 mM
ZnSO ₄ 7H ₂ O	29.91 mM	6.96 mM
Glicina	---	---
Acido nicotínico	---	8.12 mM
Piridoxina-HCl	---	4.86 mM
Tiaminina-HCl	1.19	29.65
Myo-inositol	0.56	0.56

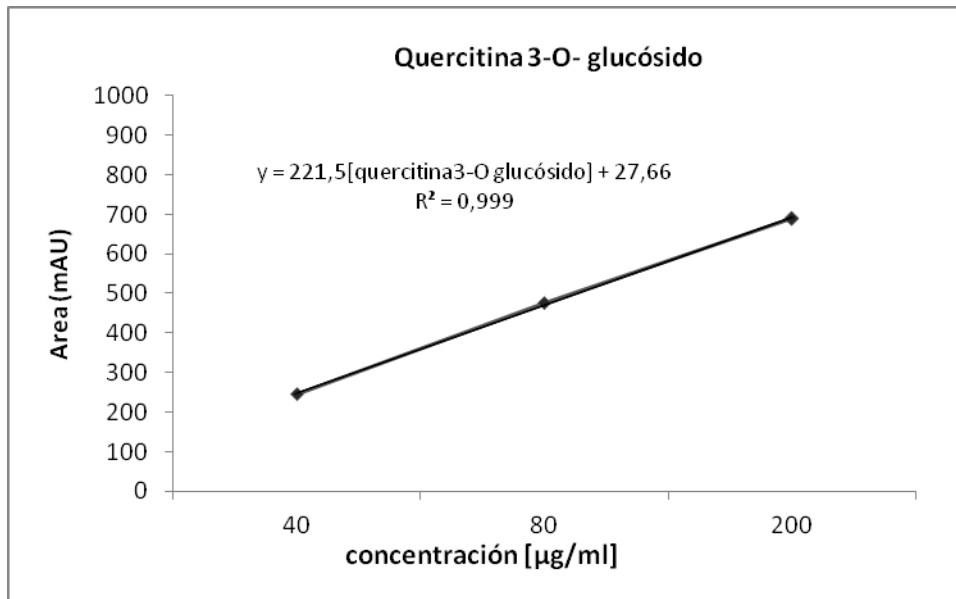
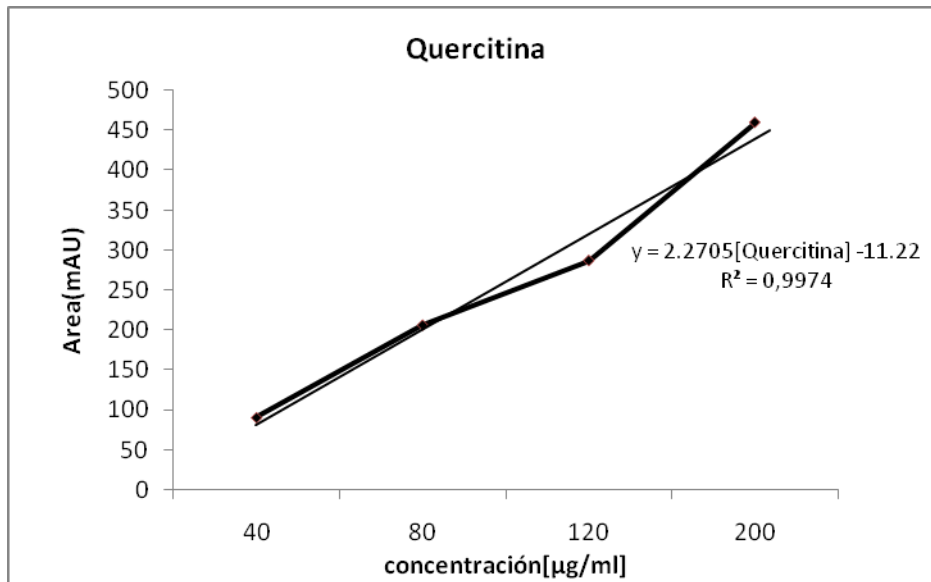
Componentes	Nitsch	SH	CHU(N6)
KNO ₃	9.40	24.73	27.99
NH ₄ NO ₃	9.00	---	---
(NH ₄) ₂ SO ₄	---	---	3.50
NH ₄ H ₂ PO ₄	---	2.61	---
KH ₂ PO ₄	0.50	---	2.94
KCl	---	---	---
CaCl ₂	1.50	1.36	1.13
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.75	1.62	0.75
CoCl ₂ 6H ₂ O	---	0.42	---
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.10	0.80	---
FeNa EDTA	0.10	53.94	0.10
H ₃ BO ₃	0.16	80.86	25.88
MnSO ₄ H ₂ O	0.11	59.17	19.70
KI	---	6.02	4.81
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	1.03	0.41	---
ZnSO ₄ 7H ₂ O	34.78	3.48	5.22
Glicina	1.26.64	---	26.64
Acido nicotínico	40.62	40.61	4.06
Piridoxina-HCl	2.43	2.43	2.43
Tiaminina-HCl	1.48	14.82	2.96
Acido Fólico	1.13	---	---
Biotina	0.21	---	---
Myo-inositol	0.56	5.55	---

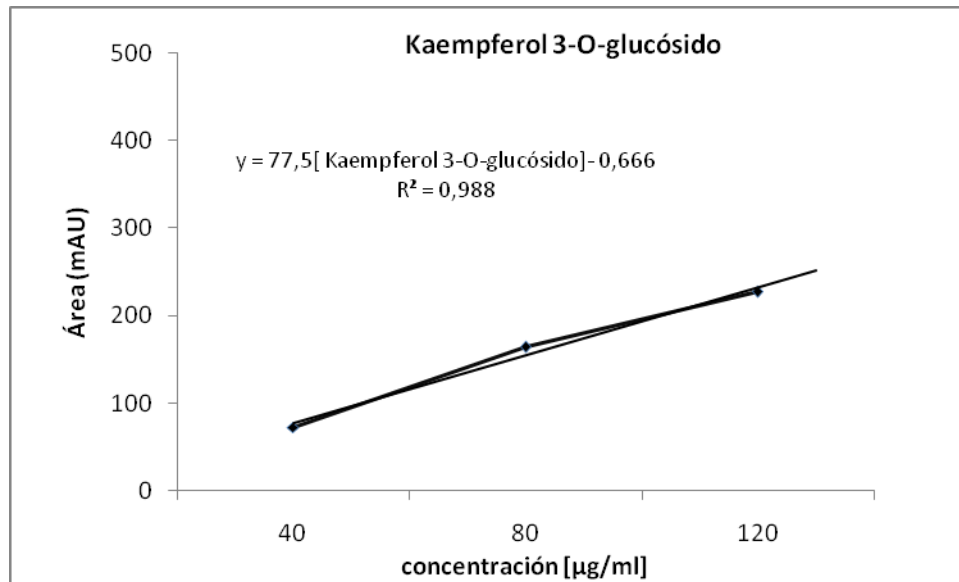
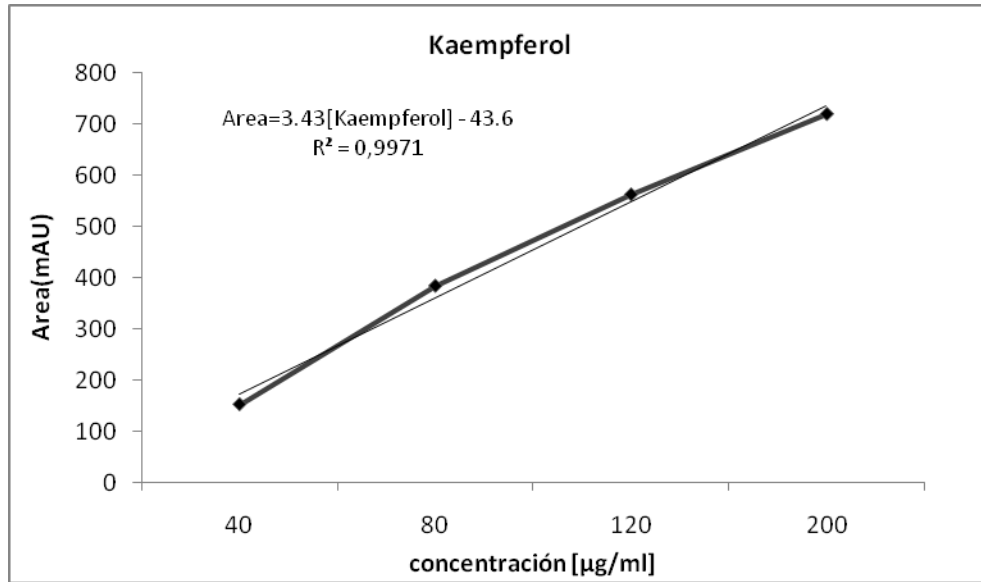
ANEXO D

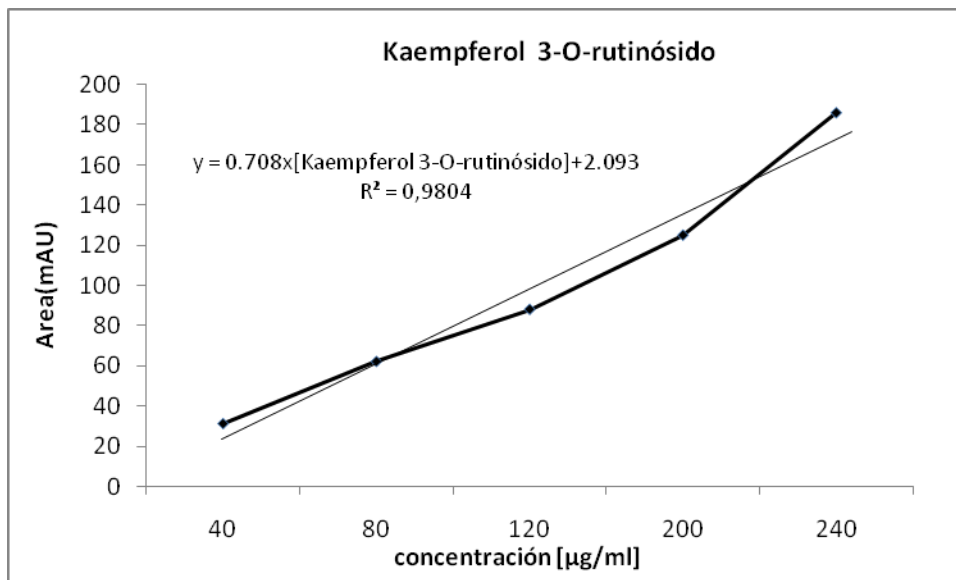
Curvas patrón de los estándares para la determinación de los compuestos presentes en *J.spicigera*

Una solución stock (0.2mg ml^{-1}) fue preparada y diluida para generar concentraciones finales de 40, 80, 120 y 240 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Cuando dichas diluciones fueron analizadas en el HPLC, las áreas correspondientes a éstas fueron graficadas, obteniéndose las siguientes gráficas.





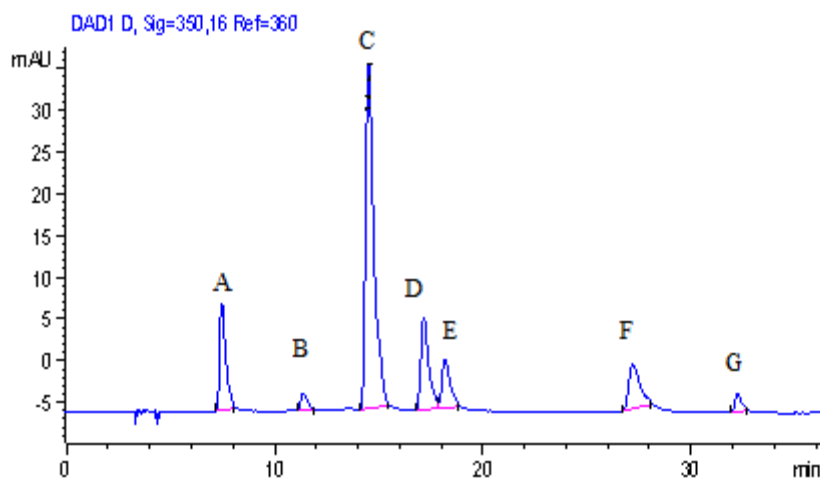




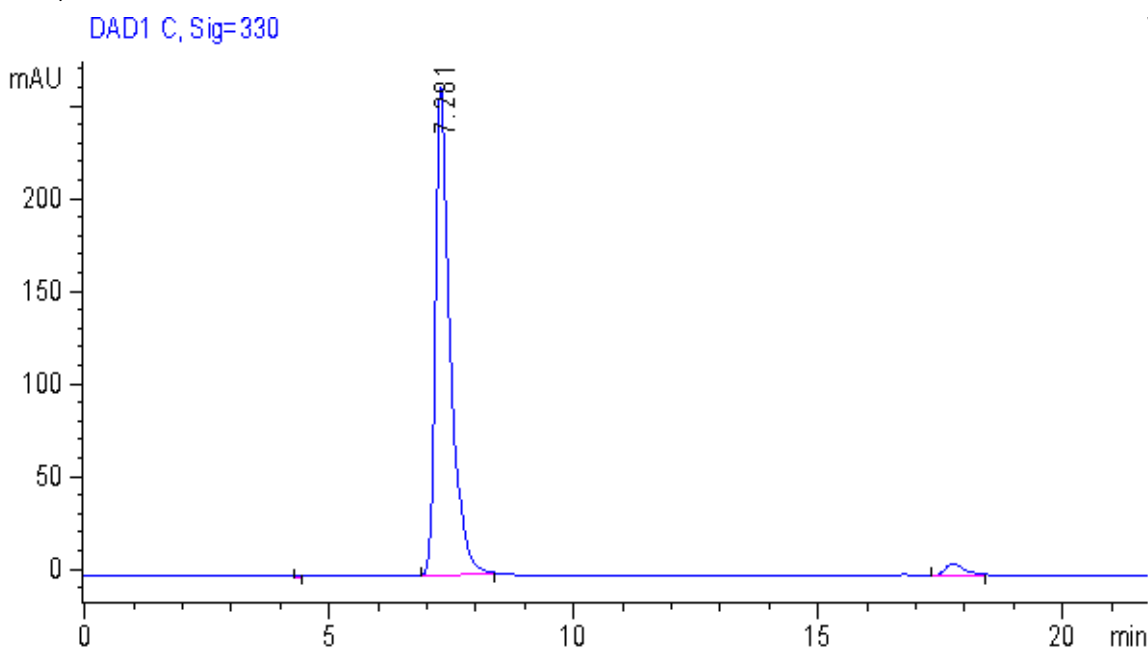
ANEXO E

CROMATOGRAMA DE ESTANDARES

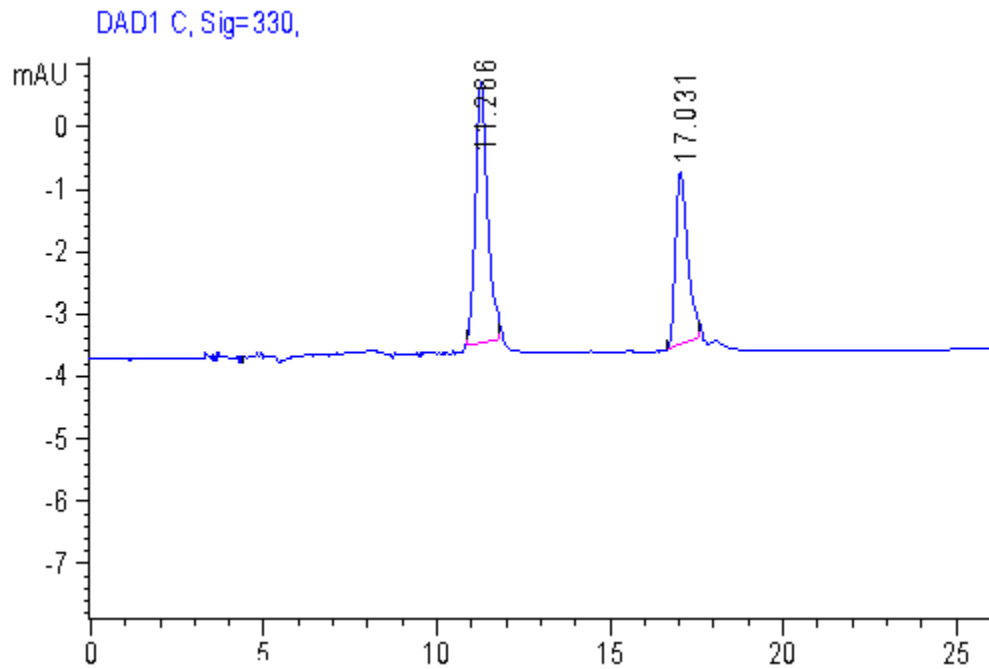
Cromatograma de los estándares: **A** ac. cafeico, **B** verbascósido, **C** quercitina3-O-glucósido, **D** kaempferol 3-O-rutinósid, **E** kaempferol 3-O-glucósido, **F** quercitina y **G** kaempferol.



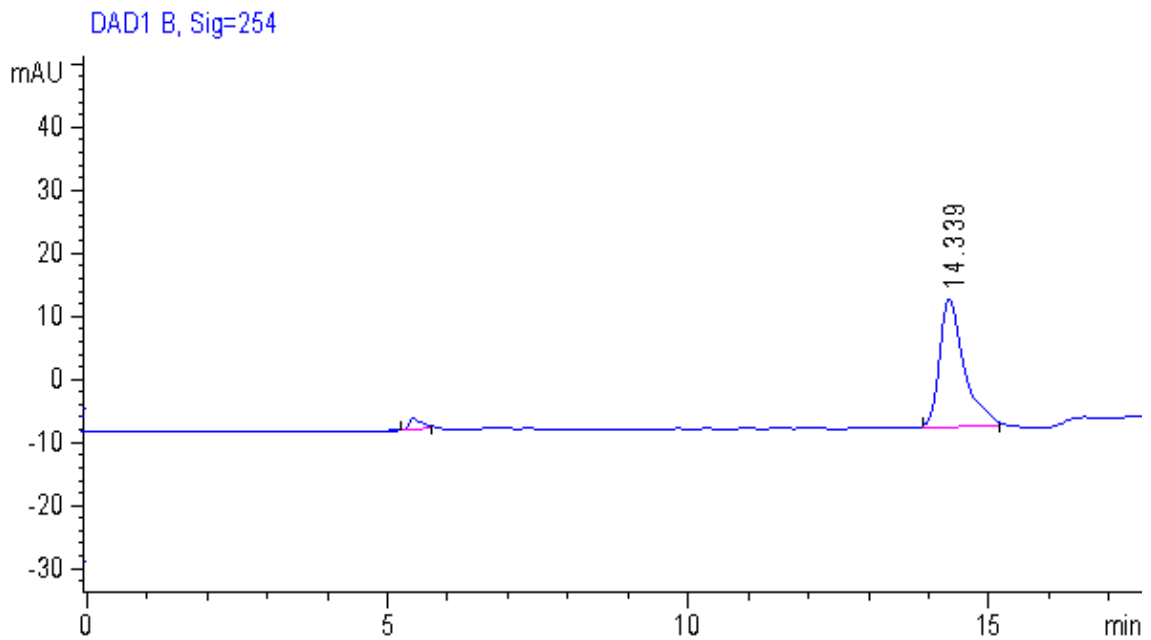
A) Ácido cafeico



B) Verbascósido, Kaempfeol 3-O-rutinósio



C) Quercitina 3-O-glucósido



D) Kaempferol

