



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**  
**FACULTAD DE AGROBIOLOGÍA “PRESIDENTE JUÁREZ”**

---



**“PROPAGACIÓN *in vitro* Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS  
DE CALLOS OBTENIDOS DE ESPECIES DEL GÉNERO *Rubus* spp.”**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**CON ESPECIALIDAD EN**

**BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA**

**QUE PRESENTA**

**I.I.A. ALEJANDRA TAPIA PÉREZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**PEDRO ANTONIO GARCÍA SAUCEDO**

**URUAPAN, MICHOACÁN, MÉXICO**

**FEBRERO DEL 2014**

## Contenido

|   |    |
|---|----|
| RESUMEN .....   | 1  |
| ABSTRACT .....  | 2  |
| I.-INTRODUCCIÓN .....   | 3  |
| II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....   | 4  |
| 2.1 EL GÉNERO <i>Rubus</i> .....  | 4  |
| 2.1.1 Taxonomía .....   | 4  |
| 2.1.2 Descripción botánica .....  | 5  |
| 2.1.3 Propagación de <i>Rubus</i> .....   | 6  |
| 2.1.4 Usos .....  | 6  |
| 2.2. METABOLITOS SECUNARIOS .....   | 7  |
| 2.2.1 Compuestos polifenólicos .....  | 8  |
| 2.2.2 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos en <i>Rubus</i> ..... | 9  |
| 2.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA .....  | 11 |
| 2.3.1 Actividad antimicrobiana y los compuestos polifenólicos.....              | 11 |
| 2.3.2 Modo de acción .....  | 12 |
| 2.3.3 Metodologías de actividad antimicrobiana.....                             | 14 |
| 2.4 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES (CTV).....                                     | 17 |
| 2.4.1 Tipos de cultivos.....  | 17 |
| 2.4.2 Morfogénesis.....   | 17 |
| 2.4.3 Condiciones de cultivo .....  | 19 |
| 2.5 Aplicaciones.....   | 22 |
| 2.6 Cultivo <i>in vitro</i> de plantas leñosas.....                             | 22 |
| 2.6.1 Micropropagación de <i>Rubus</i> spp.....                                 | 23 |
| III.- JUSTIFICACIÓN .....   | 26 |
| IV.- OBJETIVOS .....  | 27 |
| 4.1 Objetivo General.....   | 27 |
| 4.2 Objetivo específicos .....  | 27 |
| V.- HIPÓTESIS .....   | 27 |
| VI.-ESQUEMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA .....                                     | 28 |
| VII.- DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA .....  | 29 |
| 7.1 Colecta y preparación del material vegetal .....                            | 29 |
| 7.2 Establecimiento .....   | 29 |

|  |    |
|--|----|
| 7.2.1 Sistema de asepsi .....                        | 29 |
| 7.2.2 Análisis Estadístico .....                     | 30 |
| 7.2.3 Medio de cultivo para establecimiento .....    | 31 |
| 7.2.4 Siembra e incubación .....                     | 31 |
| 7.3 Micropropagación.....                            | 31 |
| 7.4 Alargamiento.....                                | 34 |
| 7.5 Enraizamiento .....                              | 34 |
| 7.6 Calogénesis .....                                | 35 |
| 7.6.1 Inducción del callo .....                      | 35 |
| 7.6.2 Micropropagación del callo .....               | 36 |
| 7.7 Obtención de suspensiones celulares .....        | 38 |
| 7.8 Extracciones.....                                | 39 |
| 7.8.1 Obtención de extractos.....                    | 39 |
| 7.8.2 Análisis cualitativos de los extractos.....    | 40 |
| 7.9 Actividad antimicrobiana .....                   | 41 |
| VIII.- RESULTADOS Y DISCUSIONES .....                | 42 |
| 8.1 Colecta y preparación del material vegetal ..... | 42 |
| 8.2 Asepsia y establecimiento .....                  | 44 |
| 8.3 Micropropagación.....                            | 46 |
| 8.4 Alargamiento y producción de hojas.....          | 53 |
| 8.5 Enraizamiento .....                              | 55 |
| 8.6 Callogenésis .....                               | 58 |
| 8.6.1 Inducción del callo .....                      | 58 |
| 8.6.2 Micropropagación de callo.....                 | 60 |
| 9. Obtención de suspensiones celulares .....         | 65 |
| 10. Extracciones (screening) y CCF.....              | 67 |
| 10.1 Curva del ácido gálico .....                    | 70 |
| 11. Actividad antimicrobiana .....                   | 71 |
| IX.- CONCLUSIONES.....                               | 72 |
| X.- PERPECTIVAS .....                                | 72 |
| XI.-BIBLIOGRAFÍA.....                                | 73 |
| ANEXO 1: .....                                       | 84 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1: Metodología utilizada para extracción de compuesto polifenólicos en especies del género <i>Rubus</i> .....                            | 13 |
| Tabla 2: Actividad antimicrobiana de especies del género <i>Rubus</i> .....  | 16 |
| Tabla 3: Clasificación y abreviaturas de los RCV .....   | 21 |
| Tabla 4: Agentes desinfectantes utilizados en los diferentes tratamientos para el establecimiento de las especies de <i>Rubus</i> spp.....     | 30 |
| Tabla 5: Tratamiento para evaluar la inducción de los brotes en <i>Rubus</i> spp. ....   | 32 |
| Tabla 6: Tratamientos para evaluar el alargamiento de los tallos .....   | 34 |
| Tabla 7: Tratamiento para evaluar la inducción de raíces .....   | 35 |
| Tabla 8: Tratamiento para evaluar la inducción de callo .....  | 35 |
| Tabla 9: Simbología para identificación del explante con .....   | 36 |
| Tabla 10: Tratamientos aplicados para la curva de crecimiento de callogénesis .....  | 38 |
| Tabla 11: Localización de los sitios de colecta de las especies del género <i>Rubus</i> en Michoacán ...                                       | 42 |
| Tabla 12: Características morfológicas de las tres especies del .....  | 43 |
| Tabla 13: Efecto del la concentración sobre la capacidad de formación de brotes de las especies de <i>Rubus</i> trabajadas, a los 35 días..... | 49 |
| Tabla 14: Efecto de los tratamientos M1P y M2P sobre CFB a los 35 días.....  | 53 |
| Tabla 15: Respuesta del crecimiento de los brotes y número de hojas frente a concentraciones de AIA a los 28 días.....                         | 54 |
| Tabla 16: respuesta de crecimiento de la raíz y número de raíces frente a concentraciones de AIB a los 15 días.....                            | 56 |
| Tabla 17: Respuesta de crecimiento de la raíz y número de raíces frente a concentraciones de AIA a los 28 días.....                            | 58 |
| Tabla 18: Resultados obtenidos en la inducción de callo de cada especies trabajada frente a las concentraciones de 2,4-D .....                 | 59 |
| Tabla 19: Resultaos del tiempo de duplicación celular y la velocidad específica de cada especie trabajada .....                                | 65 |
| Tabla 20: Datos obtenidos de la curva del ácido gálico .....   | 70 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| FIGURA 1: Estructura de compuestos fenólicos .....  | 8                                    |
| FIGURA 2: Rutas metabólicas de los compuestos fenólicos (fuente: Murcia, 2003).....   | 9                                    |
| FIGURA 3: Metodología de difusión en disco (izquierda) y dilución en disco (derecha) utilizadas en actividad antimicrobiana .....   | 15                                   |
| FIGURA 4: Fases de crecimiento celular.....   | 18                                   |
| FIGURA 5: Respuesta <i>in vitro</i> de los explantes a la presencia de los reguladores de crecimiento auxinas y citocininas (Pérez-Molphe y col., 1999).....  | <b>¡Error! Marcador no definido.</b> |
| FIGURA 6: Resultados obtenidos en el establecimiento <i>in vitro</i> de A) Frambuesa B) Cerosa y C) Velloso.....  | 48                                   |
| FIGURA 7: Efecto de BA sobre el número de brotes generados en A)Frambuesa B) Cerosa y C) Velloso (letras iguales indican que no hay diferencia significativa) .....   | 50                                   |
| FIGURA 8: Brotación <i>in vitro</i> de yemas axilares en <i>Rubus</i> spp. durante 35 días en el medio M2P .....  | 52                                   |
| FIGURA 9: Características de la obtención de un callo friable (derecha) y no friable (izquierda) en las mismas condiciones de incubación. ....  | 60                                   |
| FIGURA 10: Crecimiento de los callos tomados a 3 (A), 21 (B) y 35 días (C).....   | 61                                   |
| FIGURA 11: Curvas de Crecimiento de callo según de A) Frambuesa, B) Cerosa y C) Velloso.....  | 63                                   |
| FIGURA 12: Curva de crecimiento de las suspensiones celulares en el tratamiento M2C de cada especie trabajada. ....   | 67                                   |
| FIGURA 13: Callos y medios de cultivo pigmentados .....   | 67                                   |
| FIGURA 14: Placas de CCF de los extractos metanólicos de callo A) Revelado con RPN a 365 nm UV; B) Revelado con Cloruro Férrico teniendo como control el ácido gálico (última hilera) y medios C) revelado con sulfato Sérico ..... | 69                                   |
| FIGURA 15: Placas de CCF de los extractos de acetato de etilo revelados con Sulfato sérico (A) y extractos hexánicos revelados con Lieberman Burchard (B).....  | 69                                   |
| FIGURA 16: Curva del ácido gálico obtenida de la relación de mg/ml de la solución utilizada sometida a 725 nm en espectro. ....   | 70                                   |

## ABREVIATURAS

|                    |  |
|--------------------|--|
| AIB                | Ácido indolbutírico                            |
| AIA                | Ácido 3-indolacético                           |
| ANA                | Ácido naftanalacético                          |
| BA                 | 6-benciladenina                                |
| CTV                | Cultivo de Tejidos Vegetales                   |
| 2,4-D              | Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (auxina)        |
| MS                 | Medio de cultivo Murashige y Skoog, 1962       |
| PVP                | Polivinilpirrolidona                           |
| TDZ                | N-fenil-N'-1,2,3-tiadizol-5ylurea (Tidiazurón) |
| HPLC               | Cromatografía de alta resolución               |
| CTV                | Cultivo de tejidos vegetales                   |
| mg.L <sup>-1</sup> | Miligramos sobre litros                        |
| ml.L <sup>-1</sup> | Mililitros sobre litro                         |
| °C                 | Grados centígrados                             |
| PF                 | Peso fresco                                    |
| RCV                | Reguladores de crecimiento vegetal             |
| rpm                | Revoluciones por minuto                        |
| tdc                | Tiempo de crecimiento celular                  |
| μ                  | Velocidad específica de crecimiento celular    |
| μM                 | Micromoles                                     |
| CCF                | Cromatografía de Capa Fina                     |
| TTC                | Reactivo 2,3,5 trifeniltetrazoliodocloruro     |
| CFB                | Capacidad de formación de brotes               |
| RFC                | Reactivo de Folin Ciocalteun                   |

## RESUMEN

Las pruebas *in vitro* determinaron que el mejor tratamiento de asepsia fue utilizando cloro al 10% para todos los materiales variando el tiempo de 10 min para Frambuesa y 20 min para Cerosa y Velloso; con un porcentaje de sobrevivencia de 67, 70 y 55%, respectivamente. En la Micropropagación con BA los resultados mostraron un efecto ligado al material, ya que mientras que la Frambuesa a concentración de 2.0 mgL<sup>-1</sup> obtuvo 8.41 brotes, las zarzamoras Cerosa y Velloso a se obtuvo 8.36 y 6.59 brotes, respectivamente; pero al suplementar el medio de cultivo con aminoácidos, las zarzamoras Cerosa y Velloso obtuvieron mayor número de brotes, siendo de 4.10 y 3.71 brotes por explante. En la etapa de alargamiento con AIA, la concentración 0.1 mgL<sup>-1</sup> obtuvo el mayor efecto en la longitud de tallo en las tres especies, siendo las medidas obtenidas de 6.06, 6.1 y 3.42 cm; mientras que en la etapa de enraizamiento el mejor tratamiento con AIB fue 0.5 mgL<sup>-1</sup> al lograr una longitud de raíz de 6.79, 7.20 y 7.00 cm (datos respectivos a Frambuesa, Cerosa y Velloso) y con AIA se demostraron que las especies actúan mejor en ausencia de ella, puesto que se obtuvieron mayor longitud de en sus raíces siendo de 2.88, 3.44 y 1.92 cm, respectivamente. En la generación de callo, la inducción fue favorecida a 1 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D en las tres especies, obteniendo porcentajes de hasta el 100% de inducción y porcentajes de 83.3% de callos friables como fue el caso de la Cerosa. En la micropropagación las especies se diferenciaron al adquirir mayor crecimiento en diferentes tratamientos; en el caso de Frambuesa y Cerosa el medio suplementado con ANA y BA obtuvo el mayor PF de sus callos (3.57 y 3.37 gr.) entre los 17 y 20 días y en la Velloso el medio suplementado con AIA, AIB, ANA y BA fue el más favorable al obtener un PF de 2.92 gr. en sus callos en el día 19. Por otro lado, los cálculos realizados de tdc y  $\mu$  en cada uno de los tratamientos de las especies fueron tdc de 5.290, 6.288 y 8.172 días y  $\mu$  de 0.189, 0.159 y 0.122 cm d<sup>-1</sup> en Frambuesa, Cerosa y Velloso, respectivamente. Las curvas de crecimiento de las suspensiones celulares presentan el mismo comportamiento que la curva de crecimiento en medio sólido con respecto al tipo de tratamiento; sin embargo en el medio líquido, la fase exponencial se mostró más rápidamente (en los primeros 4 días), además se observa que los pesos a los 14 días permanece por debajo del gramo de muestra comparada con los gramos obtenidos en el medio sólidos.

**Palabras claves:** género *Rubus*, cultivo *in vitro*, compuestos polifenólicos, antimicrobiana

## ABSTRACT

In vitro tests have determined that the best treatment of sepsis was using 10% bleach for all materials by varying the time of 10 min for Raspberry and 20 min for Waxy and Hairy , a survival rate of 67 , 70 and 55%, respectively . In Micropropagation with BA results showed a bound material effect because while the Raspberry at a concentration of 2.0 mg L<sup>-1</sup> was obtained 8.41 buds, Waxy and Hairy blackberries to 8.36 and 6.59 shoots, respectively was obtained , but to supplement the culture medium containing amino acids, and Hairy Cerosa blackberries sprouts obtained higher , being 4.10 and 3.71 brotes explant . In step with AIA elongation , concentration 0.1 mg L<sup>-1</sup> had the highest effect on stem length in the three species, with the measures obtained 6.06 , 6.1 and 3.42 cm , while in the rooting stage the best treatment AIB was 0.5 mgL<sup>-1</sup> to achieve a root length of 6.79 , 7.20 and 7.00 cm ( respective data Raspberry, waxy and Hairy ) and AIA was demonstrated that species perform better in the absence of it , since it was obtained more length of their roots being 2.88 , 3.44 and 1.92 cm, respectively. In the generation of callus induction was favored 1 mgL<sup>-1</sup> of 2,4-D in the three species , giving percentages of up to 100% induction and percentages friable callus 83.3% as was the case of the waxy . In micropropagation species differed with the greater growth in different treatments , in the case of Raspberry and Waxy medium supplemented with NAA and BA had the highest PF calluses between 17 and 20 days ( 3.57 and 3.37 gr. ) hairy in medium supplemented with IAA , IBA , NAA and BA was the most favorable to get a PF of 2.92 gr. in their callus on day 19 . Furthermore, calculations of tdc and  $\mu$  in each species treatments were tdc 5,290 , 6,288 and 8,172 days and  $\mu$  of 0.189 , 0.159 and 0.122 cm d<sup>-1</sup> in Raspberry, Waxy and Hairy respectively. The growth curves of cell suspensions exhibit the same behavior as the curve of growth on solid medium with respect to the type of treatment , but in the liquid medium , the exponential phase was more quickly ( in the first 4 days ) plus shows that the weights at 14 days remains below gram sample compared to the solid obtained in grams medium.

Keywords: genus *Rubus*, in vitro culture, polyphenolic compounds, antimicrobial

## I.-INTRODUCCIÓN

En México, uno de los grupos de gran diversidad de especies es el género *Rubus*, debido a que presenta una frecuente reproducción apomítica e hibridación. Los integrantes del género *Rubus* son las zarzamoras y frambuesas, las cuales presentan una gran variedad de especies que le han permitido subsistir de una mejor manera ante el entorno físico que las rodea. De manera particular, en Michoacán, las zarzamoras y frambuesas silvestres han abarcado parte de sus territorios, así como de su herbolaria tradicional aplicándolas en remedios para disminuir enfermedades o padecimientos como diarrea, comezón de encías o como cataplasmas, evitando así el desarrollo microbiano en algunas heridas. Por tal motivo, las plantas del género *Rubus* ha ido cobrando importancia a nivel de investigación debido a que autores reportan que sus extractos hidroalcohólicos en pruebas *in vitro* tienen actividad antioxidante, anticancerígenas y antimicrobianas debido a la presencia de compuestos bioactivos de tipo polifenólico. Sin embargo, a pesar de la riqueza biológica de este género y su gran potencial, son plantas poco aprovechadas y valoradas por los lugareños debido a que la mayor parte de los pobladores las consideran plantas invasoras o malezas para sus cultivos y por ello las eliminan. Hoy en día los crecientes desarrollos de la biotecnología vegetal *in vitro* a mostrado ser una herramienta útil en la conservación de algunas especies vegetales y en la propagación masiva de clones específicos libres de patógenos que garantiza alta calidad y mayor uniformidad en sus progenitores; además de favorecer la obtención y/o producción de metabolitos secundarios de interés. De acuerdo a lo anterior y considerando que en Michoacán se han reportado más de 10 especies del género *Rubus*, se ha considerado que el rescate, la evaluación de los fitoquímicos y la micropropagación de zarzamoras y frambuesa presentes en la Meseta Purépecha aportarán información sobre el estudio y potenciales usos agroindustriales; por ello en el presente proyecto se propone establecer un evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos polifenólicos obtenidos de la micropropagación de zarzamoras y frambuesas silvestre (*Rubus* spp.), mediante el cultivo de yemas axilares.

## II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 EL GÉNERO *Rubus*

#### 2.1.1 Taxonomía

El género *Rubus*, pertenece a la familia de las Rosáceas y es uno de los más diversos del reino vegetal, compuesto por una serie altamente heterocigota de algunas 500 especies con niveles de ploidía que van desde diploide a dodecaploide (Meng y Fim, 2002). Los miembros del género, frambuesa y zarzamoras, pueden ser difíciles de clasificar en especies distintas debido a la frecuente reproducción apomíctica e hibridación entre especies (Romero, 2003; Rzedowski y Calderón, 2005).

Las plantas del género *Rubus* son originarias de América del Norte y Europa (Crandall, 1995) pero ahora se encuentran distribuidas de forma silvestre desde Norteamérica hasta Sudamérica, siendo Centroamérica (México), uno de los países que ha presentado diversidad de especies en varios de sus estado entre los que destacan: Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí, Guerrero, Chiapas, Puebla y Michoacán. De manera particular, el estado de Michoacán se encuentra la Meseta Purepecha zona representativa en éste género y en donde se han realizado algunos trabajos que han contribuido a la taxonomía de este género, tal es el caso de Vargas (1994) quien realizó recorridos en regiones aledañas al municipio de Uruapan he identificó cuatro especies siendo: *Rubus coriifolius*, *R. huministratus*, *R. adenotrichus* y *R. tricomallus*, por su parte, Cruz (1997) colectó varios morfoespecies en la parte norte de Uruapan, logrando identificar seis: *R. adenotricus*, *R. humistratus*, *R. trichomallus*, *R. ulmifolius* y *R. alnifolius*. Sin embargo, ambos autores mencionan que la información necesaria para la identificación de los componentes para este género es escasa, por lo que se generan problemas al momento de la identificación. Trabajos más recientes han tratado de esclarecer las dudas que circundan a la taxonomía del género *Rubus*, para ello, han utilizado la herramienta de los llamados marcadores moleculares como lo hizo Sevilla (2009) quien logró identificar botánicamente especies silvestre

como *Rubus adenotrichus*, *R. glaucus*, *R. coriifolius* y *R. pringley* que fueron colectados en siete sitios de los municipios de Uruapan, Nahuatzen y Ziracuaretiro, Michoacán.

### **2.1.2 Descripción botánica**

La zarzamora y frambuesa son plantas perennes leñosas con un hábito de crecimiento bianual, donde durante el primer año su tallo principal se desarrolla de manera estéril, dando lugar a la diferenciación de yemas florales y en el segundo año florecen y fructifican, muriendo después de la maduración de los frutos; según la especie, puede tener un hábito de crecimiento erecto, semirastrero o rastrero y presentar coloración en su corteza ya sea rojiza, morada o azul blanquecina, además de exhibir pelos glandulares rectos o encorvados y espinas (Rzedowski y Calderón, 1989).

Las hojas son elípticas a lanceolada, formadas por 5 a 7 folíolos ovalados y con bordes aserrados o dentados, de color verde tenue en la cara inferior e intensa en la superior. Sus flores son terminales y axilares, las yemas florales y los pecíolos pueden estar cubiertos por un fino vello no glandular y espinas, además se caracterizan por tener cinco pétalos blancos o rosados y ampliamente obovados, según la especie; son hermafroditas, estipuladas, con cáliz pubescente y con estambres dispuestos en la base del receptáculo. Sus frutos son constituidos por polidrupas de color rojo de forma esférica o cónica, que se encuentran unidas al receptáculo débilmente y en su interior poseen una semilla diminuta; su color tiende a cambiar conforme su maduración, en zarzamora de rojo a negro y en frambuesa permanece en verde-rojo. El sistema radicular se extiende a poca profundidad, es fasciculado, de desarrollo horizontal con abundantes ramificaciones y poseen tanto raíces primarias como secundarias leñosas (Rzedowski y Calderón, 1989).

### **2.1.3 Propagación de *Rubus***

El cultivo de plantas del género *Rubus* necesita de un clima templado, con veranos frescos y húmedos, ya que tanto la brotación como la pérdida de hojas están ligados al cambio de temperatura y el fotoperíodo. La alta humedad relativa es necesaria para el buen crecimiento de los frutos, debido a que contribuye a la proliferación foliar alrededor de las flores tempranas, asegurando un mejor desarrollo. Estas plantas, demandan suelos ricos en materia orgánica de textura media, frescos, prácticamente libre de calcio activo (Ciravegna y col., 2004). Además la composición química del suelo debe ser ajustada a los requerimientos de las plantas pues estas son muy sensibles a las deficiencias de bases como potasio y magnesio. Un pH ideal para el cultivo es de alrededor de 6.5 (Ciravegna y col., 2004).

La zarzamora y frambuesa se reproducen con mayor facilidad por métodos asexuales, por medio de estacas, es decir, por trozos de ramas o de raíces de madera nueva (herbáceas o leñosas), que colocados en un sustrato adecuado y en condiciones convenientes pueden enraizar, dando lugar a nuevas plantas. Este sistema permite la conservación de las características de las plantas madres, cosa que no ocurre con la multiplicación sexual por semilla (Cadwell, 1984).

### **2.1.4 Usos**

En la región Purépecha, las plantas del género *Rubus* han jugado un papel importante para los diversos pueblos indígenas, ya que han sido aprovechadas como pigmentos naturales para decorar sus artesanías y textiles favoreciendo su valor agregado, al igual que han sido considerados materia prima para la construcción de sus viviendas, así también se reconocen en su cultura culinaria con la elaboración de atoles, tamales, tés, ensaladas, agua frescas, jaleas, mermeladas, vinos entre otros (Bravo, 1996) debido a que hoy en día los usos y aplicaciones han aumentado gracias a que son plantas multifacéticas.

Por otra parte, tanto la zarzamora como la frambuesa silvestres han sido reconocidas por años dentro de la herbolaria indígena por proporcionar propiedades saludables que destaca la capacidad de remediar o disminuir enfermedades o padecimientos como disminución de la inflamación de encías, aftas bucales, afecciones intestinales como diarrea y colitis, efecto producido al consumir de sus frutos frescos o infusiones de hojas y/o tallos (Vanaclocha y Cañigüeral, 2003; Manach y col. 2004). Además, la literatura reciente reporta que las plantas del género *Rubus* presentan una variedad de propiedades saludables entre las que destacan la capacidad antioxidante, antidiabética, anticancerígena, antimicrobianas, entre otras (Cuevas- Rodríguez, 2010; Reyes-Carmona, 2005, Sisti y col., 2007), tales propiedades se le atribuyen a la presencia y acción de metabolitos secundarios, mayormente, de tipo polifenólicos.

## **2.2. METABOLITOS SECUNARIOS**

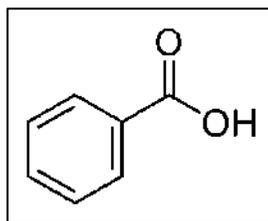
Las plantas sintetizan una gran gama de compuestos orgánicos que son tradicionalmente clasificados en metabolitos primario y secundarios. Los metabolito primario son compuestos que tienen un rol esencial asociados con la fotosíntesis, respiración, crecimiento y desarrollo de la planta. Mientras que los metabolitos secundarios tiene un rol principal en la interacción ecológica entre planta-planta y planta-ambiente tales como atrayentes de polinizadores, protección de radiación UV y como mecanismos de defensa contra agentes fitopatógenos (Bravo, 1998; Berenbaum, 2001).

El origen biosintético de los metabolitos secundarios son divididos en tres principales grupos: terpenos, alcaloides y polifenoles, los cuales se sintetizan en pequeñas cantidades y su distribución está restringida a un determinado género, familia, o incluso algunas especies de plantas. Estos metabolitos secundarios se encuentran representados en varias especies del género *Rubus*, tales como los triterpenos: ácido oleanólico, ursólico, maslínico, arjunico y euscáfico encontrados de manera representativa en frutos inmaduros de *Rubus chingii* (Guo y col., 2005), en hojas de *R. cochinchinesis* (Trinh Phuong y col.,1999) y en raíces de *R.*

*parvifolius* ( Yoon Soo Chio y col., 1991); mientras que algunos alcaloides tal como: 1-octacosanol presente en tallos y hojas de *R. apetalus* (F.A Hamil y col., 2003) y en raíces de *R. ellipticus* (Bhakuni y col.,1987) sin embargo, los compuestos polifenoles son los metabolitos secundarios mayoritarios y representativos del género *Rubus*, puesto que se han reportado en más de 15 especies de este género, ya sea en hoja, tallo y frutos.

### 2.2.1 Compuestos polifenólicos

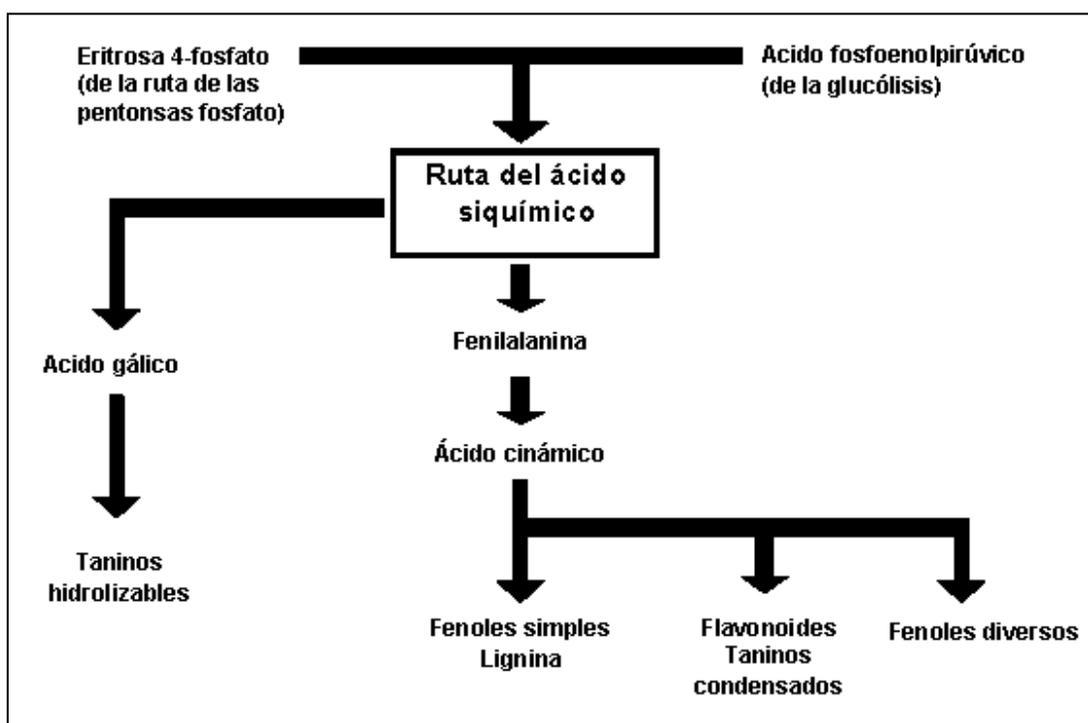
Los metabolitos secundarios de tipo polifenólico se caracterizan por poseer un anillo benceno hidroxilado como elemento común en sus estructuras moleculares (Figura 1), las cuales pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. (Martínez-Valverde y col.,2000; Duthie y Crozier 2000). Habitualmente, estos compuestos polifenólicos se presenta conjugado con azúcares como la glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, o a los ácidos glucurónico y galacturónico; también puede unirse a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos y aminas (Duthie y col., 2003).



**FIGURA 1:** Estructura de compuestos fenólicos

Aunque existen una gran variedad de compuestos fenólicos en las plantas, la mayor parte de ellos tiene como origen metabólico la ruta del ácido siquímico, que utiliza los sustratos de la vía de las pentosas (eritrosa-4-fosfato) y de la glucólisis (ácido fosfoenolpirúvato) dando como resultado aminoácidos aromáticos: triptófano, tirosina y fenilalanina, siendo este último, un aminoácido esencial sintetizado en el metabolismo primario que posteriormente entra al metabolismo secundario para convertirse a ácido cinámico y dar inicio a la obtención de los

diferentes compuestos fenólicos: ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoides (antocianinas, flavonas, flavonoles, flavanonas y flavanoles) y taninos (hidrolizables y condensados), que son diferenciados y caracterizados principalmente por el número de átomos de carbono de su esqueleto básico molecular (Merken Beecher, 2006) (Figura 2).



**FIGURA 2:** Rutas metabólicas de los compuestos fenólicos (fuente: Murcia, 2003)

### 2.2.2 Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos en *Rubus*

Los polifenoles, es el grupo de metabolitos secundarios que más se ha extraído y cuantificado en el campo de la investigación debido a su amplia distribución en las plantas de interés agrícola y su repercusión en la fisiología digestiva (Mueller-Harvey, 2001).

Para la extracción de compuestos polifenólicos Saura-Calixto y col. (2007) exponen la aplicación de una primera extracción con disolventes orgánicos (metanol, etanol, propanol, acetona, agua, acetato de etilo, entre otros) o la mezcla de algunos de ellos en diversas proporciones; la utilización de estos disolventes polares favorecen la obtención de diferentes fenólicos siempre y

cuando se tenga en cuenta que los compuestos a extraer de un material vegetal son dependientes de la elección del disolvente a usar, del método de extracción y de los compuestos bioactivos presentes en las plantas ya que pueden existir una mezcla de diferentes clases de polifenoles solubles en el sistema de solvente empleado.

Por otro lado, en una extracción es necesario eliminar el solvente orgánico por destilación a presión reducida, en donde es costumbre hacer partición líquido-líquido para fraccionar la fase acuosa y someterlas primero a cromatografía en columna para separar las fracciones obtenidas y cuantificar e identificar los compuestos presentes en la mezcla por otras metodologías cromatográficas. Con respecto a lo anterior, la literatura reporta que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es el método más utilizado para la separación simultánea y cuantificación de sustancias fenólicas ya que es sensible y preciso para dar tal información, pero no es de fácil disponibilidad en los laboratorios, por ello, una alternativa es la cromatografía en capa fina (TLC) y la cromatografía de gases (CG) por su más versátil y rápida determinación (Martínez-Valverde y col., 2000).

En el caso de la identificación se reportan el uso de métodos de coloración conocidos como espectrométricos, siendo los más comunes la espectrometría de masas (MS) y espectrometría de masas con ionizador por electro spray (ESI-MS) (Tomás y col., 2006; Peng y col., 2001).

Actualmente, se ha desarrollado numerosas investigaciones sobre la relación entre el disolvente orgánico y los compuestos polifenoles presentes en plantas del género *Rubus*. Mayormente, en la zarzamora se han realizado extracciones de partes aéreas (hojas, tallos y frutos) con disolventes polares como etanol, metanol y acetato de etilo, aplicando cromatografías acoplado a espectrometrías (Tabla 1).

## 2.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

### 2.3.1 Actividad antimicrobiana y los compuestos polifenólicos

La presencia de compuestos bioactivos fenólicos en plantas forma parte de las estrategias defensiva de la misma; dichos compuestos le proporcionan importantes características biológicas a los extractos, como son antivirales, antimicrobianos o repelentes, que permiten su utilización para proteger los cultivos e incrementar la calidad y su producción alimentaria, ya que tienen la propiedad de ser menos tóxicos y más fácilmente degradables.

Un porcentaje importante de polifenoles en plantas, poseen cierta actividad frente a los microorganismos, algunos ejemplos los constituyen el catecol, el pirogalol y los ácidos cinámicos y caféico en plantas comerciales como tomillo (*Thymus vulgaris*) y la manzanilla (*Matiarca chamomilla*), otros como mentol en menta (*Menta piperita*), capsaicina en pimiento rojo (*Capsicumm annuum*) (Cichewicz y col., 1996) taninos en eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (Cruz J. y col., 2001), catequinas en té verde (*Camellia sinensis*) (Yildirim A. y col., 2000), teaflavinas en té verde (Ikigai H y col., 1990) todo ellos han confirmado su propiedad antimicrobiana frente a bacterias de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, entre otros patógenos, todos ellos han confirmado la susceptibilidad de los extractos polifenólicos frente a las bacterias GRAM positivas en comparación a las GRAM negativas y ello se debe a la repulsión entre los compuestos polifenólicos y la superficie de las bacterias GRAM negativas que están recubiertas con lipopolisacáridos (Ikigai y col., 2002).

Por otro lado, cabe mencionar, que también existen plantas consideradas malezas que han presentado actividad antimicrobiana, tales como la aroma amarilla (*Acacia farnesiana*), escoba amarga (*Parthenium hysterophorus*), salvia cimarrona (*Pluchea carlinensis*) (Aida-Rodríguez y col., 2000) actividad relacionada con la presencia de flavonoides, fenoles y taninos; así también algunas zarzamoras y frambuesas silvestres (*Rubus spp.*) han mostrado actividad debido a la presencia de polifenoles, lo cual han resultado ser una fuente económica interesante para la

obtención de extractos vegetales ricos en polifenoles ( Sisti y col.,2007; Tewari y col. 1995; Crandall, 1995), pero debido a sus pocos estudios y desconocimiento han ido disminuyendo por eliminación en los campos sin tener ningún provecho para la economía.

En el caso del género *Rubus*, se han obtenido extractos vegetales a partir de frutos, tallos y hojas (frescos o secos) obtenidas de cultivos *in vitro* e *in situ* que muestran efectos inhibitorios frente algunas bacterias GRAM positivas, GRAM negativas, hongos y levaduras, cuestión que se relaciona con la presencia de polifenoles.

En la Tabla 2 se muestra una serie de especies del género *Rubus* con presencia de actividad antimicrobiana y sus compuestos fenólicos relacionado con su inhibición.

### **2.3.2 Modo de acción**

Dichos compuestos fenólicos, se han identificado por su destacada capacidad de ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre, también de ser agentes reductores y captadores de radicales libres (Duthie y col., 2003). Debido a estas características, los mecanismos de acción antimicrobiana han sido relacionados con dos criterios: su estructura química y sus mecanismos de acción sobre los microorganismos.

#### **1. Mecanismos de acción de los compuestos antimicrobianos:**

- Inhibición de la síntesis de los constituyentes de la pared celular (Jeandet y col., 2002; Bis y col., 2002).
- Alteración del funcionamiento y ruptura de la membrana citoplasmática (Jeandet y col., 2002; Domingo y López, 2002; Cotoras y col., 2004)
- Inhibición de la síntesis de enzimas, proteínas y/o de ácidos nucleicos (Izhaki, 2002).
- Alteraciones a nivel del ADN (Domingo y López, 2003)

**Tabla 1: Metodología utilizada para extracción de compuesto polifenólicos en especies del género *Rubus***

| <b>Especie</b>                   | <b>Orgáno</b>  | <b>Compuesto polifenólico</b>                                    | <b>Disolvente(s)</b>                  | <b>Cuantificación</b>           | <b>Referencia</b>            |
|----------------------------------|----------------|--|---------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| <i>R. idaeus</i>                 | Hojas          | Cianidinas y pelargonidinas                                      | Metanol 80%                           | HPLC                            | Spanos y col., 1987          |
| <i>R. saxatilis</i>              | Hojas          | Cianidin-3-glucosidos y pelargonidinas-3-glucosidos              | Metanol                               | -----                           | López-da-Silva., 2002        |
| <i>R. glaucus y adenotrichus</i> | Frutos         | Elagitaninos, ácido ferúlico, cafeíco, p-cumarico y antocianinas | Acetona acuosa 70% y acetato de etilo | -----                           | Christian Mertz y col., 2007 |
| <i>R. coriifolius</i>            | Hojas          | Kaempferol, tirosida y epicatequina                              | Metanol                               | HPLC Y LC-ESI-MS                | Barbosa y col., 2006         |
| <i>R. saxatilis</i>              | Hojas          | Ac. Ellagico, quercetina, kaempferol                             | Metanol                               | -----                           | M. Tomczyk y J. Gudej, 2005  |
| <i>R. parviflorus</i>            | no específico  | Flavonas: quercetina   | Metanol                               | -----                           | Wang Yuan y col., 2006       |
| <i>R. pinnatus y rigidus</i>     | Frutos maduros | Antocianinas   | Metanol y acetato de etilo            | HPLC; UV-VIS; NMR               | Byamukama y col., 2005       |
| <i>R. suacissimus</i>            | Hojas          | Ácido gálico   | Acuoso                                | -----                           | Zhijun Liu y col., 2006      |
| <i>R. occidentalis</i>           | Frutos maduros | Antocianinas   | Metanol con ácido fórmico al 0.1%     | LC-ESI/MS<br>HPLC/MS y<br>MS/MS | Qingguo Tian y col., 2006    |

2. Mecanismos de acción de acuerdo a la estructura química (Haslam E., 1996; De Bruyne y col., 1999, Miskovsky, 2002):

- La configuración anomérica de los azúcares presentes
- Distribución espacial
- Número de los grupos hidroxilos, formación de complejos con macromoléculas especialmente proteínas

Los compuestos fenólicos ha demostrado ser fuertes inhibidores de los procesos enzimáticos por su característica lipofílica y sus grupos OH libres, que en ocasiones forman complejos con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas lo que conduce a su inactivación (Murphy, 1999). Otros pueden inhibir la respiración mitocondrial, la fosforilación oxidativa y la síntesis de ADN (Koitabashi y col, 1996). En el caso del ácido gálico estos actúan sobre la polifenoloxidasas de algunos fitopatógenos ocasionando la acumulación de productos de oxidación.

Por otro lado, la forma glicosilada de algunos flavonoides como quercetina, kaempferol, rutinosa, soforosa, cianidina y pelargonidina presentes en *Rubus idaeus*, *coreaneum*, *danctus*, *ulmifolius*, *plicatus* y *saxatilis* (López-da-Silva y col., 2002) inactiva su actividad antimicrobiana, mientras que las agliconas de flavanonas y naringenina exhiben actividad en algunos microorganismos excepto en *A. niger* y *Candida albicans*, cuestión que no se presenta en su forma glicosiladas. Sin embargo, la sustitución del grupo hidroxilo por otro compuesto metilado como es la quercetina éter metílico en frutos y hojas de *R. idaeus*, *amabilis*, *alceaefolius*, *coriifolius* ha mostrado actividad antimicrobiana.

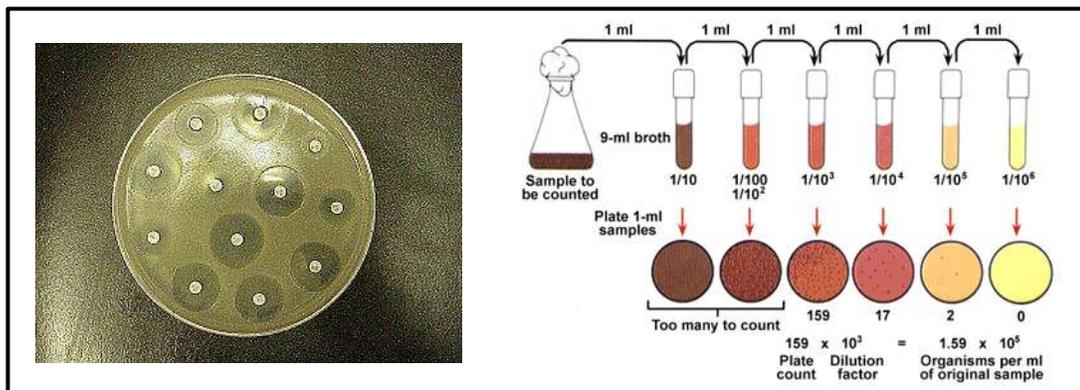
### **2.3.3 Metodologías de actividad antimicrobiana**

Los métodos más reportados para evaluar la actividad antimicrobiana se mencionan posteriormente y se encuentran esquematizados en la Figura 3.

- Método de difusión: Se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de

crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro o en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (Ramírez y Marin y col., 2009).

- Método de dilución: Es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (MBC), es decir, la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismos después de un subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado y la concentración mínima inhibitoria (MIC), es decir, la concentración más baja de sustancias que pueden inhibir el crecimiento visible de un microorganismos después de 24 horas (Ramírez y Marin y col., 2009).



**FIGURA 3:** Metodología de difusión en disco (izquierda) y dilución en disco (derecha) utilizadas en actividad antimicrobiana

**Tabla 2: Actividad antimicrobiana de especies del género *Rubus***

| Especie                 | Órgano                | Compuestos  | Solventes   | Actividad antimicrobiana   | Referencia                     |
|-------------------------|-----------------------|---|---|--|--------------------------------|
| <i>R. imperialis</i>    | raíz, tallo y hoja    | ácido 4'-metil-3-O-metilelágico y 3-O-metilelágico-4'-O           | metanol, n-hexano, acetato de etilo y n-butanol               | <i>E. coli</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> y <i>Rhizopus sp.</i> | Bella Cruz y col., 2006        |
| <i>R. urticaefolius</i> | tallo, hoja y frutos  | no analizado  | hidroalcoholico 70%   | <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> .  | Paula Silva y col., 2005       |
| <i>R. chamaemorus</i>   | Hoja                  | flavonoides, ácido elágico y gálico                               | metanolicas de butanol  | <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> y <i>M. luteus</i>   | B. Thiem y O. Góslinska, 2003  |
| <i>R. ulmifolius</i>    | Hoja                  | derivados de ácido elágico  | Metanol   | <i>Staphylococcus aureus</i>   | Cassandra L. Y col., 2012      |
| <i>R. ulmifolius</i>    | hoja, tallo y flor    | triterpenos, flavonoides, ácidos ferúlico y gálico, y los taninos | Screening: n-hexano, cloroformo, cloroformo/metanol y metanol | <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> y <i>A. niger</i> .    | L. Panizzi y col., 2001        |
| <i>R. arcticus</i>      | Hojas                 | monomeros y oligomeros de ellagitaninos                           | Acetona   | <i>Peronospora sparsa</i>  | Anne Hukkanen y col., 2008     |
| <i>R. coriifolius</i>   | hojas y tallo         | epicatequinas, catequinas y ácido elágicos                        | metanol, n-hexano y acetato de etilo                          | <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i>  | Alma Delia Alanís y col., 2003 |
| <i>R. ulmifolius</i>    | Hoja micropropagada   | ácido clorogénico, flavonoides, ácido caftárico y taninos         | metanol (20,60 y 100%) y acetona (70%)                        | 33 hongos y 3 levaduras  | M. Sisti y col., 2007          |
| <i>R. apetalus</i>      | tallos, hoja y frutos | alcaloides  | cloroformo y éter de petroleo                                 | <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> y   | F.A. Hamil y col., 2003        |

## **2.4 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES (CTV)**

El CTV o cultivo *in vitro*, es una rama de la biotecnológica que consiste en cultivar asépticamente un segmento de tejido, órgano, célula o protoplastos (denominado explante), para lograr una respuesta morfogénica y biosintética de las células, controlando estrictamente las condiciones ambientales, hormonales y nutricionales requeridas por la planta (Gamborg 2002), esto es posible a la “totipotencialidad celular” (Gamborg y Philips, 1995), término que se refiere a que todas las células de una planta, bajo condiciones adecuadas y estímulos apropiados, tienen la capacidad de regular la división y diferenciación celular para crecer y regenerar una nueva planta, genéticamente idéntica a la planta madre (Taiz y Seiger, 1998; Lambers y col. 2000).

El CTV ha sido utilizado para obtener un mayor conocimiento sobre la fisiología, bioquímica y genética vegetal; ya que permite la manipulación de variables físicas y químicas, independientemente de los factores ambientales, además, es posible identificar y producir metabolitos de uso industrial con mayor calidad, rendimiento y en menor tiempo, así como conocer la ruta de síntesis bioquímica (Pérez-Molphe y col., 1999; Gómez, 2005; Rosas, 2007).

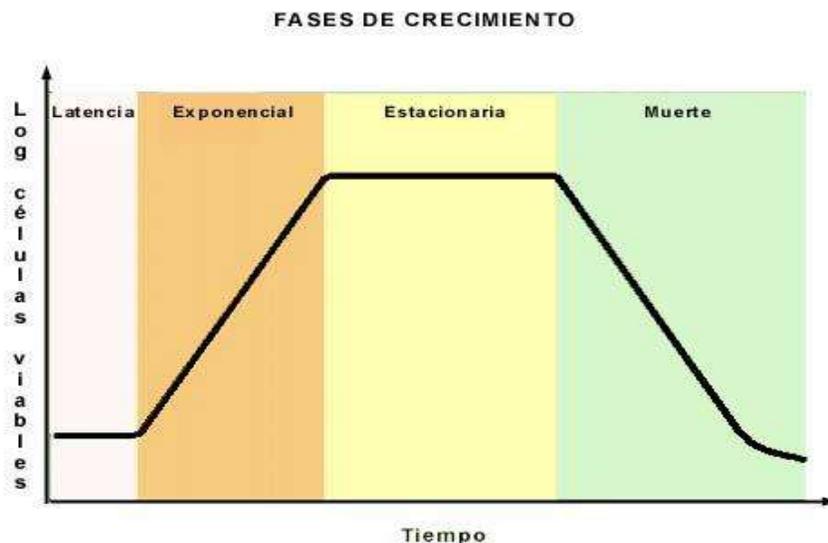
### **2.4.1 Tipos de cultivos**

Los explantes, al ser cultivados en un medio de cultivo apropiado, usualmente en presencia de reguladores de crecimiento: auxinas y citoquininas, pueden dar lugar a una masa de células desorganizada en división, lo que se conoce como callo (Dodds y Roberts, 1995). Cuando los callos friables son dispuestos en un medio de cultivo líquido en agitación, las células simples y/o grupos pequeños de células son liberadas dentro del medio, las cuales continúan creciendo y se dividen, dando lugar a suspensiones celulares (Bhojawani y Razdab, 1996; Gamborg, 2002). El cultivo *in vitro* de protoplastos, entendiendo por éstos células a las cuales se les ha removido la pared celular (Taiz y Seiger, 1998; Lambers y col., 2000), que puede ser obtenido a partir de células del mesófilo o desde suspensiones

celulares (Smith, 1992; Vsil y Torpe, 1994; Gamborg, 2002). Así también los ápices radicales o foliares, las yemas axilares o adventicias componen los cultivos de órganos (Pierik, 1990; Bhojawani y Razdab, 1996). Finalmente, embriones, ya sea maduros o inmaduros, (Gamborg y Phillips, 1995; Gamborg, 2002) y polen (Dixon, 1991), también se han utilizado como explantes.

#### 2.4.1.1 Obtención de brotes y callos

Mediante el CTV es posible obtener brotes y callos a partir de explantes, como se ha dicho anteriormente. El callo es una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células, la cual bajo las condiciones adecuadas de luz, temperatura y nutrientes es capaz de generar órganos o embriones somáticos. El cultivo de callo puede derivarse de una variedad de órganos de la planta (raíz, tallo, hoja), usados como explantes y colocados en un medio sólido o semisólidos, generalmente se utilizan el medio MS (Murashige and Skoog, 1962). La biotecnología vegetal permite además monitorear el aumento de masa celular mediante curvas de crecimiento (Figura 4), así como obtener una mayor cantidad y calidad de compuestos que se desea, siempre y cuando las condiciones sean adecuadas.



**FIGURA 4:** Fases de crecimiento celular

### **2.4.2 Morfogénesis**

La regeneración de plantas completas, a partir de los diferentes tipos de cultivos *in vitro*, puede ocurrir a través de embriogénesis somática u organogénesis (Sugiyama, 1999; Ramage y Williams, 2002). La primera se basa en la regeneración de plantas a través de un proceso análogo a la germinación de un embrión cigótico. De acuerdo a esto, en el explante se producen estructuras bipolares que presentan las propiedades morfológicas de los embriones cigóticos, y según que éstos surjan directamente del explante o bien de un callo, se hablará de embriogénesis directa o indirecta, respectivamente (Walden y Wingender, 1995). Por otro lado, la organogénesis se basa en la regeneración de plantas mediante la producción de órganos, y al igual que la embriogénesis, se dice que es organogénesis directa o indirecta cuando se produce el órgano directamente del explante o a partir de un callo, respectivamente (Sugiyama, 1999).

### **2.4.3 Condiciones de cultivo**

El ambiente químico de las plantas cultivadas *in vitro* está determinado por la composición del medio de cultivo, entendiendo por éste la combinación sólida o líquida de nutrientes y agua, el cual además debe contener los siguientes componentes básicos: elementos esenciales o iones minerales, suplementados como una mezcla compleja de sales (solución stock); un suplemento orgánico que aporte vitaminas (tiamina, ac. Nicotínico y piridoxina) y/o aminoácidos (glicina, glutamina, entre otros); una fuente de carbono (sacarosa, glucosa, maltosa y fructosa), reguladores de crecimiento (auxinas, citoquininas y giberilinas); y un agente gelificante, en el caso de que el medio se utilice en estado sólido. Por otro lado, el pH del medio de cultivo debe ser ajustado de acuerdo a los requerimientos de la especie vegetal en cultivo, siendo el más frecuente entre los 5.2 y 5.8 para favorecer la absorción de sus nutrientes.

Es de especial importancia añadir una fuente de carbono al medio de cultivo, ya que las plantas (o sus fragmentos) cuando se desarrollan en condiciones de

cultivo *in vitro* no son completamente autotróficas. Así también, recalcar el uso de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), que son sustancias orgánicas que a bajas concentraciones influyen en los procesos fisiológicos de las plantas, regulando el crecimiento, desarrollo o metabolismo de la planta, célula o tejido vegetal (Dixon, 1991; Frankenberg y Arshad, 1995). Entre los reguladores de crecimiento vegetal (Tabla 3) se puede mencionar los siguientes:

- Auxinas: compuestos derivados del triptófano; junto con las citoquininas promueven la inducción y establecimiento de callo. Otras de sus funciones son aumentar el crecimiento de los tallos, promover la división celular en el cambium vascular y la diferenciación del xilema secundario, estimular la formación de raíces adventicias, inhibir la elongación de raíces y estimular el desarrollo de frutos y la floración en algunas especies. La concentraciones a las que se aplican esta alrededor de a  $0.1-1\text{mgL}^{-1}$ .
- Citoquininas: son compuestos derivados de la adenina y junto con las auxinas promueven la división celular y crecimiento. Utilizados a concentraciones de  $0.01-10\text{mgL}^{-1}$ .
- Giberilinas: participan en el rompimiento de la dormancia de semillas y brotes, estimula la elongación de hojas, incrementa el crecimiento de tallo y promueve el desarrollo de los frutos. principal regulador es el ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) que es aplicado hasta  $50\text{mgL}^{-1}$ .

Otros RCV menos utilizados son el etileno, ácido abscísico, los brasinoesteroides, ácido jasmónico, ácido salicílico y ácido nítrico (García, 2007)

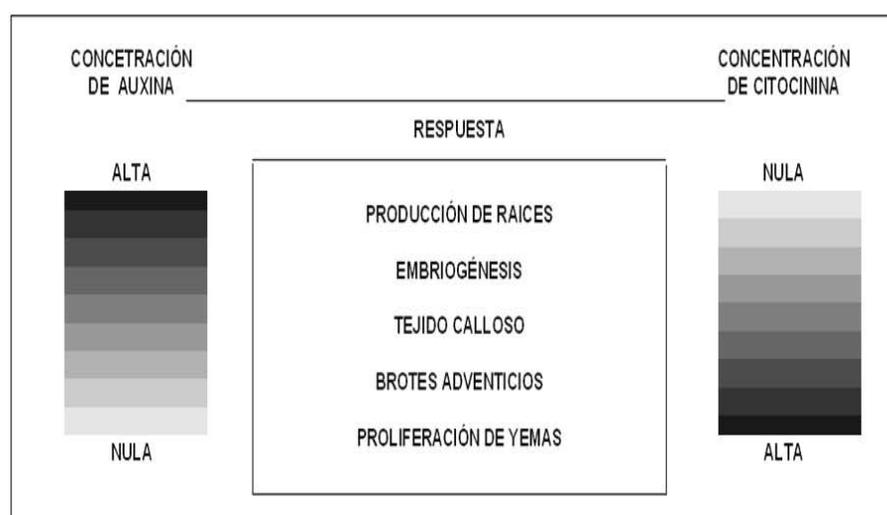
**Tabla 3: Clasificación y abreviaturas de los RCV**

| Grupo de los RCV | Compuesto                       | Abreviatura     |
|------------------|---------------------------------|-----------------|
| Auxinas          | Ácido 3-indolbutírico           | AIB             |
|                  | Ácido $\alpha$ -naftalenacético | ANA             |
|                  | Ácido 3-indolacético            | AIA             |
|                  | Ácido 2,4 diclofenoxiacético    | 2,4-D           |
| Citocininas      | 6-benciladenina                 | BA              |
|                  | Cinetina                        | 6-KT            |
|                  | Zeatina                         | Z               |
| Giberilinas      | Ácido giberélico                | AG <sub>3</sub> |

Por otra parte, se ha documentado ampliamente que el índice auxina/ citocininas en el medio de cultivo determina el tipo de cultivo establecido o regenerado como se muestra en la Figura 5.

Respuesta in vitro de los explantes a la presencia de los reguladores de crecimiento auxinas y citocininas (Pérez-Molphe y col., 1999)

Dentro de los factores físicos, la temperatura a la que están expuestos los cultivos



es un factor fundamental a controlar. En general, cada especie presenta un intervalo de temperaturas óptimo, sin embargo, para la mayoría de las plantas se pueden obtener resultados satisfactorios con temperaturas en el rango de los 20 a

28° C. Otro factor importante es el número de horas de luz diarias que recibe el cultivo, lo que se conoce como fotoperíodo (Lambers y col., 2000). En este contexto, se ha reportado que el mejor fotoperíodo para una especie cultivada *in vivo*, será de 16 h luz y 8 h oscuridad (Gamborg, 2002).

## **2.5 Aplicaciones**

El enorme potencial del cultivo *in vitro* en la producción masiva de plantas de interés comercial en reducidos tiempos, ha provocado que en los últimos años se haya incrementado el número de laboratorios de CTV en el país y en el mundo, lo cual ha motivado que algunas industrias lo estén utilizando como una alternativa efectiva en sus programas de producción masiva (Bhojawani, 1990; Roca y Mroginski, 1991; Sajc y col., 2000). Así también, para la obtención de metabolitos secundarios para la fabricación de farmacéuticos, alimentarios y biocidas en general, por ello, la biotecnología vegetal, han dado la oportunidad de que las plantas puedan considerarse como verdaderos biorreactores para la producción de compuestos naturales de interés industrial, cuya calidad y costos no sean afectadas por condiciones climáticas, sanitarias o políticas de la región de producción (Bourgand y col. 2001) utilizando diversas metodologías como biotransformación, células inmovilizadas, selección de líneas celulares, adición de precursores e inducción de vías elicitoras biológicas (Dörnenburg y Knorr, 1995; Baldy y col., 2001). Sin embargo, algunos investigadores han logrado con éxito la producción de metabolitos secundarios en un tiempo menor a través de la inducción de callo y establecimiento de suspensiones celulares, puesto que las células pueden multiplicarse fácilmente y producir el metabolito específico (Vanisree y col., 2004).

## **2.6 Cultivo *in vitro* de plantas leñosas**

Las especies leñosas son aquellas que presentan un tejido lignificado debido a la presencia de la lignina, compuesto orgánico que impregna las paredes celulares

de los vasos de la conducción. La compleja conformación de las distintas células en combinación con la rigidez propia de las paredes celulares le confieren al tejido su fortaleza; por tanto presentan resistencia a ser multiplicadas *in vitro*, por lo cual se les conoce como plantas recalcitrante (Corino, 2000).

Las técnicas del cultivo *in vitro* fueron utilizadas en un principio para la producción de especies herbáceas, posteriormente, la experiencia acumulada permitió su adaptación para la producción de plantas leñosas, por ejemplo la producción de manzano (*Malus domestica*) y duraznero (*Prunus pérsica*); tiempo después, la producción se extendió a otras especies y cultivares ornamentales, forestales y plantas frutales como el cerezo (*Prunus cerasus*), ciruelo (*Prunus domestica*), arándano, frambuesa, zarzamora (*Rubus* sp.), grosella (*Ribes* spp.), nogal (*Juglans regia*) y pistache (*Pistacia vera*), entre otras.

### **2.6.1 Micropropagación de *Rubus* spp.**

Algunas investigaciones realizadas de Micropropagación de plantas del género *Rubus*, parten de la organogénesis directa (principalmente por meristemos axilares y yemas axilares) como son mora, frambuesa y sus híbridos (Graham y col., 1997; Mezzetti y col., 1997; Meng y col., 2004; Turk y col., 1994; Zawadzka y Orlikowska, 2006); sin embargo, no existe un protocolo eficiente de regeneración para una sola especie por lo que se tienen que realizar varias investigaciones dentro de este género (Tabla 4). Investigaciones realizadas han demostrado que la eficacia de la regeneración del género *Rubus* depende en gran medida de varios factores tales como:

- El tipo y edad del explantes, siendo frecuentemente los meristemos y las yemas axilares, los explantes más utilizados para su propagación masiva debido a que son los tejidos que conserva siempre la capacidad de dividirse.

- Composición del medio nutritivo, en el caso de zarzamora y frambuesa algunos autores recomiendan el uso del medio semisólido Murashige y Skoog o MS (1962) ya que contiene concentraciones elevadas de nitratos de amonio lo que permite su uso en estudios de organogénesis (González y col.,2000).
- El tipo y la concentración de los reguladores de crecimiento aplicado en cada etapa de desarrollo. En el caso de la multiplicación el cultivo de *Rubus glaucus* se ha evaluado el regulador de crecimiento BA, resultando uno de las más eficientes para estimular el crecimiento, desarrollo, división celular, alargamiento celular, iniciación y crecimiento de brotes a concentraciones de  $1\text{mgL}^{-1}$  (Almeida y Contreras, 2004), sin embargo, autores han evaluado la respuesta al combinarla con concentraciones por debajo de  $1\text{mgL}^{-1}$  de  $\text{AG}_3$  en donde han mejorado sus resultados en el número de yemas por explantes, así como en la elongación del tallo, tal es el caso de *R. chamaemorus* ( Ryabova y col. 2007; Thiem 2003 ), *R. idaeus* (Ochatt y Patat, 1995) y *R. glaucus* (Murulanda y col.,2000) . En caso de la fase de enraizamiento se ha utilizado la auxina AIA en concentraciones que varían de 0.001 a 10 mg/l e IBA han presentado una mayor producción de raíces en el cultivo.

Tabla 14: Reguladores de crecimiento aplicados en cultivos *in vitro* de especies del género *Rubus* y la respuesta inducida

| Especie                 | Tipo de explante      | Hormona          | Concentración de hormona   | Resultado inducida                             | Referencia                   |
|-------------------------|-----------------------|------------------|--|--|------------------------------|
| Rubus sp.               | Yemas apicales        | BA<br>AIB        | BA ( 3.55 mgL <sup>-1</sup> )<br>AIB (0.49 mgL <sup>-1</sup> )                                 | Brotación                                      | Lisek y Orlikowska,2004      |
| <b>R. fruticosus L.</b> | Hojas <i>in vitro</i> | BA<br>TDZ<br>AIB | BA (2 mgL <sup>-1</sup> )<br>TDZ (1 y 2 mgL <sup>-1</sup> )<br>AIB, (0.2 mgL <sup>-1</sup> )   | Brotos adventicios a TDZ a 1 mgL <sup>-1</sup> | Tatjana Vujović y col., 2010 |
| <b>R. chamaemorus</b>   | Yemas axilares        | BA<br>TDZ<br>AG3 | BA (4.4 mgL <sup>-1</sup> )<br>TDZ (1.1 mgL <sup>-1</sup> )<br>AG3                             | Brotos con TDZ Y BA; y enraizamiento con AG3   | Samir C. Debnath, 2007       |
| <b>R. chamaemorus</b>   | Yemas axilares        | BA<br>AG3<br>TDZ | BA ( 8.9 mg.L)<br>AG3 (5.8 mgL <sup>-1</sup> )<br>TDZ (1.1 mgL <sup>-1</sup> )                 | Brotación                                      | Ryabova, 2007                |
| <b>R. ulmifolius</b>    | Yemas axilares        | BA<br>ANA        | BA (3 mgL <sup>-1</sup> )<br>ANA (0.2 mgL <sup>-1</sup> )                                      | Alargamiento de brotes                         | Sisti y col., 2007           |
| <b>R. pubescense</b>    | Hojas <i>in vitro</i> | BA<br>AIB<br>ANA | BA (8.9 mgL <sup>-1</sup> )<br>AIB ( 0.98 mgL <sup>-1</sup> )<br>ANA (0.54 mgL <sup>-1</sup> ) | Multiplicación de brotes                       | Ambrozic T.B y col., 1994    |
| <b>R. chamaemorus</b>   | Yemas axilares        | BA<br>AIB        | BA (0.88 µM)<br>AIB (0.9 µM)   | Brotación y enraizamiento                      | Thiem Barbara, 2000          |
| <b>R. idaeus</b>        | Yemas axilares        | BA<br>AIB        | BA (2 a 4 µM) en ausencia de AIB   | Brotación y plántulas completas                | Erig, C.A y col, 2002        |
| <b>Rubus spp.</b>       | Yemas axilares        | BA<br>AIB        | BA ((2 mg.L-1)<br>AIB ((2 mg.L-1)  | Brotación y enraizamiento                      | Zawadzka y Orlokowska, 2006  |

### III.- JUSTIFICACIÓN

En la actualidad resulta de gran importancia investigar y encontrar las variantes que nos permitan el desarrollo de una agricultura rentable y no contaminante del medio ambiente. Sin embargo, el uso de productos químicos en la agricultura aumenta notablemente los rendimientos y la rentabilidad de los cultivos, pero la utilización constante de estos puede alterar el medio biológico y disminuir la efectividad frente a cepas fitopatógenas y patógenas para el humano. Es por eso que la utilización de prácticas sostenibles, como el empleo de productos orgánicos, es una de las mejores variantes para garantizar una buena producción. Debido a ello, se ha estudiado a las plantas con sustancias bioactivas con alta actividad antimicrobiana ante patógenos y fitopatógenos, como es el caso del género *Rubus*, el cual gracias a la presencia de metabolitos secundarios del tipo polifenólico ha mostrado efectos fungicidas, bactericidas y como conservadores de alimentos. Sin embargo, en México aún se desconoce el potencial antimicrobiano de muchas especies silvestres de zarzamora y frambuesa presentes en su territorio, por ejemplo: la Meseta Purépecha michoacana es uno de los lugares que presenta diversidad biológica en éste género, pero debido a la falta de conocimiento científico de su potencial antimicrobiano, su valor se subestima y no pueden ser explotadas adecuadamente, lo que provoca que sean eliminadas o consideradas como maleza. Por ello, se pretende estudiar algunas especies silvestres del género *Rubus* presentes en la Meseta Purépecha, con el objetivo de aportar nueva información para que de esta manera las plantas se puedan incorporar a programas de producción masiva explotando sus compuestos, así mismo otorgando una alternativa de ingresos o de apoyo a la comunidad con la fabricación de productos naturales agronómicos o alimentario.

## IV.- OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Establecer las condiciones adecuadas para la micropropagación de plantas silvestres del género *Rubus* y sus cultivos celulares para ser utilizados como modelo biológico en la obtención de compuestos polifenólicos con actividad antimicrobiana.

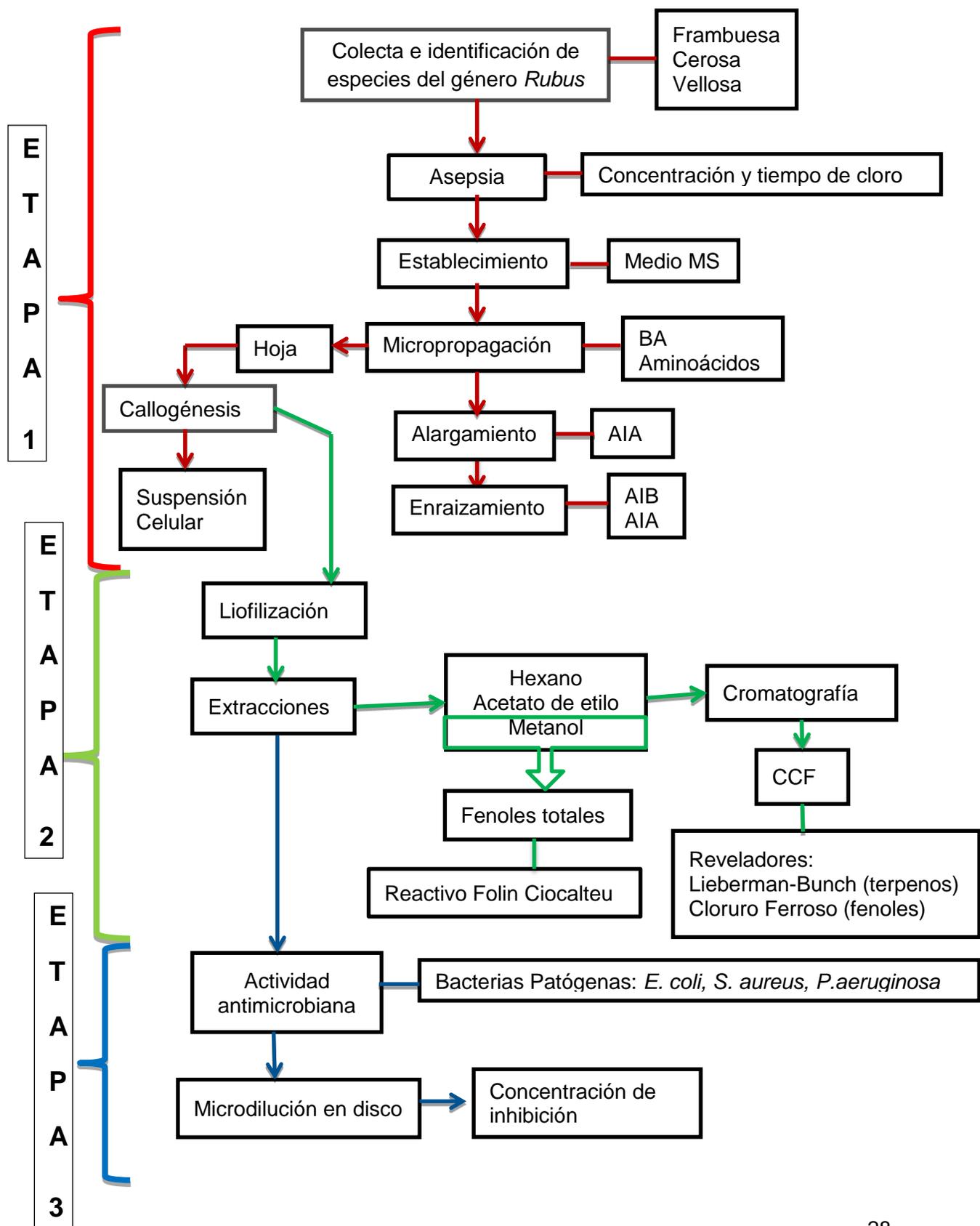
### 4.2 Objetivo específicos

- Establecer un sistema de micropropagación de brotes *in vitro* y cultivos celulares, de plantas del género *Rubus*.
- Establecer un sistema extractante de polifenoles para callos celulares.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos polifenólicos.

## V.- HIPÓTESIS

El efecto antimicrobiano de los extractos obtenidos de cultivos celulares y brotes *in vitro* del género *Rubus* frente a cepas patógenas es debido a la presencia de metabolitos secundarios de tipo polifenólicos.

## VI.-ESQUEMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA



## VII.- DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA

### 7.1 Colecta y preparación del material vegetal

Para la selección del material vegetal se realizaron recorridos por zonas aledañas a Uruapan, Michoacán para seleccionar las especies silvestres del género *Rubus* a estudiar. Se colectaron tres materiales morfológicamente diferentes que de acuerdo a sus características físicas se denominaron Frambuesa, Cerosa y Velloso. Una vez localizadas las zonas se colectaron tallos jóvenes con segmentos nodales y se tomaron las coordenadas geográficas del lugar de colecta.

Para disminuir la carga microbiana, el material vegetal se roció con solución fúngica-bactericida (agrimicin-captan a  $5 \text{ gL}^{-1}$ ) y se trasladó al laboratorio, donde se eliminaron las hojas y cortaron los tallos en fragmentos de 4-5 cm con presencia de una yemas axilares en estado de crecimiento. Los segmentos de tallo (explantes) se sometieron a un sistema de asepsia para establecerlas *in vitro*.

### 7.2 Establecimiento

#### 7.2.1 Sistema de asepsia

Para determinar cuál es el método de asepsia más viable para los explantes se probaron 4 tratamientos diferentes (Cuadro 2), cada tratamiento se llevó a cabo con 5 repeticiones y cada repetición consistió de un frasco con tres explantes en 20 ml de medio MS. En experimentaciones posteriores de establecimiento se aplicó únicamente el método que resultó ser más eficaz.

Los tratamientos aplicados a los explantes consistieron en (Tabla 4):

- Testigo (T0): Los explantes fueron lavados con agua destilada estéril y detergente líquido por 20 min y fue enjuagado con agua destilada estéril 3 veces.
- Tratamiento 1 (T1): Lavado con agua estéril y detergente líquido por 20 min, se sumergieron en etanol al 70 % (v/v) por 2-3 min, después inmersión en

solución fúngica-bactericida que contenía: agrimicin ( $0.5\text{g.L}^{-1}$ ) y benomil ( $0.5\text{g.L}^{-1}$ ), posteriormente se sumergen en cloro al 10% por 10 minutos y se realizan tres enjuagues con agua estéril.

- Tratamiento 2 (T2): Consiste en el tratamiento 1 con una variación en la concentración de cloro, siendo ésta de 20% por 10 minutos.
- Tratamiento 3 (T3): Consiste en el tratamiento 1 con una variación en la concentración y tiempo de exposición del cloro; 10% por 20 minutos.
- Tratamiento 4 (T4): Consiste en el tratamiento 1 con una variación en tiempo de exposición del cloro a 20 minutos.

**Tabla 4: Agentes desinfectantes utilizados en los diferentes tratamientos para el establecimiento de las especies de *Rubus* spp.**

| Tratamiento  | Agua estéril y detergente líquido | EtOH 70% | Solución Fúngica-Bactericida | Cloro 10% | Cloro 20% | Enjuague con agua estéril y antioxidantes |
|--------------|-----------------------------------|----------|------------------------------|-----------|-----------|---|
| Testigo (T0) | X                                 |          |                              |           |           |   |
| T1           | X                                 | X        | X                            | 10 min    |           | X   |
| T2           | X                                 | X        | X                            |           | 10 min    | X   |
| T3           | X                                 | X        | X                            | 20 min    |           | X   |
| T4           | X                                 | X        | X                            |           | 20 min    | X   |

### 7.2.2 Análisis Estadístico

Los experimentos se realizaron en un diseño de bloques completamente al azar con tres repeticiones. Cada tratamiento incluía 3 repeticiones y cada repetición consistió de un frasco con 3 explantes en 20 ml de medio. Las variables de evaluación fueron registradas y analizadas mediante un análisis de varianza (ANOVA). Las medias de los tratamientos fueron separados usando la prueba de Tukey, para diferencia mínimas significativas con un intervalo de confianza de 95%.

### **7.2.3 Medio de cultivo para establecimiento**

El medio del cultivo se prepararon a partir de soluciones stock correspondientes al medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (Anexo 1), adicionándoles vitaminas, 30 gL<sup>-1</sup> de sacarosa, 7.0 g.L<sup>-1</sup> de agar, 1.0 g.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico y ácido cítrico y según la etapa del procesos se adicionó reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones. El pH se ajustó a 5.7 con 1 N NaOH o de HCl según fuera el caso.

### **7.2.4 Siembra e incubación**

La siembra se realizó eliminando los tejidos dañados por el proceso de asepsia posteriormente se sembraron tres explantes en cada frasco con medio MS, bajo las máximas condiciones posibles de asepsia. Terminando la siembra, se sellaron y etiquetaron según correspondía a cada tratamiento y especie, para posteriormente colocarlos en el cuarto de crecimiento que se mantenía a una temperatura de  $25 \pm 2$  ° C, una intensidad lumínica de 1500 lux y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

La incubación duró tres semanas, durante las cuales se realizaron conteos semanales de los explantes contaminados, oxidados y sobrevivientes. Después de cada evaluación, el material contaminado y oxidado fue retirado del cuarto de crecimiento.

### **7.3 Micropropagación**

Una vez obtenido el material aséptico, se dio inicio a la micropropagación, traspasando los explantes más vigorosos a medio MS suplementado con diversas concentraciones de BA (Tabla 5), para evaluar su efecto en la formación de brotes. Los explantes se mantuvieron durante seis semanas en medio MS con el regulador; durante este tiempo se realizaron subcultivos cada 15 días y conteos

del número de brotes a los 7, 21 y 35 días. En cada subcultivos se fue disminuyendo la concentración de BA hasta eliminar el regulador de crecimiento.

**Tabla 5: Tratamiento para evaluar la inducción de los brotes en *Rubus* spp.**

| Tratamiento          | BA (mgL <sup>-1</sup> ) |
|----------------------|-------------------------|
| <b>Testigo (BA0)</b> | 0.0                     |
| <b>BA1</b>           | 0.5                     |
| <b>BA2</b>           | 1.0                     |
| <b>BA3</b>           | 2.0                     |

Los porcentajes de brotación y la frecuencia de formación de brotes fueron evaluados semanalmente después de iniciado el experimento. El número de brotes por explante fue registrado para seleccionar el tratamiento con la respuesta más favorable a la inducción de brotes, es decir, que se calculó la Capacidad de Formación de Brotes (CFB) de acuerdo a la formulación reportada por García-Saucedo y col. (2005) que se describe a continuación:

$$\text{CFB} = \frac{\text{Promedio de brotes por explante}}{\text{Porcentaje de explantes con brote}}$$

100

Es importante tener en cuenta que las plantas son capaces de sintetizar los aminoácidos utilizando como fuente de nitrógeno el amino y el nitrato que se les proporciona a través del suelo; pero esta síntesis de aminoácidos es costosa para la planta en relación al requerimiento energético que precisan. Este gasto de energía es especialmente importante en momentos en los cuales la fisiología de la planta no es óptima, como puede ser en casos donde ha sido sometida a cualquier tipo de estrés, por lo cual necesita incrementar el contenido total de aminoácidos para soportar dichas situaciones. Esto, lo hace a costa de disminuir la formación de proteínas, lo que provoca una reducción en la tasa de crecimiento de éstas. También se sabe que los aminoácidos están íntimamente relacionados con los mecanismos de regulación del crecimiento y desarrollo vegetal. Algunas hormonas vegetales se encuentran unidas a aminoácidos o proceden de la transformación de éstos, lo que indica el importante papel que puede tener la aplicación de los

aminoácidos al medio. Por ello, surge la alternativa de adicionar directamente algunos aminoácidos al medio de cultivo, para que se evite la transformación química del nitrógeno dentro de la planta en aminoácidos y por lo tanto llevarla a un importante ahorro energético que le ayude a superar tanto situaciones de estrés, como fomentar su crecimiento y desarrollo.

Dicho lo anterior, se consideró evaluar el comportamiento de brotación de los explantes, adicionando cuatro aminoácidos al medio MS y complementado con la concentración óptima de BA resultante para cada especie, PVP como antioxidante, gelzan como gelificante, sacarosa, y cefotaxina como antibiótico. Este nuevo tratamiento, denominado M2P, se contrapuso con un control, denominado M1P (Tabla 6).

El parámetro a evaluar fue el número de brotes por explante. Se realizaron subcultivos cada quince días, tales subcultivos consistían en disminuir a la mitad la concentración de BA y posteriormente eliminar el regulador de crecimiento.

**Medios de cultivo confrontados en la segunda prueba de la Micropropagación de *Rubus* spp.**

| M1P (control)        |                     | M2P           |                        |
|----------------------|---------------------|---------------|------------------------|
| Componentes          | Concentraciones     | Componentes   | Concentraciones        |
| <b>Medio MS</b>      | 10 mL <sup>-1</sup> | Medio MS      | 10 mL <sup>-1</sup>    |
| <b>Vitaminas R2*</b> | 10 mL <sup>-1</sup> | Vitaminas R2* | 10 mL <sup>-1</sup>    |
| <b>BA</b>            | Según especie       | BA            | Según especie          |
| <b>Sacarosa</b>      | 30 gL <sup>-1</sup> | Glicina       | 1 mgL <sup>-1</sup>    |
| <b>Agar</b>          | 7 gL <sup>-1</sup>  | Adenina       | 0.25 mgL <sup>-1</sup> |
| <b>Antioxidante</b>  | 10 mL <sup>-1</sup> | L-glutamina   | 0.50 mgL <sup>-1</sup> |
|                      |                     | L-arginina    | 0.15 mgL <sup>-1</sup> |

|             |                      |
|-------------|----------------------|
| PVP         | 1 gL <sup>-1</sup>   |
| Gelzan      | 3.3 gL <sup>-1</sup> |
| Sacarosa    | 30 gL <sup>-1</sup>  |
| Antibiótico | 1 mL <sup>-1</sup>   |

## 7.4 Alargamiento

Una vez obtenidos los brotes, se evaluó el alargamiento como respuesta a la presencia de diferentes concentraciones de AIA (Tabla 7). Los explantes permanecieron durante 35 días en este medio para permitir su elongación, donde se registró semanalmente el crecimiento en centímetros y el número de hojas formadas. Las concentraciones fueron consideradas basándose en estudios realizados en *Rubus glaucus* Benth por Alina Katil y col., (2011).

**Tabla 6: Tratamientos para evaluar el alargamiento de los tallos**

| Tratamiento    | AIA (mg/L) |
|----------------|------------|
| Testigo (AIA0) | 0.0        |
| AIA1           | 0.1        |
| AIA2           | 0.5        |

## 7.5 Enraizamiento

Los brotes que alcanzaron un tamaño mínimo de 3 cm permanecieron durante 7 días en nuevo medio MS sin reguladores de crecimiento para permitir el efecto de los nuevos reguladores sobre los explantes. Posterior a este tiempo, se probaron dos auxinas relacionados con el enraizamiento las cuales son ácido indolbutírico (AIB) y ácido indolacético (AIA); ya que la adición de auxinas en el medio de

cultivo ayuda a la brotación de un sistema radicular en especies de la familia de las Rosáceas como lo menciona Cousineau y col.(1991), por ello se evaluó la respuesta expuestos a dos diferentes concentraciones de tales reguladores de crecimiento en medio MS al 50% (Tabla 8).

El registro de número de raíces y largo de raíces por explante se efectuó cada 15 días. Los datos fueron procesados aplicando el ANOVA y la prueba de Tukey para diferencias mínimas significativas con un intervalo de confianza del 95%.

**Tabla 7: Tratamiento para evaluar la inducción de raíces**

| Tratamiento | AIB (mgL <sup>-1</sup> ) | Tratamiento | AIA (mgL <sup>-1</sup> ) |
|-------------|--------------------------|-------------|--------------------------|
| <b>AIB0</b> | 0.0                      | AIA0        | 0.0                      |
| <b>AIB1</b> | 0.5                      | AIA1        | 0.5                      |
| <b>AIB2</b> | 1                        | AIA2        | 1                        |

## 7.6 Callogénesis

### 7.6.1 Inducción del callo

Durante el proceso de micropropagación los brotes que generaban hojas bien desarrolladas, se desprendieron del explante y fueron diseccionadas (explantes de un área aproximadamente de 1 cm<sup>2</sup>), para sembrarlos en medio MS suplementado con 3.3 mgL<sup>-1</sup> gelzan, 30 mgL<sup>-1</sup> sacarosa, 0.5 mgL<sup>-1</sup> ácido ascórbico y ácido cítrico, y poniendo a prueba tres diferentes concentraciones del regulador de crecimiento 2,4-D (Tabla 9) para evaluar su efecto en la formación de callo.

**Tabla 8: Tratamiento para evaluar la inducción de callo**

| Tratamiento  | 2,4-D (mg/L) |
|--------------|--------------|
| Testigo (C0) | 0.0          |
| C1           | 0.5          |
| C2           | 1.0          |
| C3           | 2.0          |

Se realizaron subcultivos de los callos cada 15 días, incubándose en las mismas condiciones. La evaluación de inducción del callo por explante se evaluó tomando en cuenta el % de inducción, color y consistencia del mismo, para lo cual se utilizó la simbología mostrada en la Tabla 10.

**Tabla 9: Simbología para identificación del explante con crecimiento de callo**

| Tamaño del callo      | Símbolo    |
|-----------------------|------------|
| <b>No inducido</b>    | NI (0 %)   |
| <b>Un explante</b>    | + (33.3%)  |
| <b>Dos explantes</b>  | ++ (66.6%) |
| <b>Tres explantes</b> | +++ (100%) |
| Consistencia          |            |
| <b>Friable</b>        | F          |
| <b>No friable</b>     | NF         |
| Color                 |            |
| <b>Verde</b>          | V          |
| <b>Café</b>           | C          |

### 7.6.2 Micropropagación del callo

Una vez estandarizada, en cada especie, la concentración de 2,4-D para la formación de callo y teniendo un gramo de callo friable (peso fresco) en ausencia

de explante madre, se pusieron a prueba nuevos tratamientos tomando como control la concentración óptima de 2,4-D de cada especie.

En la Tabla 11 se muestran los tres diferentes tratamientos que se aplicaron para determinar la curva de crecimiento de cada especie. La curva de crecimiento se realizó de acuerdo al método propuesto por Stepan-Sarkisian (1990), para lo cual se registró el peso fresco (PF) de los cultivos celulares cada 3 días con tres repeticiones. Para la determinación del PF, se colocaron los callos en cajas Petri llevadas previamente a peso constante e inmediatamente se pesaron en una balanza analítica. Con los datos obtenidos se trazaron las curvas correspondientes a la cinética de crecimiento (PF en función del tiempo) y a partir de éstas se calculó el tiempo de duplicación de las células (tdc) y la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) mediante las ecuaciones propuestas por Rodríguez (2007):

#### **Tiempo de duplicación celular (tdc)**

$$\text{tdc} = \text{Ln}2 / m \text{ (días)}$$

$$\text{tdc} = 0.693 / m \text{ (días)}$$

Dónde:

m= pendiente de la recta en la fase exponencial

Ln2: logaritmo natural de 2

#### **Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )**

$$(\mu) = 1 / \text{tdc} \text{ (cm}^* \text{d}^{-1})$$

**Tabla 10: Tratamientos aplicados para la curva de crecimiento de callogénesis**

| <b>Medio M1C (control)</b> |                      | <b>Medio M2C</b> |                       | <b>Medio M3C</b> |                       |
|----------------------------|----------------------|------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|
| Stock MS                   | 1 mgL <sup>-1</sup>  | Stock MS         | 1 mgL <sup>-1</sup>   | Stock MS         | 1 mgL <sup>-1</sup>   |
| Vit. R2                    | 1 mgL <sup>-1</sup>  | Vit.R2           | 1 mgL <sup>-1</sup>   | Vit. R2          | 1 mgL <sup>-1</sup>   |
| 2,4-D                      | 1 mgL <sup>-1</sup>  | ANA              | 0.6 mgL <sup>-1</sup> | ANA              | 1 mgL <sup>-1</sup>   |
| Gelzan                     | 3.3 gL <sup>-1</sup> | BA               | 0.6 mgL <sup>-1</sup> | AIA              | 1 mgL <sup>-1</sup>   |
| Antioxidante               | 2 mgL <sup>-1</sup>  | Gelzan           | 3.3 gL <sup>-1</sup>  | AIB              | 0.5 mgL <sup>-1</sup> |
| pH                         | 5.7                  | Antioxidante     | 2 mgL <sup>-1</sup>   | BA               | 0.6 mgL <sup>-1</sup> |
|                            |                      | pH               | 5.7                   | Gelzan           | 3.3 gL <sup>-1</sup>  |
|                            |                      |                  |                       | Antioxidante     | 2 mgL <sup>-1</sup>   |
|                            |                      |                  |                       | pH               | 5.7                   |

## 7.7 Obtención de suspensiones celulares

Una vez generado suficiente callo de cada tratamiento aplicado y de cada especie, se llevó a cabo el establecimiento de los cultivos de células en suspensión, los cuales fueron iniciados por transferencia de 1 g de callo friable a matraces Erlenmeyer de 125 ml con 30 ml de medio de cultivo. Los medios utilizados en las suspensiones fueron los mismos que se utilizaron en la Micropropagación del callo (M1C, M2C y M3C), llevándose a cabo tres repeticiones por especie, de cada uno de los tratamientos antes dichos. Los Erlenmeyer fueron almacenados en un cuarto en total oscuridad a temperatura ambiente, y mantenidos en un agitador orbital a 120 rpm. Al igual que en cultivo de callos, el medio fue reemplazado cada tres semanas por uno nuevo.

Pasado 15 días en la agitadora en ausencia de luz, se filtraron las suspensiones de cada tratamiento, del cual, el residuo sólido (callos) fue subcultivado en medio sólido y el líquido se homogenizó con 15 ml de medio nuevo para después colocarse en matraces de 50 ml, etiquetarse y sellarse para colocarlos nuevamente en la agitadora en ausencia de luz.

Después de tres días, se transfirió 1 ml de la suspensión de cada tratamiento a un tubo ependor graduado, el cual se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos hasta que el sobrenadante quedó libre de células y posteriormente fue eliminado; posteriormente se determinó el peso del residuo celular y se tomó datos. Este procedimiento se realizó cada tres días por un periodo de 15 días. La curva crecimiento celular se trazó conforme al tiempo y peso fresco de células empaquetadas, que fue calculado con la diferencia del peso fresco del residuo celular y el peso fresco de la suspensión entera.

## **7.8 Extracciones**

### **7.8.1 Obtención de extractos**

Durante el desarrollo del callo se presentan diferentes etapas de crecimiento en la cual la etapa exponencial es en la cual el callo se va acoplado a su nuevo entorno y medio expuesto, en la cual se considera que los metabolitos secundarios se pueden presentar mayormente en esta etapa; por ello, para la obtención de los extractos vegetales se utilizaron callos y medios de cultivos en etapa exponencial, obtenidos en los tratamientos M1C, M2C y M3C. El material fue liofilizado y posteriormente pesado para conocer los rendimientos.

Debido a que los antecedentes muestran presencia de diversos metabolitos secundarios de tipo polifenólico se aplicó el solvente metanol, sin embargo, también se ha reportado la existencia de otros metabolitos secundarios de tipo terpénicos; basándose en los antecedentes y la ausencia de investigaciones en las tres especies silvestres del género *Rubus* trabajadas (Frambuesa, Cerosa y Velloso), se consideró realizar un screening con tres disolventes basándose en el

grado de polaridad, estos fueron: polar (metanol), intermedio (acetato de etilo) y no polar (hexano).

Para la extracción se utilizaron los callos y medios de cultivo liofilizados, de cada tratamiento por separado. En el caso de los callos, estos se sumergieron en 10 ml del solvente durante 48 horas; posteriormente se filtraron, homogeneizaron y redujeron a sequedad a 40 °C en un rotavapor para posteriormente obtener el extracto, este procedimiento se realizó tres veces, una vez concluida la tercera vez el material se secó completamente al sol, para eliminar residuos del disolvente utilizado y así comenzar la siguiente extracción con nuevo disolvente, con el cual se llevó a cabo el mismo proceso. En el caso de los medios de cultivo se aplicó solamente la extracción con metanol, llevando a cabo el mismo proceso de filtración, homogenización y evaporación por tres veces.

### **7.8.2 Análisis cualitativos de los extractos**

- Cromatografía de capa fina

Se realizaron las diluciones necesarias para encontrar la fase móvil y llevar a cabo la cromatografía de capa fina (CCF) por triplicado de cada extracto (metanol, acetato de etilo y metanol), una vez obtenida las placas se revelaron, en caso de metanol y acetato de etilo con Sulfato Sérico, RPN y Cloruro Férrico, con el objetivo de encontrar polifenoles y en los extractos hexánicos con Liberman-Bunchard para la determinación de terpenos.

- Cuantificación de polifenoles totales

La determinación de compuestos fenólicos totales se utilizó el reactivo Folin-Ciocalteu (RFC), descrito por Makkart y col.(2003), el cual consta de colocar en tubos 5mL: 0.0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100µL de solución estándar de ácido gálico; después se completa con 500µl con H<sub>2</sub>O destilada, 250 µl de RFC a 1N y 1.25mL de soln de carbonato de sodio; se agitó en vortex e incubo durante 40 min a temperatura ambiente y en oscuridad, finalmente se realiza la lectura en el espectro a 725 nm para tomar los datos de absorbancia de cada solución los

cuales se trazaron para obtener la curva del ácido gálico y su ecuación de la línea de tendencia.

Una vez obtenida la curva del ácido gálico, se realizaron las soluciones de los extractos metanólicos únicamente de los callos de las tres especies. Para ello, se colocaron en tubos 50 µg de cada extracto metanólicos de callo en 50µl de metanol, obteniendo 10 diferentes muestras. Posteriormente se le adicionaron las cantidades antes dichas de agua destilada, RFC y carbonato de calcio, para posteriormente incubar a por 40 min. a temperatura ambiente y en oscuridad, y finalizar con la toma de datos del espectro a 725 nm.

Obtenidos los datos se calculó el promedio del triplicado de las pruebas de cada callo y su desviación estándar, posteriormente de la ecuación de la línea de tendencia del ácido gálico ( $y=mx+ b$ ), se determinó el valor de “x” sustituyendo los valores, donde “y” correspondió al promedio obtenido en cada tratamiento de callo. Los datos finales fueron representados en gramos equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco de callo, este resultado fue obtenido llevando a cabo el cálculo propuesto por Makkart y col.(2003).

## **7.9 Actividad antimicrobiana**

Se utilizaron los siguientes microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aureginosa* obtenidos del Cepario de la Facultad de Química de la UNAM; los cuales fueron seleccionados bajo los siguientes criterios: representan diferentes grupos, crean resistencia con facilidad y disponibilidad

Se realizó la siembra de los microorganismos en tubos con Caldo LB, los cuales se incubaron a 35°C durante 24 horas, posterior a esta incubación se sembró cada microorganismo en diferente matraz. Luego de tener las cepas totalmente aisladas se estandarizo la densidad óptima del inóculo usando una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mc Farland equivalente a

1.5 x 10<sup>6</sup> UFC/ml) y se verificó usando un espectrofotómetro, donde se obtiene una absorbancia de 0.08 -0.10 para el estándar 0.5 de Mc Farland a 625 nm.

La técnica utilizada fue por microdiluciones del extracto donde aplicaron 50µl de inóculo y 100 mg/ 500 µl de extracto, esta última concentración fue diluyéndose tomando alícuotas de 100 µl en cada pozo. Los controles manejados fueron caldo LB sin y con inóculo (100 µl) metanol como control negativo (100 µl) y ampicilina (1mg/ 200 µl) como control positivo.

Para evaluar la actividad antimicrobiana se adiciono a cada solución 40 µl de trifeniltetrazoliodocloruro al 0.2% (TTC), el cual muestra a las 48 horas de incubación, pigmentación rojiza en medio cuando existe crecimiento bacteriano, es decir, que el extracto no mostro inhibición en el crecimiento de la bacteria.

## VIII.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 8.1 Colecta y preparación del material vegetal

Las zonas de colecta seleccionadas se presentan en el Tabla 12, según las coordenadas dadas por el GPS

**Tabla 11: Localización de los sitios de colecta de las especies del género Rubus en Michoacán**

| Morfoespecies         | Frambuesa<br>( <i>Rubus pringlei</i> ) | Zarzamora<br>Cerosa<br>( <i>Rubus</i> spp.) | Zarzamora Velloso<br>( <i>Rubus adenotrichus</i> ) |
|-----------------------|--|---|--|
| <b>Municipio</b>      | Nahuatzen                              | Uruapan                                     | Uruapan  |
| <b>Altitud (msnm)</b> | 2769                                   | 1889  | 1889   |
| <b>Latitud</b>        | 19°40'29"                              | 19° 28' 38"                                 | 19° 38' 37"  |
| <b>Longitud</b>       | -101°50'9"                             | -102° 4' 31"                                | -102° 4' 30"                                       |

Se realizó una breve descripción de algunas características morfológicas más distintivas de cada material colectado.

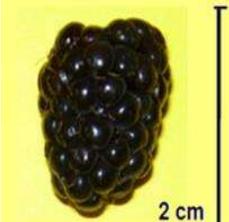
Frambuesa: Su tallo principal tiene un hábito de crecimiento erecto, semirastrero y con sección circular. Presenta hojas pinnaticompuestas con 3-7 foliolos, obovadas, de base cordada, aserradas, verde por el haz y blanquecinas aterciopeladas por el envés. Las flores tienen una corola compuesta de 5 pétalos blancos y poseen numerosos estambres y pistilos dando lugar al frutos de color rojo brillante que alcanza un tamaño aproximado de 1.5 cm de largo (Tabla 13A)

Cerosa: Presenta tallo circular, cubierto por una fina capa de cera blanquecina, presenta numerosa densidad de espinas, y su crecimiento se muestra arqueado. Las hojas presentan foliolos de forma láminar y suorbicular. Las flores presentan pétalos pequeños y separados de coloración blanca. La inflorescencia se da en forma se roseta con racimos aproximadamente de 6 a 8 frutos de color guinda opaco con un tamaño promedio de 2 cm. de largo (Tabla 13B).

Velosa: Este material silvestre se caracteriza por presentar un tallo suberecto, circular anguloso cubierto por un gran número de pelos glandulares con terminaciones rojizas, con hábito de crecimiento trepador y sus agujones están separados; sus hojas son dentadas con haz verde oscuro; sus flores son de color

| Especies                               | Tallo   | Pubescencia   | Hoja   | Flor  | Fruto   |
|--|---|---|--|---|---|
| A) Frambuesa<br>( <i>R. pringlei</i> ) |  |  |  |  |  |

**Tabla 12: Características morfológicas de las tres especies del género *Rubus* spp. trabajadas**

|   |   |   |  |   |   |
|---|---|---|--|---|---|
| B) Zarzamora<br>Cerosa<br>( <i>Rubus</i> sp.)         |  |  |  |  |  |
| C) Zarzamora<br>Velloso<br>( <i>R. adenotrichus</i> ) |  |  |  |  |  |

rosa, dando como resultado frutos subglobosos de coloración guinda brillante con un tamaño promedio de 2 cm de largo. Su inflorescencia es piramidal con un gran número de flores de color rosa, dando como resultado racimos que producen de 70 a 150 frutos de tamaño promedio de 2 cm de largo (Tabla 13C).

## 8.2 Asepsia y establecimiento

Como primer paso en el establecimiento de un sistema de propagación *in vitro*, es necesario obtener material libre de microorganismos contaminantes; para ello, inicialmente se desinfectó el material biológico de acuerdo a lo propuesto. Este tratamiento arrojó un alto porcentaje de mortandad principalmente por contaminación de microorganismos y posteriormente por oxidación, lo cual llevó a un replanteamiento de asepsia basándose en la solución fúngica y el compuesto antioxidante. Para ello se realizaron pruebas previas al protocolo propuesto, para controlar la oxidación y contaminación tomando lo reportado por Rabha Abdelwahd y col. (2008) quien solventó el problema de oxidación con la utilización del ácido ascórbico a  $1\text{mgL}^{-1}$  en el medio, mientras que la contaminación fue modificada basándose en lo reportado por Jones Castro (2007) quien realizó la evaluación de algunas solución fungicida-bactericida para disminuir los efectos de contaminación en cultivos *in vitro* de frambuesa (*Rubus idaeus* L.).

Una vez fijados los cambios se evaluó el efecto del cloro en relación al porcentaje de contaminación, oxidación y sobrevivencia. Al evaluar la variable de contaminación en cada especie, los tratamientos T2 y T3 no muestran diferencia significativa en Frambuesa y Cerosa, mientras que en Velloso son T1 y T3; por lo que si se desea, en todas las especies, agilizar el proceso se puede utilizar una concentración de 20% por 10 min, por lo contrario si se desea obtener mayor sobrevivencia debe utilizarse 10% de cloro durante 20 min de inmersión, en el caso de Frambuesa y Cerosa, mientras que en Velloso debe ser del 10% durante 10 min. Por otro lado, al analizar la variable de oxidación los resultados obtenidos

mostraron que el tratamiento T3, en Frambuesa y el T1 en Velloso existe diferencia significativa con los demás tratamientos, mientras que en Cerosa los tratamientos T2 y T3 no muestran diferencia significativa con los demás tratamientos, tales resultados revelan que mientras va aumentando la concentración de cloro y tiempo de inmersión hay menor número de explantes con brotación, eso se debe a que el cloro puede causar estrés fisiológico por ser un compuesto altamente oxidante para las plantas.

Para fines prácticos el análisis estadístico revela que el mejor tratamiento de desinfección para Frambuesa y Cerosa fue el tratamiento cuatro (T3), en el que se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia del 67% en Frambuesa y 70% en Cerosa; el tratamiento consistió en la aplicación del cloro al 10% por 20 minutos, la pérdida de plántulas por oxidación fue mínima para las dos especies (15 y 14%, respectivamente) y el porcentaje de contaminación se mantuvo por debajo del 20% (Figuras 6A y 6B). En el caso de la Velloso el mejor tratamiento fue el dos (T1) obteniendo un porcentaje de sobrevivencia del 55%, este tratamiento consistió en el lavado con cloro al 10% por 10 minutos; al igual que la Frambuesa y Cerosa, la Velloso presentó porcentajes de contaminación por debajo del 20%, pero tuvo un aumento en los porcentajes de oxidación, lo que clasificó a esta especie con menor sobrevivencia de las tres estudiadas, así como la más sensible a los tratamientos de asepsia llevados a cabo (Figura 6C). Este protocolo de desinfección se considera efectivo basándose en los parámetros definidos por Cruzat (2010) que afirma que la contaminación debe ser menor al 25% , de igual manera se considera adecuado ya que un 60% de explantes viables es un valor alto al compararlo con los demás tratamientos (Ver Figura 6). Además Roca y Mroginski (1991) señalan que tener cultivos completamente estériles y viables es difícil de lograr, más bien lo que se debe conseguir es un equilibrio entre la menor contaminación, oxidación y clorosis con una alta supervivencia, capacidad de generación de estructuras y viabilidad.

Con los resultados dado, se puede dar la razón a Pérez-Molphe y col. (1999) quienes mencionan que entre las desventajas más importantes de la propagación del cultivo de yemas axilares, es la alta sensibilidad de los tejidos a métodos de asepsia superficial, lo que hace pensar que algunos tratamientos pueden lograr reducir la contaminación por microorganismos pero la recuperación de los tejidos es mínima ya que puede ocasionarse oxidación y por ende la pérdida de los explantes logrados. Con respecto a la oxidación consideramos lo reportado por Abdelwahd y col., (2008) quienes mencionan que las causas de oxidación en CTV, son ocasionados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, la composición del medio de cultivo y el volumen y calidad del frasco del cultivo, razones que deben de estar considerados al realizar este proceso.

Así también, se observó que si las condiciones previas a la colecta de los explantes no se ven afectadas por lluvias u otros efectos del mismo tipo, las posibilidades de éxito del brotación en el cultivo *in vitro* aumentan sobre aquellos donde los inóculos estuvieron expuestos a la lluvia, ya que existe una alta proliferación de microorganismos, lo cual se traduce como un mayor porcentaje de contaminación, como fue este caso.

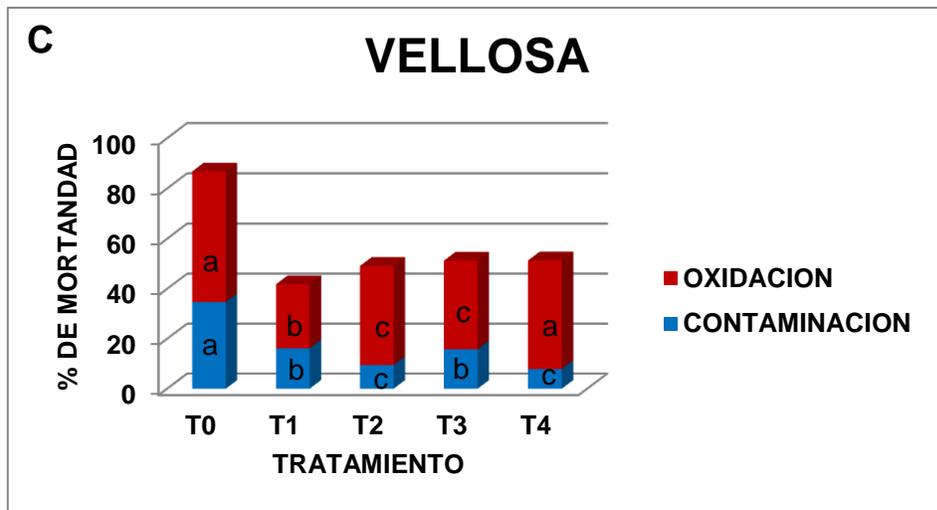
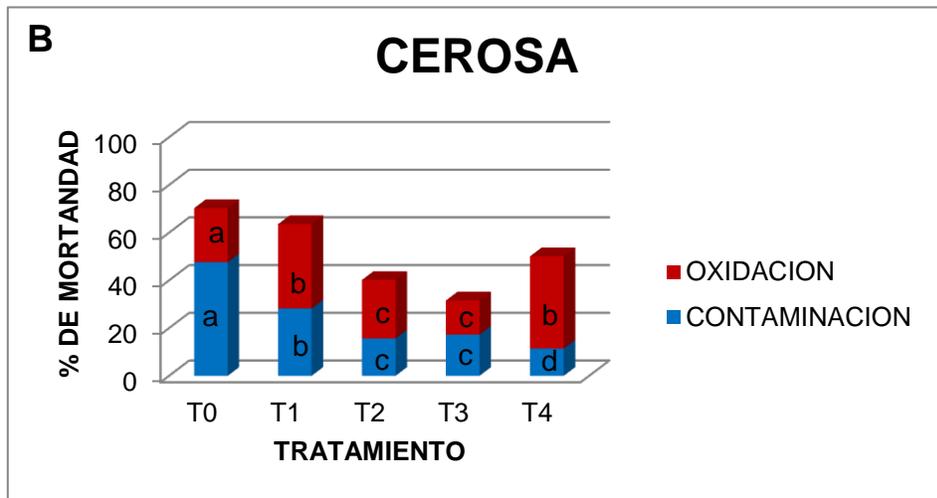
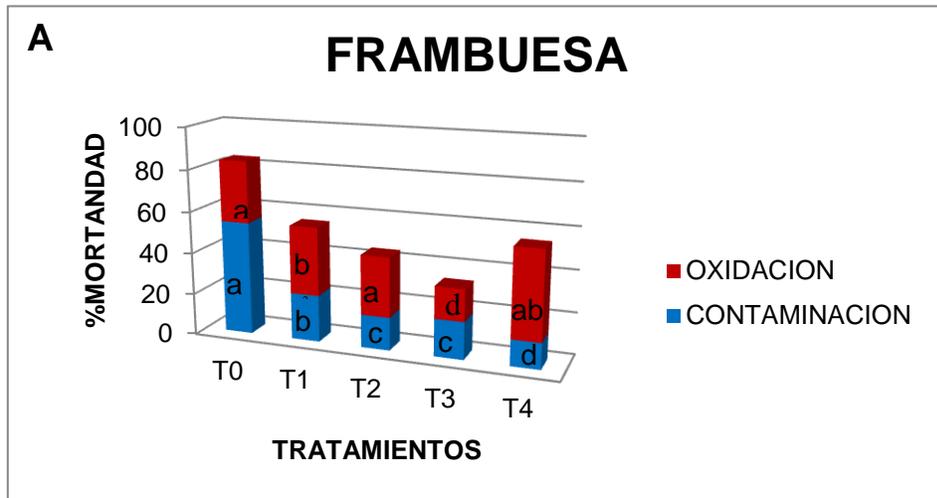
### **8.3 Micropropagación**

La Figura 7 muestra los resultados generados de cada especie en respuesta a la variable de brotación conforme a la concentración de BA durante los días 7,21 y 35.

En general se logró obtener un brotación en todos los tratamientos por lo que se puede deducir que la formación de brotes *in vitro* de las especies de *Rubus* spp. está influenciada por la adición de BA, donde de manera general todos los explantes respondieron favorablemente a la formación de brotes en presencia de la citocinina, mientras que los explantes cultivados en medio MS sin reguladores de crecimiento sólo generaron un brote. Por lo que se da la razón a González y

col. (2000), quienes mencionan que en la Micropropagación, las citocininas son un componente importante en el medio de cultivo de establecimiento y de multiplicación, debido a que promueven la división celular, proliferación de yemas axilares y formación de órganos *in vitro*.

La comparación de medias realizada demostró, en el caso de la Frambuesa (Figura 7A) no existe diferencia significativa en los primeros 7 días en concentración de BA, sin embargo, se observa diferencia significativa después de los 21 días, por lo que se observa que al aumentar gradualmente la concentración de BA en el medio de cultivo influye de manera positiva sobre el número de brotes, obteniendo después de los 21 días la mayor cantidad de brotes en la concentración más alta ( $2 \text{ mg.L}^{-1}$ ), por lo que hasta el momento se deduce que ha esta concentración no llega aún a su límite de toxicidad. En el caso de Cerosa (Figura 7B), la comparación de medias muestran que en los primeros 21 días no hay diferencia significativa en el número de brotes entre los tratamientos, por lo que económicamente se puede escoger el tratamientos BA1 ( $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) como el mejor tratamiento, ya que con una cantidad menor de hormona se obtienen resultados similares en la brotación, pero pasados 2 semanas (35 días) se muestra diferencia significativa entre los tratamientos BA1 y BA3 con el BA2, mostrando una duplicación en el número de brotes a concentración de ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) por lo que la elección del mayor número de brotes se modificó. Por otro lado, la Velloso (Figura 7C) se observa que en la primera semana de establecimiento, las concentraciones altas ( $1$  y  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de BA) durante los primero 7 días no muestran diferencias significativas conforme al número de brotes, puesto que genera mayor brotación; contrario a esto, la segunda y tercera semana la influencia del regulador, en el número de brotes, hace que exista una diferencia significativa marcada a concentración intermedia ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) produciendo mayor brotación, por lo que se concuerda, este comportamiento con lo reportado por Rojas-Gardueñas y col.( 1987).



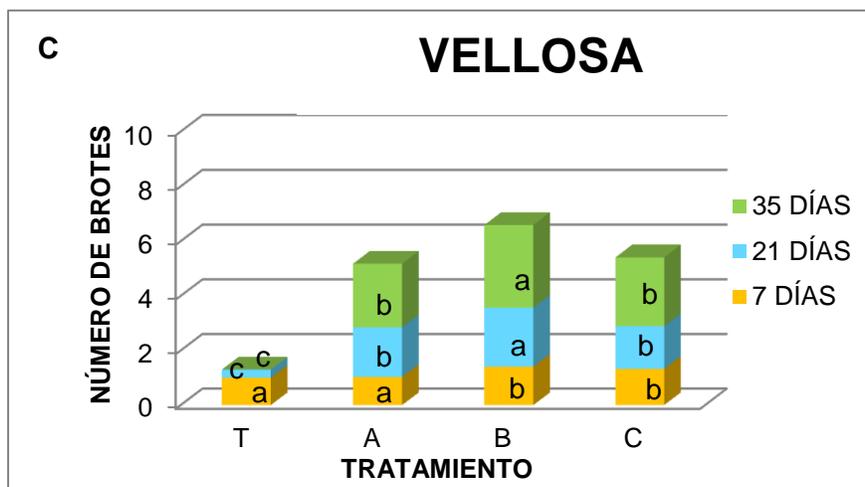
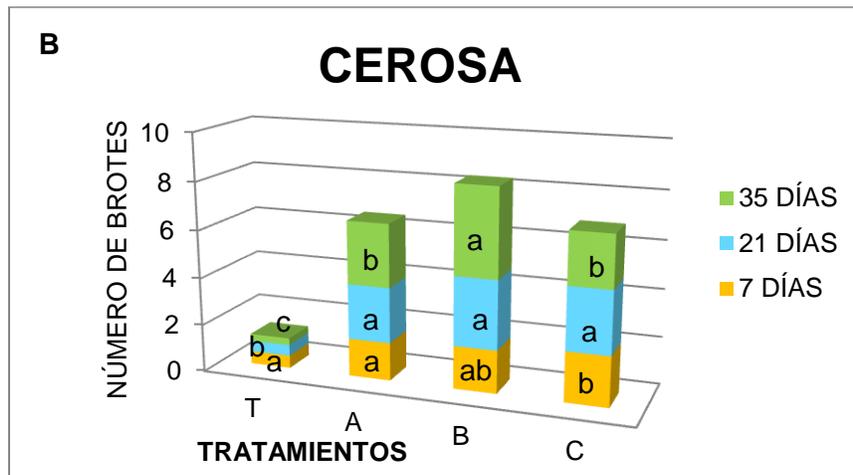
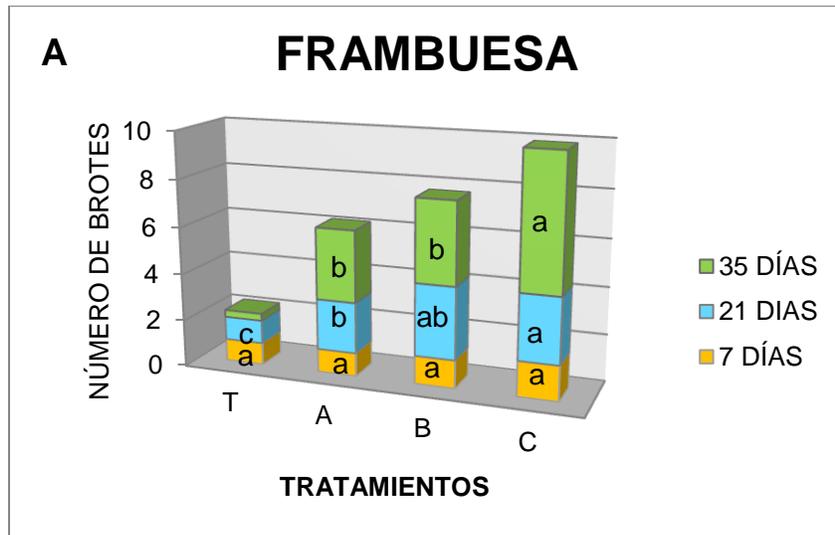
**FIGURA 5:** Resultados obtenidos en el establecimiento *in vitro* de A) Frambuesa B) Cerosa y C) Velloso

Posteriormente a los 35 días, se procedió a reunir los datos obtenidos para seleccionar el tratamiento con la respuesta más favorable a la inducción de brotes, llevando a cabo el cálculo de la Capacidad de Formación de Brotes (CFB) donde se relaciona el número de brotes por explante y el porcentaje de brotación. De esta manera, la combinación de estos valores da una idea de las condiciones óptimas para la regeneración de las tres diferentes especies del género *Rubus*, donde el tratamiento BA3 en la Frambuesa fue el más favorable puesto que presentó la mayor CFB (7.48) comparado con los demás tratamientos; mientras que para Cerosa y Velloso, el tratamiento BA2, desarrollaron una CFB de 7.43 y 5.86, respectivamente, tales tratamientos obtuvieron el número más alto de brotes comparado con los demás tratamientos (Tabla 14).

**Tabla 13: Efecto de la concentración sobre la capacidad de formación de brotes de las especies de *Rubus* trabajadas, a los 35 días**

| Morfoespecie     | Tratamiento | Brotación (%) | Promedio de Brotes por Explante | CFB         |
|------------------|-------------|---------------|---------------------------------|-------------|
| <b>FRAMBUESA</b> | BA0         | 96.8          | 1.30 <sup>c</sup>               | <b>1.26</b> |
|                  | BA1         | 83.3          | 5.19 <sup>b</sup>               | <b>4.32</b> |
|                  | BA2         | 100           | 6.52 <sup>b</sup>               | <b>6.52</b> |
|                  | BA3         | 88.9          | 8.41 <sup>a</sup>               | <b>7.48</b> |
| <b>CEROSA</b>    | BA0         | 88.9          | 1.20 <sup>c</sup>               | <b>1.16</b> |
|                  | BA1         | 94.4          | 6.55 <sup>b</sup>               | <b>6.18</b> |
|                  | BA2         | 88.9          | 8.36 <sup>a</sup>               | <b>7.43</b> |
|                  | BA3         | 93.3          | 6.88 <sup>b</sup>               | <b>6.42</b> |
| <b>VELLOSA</b>   | BA0         | 83.9          | 1.00 <sup>c</sup>               | <b>1.00</b> |
|                  | BA1         | 96.3          | 5.18 <sup>b</sup>               | <b>4.99</b> |
|                  | BA2         | 88.9          | 6.59 <sup>a</sup>               | <b>5.86</b> |
|                  | BA3         | 76.3          | 5.41 <sup>b</sup>               | <b>4.13</b> |

Letras iguales en una columna indican valores estadísticamente iguales ( $p \leq 0.05$ )



**FIGURA 6:** Efecto de BA sobre el número de brotes generados en A)Frambuesa B) Cerosa y C) Velloso (letras iguales indican que no hay diferencia significativa)

Los resultados obtenidos concuerdan con reportes generados en micropropagación de brotes laterales de *Rubus idaeus* por Borejsza-Wysocki y Geza (1994) quienes reportan que la concentración óptima para la brotación de yemas axilares se encuentra entre 1 a 2 mgL<sup>-1</sup> de BA al aplicar un amplio barrido hormonal. López y García (1998) evaluaron la concentración de 2 mgL<sup>-1</sup> de BA en cuatro variedades de frambuesa en medio MS y obtuvieron buenos resultados en cuanto al número de yemas por explantes. Villa y col. (2004) evaluaron el efecto de BA en diferentes concentraciones sobre la multiplicación *in vitro* de mora (*Rubus* sp.) y reportaron el mayor número de brotes (3.99) en un medio de cultivo MS con 1 mg.L<sup>-1</sup> de BA. Marulanda (2000) suplemento el medio MS con una combinación de citocinina-giberilina (1.5:0.5 mgL<sup>-1</sup>) y obtuvo resultados superiores a los 4 brotes por yema. Por otro lado, investigaciones indican que la complejidad de la propagación de los genotipos de *Rubus* es debido a que cada uno de ellos tiene una respuesta diferentes a los reguladores de crecimiento y muy difícilmente responden de igual manera al regulador aplicado, es el caso mencionado por Jin W y col. (1992) quienes reportan que la brotación de cuatro diferentes especies del género *Rubus* dependen de la combinación y la concentración precisa, siendo el caso de BA (2 mg.L<sup>-1</sup>) + ANA (0.1 mg.L<sup>-1</sup>) + AG<sub>3</sub> (0.2 mg.L<sup>-1</sup>) en *R. hirsutus* y *R. alceaefolius*, BA (4 mg.L<sup>-1</sup>) + ANA (0.1 mg.L<sup>-1</sup>) + AG<sub>3</sub> (0.2 mg.L<sup>-1</sup>) en *R. lambertianus* y BA (2 mg.L<sup>-1</sup>) + ANA (0.1 mg.L<sup>-1</sup>) en *R. columellaris*.

Pasadas dos semanas se transfirieron los explantes a frascos con nuevo medio de cultivo conteniendo las concentraciones que a cada experimento le correspondía, elevando su capacidad de brotes por explante. Esto confirmó que las concentraciones antes dichas fueron las mejores. Pero, pese a los resultados obtenidos, el número de brotes se vio afectado por la presencia de contaminantes y en algunos por oxidación, causando la pérdida de algunos explantes vigorosos. Este resultado fue inesperado, ya que una parte importante en la realización de este trabajo era la obtención de numerosos brotes en condiciones asépticas para

una posterior etapa. Por ello fue necesario replantear el experimento de propagación con antibióticos y antioxidantes en el medio.

Por otro lado, la evaluación de los tratamientos con la adición de los aminoácidos y el control (M1P y M2P) no mostraron diferencia significativas en el número de brotes de las tres especies durante los 35 días ( gráfica no mostrada), induciendo brotes múltiples (1-5 brotes por explante); sin embargo, los tratamiento M2P mostraron la influencia que tienen sobre la asimilación de los nutrientes en la primera etapa de la siembra dando como resultado una pronta respuesta en la obtención de brotes. Los explantes presentaron sus primeros brotes a los tres días de cultivo. Entre los 14-16 se obtuvieron de 2-3 brotes por explante, observándose a los 21-35 días de cultivo plántulas de 4-5 brotes por explante (Figura 8); mientras que en los tratamientos M1P los primeros brotes comenzaron en el séptimo día. Además los tratamientos M2P contribuyeron a la reducción de contaminación disminuyendo el número de explante contaminados y oxidados.



**FIGURA 7:** Brotación *in vitro* de yemas axilares en *Rubus* spp. durante 35 días en el medio M2P

A pesar de la no existencia significativa en el número de brotes es importante determinar cuál tratamiento es el más favorable a la inducción de brotes, para ello se aplicó el cálculo de CFB donde se relaciona el número de brotes por explante y el porcentaje de brotación. La Tabla 15 muestra que en el caso de Frambuesa el tratamiento M1P es más favorable puesto que presentó la mayor formación de brotes (3.96 brotes) comparado con el otro tratamiento; mientras que para Cerosa y Velloso, el tratamiento M2P, desarrollaron 4.10 y 3.71 brotes, respectivamente;

por lo que se concluye que a pesar de que no existe diferencia significativa en el promedio de brotes por explante, la CFB muestra la diferencia de cada especie según el tratamiento aplicado.

**Tabla 14: Efecto de los tratamientos M1P y M2P sobre CFB a los 35 días**

| Morfoespecie     | Tratamiento | Brotación (%) | Promedio de Brotes por Explante | CFB         |
|------------------|-------------|---------------|---------------------------------|-------------|
| <b>FRAMBUESA</b> | M1P         | 90.8          | 4.36 <sup>a</sup>               | <b>3.96</b> |
|                  | M2P         | 94.4          | 3.58 <sup>a</sup>               | <b>3.38</b> |
| <b>CEROSA</b>    | M1P         | 96.3.         | 3.80 <sup>a</sup>               | <b>3.66</b> |
|                  | M2P         | 100           | 4.10 <sup>a</sup>               | <b>4.10</b> |
| <b>VELLOSA</b>   | M1P         | 88.6          | 4.00 <sup>a</sup>               | <b>3.54</b> |
|                  | M2P         | 93.3          | 3.98 <sup>a</sup>               | <b>3.71</b> |

Letras iguales en una columna indican valores estadísticamente iguales ( $p \leq 0.05$ )

Los resultados obtenidos son una alternativa de aplicación para algunos genotipos de *Rubus*, debido a que las investigaciones realizadas han reportado que su mayor brotación fue dada con la combinación de TDZ (1.1 mg.L<sup>-1</sup>) con BA (4.4 mg.L<sup>-1</sup>) sin la existencia de las combinaciones realizadas en este trabajo.

#### 8.4 Alargamiento y producción de hojas

La determinación de la influencia del regulador de crecimiento AIA sobre crecimiento del tallos y desarrollo de hojas durante 28 días, se resumen en la Tabla 16, donde se registró que los explantes en presencia de AIA tenían un efecto significativo en el crecimiento del tallo y no así en el número de hojas, en todas las especies trabajadas. Además se observó que la concentración alta de AIA actúan de manera similar a los tratamientos que están en ausencia de AIA, pero la concentración mínima (AIA1= 0.1 mg-L<sup>-1</sup>) muestran diferencia significativa en el desarrollo del tallo en las tres especies por lo que se concluyó que la concentración de 0.1 mg.L<sup>-1</sup> de AIA es la óptima para el alargamiento de las especies trabajadas, ya que se obtuvieron la mayor longitud del tallo con 6.06, 6.1

y 3.42 y el mayor número de hojas (4.63, 3.32 y 3.17) a la misma concentración, en Frambuesa, Cerosa y Velloso, respectivamente.

**Tabla 15: Respuesta del crecimiento de los brotes y número de hojas frente a concentraciones de AIA a los 28 días**

| TRATAMIENTO | Alargamiento (cm)        |                         |                          | Número de hojas   |                   |                   |
|-------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|             | Frambuesa                | Cerosa                  | Velloso                  | Frambuesa         | Cerosa            | Velloso           |
| AIA0        | 3.12 ± 0.2 <sup>b</sup>  | 2.02 ± 0.1 <sup>b</sup> | 2.88 ± 0.1 <sup>b</sup>  | 2.78 <sup>a</sup> | 2.62 <sup>a</sup> | 2.8 <sup>a</sup>  |
| AIA1        | 6.06 ± 0.1 <sup>a</sup>  | 6.1 ± 0.1 <sup>a</sup>  | 3.42 ± 0.2 <sup>a</sup>  | 4.63 <sup>a</sup> | 3.32 <sup>a</sup> | 3.17 <sup>a</sup> |
| AIA2        | 4.46 ± 0.2 <sup>ab</sup> | 4.2 ± 0.2 <sup>ab</sup> | 2.72 ± 0.1 <sup>ab</sup> | 3.44 <sup>a</sup> | 3.23 <sup>a</sup> | 3.09 <sup>a</sup> |

Letras iguales en una columna indican valores estadísticamente no diferentes ( $p \leq 0.05$ )

Con respecto a lo anterior, se cree que la razón por la que el medio AIA1 presente los mejores resultados es básicamente por la combinación hormonal de citocininas restantes de procesos anteriores y la adición de auxinas, como lo mencionan Erig y col. (2002) quienes al evaluar BA y AIA en la elongación de los tallos *in vitro* de frambuesa (*Rubus idaeus*) observaron que en medios de cultivo con niveles crecientes de BA y concentraciones bajas de AIA, se presenta un aumento en el promedio de longitud de los tallos, señalando que el uso elevado de AIA es tóxico en niveles altos de citocininas, lo cual se manifiesta con la falta de elongación y crecimiento en forma de roseta de las plántulas. Por otro parte, tales resultados varían con lo señalado por Mauvalanda y col. (2000) quien utilizó diversas concentraciones de AIA en *Rubus* sp. y obtuvo sus mayores alturas de tallo a concentraciones de 2 mgL<sup>-1</sup>; por el contrario Alina Katil y col. (2011) en *R. glaucus* tuvo resultados favorables al aplicar concentraciones que varían de 0.0 a 1 mgL<sup>-1</sup> de AIA, concluyendo que los brotes con mayor altura se lograron en concentraciones de 0.1 a 0.5 mgL<sup>-1</sup> debido a que no presenta diferencia significativa en sus resultados.

Una observación relevante para el estudiante fue que las plántulas que se encontraban en ausencia de AIA presentaban brotación, principalmente los brotes

que fueron trasladados de medios suplementados con altas concentraciones de BA ( $2 \text{ mgL}^{-1}$ ) por lo que se atribuye éste efecto a que la hormona BA que presenta los tejidos, continua ejerciendo resultados en los brotes, así como lo menciona Rojas-Garcidueñas y col. (1986) quien menciona que la cantidad de hormonas absorbidas por los tejidos, seguirá mostrando su efecto hasta que sea degradada por la interacción con el medio de cultivo o consumida en los procesos metabólicos de la planta. Además, se mostró diferentes resultado conforme a lo reportado por Villa y col., (2004), quienes aplican la auxina ANA para promover el crecimiento de los tallos pero ensayos previos a los tratamientos realizados, con ANA promovieron la inducción de callo en la base de los tallos, por lo cual se cambió el regulador, con ello se concluyó que según la especie se tendrá diferente respuesta a la hormona aplicada.

## **8.5 Enraizamiento**

Con respecto al enraizamiento, en la Tabla 17 y 18 se muestra la evaluación del tamaño y número de raíces con respecto a dos concentraciones de AIB y AIA ( $0.0$ ,  $0.5$  y  $1 \text{ mgL}^{-1}$ ). En este experimento todos los explantes desarrollaron un sistema radicular vigoroso. De manera general, la aparición del sistema radicular se observó alrededor de los 5-8 días, causando las primeras apariciones en el medio MS con  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  del regulador AIB registrando un mayor tamaño de radícula pero con menor número de raíces, mientras que la concentración de  $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$  presentó menor tamaño de radículas pero con mayor número de raíces.

La estadística aplicada indica que no existe diferencia significativa entre el tratamiento AIB1 y AIB2 por lo que se puede determinar el tratamiento conforme a los datos obtenidos, en el caso del tamaño de raíces es el AIB1 con 6.79, 7.20 y 7.00 cm y para el número de raíces es el AIB2 con 4.78, 4.03 y 4.25 de raíces.

**Tabla 16: respuesta de crecimiento de la raíz y número de raíces frente a concentraciones de AIB a los 15 días**

| TRATAMIENTO | Tamaño de raíces (cm) |                   |                   | Número de raíces  |                   |                   |
|-------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|             | Frambuesa             | Cerosa            | Velosa            | Frambuesa         | Cerosa            | Velosa            |
| T           | 1.42 <sup>a</sup>     | 4.56 <sup>a</sup> | 4.36 <sup>a</sup> | 2.8 <sup>b</sup>  | 2.64 <sup>b</sup> | 2.78 <sup>b</sup> |
| AIB1        | 6.79 <sup>b</sup>     | 7.20 <sup>b</sup> | 7.00 <sup>b</sup> | 3.63 <sup>a</sup> | 3.44 <sup>a</sup> | 3.09 <sup>a</sup> |
| AIB2        | 5.62 <sup>b</sup>     | 6.90 <sup>b</sup> | 6.70 <sup>c</sup> | 4.78 <sup>a</sup> | 4.03 <sup>a</sup> | 4.25 <sup>a</sup> |

Letras iguales en una columna indican valores estadísticamente no diferentes ( $p \leq 0.05$ )

Los resultados anteriores variaron conforme a lo reportado por Castro y Gaviria (1995), quienes realizaron estudios de enraizamiento en diferentes especies de *Rubus* y a diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB) en donde se encontró que en concentraciones de AIB entre 1 y 3 mgL<sup>-1</sup> indujo un porcentaje de enraizamiento del 100%; Muñoz y Reyes (2006) lograron una respuesta similar con mora de castilla al cultivarlas en un medio nutritivo con 1 mgL<sup>-1</sup> de AIB, así también, Ballesta y col. (2008) logró obtener el mayor número de raíces y con un 100% de plantas enraizadas a 1.0 mg/l de AIB.

Mientras que en el segundo experimento que consistió en la aplicación de tres concentraciones del regulador de crecimiento AIA durante 28 días, obteniendo los resultados mostrados conforme al tamaño y el número de raíces, donde se registró de manera general, que los brotes en presencia de AIA tenían un efecto muy bajo en el tamaño y número de raíces, es decir, que las tres especies desarrollaron mayor número de raíces en ausencia del regulador AIA, porque de lo contrario, se observaba una respuesta en la elongación de los brotes y formación de hojas y muy poco en el enraizamiento.

Estadísticamente hablando, las concentraciones de AIA con respecto al tamaño de raíces, en Frambuesa se muestran diferencia entre los tratamientos, mientras que en Cerosa y Velosa existe diferencia significativa en los tratamientos EAIA1 y EAIA2 con el EAIA0, por lo que se concluyó que el regulador de crecimiento AIA

con respecto al tamaño de la raíz en las tres especies no es favorable puesto que el explante utiliza este regulador para efectuar un desarrollo diferente al enraizamiento. Por otro lado, en la valoración con el número de raíces se muestra que en Frambuesa y Cerosa existe diferencia significativa entre los tratamientos, mientras que en Velloso no existe diferencia significativa entre los tratamientos, sin embargo para las tres especies se muestra que el mayor número de raíces fue dado en ausencia del regulador de crecimiento AIA (Tabla 18). Algunas investigaciones han mostrado enraizamiento al combinar AIA a  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  y BA a  $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$  o con AIA a  $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$  y BA a  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  obteniendo raíces largas y delgadas con varias raíces secundarias, o también la obtención de raíces gruesas y largas a concentraciones de AIA a  $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$  y BA a  $0.1 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Cabe mencionar que los explantes que se sometieron a concentraciones altas de AIA provocaron clorosis en el brote y por lo ende se tuvo pérdidas de la planta, esto se cree que es debido a que se sobrepasó el límite de tolerancia de AIA en el explante por lo que se ocasiono una toxicidad provocando su muerte.

Analizando los datos obtenidos en ambos experimentos para enraizamiento se deduce que en el caso de las tres especies silvestres del género *Rubus* trabajadas es más aceptado la aplicación del regulador de crecimiento AIB a  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$ , debido a que se obtienen mayor número raíces y mayor tamaño en las raíces generadas. Es posible que se tengan resultados favorables al adicionar AIA con BA como lo recomiendan algunos autores, o en dado caso manipular concentraciones entre  $0.0$  y  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIA para evaluar el efecto y verificar si existe un mejoramiento en el número de enraizamiento.

**Tabla 17: Respuesta de crecimiento de la raíz y número de raíces frente a concentraciones de AIA a los 28 días**

| TRATAMIENTO | Tamaño de raíces (cm) |                   |                   | Número de raíces  |                   |                   |
|-------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|             | Frambuesa             | Cerosa            | Velosa            | Frambuesa         | Cerosa            | Velosa            |
| EIA0        | 2.88 <sup>a</sup>     | 3.44 <sup>a</sup> | 1.92 <sup>a</sup> | 1.69 <sup>a</sup> | 1.26 <sup>a</sup> | 0.88 <sup>a</sup> |
| EIA1        | 1.72 <sup>b</sup>     | 1.68 <sup>b</sup> | 0.85 <sup>b</sup> | 0.52 <sup>b</sup> | 0.86 <sup>b</sup> | 0.74 <sup>a</sup> |
| EIA2        | 1.00 <sup>c</sup>     | 1.27 <sup>b</sup> | 0.68 <sup>b</sup> | 0.54 <sup>b</sup> | 0.38 <sup>c</sup> | 0.62 <sup>a</sup> |

Letras iguales en una columna indican valores estadísticamente iguales ( $p \leq 0.05$ )

## 8.6 Callogenésis

### 8.6.1 Inducción del callo

Los resultados de formación de callos con el regulador 2,4-D, fueron diferentes en cuanto a la inducción de callo, color y consistencia (friable y no friable), pero no mostraron diferencias significativas en cada tratamiento (Tabla 19). Los mayores valores de inducción de callo alcanzados para Frambuesa, Cerosa y Vellosa se presentaron a una concentración de  $1 \text{ mgL}^{-1}$  con un 55.5, 100 y 66.6%, respectivamente, de los cuales el 37, 83.3 y 44.4% mostraron formación de callo friable y el 18.5, 16.7, 16.85% presentaron contaminación o necrosis, posiblemente por la manipulación del tejido en el momento del subcultivo. Los callos considerados no friables (NF) fue debido a que se caracterizaron por tener una coloración translúcida, un aspecto blando y un crecimiento rápido (Figura 9A) contrario a los callos friables que presentaban un crecimiento lento, coloración verde y estructura rígida (Figura 9B).

Los resultados anteriores muestran que el aumento en la concentración del regulador en las zarzamoras influyó en el aumento de la tasa de formación de callo, sin embargo, presentó baja tasa de callos friables. Por lo que se considera que para obtener la consistencia y la cantidad de callo formado dependen de una concentración específica de auxina aplicada para cada especie.

**Tabla 18: Resultados obtenidos en la inducción de callo de cada especie trabajada frente a las concentraciones de 2,4-D**

| ESPECIE   | TRATAMIENTO | INDUCCIÓN DE CALLO (%) | CONSISTENCIA |
|-----------|-------------|------------------------|--------------|
| Frambuesa | C0          | NI                     | ---          |
|           | C1          | 22.2 <sup>a</sup>      | NF           |
|           | C2          | 55.5 <sup>b</sup>      | F (37%)      |
|           | C3          | 44.4 <sup>c</sup>      | NF           |
| Cerosa    | C0          | 11.1                   | NF           |
|           | C1          | 44.4 <sup>a</sup>      | F (14.8%)    |
|           | C2          | 100 <sup>b</sup>       | F (83.3%)    |
|           | C3          | 77.7 <sup>c</sup>      | NF           |
| Velloso   | C0          | NI                     | ----         |
|           | C1          | 33.3 <sup>a</sup>      | NF           |
|           | C2          | 66.6 <sup>b</sup>      | F (49.95%)   |
|           | C3          | 88.8 <sup>c</sup>      | F (44.4%)    |

NI: no inducido; F: friable, NF: no friable y % porcentaje de explantes que formaron callo friable del porcentaje de callo inducido. Letras diferentes en los % de inducción de callo indican diferencia significativa  $p \leq 0.05$

Son muchas las investigaciones que han utilizado el 2,4-D y en muchas plantas con las que se ha trabajado este regulador de crecimiento para obtener callogénesis debido a su potente efecto, pero son muy pocos los trabajos realizados con especies del género *Rubus* en los cuales se han reportado la obtención de callos a partir de hoja joven *in vitro* como explantes inicial.

En trabajos realizados por Tatjana V. y col. (2010) con *Rubus fruticosus* L. establecieron que la concentración de 1 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D induce la formación de callo friables utilizando las hojas jóvenes como explantes iniciales, concentración que igualmente se encontró en este trabajo como la ideal en las tres especies estudiadas.



**FIGURA 8:** Características de la obtención de un callo friable (derecha) y no friable (izquierda) en las mismas condiciones de incubación.

### 8.6.2 Micropropagación de callo

Respecto al crecimiento celular, la figura 11 muestra la cinética de crecimiento del callo en las tres especies con respecto al PF; las gráficas presentan un perfil típico sigmoideo en el que se observaron las fases de crecimiento (fase lag, fase exponencial, fase estacionaria y fase de decline) durante 25 días.

Con respecto al PF, la fase lag en el que el cultivo presentó poco crecimiento por la adaptación a las condiciones del medio fue hasta el día 8 en los tres tratamientos de **Frambuesa**, incrementando su crecimiento (fase exponencial) hasta el día 17, la fase estacionaria fue corta en el tratamiento M1C puesto que permaneció solo 4 días, mientras que en el M2C y M3C fue de 6 días; la fase de decline fue diferente para el tratamientos M1C y M3C puesto que comenzó en el día 21 mientras que en el M2C fue en el día 24. Con respecto al mayor PF obtenido en la etapa estacionaria fue de 3.57 gr. con el tratamiento M2C que está compuesto por los reguladores ANA y BA (Figura 11A).

Por otro lado, en la curva de la zarzamora **Cerosa** se observó que la fase lag se en el tratamiento M1C se presentó los primeros 6 días, en M2C hasta el día 9 y en M3C fue hasta el día 5; la fase exponencial en los tratamientos M1C y M3C se presentó hasta el día 18 mientras que en M2C fue el día 15, la fase estacionaria

fue corta en el tratamiento M1C puesto que permaneció solo 6 días, mientras que en el M2C y M3C fue de 8 días; la fase de decline comenzó en el día 25. Con respecto al mayor PF obtenido en la etapa estacionaria fue de 3.37 gr. con el tratamiento M2C que está compuesto por los reguladores ANA y BA (Figura 11B). En la zarzamora **Velloso** la fase lag se presentó entre los días 7, 8 y 9 días según el tratamiento; la fase exponencial fue hasta el día, 18,15 y 15 en los tratamientos M1C, M2C y M3C respectivamente; la fase estacionaria para los tratamientos M1C, M2C y M3C permaneció constante durante 6,8 y 5 días, respectivamente; la fase de decline comenzó en el día 25. Con respecto al mayor PF obtenido en la etapa estacionaria fue de 2.92 gr. con el tratamiento M3C que está compuesto por la combinación de reguladores de auxinas/citocininas (Figura 11C).

En cuanto el tiempo de vida del callo en las especies del género *Rubus* spp. se observó que se logró mantener los callos hasta el segundo y tercer subcultivo (21 días de incubación), pues posteriormente comienzan a presentar problemas de infección por bacteria.



**FIGURA 9:** Crecimiento de los callos tomados a 3 (A), 21 (B) y 35 días (C)

En general, los reportes de micropropagación de especies vegetales que abordan el problema de la formación de callos, radica en la respuesta de los explantes con la concentración en el medio de las hormonas, auxinas y citocininas (Meng y col., 2004). Comúnmente, se escoge una relación auxina/citocinina alta, para que favorezca el crecimiento más que la división celular; sin embargo, en nuestro caso, la relación auxina/citocinina son bajas, las cuales produjeron un índice de crecimiento promedio de 54% en la producción de biomasa y un alto porcentaje (46%) en la formación de callos de cada especie. Este resultado es compatible

con lo obtenidos con Turk y col., (1994), donde con la misma relación auxina/citocinina, se reporta el mejor porcentaje de formación de callo (70%) en diferentes genotipos de *Rubus*. Por tal razón, con este ensayo se reafirma que el medio MS suplementado con auxinas/citoquininas, es adecuado para la formación de callos friables a partir de explantes de hoja *in vitro* de plantas del género *Rubus*.

El análisis del crecimiento de los callos ha sido utilizado para evaluar el comportamiento de los mismos, a través de los cuales se explica la acción del empleo de diferentes reguladores de crecimiento, lo que abre nuevas vías para el establecimiento *in vitro* de estos procesos. Al respecto, la edad del callo constituye un aspecto de gran importancia en el proceso de callogénesis en las diferentes especies vegetales, ya que el tiempo de permanencia en el medio de cultivo define el posterior comportamiento de estos (García, 1998), por lo cual se encontró que el momento óptimo para realizar el subcultivo de estos se encuentra entre los 15 y 20 días, mostrando un color verde claro característica coincidente con las señaladas por Tatjana V. y col.( 2010) en la formación de callo en especies del género *Rubus fruticosus*.

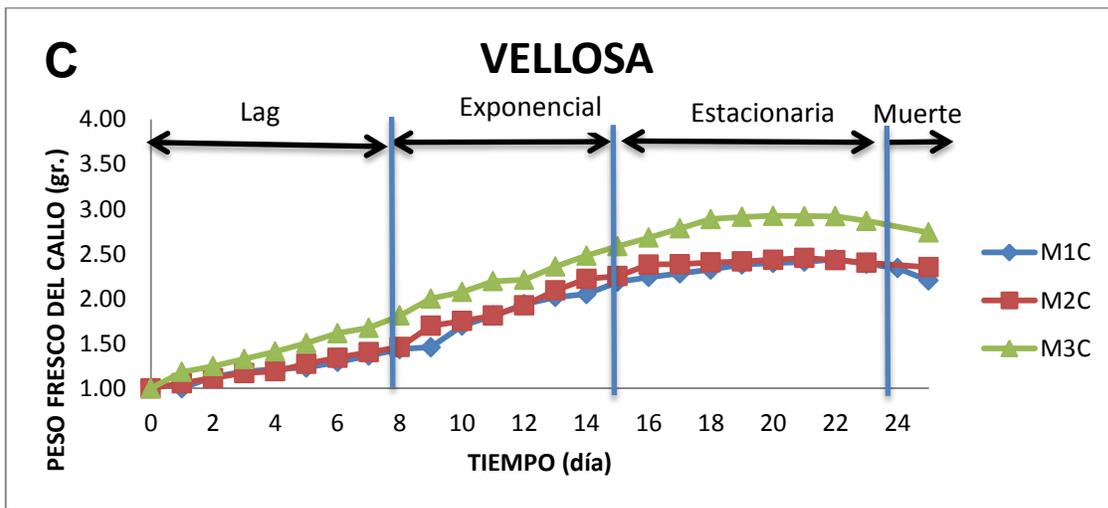
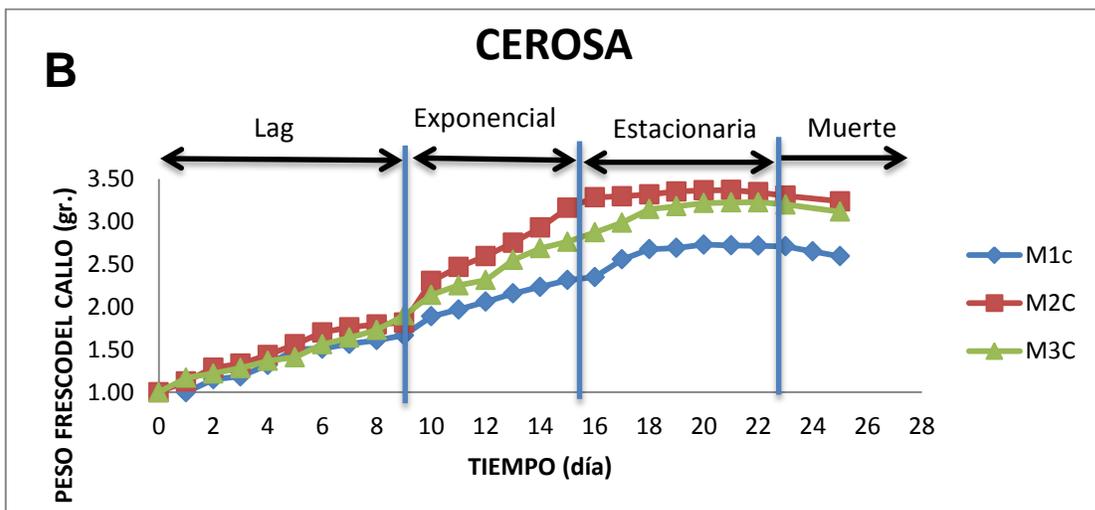
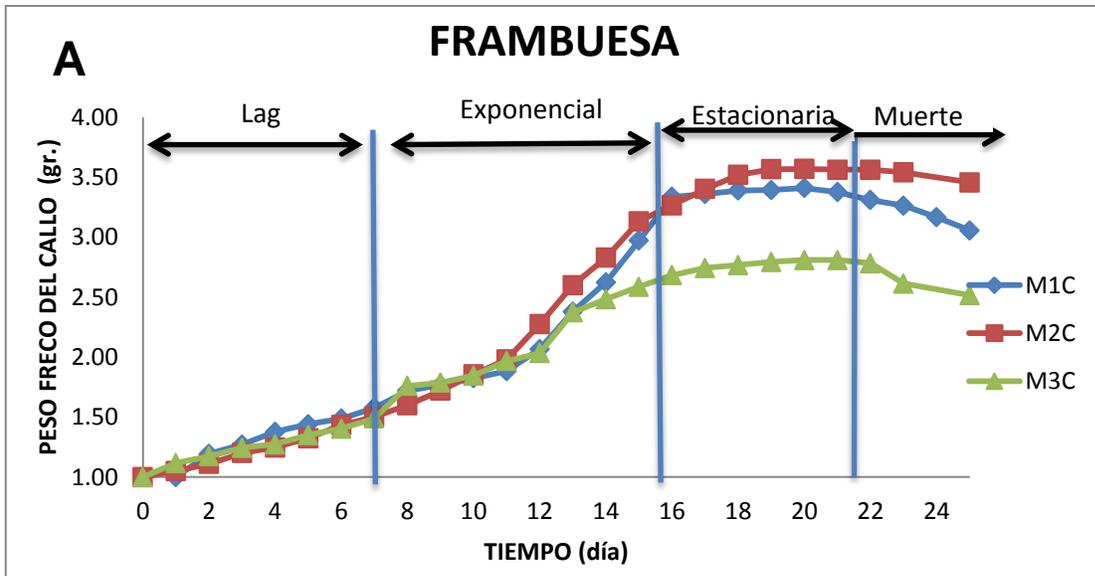


FIGURA 10: Curvas de Crecimiento de callo según de A) Frambuesa, B) Cerosa y C) Velloso



Además se midió la longitud máxima de los callos ya que el crecimiento de éstos fue más notorio en cuanto a su expansión. Los resultados de la longitud de los callos dieron una pendiente (m) que difiere en cada tratamiento (Tabla 20), pero la máxima en el caso de Frambuesa fue de 0.131, en Cerosa de 0.110 (tratamiento M2C) y en Velloso de 0.085 (tratamiento M3C); obteniéndose el menor tiempo de duplicación celular (tdc) de 5.290, 6.288 y 8.172 días, respectivamente logrando tener una alta velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) de 0.189, 0.159, y 0.122  $\text{cm d}^{-1}$ .

**Tabla 19: Resultados del tiempo de duplicación celular y la velocidad específica de cada especie trabajada**

| Especie   | Tratamiento | m     | Ln2   | tdc (días) | $\mu$ ( $\text{cm d}^{-1}$ ) |
|-----------|-------------|-------|-------|------------|------------------------------|
|           | M1C         | 0.112 | 0.693 | 6.187      | 0.161                        |
| Frambuesa | M2C         | 0.131 | 0.693 | 5.290      | 0.189                        |
|           | M3C         | 0.083 | 0.693 | 8.349      | 0.119                        |
|           | M1C         | 0.077 | 0.693 | 9.047      | 0.110                        |
| Cerosa    | M2C         | 0.110 | 0.693 | 6.288      | 0.159                        |
|           | M3C         | 0.104 | 0.693 | 6.650      | 0.150                        |
|           | M1C         | 0.065 | 0.693 | 10.694     | 0.093                        |
| Velloso   | M2C         | 0.069 | 0.693 | 9.985      | 0.100                        |
|           | M3C         | 0.085 | 0.693 | 8.172      | 0.122                        |

m:pendiente; Ln2= logaritmo de 2; tdc: tasa de crecimiento ;  $\mu$ : velocidad de crecimiento

Cabe mencionar que los medios y algunos callos en sus etapa exponencial presentaron pigmentación roja, cuestión que se relaciona con la liberación de compuesto polifenólicos del grupo de los flavonoides y por la presencia de un estrés en la adaptación de su nuevo medio de cultivo (Figura 13).

## 9. Obtención de suspensiones celulares

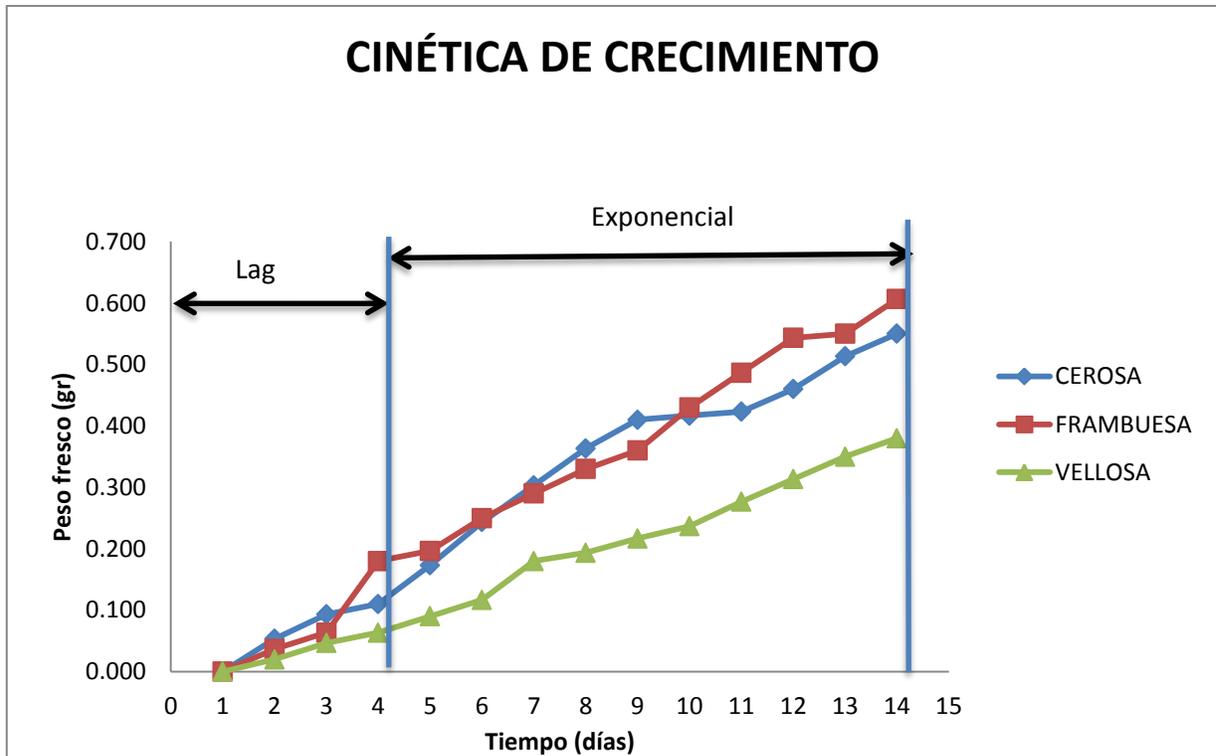
Se establecieron las suspensiones celulares para el tratamiento M2C (ANA y BA a  $0.6 \text{ mgL}^{-1}$ ) fueron los estudiados en esta parte de la investigación, cuestión que fue para comparar las curvas de crecimiento con las obtenidas en medios sólidos

de callo (Figura 11) puesto que fue el mejor tratamiento en la micropropagación del callo.

En la curva de crecimiento presentada en la figura 12, se aprecia solo dos fases antes de su muerte, siendo una la fase lag de aproximadamente 4 días en todas las especies y la fase exponencial que se presenta hasta el día 14, tanto para Frambuesa, Cerosa y Velloso, puesto que después del quinceavo día las suspensiones tomaban una coloración oscura (fenolización) o blanquizca (contaminación) provocando la disminución del índice de crecimiento y la muerte de célula.

La fenolización es uno de los problemas más comunes que se presentan en el cultivo *in vitro*, es la liberación de compuestos fenólicos por los tejidos y la consecuencia oxidación del medio de cultivo (Park y col., 2000), aun con medios líquidos en los cuales es más fácil y rápido diluir los productos tóxicos (Pierik, 1990), estos compuestos impiden el crecimiento y desarrollo de los propios tejidos vegetales. La adición de ácido ascórbico y cítrico como antioxidantes lograron un adecuado control del fenómeno de fenolización, mientras que la adición de cefotaxina y ketoconazol como antibióticos no logró un adecuado control del fenómeno de contaminación ocasionando la muerte de las células a los 18 días.

La gráfica sigmoide de las suspensiones estudiadas con respecto al PF en el punto final de la fase exponencial logrado fue de 0.607, 0.550 y 0.380 gr en Frambuesa, Cerosa y Velloso, respectivamente. Además de ello se observó que los callos comenzaron su fase exponencial más prontamente en medio líquido que en medio sólido pero sus pesos eran muy bajos y su prolongación fue muy larga. Estos resultados sugieren que la contaminación que se comienza a presentarse disminuye la velocidad de multiplicación de las células, por lo que es de gran importancia controlar este efecto negativo en las suspensiones.



**FIGURA 11:** Curva de crecimiento de las suspensiones celulares en el tratamiento M2C de cada especie trabajada.

## 10. Extracciones (screening) y CCF

Las extracciones partieron de los callos y medios obtenidos en la fase exponencial entre ellos se encontraban los medios pigmentados de color rojiza (Figura 13).



**FIGURA 12:** Callos y medios de cultivo pigmentados

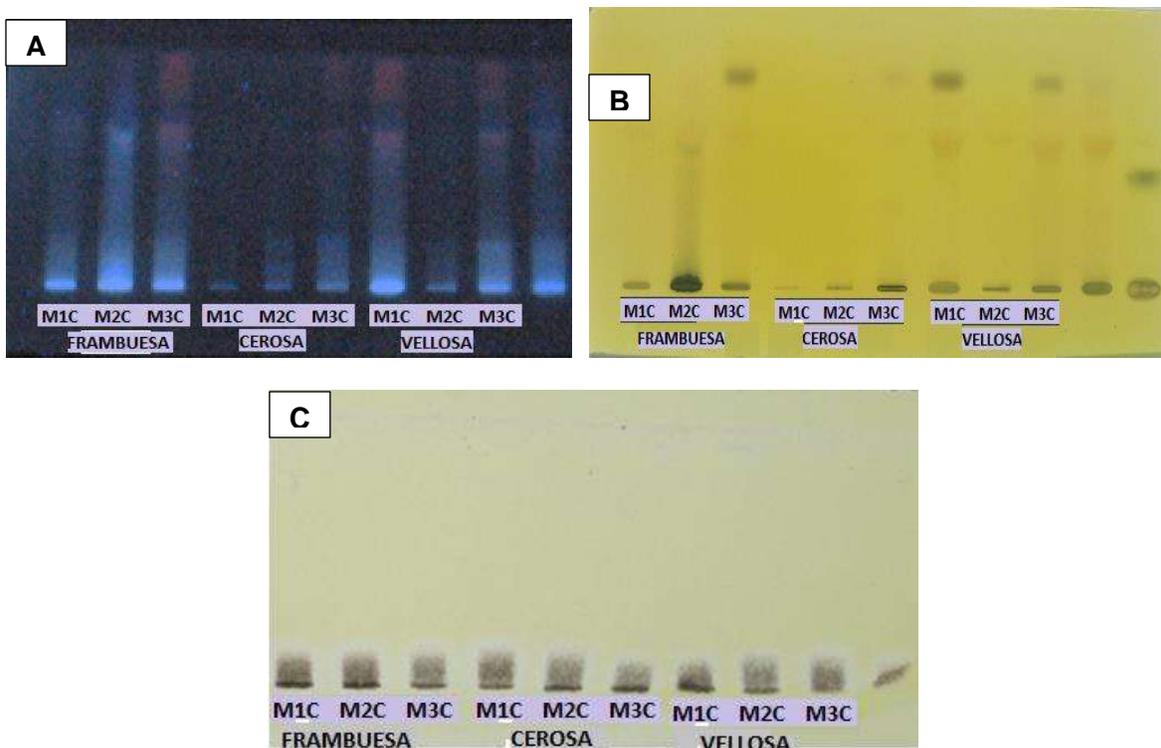
El proceso de extracción fue facilitado con la liofilización de los medios y callos, que posteriormente se comenzó con la extracción de hexano, posteriormente con

acetato de etilo y finalmente metanol; las fracciones utilizadas se sometieron a cromatografía de capa fina (CCF) con las fases móviles de hexano: acetato de etilo (8:2); acetato de etilo: metanol (9:1) y metanol: hexano (6:4) respectivamente.

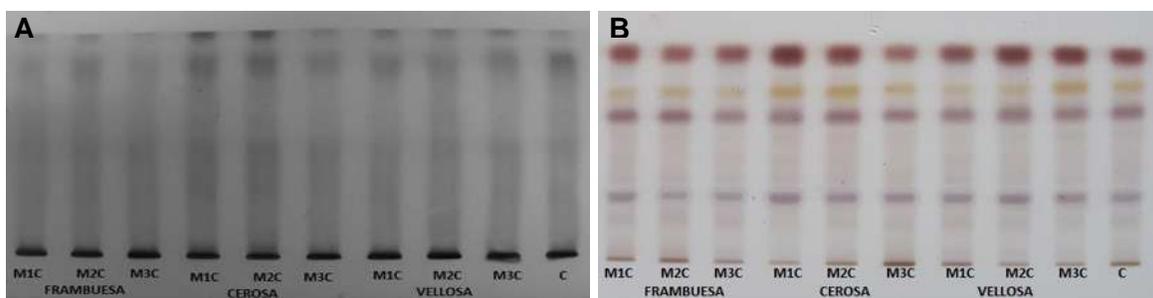
Posteriormente se revelaron con Liberman- Buchard, Sulfato Sérico, Cloruro Férrico y RPN. El revelador de Liberman-Buchard el cual permite reconocer la presencia de triterpenos y/o esteroides, porque ambos tipos de productos poseen un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6. Un ensayo positivo se tiene un cambio rápido de coloración a rosado. Mientras que el revelador Cloruro Férrico permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos en un extracto vegetal, dando una coloración rojo-vino (compuestos fenólicos en general), verde intenso y azul (taninos), ellos se presentarán si es una respuesta positiva y el RPN es para flavonoides.

Los extractos de metanol en fase móvil de butanol:ácido acético: agua (4:4:1), como ácido acético: ácido fórmico: agua (85:10:15) y  $\text{CHCl}_3$ : ác. acético: ác. fórmico (5:4:1) mostraron la presencia de compuestos polifenólicos, algunos de ellos pertenecientes al grupo de flavonoides, ello fue revelados con RPN mientras que las demás placas que mostraron polifenoles fueron reveladas con Sulfato Sérico y Cloruro Férrico (Figura 14). En estas placas se muestra que la presencia de metabolitos secundarios de tipo polifenólicos depende de la composición del medio de cultivo del cual se extrajo el callo, sin embargo los medios analizados a pesar de que eran diferentes todos ellos mostraron una misma fracción de polifenólicos.

En las figuras se utilizan las siglas M1C, M2C y M3C, siglas que se refieren a los medios de cultivos utilizados en la micropropagación del callo (Ver Tabla 11) y la muestra con letra C pertenece a una extracción obtenida de callos inducidos en hojas plantas *in situ*.



**FIGURA 13:** Placas de CCF de los extractos metanólicos de callo A) Revelado con RPN a 365 nm UV; B) Revelado con Cloruro Férrico teniendo como control el ácido gálico (última hilera) y medios C) revelado con sulfato Sérico

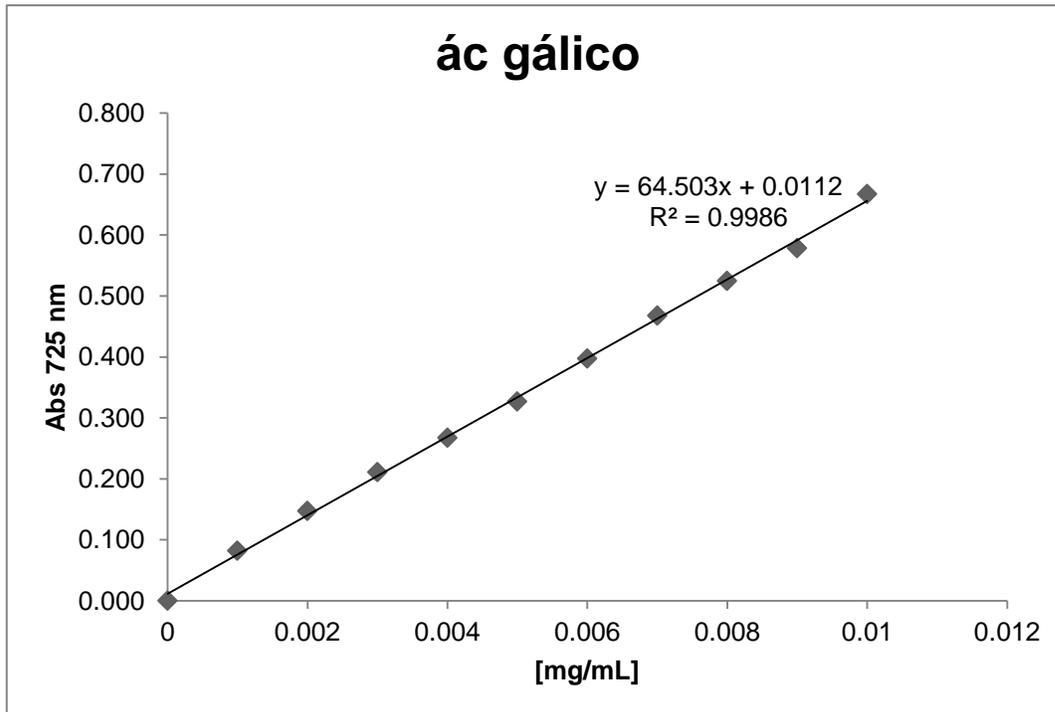


**FIGURA 14:** Placas de CCF de los extractos de acetato de etilo revelados con Sulfato sérico (A) y extractos hexánicos revelados con Liebermann Burchard (B)

Por otro lado, los extractos de acetato de etilo mostraron la existencia de metabolitos secundario de polaridad media en una fase móvil de hexano:acetato de etilo (8:2) revelado con Sulfato Sérico (Figura 15A); mientras que en los extractos hexánicos revelados con Liebermann Burchard se observó la presencia de terpenos y/o esteroides en las mismas fracciones con una fase móvil de hexano: acetato de etilo (2:8), al dar una coloración rosa-morado, lo cual determina que no sólo existen polifenoles en los extractos si no también metabolitos secundarios de tipo terpénicos (Figura 15b).

## 10.1 Curva del ácido gálico

En la figura 16 se muestra la curva obtenida de las 10 soluciones del ácido gálico obteniendo una ecuación de la línea de tendencia la cual fue utilizada para determinar los gramos equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco de callo que es representada en la tabla .



**FIGURA 15:** Curva del ácido gálico obtenida de la relación de mg/ml de la solución utilizada sometida a 725 nm en espectro.

**Tabla 20 Datos obtenidos de la curva del ácido gálico**

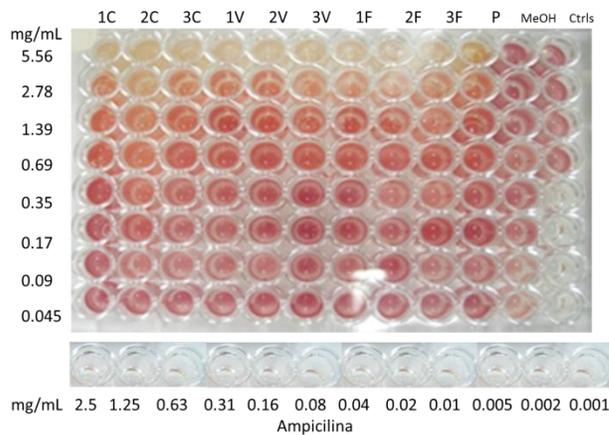
| 1C    | 2C    | 3C    | 1V    | 2V    | 3V    | 1F    | 2F    | 3F    | C     |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 13.56 | 20.37 | 30.64 | 13.62 | 14.44 | 18.57 | 14.85 | 15.65 | 17.64 | 55.99 |

Datos expresados en gr equivalentes de ácido gálico/ gr. de peso seco de callo. Los números indican el tipo del cual provenían los callos (ver tabla de proliferación de callo) 1: medio M1C, 2: M2C y 3: M3C. Las letras indican la especie a la que pertenece ese medio el cual es C:Cerosa, V:Vellosa y F:Frambuesa, y la C es el Control tomado de callo provenientes de plantas *in situ*.

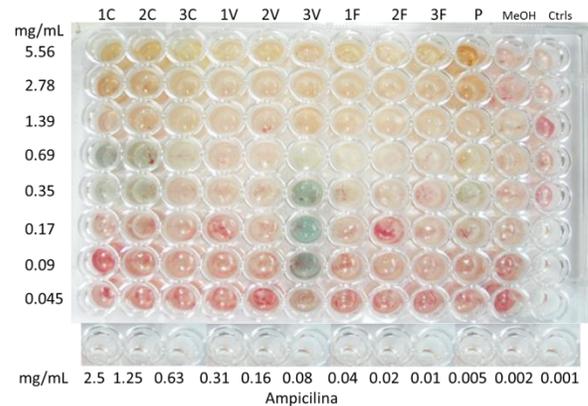
## 11. Actividad antimicrobiana

Los extractos metanólicos frente a *S. aureus* y *P.aureoginosa* mostraron que entre mayor sea la concentración del extracto mayor es su poder bacteriostático puesto que las concentraciones más alta (100 mg/ 500µl de extracto) mostraron inhibición de crecimiento durante tres días, y al cuarto día se presentó crecimiento, por el contrario en *E. coli* tanto los extractos como la ampicilina no inhibieron el crecimiento de esta bacteria por lo cual se requiere realizar pruebas con concentraciones elevadas para conocer si existe alguna actividad biológica frente a esta cepa.

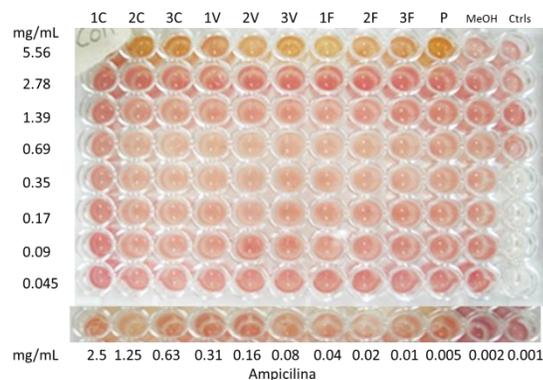
### *Pseudomonas aeruginosa*



### *S. aureus*



### *Escherichia coli*



**FIGURA 16:** Actividad antimicrobiana obtenidos de las microdiluciones de extractos metanólicos frente a bacterias Gram positiva (*S.aureus* y *P.aureoginosa*)s y Gram negativas (*E. coli*) revelada con TTC.

## **IX.- CONCLUSIONES**

- Las especies del género *Rubus* tiene un sistema de micropropagación diferentes una de otra, por lo cual es necesario tener en cuenta que los requerimiento nutrimental y hormonales en el medio en sus diversas etapas de desarrollo dan el éxito o el fracaso del su desarrollo.
- Con ayuda de los reveladores en la CCF, se pudo observar que existen compuestos polifenólicos del grupo de los flavonoides en los extractos obtenidos de callos pero no se descarta la existencia de otros metabolitos secundarios como los terpenos.
- Las concentraciones de extractos metanólicos utilizadas para la determinación de actividad antimicrobiana en bacterias no mostraron inhibición total ante su crecimiento.

## **X.- PERPECTIVAS**

- Continuar con el rescate de las especies trabajadas llevando a cabo los protocolo logrados en esta investigación.
- Realizar nuevas pruebas del cultivos en suspensión con el objetivo de lograr vencer la contaminación para así continuar con las pruebas antimicrobianas o cuantificación de metabolitos secundarios.
- Llevar a cabo una cuantificación de polifenoles y terpenos de extractos obtenidos con ayuda de HPLC para determinar cuáles son los dominantes.
- Aumentar el rango de concentraciones (<10mg/500µl) para determinar si existe alguna concentración que tenga actividad bactericida y poder tener una tendencia hacia la elaboración de productos naturales.

## XI.-BIBLIOGRAFÍA

### A

Aida Rodríguez-García, Luis J. Galan-Wong, Katiushka Arévalo-Niño. (2000). Development and in Vitro evaluation of biopolymers as delivery system against periodontopathogen microorganisms. Acta Odontol. Latinoam. Vol. 23, Num. 2., pp 158-163

Alina Katil Sigarroa-Rieche y Claudia Lucía García-Delgado. 2011. Establecimiento y multiplicación in vitro de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos. Acta Agronómica, 60: 347-354

Alma Delia Alanís, Calzada F., Cedillo-Rivera R. y Meckes Mariana. 2003. Antiprotozoal activity of the constituents of *Rubus corifolius*. Phytoterapy Research, 17: 681-682

Almeida J., Contreras I. 2004. Propagación in vitro de Mora de Castilla (*Rubus glaucus*) a partir de miniestacas. Ecofisiología y Fisiología Vegetal, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

Amcrozic Turk B., Harry J.S. and Zimmerman H.R. 1994. Adventitious shoot regeneratio from in vitro cultured leaves of *Rubus* genotypes. Plant Cell Tissue and Organ Culture 38: 11-17.

Anne Hukkanen, Katri Kostamo, Sirpa Kärenlampi and Harri Kokko. 2008. Impact of Agrochemicals on *Perospora sparsa* and Phenolic Profiles in Three *Rubus arcticus* cultivars. J.Agric.Food Chem., 56:1008-1016

### B

B. Thiem y O. Goslinska. 2004. Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves. Fitoterapia, 75:93-95

Baldi, A, Bisaria VS, Srivastava (2007). Biotechnological approaches for the production of some promising ant-based chemotherapeutics. En: Kayser O, Quax W (Eds) Medicinal plant biotechnology. pp. 117-156

Ballesta, M.2008 Establecimiento y multiplicación in vitro de mora de castilla (*Rubus glaucus*) en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Francisco de Paula Santander. Tesis de grado.75 p.

Barbosa, E.; Calzada, F.; Campos, R. In vivo anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. 2006. *J. Ethn.* , 34, 178-184.

Bella Cruz A., Bella Cruz Cé R., Kanegusuku M., Cechinel Filho V., Yunes A. R., Delle Monache F., and Niero R. 2006. Antimicrobial activity of *Rubus imperialis* (Rosaceae). *Acta Farm. Bonaerense* 25: 256-259.

Bhojwani, S.S and Razdab, M.K. 1996. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, a Revised Edition. Elsevier, Amsterdam, N.Y. 767 p.

Bhojwani S.S and Razdan M.K. (1990). *Plant Tissue Culture: applications and Limitations*. Development in crop science 19. Elsevier. New York. 461 p.p.

Borejsza-Wysocki, W. y Geza, H. 1994. Establishment of callus and cell suspension cultures of raspberry (*Rubus idaeus* cv. Royalty) with Benzylamino purine for *Plant Cell and tissue* 37: 213-216.

Bourgaud, F., A. Gravot, S. Milesi, E. Gontier, 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851.

Bravo, L. F. 1996. Manejo, cosecha y postcosecha de la zarzamora (*Rubus* spp.) variedad Brazos en los Reyes, Michoacán. Tesina de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán México. 46p.

## C

Castro, RD. y Gaviria, G. B. (1995). Propagación in vitro de especies del genero *Rubus* Universidad Catolica de Oriente. Fundación de Fomento Agropecuario Buen Pastor. Serie: investigaciones-10. Colombia. 9p.

Christian Mertz, Veronique Cheynier, Ziya Günata and Pierre Brat. 2007. Analysis of Phenolic Compounds in Two Blackberry Species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem*, 55: 8618-8624

Cotoras, M., Folch, C. and Mendoza, L. 2004. Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoid kaurenoic acid and 3 $\beta$ -hidroxy-kaurenoic acid. *J. Agric. Food Chem.* 52: 2821-2826.

Cousineau, J. C. y Donnelly, D. J. 1991. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of tissue cultured and greenhouse-grown raspberry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27: 249-255.

Crandall P.C. (1995). *Bramble production: the management and marketing of raspberries and blackberries*. Ed. The Haworth Press Journals.NY. pp 8.

Cruz, J. R. 1997. Los citunís silvestres (*Rubus* spp.) su caracterización taxonómica y ecológica en una región del sur de la meseta Purhépecha, Michoacán, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán México. 67 p.

Cruz, J.M., Domínguez, J.M., Domínguez H., Parajo J.C. Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 2459-2464

Cruzat, R. 2010. Resultados y lecciones de propagación in vitro en las especies ornamentales. Ed. Mundi Prensa 236 pp

Cuevas-Rodríguez EO, Día VP, Yousef GG, García-Saucedo PA, López-Medina J, Paredes-López O, Gonzalez de Mejia E y Lila MA (2010) Inhibition of proinflammatory responses and antioxidant capacity of Mexican blackberry (*Rubus* spp.) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(17): 9542-9548.

## D

De Bruyne, T.; Pieters, L.; Deelstra, H.; Vlietinck, A. (1999). Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. Sys. Ecol.*, 27, 445-459

Dixon RA, Gonzales R.A. (1991). *Plant Cell Culture: A Practical Approach*, 2nd Rev. ed. Oxford University Press, Oxford.

Dodds J.H. and Roberts L.W. (1995). *Experiments in Plant Tissue Culture*, 3rd Rev Ed. Cambridge University Press. London. 232 p.p.

Domingo, D. and López-Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev. Esp. Quimioterap.* 16: 385-393.

Duthie GG, Duthie SJ y Kyle JAM (2002). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews* 13:79-106.

Duthie, S. J. Berry phytochemical, genomic stability and cancer: evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process. *Mol. Nutr. Food Res.* 1995, 51, 665-674.

## E

Erig A., Rossi A., y Luces G. (2002). Benzilaminopurina e ácido indolacético na multiplicação in vitro da amoreira preta (*Rubus idaeus* L.) cv Tupy. *Ciencia Rural* 32(5):765-770.

Escobar HA, Villalobos AVM & Villegas MA (1986) *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell Tiss.Org. Cult.* 7: 269–277

## F

F.A Hamil, S. Apio, N.K. Mubiru, M. Mosango, R. Bukenya-Ziraba, O.W. Magany, D.D. Soejarto. 2003. Tradicional herbal drug of southern Uganda Part III: Isolation and methods for physical characterization of bioactive alkanols from *Rubus apetalus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 87:15-19.

## G

Gamborg O.L., Phillips G.C. (1995). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg. 300 p.p.

Gamborg, L.O. 2002. Plant tissue culture biotechnology Milestones. *In vitro Cell. Develop. Biol. Plant.* 38: 84–92.

García-Saucedo, P. A., Valdez-Morales M., Valverde M. E., Cruz-Hernández A., Paredes-López O. 2005. Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 80: 215–219

Gómez Y. 2005. Establecimiento de un cultivo in vitro de *Ipomea intrapilosa* y evaluación de su actividad insecticida contra *Trialeurodes vaporariorum*. Tesis de Maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-IPN, México

Gonzalez M.V., López M. Valdes A.E., Ordas R.J. 2000. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. *AnnAppl Biol* 137:73-78

Gonzalez, E. M.; de Ancos, B.; Cano, M. P. Partial characterization of peroxidase and polyphenol oxidase activities in blackberry fruits. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 5459-5464.

Graham J.L., Iasi and S. Millam. (1997). Genotype-specific regeneration from a number of *Rubus* cultivars. *Plant Cell Tis. Org. Cult.* 48:167-173.

Gu, L.; Kelm, M. A.; Hammerstone, J. F.; Beecher, G. Concentration of proanthocyanidins in common foods and estimation of normal consumption. *J. Nutr.* 2004, 134, 613 – 617.

## H

Haslam, E. *Plant polyphenols: vegetable tannins revisited.* Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 1996, pp 230.

## I

Izhaki, I. 2002. Emodin-a secondary metabolites with multiple ecological functions in higher plants-Research review. *New Physiologist.* 155: 205-217.

## J

Jin W., Gu Y. and Zhen S-Z. 1992. In vitro propagation of *Rubus* species. *Scientia Horticulturae*, 49:335-340.

Jin-Hu Wu, Shirley A., Miller Harvey, K. Hall. Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*. 2009. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 99:17-25

Jones Castro Fiorella y Flores Mora Dora. 2007. Establecimiento *in vitro* y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). *Tecnología en Marcha*, 20:20-23

## K

Koitababashi, R., T. Suzuki, T. Kawazu, A. Sakai, H. Kuroiwa, T. Kuroiwa. 1997. 1,8- cinneole inhibits root growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. *Journal of Plant Research* 110: 1-6.

## L

L.Panizzi, C. Caponi, S.Catalano, P.L. Cioni, I. Morelli. 2001. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 165-168.

Lambers, H., Chapin, F.S. III. and Pons, T.L. 2000. *Plant physiological ecology*. Springer-Verlag, New York Inc. 539p.

Lisek, A. y Orlikowska, T. 2004. In vitro storage of strawberry and raspberry in calcium-alginate beads at 4 °C. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78: 167–172.

Lopéz-da-Silva, F.; de Pascual-Teresa, S.; Rivas-Gonzalo, J.; Santos-Buelga, C. Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv. Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. *Eur. Food Res. Technol.* 2002, 214, 248–253.

## M

M.Tomczyk and J.Gudej. Polyphenolic Compounds from *Rubus saxatilis*. 2005. *Chemistry of Natural compounds*, N° 3: 41

Makkar HPS. *Quantification of Tannins in Tree and Shrub Foliage: A Laboratory Manual*: Kluwer Acad. Publ.; 2003.

Manach, C.; Scarbet, A.; Monard, C.; Rémesy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79, 727-747.

Martinez-Valverde I.; Periago J.M.; Ros G., 2000. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivo latinoamericanos de nutricion* Vol. 5 N° 1

Martinussen, I., Pilsen, G., Svenson, L., Junntila O. y Rapp K. 2004. *In vitro* propagation of cloudberry (*Rubus chamaemorus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78: 43–49.

Marulanda, M.; Carvajalino, M.; Vento H.(2000) Establecimiento y multiplicación in vitro de plantas seleccionadas de *Rubus glaucus* Benth. para el departamento de Risaralda (Colombia). *Actual. Biol.* 22(73):121 – 129

Meng, R., T.H.H. Chen, C.E. Fin and Y. Li (2004): Improving in vitro plant regeneration from leaf and petiole explants of 'Marion' blackberry. *HortScience*, 39(2), 316-320.

Mezzetti, B., Savini, G., Carnevali, F. y Mott. D. 1997. Plant genotype and growth regulators interaction affecting in vitro morphogenesis of blackberry and raspberry. *Biología Plantarum* 39 (1):139-150.

Mueller-Harvey, Irene. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*. 91:3.

Muñoz I. y Reyes H. 2006. Efecto de reguladores de crecimiento, L-cisteína y ácido ascó+ B7ribico en el cultivo in vitro de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth). *Acta Agronomica*, 4: 24-27.

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(473-497).

## O

Ochatt, S. J. y Patat-Ochatt, E. M. 1995. *In vitro* culture of raspberry (*Rubus idaeus*) for mass propagation and virus elimination. *Euphytica* 85: 287-294.

## P

Pauda-Silva J.; Martins de Siqueira A., 2005, Acción antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*. *Rev. Cubana Plant Med*; 5 (1):26-9

Peng S.X., Branch T.M., King S.L. (2001). Fully automated 96-well liquid-liquid extraction for analysis of biological samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 73(3): 708-714.

Pérez-Molphe, B., Pérez Reyes M.E., Villalobos A.E., Meza R.E., Morones R.L. y Lizalde V.J. 1999. Micropropagation of 21 species of Mexican cactus by axillary proliferation in vitro cell. *Cell Dev. Biol*, 34:131-135

Pierick, R. L. 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España. 326p.

Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Alakomi, H.; Oksman-Caldentey, K. Bioactive berry compounds—novel tools against human pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2005, 67, 8-18.

## Q

Qingguo Tian, M. Monica Giusti, Gary D. Stoner, Steven J. Schwartz. 2006. Characterization of a new anthocyanin in black raspberries (*Rubus occidentalis*) by liquid chromatography electrospray ionization tandem spectrometry. *Food Chemistry*, 94: 465-468.

## R

- Rabha Abdlwahd, Najat Hakam, Mustapha Labnilili and Sripada Udupa. 2008. Use of adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology*, 7:997-1002.
- Ramage, C. M. and Williams, R. R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *J. Food Sci.* 34, 49-57.
- Reyes-Carmona, J.; Yousef, G.G.; Martínez-Peniche, R.A.; Lila, M.A. Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions. *J. Food Sci.* 2005, 70, S497-S503.
- Roca, W., Mroginski, L.A. 1991. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 968p.
- Rodríguez MJ, Alberto MR, Manca de Nadra MC. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* ; 18 (2): 91–101
- Rojas-Garcidueñas M. y Ramírez H. 1986. *Control Hormonal del Desarrollo de las Plantas*. Ed. LIMUSA. México. 34,45-56pp
- Romero, G. G. 2003. *Experiencia en la exportación de zarzamora (Rubus spp.) en el estado de Michoacán*. Memoria Profesional. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán México. 35p.
- Rosa, M. R.; Moura, J. D.; Melecchi, S. M. I.; dos Santos, R.; Richter, M. F.; Bastos, C. E.; Pegas, H. J.; Lia de Paula, R. A.; Saffi, J. Protective against cytotoxicity and genotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butylhydroperoxide. *Toxicol. in vitro.* 2007, 21, 1442-1452.
- Ryabova, D. 2007. A two-step procedure for *in vitro* multiplication of cloudberry (*Rubus chamaemorus*) shoots using bioreactor. *Genet Resour Crop Evol* 54:973–980
- Rzedowski J. y Calderon G.; (1989), *Rubus Pringlei y Macvaughianus* (Rosaceae), frambuesas silvestres de posible interés hortícola; *acta botánica mexicana* 5: 1-4.
- Rzedowski, J. y Calderón, G. 2005. *Flora del Bajío y Regiones Adyacentes*. Fascículo 135. Imprenta Tavera Hermanos. Morelia, Michoacán, México. 163pp.
- S. Ramachandra Rao y G.A. Ravishankar. 2002. Plant cell culture: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20:101-153

## S

Sajc, L, Grubisic D, Vunjak-Novakovic G. (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal*. 4:89-99

Samir C. Debnath. 2007. A two-step procedure for in vitro multiplication of cloudberry (*rubus chamaemorus* L.) shoots using bioreactor. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 88: 185-191

Saura-Calixto F., Serrano J., Goni I. (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2): 492-501.

Sisti, M., De Santi, M., Fraternali, D., Ninfali, P., Scoccianti, V. y Brandi, G. 2007. Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized in vitro culture. *Food Science and Technology*. doi:10.1016/j.lwt.2007.05.012.

Smith, R.H., 1992. *Plant Tissue Culture-Techniques and Experiments*. Academic Press.

## T

Taiz L y Zeiger E (2006). *Plant Physiology*. Ed. Sinauer Associates. Cuarta anthocyanins, Tesis doctoral. Universidad de Helsinki. Department of applied chemistry and microbiology. Food chemistry division. Helsinki. pp 87. *Technology (2007)*, doi:10.1016/j.lwt.2007.05.012

Tatjana vujović, Durdina Ruzic, Rodosav Cerović and Gordana Surjan. 2010. Adventitious regeneration in blackberry (*Rubus fruticosus* L.) and assessment of genetic stability in regenerants. *Plant Growth Regul.*, 61:265-275

Tewari, R. (1995). Plant extract against four phytopathogenic fungi; the rice. *Indian Perfumvol.* 39, no. 2.

Thiem B (2001) Micropropagation of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) by initiation of axillary shoots. *Acta Soc Bot Pol* 70:11–16

Thiem B. (2003). *Rubus chamaemorus* L.-a boreal plant rich in biologically active metabolites: a review. *Biollett*, 40 (1):3-13

Tomás F.A, Gil M.I., Cremin P. Waterhouse L.A., Hess P.B. (2006). HPLC-DA-ESIMS analysis phenolic compound in nectarines, peaches and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10): 4748-4760.

Trinh Phuong L., Christine Kamperdick, Tran Van Sung, Günter Adam. 1999. Triterpenes from *Rubus cochinchinensis*. *Phytochemistry*, 50:463- 465

Turk B.A., H.J. Swartz and R.H. Zimmerman. (1994). Adventitious shoot regeneration from in vitro-cultured leaves of *Rubus* genotypes. *Plant Cell Tis. Org.Cult.* 38:11-17.

## V

Vanaclocha VB y Cañigüeral S (2003). *Fitoterapia: vademécum de prescripción*. Ed. MASSON. Cuarta edición. España. p 291.

Vanisree M., Lee CY., Lo S.F., Nalawade S.M., Lin C.F., 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by tissue culture. *Bot. Bull. Aca. Sinica*, 45; 1-22

Vargas, G. J. L. (1994). Algunos ecotipos de zarzamora silvestre y sus principales enfermedades en el municipio de Uruapan. Mich. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Uruapan, Michoacán México.

Vsil, I.K. and Torpe, T.A. 1994. *Plant Cell and Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers. London

## W

Walden, R. and Wingender, R. 1995. Gene-transfer and plant-regeneration techniques. *Trends Biotechnol.* 13: 324-31.

Wang Yuan; He Jiuming, Chen Hui, Zhang Disheng, Cai Huan, Shao Huibo. 2006. Analysis of flavone in *Rubus parvifolius* Linn by High Performance Liquid Chromatography Combined with Electrospray Ionization-Mass Spectrometry and Thin-Layer Chromatography Combined with Fourier Transform Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Chin. J. Anal. Chem*, 34(8):1073-1077

## Y

Yoon Soo Choi, Kun Ho Son and Jae Chul Do.1991. Triterpenoids from the Roots of *Rubus parvifolius*. *Arch. Pharm Res*, 14:225-230

## Z

Zawadzka M, Orlikowska T (2006) The influence of FeEDDHA in red raspberry cultures during shoot multiplication and adventitious regeneration from leaf explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 85:145–149"



**ANEXO 1: Composición y preparación de stocks del medio de cultivo Murashige & Skoog, 1992 (medios MS)**

| SOLUCIÓN | SALES   | CONCENTRACIÓN DEL STOCK EN g/L | CONCENTRACIÓN FINAL EN EL MEDIO mg/L | CANTIDAD DE STCK PARA UN LITRO DE MEDIO |
|----------|---|--------------------------------|--------------------------------------|---|
| A        | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 82.5                           | 1650                                 | 20ml                                    |
| B        | KNO <sub>3</sub>                                    | 95.0                           | 1900                                 | 20ml                                    |
| C        | CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O                | 88.0                           | 440                                  | 5ml                                     |
| D        | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 34.0                           | 170                                  | 5ml                                     |
| E        | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 1.24                           | 6.2                                  | 5ml                                     |
|          | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O | 0.05                           | 0.25                                 |   |
|          | CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O                | 0.005                          | 0.025                                |   |
|          | KI  | 0.166                          | 0.83                                 |   |
| F        | MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O                | 74.0                           | 370.0                                | 5ml                                     |
|          | MnSO <sub>4</sub> •4H <sub>2</sub> O                | 3.45                           | 22.3                                 |   |
|          | ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O                | 1.72                           | 8.6                                  |   |
|          | CuSO <sub>4</sub> •5H <sub>2</sub> O                | 0.005                          | 0.025                                |   |
| G        | Na <sub>2</sub> EDTA(*)                             | 7.46                           | 37.3                                 | 5ml                                     |
|          | FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O                | 5.57                           | 27.8                                 |   |
| H        | TIAMINA(**)   | 0.02                           | 0.1                                  | 5ml                                     |
|          | AC. NICOTINICO                                      | 0.1                            | 0.5                                  |   |
|          | PIRIDOXINA  | 0.1                            | 0.5                                  |   |
|          | GLICINA   | 0.4                            | 2.0                                  |   |

Inositol 100mg/l, sacarosa 30g/l, agar (según la marca): 6-10g/l

\* El Na<sub>2</sub>EDTA y el FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O se disuelven por separados cada uno en 200ml de agua destilada. Se calienta la solución de Na<sub>2</sub>EDTA y poco a poco se agrega la solución de FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, calentando y agitando continuamente hasta obtener un color amarillo. Se deja enfriar y se ajusta a 1000ml con agua destilada. El calor y la mezcla en dilución dan lugar a un complejo FeEDTA más estable.