



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA: ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE LÍNEAS CELULARES DE
LECHERO BLANCO (*Euphorbia laurifolia* Juss. ex. Lam) A PARTIR DE
SEGMENTOS DE TALLO PARA LA POSTERIOR APLICACIÓN EN
ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIMICROBIANA

AUTOR: VACA SANTAMARÍA, DANIEL SANTIAGO

DIRECTOR: LIC. JADÁN GUERRERO, MÓNICA BEATRIZ Ph.D.

SANGOLQUÍ

2019



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “*ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE LÍNEAS CELULARES DE LECHERO BLANCO (Euphorbia laurifolia Juss. ex. Lam) A PARTIR DE SEGMENTOS DE TALLO PARA LA POSTERIOR APLICACIÓN EN ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIMICROBIANA*” fue realizado por el señor *Vaca Santamaría, Daniel Santiago*, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí,.....

Firma:

Mónica Beatriz Jadán Guerrero Ph.D.

C.C.....*1802273562*.....



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Vaca Santamaría, Daniel Santiago*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: “*ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE LÍNEAS CELULARES DE LECHERO BLANCO (Euphorbia laurifolia Juss. ex. Lam) A PARTIR DE SEGMENTOS DE TALLO PARA LA POSTERIOR APLICACIÓN EN ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIMICROBIANA*” es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, *30 de enero de 2018*.

Firma:

.....
Daniel Santiago Vaca Santamaría

C.C. 0401543723



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, *Vaca Santamaría, Daniel Santiago*, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “*ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE LÍNEAS CELULARES DE LECHERO BLANCO (Euphorbia laurifolia Juss. ex. Lam) A PARTIR DE SEGMENTOS DE TALLO PARA LA POSTERIOR APLICACIÓN EN ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIMICROBIANA*” en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, *30 de enero de 2019*.

Firma:

.....
Daniel Santiago Vaca Santamaría

C.C. 0401543723

DEDICATORIA

A mis padres, Mónica y César, por haber estado siempre a mi lado en todo momento. Por brindarme ese apoyo moral, sentimental y económico. Por ser mis guías y forjar la persona que soy. Por enseñarme que no solamente la preparación académica importa en esta vida, sino también la superación personal y el valor de ser humano.

A mis hermanas, Yordana y Emily, con quienes compartí tantos gratos momentos, alegrías y enojos, por su constante apoyo y presencia en todos los momentos importantes de mi vida.

A mis abuelitos, Marina, Vicente y Georgina, por todos los consejos que han prestado a mi persona y a mis padres. Por dedicarme tanto apoyo y amor, ayudándome a ser mejor persona.

A mi novia, Sofy, con quien he pasado gran parte de mi vida universitaria en tantos días de lucha y desvelo, quien me ha enseñado que el amor existe y a quien pienso dedicarle el resto de mi vida.

Daniel Santiago Vaca Santamaría

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, que ha sabido enseñarme y aconsejarme para afrontar todas las etapas de mi vida y poder llegar hasta donde estoy ahora. Por su constancia, que me impulsaba a asumir nuevos retos y siempre superarlos.

A mi directora de Tesis, Mónica Jadán Ph.D., por haberme dado la oportunidad de trabajar bajo su guía en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. Por su apoyo, dedicación y orientación, no solo en el ámbito académico, sino también personal. Además agradezco a la Doctora Claudia Segovia, por prestarme parte de su tiempo en las varias revisiones de mi trabajo durante todo el periodo de titulación.

A Jenny, Denisse y Jessica, antiguas tesistas del Laboratorio de cultivo de Tejidos Vegetales en mis días de pasante, quienes supieron enseñarme todas las bases que me fueron de utilidad a lo largo de mi estadía en el laboratorio, además de darme su amistad.

A mi novia, Sofy, por todo el tiempo que ha dedicado en aconsejarme, desde un ámbito profesional y personal, en como tenía que encaminar mi proyecto.

A mis amigos, Jimmy, Ronald y Richard, con quienes durante tantos años he compartido y han sabido apreciarme como soy, además de siempre brindarme ayuda cuando la necesitaba.

A Marianita y Héctor, quienes me acogieron en su hogar cada que necesité realizar la recolección del material vegetal para mi proyecto, además del tiempo que dedicaron guiándome en el proceso.

Daniel Santiago Vaca Santamaría

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA	
CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del Problema	1
1.2 Justificación del Problema.....	3
1.3 Objetivos de la Investigación	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
1.4 Marco Teórico	5
1.4.1 Características generales de Lechero Blanco (<i>Euphorbia laurifolia</i> Juss. ex Lam.).....	5

1.4.2 Familia Euphorbiaceae	7
1.4.3 Cultivo <i>in vitro</i>	8
1.5 Hipótesis	14
CAPÍTULO 2 Materiales y Métodos	15
2.1 Localización del ensayo	15
2.2 Procedimientos generales	15
2.3 Efecto del hipoclorito de sodio en la desinfección de segmentos de tallo de lechero blanco.....	17
2.4 Efecto de diferentes concentraciones de fitorreguladores en la inducción a callo a partir de los segmentos de tallo de lechero blanco	20
2.5 Selección y propagación de líneas celulares obtenidas a partir del callo formado de los segmentos de tallo de lechero blanco	22
CAPÍTULO 3 RESULTADOS	24
3.1 Efecto del hipoclorito de sodio en la desinfección de segmentos de tallo de lechero blanco.....	24
3.1.1 Contaminación.....	24
3.1.2 Oxidación	29
3.2 Efecto de diferentes concentraciones de fitorreguladores en la inducción a callo a partir de los segmentos de tallo de lechero blanco	35
3.2.1 Inducción de callo.....	35

3.2.2 Oxidación	41
3.3 Selección y propagación de líneas celulares obtenidas a partir del callo formado de los segmentos de tallo de lechero blanco	46
CAPÍTULO 4 DISCUSIÓN.....	59
4.1 Efecto del hipoclorito de sodio en la desinfección de segmentos de tallo de lechero blanco.....	59
4.2 Efecto de diferentes concentraciones de fitorreguladores en la inducción a callo a partir de los segmentos de tallo de lechero blanco y selección de líneas celulares de interés.....	63
CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES	71
CAPÍTULO 6 RECOMENDACIONES	73
CAPÍTULO 7 BIBLIOGRAFÍA.....	74
ANEXOS.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Tratamiento general de desinfección de tallos de lechero blanco.</i>	17
Tabla 2 <i>Tratamientos específicos de desinfección basados en la concentración y tiempo de exposición del hipoclorito de sodio en explantes de tallos de lechero blanco.</i>	18
Tabla 3 <i>Tratamientos para la inducción de callo de explantes de tallo de lechero blanco (Euphorbia laurifolia Juss. ex Lam.).</i>	20
Tabla 4 <i>Tabla de contingencia de los protocolos de desinfección respecto a la variable contaminación, donde se muestran los explantes de lechero blanco, contaminados y no contaminados con bacteria.</i>	24
Tabla 5 <i>Prueba chi-cuadrado para la variable contaminación por explante con respecto a los diferentes tratamientos de desinfección.</i>	28
Tabla 6 <i>Prueba de Shapiro-Wilks para determinar la normalidad de los datos provenientes de la variable contaminación.....</i>	28
Tabla 7 <i>Prueba de Kruskal Wallis para la variable contaminación de explantes de los diferentes tratamientos de desinfección.....</i>	29
Tabla 8 <i>Tabla de contingencia de la variable oxidación con respecto a los tratamientos de desinfección, donde se muestra el número de explantes de lechero blanco oxidados y no oxidados para cada tratamiento.</i>	30
Tabla 9 <i>Prueba chi-cuadrado para la variable oxidación de explantes, con respecto a los diferentes tratamientos de desinfección.</i>	33

Tabla 10 <i>Prueba de Shapiro-Wilks para determinar la normalidad de los datos provenientes de la variable contaminación.</i>	33
Tabla 11 <i>Prueba de Kruskal Wallis para la variable oxidación de los explantes para los diferentes tratamientos de desinfección.</i>	34
Tabla 12 <i>Análisis de varianza de los tratamientos de fitorreguladores con respecto a la variable porcentaje de formación de callo.</i>	39
Tabla 13 <i>Prueba de Duncan para la comparación múltiple de los tratamientos de fitorreguladores con respecto a la variable porcentaje de formación de callo.</i>	40
Tabla 14 <i>Prueba chi-cuadrado para la variable oxidación de explantes, con respecto a los diferentes tratamientos de desinfección.</i>	44
Tabla 15 <i>Prueba de Shapiro-Wilks para determinar la normalidad de los datos provenientes de la variable oxidación.</i>	44
Tabla 16 <i>Prueba de Kruskal Wallis para la variable oxidación de los explantes para los diferentes tratamientos de fitorreguladores.</i>	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fruto tricoco de lechero blanco (Tomado de Jijón, 2015).....	7
Figura 2. Proceso de corte de los explantes de lechero blanco. A) Rama muestreada de lechero blanco de 25 cm de longitud. B) Corte del extremo terminal de 12 cm de la rama de lechero blanco sin hojas, listo para iniciar el proceso de desinfección. C) Explantes de tallo de lechero blanco que fueron introducidos a nivel in vitro, de 5 mm de largo y ancho, con 3 mm de grosor.	19
Figura 3. Porcentaje de explantes contaminados con bacteria y no contaminados en base a la concentración de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión a 7 de realizada la siembra.	26
Figura 4. Gráfica de tendencias del número de explantes no contaminados con respecto al tiempo de inmersión del hipoclorito de sodio.	26
Figura 5. Gráfica de tendencias del número de explantes no contaminados con respecto a la concentración del hipoclorito de sodio.....	27
Figura 6. Porcentaje de explantes oxidados y no oxidados en base a la concentración de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión a 15 días de realizada la siembra.....	31
Figura 7. Gráfica de tendencias del número de explantes no oxidados con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio.	31
Figura 8. Gráfica de tendencias del número de explantes no oxidados con respecto a la concentración del hipoclorito de sodio.....	32

Figura 9. Formación de callo de lechero blanco en medio de cultivo MS enriquecido con los fitorreguladores del tratamiento T1 (0,5 mg L ⁻¹ de ANA y 0,5 mg L ⁻¹ de KIN).	36
Figura 10. Número de explantes con presencia y ausencia de callo en los diferentes tratamientos de fitorreguladores a 15 días de realizada la siembra.	36
Figura 11. Porcentaje promedio de formación de callo de los explantes de lechero blanco sometidos a diferentes concentraciones de fitorreguladores a 30 días de realizada la siembra.....	37
Figura 12. Porcentaje promedio de formación de callo de los explantes de lechero blanco sometidos a diferentes concentraciones de fitorreguladores a 60 días de realizada la siembra.....	38
Figura 13. Número de explantes de lechero por categoría de oxidación para cada tratamiento de fitorreguladores a 30 días de realizada la siembra.....	42
Figura 14. Número de explantes de lechero por categoría de oxidación para cada tratamiento de fitorreguladores a 60 días de realizada la siembra.....	43
Figura 15. Morfología celular de las líneas celulares obtenidas a partir de los callos de lechero blanco. A) Célula alargada. B) Célula redondeada. C) Célula ovalada.	47
Figura 16. Líneas celulares del tratamiento T1.	48
Figura 17. Líneas celulares del tratamiento T2.	48
Figura 18. Línea celular del tratamiento T4.	49
Figura 19. Línea celular del tratamiento T5.	50
Figura 20. Línea celular del tratamiento T6.	50
Figura 21. Línea celular del tratamiento T7.	51
Figura 22. Línea celular del tratamiento T8.	52

Figura 23. Línea celular del tratamiento T9.....	52
Figura 24. Línea celular del tratamiento T10.....	53
Figura 25. Líneas celulares del tratamiento T11.....	54
Figura 26. Líneas celulares del tratamiento T12.....	55
Figura 27. Líneas celulares del tratamiento T13.....	55
Figura 28. Líneas celulares del tratamiento T14.....	56
Figura 29. Líneas celulares del tratamiento T15.....	57
Figura 30. Línea celular del tratamiento T16.....	58

RESUMEN

El lechero blanco (*Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam.) es una planta perteneciente a la familia Euphorbiaceae de uso tradicional en el Ecuador, donde se aprovecha principalmente su látex para combatir obsesos de la piel y verrugas. El objetivo de esta investigación fue establecer líneas celulares a nivel *in vitro* de segmentos de tallo de lechero blanco para su posterior análisis en la actividad citotóxica y antimicrobiana. La introducción consistió en el lavado de los segmentos de tallo en varias soluciones desinfectantes (detergente 5% v/v, fungicida 5% v/v), probando diferentes tratamientos en base a la concentración de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión, donde el mejor resultado se observó al usar una concentración del 5% v/v con 25 minutos de inmersión, obteniendo un 65% de explantes no contaminados y un 80% no oxidados. Para la obtención de callo se introdujo los explantes en medio de cultivo MS enriquecido con diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas, donde los mejores resultados se observaron al usar 5 mg L⁻¹ de 2,4-D con 0,5 mg L⁻¹ de BAP y 1 mg L⁻¹ de AIB con 1,5 mg L⁻¹ de BAP, con porcentajes de formación de callo de 113,125% y 100,625%, respectivamente. Un total de 23 líneas celulares se seleccionaron de todos los tratamientos de fitorreguladores que formaron un porcentaje representativo de callo, las que se compararon con información bibliográfica para determinar los metabolitos secundarios que estas podrían producir. Las líneas ELT5.1, ELT7.1, ELT8.1, ELT9.1, ELT10.1, ELT11.2, ELT12.1, ELT12.2, ELT13.1 y ELT13.2 presentaron similares características con callos en los que se encontró metabolitos secundarios que han demostrado tener posibles aplicaciones en la prevención e inhibición del cáncer, además de una presencia generalizada de compuestos terpénicos con posibles propiedades antibacteriales.

PALABRAS CLAVE:

- **LECHERO BLANCO**
- **FITORREGULADORES**
- **CALLO**
- **LÍNEAS CELULARES**
- **METABOLITOS SECUNDARIOS**

ABSTRACT

Lechero blanco (*Euphorbia laurifolia* Juss, ex Lam) is a plant belonging to Euphorbiaceae family with traditional application in Ecuador, where its latex is mainly used to combat skin abscesses and warts. The objective of this research was the *in vitro* cell lines establishment of lechero stem segments for subsequent analysis of cytotoxic and antimicrobial activity. The introduction consisted in washing the stem segments in several disinfectant solutions (5% v/v detergent, 5% v/v fungicide), testing different treatments based on sodium hypochlorite concentration and immersion time. Best result was observed using 5% v/v concentration with 25 minutes of immersion, obtaining 65% uncontaminated and 80% non-oxidized explants. Callus formation was induced in MS culture medium supplemented with different auxins and cytokinins combinations. Highest percentages of callus formation was achieved using 5 mg L⁻¹ of 2,4-D and 0.5 mg L⁻¹ of BAP, 1 mg L⁻¹ of AIB and 1.5 mg L⁻¹ of BAP, with 113.12% and 100.625%, respectively. 23 cell lines were selected from all phytohormones treatments that formed a representative percentage of callus formation, which lines were compared with bibliographic information to determine the secondary metabolites that they could produce. ELT5.1, ELT7.1, ELT8.1, ELT9.1, ELT10.1, ELT11.2, ELT12.1, ELT12.2, ELT13.1, ELT13.2 cell lines showed similar characteristics to calluses with secondary metabolites, which have been presented possible applications in cancer inhibition and prevention, in addition to a generalized presence of terpene compounds with possible antibacterial properties.

KEY WORDS:

- **LECHERO BLANCO**
- **PHYTOREGULATORS**
- **CALLUS**
- **CELL LINES**
- **SECONDARY METABOLITES**

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del Problema

Ecuador es un país que presenta una riqueza natural inagotable, siendo reconocido a nivel mundial por la cantidad y variedad de plantas y animales que posee por metro cuadrado. Al contar con diversas regiones naturales como son las costas del Pacífico, la Cordillera de los Andes, la selva amazónica y las Islas Galápagos, Ecuador concentra alrededor del 10% de especies de plantas que existen en el mundo (Ministerio de Turismo, 2014).

A pesar de la megadiversidad con la que cuenta nuestro país, poco es el esfuerzo y recursos destinados a la investigación científica de especies vegetales nativas y endémicas, lo cual representa un desperdicio del potencial farmacéutico, tecnológico, médico, etc., de las propiedades fitoquímicas y mecanismos naturales que presentan dichas plantas, teniendo además la capacidad de fomentar la conservación de la biodiversidad, generando también conocimiento que pueda dar un valor agregado a los recursos naturales (Fontaine, Narváez, & Cisneros, 2008).

El lechero blanco (*Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam.) es una planta ampliamente distribuida en Ecuador, Colombia, Venezuela, Guyana, Perú y Bolivia. Perteneciente a la familia Euphorbiaceae, aun cuenta con un uso tradicional en la sierra ecuatoriana, donde la gente aprovecha su látex para tratar abscesos de la piel y verrugas (Jijón, 2015). Este conocimiento ancestral ha generado interés sobre las posibles propiedades citotóxicas, antibacteriales y antifúngicas que podrían presentar los metabolitos secundarios de esta planta, convirtiéndola en un candidato viable de estudio.

Existe poca información científica disponible sobre el lechero blanco, limitándose a un solo trabajo a nivel nacional realizado por Miranda (2015) en la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, titulado: “Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad citotóxica y antimicrobiana *in vitro* del látex de *Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam. en patógenos dérmicos”; investigación que confirma las propiedades citotóxica del látex de esta planta. Sin embargo, es posible obtener información sobre plantas cercanas a la de interés, pertenecientes al mismo género o familia.

La familia de plantas Euphorbiaceae, ha sido reconocida a través de la historia por las propiedades curativas de sus miembros. La especie *Euphorbia fischeriana* Steud., se utilizaba tradicionalmente como droga anticancerígena en la cultura china. Del mismo modo, diversas especies pertenecientes a esta familia (*E. portlandica* L., *E. helioscopia* L., *E. resinífera* Berg., etc.) se han implementado en el tratamiento de cáncer, tumores y verrugas desde el tiempo de Hipócrates, apareciendo como referencia en numerosa literatura del mundo (Neira, Stashenko, & Escobar, 2014). En Costa Rica, la familia Euphorbiaceae se considera entre las más importantes, debido en parte a su abundancia dentro de su territorio, además de su amplia gama de usos que se han reconocido desde la antigüedad, ya sea a nivel ornamental, alimenticio y/o medicinal (Stevens, 2010).

A pesar de la distribución cosmopolita y las más de 1600 especies que se han reconocido dentro de la familia Euphorbiaceae, en Ecuador se cuenta con pocos registros sobre el estudio de este grupo de plantas, de modo que incluso se desconoce el número de especies que habitan nuestro territorio (Ulloa & Moller, 2014).

Esta investigación pretende aprovechar las técnicas del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para generar líneas celulares a partir de segmentos de tallo de lechero blanco (*Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam.), con el fin de generar conocimiento científico que pueda encaminar a un mejor entendimiento de los metabolitos secundarios que produce esta planta y sus posibles aplicaciones, como en análisis de las propiedades citotóxicas y antimicrobianas, otorgando información útil para futuras investigaciones, lo cual ayudaría a fomentar el estudio y conservación de esta planta y aquellas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae dentro del Ecuador.

1.2 Justificación del Problema

Las plantas de la familia Euphorbiaceae están ampliamente distribuidas en el mundo, especialmente en zonas tropicales. Esta familia de plantas incluye hierbas, arbustos, lianas y árboles, constituyendo un grupo de plantas sumamente diverso. Muchas de sus especies contienen toxinas que actúan como veneno cuando son ingeridas y también producen sustancias que pueden llegar a quemar la piel al contacto. A pesar de su toxicidad, el uso de concentraciones diluidas de estas sustancias puede resultar beneficioso para su implementación como tratamiento a diferentes afecciones.

Una de las características más representativas de esta familia es la producción de una leche blanca (látex) que fluye cuando la planta sufre alguna lesión, sustancia que es comúnmente conocida por su uso en la elaboración de caucho. Sin embargo, al látex también se le otorga variados usos como en el tratamiento de algunas enfermedades cutáneas; por ejemplo, el látex de especies del género *Euphorbia* se usan para curar verrugas y el látex de la ceiba de leche es usado como remedio para la lepra.

El lechero blanco (*Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam.) es una de las especies de esta gran familia de plantas, y ha sido seleccionada por su disponibilidad geográfica, encontrándose ampliamente distribuido en Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y Bolivia; además de las propiedades químicas que suele tener el látex de este tipo de plantas. En la sierra ecuatoriana es usado por los campesinos para delimitar terrenos, lo cual le ha otorgado el nombre de cerca viva, a más de un uso tradicional para combatir problemas de verrugas y abscesos infectados de la piel (Jijón, 2015). Por la presencia de principios activos, se ha considerado al lechero blanco como una planta de importancia en la cual se puede aplicar técnicas de cultivo *in vitro* con el fin de desarrollar un método que pueda optimizar la producción de metabolitos secundarios que ofrece esta planta.

Primero se analizará las condiciones en las que crece esta planta, lo que facilitará el proceso de introducción a cultivo *in vitro*, inmediatamente después se someterán los explantes a diversas concentraciones de fitorreguladores que se incorporarán al medio de cultivo con el fin de obtener callos, de los cuales se obtendrán distintas líneas celulares. Este conocimiento constituirá la base para dirigir investigaciones futuras sobre análisis citotóxicos y antibacteriales en diferentes líneas celulares de lechero blanco.

1.3 Objetivos de la Investigación

1.3.1 Objetivo general

Establecer líneas celulares a nivel *in vitro* de lechero blanco (*Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam.) a partir de segmentos de tallo.

1.3.2 Objetivos específicos

- Obtener un protocolo de desinfección para el cultivo *in vitro* de lechero blanco (*Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam.).
- Determinar las concentraciones de fitorreguladores necesarios para la formación de callo de lechero blanco (*Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam.).
- Seleccionar y propagar las diferentes líneas celulares a partir de callo de lechero blanco (*Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam.).

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Características generales de Lechero Blanco (*Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam.)

1.4.1.1 Clasificación Taxonómica

El género *Euphorbia* fue descrito por primera vez por Linnaeus (1799), donde la clasificación taxonómica del lechero blanco se muestra a continuación:

SUPERREINO	Eukaryota
REINO	Plantae
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Malpighiales
FAMILIA	Euphorbiaceae
GÉNERO	<i>Euphorbia</i>
ESPECIE	<i>laurifolia</i> Juss. ex Lam.
NOMBRE COMÚN	Lechero Blanco

El nombre genérico *Euphorbia*, fue asignado por Linnaeus en honor a Euphorbus, médico griego de Juba II, rey de Mauritania, quien estuvo interesado en la botánica, escribiendo sobre

una planta similar al cactus africano (conocida actualmente como *Euphorbia obtusifolia* ssp.), cuyo exudado de látex se usó como un poderoso laxante (Dale, 1986).

1.4.1.2 Otros Nombres

A esta planta se denomina comúnmente como “lechero” en la mayoría de territorios, sin embargo también se la conoce con nombres como: lechero blanco, lecherillo, pinchoa, pinglio, pinllug, pinsho (Ecuador), lechero de cerco (Colombia), palo lechero (Perú) (Grandtner & Chevrette, 2013), donde los campesinos también la suelen llamar “cerca viva”, por su uso en la delimitación de terrenos de cultivo.

1.4.1.3 Distribución Geográfica

El lechero blanco (*Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam.) está ampliamente distribuido en Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y Bolivia, ubicándose en territorio ecuatoriano a lo largo de la zona andina, a alturas que van desde los 1500 hasta los 3000 msnm (Jijón, 2015).

1.4.1.4 Características Morfológicas y Usos

Puede ser un árbol o arbusto, muchas veces plantas suculentas, que cuentan con un látex lechoso y hojas glabras sin estípulas. Cuentan con numerosas flores masculinas alrededor de una flor femenina central pedicelada, con un fruto tricoco (Figura 1) (Ulloa & Moller, 2014).

Se suele usar su madera para la construcción de viviendas. El látex se lo emplea como pegamento y para tratar afecciones del hígado, abscesos infectados en la piel, a más de verrugas. Dentro de la sierra ecuatoriana, aún se le da un uso tradicional, sobreviviendo en algunos huertos de Quito y su periferia. Los tallos de las plantas suelen usarse para delimitar terrenos y proteger cultivos de los campesinos, los cuales enraízan y crecen rápidamente, por lo que también se conoce a estas plantas como cercas vivas. Además, tienen uso ornamental y su estado de

conservación no ha sido valorado por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Jijón, 2015).



Figura 1. Fruto tricoco de lechero blanco
(Tomado de Jijón, 2015)

1.4.2 Familia Euphorbiaceae

Esta familia consta alrededor de 7000 especies distribuidas en 250 géneros, siendo la mayoría de ellas matas y hierbas, aunque también constituyen árboles y arbustos (The Plant List, 2010). Es una familia de plantas cosmopolitas, aunque la mayoría de especies pertenecen a zonas tropicales, distribuidas ampliamente en África y América tropical, así como en la región indomalaya (Días, 2014).

Una de las características más representativas de muchos géneros de plantas de esta familia (*Euphorbia*, *Sapium*, *Croton*, etc.), es la producción de látex, que por lo general es tóxico, pudiendo causar inflamaciones en piel y ojos con el simple contacto. La planta usa estas toxinas como mecanismo de defensa contra herbívoros (Basak, Bakshi, Basu, & Basak, 2009). Sin embargo, plantas de esta familia tienen importancia para la producción de fármacos, además de propiedades nutricionales, usadas para producción de aceites y biocombustibles (Ernst et al.,

2015). Adicionalmente, alrededor de 400 terpenoides han sido aislados de plantas del género *Euphorbia*, los cuales han demostrado tener propiedades apoptóticas, citotóxicas, inducción de proliferación celular e incluso antitumorales (Avila et al., 2010).

1.4.3 Cultivo *in vitro*

1.4.3.1 Aspectos Generales

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de una planta) se cultiva en condiciones estériles, en un medio de composición química definida y que se incuba bajo condiciones ambientales controladas (Kumar & Loh, 2012), cuya finalidad suele ser la micropropagación de plantas o la obtención de órganos adventicios. Todo este proceso se basa en el principio de totipotencia, que consiste en que cualquier célula vegetal que contiene material genético de la planta a la que pertenece, sin importar su especialización ni posición, tiene la capacidad para generar un nuevo individuo (Mendoza, 2014).

Existen varias razones por las que el cultivo de tejidos y células a nivel *in vitro* resulta una opción interesante para la producción de plantas y derivados, como por ejemplo: permitir el crecimiento bajo condiciones de sanidad específicas, aumentando el rendimiento de producción; no están sujetos a condiciones climáticas ni posicionamiento geográfico; es una opción viable para la propagación de plantas no domesticadas o de difícil cultivo en campo; tiene mayor facilidad de mejoramiento genético de las especies por técnicas biotecnológicas en comparación al uso de técnicas tradicionales; síntesis controlada de principios activos de plantas de lento crecimiento o de difícil extracción; etc., por nombrar algunas de las aplicaciones más usadas de esta disciplina (Bhojwani, 2012).

1.4.3.2 Medios de cultivo

Se debe tomar en cuenta todos los factores, tanto bióticos como abióticos cuando se quiere llevar la propagación de una planta a nivel *in vitro*, por ello los medios nutritivos usados para el cultivo de tejidos vegetales contienen numerosos componentes que promueven la división de las células vegetales (Ovando, 2010). En la actualidad ya existen formulaciones generales para la preparación de medios de cultivos, un ejemplo muy conocido es el medio MS, creado por Murashige y Skoog en 1962, que constan de los compuestos químicos necesarios (macronutrientes y micronutrientes) para el desarrollo de los explantes (ANEXO A) (González, Mogollón, Alvarado, Giménez, & Capote, 2012).

Entre los componentes que debe tener un medio de cultivo se encuentra la fuente de carbono, ya que a nivel *in vitro* muy pocos cultivos son autótrofos, siendo la sacarosa (2% a 5%) el más usado. El nitrógeno puede ser suministrado en forma de nitrato y amonio, aunque también puede suministrarse en forma de glutamina o urea. También se requiere de fósforo, calcio, magnesio y azufre a concentraciones de 1 a 3 mM. A pesar de que los medios de cultivo requieren de vitaminas, gran parte de las veces solo resulta necesario la incorporación de tiamina (Smith, 2012).

Algunos medios de cultivo requieren además de un agente gelificante, con el fin de tener una base firme sobre la cual pueda desarrollarse el explante. El agente gelificante más usado es el agar (0,6 a 1%), el cual necesita ser especialmente puro para evitar contaminación (Smith, 2012).

Otros componentes importantes que se suelen incorporar a los medios de cultivo son los reguladores de crecimiento vegetal, también conocidos como fitorreguladores. Estas son moléculas orgánicas que cuentan con la capacidad de modular el crecimiento y desarrollo de las

plantas y sus tejidos, encontrándose internamente a bajas concentraciones (1 mM). Conforme se iban encontrando nuevos reguladores de crecimiento y se profundizaba en el estudio de sus efectos y concentraciones endógenas, resaltaba mayor evidencia de que cada uno de ellos tenía variadas respuestas sobre diferentes tejidos vegetales, las cuales dependían de la especie, órgano vegetal, estado de desarrollo del individuo, concentraciones e interacciones de los reguladores empleados. Por este motivo, no es recomendable generalizar los efectos que estas sustancias tienen sobre el crecimiento y desarrollo sobre los tejidos u órganos vegetales en casos particulares (Smith, 2012).

Los reguladores de crecimiento son útiles para generar situaciones específicas dentro del cultivo de tejidos vegetales, como la diferenciación de tejidos, o la producción específica de principios activos. Estas sustancias se agrupan en diferentes tipos de acuerdo a su estructura:

- Auxinas, sustancias químicas con la capacidad de aumentar la plasticidad celular, permitiendo la expansión de la célula, además de inducir diferenciación de raíces a nivel *in vitro*,
- citocininas, también llamadas citoquininas, promueven la división celular,
- giberelinas, familia de compuestos químicos tetracíclicos diterpénicos que estimulan la elongación de tallos, germinación de semillas y floración,
- ácido abscísico, el cual es producido por la planta frente a situaciones de estrés, provocando el cierre de estomas y la producción de proteínas protectoras.
- etileno, es un compuesto gaseoso, conocido como hormona de maduración, el cual induce la senescencia de hojas y flores, germinación de las semillas y la floración en algunas especies (George, Hall, & Klerk, 2008).

1.4.3.3 Tipos de cultivos

Según el objetivo, es posible obtener plantas, metabolitos o exudados mediante las técnicas de cultivo de tejidos vegetal diferenciado o indiferenciado. Los cultivos diferenciados se producen por embriogénesis somática u organogénesis que a su vez puede ser de forma directa o indirecta, donde la embriogénesis tiene como objetivo la formación de una planta normal a partir de una estructura de dos polos conformada por una raíz y una sección apical (E. Hernández, López, & Estrada, 2013), mientras la organogénesis tiene como finalidad la formación de un primordio de un solo polo que se origina de una yema y resulta en brotes que enraizarán mediante meristemas radicales (Rodríguez, Latsague, Chacón, & Astorga, 2014).

En cultivos indiferenciados se produce la formación de callos en medios de cultivo semisólidos o líquidos a partir de órganos o tejidos, cuyas células se desdiferencian por efecto de auxinas agregadas. En medio de cultivo semisólido se forman masas celulares algo compactas y en líquido suspensiones de agregados celulares o dispersas (Trabelsi et al., 2011). Estos cultivos se caracterizan por superar a la planta materna en la producción metabólica y la variedad genética (Rodríguez et al., 2014).

Dentro de los grupos de células de los cultivos indiferenciados están células alargadas o anchas con una vacuola grande en el centro y poca viabilidad morfológica, hay diversidad celular en cuanto a tamaños (Sánchez & Venutolo, 2015), citoplasma espeso y alta viabilidad morfológica como las de las células del meristemo (Smith, 2012). Mas, se debe tomar en cuenta que dichos tipo celulares podrían crecer en diferente sincronía, por lo que no necesariamente se pueden definir como tipos celulares distintos (Kumar & Loh, 2012).

Cuando se quiere formar células no diferenciadas (callo), es necesario tener un balance concreto de citoquininas y auxinas agregadas al medio de cultivo, que generalmente requiere un rango intermedio entre ambas. Entre las auxinas más utilizadas se tiene: 2,4-D, ácido naftalenacético (ANA), ácido indol-3-acético (AIA), indol-3-butírico (AIB); y las citoquininas que más se emplean son: kinetina (KIN), 6-bencilaminopurina (BAP) y Zeatina (ZEA) (Smith, 2012).

Conforme los callos se desarrollan, su crecimiento dependerá de una compleja relación entre diversos factores, como la composición del medio de cultivo, los explantes elegidos para la desdiferenciación celular y las condiciones experimentales durante la etapa de incubación. Los callos podrán desarrollarse de manera lignificada, con una textura compacta y dura; o por el contrario, serán de naturaleza frágil, capaces de separarse sin dificultad, a los que se denomina como cultivos friables (Kumar, 2015).

Generalmente los callos se presentan con una coloración amarillenta o blanquecina, aunque a veces pueden presentar otras pigmentaciones de manera total o irregular. Se ha observado en cultivos de cotiledones de soja, que callos de color blanco crecidos en oscuridad se tornan de un color verde cuando son transferidos a condiciones de luz, debido a la producción de cloroplastos. Callos de coloración amarilla se pueden dar por presencia de pigmentos carotenoides como se ha visto en cultivos de *Nigella sativa* L. Incluso se ha logrado observar coloraciones púrpuras en callos de coliflor (*Brassica oleracea* L.), debido a la producción de una forma oxidada de 3, 4 dihidroxi fenilalanina, o por la acumulación de antocianinas (Kumar, 2015). Por lo tanto, la coloración de los callos estará ligada a la planta de procedencia así como los metabolitos secundarios presentes en sus tejidos.

Las células de los callos suelen tener un desarrollo tardío y asincrónico por la reserva vectorial de nutrientes en el medio de cultivo, por esta razón se complica definir líneas celulares de interés. Los callos se deben sembrar en subcultivos con medio fresco por períodos de entre 30 a 40 días según lo requiera la especie, que un callo sea friable o poco cohesivo y su curva de crecimiento dependen también de las condiciones de luz, y concentraciones de sus componentes como nutrientes, agar y fitorreguladores que se apliquen a cada especie (Rodríguez et al., 2014). Si el callo es compacto se busca la manera de fragmentar los agregados celulares por medios mecánicos como la agitación o por medio del uso de enzimas (Smith, 2012).

La curva de crecimiento de las células del cultivo de callos se asemeja a la de los microorganismos pero con un período de tiempo mayor. Comienza con la fase de inicio en que las células se adaptan al medio y puede demorar de uno hasta tres días, a continuación, viene la fase de división celular con un crecimiento de biomasa y finalmente, la falta de nutrientes comienza a frenar la división hasta pararla (Sánchez & Venutolo, 2015).

1.4.3.4 Líneas celulares

Línea celular se define como el establecimiento de un cultivo celular único (humano, animal o vegetal) con la capacidad de proliferar indefinidamente mientras se le suministre medio de cultivo fresco y espacio donde multiplicarse. Las líneas celulares han jugado un papel fundamental en estudios fisiológicos, fisiopatológicos y mecanismos que involucran células específicas, permitiendo examinar alteraciones en la estructura, biología y genética de las células en condiciones controladas (Ulrich & Pour, 2001).

En cultivo de tejidos vegetales, las líneas celulares se obtienen mediante varios subcultivos de células desdiferenciadas (callos) hasta conseguir una población celular fisiológica y

morfológicamente homogénea, con una alta viabilidad, que se diferencian del tejido originalmente usado y pueden mantenerse en medio de cultivo semisólido o en suspensión. Generalmente, en las poblaciones de células vegetales cultivadas a nivel *in vitro* se pueden observar parámetros como morfología celular, tamaño celular y procesos de división celular. Los modelos de líneas celulares también permiten el estudio de estructuras intracelulares, además de la producción de metabolitos para su análisis bioquímico y de interacción. Por esta razón, las líneas celulares vegetales representan modelos experimentales ventajosos para diversos estudios centrados en mecanismos que afectan a la morfología celular, así como la respuesta de compuestos fitoquímicos que actúan como reguladores a nivel interno y externo del tejido vegetal (Seifertová et al., 2014).

1.5 Hipótesis

La exposición de los segmentos de tallo de lechero blanco a diferentes concentraciones de fitorreguladores inducirá a la formación de callo a partir de los cuales se establecerán distintas líneas celulares para la posterior aplicación en análisis de la actividad citotóxica y antimicrobiana.

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Localización del ensayo

La investigación se realizó en dos fases. En la fase de campo se recolectó segmentos de ramas de la planta de lechero blanco de la zona suroeste de la parroquia de Aloasí ($0^{\circ}31'35,6''S$; $78^{\circ}35'34,39''O$) en la provincia de Pichincha.

La fase de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, localizada en Sangolquí, Av. El Progreso, s/n, Cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, $0^{\circ}18,81 S$; $78^{\circ}26,64 O$; a una altitud de 2516 msnm.

2.2 Procedimientos generales

Material Vegetal

Se tomaron muestras vegetales de una población de aproximadamente 50 plantas silvestres de lechero blanco de la zona suroeste de la parroquia de Aloasí en la provincia de Pichincha. Las muestras se recolectaron durante el día con una temperatura promedio de $14^{\circ}C$ y en tipo de suelo Andisol (Calvache, 2014).

Las plantas de esta población cumplen con las condiciones de ser semileñosas, encontrarse en estado vegetativo joven y ser sanas visiblemente. Se extrajeron ramas completas a partir de yemas laterales (Figura 2A), donde aquellas que superaban los 30 cm de longitud fueron cortadas con ayuda de unas tijeras de podar previamente desinfectadas con alcohol etílico al 70%. Estos segmentos fueron lavados con agua estéril y se depositaron en cajas de cartón previamente

recubiertas en su interior con papel periódico para transporte al laboratorio de cultivo de tejidos vegetales.

Los explantes seleccionados para los diferentes ensayos experimentales fueron segmentos de entrenudos de las ramas muestreadas.

Medios de cultivo y condiciones de esterilización

Los medios de cultivo se dosificaron a razón de 25 mL en frascos de vidrio de 250 mL de capacidad. El pH se ajustó en un rango de 5,7 – 5,8 con NaOH 1N y HCl 1N y se agregó agar ($7,5 \text{ g L}^{-1}$) como agente gelificante previo a ser esterilizado en autoclave.

Los frascos con medio de cultivo e instrumentos para el trabajo en cámara de flujo laminar fueron esterilizados en autoclave horizontal (Marca: Tuttnauer, Procedencia: Estados Unidos) a 121°C y $1,2 \text{ kg cm}^{-2}$ de presión por un tiempo de 1 hora y 15 minutos aproximadamente.

Adicionalmente, los instrumentos se esterilizaron dentro de la cámara de flujo laminar horizontal (Marca: Streamline, Procedencia: Estados Unidos), donde permanecían durante 20 minutos bajo la exposición de rayos ultravioletas (UV), lo que permitió un manejo de material vegetal en condiciones estériles.

Todo el proceso de esterilización se realizó previo a cada introducción de material vegetal a nivel *in vitro*.

Condiciones de cultivo *in vitro*

Los explantes en los frascos de medio de cultivo semisólido se colocaron en un cuarto con condiciones controladas, con una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con una humedad relativa del 70% y expuestos a fotoperiodos naturales de 16 horas, exceptuando los medios de cultivo con 2,4-D. que requerían de completa oscuridad.

2.3 Efecto del hipoclorito de sodio en la desinfección de segmentos de tallo de lechero blanco

Este experimento tuvo como objetivo determinar el efecto de diferentes concentraciones de hipoclorito de Sodio (NaClO) en la desinfección de segmentos jóvenes de tallo de lechero blanco.

Se tomó en cuenta los protocolos de desinfección de Perveen, Javed, Anis, & Aref (2013), Yang, Chen, Li, & Chen (2009) y Uchida et al. (2004) para desarrollar los tratamientos aplicados a los segmentos de tallo de lechero blanco, para lo cual se realizaron 20 repeticiones, con dos explantes por frasco de medio de cultivo semisólido.

Segmentos de tallo de 12 cm de longitud aproximadamente (Figura 2B) se sometieron a 3 primeras etapas: lavado en agua corriente, exposición a detergente, desinfección con fungicida (Marca: Phytan), cuyos tiempos de exposición y concentraciones se detallan en la Tabla 1. Los tratamientos se diferenciaron en función de la variación en las concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión (Tabla 2), agregando a cada tratamiento tres gotas de Tween 20.

Terminada la desinfección de los explantes, se les realizó tres lavados con agua destilada estéril, con el fin de remover el exceso de hipoclorito de sodio restante.

Cada etapa del protocolo de desinfección se mantuvo en agitación constante a 120 rpm con ayuda de un agitador orbital múltiple (Marca: WiseStir, Procedencia: Estados Unidos).

Tabla 1

Tratamiento general de desinfección de tallos de lechero blanco.

Fase	Lavado	Detergente	Fungicida
Tiempo	1 hora	15 minutos	15 minutos
Concentración	---	5%	5 mL L ⁻¹

Tabla 2

Tratamientos específicos de desinfección basados en la concentración y tiempo de exposición del hipoclorito de sodio en explantes de tallos de lechero blanco.

Tratamiento	Tiempo de exposición (minutos)	Concentración Hipoclorito de sodio (% v/v)
T1	15	1,5
T2	15	3
T3	15	5
T4	25	1,5
T5	25	3
T6	25	5

Una vez terminada la desinfección, los explantes fueron transportados en vasos de precipitación, sumergidos en agua destilada estéril, para comenzar el proceso de siembra en condiciones asépticas dentro de cámara de flujo laminar horizontal.

Se comenzó cortando todas las secciones de tallo que se encontrasen necrosadas, para proseguir con cortes a modo de discos, con un diámetro variable en función del tallo (entre 5 hasta 8 mm) y con un espesor de 3 mm aproximadamente. Finalmente, a cada disco se cortó los bordes con el fin de obtener explantes que no hayan tenido contacto con los agentes desinfectantes y, consecuentemente, con el exterior (Figura 2C). Después de este proceso, se procedió a colocar dos explantes en el cada frasco de medio cultivo semisólido.

Todos los explantes fueron cultivados en medio de cultivo enriquecido con sales minerales de Murashige & Skoog (1962) (ANEXO A), con 30 g L⁻¹ de azúcar y 7,5 g L⁻¹ de agar como agente gelificante, utilizando 20 frascos de vidrio por tratamiento de 250 mL de capacidad, dosificados con 25 mL de medio de cultivo.

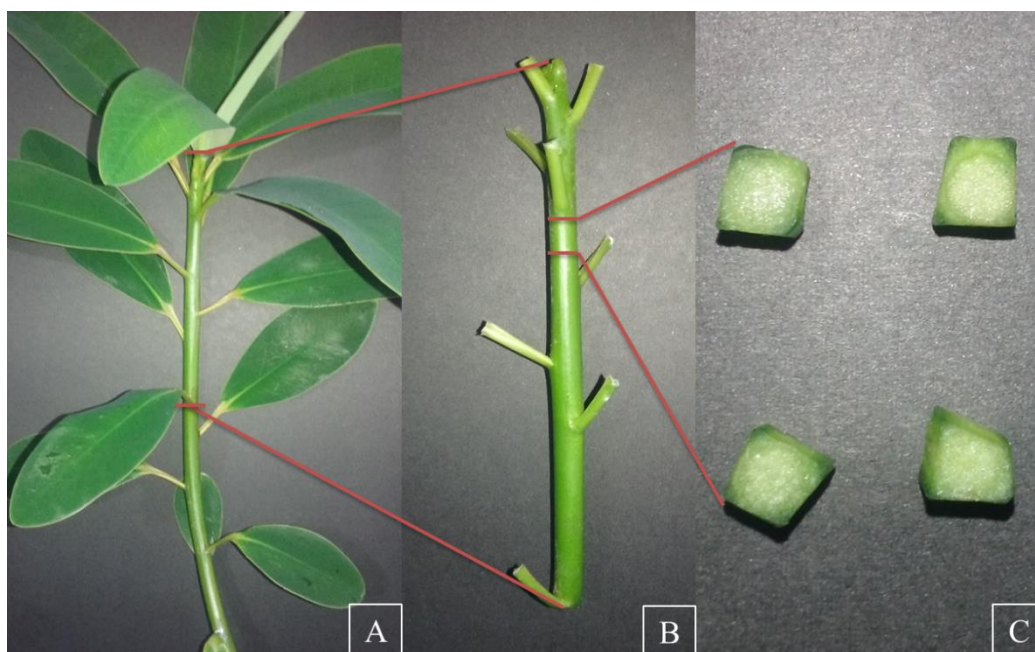


Figura 2. Proceso de corte de los explantes de lechero blanco. A) Rama muestreada de lechero blanco de 25 cm de longitud. B) Corte del extremo terminal de 12 cm de la rama de lechero blanco sin hojas, listo para iniciar el proceso de desinfección. C) Explantes de tallo de lechero blanco que fueron introducidos a nivel *in vitro*, de 5 mm de largo y ancho, con 3 mm de grosor.

En este experimento se evaluó la presencia (1) o ausencia de contaminación (0), para bacterias, al cabo de 7 días de realizada la siembra, con cada explante como unidad experimental. Además, se evaluó la presencia de explantes viables, aquellos que presentaron un color verde claro (Ramírez, Urdaneta, & León de Sierralta, 2002), tomando como explantes no viables a los que tuvieron oxidación de los tejidos, donde los explantes oxidados se les asignó el valor de (1) y los no oxidados el valor (0), variable que se evaluó a los 15 días, considerando a cada explante como unidad experimental.

Para el análisis estadístico se empleó pruebas de chi-cuadrado con el fin de buscar dependencia entre la variable contaminación y los tratamientos, además de pruebas no paramétricas para variables dicotómicas, como Kruskal Wallis, mediante el programa estadístico

InfoStat. Adicionalmente, se realizó análisis descriptivos de los porcentajes de las diferentes variables.

2.4 Efecto de diferentes concentraciones de fitorreguladores en la inducción a callo a partir de los segmentos de tallo de lechero blanco

La obtención de células no diferenciadas depende de la concentración de auxinas y citoquininas presentes en el medio de cultivo, teniendo generalmente una concentración ligeramente mayor de auxinas en relación a las citoquininas (Matos & Sánchez, 2011). Por ello, el objetivo de este experimento fue utilizar tres tipos de auxinas a diferentes concentraciones para inducir la formación de callo a partir de segmentos de tallo de lechero blanco.

Para alcanzar este objetivo, se tomaron en cuenta trabajos previos sobre plantas pertenecientes a la misma familia (Euphorbiaceae) puesto que no existen investigaciones en esta especie, variando las concentraciones óptimas de fitorreguladores que usaron dichos autores (Iracheta et al., 2016; Preciado, Ayala, & Martínez, 2016). En base a esta bibliografía, se exponen los tratamientos y fitorreguladores que se usaron para la inducción de callo en la Tabla 3.

Tabla 3

Tratamientos para la inducción de callo de explantes de tallo de lechero blanco (Euphorbia laurifolia Juss. ex Lam.).

Tratamiento	Citoquinina	Concentración (mg L ⁻¹)	Auxina	Concentración (mg L ⁻¹)
TC	---	---	---	---
T1	Kinetina	0,5	ANA	0,5
T2	Kinetina	0,5	ANA	1
T3	Kinetina	0,5	ANA	2
T4	Kinetina	1	ANA	0,5
T5	Kinetina	1	ANA	1
T6	Kinetina	1	ANA	2
T7	BAP	1	AIB	0,5
T8	BAP	1	AIB	1
T9	BAP	1	AIB	2

CONTINÚA ⇨

T10	BAP	1,5	AIB	0,5
T11	BAP	1,5	AIB	1
T12	BAP	1,5	AIB	2
T13	BAP	0,5	2,4-D	1
T14	BAP	0,5	2,4-D	3
T15	BAP	0,5	2,4-D	5
T16	BAP	1	2,4-D	1
T17	BAP	1	2,4-D	3
T18	BAP	1	2,4-D	5

Todos los explantes se cultivaron en medio de cultivo enriquecido con las sales minerales de Murashige & Skoog (1962) (ANEXO A), con los fitorreguladores ya mencionados para cada tratamiento, 30 g L⁻¹ de azúcar y 7,5 g L⁻¹ de agar como agente gelificante en 10 frascos de vidrio de 250 mL de capacidad por tratamiento, dosificados con 25 mL de medio de cultivo. También se empleó un tratamiento control (TC), donde la composición del medio de cultivo será igual a la usada en los tratamientos ya descritos, privándolo de fitorreguladores para poder establecer un punto de comparación.

La unidad experimental para esta etapa corresponde al análisis individual de cada explante. Como resultado de este experimento se determinó el porcentaje de formación de callo para cada tratamiento después de 30 días de realizada la siembra, tomando como base el área superficial de cada explante. Además, se evaluó la oxidación de los explantes asignándoles una numeración de acuerdo al grado de oxidación: (0) para explantes no oxidados, (1) para explantes con indicios de oscurecimiento de tejidos y (2) para explantes no viables, cuya oxidación terminó en muerte de los tejidos.

El análisis estadístico consistió en un análisis de varianza (ANOVA) para establecer si existe diferencia significativa entre tratamientos, seguido de pruebas Duncan para separar grupos

significativamente diferentes. Adicionalmente, se realizó análisis exploratorio de los porcentajes de las diferentes variables.

2.5 Selección y propagación de líneas celulares obtenidas a partir del callo formado de los segmentos de tallo de lechero blanco

Una vez establecidos los callos a partir de los segmentos de tallo, se realizó una diferenciación de los tipos de callos formados sobre el tejido vegetal con ayuda de un estereomicroscopio (Marca: Leica, Procedencia: Estados Unidos) al cabo de 60 días de realizada la siembra, tiempo suficiente para conseguir una clara distinción de las líneas celulares.

Se tomó en cuenta varias características con el fin de establecer una clara distinción de las líneas celulares para todos los explantes que formaron callo en el tiempo indicado:

- La coloración del callo, donde también se observó si hubo más de una coloración dependiendo la zona examinada.
- El nivel de oxidación de los callos.
- La producción de exudado, así como su coloración.
- La obtención de callos friables o no friables.
- Los tipos de células encontradas en las diferentes líneas celulares (alargadas o redondeadas)

La última características mencionada, requirió poner los callos en suspensión durante 7 días en agitación mecánica, con el fin de disgregar las células y poderlas observar en un microscopio óptico (Marca: Olympus, Procedencia: Estados Unidos) con un aumento de 40X. La suspensión consistió en un medio de cultivo líquido enriquecido con las sales minerales de Murashige & Skoog (1962) (ANEXO A), con los fitorreguladores respectivos de cada

tratamiento, 30 g L^{-1} de azúcar, en frascos de vidrio de 250 mL de capacidad, dosificados con 25 mL de medio de cultivo.

CAPÍTULO 3 RESULTADOS

3.1 Efecto del hipoclorito de sodio en la desinfección de segmentos de tallo de lechero blanco

Durante esta fase del ensayo, se aplicó un protocolo general de desinfección de los explantes de lechero blanco (Tabla 1), sin embargo, los tratamientos escogidos se basaron en la concentración de hipoclorito de sodio (1,5%, 3% y 6%) y los tiempos de inmersión (15 y 25 minutos), de los cuales las variables a evaluar fueron la contaminación y oxidación de los explantes, tomando como unidad experimental cada explante sembrado en el medio de cultivo semisólido.

3.1.1 Contaminación

La variable contaminación se evaluó al cabo de 7 días de realizada la siembra, evaluando cada explante de manera visual en busca de contaminación bacteriana.

Análisis exploratorio de los datos

En la Tabla 4 se puede observar la cantidad de explantes de lechero blanco contaminados y no contaminados por bacteria sobre cada uno de los seis tratamientos de hipoclorito de sodio.

Tabla 4

Tabla de contingencia de los protocolos de desinfección respecto a la variable contaminación, donde se muestran los explantes de lechero blanco, contaminados y no contaminados con bacteria.

Tratamientos de desinfección	Sin contaminación bacteriana	Con contaminación bacteriana	Total
T1 (1,5% v/v 15 min)	12	28	40
T2 (3% v/v 15 min)	1	39	40
T3 (5% v/v 15 min)	18	22	40
T4 (1,5% v/v 25min)	4	36	40

CONTINÚA ⇨

T5 (3% v/v 25 min)	2	38	40
T6 (5% v/v 25 min)	26	14	40
Total	63	177	240

Se puede observar que los tratamientos T3 y T6 presentaron el mayor número de explantes no contaminados, en los que se usó la mayor concentración de hipoclorito de sodio (5% v/v). Por otro lado, en los tratamientos donde se usó la concentración de hipoclorito de sodio al 3% v/v, presentaron casi la totalidad de explantes contaminados.

En la Figura 3 se puede apreciar los porcentajes de contaminación de los diferentes tratamientos, donde el tratamiento T6, correspondiente a 5% v/v de concentración de hipoclorito de sodio con 25 minutos de inmersión, resultó tener el mayor porcentaje de explantes no contaminados con un 65%. A su vez, se puede observar que tanto los tratamientos T2, T4 y T5 presentaron los porcentajes más altos de contaminación, siendo los tratamientos menos efectivos en cuanto a desinfección de los explantes de lechero blanco.

Como se puede observar en la Figura 4, existe una tendencia cruzada tomando en cuenta solamente ambos tiempos de inmersión, ya que tanto para los 15 como 25 minutos, se observó un tratamiento que presentó casi ningún explante libre de contaminación, específicamente en el tratamiento con 3% v/v de concentración del agente desinfectante. Sin embargo, el tratamiento que resultó con un mayor número de explantes no contaminados se encuentra dentro de los tratamientos con 25 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio, con un total de 26 explantes no contaminados.

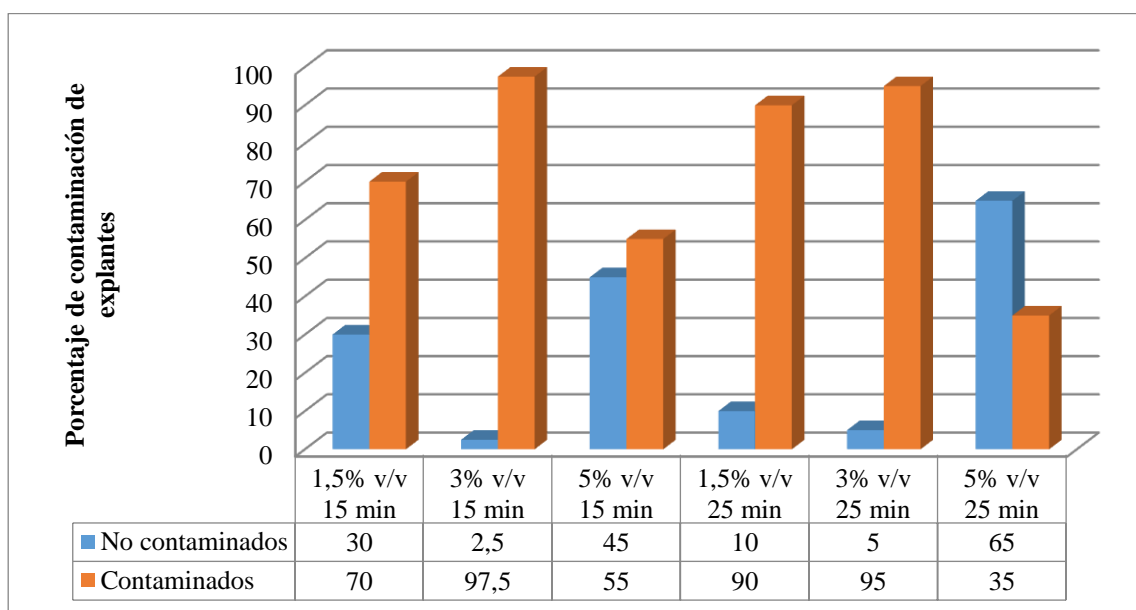


Figura 3. Porcentaje de explantes contaminados con bacteria y no contaminados en base a la concentración de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión a 7 de realizada la siembra.

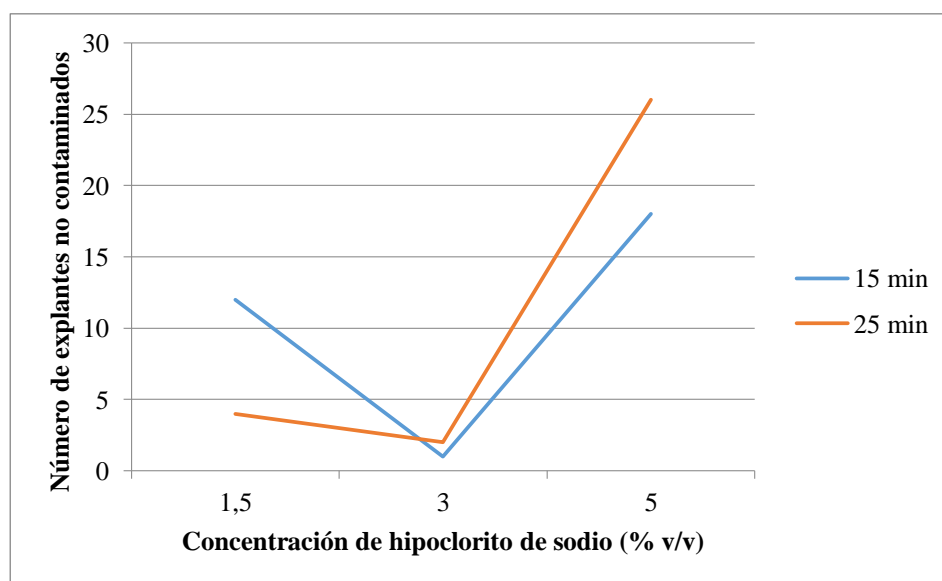


Figura 4. Gráfica de tendencias del número de explantes no contaminados con respecto al tiempo de inmersión del hipoclorito de sodio.

La Figura 5 se muestra una gráfica de tendencias sobre la cantidad de explantes libres de contaminación con respecto a la concentración de hipoclorito de sodio utilizada. En contraste con la gráfica de tendencias de la Figura 4, en esta se puede observar una clara predisposición de cada concentración de hipoclorito de sodio, siendo la concentración correspondiente a 5% v/v, la que mayor cantidad de explantes no contaminados presentó para ambos tiempos de inmersión.

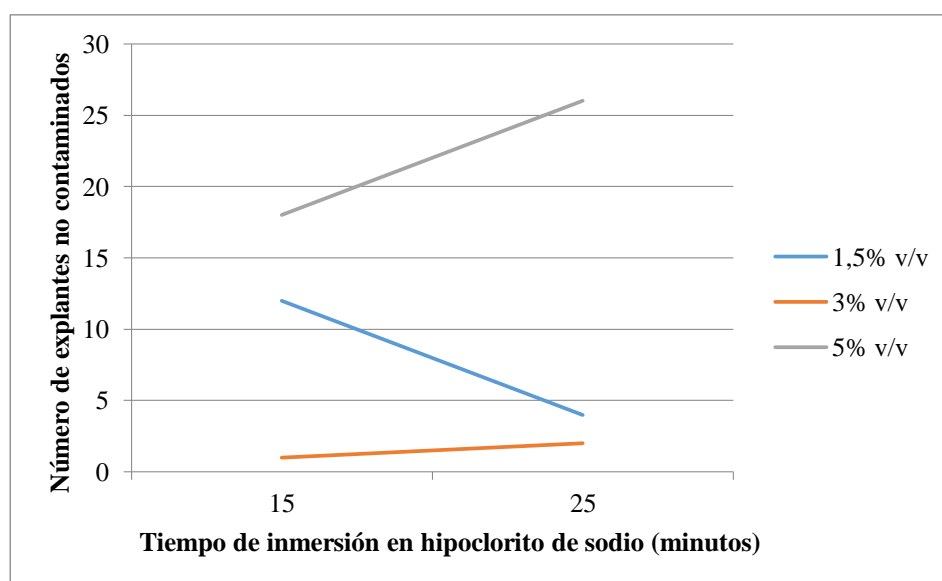


Figura 5. Gráfica de tendencias del número de explantes no contaminados con respecto a la concentración del hipoclorito de sodio.

Análisis inferencial

Se analizó la dependencia de los tratamientos de desinfección planteados (Tabla 2) con respecto a la variable contaminación mediante una prueba de chi-cuadrado (Tabla 5) donde se obtuvo un valor p de 0,0001 ($p=0,01\%$), menor al valor de significancia nominal de la prueba (5%), indicando una clara dependencia de ambas variables, descartando la hipótesis de igualdad entre los tratamientos de desinfección.

Tabla 5

Prueba chi-cuadrado para la variable contaminación por explante con respecto a los diferentes tratamientos de desinfección.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	65,02	5	<0,0001
Chi Cuadrado MV-G2	69,36	5	<0,0001
Coef.Conting.Cramer	0,37		
Coef.Conting.Pearson	0,46		

gl. Grados de libertad.

Debido a que los datos obtenidos a partir de la evaluación de contaminación de los explantes son dicotómicos, se realizó una prueba de Shapiro - Wilks, con el fin de averiguar si los datos siguen una distribución normal (Tabla 6). Se obtuvo un valor p de 0,0001 ($p=0,01\%$), el cual fue menor al nivel de confianza de la prueba (5%), por lo que se puede afirmar que los datos no siguen una distribución normal.

Tabla 6

Prueba de Shapiro-Wilks para determinar la normalidad de los datos provenientes de la variable contaminación.

Shapiro-Wilks					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Contaminación	240	0,74	0,44	0,54	<0,0001

n. Muestra; D.E. Desviación estándar; W*. Estadístico de prueba de Shapiro-Wilks.

Como los datos de contaminación no siguen una distribución normal, fue necesario realizar un análisis de varianza no paramétrico, por lo cual se aplicó la prueba de Kruskal Wallis con un nivel de confianza del 5%, cuyo fin es obtener una diferenciación de los tratamientos por subgrupos. Como se observa en la Tabla 7, se obtuvo un valor p de 0,0001 ($p=0,01\%$), indicando diferencia significativa entre los 6 tratamientos dividiéndolos en cuatro subgrupos (A, B, C y D), donde los tratamientos T6 y T3 pertenecen al grupo A, diferenciándose del resto. Los dos

tratamientos presentaron el menor porcentaje de contaminación (Figura 3), y a pesar de no tener diferencia estadística, se optó por el tratamiento T6 para los siguientes ensayos de la investigación, ya que tuvo el menor porcentaje de contaminación.

Tabla 7

Prueba de Kruskal Wallis para la variable contaminación de explantes de los diferentes tratamientos de desinfección.

Prueba de Kruskal Wallis							
Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	C	H	p
T1	40	0,7	0,46	1	0,58	37,61	<0,0001
T2	40	0,98	0,16	1			
T3	40	0,55	0,5	1			
T4	40	0,9	0,3	1			
T5	40	0,95	0,22	1			
T6	40	0,35	0,48	0			
Trat.	Medianas	Ranks					
T6	0	74	A				
T3	1	98	A	B			
T1	1	116		B	C		
T5	1	140			C	D	
T4	1	146			C	D	
T2	1	149				D	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

N. Población; H. Estadístico de prueba de Kruskal Wallis.

3.1.2 Oxidación

Esta variable fue observada al cabo de 15 días de realizada la siembra. Se evaluó cada explante individualmente en busca de signos de oscurecimiento o necrosamiento de los tejidos vegetales.

Análisis exploratorio de datos

Como se puede observar en la Tabla 8, cuando se implementó la concentración de hipoclorito de sodio al 5%, se tuvo la mayor cantidad de explantes no oxidados, especialmente en

el tratamiento T6. Sin embargo, los valores para el tratamiento T1 y T3 dieron una cantidad de explantes no oxidados cercana entre sí. La cantidad de explantes oxidados para los tratamientos T2, T4 y T5 fueron muy similares, siendo a su vez, los que presentaron menor cantidad de explantes no oxidados.

Tabla 8

Tabla de contingencia de la variable oxidación con respecto a los tratamientos de desinfección, donde se muestra el número de explantes de lechero blanco oxidados y no oxidados para cada tratamiento.

Tratamientos de desinfección	Con oxidación	Sin Oxidación	Total
1 (1,5% v/v 15 min)	19	21	40
2 (3% v/v 15 min)	31	9	40
3 (5% v/v 15 min)	15	25	40
4 (1,5% v/v 25min)	33	7	40
5 (3% v/v 25 min)	32	8	40
6 (5% v/v 25 min)	8	32	40
Total	138	102	240

En la Figura 6 se puede observar que el tratamiento T6, correspondiente a la concentración del 5% de hipoclorito de sodio con un tiempo de inmersión de 25 minutos, presentó la mayor cantidad de explantes no oxidados con un 80% en total. Los tratamientos T1 y T3, presentaron porcentajes de explantes oxidados algo cercanos, con un 52,5% y 62,5% respectivamente. Los tratamientos con un mayor índice de oxidación fueron los tratamientos T2, T4, y T5, con valores muy similares que no superaron el 22,5% de explantes no oxidados.

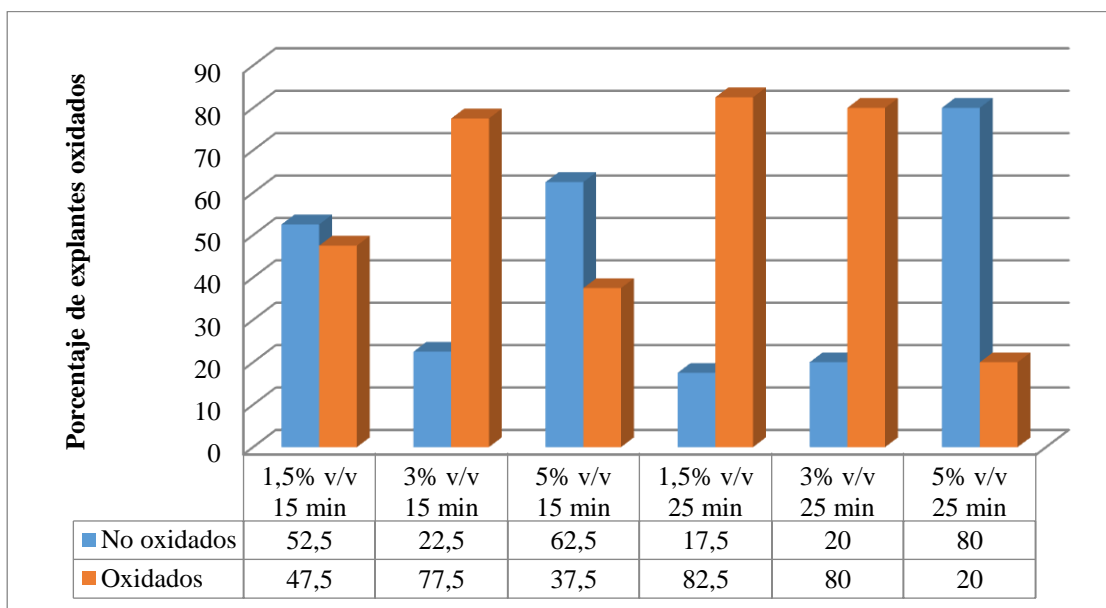


Figura 6. Porcentaje de explantes oxidados y no oxidados en base a la concentración de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión a 15 días de realizada la siembra.

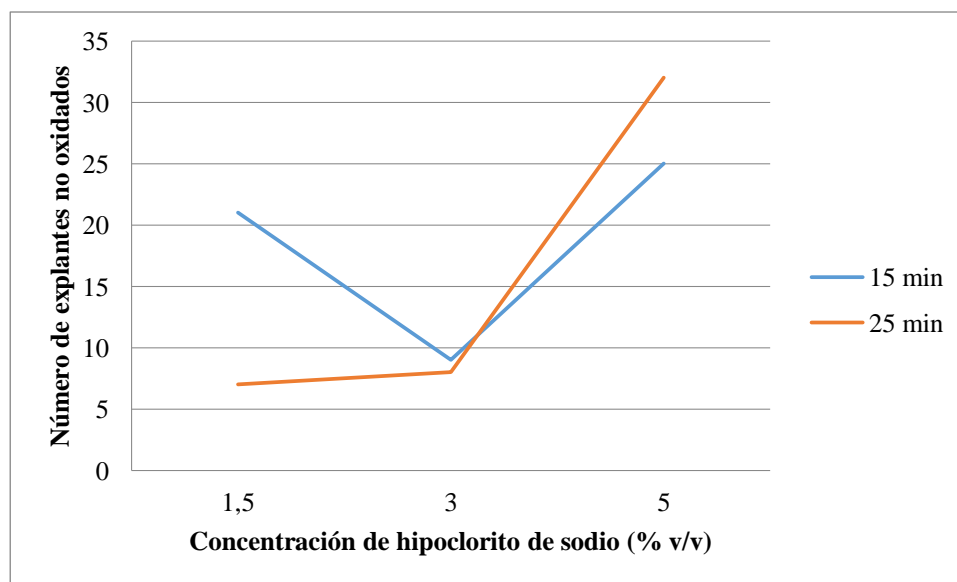


Figura 7. Gráfica de tendencias del número de explantes no oxidados con respecto al tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio.

En la Figura 7 se puede observar una gráfica de tendencias del número de explantes oxidados con respecto a los tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio. Similar a lo observado en la Figura 4, se obtuvo una tendencia cruzada al tomar en cuenta los tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio con respecto al número de explantes oxidados, donde los 25 minutos de exposición al hipoclorito de sodio presentaron la mayor cantidad de explantes no oxidados.

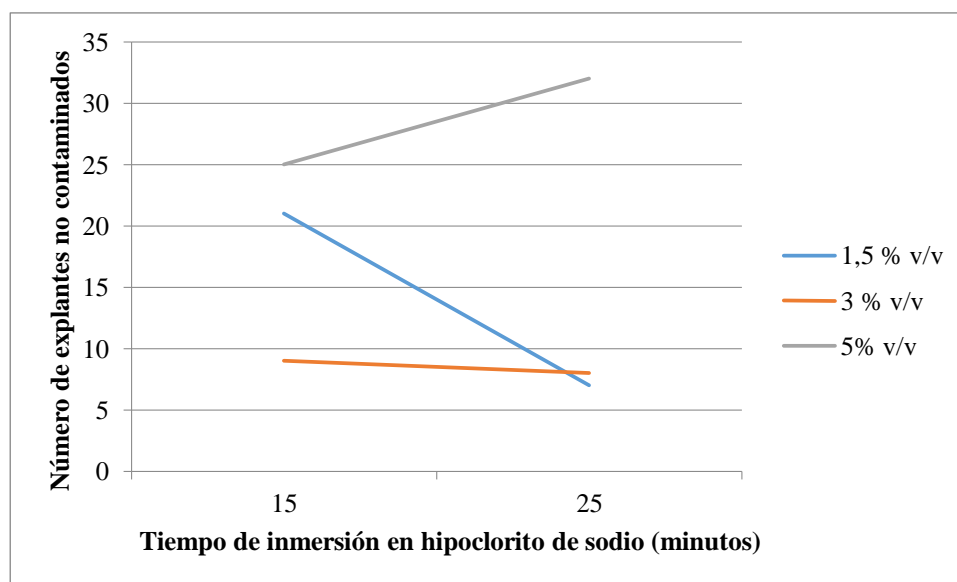


Figura 8. Gráfica de tendencias del número de explantes no oxidados con respecto a la concentración del hipoclorito de sodio.

A su vez, en la Figura 8 se puede observar una gráfica de tendencia del número de explantes no oxidados con respecto a las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio de los tratamientos, donde se ve una clara predisposición que favorece a la concentración de 5% v/v del agente desinfectante, presentando los más altos valores de explantes no oxidados para ambos tiempos de inmersión.

Análisis inferencial

Para analizar si existe dependencia de los diferentes tratamientos de desinfección planteados con respecto a la variable oxidación, se realizó una prueba de chi-cuadrado (Tabla 9), en la que se obtuvo un valor p de 0,0001 (0,01%) menor que el valor de significancia nominal de la prueba (5%). Este análisis mostró una significativa dependencia entre los tratamientos y la variable oxidación, rechazando de este modo la hipótesis de igualdad.

Tabla 9

Prueba chi-cuadrado para la variable oxidación de explantes, con respecto a los diferentes tratamientos de desinfección.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	56,27	5	<0,0001
Chi Cuadrado MV-G2	59,2	5	<0,0001
Coef.Conting.Cramer	0,34		
Coef.Conting.Pearson	0,44		

Al igual que con la variable de contaminación, es necesario revisar si los datos recolectados de oxidación siguen una distribución normal al ser de naturaleza binomial. Se aplicó una prueba de Shapiro-Wilks (Tabla 10), donde se obtuvo un valor p de 0,0001 (p=0,01%) menor que el nivel de confianza de la prueba (5%), rechazando la hipótesis de una distribución normal de los datos.

Tabla 10

Prueba de Shapiro-Wilks para determinar la normalidad de los datos provenientes de la variable contaminación.

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Oxidación	240	0,58	0,5	0,61	<0,0001

Como los datos no siguen una distribución normal, fue necesario recurrir nuevamente a la prueba de Kruskal Wallis para el análisis de varianzas no paramétrico, con un nivel de confianza del 5%. Como se observa en la Tabla 11, se obtuvo un valor p de 0,0001 ($p=0,001\%$), indicando que se rechaza la igualdad de los tratamientos de desinfección, clasificándolos en tres subgrupos diferentes (A, B y C). Los tratamientos T6 y T3 se clasificaron dentro del mismo subgrupo (A), mostrando que no existe diferencia estadística entre ellos. A pesar de esto, se decidió proseguir la investigación con el tratamiento T6, que similar a lo ocurrido con contaminación, es el tratamiento que menor porcentaje de oxidación presentó (Figura 6).

Tabla 11

Prueba de Kruskal Wallis para la variable oxidación de los explantes para los diferentes tratamientos de desinfección.

Prueba de Kruskal Wallis							
Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	C	H	p
T1	40	0,48	0,51	0	0,73	41,08	<0,0001
T2	40	0,78	0,42	1			
T3	40	0,38	0,49	0			
T4	40	0,83	0,38	1			
T5	40	0,8	0,41	1			
T6	40	0,2	0,41	0			
Trat.	Medianas	Ranks					
T6	0	75,5	A				
T3	0	96,5	A	B			
T1	0	108,5		B			
T2	1	144,5			C		
T5	1	147,5			C		
T4	1	150,5			C		

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.2 Efecto de diferentes concentraciones de fitorreguladores en la inducción a callo a partir de los segmentos de tallo de lechero blanco

Para esta fase de la investigación, se aplicaron 18 diferentes tratamientos, donde se utilizó 3 auxinas (ANA, AIB, 2,4-D) y 2 citoquininas (kinetina, BAP) para lograr la desdiferenciación celular (Tabla 3), donde la variable a evaluar fue el porcentaje de formación de callo, después de 30 días de realizada la siembra, tomando como unidad experimental a cada explante de lechero blanco. Adicionalmente, se analizó datos sobre la oxidación de los explantes.

3.2.1 Inducción de callo

Los primeros indicios de formación de callo se empezaron a notar al cabo de la primera semana de realizada la siembra, especialmente en los tratamientos T1, T2, T4, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16, y T17; donde se pudo observar un ensanchamiento de los tejidos, especialmente en las zonas del explante que se encontraba en contacto con el medio de cultivo semisólido.

Análisis exploratorio de datos

Al cabo de 15 días de iniciado el ensayo ya se observó formación de callo en los explantes, especialmente en los tratamientos T2, T4, T8, T10, T11, T12, T13, T14, T15, T16 y T17; tanto en la zona que estuvo en contacto con el medio de cultivo, como en la parte lateral y superior de los explantes (Figura 9).



Figura 9. Formación de callo de lechero blanco en medio de cultivo MS enriquecido con los fitorreguladores del tratamiento T1 ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA y $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de KIN).

En la Figura 10 se muestra un análisis exploratorio de estos datos, el cual da una mejor visualización del número de explantes donde se formó callo de cada uno de los tratamientos de fitorreguladores.

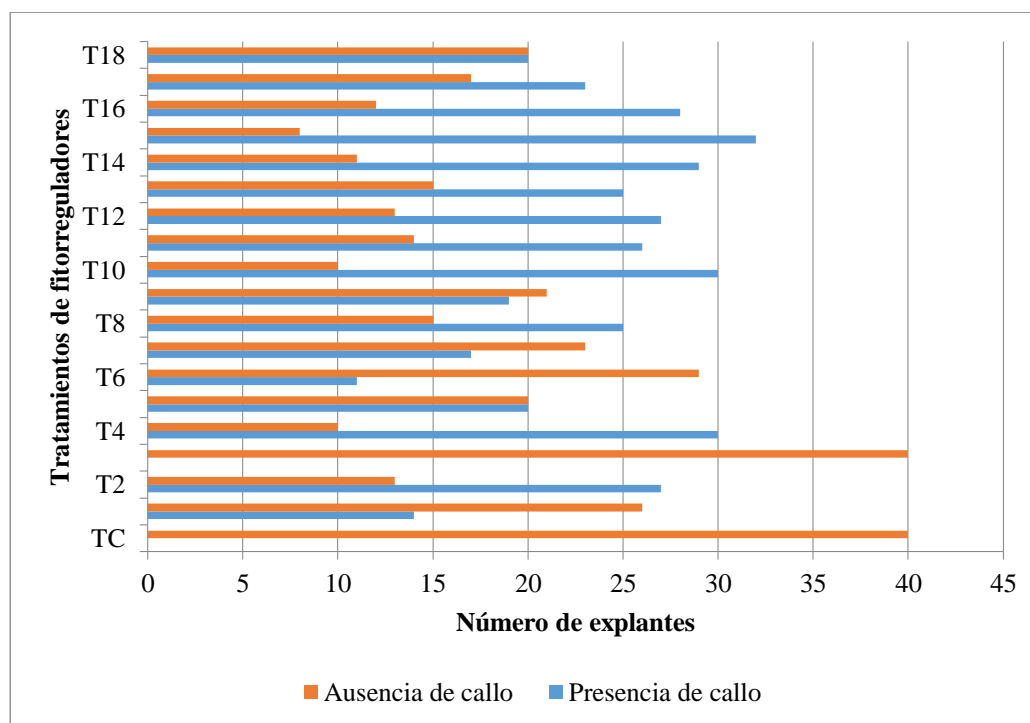


Figura 10. Número de explantes con presencia y ausencia de callo en los diferentes tratamientos de fitorreguladores a 15 días de realizada la siembra.

Transcurridos los 30 días de realizada la siembra, se procedió a determinar los porcentajes de formación de callo, tomando en cuenta la superficie del explante para este fin. De los porcentajes obtenidos se realizó un promedio, los cuales se pueden observar en la Figura 11. El ensayo que presentó un mayor porcentaje de formación de callo fue el tratamiento T15, correspondiente a una combinación de los fitorreguladores 2,4-D (5 mg L^{-1}) y BAP ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), con un porcentaje promedio de 73,125%. Además, es posible observar que a pesar de que el medio de cultivo control carece de fitorreguladores, también presentó varios explantes que formaron callo, los cuales también fueron evaluados.

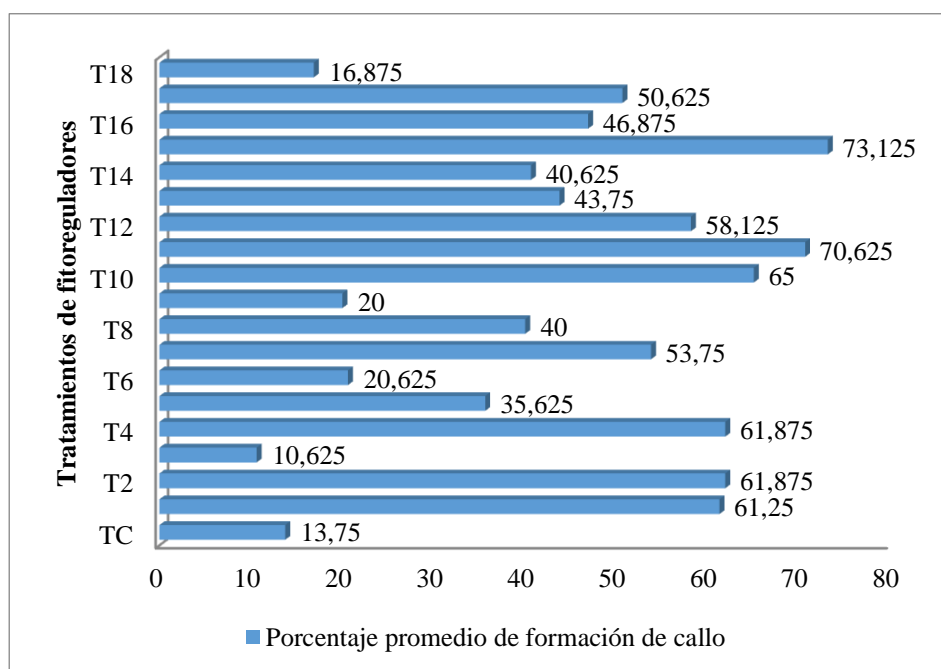


Figura 11. Porcentaje promedio de formación de callo de los explantes de lechero blanco sometidos a diferentes concentraciones de fitorreguladores a 30 días de realizada la siembra.

Durante los 30 días que transcurrieron hasta la evaluación, varios explantes de lechero blanco se tuvieron que descartar debido a problemas de contaminación y oxidación, teniendo aún indicios de oscurecimiento de los tejidos al momento de determinar los porcentajes de formación

de callo de los explantes. Se decidió dar seguimiento y mantenimiento a los callos para una segunda evaluación a los 60 días, tiempo que fue necesario para una mayor diferenciación de las líneas celulares.

Transcurrido el periodo de tiempo mencionado, se determinó nuevamente los porcentajes de formación de callo de los explantes, cuyos promedios se muestran en la Figura 12. Del mismo modo que en el análisis realizado a los 30 días, se obtuvo una mayor formación de callo en el tratamiento T15, correspondiente a 5 mg L^{-1} de 2,4-D y $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP con un promedio de 113,125%, seguido del tratamiento T11 (1 mg L^{-1} de AIB y $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP) con un porcentaje de formación de callo promedio del 100,625%.

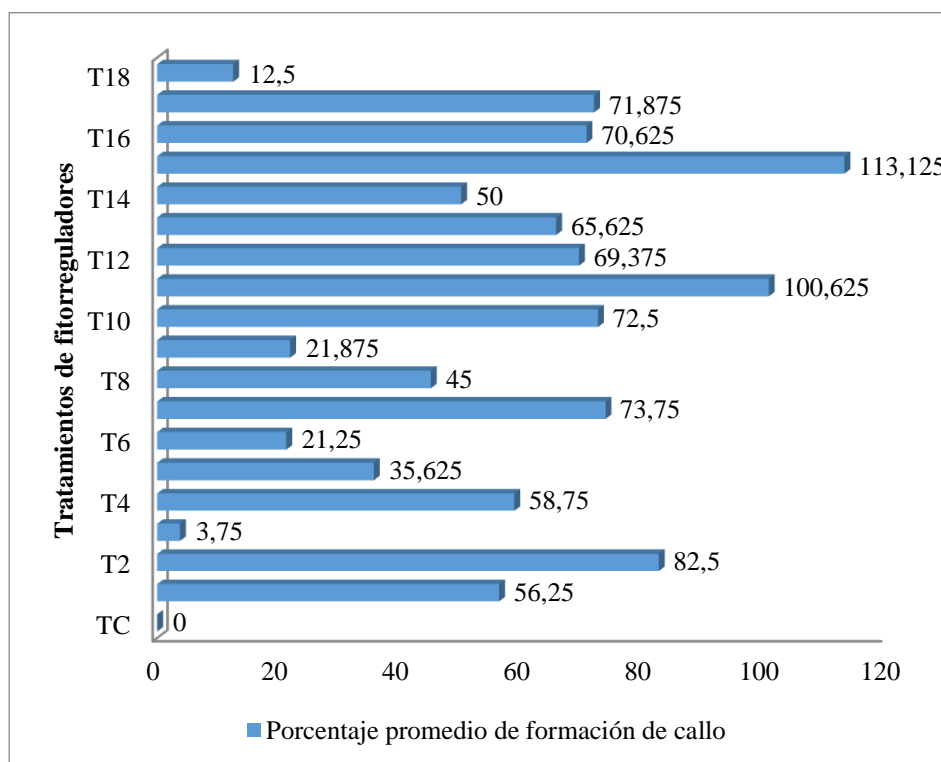


Figura 12. Porcentaje promedio de formación de callo de los explantes de lechero blanco sometidos a diferentes concentraciones de fitorreguladores a 60 días de realizada la siembra.

Conforme pasó el tiempo hasta la segunda evaluación, nuevamente hubo pérdida de explantes por problemas de oxidación y contaminación, lo cual se vio reflejado directamente en algunos tratamientos, como el tratamiento T3 y T18, disminuyendo su porcentaje promedio de formación de callo. El tratamiento control fue el ensayo que más pérdida de explantes tuvo, con una muerte total de los explantes, resultando en un 0% de porcentaje promedio de formación de callo al cabo de 60 días (Figura 12).

Análisis inferencial

Para identificar si existe diferencia significativa entre los tratamientos de fitorreguladores propuestos, se aplicó inicialmente un análisis de varianza (ANOVA). Como se observa en la Tabla 12 se obtuvo un valor p de 0,0001 ($p=0,01\%$), valor que es menor que el nivel de confianza (5%) de la prueba, rechazando de este modo la hipótesis de igual de los tratamientos con respecto a la formación de callo.

Tabla 12

Análisis de varianza de los tratamientos de fitorreguladores con respecto a la variable porcentaje de formación de callo.

Análisis de la varianza				
Variable	N	R²	R² Aj	CV
Formación de callo	760	0,2	0,18	115,77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	716470,39	18	39803,91	10,2	<0,0001
Tratamientos	716470,39	18	39803,91	10,2	<0,0001
Error	2890437,5	741	3900,73		
Total	3606907,89	759			

R². Coeficiente de determinación; R² Aj. Coeficiente de determinación ajustado; CV. Coeficiente de variación; F.V. Fuente de variación; SC. Suma de los cuadrados; CM. Cuadrados medios; F. Estadístico de prueba de Fisher.

Con el fin de agrupar los tratamientos en subgrupos significativamente diferentes, se utilizó la prueba de Duncan para comparaciones múltiples. Como se observa en la Tabla 13, los datos lograron agruparse hasta en ocho subgrupos significativamente diferentes (A, B, C, D, E, F, G y H), donde el tratamiento T11 y T15 se clasificaron en el mismo grupo, siendo estos los tratamientos que mayor porcentaje de formación de callo presentaron (Figura 12), cuyas combinaciones de fitorreguladores fueron 1 mg L⁻¹ de AIB con 1,5 mg L⁻¹ de BAP y 5 mg L⁻¹ de 2,4-D con 0,5 mg L⁻¹ de BAP, respectivamente.

Tabla 13

Prueba de Duncan para la comparación múltiple de los tratamientos de fitorreguladores con respecto a la variable porcentaje de formación de callo.

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 3900,7254 gl: 741				
Tratamientos	Medias	n	E.E.	
TC	0	40	9,88	A
T3	3,75	40	9,88	A
T18	12,5	40	9,88	A B
T6	21,25	40	9,88	A B C
T9	21,88	40	9,88	A B C
T5	35,63	40	9,88	B C D
T8	45	40	9,88	C D E
T14	50	40	9,88	C D E F
T1	56,25	40	9,88	D E F
T4	58,75	40	9,88	D E F
T13	65,63	40	9,88	D E F
T12	69,38	40	9,88	E F G
T16	70,63	40	9,88	E F G
T17	71,88	40	9,88	E F G
T10	72,5	40	9,88	E F G
T7	73,75	40	9,88	E F G
T2	82,5	40	9,88	F G
T11	100,63	40	9,88	G H
T15	113,13	40	9,88	H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

3.2.2 Oxidación

Se observó oxidación de los explantes de lechero blanco a lo largo de todo el periodo de evaluación de callo, que acompañado de contaminación bacteriana, resultó en la muerte de los tejidos. Por ello, se asignó niveles de oxidación de acuerdo a como se especifica en materiales y métodos (0, 1 y 2), y se evaluó cada explante a los 30 y 60 días de realizada la siembra.

Análisis exploratorio de los datos

Como se muestra en la Figura 13, la mayor cantidad de explantes oxidados se observó en el tratamiento T3, que corresponde a la combinación de 2 mg L^{-1} de ANA con $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de kinetina, con un total de 32 explantes no viables de 40. Por otro lado, la menor cantidad de explantes oxidados se observó en el tratamiento T15, cuya combinación de fitorreguladores fue de 5 mg L^{-1} de 2,4-D con $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, con un total de 28 explantes no oxidados.

En casi todos los tratamientos se logró observar oscurecimiento de los tejidos en explantes que presentaron formación de callo, siendo el tratamiento T4 ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA y 1 mg L^{-1} de kinetina) el que más destacó en este punto, con un total de 12 explantes.

Una segunda evaluación se realizó a los 60 días de realizada la siembra de los explantes de lechero blanco, cuyos datos se pueden observar en la Figura 14. Hubo un incremento general de oxidación de los explantes de los tratamientos, donde el tratamiento T3 fue el que mayor cantidad de explantes no viables presentó, con un total de 37 de 40, siendo el tratamiento con fitorreguladores que mayor cantidad de explantes oxidados obtuvo.

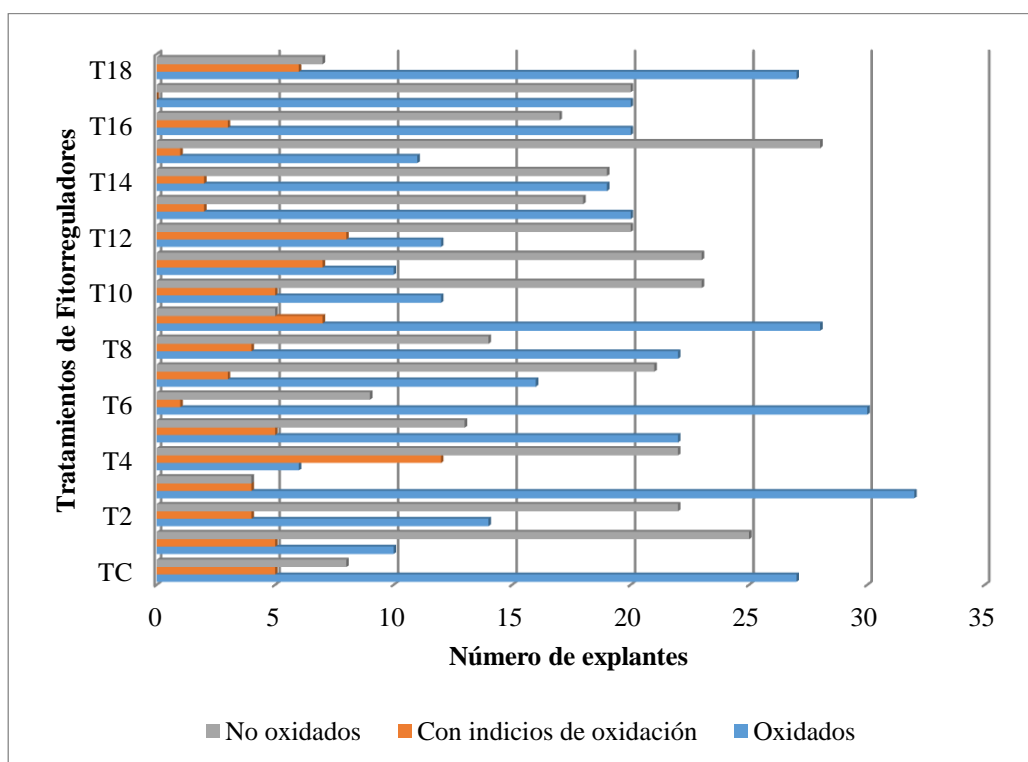


Figura 13. Número de explantes de lechero por categoría de oxidación para cada tratamiento de fitorreguladores a 30 días de realizada la siembra.

El tratamiento T15 (5 mg L^{-1} de 2,4-D y $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP) se mantuvo casi constante con respecto al índice de oxidación, con un total de 27 explantes no oxidados, siendo el tratamiento que mejores resultados obtuvo en esta categoría.

Del mismo modo, aumentó el número de callos que presentaron oscurecimiento de los tejidos, donde el tratamiento T1 ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de 2,4-D y $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de kinetina) fue el que mayor cantidad de callos con indicios de oxidación presentó, con un total de 17 explantes.

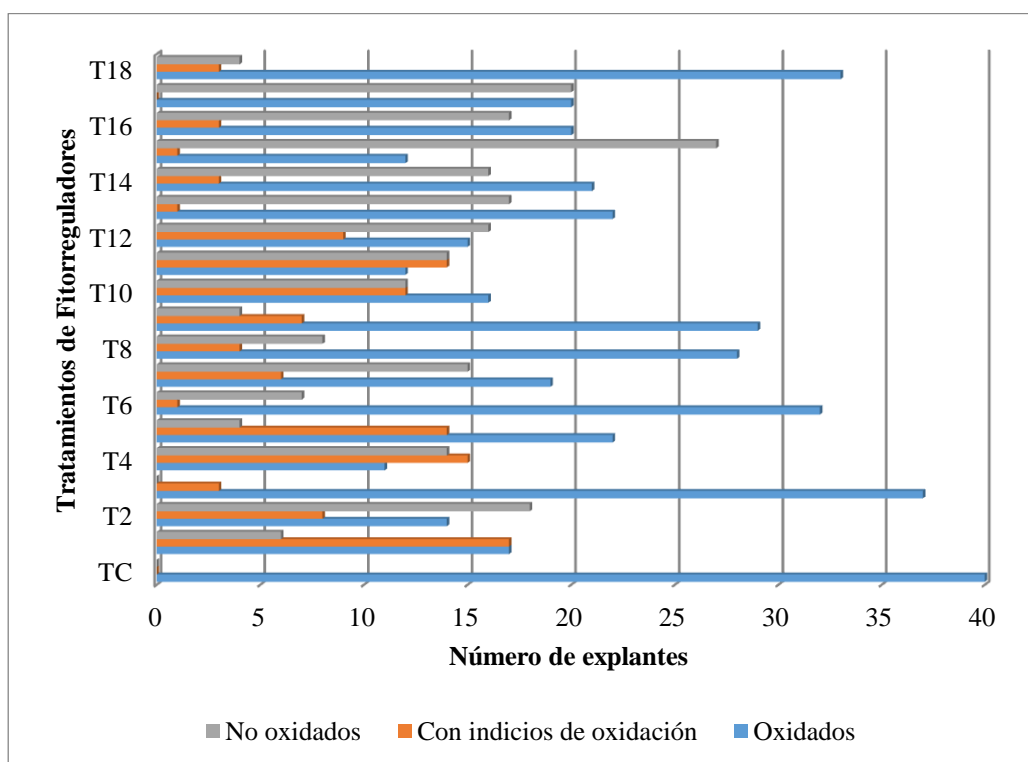


Figura 14. Número de explantes de lechero por categoría de oxidación para cada tratamiento de fitorreguladores a 60 días de realizada la siembra.

En el tratamiento control, carente de fitorreguladores, también se observó un aumento en el índice de oxidación, resultando en una muerte de la totalidad de los explantes.

Análisis inferencial

Se realizó una prueba de chi-cuadrado con el fin de analizar la dependencia de los tratamientos de fitorreguladores con respecto a la variable oxidación. Como se observa en la Tabla 14, se obtuvo un valor p de 0,0001 ($p=0,01\%$), menor que el valor de significancia nominal de la prueba (5%), indicando efectivamente, que existe dependencia entre los tratamientos de fitorreguladores usados con respecto a la variable oxidación, descartando la hipótesis de igualdad de los mismos.

Tabla 14

Prueba chi-cuadrado para la variable oxidación de explantes, con respecto a los diferentes tratamientos de desinfección.

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	235,24	36	<0,0001
Chi Cuadrado MV-G2	261,12	36	<0,0001
Coef.Conting.Cramer	0,32		
Coef.Conting.Pearson	0,49		

Debido a que la variable oxidación es de naturaleza cualitativa ordinal, fue necesario comprobar si existe normalidad del conjunto de datos evaluados, por lo que se realizó una prueba de Shapiro-Wilks. Como se puede observar en la Tabla 15, se obtuvo un valor p de 0,0001 ($p=0,01\%$), menor que el nivel de confianza de la prueba (5%), rechazando la hipótesis de una distribución normal de los datos.

Tabla 15

Prueba de Shapiro-Wilks para determinar la normalidad de los datos provenientes de la variable oxidación.

Shapiro-Wilks (modificado)					
Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Oxidación	760	1,26	0,88	0,7	<0,0001

Gracias a la prueba de Shapiro-Wilks se dedujo que los datos no siguen una distribución normal, por lo que se implementó una prueba de Kruskal Wallis para el análisis de varianzas no paramétrico de los datos con un nivel de confianza del 5%. Como se observa en la Tabla 16, se obtuvo un valor p de 0,0001 ($p=0,01\%$), por lo que se rechazó la hipótesis de igualdad de los tratamientos de fitorreguladores, categorizándolos en ocho subgrupos significativamente diferentes (A, B, C, D, E, F, G, H).

Se agrupó a los tratamientos T15, T4, T2, T11, T12, T17, T10 en el subgrupo A, siendo tratamientos que presentaron bajos índices de oxidación, mientras que los tratamientos T9, T6, T18, T3, TC se colocaron en el subgrupo H, los cuales presentaron el mayor índice de explantes oxidados. A pesar de la agrupación obtenida, es necesario un mayor análisis de esta variable, debido a los tres niveles de oxidación usados para su clasificación.

Tabla 16

Prueba de Kruskal Wallis para la variable oxidación de los explantes para los diferentes tratamientos de fitoreguladores.

Prueba de Kruskal Wallis							
Tratamientos	N	Medias	D.E.	Medianas	C	H	p
T1	40	1,28	0,72	1	0,8	109,02	<0,0001
T10	40	1,1	0,84	1			
T11	40	0,95	0,81	1			
T12	40	0,98	0,89	1			
T13	40	1,13	0,99	2			
T14	40	1,13	0,97	2			
T15	40	0,63	0,93	0			
T16	40	1,08	0,97	1,5			
T17	40	1	1,01	1			
T18	40	1,73	0,64	2			
T2	40	0,9	0,9	1			
T3	40	1,93	0,27	2			
T4	40	0,93	0,8	1			
T5	40	1,45	0,68	2			
T6	40	1,63	0,77	2			
T7	40	1,1	0,93	1			
T8	40	1,5	0,82	2			
T9	40	1,63	0,67	2			
TC	40	2	0	2			
Trat.	Medianas	Ranks					
T15	0	246,4	A				
T4	1	294,89	A	B			
T2	1	298,18	A	B			
T11	1	301,65	A	B			
T12	1	313,44	A	B			
T17	1	330,25	A	B	C		
T10	1	337,2	A	B	C		
T16	1,5	343		B	C	D	
T7	1	344,74		B	C	D	

CONTINÚA ⇨

T14	2	354,01	B	C	D			
T13	2	356,53	B	C	D			
T1	1	369,46	B	C	D	E		
T5	2	411,78		C	D	E	F	
T8	2	435,35			D	E	F	G
T9	2	459,11				E	F	G
T6	2	466,65					F	G
T18	2	486,16					F	G
T3	2	530,21						G
TC	2	550,5						H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.3 Selección y propagación de líneas celulares obtenidas a partir del callo formado de los segmentos de tallo de lechero blanco

A partir de los callos obtenidos mediante las concentraciones de fitorreguladores, se seleccionaron diferentes líneas celulares determinando características representativas que las diferencien entre sí. Para ello, se observó cuidadosamente los callos con ayuda de un estereomicroscopio, con el fin de obtener todas las variaciones y características a tomar en cuenta para su clasificación.

En base a la observación realizada se logró diferenciar 7 coloraciones distintas, distribuidas a lo largo de todos los tratamientos. A su vez, algunos callos presentaron hasta dos coloraciones dentro de sus tejidos, así como la presencia de exudados. Todos los callos fueron de naturaleza no friable. También se tomó en cuenta la morfología celular, observando en cada línea la presencia de células alargadas, redondeadas y/u ovaladas (Figura 15).

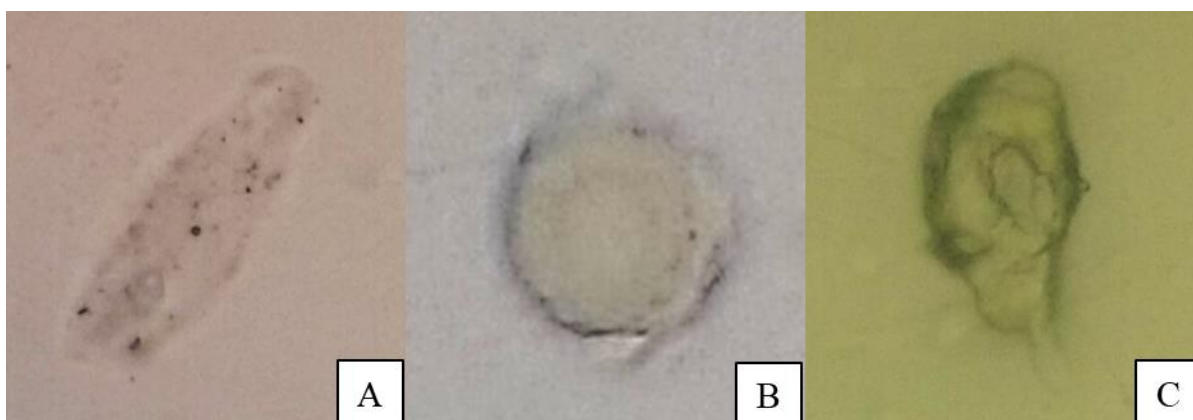


Figura 15. Morfología celular de las líneas celulares obtenidas a partir de los callos de lechero blanco. A) Célula alargada. B) Célula redondeada. C) Célula ovalada.

Para una mejor organización en la exposición de datos, se decidió describir las líneas celulares más representativas de cada tratamiento de fitorreguladores usado para la formación de callo, asignando un código a cada una de ellas.

Tratamiento T1

Se obtuvo principalmente una línea celular compuesta por un callo de coloración oliva oscuro, con indicios de oxidación en los tejidos y células de forma alargada, a la que se asignó el código ELT1.1. Se encontró una segunda línea celular representativa en este tratamiento, con dos coloraciones, oliva oscuro en la parte superior y café oscuro en la base, igualmente con células de forma alargada, asignada con el código ELT1.2. Las líneas celulares descritas se pueden observar en la Figura 16.

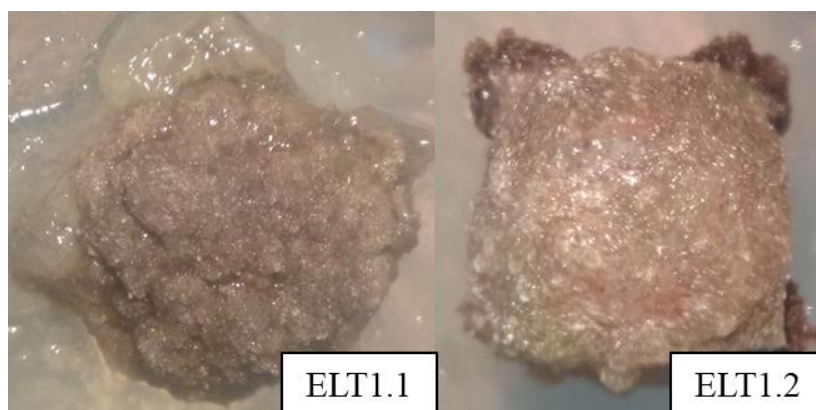


Figura 16. Líneas celulares del tratamiento T1.

Tratamiento T2

Se diferenció dos líneas celulares principalmente. La primera presentó una coloración café oscuro, de crecimiento irregular, con células de forma ovalada y redondeadas, a la que se le asignó el código: ELT2.1. La segunda línea también presentó un color café oscuro, pero con la diferencia de que produjo un exudado en una zona en concreto, asemejándose a una extensión del propio callo y de una tonalidad anaranjada. Esta línea también presentó células de forma ovalada y redondeada, a la que se le asignó el código ELT2.2. En la Figura 17 se observan las líneas celulares descritas.

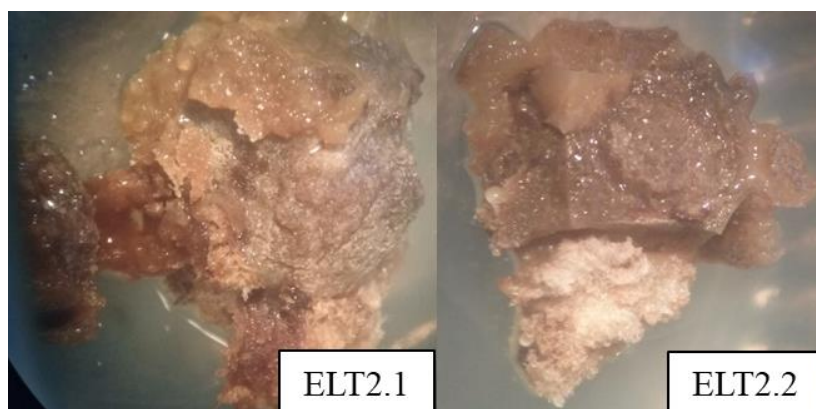


Figura 17. Líneas celulares del tratamiento T2.

Tratamiento T3

No hubo formación de callo de los explantes de este tratamiento.

Tratamiento T4

Se halló la prevalencia de una línea celular de coloración café oscuro, de crecimiento más regular que la línea ELT2.1, donde sus células presentaron una forma ovalada y redondeada, a la que se le asignó el código: ELT4.1. También se logró identificar una segunda línea celular con las características y prevalencia ya descritas para ELT1.1, razón por la que no se asignó un código propio. La línea ELT4.1 se puede observar en la Figura 18.



Figura 18. Línea celular del tratamiento T4.

Tratamiento T5

Hubo la prevalencia de una línea celular de coloración café oscuro, donde el callo creció a modo de pequeñas protuberancias, y presentó solamente células de forma redondeada, a la cual se le asignó el código: ELT5.1. Una segunda línea logró ser identificada, pero presentó las mismas

características de la línea ELT1.1, por lo que no se asignó un código. La línea ELT5.1, se puede observar en la Figura 19.



Figura 19. Línea celular del tratamiento T5.

Tratamiento T6

A pesar del bajo porcentaje de formación de callo que se encontró en este tratamiento, se logró identificar una línea celular de una coloración café oscuro, con la particularidad de presentar la producción de exudado a lo largo de todo el callo. Las células vistas en esta línea celular presentaron una forma redondeada. Se le asignó el código ELT6.1, y se la puede observar en la Figura 20.

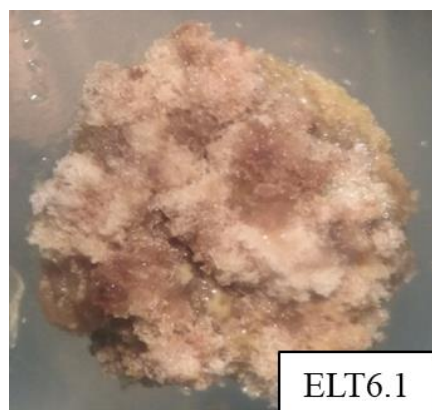


Figura 20. Línea celular del tratamiento T6.

Tratamiento T7

En este tratamiento se logró identificar una línea celular prevalente, con un callo de color verde y forma granulada, de crecimiento regular alrededor del explante y con células de forma redondeada, a la que se le asignó el código: ELT7.1. Se halló una segunda línea con las características de ELT1.1, por lo que no se asignó un código propio. La línea ELT7.1 se puede observar en la Figura 21.



Figura 21. Línea celular del tratamiento T7.

Tratamiento T8

Se observó la predominancia de una línea celular conformada por callos de dos coloraciones, verde y café oscuro, cuyo crecimiento fue regular alrededor del explante. Las células observadas en esta línea fueron de forma redondeada. A la línea descrita se le asignó el código: ELT8.1, y se la muestra en la Figura 22. También se logró observar la formación de callo de color cian claro en dos explantes, pero por ser tan pocos no se los consideró una línea celular representativa del tratamiento.

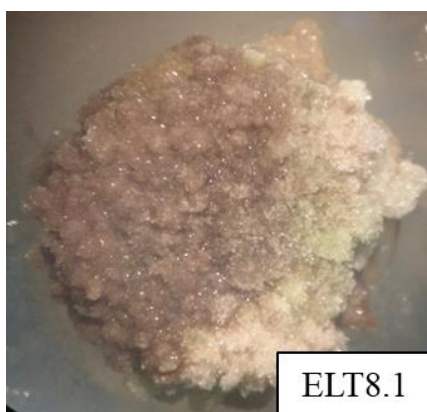


Figura 22. Línea celular del tratamiento T8.

Tratamiento T9

A pesar de no tener una gran prevalencia, se logró observar una línea celular caracterizada por presentar un callo granuloso de color cian claro en la parte superior y un callo de color café oscuro en la base. Las células observadas para esta línea tuvieron una forma ovalada, y se le asignó el código: ELT9.1. En la Figura 23 se puede observar la línea descrita.



Figura 23. Línea celular del tratamiento T9.

Tratamiento T10

Existió la prevalencia de una línea celular de color café oscuro, similar a la línea ELT5.1, con la diferencia de que esta línea presentó células de forma redondeada y ovalada, por lo que se le asignó el código: ELT10.1. Una segunda línea celular fue identificada en este tratamiento, con las características ya descritas en ELT7.1, por lo que no se le asignó un nuevo código. La línea ELT10.1 se puede observar en la Figura 24.

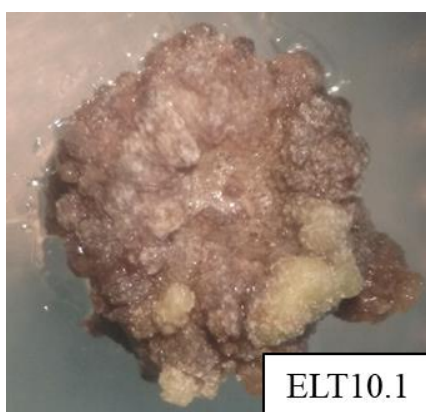


Figura 24. Línea celular del tratamiento T10.

Tratamiento T11

Se observó la prevalencia de una línea celular con un callo de color café oscuro, de crecimiento irregular y a modo de protuberancias, con células de forma redondeada. A esta línea celular se le asignó el código: ELT11.1. En este tratamiento también se logró observar callos de coloración cian claro y crecimiento granulado, con la diferencia de presentar un exudado de color blanco a lo largo de todo el callo. Las células de esta línea también tuvieron forma redondeada y se le asignó el código: ELT11.2. Ambas líneas celulares se las puede observar en la Figura 25.



Figura 25. Líneas celulares del tratamiento T11.

Tratamiento T12

En este tratamiento hubo la prevalencia de un callo café oscuro y de crecimiento a modo de protuberancias, de similares características que la línea ELT5.1, razón por la que no se le asignó un código. Una segunda línea celular se logró identificar, similar a EL8.1, con la diferencia que se observó células de forma redondeada y ovalada. Se asignó el código: ELT12.1 a esta línea celular. Una última línea se observó en este tratamiento, con una coloración cian claro de crecimiento granulado bastante regular alrededor del explante, pero sin la producción de exudado. También se observó células de forma redondeada, y se asignó a esta línea celular el código: ELT12.2. Las dos líneas celulares descritas se muestran en la Figura 26

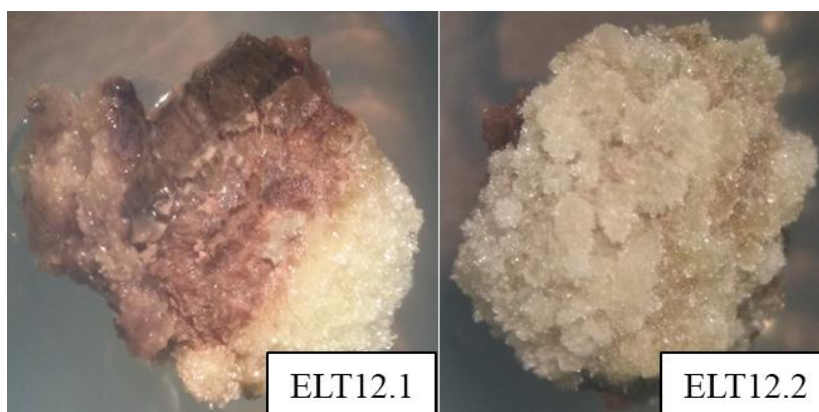


Figura 26. Líneas celulares del tratamiento T12.

Tratamiento T13

Se identificó una línea celular con un callo de color beige de crecimiento granulado y uniforme alrededor del explante, con la producción de exudado blanco a lo largo de todo el tejido vegetal, con células de forma ovalada. A esta línea celular se le asignó el código: ELT13.1. Otra línea fue identificada, con un callo de crecimiento a modo de protuberancia y con dos coloraciones, café pardo y beige, presentando también células de forma ovalada. Esta línea fue nombrada con el código: ELT13.2. Ambas líneas celulares se pueden observar en la Figura 27.



Figura 27. Líneas celulares del tratamiento T13.

Tratamiento T14

Se encontró una línea celular con características similares a ELT4.1, con la diferencia de que solo se observó células de forma ovalada, razón por la cual se le asignó el código: ELT14.1. Una segunda línea celular fue identificada, con un callo de coloración café pardo, de crecimiento poco granulado y regular alrededor del explante, además de la presencia de exudado blanco. Sus células tuvieron una forma redondeada y se le asignó el código: ELT14.2. Se logró identificar dos callos que presentaron características peculiares, de coloración café oscuro y una forma bastante compacta, sin embargo, por su disminuido número no se los consideró una línea celular más. Las dos líneas descritas en este tratamiento se muestran en la Figura 28.

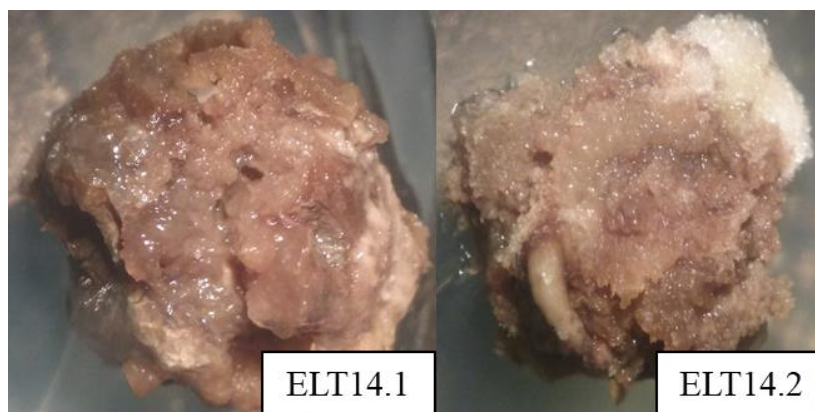


Figura 28. Líneas celulares del tratamiento T14.

Tratamiento T15

En este tratamiento también se obtuvo una línea celular de callos de coloración café pardo, pero con la particularidad de tener un crecimiento irregular y bastante expandido, siendo la línea celular que más callo produjo a partir de cada explante. Las células observadas en esta línea tuvieron una forma redondeada y se les asignó el código: ELT15.1.

Al igual que en el tratamiento T14, también se identificaron callos de una coloración café oscuro, con una forma bastante compacta, y con células de forma redondeada, pero en este tratamiento tuvieron una mayor prevalencia, por lo cual se le consideró como una línea celular representativa y fue nombrada con el código: ELT15.2. Una última línea celular se logró identificar, con callos de color café oscuro y presencia de exudado blanco en zonas específicas, con células de forma ovalada y redondeada, a la que se le asignó el código: ELT15.3. Todas las líneas celulares descritas se pueden observar en la Figura 29.

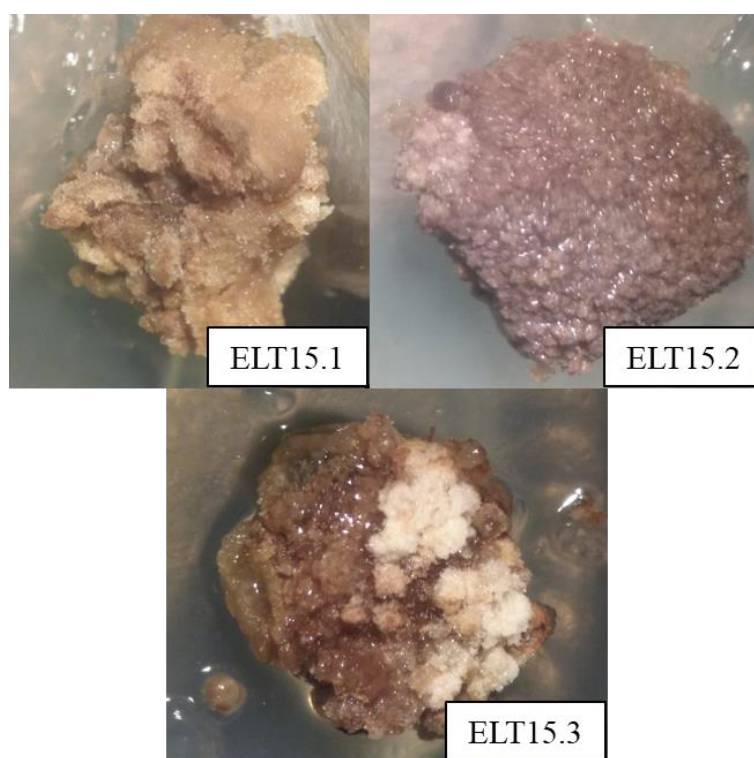


Figura 29. Líneas celulares del tratamiento T15.

Tratamiento T16

En este caso se identificó una nueva línea celular predominante, conformada por callos de un color crema y a veces con tonalidades café pardo en la base, de crecimiento granulado y disperso, irregular pero alrededor del explante y con la presencia de exudado blanco a lo largo de

todo el callo. También se observó la presencia de células redondeadas. A esta línea se asignó el código: ELT16.1, y se muestra en la Figura 30.



Figura 30. Línea celular del tratamiento T16.

Tratamiento T17

En este tratamiento también se observó una línea celular prevalente, compuesta por callos de coloración café oscuro y bastantes compactos, similar a la descrita en el tratamiento T15 (ELT15.2), motivo por el que no se asignó un código propio. También se encontró la presencia de callos de coloración café pardo acompañados de la producción de exudado blanco en su superficie, de características ya mencionadas en la línea ELT16.1, razón por la no se asignó un nuevo código a esta línea.

Tratamiento T18

Similar a lo ocurrido en el tratamiento T3, los explantes no formaron callo.

CAPÍTULO 4 DISCUSIÓN

Debido a la poca información científica que se encuentra disponible sobre el lechero blanco (*Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam.), fue necesario basarse en estudios de plantas pertenecientes al mismo género o familia, que como se conoce suelen producir metabolitos secundarios similares entre sí (Álvarez & Toso, 2018), además del conocimiento tradicional que la gente le suele dar a esta planta en el campo, para dar importancia y justificación a su estudio.

A lo largo de la etapa de recolección de muestras del lechero blanco, se ha observado el desconocimiento o poco interés que las personas le dan a esta planta, cuya reproducción está principalmente ligada al uso de sus troncos en cercas que delimitan los terrenos de cultivo, siendo prácticamente inexistente su multiplicación consciente en estas zonas.

Debido a lo explicado, se pretende motivar a las personas a considerar al lechero blanco como un candidato viable de estudio, lo que fomentaría también el interés de plantas del mismo género y familia, promoviendo su conservación.

4.1 Efecto del hipoclorito de sodio en la desinfección de segmentos de tallo de lechero blanco

Uno de los principales problemas cuando se trabaja con explantes a nivel *in vitro*, es la aparición de contaminantes, principalmente de origen bacteriano o fúngico, que compiten activamente por el sustrato (medio de cultivo) con un ritmo de desarrollo y multiplicación acelerado si se comparan con los tejidos vegetales, además de producir desechos metabólicos que pueden resultar tóxicos, provocando la muerte de los explantes (Hernández & González, 2010).

Dentro de las principales fuentes de contaminación se encuentra a la planta madre, de la cual se obtienen las muestras vegetales para el trabajo en el laboratorio, ya que en condiciones naturales está expuesta a múltiples agentes infecciosos, que pueden ser transportados al cultivo *in vitro*. Existen diferentes formas de controlar y prevenir la contaminación, como la recolección y transporte de plantas donadoras enteras para su aislamiento y control fitosanitario (Hine & Abdelnour, 2013), método que no pudo ser aplicado debido a la gran cantidad de material vegetal que se requería para los experimentos.

Por esta razón, se limitó a buscar plantas con una apariencia sana y sin la presencia de machas o indicios de daño físico, las que se recolectaron en periodos secos, donde los porcentajes de humedad relativa ambientales disminuyen, dificultando el crecimiento de bacterias y hongos asociados a tejidos vegetales (Pérez et al., 2015).

Debido a la falta de un tratamiento fitosanitario, fue necesario poner especial cuidado a la hora de establecer un método de desinfección, con el fin de contrarrestar los posibles contaminantes ambientales presentes en el material vegetal sin dañar los tejidos del explante.

Como protocolo general, se realizó un lavado previo de los tallos de lechero blanco durante una hora para remover los contaminantes visibles, seguido de 15 minutos de lavado en detergente al 5%, lo que disminuye la tensión superficial del agua y favorece su penetración en los intersticios de los tallos (Tomaszewska, Figas, Keutgen, & Keutgen, 2015).

En pruebas preliminares al protocolo establecido en esta investigación, se observó una marcada contaminación por hongo filamentoso, problema que no se encontró en estudios previos realizados en plantas pertenecientes al mismo género, *Euphorbia* (Perveen et al., 2013; Uchida et al., 2004; Yang et al., 2009). Por este motivo, fue necesario el uso de un fungicida comercial

(Marca: Phytol) a una concentración de 5 mL L⁻¹ con un tiempo de inmersión de 15 minutos, eliminando casi por completo la contaminación fúngica.

El hipoclorito de sodio es uno de los agentes desinfectantes más utilizados en el cultivo de tejidos vegetales gracias a su efectividad a diferentes concentraciones y tiempos de inmersión en dependencia de la planta y el tipo de explante, además de su fácil adquisición y uso (Borges, Estrada, Pérez, & Meneses, 2009). En las investigaciones de Uchida et al. (2004) y Yang et al. (2009), el principal desinfectante usado fue hipoclorito de sodio, con concentraciones de 3% y 2% v/v, y tiempos de inmersión de 10 minutos y 20 minutos, respectivamente. Sin embargo, al no existir estudios previos realizados sobre la planta de lechero blanco, fue necesario realizar diferentes tratamientos en base a variadas concentraciones y tiempos de inmersión (Tabla 2), que como ya se explicó, su efectividad depende de la planta estudiada y del segmento escogido.

Se obtuvo un tratamiento visiblemente más efectivo en cuanto a desinfección de los explantes, conformado por una concentración de hipoclorito de sodio al 5% v/v y 25 minutos de tiempo de inmersión, con un 65% de explantes no contaminados. Sin embargo, estadísticamente este tratamiento no fue diferente del que tuvo una concentración del 5% v/v de hipoclorito de sodio con un tiempo de inmersión de 15 minutos, presentando un 45% de explantes no contaminados en este caso.

Estos resultados no coinciden con las concentraciones y tiempos de inmersión usados en otras plantas del género *Euphorbia* (Uchida et al., 2004; Yang et al., 2009), lo que hace hincapié en la necesidad de probar variados protocolos de desinfección cuando se introduce una planta de diferente especie al sistema *in vitro* (Borges et al., 2009).

No está de más destacar que en los dos tratamientos mencionados se usó la misma concentración de hipoclorito de sodio, que como se puede observar en la Figura 5, mostró una menor contaminación con respecto a las otras concentraciones usadas, lo que no se pudo observar cuando se comparó únicamente los tiempos de inmersión (Figura 4).

La oxidación, al igual que la contaminación, es uno de los problemas más recurrentes en el cultivo de tejidos vegetales a nivel *in vitro*, causada principalmente por la producción de compuestos fenólicos, que se generan cuando los explantes sufren lesiones en los procesos de desinfección y corte (Azofeifa, 2009). Dentro de los resultados se pudo observar una tendencia en la oxidación de los explantes, donde los tratamientos en los que se usó las concentraciones más bajas de hipoclorito de sodio (1,5 y 3% v/v) presentaron los mayores porcentajes de oxidación de explantes, mientras que el uso de hipoclorito de sodio al 5% v/v presentó un menor índice de oxidación (Figura 6). Estos resultados difieren de los observados por Pequeño et al. (2015) en *Jatropha curcas* L., planta perteneciente a la familia Euphorbiaceae, donde se encontró que existe una clara dependencia del porcentaje de hipoclorito de sodio usado con respecto al nivel de oxidación, explicando que, una mayor concentración al momento de realizar la desinfección promueve la producción de compuestos fenólicos por parte de la enzima polifenol oxidasa, resultando en oxidación de los explantes.

Los tratamientos que presentaron una mayor oxidación de los explantes también presentaron casi un 100% de contaminación bacteriana (T2, T4, T5), que como ya se explicó, compite por los nutrientes del medio de cultivo además de producir posibles metabolitos de desecho que resultan tóxicos para los explantes (Hernández & González, 2010), razón por la que se puede atribuir su oxidación al crecimiento masivo de estos microorganismos.

Al analizar en conjunto los resultados obtenidos para contaminación y oxidación, se determinó que el tratamiento conformado por hipoclorito de sodio al 5% v/v con 25 minutos de inmersión fue el mejor para la desinfección de explantes de lechero blanco.

4.2 Efecto de diferentes concentraciones de fitorreguladores en la inducción a callo a partir de los segmentos de tallo de lechero blanco y selección de líneas celulares de interés

Una vez terminada la etapa de desinfección e introducción de los explantes, se continuó con la fase de inducción a callo mediante el uso de variados fitorreguladores, de los cuales se seleccionaron las líneas celulares existentes.

La elección del explante a usar es una parte importante del proceso de introducción y formación de callo, donde cualquier estructura viva de una planta tiene el potencial de someterse a técnicas de cultivo *in vitro* (Iracheta et al., 2016). En la investigación realizada por Uchida et al. (2010) se indujo la formación de callo a partir de explantes de entrenudos de tallo de la especie *Euphorbia tirucalli* L., planta de características similares a *Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam., lo que confirma que es posible usar esta parte de la planta para inducir la dediferenciación celular. Otra razón por la que esta estructura fue escogida se debe a que al haber muestreado plantas silvestres, estas quedan expuestas a todo tipo de contaminantes que se encuentran en el ambiente, donde únicamente el tallo puede someterse a cortes de tal modo que solo el tejido interno esté en contacto con el medio de cultivo semisólido, proceso que no se puede lograr con hojas u otras partes de la planta.

Otro factor a tomar en cuenta cuando se escoge un explante para la formación de callo, es el uso de plantas en estadíos tempranos de desarrollo o de tejido joven proveniente de partes maduras de la planta, por no encontrarse altamente diferenciados (Ikeuchi, Sugimoto, & Iwase,

2013). Por ello, los explantes de tallo usados fueron extraídos de las zonas más terminales de las ramas muestreadas, de entrenudos cercanos al meristemo apical.

Sin embargo, el factor más importante cuando se busca la inducción a callo a nivel *in vitro*, es el balance de las concentraciones de los fitorreguladores que se incorporan al medio de cultivo. De manera general, es necesario un rango intermedio de auxinas y citoquininas para este fin, ya que al tener una concentración mayor de auxinas puede generar raíces y una mayor concentración de citoquininas puede generar brotes (Ikeuchi et al., 2013).

Como no existen datos relacionados con la inducción de callo de *Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam., fue necesario buscar información relacionada sobre plantas taxonómicamente cercanas. Uchida et al. (2010) obtuvo la formación de callo a partir de entrenudos de *Euphorbia tirucalli* L. incorporando al medio de cultivo 2 mg L⁻¹ de ANA, 1 mg L⁻¹ 2,4-D y 0,22 mg L⁻¹ de BAP. Iracheta et al. (2016) obtuvo callo en explantes de hoja y peciolo de *Jatropha curcas* L. con una combinación de 1 mg L⁻¹ de AIB y 1,5 mg L⁻¹ de BAP, mientras que Preciado et al. (2016) consiguió callos en hojas de *Jatropha cuneata* Wigg al usar 1 mg L⁻¹ de ANA y 1 mg L⁻¹ de KIN, ambas plantas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae.

En base a estos estudios se generaron los 18 tratamientos de fitorreguladores presentados en esta investigación (Tabla 3), variando las concentraciones especificadas en cada uno de ellos para obtener un amplio rango de posibilidades a la hora de analizar los resultados. Mediante las pruebas estadísticas y el análisis exploratorio de datos realizado, se obtuvo dos tratamientos que resaltaron, teniendo que las combinaciones de fitorreguladores de 5 mg L⁻¹ de 2,4-D con 0,5 mg L⁻¹ de BAP (tratamiento T15) y 1 mg L⁻¹ AIB con 1,5 mg L⁻¹ de BAP (tratamiento T11), fueron los tratamientos con mayor porcentaje promedio de formación de callo, con 113,125% y

100,625% respectivamente. La combinación y concentraciones de los fitorreguladores usados en el tratamiento T11 coinciden con los resultados obtenidos por Iracheta et al. (2016). Sin embargo, el tratamiento T15 no coincide con los resultados de las investigaciones expuestas, tratamiento donde se usó la mayor concentración de 2,4-D (5 mg L^{-1}) junto a la citoquinina BAP ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$).

El 2,4-D es un análogo sintético de auxina, que es frecuentemente usado en cultivo *in vitro* para la inducción de explantes a callo, incluso como único fitorregulador incorporado al medio (Tu, 2001). Distintos autores han obtenido tejido indiferenciado a variadas concentraciones de 2,4-D, donde muchas veces el porcentaje de obtención de callo aumenta conforme se usa una mayor concentración de este fitorregulador (Espinosa et al., 2012), llegando a obtener resultados favorables a concentraciones de hasta 20 mg L^{-1} (García, Pérez, Torres, & Padrón, 2006; Pérez et al., 2004).

Esta información, junto a los resultados obtenidos, sugiere que mayores concentraciones de 2,4-D pueden estimular de mejor manera la indiferenciación de los tejidos en *Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam., quedando a consideración qué efecto tendría este fitorregulador como único componente hormonal del medio de cultivo, ya que a pesar de que el tratamiento T18 también contó con una concentración de 5 mg L^{-1} , se obtuvo resultados contrarios a los vistos en T15, teniendo como única diferencia el uso de una mayor concentración de BAP (1 mg L^{-1}).

A diferencia de lo esperado, también se observó formación de callo en 10 explantes pertenecientes al tratamiento control (TC), carente de fitorreguladores, que presentó un bajo porcentaje promedio de formación de callo (13,75%) en comparación al resto de tratamientos a los 30 días de realizada la siembra. Muchas plantas tienen como mecanismo de defensa el formar callo en tejidos que han sufrido algún tipo de lesión o herida, especialmente en células vasculares,

corticales y medulares (Ikeuchi et al., 2013), lo que explicaría la formación de callo justamente sobre el tejido vascular del tallo, aun en ausencia de fitorreguladores en el tratamiento control.

A lo largo de todo el proceso de formación de callo se descartaron varios explantes en todos los tratamientos, sea en mayor o menor grado, debido a problemas de contaminación bacteriana y oxidación, con la particularidad de que este problema aparecía después de más de tres semanas de haber sembrado los explantes en el medio de cultivo semisólido. Alvarado, Portal, García, Ramírez, & Martínez (2003) explica que este tipo de incidentes pueden darse por bacterias que permanecen latentes en los espacios intercelulares de los explantes, donde un cambio mínimo en las condiciones medioambientales *in vitro* (pH, temperatura, composición del medio de cultivo) puede provocar su reactivación. Algún tipo de estrés adicional en el material vegetal también puede ocasionar la activación de estas bacterias (Portal, Caraballoso, Alvarado, & Leiva, 2003), lo que pudo ocurrir cuando se efectuó un cambio de medio de cultivo en los tratamientos.

A su vez, la oxidación generó pérdida de explantes en los tratamientos de fitorreguladores, que también fue un factor recurrente a lo largo de todo el periodo de evaluación (Figura 13Figura 14). Esto probablemente fue causado por la liberación de exudado por parte de los explantes, los que se componen de metabolitos secundarios producidos en respuesta a estrés biótico y abiótico (Azofeifa, 2009), siendo en este caso, los cortes realizados antes de su introducción al medio de cultivo. Los exudados no tienen que ser necesariamente tóxicos, pero conociendo las propiedades citotóxicas que presenta el látex de *Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam. (Miranda, 2015), es una causa bastante probable para la oxidación vista en esta investigación.

La oxidación provocada por exudados suele ser un problema que puede extenderse hasta varias semanas de realizada la siembra, generando pérdidas de explantes en el proceso de establecimiento *in vitro*. Sin embargo este problema suele cesar una vez que el explante comienza su crecimiento (Azofeifa, 2009), lo que explicaría por qué se encontró indicios de oxidación cuando los callos se ya se habían establecido al cabo de 60 días de iniciado el ensayo (Figura 14), explicando el color oscuro de varias de las líneas celulares que se obtuvieron a partir de ellos.

A pesar de que los tratamientos T15 y T11 presentaron el mayor porcentaje promedio de formación de callo, el resto de tratamientos también formaron el suficiente material calloso para establecer y diferenciar líneas celulares a partir de ellos, exceptuando los tratamientos T3 y T18. Se observó las características más representativas de cada línea celular y se las comparó con los resultados de diferentes autores para consolidar una idea más clara sobre la posible aplicación que pueden tener las líneas obtenidas.

Los tipos de callos pertenecientes a las líneas ELT1.1 y ELT1.2 estuvieron presentes en varios de los tratamientos de fitorreguladores usados, encontrándose en mayor número en el tratamiento T1, seguido de los tratamientos T4, T5 y T7. Estos callos tuvieron la particularidad de tener un grado de oxidación mayor en comparación a otras líneas celulares descritas, reflejándose en su pronunciada coloración oscura. Es posible que esta oxidación este ligada a la formación de quinonas producidas por compuestos fenólicos catalizados por la enzima polifenol oxidasa, que se activa cuando los tejidos se someten a estrés (Naz & Khatoon, 2014), lo que causó una baja creación de nuevo tejido calloso. Otra característica de estas líneas celulares fue que se formaron por células alargadas, cualidad que pertenece a callos no embriogénicos (Vacca,

et al., 2014), que en conjunto con la oxidación descrita, no figuran como candidatos viables de futuras investigaciones.

Otros tipos de callos que se observó frecuentemente en los tratamientos de fitorreguladores fueron los pertenecientes a las líneas: ELT2.1, ELT2.2, ELT4.1, ELT6.1, ELT11.1, ELT14.1, ELT14.1, ELT15.1, ELT15.2 y ELT15.3, los que presentaron tonalidades entre café oscuro y café pardo. Esta coloración oscura podría ser signo de oxidación, pero contrario a lo visto en las líneas ELT1.1 y ELT1.2, estos callos sí presentaron la formación continua de nuevo tejido desdiferenciado. Posiblemente, estos callos tuvieron una elevada producción de metabolitos secundarios durante su desarrollo, que al tener propiedades citotóxicas, causaron la oxidación de sus tejidos (Azofeifa, 2009; Miranda, 2015) sin comprometer en su totalidad la viabilidad de los explantes.

Las líneas celulares ELT5.1, ELT10.1 y ELT13.2 presentaron una misma morfología de callo, con un crecimiento a modo de protuberancias, donde cada línea se diferenció en cuanto a la tonalidad de café que presentó, pasando por café oscuro a un color beige, lo que podría deberse a los grados de oxidación de los callos. En la investigación de Bijekar & Gayatri (2014) se obtuvo callos de *Baliospermum montanum* Wild, planta perteneciente a la familia Euphorbiaceae, con características similares a las líneas anteriormente mencionadas, en los que se indujo una mayor producción de flavonoides mediante el uso de fenilalanina. Este grupo de compuestos son producidos por varios miembros de la familia Euphorbiaceae, y han demostrado tener actividad antiproliferativa en líneas celulares cancerígenas (Pereira et al., 2015).

En la investigación de Kumar, Vijila, & Raj (2018) se obtuvieron varios tipos de callo a partir de la planta *Euphorbia hirta* Linn, donde se puso especial atención en dos de ellos; uno de

crecimiento granular con coloración verde, y otro con el mismo tipo de crecimiento pero con dos coloraciones, verde y café oscuro; crecimiento y coloración que se logró observar en las líneas ELT7.1, ELT8.1 y ELT12.1 de esta investigación. Los autores confirman la presencia de varios compuestos triperpénicos, de los cuales se destaca el taraxerol, que ha demostrado ser un agente anti-inflamatorio en líneas celulares de macrófagos extraídos de sangre de ratón, y podría ser usado como agente preventivo en cáncer asociado a inflamaciones (Yao et al. 2013).

Las líneas celulares ELT9.1, ELT11.2 y ELT12.2 presentaron características similares, donde los callos tuvieron una coloración cian claro y un crecimiento granuloso, con pequeñas diferencias entre sí. Este tipo de características se encontraron en callos de *Euphorbia helioscopia* L. obtenidas por Yang et al. (2009), donde el autor solo realizó la desdiferenciación de explantes de esta planta sin un mayor análisis de su composición fitoquímica. Sin embargo, extractos de partes aéreas de esta planta han demostrado tener propiedades tóxicas, con un efecto inhibitorio en líneas celulares humanas de carcinoma hepatocelular, cáncer gástrico y cáncer colorectal. En estos extractos se han encontrado metabolitos secundarios como diterpenoides, triterpenoides, flavonoides, lípidos, etc. (Cheng et al., 2015), compuestos comunes presentes en el látex de plantas del género *Euphorbia* que también podrían estar representados en los callos de estas plantas.

La línea ELT13.1 presentó características similares a los callos de *Euphorbia tirucalli* L. obtenidos por Uchida et al. (2010), con una coloración beige y crecimiento granuloso. En dicha investigación, se encontró que los callos producían esteroides, encontrando principalmente isofucoesterol y estigmasterol, ambos compuestos relacionados con la prevención del cáncer (De Stefani et al., 2000; Kim, Kim, & Ahn, 2014). Además, se encontró la presencia de terpenoides,

grupo de compuestos de gran presencia en la familia Euphorbiaceae, que han demostrado tener en algunas especies propiedades antibacteriales (De Oliveira et al., 2018).

En la línea celular ELT16.1, se describieron callos con una coloración crema y de crecimiento granulado irregular, características vistas en callos de *Jatropha curcas* L. obtenidos por Ovando et al. (2016). Los autores afirman que esta planta produce diterpenos con actividad citotóxica, principalmente jatropholone y jatrophone, con uso potencial como agentes antiproliferativos y antimetastático. Sin embargo, al realizar un análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas no encontraron los compuestos de interés, explicando que, en forma de callo es posible que los compuestos no puedan ser retenidos hasta producirse una diferenciación de los tejidos, que se produzca una cantidad menor a 3 µg/mL y la prueba no pueda detectarlo, o que simplemente las células indiferenciadas perdieron la capacidad de producir los isoprenoides que la planta madre sí puede.

Toda la información analizada provee un conocimiento científico sobre los diferentes enfoques y aplicaciones que cada línea celular puede ofrecer en futuras investigaciones, destacando las propiedades citotóxicas de diversos compuestos que se han encontrado en extractos de partes aéreas y callos de plantas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae, con poder inhibitorio y preventivo en líneas celulares cancerígenas, además de presentar compuestos terpénicos que han demostrado tener propiedades antibacteriales. A futuro se realizarán análisis fitoquímicos de los extractos de cada tipo de callo obtenido para obtener una específica caracterización de las líneas celulares descritas que corrobore los compuestos que puedan resultar de interés.

CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES

Al utilizar plantas silvestres de lechero blanco, es necesario poner especial cuidado al seleccionar las más aptas para el cultivo *in vitro*, observando que sean fenotípicamente sanas y estén alejadas de posibles fuentes de contaminación, como ganado, carreteras o la misma influencia del ser humano, para que se facilite de cierta forma su introducción al sistema *in vitro*.

La desinfección de los explantes de tallo requirió de varias etapas, incluyendo lavados en agua corriente y detergente, el uso de un fungicida de amplio espectro y la aplicación de diferentes concentraciones y tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio, donde los mejores resultados se obtuvieron al usar una concentración del 5% con un tiempo de inmersión de 25 minutos, observando un 65% de explantes no contaminados y un 80% de explantes no oxidados.

Los segmentos de tallo reaccionaron favorablemente al uso de diferentes combinaciones de fitorreguladores, donde los mayores porcentajes de formación de callo se observaron en los tratamientos T15 (5 mg L⁻¹ de 2,4-D, 0,5 mg L⁻¹ de BAP) y T11 (1 mg L⁻¹ de AIB y 1,5 mg L⁻¹ de BAP) con 113,125% y 100,625%, respectivamente, al cabo de 60 días de realizada la siembra. A pesar de los resultados obtenidos, fue necesario observar cada uno de los tratamientos donde hubo formación de callo a partir de los explantes, con el objetivo de seleccionar todas las posibles líneas celulares de lechero blanco.

En base a características como coloración y morfología del callo, producción de exudados y morfología celular, se seleccionaron un total de 23 líneas celulares provenientes de los tratamientos de fitorreguladores usados, las que se compararon con callos obtenidos por diferentes autores en busca de posibles aplicaciones en base a los metabolitos secundarios que

podrían producir. Las líneas ELT5.1, ELT7.1, ELT8.1, ELT9.1, ELT10.1, ELT11.2, ELT12.1, ELT12.2, ELT13.1 y ELT13.2 presentaron similitudes con callos en los que se encontró metabolitos secundarios que han demostrado tener posibles aplicaciones en la prevención e inhibición del cáncer, además de una presencia generalizada de compuestos terpénicos con posibles propiedades antibacteriales.

Con esta investigación se logró construir nuevo conocimiento científico para el cultivo *in vitro* de lechero blanco (*Euphorbia laurifolia* Juss. ex Lam.), lo que dará una mejor proyección del posible uso que se pueden dar a las líneas celulares de esta planta, especialmente en cuanto a posibles propiedades citotóxicas y antibacteriales.

CAPÍTULO 6 RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un tratamiento fitosanitario a la planta donadora, transportándola a un sustrato estéril con continuas aplicaciones de fungicidas y bactericidas, con el objetivo de reducir la contaminación de los explantes ya que en condiciones naturales las plantas se exponen continuamente a esporas de hongos y bacterias.

Usar un corte de tallo de menor longitud cuando se realice el protocolo de desinfección, para eliminar las bacterias latentes que puedan alojarse en los espacios intercelulares de los explantes, lo que eliminaría la contaminación después de tiempos prolongados de realizada la introducción a sistema *in vitro*.

Evaluar la capacidad de producir callo en otros tipos de explantes, como la hoja, donde varios autores han tenido resultados favorables en la obtención de células indiferenciadas en hojas de varias plantas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae.

Es necesario realizar un análisis fitoquímico de las todas las líneas celulares obtenidas, lo que corroboraría los diferentes metabolitos secundarios que estas producen y confirmaría o no la existencia de propiedades citotóxicas y antibacteriales, además de otros posibles usos.

También se recomienda una caracterización fitoquímica del látex de lechero blanco, en busca de metabolitos secundarios específicos que puedan ser comparados a los obtenidos en diferentes líneas celulares formadas.

CAPÍTULO 7 BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, Y., Portal, N., García, L., Ramírez, D., & Martínez, Y. (2003). Incidencia de contaminantes microbianos en la micropropagación de la caña de azúcar. *Biotecnología Vegetal*, 3(1). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/204>
- Álvarez, H. L., & Toso, R. E. (2018). Actividad antimicrobiana, larvicida, antiviral y citotóxica de especies medicinales nativas del género *Euphorbia*, *E. collina* Phil. y *E. serpens* H.B.K. caracterización de los metabolitos bioactivos. *Ciencia Veterinaria*, 17(2). Recuperado de <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/2076>
- Avila, L., Perez, M., Sanchez-Duffhues, G., Hernández-Galán, R., Muñoz, E., Cabezas, F., ... Echeverri, F. (2010). Effects of diterpenes from latex of *Euphorbia lactea* and *Euphorbia laurifolia* on human immunodeficiency virus type 1 reactivation. *Phytochemistry*, 71(2-3), 243-248. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.10.005>
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas De Oxidación Y Oscurecimiento De Explantes Cultivados *in Vitro*. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153-175.
- Basak, S. K., Bakshi, P. K., Basu, S., & Basak, S. (2009). Keratouveitis caused by *Euphorbia* plant sap. *Indian Journal of Ophthalmology*, 57(4), 311-313. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.53060>
- Bhojwani, S. S. (2012). *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*. Elsevier.
- Bijekar, S., & Gayatri, M. (2014). *In vitro* techniques to accelerate flavonoid synthesis in some Euphorbiaceae members. *Innovation and Scientific Research*, 9(1).

- Borges, M., Estrada, E., Pérez, I., & Meneses, S. (2009). Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 127-135.
- Calvache, A. (2014). El Suelo y la Matriz Productiva Agropecuaria Esmeraldas. Presentado en XIV Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo, Universidad Técnica Equinoccial. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/325483936_EL_SUELO_Y_LA_MATRIZ_PRODUCTIVA_AGROPECUARIA_ESMERALDAS_56_y_7_de_noviembre_del_2014_PRESENTACION_Presidente_del_XIV_Congreso_de_la_SECS
- Cheng, J., Han, W., Wang, Z., Shao, Y., Wang, Y., Zhang, Y., ... Zhang, Y. (2015). Hepatocellular Carcinoma Growth Is Inhibited by *Euphorbia helioscopia* L. Extract in Nude Mice Xenografts [Research article]. <https://doi.org/10.1155/2015/601015>
- Dale, N. (1986). *Flowering plants: the Santa Monica Mountains, coastal & chaparral regions of Southern California*. Capra Press.
- De Oliveira, R., Alves, C., Pontes, M., Cavalcante, N., Da Cruz, E., De Oliveira, A. P., ... Da Silva Almeida, J. (2018). Antibacterial activity of terpenoids isolated from *Cnidocolus quercifolius* Pohl (Euphorbiaceae), a Brazilian medicinal plant from Caatinga biome. *European Journal of Integrative Medicine*, 24, 30-34. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2018.10.011>
- De Stefani, E., Boffetta, P., Ronco, A., Brennan, P., Deneo, H., Carzoglio, J., & Mendilaharsu, M. (2000). Plant Sterols and Risk of Stomach Cancer: A Case-Control Study in Uruguay. *Nutrition and Cancer*, 37(2), 140-144. https://doi.org/10.1207/S15327914NC372_4

- Días, A. (2014). *Monografía sobre los conocimientos botánicos de la familia Euphorbiaceae y la especie Croton lechleri*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D. C. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/278410748_Monografia_sobre_los_conocimientos_botanicos_de_la_familia_Euphorbiaceae_y_la_especie_Croton_lechleri
- Ernst, M., Grace, O. M., Saslis-Lagoudakis, C. H., Nilsson, N., Simonsen, H. T., & Rønsted, N. (2015). Global medicinal uses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 176, 90-101. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.10.025>
- Espinosa, A., Silva, J., Sariego, S., Cholo, L., & Delgado, H. (2012). Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en la formación de callos en *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*, 35(4), 407-416.
- Fontaine, G., Narváez, I., & Cisneros, P. (2008). *GEO Ecuador 2008. Informe sobre el estado del medio ambiente*. Recuperado de http://biblio.flacsoandes.edu.ec/shared/biblio_view.php?bibid=109620&tab=opac
- García, L. R., Pérez, J. P., Torres, D., & Padrón, Y. (2006). Influencia de reguladores del crecimiento en la formación de callos de *Phaseolus vulgaris* L cv. CIAP 7247. *Biotecnología Vegetal*, 6(2). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/406>
- George, E., Hall, M., & Klerk, G. (Eds.). (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background* (3.^a ed.). Springer Netherlands. Recuperado de [//www.springer.com/la/book/9781402050046](http://www.springer.com/la/book/9781402050046)
- González, M., Mogollón, N., Alvarado, G., Giménez, A., & Capote, T. (2012). Efecto del medio de cultivo *in vitro* y la fuente nitrogenada sobre el crecimiento del cocuy (*Agave cocui* trelease). *Bioagro*, 24, 39-44.

- Grandtner, M. M., & Chevrette, J. (2013). *Dictionary of Trees, Volume 2: South America: Nomenclature, Taxonomy and Ecology*. Academic Press.
- Hernández, E., López, M. C. G., & Estrada, A. A. (2013). Callogenesis de *Heliconia collinsiana* GRIGGS *in vitro*: establecimiento, inducción y proliferación. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(8), 1175-1186.
- Hernández, Y., & González, M. E. (2010). Efectos de la Contaminación Microbiana y Oxidación Fenólica en el Establecimiento *in vitro* de Frutales Perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 00-00.
- Hine, A., & Abdelnour, A. (2013). Establecimiento *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). *Revista Tecnología en Marcha*, 26(4), ág. 64-71.
<https://doi.org/10.18845/tm.v26i4.1584>
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*, 25(9), 3159-3173. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>
- Iracheta, L., Díaz, V. H., Basulto, J. A., González, A., Rico, H. R., & López, P. (2016). *Propagación in vitro del piñón mexicano (Jatropha Curcas L.)*. Recuperado de <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/handle/123456789/4331>
- Jijón, C. (2015). *Euphorbia laurifolia*. Recuperado 27 de diciembre de 2018, de http://plantasnativas.visitavirtualjbq.com/index.php?option=com_content&view=article&id=13:euphorbia-laurifolia&catid=14&Itemid=108
- Kim, K., Kim, M., & Ahn, D. (2014). Lipase inhibitory activity of chlorophyll a, isofucosterol and saringosterol isolated from chloroform fraction of *Sargassum thunbergii*. *Natural Product Research*, 28(16), 1310-1312. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.900769>

- Kumar, G., Vijila, M., & Raj, R. (2018). Early callus induction and batch kinetics studies for *in vitro* production of triterpenoids in suspension cultures of *Euphorbia hirta* Linn. *Drug Invention Today*, 10(3). Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/329573781_Early_callus_induction_and_batch_kinetics_studies_for_in_vitro_production_of_triterpenoids_in_suspension_cultures_of_Euphorbia_hirta_Linn
- Kumar, P. P., & Loh, C. S. (2012). 9 - Plant tissue culture for biotechnology. En A. Altman & P. M. Hasegawa (Eds.), *Plant Biotechnology and Agriculture* (pp. 131-138). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381466-1.00009-2>
- Kumar, S. (2015, octubre 20). Callus Tissue: Morphology, Internal Structure and Characteristics (With Diagram). Recuperado 26 de enero de 2019, de <http://www.biologydiscussion.com/plant-tissues/callus-tissue/callus-tissue-morphology-internal-structure-and-characteristics-with-diagram/14591>
- Linnaeus, C. (1799). *Species plantarum*. Impensis G. C. Nauk.
- Matos, A., & Sánchez, A. (2011). Evaluación de reguladores de crecimiento para la inducción de callo en Aloe vera L. *Multiciencias*, 11(1), 7-14.
- Mendoza, E. (2014). *Plantas Transgénicas: Beneficios y Riesgos*. Lulu.com.
- Ministerio de Turismo. (2014). Ecuador megadiverso y único en el centro del mundo – Ministerio de Turismo. Recuperado 26 de diciembre de 2018, de <https://www.turismo.gob.ec/ecuador-megadiverso-y-unico-en-el-centro-del-mundo/>
- Miranda, A. (2015). *Estudio Fitoquímico, y evaluación de la actividad Citotóxica y Antimicrobiana in vitro del látex de Euphorbia Laurifolia en Patógenos Dérmicos*. Recuperado de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4011>

- Naz, S., & Khatoon, K. (2014). The effect of auxins on callus induction in *Achyranthes aspera*. *Pakistan Journal of Botany*, 46(6), 2203-2207.
- Neira, L. F., Stashenko, E., & Escobar, P. (2014). Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Euphorbiaceae. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 46(1), 15-22.
- Ovando, I. (2010). Manual de Cultivo de Tejidos Vegetales para Ingenieros Biotecnólogos. Recuperado de https://www.academia.edu/14901719/cultivo_de_tejidos_vegetales
- Ovando, I., Pérez, L. P., Ruiz, S., Salvador, M., Urbina, M. E., & Adriano, L. (2016). Production of cytotoxic compounds in dedifferentiated cells of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). *PeerJ*, 4, e2616. <https://doi.org/10.7717/peerj.2616>
- Pequeño, I., Martínez, G., Aguirre, V., Iracheta, L., Mojica, V., Rodríguez, G., & Ojeda, M. (2015). Efecto del NaClO sobre la actividad de la polifenol oxidasa en explantes de hoja y peciolo de dos genotipos de *Jatropha curcas* L. *Bioagro*, 27(3), 167-172.
- Pereira, K., Motta, L., Santos, D., Salatino, M., Salatino, A., Pena, M., ... Furlan, C. (2015). Antiproliferative Activity of Flavonoids from *Croton sphaerogynus* Baill. (Euphorbiaceae) [Research article]. <https://doi.org/10.1155/2015/212809>
- Pérez, J., García, L., Gómez, R., Bermúdez, I., Padrón, Y., Torres, D., & Romero, C. (2004). Formación de callos en *Phaseolus vulgaris* L cv. Turrialba- 4 con Thidiazuron y ácido 2,4-diclorofenoxiacético. *Biotecnología Vegetal*, 4(4). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/433>
- Pérez, N., Capote, A., Pérez, A., Gómez, L., & Jiménez, E. (2015). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de brotes de *Aloe vera* L. *Biotecnología Vegetal*, 15(2). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/14>

- Perveen, S., Javed, S. B., Anis, M., & Aref, I. M. (2013). Rapid *in vitro* multiplication and ex vitro establishment of Caribbean copper plant (*Euphorbia cotinifolia* L.): an important medicinal shrub. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(12), 3391-3400. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1374-y>
- Portal, N., Carabaloso, I., Alvarado, Y., & Leiva, M. (2003). Bacterias contaminantes en la fase de establecimiento *in vitro* del guayabo. *Bioteología Vegetal*, 3(3). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/251>
- Preciado, P., Ayala, G., & Martínez, D. (2016). Enraizamiento a partir de callos de *Jatropha cuneata* (wiggins & rollins) *in vitro* / Rooting from calluses of *Jatropha cuneata* (wiggins & rollins) in-vitro. *CIBA Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 4(8), 58-72.
- Ramírez, M., Urdaneta, A., & León de Sierralta, S. (2002). Establecimiento *in vitro* de explantes adultos del guanábano (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 19, 48-55.
- Rodríguez, M., Latsague, M., Chacón, M., & Astorga, P. (2014). Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque*, 35(1), 111-118.
- Sánchez, L., & Venutolo, S. A. (2015). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). *Tecnología en Marcha*, 28(1), 105-120.
- Seifertová, D., Klíma, P., Pařezová, M., Petrášek, J., Zažímalová, E., & Opatrný, Z. (2014). Plant Cell Lines in Cell Morphogenesis Research. En V. Žárský & F. Cvrčková (Eds.), *Plant*

- Cell Morphogenesis: Methods and Protocols* (pp. 215-229). Totowa, NJ: Humana Press.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-643-6_18
- Smith, R. H. (2012). *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. Academic Press.
- Stevens, P. (2010). Euphorbiaceae. Recuperado 27 de diciembre de 2018, de <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/orders/malpighialesweb.htm#Euphorbiaceae>
- The Plant List. (2010). Euphorbiaceae. Recuperado 27 de diciembre de 2018, de <http://www.theplantlist.org/browse/A/Euphorbiaceae/>
- Tomaszewska, M., Figas, A., Keutgen, N., & Keutgen, A. J. (2015). Establishing an efficient explant superficial sterilization protocol for *in vitro* micropropagation of bear's garlic (*Allium ursinum* L.). *Herba Polonica*, 61(4), 66-77. <https://doi.org/10.1515/hepo-2015-0032>
- Trabelsi, E. B., Naija, S., Elloumi, N., Belfeleh, Z., Msellem, M., Ghezal, R., & Bouzid, S. (2011). Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive *Olea europaea* (L.) 'Chetoui'. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(2), 319-324. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0550-6>
- Tu, M. (2001). *Weed Control Methods Handbook: Tools and Techniques for Use in Natural Areas*. Wildland Invasive Species Team, the Nature Conservancy.
- Uchida, H., Nakayachi, O., Otani, M., Kajikawa, M., Kohzu, Y., Yamato, K. T., ... Ohyama, K. (2004). Plant regeneration from internode explants of *Euphorbia tirucalli*. *Plant Biotechnology*, 21(5), 397-399. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.397>

- Uchida, H., Ohyama, K., Suzuki, M., Yamashita, H., Muranaka, T., & Ohyama, K. (2010). Triterpenoid levels are reduced during *Euphorbia tirucalli* L. callus formation. *Plant Biotechnology*, 27(1), 105-109. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.27.105>
- Ulloa, C., & Moller, P. (2014). *Euphorbia* L. Recuperado 27 de diciembre de 2018, de http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=112355
- Ulrich, A. B., & Pour, P. M. (2001). Cell Lines. En S. Brenner & J. H. Miller (Eds.), *Encyclopedia of Genetics* (pp. 310-311). New York: Academic Press. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.0173>
- Vacca, M., Bonomo, M. L., Avilés, Z., & Díaz, L. (2014). Inducción de callos embriogénicos y formación de proembriones somáticos en *Pterogyne nitens* Tull “tipa colorada”. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XVI(2). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=77632757024>
- Yang, Z., Chen, G., Li, Y., & Chen, J. (2009). Characterization of callus formation in leaf of *Euphorbia helioscopia*. *African Journal of Plant Science*, 3(6), 122-126.
- Yao, X., Li, G., Bai, Q., Xu, H., & Lü, C. (2013). Taraxerol inhibits LPS-induced inflammatory responses through suppression of TAK1 and Akt activation. *International Immunopharmacology*, 15(2), 316-324. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.12.032>

ANEXOS

ANEXO A. Formulación tradicional del medio Murashige & Skoog (MS)

Nutriente	Concentración (mg L⁻¹)
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	1,650
Cloruro de calcio (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	440
Sulfato de magnesio (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	370
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	170
Nitrato de potasio (KNO ₃)	1,900
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	6.2
Cloruro de cobalto (CoCl ₂ · 6H ₂ O)	0.025
Sulfato cúprico (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	0.025
Sulfato ferroso (FeSO ₄ · 7H ₂ O)	27.8
Sulfato de manganeso (MnSO ₄ · 4H ₂ O)	22.3
Yoduro de potasio (KI)	0.83
Molibdato de sodio (Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O)	0.25
Sulfato de zinc (ZnSO ₄ · 7H ₂ O)	8.6
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37.2