



Polibotánica

ISSN electrónico: 2395-9525

polibotanica@gmail.com

Instituto Politécnico Nacional

México

<http://www.polibotanica.mx>

CALLOGÉNESIS Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE *Euphorbia nutans* Lag.

CALLOGENESIS AND PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF *Euphorbia nutans* Lag.

Aguilar Jiménez, D., B. Reyes Trejo, J.L. Rodríguez De la O, J. Martínez Solís†

CALLOGÉNESIS Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE *Euphorbia nutans* Lag.

CALLOGENESIS AND PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF *Euphorbia nutans* Lag.

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 60: 337-354 México. Julio 2025

DOI: 10.18387/polibotanica.60.20



Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0
Atribución-No Comercial ([CC BY-NC 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)).

Callogénesis y análisis fitoquímico de *Euphorbia nutans* Lag.**Callogenesis and phytochemical analysis of *Euphorbia nutans* Lag.**

Aguilar Jiménez, D.,
B. Reyes Trejo,
J.L. Rodríguez De la O,
J. Martínez Solís†

CALLOGÉNESIS Y
ANÁLISIS FITOQUÍMICO
DE *Euphorbia nutans* Lag.

CALLOGENESIS AND
PHYTOCHEMICAL
ANALYSIS OF *Euphorbia
nutans* Lag.

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 60: 337-354. Julio 2025

DOI:
10.18387/polibotanica.60.20

Daniel Aguilar-Jiménez / aguilard229@gmail.com ✉
<https://orcid.org/0000-0001-8014-4167>

Programa Educativo de Agrobiotecnología. Universidad Tecnológica de Izúcar de Matamoros. Prolongación Reforma No. 168, Barrio de Santiago Mihuacán, Izúcar de Matamoros, Puebla, México. CP 74420

Benito Reyes-Trejo <https://orcid.org/0000-0001-9330-2646>

Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Preparatoria Agrícola Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco Km 38.5, 56230 Chapingo, Edo. México, México

José Luis Rodríguez-De-la-O <https://orcid.org/0000-0002-2331-9984>

Departamento de Fitotecnia-Área de Genética. Universidad Autónoma Chapingo Carretera México-Texcoco Km. 38.5, 56230 Chapingo, Edo. México, México

Juan Martínez-Solís † 09/04/2025

<https://orcid.org/0000-0002-8216-2702>

Departamento de Fitotecnia- Instituto de Horticultura Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco Km. 38.5, 56230 Chapingo, Edo. México, México

RESUMEN: *Euphorbia nutans* se utiliza de forma empírica para tratar gastritis y heridas cutáneas en la Mixteca Poblana. La propagación de especies *in vitro* es una alternativa sustentable para el aprovechamiento de su uso terapéutico, sin embargo, se desconoce si la desdiferenciación celular afecta la producción de metabolitos secundarios. Este estudio tuvo como objetivo obtener callos *in vitro* de *E. nutans* en medio Murashige & Skoog suplementado con citocininas y auxinas, para comparar su perfil fitoquímico con el obtenido de plantas silvestres. Los extractos orgánicos fueron preparados bajo reflujo con 3.41 g de callos, por dos horas, empleando hexano, seguido por diclorometano y finalmente metanol. El análisis fitoquímico de extractos de callos fue mediante comparación de metabolitos secundarios aislados previamente de 3.534 Kg de material vegetal silvestre seco y molido de *E. nutans*, empleando cromatografía en capa delgada (TLC) y espectroscopía de RMN de ¹H. Las variables *in vitro* fueron: porcentaje de respuesta, peso, color y textura de callos. Los resultados indican que el 100 % de segmentos foliares formaron callos color verde limón y friables, con peso superior significativamente (Tukey, p ≤ 0.05) usando BA y ANA. El análisis mediante TLC, reveló la presencia de las mismas bandas en extractos de callos, así como bandas no encontradas en extractos de plantas silvestres. El análisis mediante RMN ¹H permitió identificar seis metabolitos secundarios β-sitosterol, estigmasterol, acetato de α-amirina, β-lupeol, 24-metilen-cicloartan-3β-ol y un metabolito tipo iridoide. Estos resultados son el primer estudio fitoquímico de *E. nutans*.

Palabras clave: Desdiferenciación celular, callogénesis, metabolitos secundarios, *Euphorbia nutans* células indiferenciadas, planta medicinal.

ABSTRACT: *Euphorbia nutans* is used empirically to treat gastritis and skin wounds in the Mixteca region of Puebla. *In vitro* propagation of species is a sustainable alternative for therapeutic use; however, it is unknown whether cellular dedifferentiation affects the production of secondary metabolites. This study aimed to obtain *in vitro* calli of *E. nutans*

in Murashige & Skoog medium supplemented with cytokinins and auxins, to compare its phytochemical profile with that obtained from wild plants. The organic extracts were prepared under reflux with 3.41 g of calluses, for two hours, using hexane, followed by dichloromethane and finally methanol. Phytochemical analysis of callus extracts was carried out by comparison of secondary metabolites previously isolated from 3.534 kg of dried and ground wild plant material of *E. nutans*, using thin layer chromatography (TLC) and ^1H NMR spectroscopy. The *in vitro* variables were: response percentage, weight, color and texture of calluses. The results indicate that 100% of leaf segments formed lemon-green, friable calluses with significantly higher weight (Tukey, $p \leq 0.05$) using BA and ANA. TLC analysis revealed the presence of the same bands in callus extracts, as well as bands not found in wild plant extracts. ^1H NMR analysis identified six secondary metabolites: β -sitosterol, stigmasterol, α -amyrin acetate, β -lupeol, 24-methylene-cycloartan-3 β -ol, and an iridoid-type metabolite. These results are the first phytochemical study of *E. nutans*.

Key words: Cellular dedifferentiation, callogenesis, secondary metabolites, *Euphorbia nutans*, undifferentiated cells, medicinal plant.

INTRODUCCIÓN

Durante los estudios fitoquímicos de las partes de una la planta se muestra la presencia de una amplia variación de metabolitos secundarios como polifenoles, flavonoides, terpenoides, alcaloides, glucósidos, fitoesteroles, saponinas, taninos y ácidos grasos, etc. Así, en la tronadora (*Tecoma stans* L.) se ha descrito un mayor contenido de alcaloides en base seca durante la etapa de prefloración que durante la etapa de floración. Así, ambas etapas mostraron diferentes niveles de fitoquímicos en las hojas, lo que depende en gran medida de la etapa fisiológica de la planta, seguido del tipo de medio de extracción empleando disolventes de distintas polaridades. Sin embargo, la resistencia de las plantas al estrés ambiental, es decir, a las altas temperaturas, la sequía, la alta exposición solar y la salinidad del suelo, también puede ser el factor estimulante que permite la biosíntesis y la acumulación de estas sustancias durante las diferentes fases de su crecimiento (Anand & Basavaraju, 2021).

Por otro lado, en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, un callo se define como una masa de células indiferenciadas (no especializadas) o desdiferenciadas (que pierden su especialización), las cuales proliferan de forma desorganizada como respuesta a estímulos físicos químicos u hormonales o como conjunto de células en crecimiento desorganizado, que se desarrollan en respuesta a una lesión química o física en condiciones hormonales determinadas (Pierik R, 1990). El callo se puede obtener a partir de un explante y sólo algunas de las células del callo exhiben la totipotencia celular. Esta habilidad de diferenciarse en tejidos, órganos e incluso embriones, las hace capaces de regenerar plantas enteras (Pierik R, 1990). Por otra parte, Kondamudi *et al.* (2009) mencionan que, en muchos experimentos de cultivo de tejidos, como primer paso es necesaria la inducción de callo a partir del explante; pues el cultivo de callo se utiliza para estudiar el aislamiento de protoplastos, tipos de células, la selección celular, la embriogénesis somática, la organogénesis y la producción de metabolitos secundarios. Respecto a la familia *Euphorbiaceae*, Lee & Starratt (1972) cultivaron raíces de plántulas de *Euphorbia esula* L. y *Euphorbia cyparissias* L. para obtener callos con ácido α -naftalenacético (ANA), y fue mejor regulador de crecimiento vegetal que kinetina (Kin), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indolacético (AIA) o ácido-4-amino-3,5,6 tricloloropicolínico (picloram). El ácido giberélico no tuvo algún efecto. Ripley & Preece (1986) mencionan que la citocinina 6-benciladenina (BA) no fue necesaria para la proliferación de brotes axilares en *Euphorbia lathyris* L., pero sí para la producción de callos y brotes adventicios. En *Mallotus philippensis* Lam., Abbas (1993) obtuvo callo en continuo crecimiento empleando medio de Murashige & Skoog (MS) con 2,4-D (1.3 mg L^{-1}) y Kin (0.5 mg L^{-1}). Jasrai *et al.* (2003) en *Euphorbia pulcherrima* Willd, reportaron la inducción de callos rojos con medio MS suplementado con 2.0 mg L^{-1} de 2-iso-penteniladenina (2i-p) y ANA (0.5 mg L^{-1}). Pickens *et al.* (2005), mencionan que la mayoría de callos y brotes en *Euphorbia pulcherrima* Willd, se obtuvieron a partir de secciones de la vena

media de hojas cultivadas *in vitro*, con 2.0 a 3.0 mg L⁻¹ de BA y 3.0 mg L⁻¹ de AIA durante un mes. Xu *et al.* (2008), plantearon un protocolo de regeneración celular para *Euphorbia ésula* L. empleando medio MS adicionado con 0.25 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP) y 0.4 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), obteniendo después de 30 días de cultivo, brotes de forma directa e indirecta. En *Euphorbia pulcherrima* Willd, Perera & Trader (2010), mencionan el cultivo de yemas apicales y axilares con medio MS adicionado BA (2.25 mg L⁻¹) para producir callo color rojo, o BA y AIA (2.25 y 0.7 mg L⁻¹, respectivamente) para obtener algunos callos color blanco y gris-verde después de un mes de cultivo. En *Ricinus communis* L., se menciona la obtención de callo friable (90%) de color marrón blanquecino con medio MS más 0.5 mg L⁻¹ de ANA y 2.5 mg L⁻¹ de BAP a partir de tejidos de hojas cotiledonales (Naz *et al.*, 2011).

Así mismo, el cultivo de tejidos vegetales fue introducido desde finales de la década de los 60's del siglo XX, como una alternativa posible para el estudio y producción de metabolitos secundarios (Bourgaud *et al.*, 2001). A partir de entonces, se han realizado numerosos estudios con el objetivo de incrementar y obtener los compuestos deseados. Sin embargo, Kreis (2007) menciona que no es posible obtener los mismos compuestos (en cantidad y calidad) en células indiferenciadas que los obtenidos en las plantas madre, ya que muchos metabolitos se sintetizan integrados a eventos de diferenciación celular. No obstante, Janarthanam *et al.* (2010) mencionan que en *Stevia rebaudiana* Bert. (*Asteraceae*), lograron obtener callo abundante (11.6 g) con metabolitos secundarios a partir de explantes foliares cultivados en un medio MS con 0.5 mg L⁻¹ de ANA, 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1.0 mg L⁻¹ de Kin. También, Aguilar *et al.* (2019) mencionan el uso de BAP (0.5 mg L⁻¹) para la propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* Bert. a partir de segmentos nodales, con la posible presencia de metabolitos secundarios (esteviósidos). Estos resultados fueron similares a lo publicado por Vázquez-Baxcajay *et al.* (2014), quienes encontraron que las plantas de *Stevia rebaudiana* Bert. micropropagadas, conservaron su capacidad para sintetizar distintos esteviósidos. Por otra parte, Ali & Tariq (2013) en *Momordica charantia* cv. Jaunpuri (*Cucurbitaceae*), mencionan a BAP, AIA, y 2,4-D en medio MS para inducir callogénesis y extraer los principios activos ahí generados, resultando BAP con 2,4-D, la mejor combinación en diferentes concentraciones para la inducción de callo a partir de diferentes explantes. Recientemente, Andújar *et al.* (2023), mencionan el aumento de niveles endógenos de diterpenos en *Stevia rebaudiana* Bert. cultivada con 12.5 mg L⁻¹ de nanopartículas de planta en condiciones *in vitro*. Con base en los antecedentes sobre inducción de callo en plantas de la familia Euphorbiaceae, el uso de reguladores de crecimiento en esta familia, y la falta de estudios en *Euphorbia nutans* Lag., especie premisoria para aplicaciones farmacológicas, en este trabajo el objetivo planteado fue la inducción de callo *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. para comparar mediante cromatografía en placa delgada y espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (RMN de ¹H), los metabolitos así obtenidos contra los de las plantas silvestres.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

La inducción de callos *in vitro* se realizó a partir de segmentos nodales, hojas y segmentos foliares de plantas de *Euphorbia nutans* Lag. generadas *in vitro*. La obtención de extractos a partir de hojas y tallos de plantas silvestres de *Euphorbia nutans* Lag., fue mediante plantas recolectadas en la Mixteca Poblana México (Izúcar de Matamoros, Puebla) e identificadas en el Herbario Jorge Espinosa Salas de la Universidad Autónoma Chapingo, al igual que el material vegetal para el establecimiento y obtención de plantas *in vitro*. Las plantas recolectadas tenían aproximadamente dos meses de edad.

Inducción de callo a partir del cultivo *in vitro* de segmentos nodales de *Euphorbia nutans* Lag.

El medio de cultivo empleado fue con las sales inorgánicas de Murashige & Skoog (1962) al 100%, suplementado con mio-inositol 100 mg L⁻¹, tiamina-HCl 0.40 mg L⁻¹, sacarosa 30.0 g L⁻¹ y 3.0 mg L⁻¹ nitrato de plata (AgNO₃) de acuerdo a Aguilar-Jiménez & Rodríguez-De-la-O (2020). Además, se adicionó por separado con 10.0 mg L⁻¹ de citocininas (Kin, 2i-p, BA) y de auxinas

(ANA, 2,4-D, TDZ), formando así, un diseño factorial 3x3 más un tratamiento control (MS) con diez repeticiones cada uno. A cada tratamiento se adicionaron 7.0 g L⁻¹ de agar y se ajustó el pH a 5.7 ± 0.01 con hidróxido de sodio o ácido clorhídrico. Todos los reactivos empleados son marca SIGMA®. Después de disolver el agar en el medio de cultivo, éste se vertió en tubos de ensayo en una cantidad de 10 mL por recipiente, se cubrieron con tapas de polipropileno y se esterilizaron 20 minutos en una autoclave tipo horizontal a 121 °C y a 1.5 kg cm² de presión marca AESA®. Posteriormente, se sembró un segmento nodal por **tubo de ensayo**, fueron incubados a 26 ± 2 °C con 24 horas de luz artificial mediante lámparas de luz fluorescente blanca (38.0-45.7 μmol.m⁻². s⁻¹), durante ocho semanas.

Inducción de callo a partir del cultivo *in vitro* de hojas completas y segmentos foliares de *Euphorbia nutans* Lag.

A partir del caso anterior, y según los antecedentes sobre el efecto de BA para inducción de callo en otras plantas del género *Euphorbia* (Ripley & Preece, 1986; Jasrai *et al.*, 2003; Pickens *et al.*, 2005 y Perera & Trader, 2010), el medio de cultivo empleado fue Murashige & Skoog (1962) 100%, suplementado con mio-inositol 100 mg L⁻¹, tiamina-HCl 0.40 mg L⁻¹, sacarosa 30 g L⁻¹, BA con ANA en 10.0 mg L⁻¹, 7.0 g L⁻¹ de agar y 3.0 mg L⁻¹ de AgNO₃ (Aguilar-Jiménez & Rodríguez-De-la-O, 2020), ajustando el pH a 5.7 ± 0.01. Después de disolver el agar en el medio de cultivo, se vertió y se esterilizó como se mencionó anteriormente. En seguida, se elaboró un experimento con arreglo factorial 2 x 2 al sembrar hojas completas y segmentos foliares con el haz en contacto con el medio de cultivo y con el haz invertido; así como dos experimentos separados empleando segmentos foliares con el haz en posición normal e invertido, pero con hendidura de la nervadura central por la mitad. Todos los tratamientos tuvieron cinco repeticiones, considerando a cada tubo de ensayo con un explante como unidad experimental. Con respecto a los segmentos foliares, se obtuvieron tras eliminar los extremos de las hojas con ayuda de un bisturí. Posteriormente, se mantuvieron en incubación a 26 ± 2 °C y con 24 horas de luz artificial mediante lámparas de luz fluorescente blanca (38.0-45.7 μmol.m⁻². s⁻¹) por un periodo de ocho semanas.

Análisis fitoquímico de extractos a partir de plantas silvestres y de callos obtenidos *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag.

Para la extracción de metabolitos secundarios a partir de plantas silvestres recolectadas, 3.534 Kg de material vegetal se secó por dos semanas a temperatura ambiente y bajo sombra. A partir de este material, se efectuaron extracciones por meceración con diferentes disolventes siguiendo un orden ascendente de polaridad. Se añadieron 12 L de hexano y se dejó reposar por tres días; después se filtró el extracto y se destiló a vacío con ayuda de un rotaevaporador Büchi Heating Bath B-491 para recuperar el disolvente; esta operación se repitió tres veces. A continuación, al residuo vegetal se agregaron 10 L de cloruro de metileno bajo maceración por tres días, esta operación se repitió también tres veces; y finalmente, también se agregaron 10 L de metanol (MeOH) al residuo vegetal recuperado, efectuando el mismo procedimiento tres veces. Se obtuvieron 107.1 g de extracto hexánico, 85.8 g de extracto de diclorometano y 167.6 g de extracto de metanol, cuyo proceso de extracción se aprecia en la Figura 1.

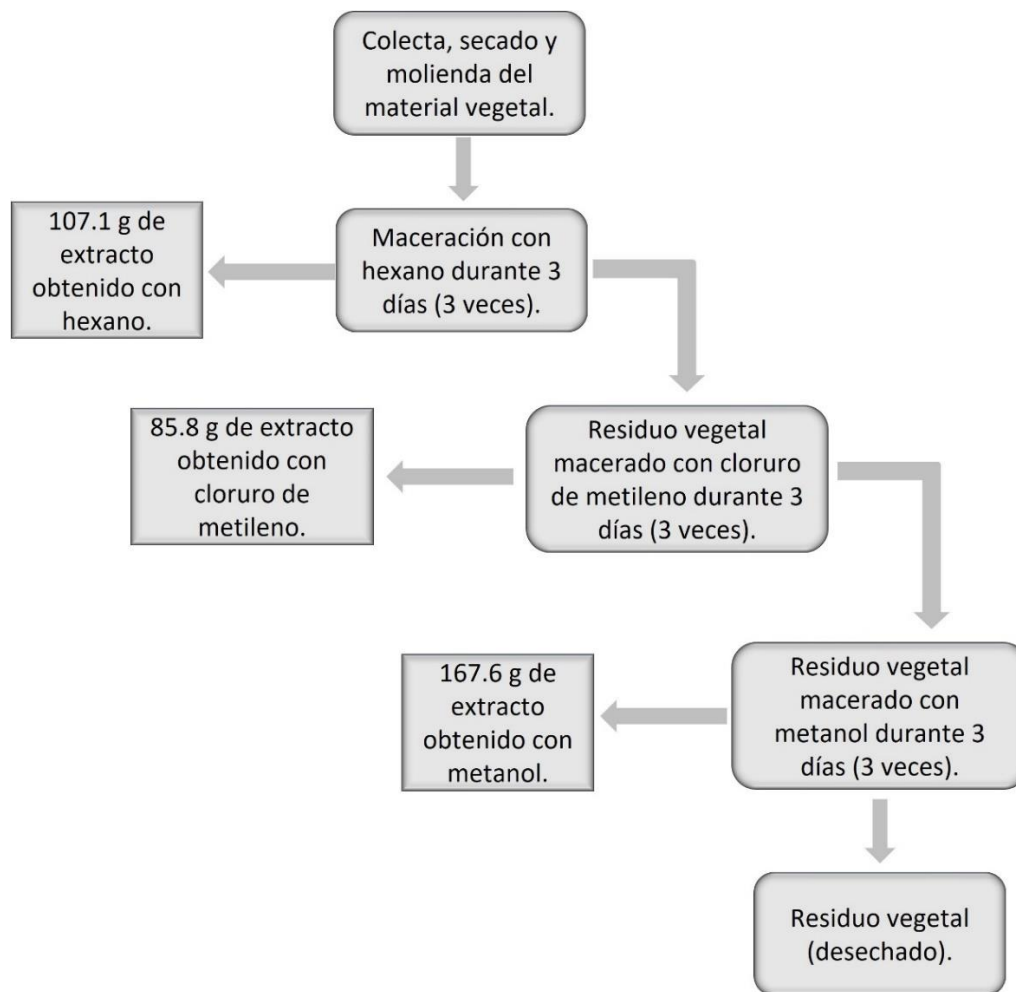


Figura 1. Diagrama del proceso para la obtención de extractos vegetales a partir de plantas silvestres de *Euphorbia nutans* Lag.

Figure 1. Diagram of the process for obtaining plant extracts from wild *Euphorbia nutans* Lag. plants.

Posteriormente, cada extracto se analizó mediante cromatografía en columna de vidrio (4.5 cm x 130 cm), empacada con 250 g de silicagel 60 (Malla 0.063-0.200 mm, Merck); se inició la separación de metabolitos secundarios con hexano y con cantidades crecientes de AcOEt y finalmente con AcOEt puro; se recogieron fracciones de 20 mL, mismas que fueron monitoreadas empleando cromatografía en capa delgada (Merck, TLC Silica gel 60 F254 25 Aluminium sheets 20 x 20 cm). Las fracciones fueron reunidas por su semejanza cromatográfica y se sometieron a estudios de RMN de ^1H .

Para la extracción de metabolitos secundarios a partir de callos *in vitro* de *Euphorbia nutans*, primero se retiraron de los frascos de cultivo y se dejaron a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, se pesaron 3.41 g y se sometieron a la técnica de reflujo por dos horas, la cual se repitió tres veces con tres disolventes diferentes, iniciando con el de menor a mayor polaridad (hexano, diclorometano y metanol, respectivamente) según lo recomendado por (Harborne, 1984). Los extractos obtenidos se concentraron con ayuda de un Rota evaporador Büchi Heating Bath B-491 y se mantuvieron en frascos color ambar hasta su posterior análisis mediante cromatografía en capa delgada y RMN de ^1H .

Análisis de datos

Los datos obtenidos para cada variable se sometieron a análisis de varianza y se aplicó la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para definir la diferencia entre los efectos medios de los tratamientos. El paquete estadístico empleado fue Minitab 17.

Para el análisis de metabolitos secundarios, los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C y DEPT en una dimensión, y los bidimensionales HSQC, HMBC y COSY, se determinaron en un espectrómetro Agilent 400 MHz DD2 (Santa Clara, CA, USA) con sintonías a 100 MHz para RMN de ^{13}C y a 400 MHz para RMN de ^1H . Los desplazamientos químicos se midieron en CDCl_3 (Cloroformo deuterado), las muestras fueron disueltas en 600 μL y colocadas en tubos de RMN de 5 mm de diámetro, empleando TMS (Tetrametil silano) como referencia interna y realizar su respectiva comparación. El equipo se ubica en el Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de callo a partir del cultivo *in vitro* de segmentos nodales de *Euphorbia nutans* Lag.

La inducción de callo estuvo influenciada principalmente por el tipo de auxina, siendo ANA la auxina con mejor efecto independientemente de la citocinina empleada (Kin, 2i-p o BA), a excepción del tratamiento con Kin + 2,4-D, que también favoreció la formación de tejido calloso, los resultados se presentan en la Figura 2 y Tabla 1. Por lo tanto, en *Euphorbia nutans* Lag. estos resultados no coinciden con lo publicado por Lozzi *et al.* (2018), quienes emplearon 2,4-D (0.55 mg L^{-1}) para formar callos de color blanco cremoso a partir de cotiledones maduros en *Ceratonia siliqua* L.; así como la respuesta obtenida por Hernández-Amasifuen *et al.* (2021) en *Capsicum pubescens* al emplear medio MS con 0.7 y 1.0 mg L^{-1} de 2,4-D; y por Millones-Yamunaqué *et al.* (2021), quienes obtuvieron una tasa del 100 % de callos friables en *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl. cultivando nudos cotiledonales en medio MS con 2,4-D desde 0.1 a 5.0 mg L^{-1} . Esto sugiere que, la respuesta a formar callo depende de la especie vegetal y 2,4-D no es de uso universal, o debe emplearse sin otros reguladores de crecimiento para favorecer esa respuesta. También, las respuestas obtenidas difieren de lo mencionado por Pierik (1990) y Kondamudi *et al.* (2009), pues la formación de callo en *Euphorbia nutans* Lag. no sucedió en el corte del tejido, sino en el segmento nodal donde existen yemas axilares (Figura 2, A-F) y tejidos con crecimiento activo. Esto coincide con lo reportado por Isah (2019), quien menciona la obtención de callo a partir de meristemos apicales en *Gymnema sylvestre* R. para regenerar brotes de forma indirecta; por lo tanto, estos resultados indican de la importancia de tejidos en crecimiento activo para favorecer la formación de callo, sin depender de la especie, coincidiendo con lo publicado por Perera & Trader (2010) en *Euphorbia pulcherrima* Will, quienes mencionan la obtención de callo a partir de yemas apicales y axilares empleando un medio de cultivo MS adicionado con BA y AIA, e incluso, adicionando únicamente BA como publicó Jasrai *et al.* (2003). Al analizar los resultados obtenidos con los de otras especies, parece indicar que, en *Euphorbia nutans* Lag., los explantes a partir de segmentos nodales no son idóneos para regenerar plantas *in vitro* de forma indirecta (Figura 2), pues según Albarrán-Mondragón *et al.* (2022), la mejor respuesta para inducción de callo a partir de secciones foliares en *Bromelia karatas* L., fue empleando un medio MS con BA (1.0 mg L^{-1}) + 2,4-D (0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg L^{-1}); y Fallah *et al.* (2022), mencionan algo similar para inducir callo a partir de brotes en zanahoria con medio MS adicionado BAP y 2,4-D (0.5 mg L^{-1}). También, tal vez falta evaluar otros reguladores de crecimiento, concentraciones y combinaciones como lo publicado por López-Ramírez *et al.* (2021), quienes lograron inducir callo en *Yucca carnerosana* Trel. empleando un medio MS adicionado con BA y ácido 4-aminotricloropicolínico (Picloram); pues con BA y 2,4-D, obtuvieron callos de aspecto compacto y necróticos como los obtenidos en la presente investigación con *Euphorbia nutans* Lag. (Figura 2).

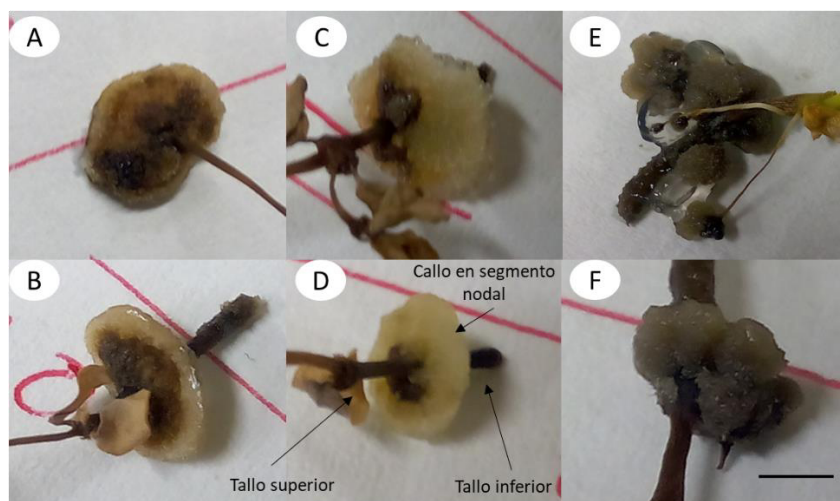


Figura 2. Formación de callos a partir de segmentos nodales de *Euphorbia nutans* Lag. en condiciones *in vitro*. A y B) Callos obtenidos con Kin + ANA, C y D) Callos obtenidos con 2i-p + ANA, E) Callos obtenidos con BA + ANA, F) Callos obtenidos con Kin + 2,4-D. Barra = 5 mm.

Figure 2. Callus formation from nodal segments of *Euphorbia nutans* Lag. in *in vitro* conditions. A and B) Calluses obtained with Kin + NAA, C and D) Calluses obtained with 2i-p + NAA, E) Calluses obtained with BA + NAA, F) Calluses obtained with Kin + 2,4-D. Bar = 5 mm.

Por otra parte, el peso de los callos parcialmente formados en los tratamientos con ANA, fue significativamente mejor con respecto a los demás tratamientos evaluados (Tukey, $p \leq 0.05$). No obstante, al comparar esa respuesta con la obtenida en otras especies empleando los mismos reguladores de crecimiento, son resultados inferiores, por ejemplo, a lo reportado por Lozzi *et al.* (2018), quienes a partir de explantes de cotiledones en *Ceratonia siliqua* L. lograron 32.5 g de callos blancos cremosos con 2,4-D (0.55 mg L^{-1}). Sin embargo, la respuesta para formar callo en *Euphorbia nutans* Lag. a partir de segmentos nodales, tal vez dependa de ANA sin citocinina y en diferente concentración (Tabla 1). Tal es el caso de 2,4-D, ya que los resultados obtenidos no coinciden con lo publicado por Lozzi *et al.* (2018), Hernández-Amasifuen *et al.* (2021) y Millones-Yamunaqué *et al.* (2021), quienes mencionan a 2,4-D para formar callo. Pero en este trabajo, el efecto de 2,4-D se vio inhibido por las citocininas, excepto cuando se combinó con Kin y favoreció parcialmente callo tipo 2 en el 70 % de explantes, respuesta que coincide con Abbas (1993) al emplear 2,4-D y Kin. También, ANA + BA tuvieron menor respuesta (40%) que Kin y 2i-p con ANA (70%), posiblemente porque BA está indicada para organogénesis directa como indica Rangel-Estrada *et al.* (2015) en *Euphorbia pulcherrima* Will, a partir de segmentos nodales y en concentraciones menores (2.0 y 1.0 mg L^{-1}) a las manejadas en este trabajo, pudiendo causar antagonismo con ANA. Esto sugiere que, en estudios posteriores, se evalúe con otras citocininas, diferentes concentraciones y otros explantes; pues Preciado *et al.* (2016) mencionan al ANA con cinetina (1.0 mg L^{-1}) para formar callos en *Jatropha cuneata* Wiggins & Rollins a partir de hojas. Por otra parte, Rodríguez *et al.* (2014) publicaron que ANA fue el mejor regulador para inducir callo en *Ugni molinae* T., igualmente son resultados similares a los publicados por Lee & Starratt (1972) en *Euphorbia esula* L. y *Euphorbia cyparissias* L. para obtener callos con ANA, coincidiendo parcialmente con los obtenidos en *Euphorbia nutans* Lag. Esto indica que ANA, favorece la dediferenciación celular, resultando interesante para regenerar plantas *in vitro* de manera indirecta independientemente de la especie (Tabla 1).

Tabla 1. Inducción de callos *in vitro* a partir de segmentos nodales de *Euphorbia nutans* Lag.
Table 1. *In vitro* callus induction from nodal segments of *Euphorbia nutans* Lag.

Tratamiento	Porcentaje de respuesta (%)	Características del callo		Peso de callo (g)
		Color	Textura	
Kin con ANA	70	Marrón/cremoso	Compacta	0.0321 a
2i-p con ANA	90	Cloróticos	Compacta	0.0381 a
BA con ANA	40	Gris oscuro	Compacta	0.0401 a
Kin con 2,4-D	70	Gris oscuro	Compacta	0.0245 b

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

Responses to callus formation *in vitro* in nodal segments of *Euphorbia nutans* Lag., by treatment. Treatments that have the same letter are not statistically different (Tukey, $p \leq 0.05$).

No obstante, Ripley & Preece (1986) mencionan que BA no es necesaria para la proliferación de brotes axilares en *Euphorbia lathyris* L., pero sí fue fundamental para la obtención de callo y brotes adventicios. Sin embargo, en *Euphorbia nutans* Lag. BA no fue favorable para obtener callo cuando se combinó con 2,4-D y TDZ, sólo con ANA; esto sugiere que BA no es compatible con otras auxinas para formar callo, coincidiendo esta observación con lo mencionado por Janarthanam *et al.* (2010) en *Stevia rebaudiana* Bert. (*Asteraceae*), quienes obtuvieron callo para análisis de metabolitos secundarios empleando 0.5 mg L⁻¹ de ANA + 0.5 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1.0 mg L⁻¹ de Kin, sin BA. Sin embargo, BA sí es importante para el proceso de organogénesis como mencionan Xu *et al.* (2008) en *Euphorbia ésula* L., quienes obtuvieron brotes a partir de callo después de treinta días de cultivo *in vitro* en medio MS adicionando BAP y AIB, así como a lo reportado por Ali & Tariq (2013) en *Momordica charantia* cv. Jaunpuri (*Cucurbitaceae*) cuando emplearon BAP, AIA y 2,4-D, al ser mejor la combinación BAP + 2,4-D al igual que lo publicado por Fallah *et al.* (2022); o a lo mencionado por Preciado *et al.* (2016) en *Jatropha cuneata* Wiggins & Rollins, y ser mejor ANA con cinetina que 2,4-D. Sin embargo, Arzate-Fernández *et al.* (2020) publican que a mayor concentración de 2,4-D en todos los explantes de *Agave marmorata* R., el peso de callo aumentó, resultados totalmente diferentes a los obtenidos en *Euphorbia nutans* Lag., donde la única combinación que favoreció la formación de callo de coloración gris oscuro y poco friable, de manera similar a López-Ramírez *et al.* (2021), fue con Kin + 2,4-D. Así mismo, Álvarez-Aragón *et al.* (2020) mencionan el empleo de 2,4-D con BA para la obtención de callo a partir de semillas maduras en *Agave marmorata* R., y Fallah *et al.* (2022) también mencionan a 2,4-D y BAP para inducir callo a partir de brotes de zanahoria. Sin embargo, en el presente trabajo con *Euphorbia nutans* Lag., esa respuesta no fue favorecida. Esto sugiere que las respuestas morfogénicas pueden estar controladas a nivel de receptores celulares, y dichos receptores pueden variar no sólo de la especie, sino del tipo de explante; o incluso, dichas respuestas dependen de la especie, de la concentración y combinación de reguladores de crecimiento como señala Gätjens-Boniche *et al.* (2018) en *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (*Orchidaceae*) al obtener callos protocórmicos con BAP y 2,4-D en 1.0 y 0.5 mg L⁻¹ respectivamente; y a lo mencionado por Wu *et al.* (2019), quienes lograron mantener cultivos de callos de *Lilium brownii* FEBr. ex Meillez. empleando medio MS suplementado con 30.0 g L⁻¹ de sacarosa, 8.0 g L⁻¹ de agar, adicionado con 2,4-D, ANA y BA o thidiazuron (TDZ) o zeatina.

Inducción de callo a partir del cultivo *in vitro* de hojas completas y segmentos foliares de *Euphorbia nutans* Lag.

Los resultados indican que la posición de la hoja en el medio de cultivo no representa un factor determinante en la formación de callo (Tabla 2), sino el contacto de la parte basal de la hoja con éste. Como se puede apreciar en la Figura 3, el callo se formó en el peciolo de las hojas, por lo tanto, la formación de callo será positiva siempre y cuando la hoja lleve parte del peciolo y éste

quede en contacto con el medio de cultivo, independientemente de si el haz foliar se coloca hacia arriba o hacia abajo sobre el medio de cultivo. Por ello, las respuestas obtenidas con hojas como explantes sí coinciden con lo citado por Pierik (1990) y Kondamudi *et al.* (2009), ya que parece ser necesario causar una herida para inducir respuesta callogénica en los explantes, lo que resulta similar a la respuesta obtenida (callo) en otras especies como reporta Albarrán-Mondragón *et al.* (2022) cuando cultivaron secciones de hojas en *Bromelia karatas* L. De igual forma, los resultados obtenidos fueron similares a lo mencionado por Mathur & Hülskamp (2002) sobre la importancia de los microtúbulos y microfilamentos de actina, así como el citoesqueleto en el control de la morfogénesis de las plantas; pues como es evidente, en ninguna otra parte de la hoja se indujo la formación de callo sino sólo en el peciolo, el cual fue “herido” con el bisturí. No obstante, es fundamental que el tejido herido quede en contacto con el medio de cultivo, ya que los peciolos heridos que quedaron sin contacto con el medio no tuvieron respuestas (Figura 3).

Tabla 2. Inducción de callos *in vitro* a partir de hojas completas y segmentos foliares de *Euphorbia nutans* Lag.
Table 2. *In vitro* callus induction from complete leaves and leaf segments of *Euphorbia nutans* Lag.

Explante	Porcentaje de respuesta (%)	Características del callo		Peso de callo (g)
		Color	Textura	
Hoja completa HazA	100	Verde claro	Poco cristalino	0.0174 c
Hoja completa HazB	40	Clorótico	Poco cristalino	0.0113 c
Segmento foliar HazA	100	Gris oscuro	Compacta	0.8830 b
Segmento foliar HazB	100	Gris oscuro con tonos rojos	Compacta	0.8220 b
Segmento foliar HazA con nervadura central hendida	100	Verde limón	Friable	1.9355 a
Segmento foliar HazB con nervadura central hendida	100	Verde limón	Friable	1.9078 a

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

HazA: Envés de la hoja en contacto con el medio de cultivo.

HazB: Haz de la hoja en contacto con el medio de cultivo.

Responses to callus formation *in vitro* in nodal segments of *Euphorbia nutans* Lag., by treatment. Treatments that have the same letter are not statistically different (Tukey $p \leq 0.05$).

BeamA: Underside of the leaf in contact with the culture medium.

BeamB: Beam of the leaf in contact with the culture medium.

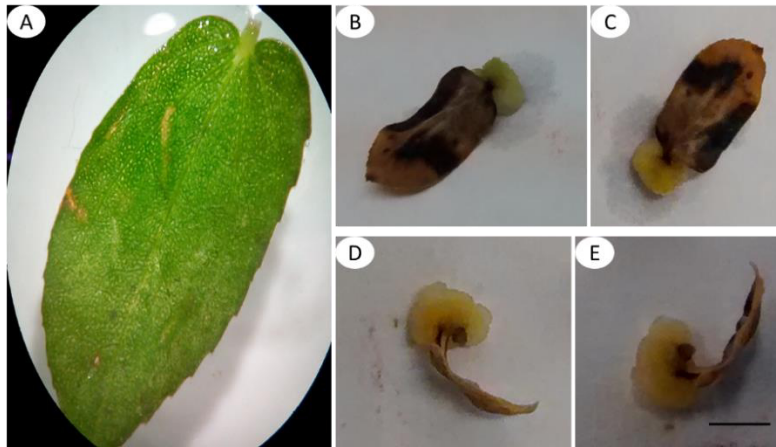


Figura 3. Callos formados en hojas completas *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. A) Hoja completa de *Euphorbia nutans* Lag., B) y C) Respuesta para formación de callo en hojas completas con el haz hacia arriba, D y E) Respuesta para formación de callo en hojas completas con el haz hacia abajo. Barra = 5 mm.

Figure 3. Calluses formed on complete leaves *in vitro* of *Euphorbia nutans* Lag. A) Complete leaf of *Euphorbia nutans* Lag., B) and C) Response for callus formation on complete leaves with the bundle facing up, D and E) Response for callus formation on complete leaves with the bundle facing down. Bar = 5 mm.

Con respecto al color de callo obtenido en *Euphorbia nutans*, los resultados son similares a lo publicado por Perera & Trader (2010) en *Euphorbia pulcherrima* Will empleando medio MS + BA y BA + AIA, así como a lo mencionado por Jasrai *et al.* (2003), pues también observaron la presencia de callos color blanco y color gris-verde después de un mes de cultivo. Esto sugiere que probablemente, son respuestas en común para plantas de la familia *Euphorbiaceae* (Figura 4); aclarando que en *Euphorbia nutans* Lag., las tonalidades color rojo aparecieron después de tres semanas de cultivo *in vitro* y no fue una coloración homogénea del callo, sólo en ciertos sitios de manera similar a lo que sucede en las hojas de las plantas en campo (Figura 4).

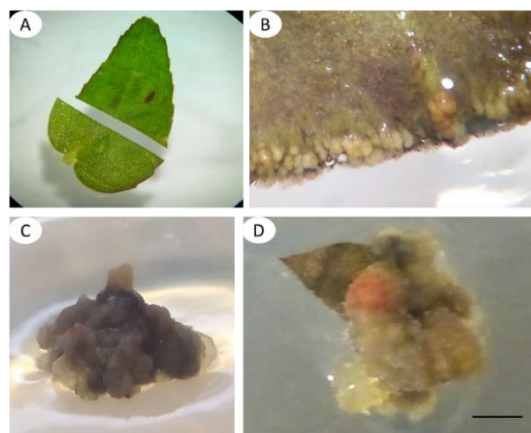


Figura 4. Respuestas a la formación de callo *in vitro* en segmentos de lámina foliar media de *Euphorbia nutans* Lag. sin hendir la nervadura central por la mitad. A) Restos de hoja después de aislar la parte media, B) Inicio de respuesta a callo en el margen foliar herido con el bisturí, C) Formación de callo a los 30 días de cultivo *in vitro* a partir del segmento de lámina foliar con el haz en contacto con el medio de cultivo, D) Formación de callo con coloración rojiza en segmento de lámina foliar a los 15 días de cultivo *in vitro* con el envés en contacto con el medio de cultivo. Barra = 5 mm.

Figure 4. Responses to *in vitro* callus formation in middle leaf blade segments of *Euphorbia nutans* Lag. without splitting the central rib in half. A) Leaf remains after isolating the middle part, B) Beginning of callus response on the leaf margin wounded with the scalpel, C) Callus formation after 30 days of *in vitro* culture from the leaf blade segment with the side in contact with the culture medium, D) Formation of callus with reddish color in leaf blade segment after 15 days of *in vitro* culture with the underside in contact with the culture medium. Bar = 5 mm.

Por otra parte, la inducción de callo friable en *Euphorbia nutans* Lag., sucedió de forma significativa (Tukey, $p \leq 0.05$) cuando se sembraron segmentos de lámina foliar y se escindió la nervadura central justo por la mitad (Tabla 2 y Figura 5). Con ello, la respuesta obtenida fue independientemente de la posición del explante, resultados que refuerzan lo publicado por Šamaj *et al.* (2004) y Mathur & Hülskamp (2002) sobre la importancia de exponer dichas estructuras celulares directamente con el medio de cultivo. Así mismo, Pickens *et al.* (2005) mencionan que la mayoría de callos y brotes en *Euphorbia pulcherrima* Will., se obtuvieron a partir de secciones de la vena media de las hojas cultivadas *in vitro* con BA y AIA durante un mes, y Naz *et al.* (2011) menciona tejidos de hojas cotiledonales de *Ricinus communis* L. para inducción de callo. De acuerdo a las respuestas obtenidas en *Euphorbia nutans* Lag., y a lo citado por Ripley & Preece (1986) en *Euphorbia lathyris* L. con BA para formación de callo, Jasrai *et al.* (2003) y Perera & Trader (2010) en *Euphorbia pulcherrima* Will. con BA y AIA, se puede ver que BA juega un papel muy importante para la formación de callo con o sin auxinas, dependiendo de la concentración, especie vegetal y explante utilizado como explicó Arzate-Fernández *et al.* (2020) para obtener callos compactos color crema, compactos amarillentos y hasta callos friables con cubierta mucilagenosa en especies de *Agave*. No obstante, recordar que la mejor respuesta para obtener callo en *Jatropha cuneata* a partir de hojas por Preciado *et al.* (2016), fue cuando emplearon ANA con cinetina y no con 2,4-D. Esto sugiere que, la combinación de BA y ANA, puede ser una excelente alternativa para la dediferenciación celular de tejidos vegetales *in vitro*, y que explantes a partir de hojas pueden ser una excelente alternativa como fuente de explantes para la formación de tejido calloso (Hernández-Amasifuen *et al.*, 2021; Albarrán-Mondragón *et al.*, 2022). Por lo tanto, es importante seguir trabajando en detallar protocolos de respuestas morfogénicas en *Euphorbia nutans* Lag. de acuerdo a los estudios posteriores que resulten de interés.

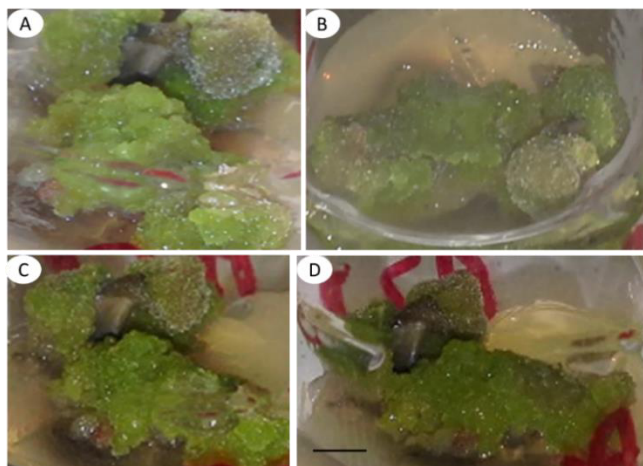


Figura 5. Obtención de callos *in vitro* en *Euphorbia nutans* Lag. a partir de segmentos de lámina foliar, con la nervadura central hendida por la mitad a 7 días de cultivo en medio MS 100% + BA y ANA 10.0 mg L⁻¹. A-B) Haz foliar en contacto con el medio de cultivo, C-D) Envés foliar en contacto con el medio de cultivo. Barra = 5 mm.

Figure 5. Obtaining *in vitro* callus in *Euphorbia nutans* Lag. from leaf blade segments, with the central vein split in half after 7 days of culture in 100% MS medium + BA and NAA 10.0 mg L⁻¹. A-B) Leaf surface in contact with the culture medium, C-D) Leaf surface in contact with the culture medium. Bar = 5 mm.

Análisis fitoquímico de extractos a partir de callos obtenidos *in vitro* y de plantas silvestres de *Euphorbia nutans* Lag.

Los metabolitos identificados en el extracto hexánico fueron: en las fracciones 139-148 eluidas con hexano:AcOEt (95:5), se aisló un sólido cristalino denominado acetato de α -amirina, identidad que fue confirmada al comparar sus propiedades espectroscópicas con las descritas en la literatura (Bhattacharyya & Barros, 1985; Ipav *et al.*, 2022b), de las fracciones 200-223 eluidas con hexano:AcOEt (9:1), se obtuvo otro sólido cristalino identificado como β -lupeol, mismo que que coincidió con las características espectroscópicas publicadas recientemente (Ipav *et al.*, 2022a), de las fracciones 252-303 eluidas con hexano:AcOEt (9:1); se visualizaron en su espectro de RMN de ^1H , β -sitosterol, estigmasterol y β -lupeol, mismos que fueron separados por recromatografías sucesivas cuyos datos espectroscópicos correspondieron a los esteroides aislados previamente de *Rubus suavissimus* (Chaturvedula & Prakash, 2012). Por otro lado, los metabolitos identificados en el extracto de diclorometano (CH_2Cl_2) son: en las fracciones 97-100 eluidas con hexano:AcOEt (95:5) se aisló e identificó β -sitosterol y una mezcla de 24-metilen cicloartan-3 β -ol (Kikuchi *et al.*, 1986). De las fracciones 101-126 eluidas con hexano:AcOEt (95:5) se aisló β -lupeol (Aguilar-Jiménez *et al.*, 2015). En el extracto de metanol los metabolitos identificados fueron: de las fracciones 1-40 eluidas con cloruro de metileno, estigmasterol y β -sitosterol; y de las fracciones 511-570 eluidas con CH_2Cl_2 :MeOH (1:1), se encontró un metabolito tipo iridoide por comparación de sus datos espectroscópicos de RMN de ^1H con los descritos en la literatura (El-Naggar & Beal, 1980).

El análisis de extractos mediante TLC, reveló algunas diferencias entre extractos de callos producidos *in vitro* con respecto a los obtenidos de plantas silvestres (Figura 6). Por lo tanto, sí se está de acuerdo de forma parcial con Kreis (2007), porque existe la posibilidad de no haber obtenido los mismos metabolitos a partir de células indiferenciadas como se aprecia en la placa TLC, específicamente en extracto con hexano de plantas silvestres; observándose en el primer carril, de izquierda a derecha, dos bandas (señaladas con flechas color rojo) que corresponde a dos posibles metabolitos no presentes en el extracto hexánico de callos (Figura 6). Sin embargo, resulta lógico que haya variaciones entre los dos extractos porque las condiciones en campo son diferentes a las condiciones *in vitro*. Por lo tanto, existen variaciones en la biosíntesis de metabolitos secundarios, moléculas que ayudan a sobrevivir a las plantas bajo ciertas situaciones de estrés (Taiz & Zeiger, 2006; Verpoorte *et al.*, 2000), y no porque se trate de células indiferenciadas. Además, se aprecian en la placa cromatográfica, para los extractos de callos con cloruro de metileno (CH_2Cl_2) y con metanol (CH_3OH), la presencia de las mismas bandas que en extractos de plantas silvestres (Figura 6, carriles 4 y 6, respectivamente), y además, otras bandas (señaladas con flechas color amarillo y azul) que no se observan en los extractos de plantas silvestres con los mismos disolventes (Figura 6, carriles 4 y 5). Estos resultados son similares a los obtenidos en especies diferentes como mencionan Janarthanam *et al.* (2010) en *Stevia rebaudiana*, ya que encontraron los principales compuestos activos en células indiferenciadas cultivadas *in vitro*. Así mismo, López-Ramírez *et al.* (2021) mencionan que un análisis cromatográfico y espectrométrico, les permitió separar e identificar 22 compuestos en callos, 26 en plantas *in vitro* y 27 en plantas *ex vitro* de *Yucca carnerosana* Trel. De forma similar, Ali & Tariq (2013) mencionan que las plantas de *Momordica charantia* cv. Jaunpuri cultivadas en campo, mostraron mayor cantidad de metabolitos secundarios que los callos a partir de plántulas *in vitro*. Sin embargo, al emplear cotiledones como explantes para formar callo, observaron que los metabolitos secundarios obtenidos eran comparativamente similares con ligeras variaciones. Incluso, al comparar la extracción de metabolitos a partir de entrenudos de plantas crecidas en campo, con los obtenidos en cultivos de callo, en ambos casos se encontró el ácido alfa-eleostearico, un ácido graso específico de *Momordica* sp. Todo ello sugiere que, la biosíntesis de metabolitos a partir de tejidos indiferenciados (callos) sí es posible, e incluso, pueden obtenerse otros metabolitos secundarios que no se encuentran en plantas silvestres o en campo, pero se debe contar con protocolos rigurosos para controlar su producción mediante el empleo de elicitors celulares y cultivos específicos (Baldi *et al.*, 2007), e incluso, considerar que el éxito en ello puede depender del tipo de explante empleado (Ali & Tariq, 2013). Por ello, se sugiere que en estudios fitoquímicos posteriores se consideren callos, plantas diferenciadas *in vitro* y material vegetal silvestre.

Posible banda del metabolito
24-metileno-cicloart-3 β -ol
(c).

Bandas del metabolito β -lupeol (l).

Bandas del metabolito
 β -sitosterol (s).

Bandas del metabolito
estigmasterol (e).

Bandas del metabolito
acetato de α -amirina (a).

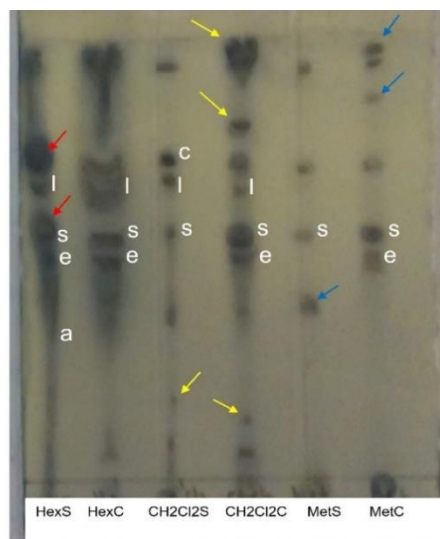


Figura 6. Placa cromatográfica en capa delgada en la que se utilizó una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 7/3 (v/v) como eluyente, para comparar los metabolitos obtenidos en extractos de plantas silvestres vs extractos de callos *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. HexS: Extracto hexánico de plantas silvestres, HexC: Extracto hexánico de callos, $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{S}$: Extracto con diclorometano de plantas silvestres, $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{C}$: Extracto con diclorometano de callos, MetS: Extracto con metanol de plantas silvestres, MetC: Extracto con metanol de callos.

Figure 6. Thin layer chromatographic plate in which a mixture of $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 7/3 (v/v) was used as eluent, to compare the metabolites obtained in wild plant extracts vs *in vitro* callus extracts of *Euphorbia nutans* Lag. HexS: Hexane extract of wild plants, HexC: Hexane extract of calluses, $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{S}$: Dichloromethane extract of wild plants, $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{C}$: Dichloromethane extract of calluses, MetS: Methanol extract of wild plants, MetC: Methanol extract of calluses.

Por otra parte, el análisis mediante RMN ^1H reveló que los metabolitos secundarios obtenidos a partir de plantas silvestres en el extracto con hexano, fueron: β -sitosterol (1), estigmasterol (2), β -lupeol (3) y acetato de α -amirina (4); cuyas estructuras moleculares se muestran en la Figura 7. En el extracto de diclorometano se identificaron los metabolitos 1, 2, 3, y 24-metileno-cicloart-3 β -ol (5), cuyas características espectroscópicas coincidieron con el un cicloartano, aislado e identificado, presente en *Nervilia purpurea* S. (Kikuchi *et al.*, 1986). En el extracto metanólico, se identificaron los metabolitos 1 y 2; y se detectó un metabolito interesante de tipo iridoide (6), sus características espectroscópicas corresponden a la estructura general de un iridoide (El-Naggar & Beal, 1980), el cual no ha sido descrito en plantas de la familia *Euphorbiaceae*, por lo que este estudio es el primero en reportarlo, así como el primer estudio fitoquímico que se describe para la planta *Euphorbia nutans* Lag. (Aguilar-Jiménez *et al.*, 2015). Así mismo, el análisis mediante RMN ^1H del extracto con metanol a partir de callos, reveló sacarosa abundante; posiblemente porque el medio de cultivo fue adicionado con sacarosa, y las condiciones *in vitro* permitieron mayor biosíntesis de ella, entre otros metabolitos secundarios (Baldi *et al.*, 2007; Sakunphueak & Panichayupakaranant, 2010; Pérez-Alonso & Jiménez, 2011) y no se inhibieron por tratarse de tejidos no diferenciados como menciona Kreis (2007), pues se ha demostrado la posibilidad de obtener metabolitos secundarios en células indiferenciadas (Janarthanam *et al.*, 2010; Ali & Tariq, 2013; Aguilar *et al.*, 2019). Así mismo, es importante realizar comparaciones fitoquímicas en igualdad de condiciones, y no argumentar que en cultivos *in vitro* no se obtienen los mismos metabolitos o las mismas cantidades, cuando se consideran partes botánicas diferentes, como frutos maduros vs callo u hojas *in vitro* (Albarrán-Mondragón *et al.*, 2022), ya que los metabolitos secundarios de plantas no siempre se encuentran de forma generalizada, e incluso, pueden estar presentes sólo en partes muy específicas de ellas (Harborne, 1984). Por lo tanto, es importante ajustar las condiciones *in vitro* que permitan obtener respuestas deseadas a partir de cultivos diferenciados e indiferenciados (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011).

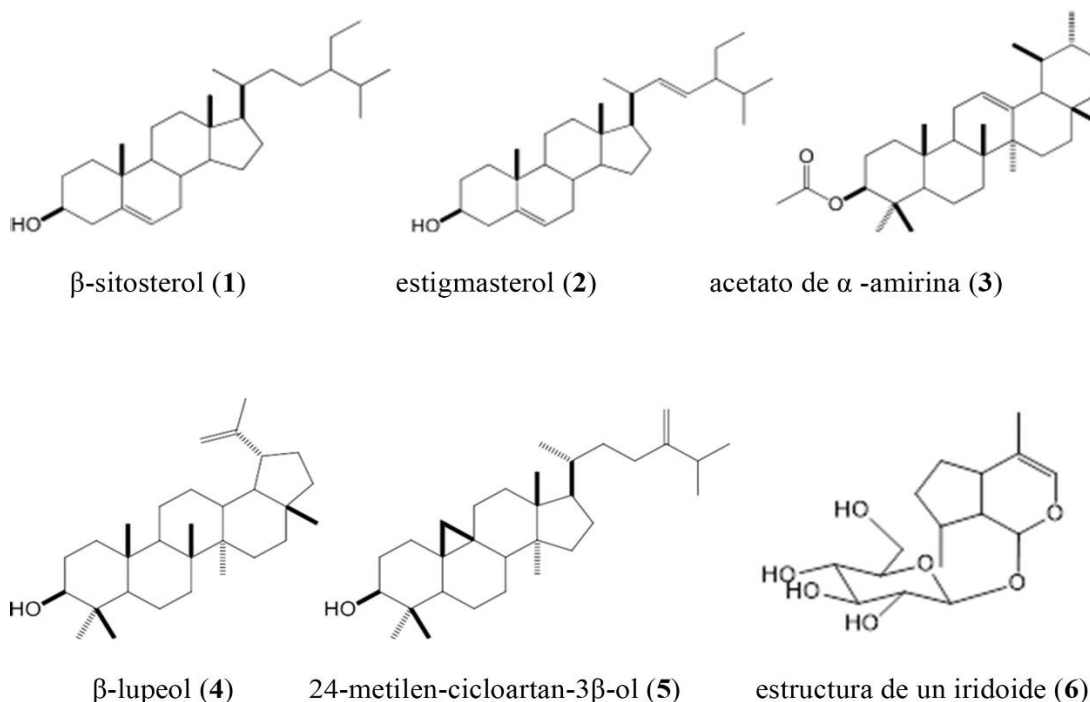


Figura 7. Estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados de *Euphorbia nutans* Lag.
Figure 7. Molecular structure of the secondary metabolites isolated from *Euphorbia nutans* Lag.

CONCLUSIONES

Fue posible la inducción de callo en segmentos nodales, de forma significativa solo en los medios de cultivo con ANA, independientemente de la citocinina empleada. Con el empleo de segmentos de lámina foliar con nervadura central hendida por la mitad, sin importar su posición en el medio de cultivo, se logró la máxima producción de callo friable con color verde limón y apariencia mucilaginosa.

Las placas cromatográficas, revelaron la presencia de los mismos metabolitos en extractos de callos *in vitro* y en extractos de plantas silvestres de *Euphorbia nutans* Lag. con algunas variaciones, que posiblemente correspondan a otros metabolitos secundarios presentes en callos. Finalmente, el análisis mediante RMN ^1H permitió identificar seis metabolitos secundarios conocidos: β -sitosterol, stigmasterol, acetato de α -amirina, β -lupeol, 24-metilen-cicloartan-3 β -ol y un metabolito tipo iridoide; confirmado que el cultivo de células indiferenciadas *in vitro*, también pueden realizar la biosíntesis de metabolitos secundarios.

LITERATURA CITADA

- Abbas, N. (1993). *Studies on somatic embryogenesis and organogenesis in three economic plants, Mallotus philippensis, Aleurites fordii - mature endosperm, Trachyspermum ammi, seedling explants*. India: Thesis submitted to University of Delhi.
- Aguilar Jiménez, D., Rodríguez De la O, J. L., Piña Guillén, J., & Silva Díaz, V. (2019). Propagación *in vitro* de *Stevia rebaudiana* y análisis preliminar de esteviósidos. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 10(1), 197-204. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i1.1543>

- Aguilar-Jiménez, D., & Rodríguez-De-la-O, J. L. (2020). Efecto de nitrato de plata en la germinación *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. *Bioteología Vegetal*, 20(4), 338-350. eISSN 2074-8647, RNPS: 2154.
- Aguilar-Jiménez, D., Rodríguez-De-la-O, J. L., Reyes-Trejo, B., & Martínez-Solís, J. (2015). Respuestas morfogénicas *in vitro* y caracterización fitoquímica de la *Euphorbia nutans* Lag. Texcoco, Estado de México: Tesis de maestría, Universidad Autónoma Chapingo. <https://repositorio.chapingo.edu.mx/handle/123456789/1255>.
- Albarrán-Mondragón, F. J., Orozco-Villafuerte, J., Mulia-Rodríguez, J., Hernández-Jaimes, C., Cruz-Sosa, F., & Buendía-González, L. (2022). Total phenolic content in fruits and in *in vitro* cultures of *Bromelia karatas* L. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 21(1), Bio2685. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio2685>
- Ali, S., & Tariq, A. (2013). Analysis of secondary metabolites in callus cultures of *Momordica charantia* cv. Jaunpuri. *Biología (Pakistan)*, 59(1), 23-32.
- Alvarez-Aragón, C., Arzate-Fernández, A. M., Martínez-Martínez, S. Y., & Martínez-Velasco, I. (2020). Regeneración de plantas de *Agave marmorata* Roetzl, vía embriogénesis somática. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(36). Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/349107101>.
- Anand, M., & Basavaraju, R. (2021). A review on phytochemistry and pharmacological uses of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *Journal of ethnopharmacology*, 265(113270). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113270>
- Andújar, I., González, M., García-Ramos, J. C., Hajari, E., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., Escalona, M. (2023). Are silver nanoparticles the “silver bullet” to promote diterpene production in *Stevia rebaudiana*? *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 155(2), 447-453. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02450-5>
- Arzate-Fernández, A. M., Martínez Velasco, I., Alvarez-Aragón, C., Martínez Martínez, S. Y., & Norman-Mondragón, T. H. (2020). Respuesta morfogénica de dos especies de agave regeneradas *in vitro*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(47). Obtenido de <https://www.researchgate.net/publication/342535024>.
- Baldi, A., Bisaria, V. S., & Srivastava, A. K. (2007). Biotechnological Approaches for the Production of some Promising Plant-Based Chemotherapeutics. En O. K. Quax, *Medicinal Plant Biotechnology. From Basic Research to Industrial Applications* (págs. 117-156). Weinheim, Alemania: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527619771.ch7>
- Bhattacharyya, J., & Barros, C. B. (1985). Triterpenoids of *Cnidioscolus urens*. *Phytochemistry*, 25(1), 274-276. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94550-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94550-3)
- Bourgaud, F., Grivot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)
- Chaturvedula, V. S., & Prakash, I. (2012). Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(9), 239-242. <https://doi.org/10.3329/icpj.v1i9.11613>.
- El-Naggar, L. J., & Beal, J. L. (1980). Iridoids. A review. *Journal of Natural Products*, 43(6), 649-707. <https://doi.org/10.1021/np50012a001>
- Fallah Ziarani, M., Tohidfar, M., & Navvabi, M. (2022). Modeling and optimizing *in vitro* percentage and speed callus induction of carrot via Multilayer Perceptron-Single point discrete GA and radial basis function. *BMC Biotechnology*, 22, 34. <https://doi.org/10.1186/s12896-022-00764-4>
- Gätjens-Boniche, O., Acuña-Matamoros, C. L., Montero-Carmona, W., Díaz, C., & Torres, S. (2018). Propagación masiva y formación de callos protocórmicos de *Vainilla* a partir de ápices radicales. *Polibotánica* 45, 157-180. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.45.12>
- Harborne, H. B. (1984). *Phytochemical Methods (A guide to modern techniques of plant analysis)* (Second edition ed.). New York: Chapman and Hall. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5570-7>
- Hernández-Amasifuen, A. D., Argüelles-Curaca, A., Cortez-Lázaro, A. A., & Díaz-Pillasca, H. B. (2021). Inducción *in vitro* de callos a partir de explantes foliares en rocoto (*Capsicum*

- pubescens* Ruiz & Pav.). *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 34(2), 131-140. <https://doi.org/10.17163/lgr.n34.2021.09>
- Ipav, S. S., Igoli, J. O., Tor-Anyiin, T. A., & Anyam, J. V. (2022a). Isolation and characterisation of lupeol and lupeol acetate from propolis obtained from Benue state. *Journal of Chemical Society of Nigeria*, 47(1). <https://doi.org/10.46602/jcsn.v47i1.708>
- Ipav, S. S., Igoli, J. O., Tor-Anyiin, T. A., & Anyam, J. V. (2022b). Isolation and characterisation of alpha and beta amyryns from propolis obtained from Benue state. *Journal of Chemical Society of Nigeria*, 47(2). <https://doi.org/10.46602/jcsn.v47i2.723>
- Isah, T. (2019). De novo *in vitro* shoot morphogenesis from shoot tip-induced callus cultures of *Gymnema sylvestri* (Retz.) R.Br. ex Sm. *Biological Research*, 52(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0211-1>
- Janarthanam, B., Gopalakrishnan, M., & Sekar, T. (2010). Secondary metabolite production in callus cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 45(3), 243-248. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v45i3.6532>
- Jasrai, Y., Thaker, K., & D'Souza, M. (2003). *In vitro* Propagation of *Euphorbia pulcherrima* Willd. Through Somatic Embryogenesis. *Plant Tissue Culture*, 31-36.
- Kikuchi, T., Kadota, S., & Tsubono, K. (1986). Studies on the Constituents of Orchidaceous Plants. IV. Proton and Carbon 13 Signal Assignments of Cycloecalenol –Type Triterpenes from *Nervilia purpurea* Schlechter by Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34(6), 2479-2486. <https://doi.org/10.1248/CPB.34.2479>
- Kondamudi, R., Sri R, M. K., & Pullaiah, T. (2009). Euphorbiaceae - a critical review on plant tissue culture. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(3), 313-335.
- Kreis, W. (2007). *In vitro* culturing techniques of medicinal plants. En O. Q. Kayser, *Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial applications* (págs. 157-185). Weinheim, Alemania: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527619771.ch8>
- Lee T, T., & Starratt A, N. (1972). Growth substance requirements and major lipid constituents of tissue cultures of *Euphorbia esula* and *E. cyparissias*. *Canadian Journal Botany*, 50, 723-726. <https://doi.org/10.1139/b72-090>
- López-Ramírez, Y., Cabañas-García, E., Areche, C., Trejo-Tapia, G., Pérez-Molphe-Balch, E., & Gómez-Aguirre, Y. A. (2021). Callus induction and phytochemical profiling of *Yucca carnerosana* (Trel.) McKelvey obtained from *in vitro* cultures. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 20(2), 823-837. <https://doi.org/10.24275/rmiq/Bio2209>
- Lozzi, A., Abdelwahd, R., Alami-Halimi, D., Mentag, R., & Abousalim, A. (2018). Optimization of a mature cotyledons-based *in vitro* culture system for embryogenic-callus induction in carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 25(1), 71-84. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2018.06.053>
- Mathur, J., & Hülskamp, M. (2002). Microtubules and microfilaments in cell morphogenesis in higher plants. *Current Biology*, 12(19), R669-76. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)01164-8](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01164-8)
- Millones-Yamunaqué, A. M., Delgado-Paredes, G. E., Vásquez-Díaz, C., & Rojas-Idrogo, C. (2021). Callus induction, clonal propagation and *in vitro* germplasm conservation of 'hualtaco' *Loxopterygium huasango* Spruce ex Engl. (Anacardiaceae). *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 545-556. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.059>
- Mukul, A., & Basavaraju, R. (2021). A review on phytochemistry and pharmacological uses of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *Journal of Ethnopharmacology*, 265. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113270>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Naz, S., Tabassum, F., Javad, S., Ilyas, S., Aslam, F., Munir, N., & Ali, A. (2011). Micropropagation and callogenesis of a recalcitrant species *Ricinus communis*. *Pakistan Journal of Botany*, 43(5), 2419-2422.

Recibido:
14/diciembre/2024

Aceptado:
23/junio/2025

- Perera, D., & Trader, B. (2010). Poinsettia 'Prestige™ Red' (*Euphorbia pulcherrima*) *In Vitro* Propagation. *HortScience* *horts*, 45(7), 1126-1128. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.7.1126>
- Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Bioteología Vegetal*, 11(4), 195-211. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/255/837>.
- Pickens, K., Cheng, Z., & Trigiano, R. (2005). Axillary bud proliferation and organogenesis of *Euphorbia pulcherrima* Winter Rose. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 41(6), 770-774. <https://doi.org/10.1079/IVP2005706>
- Pierik R, L. M. (1990). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Madrid-España: Mundi-Prensa.
- Preciado Paredes, P. M., Ayala Astorga, G. I., & Martínez Heredia, D. (2016). Enraizamiento a partir de callos de *Jatropha cuneata* (Wiggins & Rollins) *in vitro*. *CIBA Revista Iberoamericana De Las Ciencias Biológicas Y Agropecuarias*, 4(8), 58-72. <https://ciba.org.mx/index.php/CIBA/article/view/34>
- Rangel-Estrada, S. D., Canul-Ku, J., Osuna-Canizales, F. J., García-Pérez, F., Del-Rosario-Montes, P., Vences-Hernández, A. B., & Hernández-Meneses, E. (2015). Regeneración *in vitro* de híbridos de nochebuena vía organogénesis. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(7), 1571-1585.
- Ripley, K., & Preece, J. (1986). Micropropagation of *Euphorbia lathyris* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5(3), 213-218. <https://doi.org/10.1007/BF00040132>
- Rodríguez Beraud, M. M., Latsague Vidal, M. I., Chacón Fuentes, M. A., & Astorga Brevis, P. K. (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *BOSQUE*, 35(1), 111-118. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100011>
- Sakunphueak, A., & Panichayupakaranant, P. (2010). Increased production of naphthoquinones in *Impatiens balsamina* root cultures by elicitation with methyl jasmonate. *Bioresour Technology*, 101(22), 8777-8783. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.067>.
- Šamaj, J., Baluška, F., & Hirt, H. (2004). From signal to cell polarity: mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity. *Journal of Experimental Botany*, 55(395), 189-198. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh012>
- Taiz, L., & Zeiger W. E. (2006). *Fisiología Vegetal*. 3a. ed. Castellón de la Plata, España: Universitat Jaume. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg079>
- Vázquez-Baxcajay, L., Robledo-Paz, A., Muratalla-Lúa, A., & Conde-Martínez, V. (2014). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni, and steviosides detection. *Bioagro* (online), 26(1), 49-56. ISSN 1316-3361.
- Verpoorte, R., van der Heijden, R., & Memelink, J. (2000). Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research*, 9(4-5), 323-343. <https://doi.org/10.1023/a:1008966404981>
- Wu, Y., Ma, Y.-D., Li, Y., Zhang, L., & Xia, Y.-P. (2019). Plantlet regeneration from primary callus cultures of *Lilium brownii* F.E.Br. ex Mieliez var. *giganteum* G. Y. Li & Z. H. Chen, a rare bulbous germplasm. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 55(1). <https://doi.org/10.1007/s11627-018-09955-1>
- Xu, B., Dai, W., & Chao, W. (2008). An efficient method for *in vitro* regeneration of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 44(6), 548-556. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9139-9>