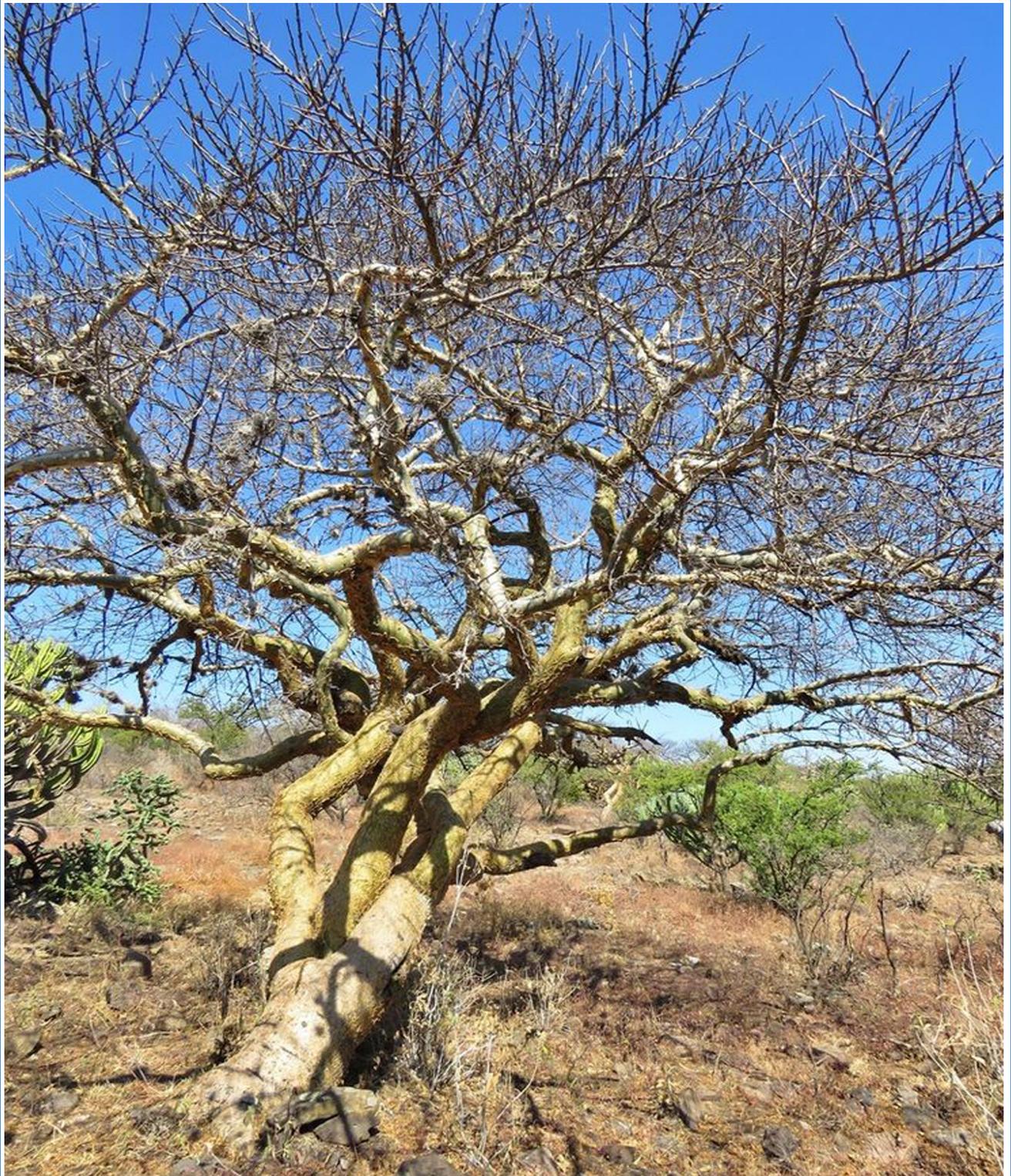


POLIBOTÁNICA

ISSN 1405-2768

ISSN 2395-9525



Núm. 60

 **CONAHCYT**
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

Julio 2025

PÁG.

CONTENIDO

- 1 *Mammillaria scoria* (cactaceae) una nueva especie de Querétaro, México
Mammillaria scoria (Cactaceae) a new species from Querétaro, México
Pedro González-Zamora | David Aquino | Daniel Sánchez
- 15 Revisión del género *Karwinskia* (Rhamnaceae) en México
Review of the *Karwinskia* genus (Rhamnaceae) in Mexico
Rafael Fernández Nava | María de la Luz Arreguín Sánchez
- 39 Diversidad florística de las áreas verdes urbanas de Miahuatlán, una ciudad pequeña de Oaxaca, México
Floristic diversity of the urban green areas of Miahuatlán, a small city from Oaxaca, Mexico
Víctor Gutiérrez Pacheco | Deisy Coromoto Rebolledo López
- 61 Caracterización morfológica de especies del género *Hylocereus* (Cactaceae) en una unidad de cultivo localizada en Molcaxac, Puebla, México
Morphological characterization of species of the genus *Hylocereus* (Cactaceae) in a cultivation unit located in Molcaxac, Puebla, Mexico
Vianey del Rocío Torres Pelayo
- 79 Estandarización del proceso de diafanización vegetal en las especies: *Adiantum pedantum* L. (Pteridaceae), *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott (Nephrolepidaceae) y una Spermatophyta *Pyracantha koidzumii* Hayata Rehder Rosaceae
Standardization of the plant diaphanization process; of *Adiantum pedantum* L. (Pteridaceae), *Nephrolepis exaltata* (L.) Schott (Nephrolepidaceae) and one Spermatophyta *Pyracantha koidzumii* Hayata Rehder (Rosaceae)
Ruth Concepción Márquez Juárez | Arantxa Chowell-López | Diego Martínez Mata | Gabriela Sánchez Fabila Sánchez Fabila | Roberto Moreno Colín | Pilar Amellali Badillo-Suárez | Irma Estrella Beatriz Manuell Cacheux | Rogelio Monterrubio Valdivia
- 91 Análisis de la estructura de un bosque en una región del suroeste del estado de Durango
Analysis of the structure of a forest in a southwestern region of the state of Durango
Manuel Antonio Díaz-Vásquez | Pedro Antonio Domínguez-Calleros | Norberto Domínguez-Amaya | Héctor Manuel Loera-Gallegos | Jesús Alejandro Soto-Cervantes
- 107 Estructura y diversidad arbórea de una selva mediana perennifolia en el complejo ecoturístico Agua Selva, Tabasco, México
Tree structure and diversity of a medium evergreen forest in the Agua Selva ecotourism complex, Tabasco, Mexico
Manuel Pérez de la Cruz | Josué García León | José del Carmén Gerónimo Torres | Facundo Sánchez Gutiérrez | Miguel Alberto Magaña Alejandro | Aracely de la Cruz Pérez
- 123 Diversidad del sotobosque; un atributo de evaluación en reforestaciones utilizadas como estrategias de restauración forestal
Understory diversity; an evaluation attribute in reforestations used as a forest restoration strategy
Francisca Ofelia Plascencia Escalante | Isidoro Herrera Ávila | Marfín Pérez Suárez | Patricia Hernández De La Rosa | Gregorio Ángeles Pérez
- 141 Estructura y diversidad arbórea bajo dos esquemas de manejo forestal e influencia de la orientación geográfica en un bosque de Durango, México
Tree structure and diversity under two forest management schemes and the influence of geographic orientation in a forest in Durango, Mexico
José de Jesús Graciano Luna | Eduardo Alanís Rodríguez | Oscar Aguirre Calderón | César Martín Cantú Ayala | José Yerena Yamalle | Cristian Martínez Adriano | José Luján Soto
- 163 Reserva de carbono orgánico y nitrógeno en Luvisol bajo diferentes usos de suelo en Oaxaca, México
Organic carbon and nitrogen reserve in Luvisol under different land uses in Oaxaca, México
Celestino Sandoval García | Israel Cantú Silva
- 177 Estimación de carbono a nivel árbol individual en bosque natural mediante vehículos aéreos no tripulados (VANT)
Carbon estimation at individual tree level in natural forest using unmanned aerial vehicles (UAV)
Jaime Briseño Reyes | Susana Isabel Hinojosa-Espinoza | José Javier Corral-Rivas | Jesús Aguirre-Gutiérrez | Daniel José Vega-Nieva | Héctor Manuel De los Santos Posadas
- 199 Variación morfométrica y espacial urbana de tres especies arbóreas en función del ancho de camellón en calles de la ciudad de San Luis Potosí, México
Morphometric and urban spatial variation of three tree species in relation to street median width in the city of San Luis Potosí México
Andrea Candia Lomelí | Carlos Renato Ramos Palacios | Jonathan Hammurabi González Lugo | Fredy Alexander Alvarado Roberto
- 229 Descripción inicial de la fenología de *Quercus durifolia* Seemen ex Loes. árbol endémico de la Sierra Madre Occidental
Initial description of the phenology of *Quercus durifolia* Seemen ex Loes. endemic tree of the Sierra Madre Occidental
Rosa Elvira Madrid Aispuro | José Ángel Prieto Ruíz | Arnulfo Aldrete | Silvia Salcido Ruiz | Eduardo Daniel Vivar Vivar | Laura Elena Martínez Nevárez
- 245 Registro polínico en miel de *Apis mellifera* L. de dos localidades de la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán, Jalisco, México
Pollen record on honeybee honey of *Apis mellifera* L. of Sierra of Manantlan Biosphere Reserve, Jalisco, México
Xochilt Morales Najarro | Iris Grisel Galván Escobedo | Monserrat Vázquez Sánchez | Montserrat Medina Acosta

PÁG.

CONTENIDO

- 263 Efecto de complejos orgánicos en la micropropagación de *Phalaenopsis* var. Dudu
Effect of organic complexes on micropropagation of *Phalaenopsis* var. Dudu
Amaury Arzate Fernández | Sandra Martínez Martínez | Tomás Norman Mondragón | María Mariezcurrena Berazain | Arely Piña Sampedreño
- 273 Evaluación de las respuestas de tres variedades de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) inoculadas con bacterias cuando se cultivan en condiciones de estrés por aguas residuales y sulfato de cobre.
Evaluation of the responses of three tomato varieties (*Solanum lycopersicum* L.) inoculated with bacteria when grown under stress conditions due to wastewater and copper sulfate
Abdul Khalil Gardezi | Leticia Manuela Inzunza Medina | Guillermo Carrillo Castañeda | Hector Manuel Ortega Escobar | oscar raul mancilla villa | Juan Enrique Rubiños Panta | Jorge flores Velazquez | Mora Meraz Maldonado | Sergio Roberto Marquez Berber | Hector Flores Magdaleno | Gabriel Haro Aguilar
- 291 Especies de *Meloidogyne* asociadas a cultivos hortícolas en el Valle de Tepeaca, Puebla, México
Perineal patterns and isozyme phenotypes for the identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in vegetables from the Tepeaca Valley, Puebla, Mexico
María Gabriela Medina Canales | Ana Karen Alquicira Jimenez | Norma García Aguilar | Ilia Mariana Escobar Ávila | Alejandro Tovar Soto
- 307 Efecto de las propiedades físicas y químicas del suelo en el estado nutrimental del nopal-verdura (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill variedad Milpa Alta
Effect of soil physical and chemical properties on the nutritional status of nopal-vegetable (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill variety Milpa Alta
Bertha Patricia Zamora Morales | Aurelio Báez Pérez | Leticia Bonilla-Valencia | Jorge Artemio Zegbe Domínguez | Marisela Cristina Zamora Martínez | Abel Quevedo-Nolasco
- 325 Evaluación fitoquímica de extractos de la resina de *Bursera fagaroides* (Kunth) Engl.
Phytochemical evaluation of resin extracts of *Bursera fagaroides* (Kunth) Engl.
Luis Antonio Flores-Hernández | Fanny Imelda Pastenes-Felizola | Fanny Imelda Pastenes-Felizola | Jose Luis Díaz-Núñez | Pablo Noé Núñez-Aragón
- 337 Callogénesis y análisis fitoquímico de *Euphorbia nutans* Lag.
Callogenesis and phytochemical analysis of *Euphorbia nutans* Lag.
Daniel Aguilar Jiménez | Benito Reyes Trejo | José Luis Rodríguez De la O | Juan Martínez Solís
- 355 Evaluación de dos métodos de desinfección de sustratos para la producción de *Pleurotus ostreatus*
Evaluation of two substrate disinfection methods for the production of *Pleurotus ostreatus*
Rosa Elena Hernández Hernández | Veronica Rosales Martinez | Carolina Flota Bañuelos | Mónica Leticia Osnaya González | Porfirio Morales Almora
- 367 Conservación genómica de dos especies del orden Asparagales con cariotipo bimodal, empleando hibridación genómica *in situ* (GISH)
Genomic conservation of two species of the order Asparagales with bimodal karyotype, using genomic *in situ* hybridization (GISH)
María José García Castillo | Luis Carlos Rodríguez Zapata | Lorenzo Felipe Sanchez Teyer
- 381 Prácticas de manejo para la producción de (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) en productores del Municipio de Pungarabato, Guerrero, México
Management practices for the production of (*Vigna unguiculata* [L.] Walp) in producers of the Municipality of Pungarabato, Guerrero, Mexico
Jaime Olivares | Santos Rodríguez Mejía | Saúl Rojas Hernández | Teolincacihualt Romero Rosales | Miguel Ángel Damian Valdéz | Vania Jiménez Lobato | Lucero Sarabia Salgado
- 395 Manejo del ramón *Brosimum alicastrum* Sw. en huertos familiares de Tzucacab, Yucatán, México
Ramón (*Brosimum alicastrum* Sw.) management in home gardens of Tzucacab, Yucatán, México
Rosalba Esther Mex Mex | Juan José Jiménez Osornio | Patricia Irene Montañez-Escalante | Héctor Estrada Medina | Guadalupe del Carmen Reyes Solis
- 411 Rescate y conservación del conocimiento tradicional sobre plantas medicinales en la sierra de Taxco, Guerrero, México: El caso del Toronjil (*Agastache mexicana* subsp. *mexicana*)
Rescue and conservation of traditional knowledge on medicinal plants in the Sierra de Taxco, Guerrero, Mexico: The case of Toronjil (*Agastache mexicana* subsp. *mexicana*)
Judith Morales Barrera | Blas Cruz-Lagunas | Miguel Angel Gruintal-Santos | Mirna Vázquez-Villamar | Teolincacihualt Romero-Rosales | Saúl Rojas-Hernández | Tania de Jesús Adame Zambrano
- 441 Etnobotánica de los chiles silvestres en dos comunidades ch'oles de Tacotalpa, Tabasco, México
Ethnobotany of wild chili peppers in two ch'ol communities of Tacotalpa, Tabasco, Mexico
Guadalupe Morales Valenzuela | María Isabel Villegas Ramírez
- 459 Caracterización sensorial para la diferenciación de mezcal ancestral de dos zonas productoras de Oaxaca, México
Sensory characterization for the differentiation of ancestral mezcal from two producing areas of Oaxaca, Mexico
Susana Yareth López García | Anastacio Espejel García | Arturo Hernández Montes | Landy Hernández Rodríguez | Ariadna Isabel Barrera Rodríguez

REVISTA BOTÁNICA INTERNACIONAL DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

EDITOR EN JEFE

Rafael Fernández Nava

EDITORA ASOCIADA

María de la Luz Arreguín Sánchez

COMITÉ EDITORIAL INTERNACIONAL

Christiane Anderson
University of Michigan
Ann Arbor, Michigan, US

Delia Fernández González
Universidad de León
León, España

Heike Vibrans
Colegio de Postgraduados
Estado de México, México

José Angel Villarreal Quintanilla
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Saltillo, Coahuila, México

Hugo Cota Sánchez
University of Saskatchewan
Saskatoon, Saskatchewan, Canada

Luis Gerardo Zepeda Vallejo
Instituto Politécnico Nacional
Ciudad de México, México

Fernando Chiang Cabrera
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad de México, México

Claude Sastre
Muséum National d'Histoire Naturelle
Paris, Francia

Thomas F. Daniel
California Academy of Sciences
San Francisco, California, US

Mauricio Velayos Rodríguez
Real Jardín Botánico
Madrid, España

Francisco de Asis Dos Santos
Universidad Estadual de Feira de Santana
Feira de Santana, Brasil

Noemi Waksman de Torres
Universidad Autónoma de Nuevo León
Monterrey, NL, México

Carlos Fabián Vargas Mendoza
Instituto Politécnico Nacional
Ciudad de México, México

Julieta Carranza Velázquez
Universidad de Costa Rica
San Pedro, Costa Rica

José Luis Godínez Ortega
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad de México, México

Tom Wendt
University of Texas
Austin, Texas, US

José Manuel Rico Ordaz
Universidad de Oviedo
Oviedo, España

Edith V. Gómez Sosa
Instituto de Botánica Darwinion
Buenos Aires, Argentina

Edith V. Gómez Sosa
Instituto de Botánica Darwinion
Buenos Aires, Argentina

Dr. Juan Ramón Zapata Morales
Universidad de Guanajuato
Guanajuato, México

Jorge Llorente Bousquets
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad de México, México

DISEÑO Y FORMACIÓN ELECTRÓNICA

Luz Elena Tejeda Hernández

OPEN JOURNAL SYSTEM Y TECNOLOGÍAS DE LA INFORMACIÓN

Pedro Aráoz Palomino

POLIBOTÁNICA, revista botánica internacional del Instituto Politécnico Nacional, incluye exclusivamente artículos que representen los resultados de investigaciones originales en el área. Tiene una periodicidad de dos números al año, con distribución y Comité Editorial Internacional.

Todos los artículos enviados a la revista para su posible publicación son sometidos por lo menos a un par de árbitros, reconocidos especialistas nacionales o internacionales que los revisan y evalúan y son los que finalmente recomiendan la pertinencia o no de la publicación del artículo, cabe destacar que este es el medio con que contamos para cuidar el nivel y la calidad de los trabajos publicados.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES PARA LA PUBLICACIÓN DE TRABAJOS

Se aceptarán aquellos originales que se ajusten a las prescripciones siguientes:

POLIBOTÁNICA incluye exclusivamente artículos que representen los resultados de investigaciones originales que no hayan sido publicados.

1. El autor deberá anexar una carta membretada y firmada dirigida al Editor, donde se presente el manuscrito, así como la indicación de que el trabajo es original e inédito, ya que no se aceptan trabajos publicados o presentados anterior o simultáneamente en otra revista, circunstancia que el autor(es) deberá declarar expresamente en la carta de presentación de su artículo.
2. Al quedar aceptado un trabajo, su autor no podrá ya enviarlo a ninguna otra revista nacional o extranjera.
3. Los artículos deberán estar escritos en español, inglés, francés o portugués. En el caso de estar escritos en otros idiomas diferentes al español, deberá incluirse un amplio resumen en este idioma.
4. Como parte de los requisitos del CONACYT, POLIBOTÁNICA ahora usa la plataforma del Open Journal System (OJS); para la gestión de los artículos sometidos a la misma. Así que le solicitamos de la manera más atenta sea tan amable de registrarse y enviar su artículo en la siguiente liga: www.polibotanica.mx/ojs/index.php/polibotanica
 - a) cargar el trabajo en archivo electrónico de office-word, no hay un máximo de páginas con las siguientes características:
 - b) en páginas tamaño carta, letra times new roman 12 puntos a doble espacio y 2 cm por margen
5. Las figuras, imágenes, gráficas del trabajo deben estar incluidas en el documento de Word original:
 - a) en formato jpg
 - b) con una resolución mínima de 300 dpi y un tamaño mínimo de 140 mm de ancho
 - c) las letras deben estar perfectamente legibles y contrastadas
6. Todo trabajo deberá ir encabezado por:
 - a) Un título tanto en español como en inglés que exprese claramente el problema a que se refiere. El formato para el título es: negritas, tamaño 14 y centrado;
 - b) El nombre del autor o autores, con sus iniciales correspondientes, sin expresión de títulos o grados académicos. El formato para los autores es: alineados a la izquierda, cada uno en un párrafo distinto y tamaño 12. Cada autor debe tener un número en formato superíndice indicando a qué afiliación pertenece;
 - c) La designación del laboratorio e institución donde se realizó el trabajo. La(s) afiliación(es) debe(n) estar abajo del grupo de autores. Cada afiliación deberá estar en un párrafo y tamaño

12. Al inicio de cada afiliación estará el número en superíndice que lo relaciona con uno o más autor/es.

d) El autor para correspondencia deberá estar en el siguiente párrafo, alineado a la izquierda, tamaño 12.

7. Todo trabajo deberá estar formado por los siguientes capítulos:

a) RESUMEN y ABSTRACT. Palabras clave y Key Words. El resumen debe venir después de la afiliación de los autores, alineado a la izquierda, tamaño 12. La palabra “Resumen: / Abstract:” debe venir en negritas y con dos puntos. El texto del resumen debe empezar en el párrafo siguiente, tamaño 12 y justificado. El texto “Palabras clave / Key Words:” debe venir en negritas seguido de dos puntos. Cada una de las palabras clave deben estar separadas por coma o punto y coma, finalizadas por punto.

b) INTRODUCCIÓN y MÉTODOS empleados. Cuando se trate de técnicas o métodos ya conocidos, solamente se les mencionará por la cita de la publicación original en la que se dieron a conocer. El formato para todas las secciones en esta lista es: negritas, tamaño 16 y centrado.

c) RESULTADOS obtenidos. Presentación acompañada del número necesario de gráficas, tablas, figuras o diagramas de tamaño muy cercano al que tendrá su reproducción impresa (19 x 14 cm).

d) DISCUSIÓN concisa de los resultados obtenidos, limitada a lo que sea original y a otros datos relacionados directamente y que se consideren nuevos.

e) CONCLUSIONES.

ESPECIFICACIONES DE FORMATO PARA EL CUERPO DEL TRABAJO

1. Secciones/Subtítulos de párrafo: Fuente tamaño 16, centrado, en negritas, con la primera letra en mayúscula.
2. Subsecciones/Subtítulos de párrafo secundarios : Fuente tamaño 14, centrado, en negritas, con la primera letra en mayúscula. Cuando existan subsecciones de subsección formatear en tamaño 13 negrita y centrado.
3. Cuerpo del texto: Fuente tamaño 12, justificado. NO debe haber saltos de línea entre párrafos.
4. Las notas de pie de página deben estar al final de cada página, fuente tamaño 12 justificadas.
5. Cita textual con mas de tres líneas: Fuente tamaño 12, margen izquierdo de 4 cm.
6. Título de imágenes: Fuente tamaño 12, centrado y en negritas, separado por dos puntos de su descripción. Descripción de las imágenes: tamaño 12.
7. Notas al pie de las imágenes: Fuente tamaño 12 y centradas con respecto a la imagen, la primera letra debe estar en mayúsculas.
8. Imágenes: deben estar en el cuerpo del texto, insertadas en formato png o jpg, a por lo menos 300 dpi de resolución y centradas. Las imagenes deben estar en línea con el texto. Se consideran imágenes: gráficos, cuadros, fotografías, diagramas y, en algunos casos, tablas y ecuaciones.
9. Tablas de tipo texto: El título de las columnas de las tablas debe estar en negritas y los datos del cuerpo de la tabla con fuente normal. Los nombres científicos deben estar en *italicas*. Se recomienda utilizar las Tablas como imágenes, estas deberán de ir centradas (a por lo menos 300 dpi de resolución).
10. Notas al pie de la tabla: Fuente tamaño 12 y centradas con respecto a la tabla, la primera letra debe estar en mayúsculas.
11. Ecuaciones pueden estar en Mathtype 1 o en imagen. En este último caso, seguir instrucciones del punto 8.
12. Citas del tipo autor y año deben estar entre paréntesis, con el apellido del autor seguido por el año (Souza, 2007), primera letra en mayúscula.

- 8. LITERATURA CITADA**, Se tomara como base el Estilo APA para las Referencias Bibliográficas, formada por las referencias mencionadas en el texto del trabajo y en orden alfabético. Es obligatorio utilizar Mendeley® (software bibliográfico). El propósito de utilizar este tipo de software es asegurar que los datos contenidos en las referencias están correctamente estructurados y corresponden a las citas del cuerpo del texto.

ESTRUCTURA Y FORMATO DE LOS AGRADECIMIENTOS Y REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Los Agradecimientos deberán estar después de la última sección del cuerpo del texto. Esta información debe tener como título la palabra “Agradecimientos”, o su equivalente en otro idioma, en negritas, tamaño 12 y centrado. El texto de esta información debe estar en tamaño 12 justificado.
2. Las Referencias bibliográficas deben estar en orden alfabético sin salto de línea de párrafo, alineados a la izquierda, en tamaño 12.
3. Apéndices, anexos, glosarios y otros materiales deben incluirse después de las referencias bibliográficas. En caso de que estos materiales sean extensos deberán ser creados como archivos PDF.

9. REVISIÓN Y PUBLICACIÓN

Todos los artículos enviados a la revista para su posible publicación serán sometidos a una revisión “doble ciego”, se enviarán por lo menos a un par de árbitros, reconocidos especialistas nacionales o internacionales que los revisarán y evaluarán y serán los que finalmente recomienden la pertinencia o no de la publicación del artículo, cabe destacar que este es el medio con que contamos para cuidar el nivel y la calidad de los trabajos publicados.

Una vez aceptado el trabajo, se cobrarán al autor(es) \$299 por página más IVA, independientemente del número de fotografías que contenga.

PUBLICATION GUIDELINES

POLIBOTÁNICA, an international botanical journal supported by the National Polytechnic Institute, only publishes material resulting of original research in the botanic area. It has a periodicity of two issues per year with international distribution and an international Editorial Committee.

All articles submitted to POLIBOTÁNICA for publication are reviewed by at least a couple of referees. National or international recognized experts will evaluate all submitted materials in order to recommend the appropriateness or otherwise of a publication. Therefore, the quality of published papers in POLIBOTÁNICA is of the highest international standards.

FOR PUBLICATION OF ARTICLES

Originals that comply with the following requirements will be accepted:

1. POLIBOTÁNICA includes only items that represent the results of original research which have not been published. The author should attach an official and signed letter to Editor stating that the work is original and unpublished. We do not accept articles published or presented before or simultaneously in another journal, a fact that the author (s) must expressly declare in the letter.
2. When an article has been accepted, the author can no longer send it to a different national or foreign journal.
3. Articles should be written in Spanish, English, French or Portuguese. In the case of be written in

languages other than Spanish, it should include an abstract in English.

4. The article ought to be sent to the POLIBOTÁNICA's Open Journal System <http://www.polibotanica.mx/ojs> in an office-word file without a maximum number of pages with the following features:

a) on letter-size pages, Times New Roman font type, 12-point font size, double-spaced and 2 cm margin

5. The figures, images, graphics in the article must be attached as follows:

a) in jpg format

b) with a minimum resolution of 300 dpi and a minimum size of 140 mm wide

c) all characters must be legible and contrasted

6. All articles must include:

a) a title in both Spanish and English that clearly express the problem referred to. The format for this section is: bold, font size 14 and centered.;

b) the name of the author or authors, with their initials, no titles and no academic degrees. The format for this section is: font size 12, aligned to the left, each name in a different paragraph but without spaces in-between and a superscript number indicating the affiliation;

c) complete affiliations of all authors (including laboratory or research institution). The format for this section is: font size 12, aligned to the left, each name in a different paragraph but without spaces in-between and a superscript number at the beginning of the affiliation;

d) correspondence author should be in the next paragraph, font size 12 and aligned to the left.

7. All work should be composed of the following chapters:

a) RESUMEN and ABSTRACT. Palabras clave y Key Words. The format for this section is: bold, font size 12 and centered. Both words (RESUMEN: and ABSTRACT:) must include a colon, be in bold and aligned to the left. The body of the abstract must be justified and in font size 12. Both palabras clave: and keywords: must include a colon, be in bold and aligned to the left. Keywords must be separated by a comma or semicolon, must be justified and in font size 12.

b) INTRODUCTION y METHODS. In the case of techniques or methods that are already known, they were mentioned only by appointment of the original publication in which they were released.

c) RESULTS. Accompanied with presentation of the required number of graphs, tables, figures or diagrams very close to the size which will be printed (19 x 14 cm).

d) DISCUSSION. A concise discussion of the results obtained, limited to what is original and other related directly and considered new data.

e) CONCLUSIONS. The format for sections Introduction, Results, Discussion and Conclusions is: bold, font size 16 and centered.

FORMAT SPECIFICATIONS FOR THE BODY OF WORK

1. Sections: Font size 16, centered, bold, with the first letter capitalized.
2. Subsections / Secondary Subtitles: Font size 14, centered, bold, with the first letter capitalized. When there are second grade subsections format in size 13 bold and centered.
3. Body: Font size 12, justified. There should NOT be line breaks between paragraphs.
4. Footnotes should be at the bottom of each page, font size 12 and justified.
5. Textual quotation with more than three lines: Source size 12, left margin of 4 cm.
6. Image Title: Font size 12, centered and bold, separated by two points from its description. Description of the images: size 12.
7. Images Footnotes: Font size 12 and centered with respect to the image, the first letter must be in capital letters.
8. Images: must be in the body of the text, inserted in png or jpg format, at least 300 dpi resolution and centered. Images should be in line with the text. Graphs, charts, photographs, diagrams and, in some cases, tables and equations are considered images.
9. Text Tables: Only The title of the columns of the tables must be in bold. Scientific names must be in italics. It is recommended to use the Tables as images, they should be centered (at least 300 dpi resolution).
10. Footnotes: Font size 12 and centered with respect to the table, the first letter must be in upper case.
11. Equations can be in Mathtype 1 or in image. In the latter case, follow the instructions in point 8.
12. Quotations of the author and year type must be in parentheses, with the author's last name followed by the year (Souza, 2007), first letter in capital letters.

8. LITERATURE CITED. All references must be cited using the APA stile. POLIBOTÁNICA requires the use of Mendeley® (free reference manager) for the entire bibliography.

STRUCTURE AND FORMAT OF ACKNOWLEDGMENTS AND BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES

1. Acknowledgments must be after the last section of the body of the text. This information should be titled the word "Acknowledgments", or its equivalent in another language, in bold, size 12 and centered. The text of this information must be in size 12 justified.
2. Bibliographical references should be in alphabetical order without paragraph line jump, aligned to the left, in size 12.
3. Appendices, annexes, glossaries and other materials should be included after the bibliographic references. If these materials are extensive they should be created as PDF files.

9. REVIEW AND PUBLICATION

All articles submitted to the journal for publication will undergo a review "double-blind", they will be sent at least a couple of referees, recognized national or international experts that reviewed and evaluated and will be finally recommended the relevance or the publication of the article, it is noteworthy that this is the means that we have to take care of the level and quality of published articles.

Once accepted the article, the author will be charged \$15 USD per text page, regardless of how many pictures it contains.

Toda correspondencia relacionada con la revista deberá ser dirigida a:

Dr. Rafael Fernández Nava
Editor en Jefe de

POLIBOTÁNICA

Departamento de Botánica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional
Apdo. Postal 17-564, CP 11410, Ciudad de México

Correo electrónico:
polibotanica@gmail.com
rfernand@ipn.mx

Dirección Web
http://www.polibotanica.mx

POLIBOTÁNICA es una revista indexada en:

CONAHCYT, índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnológica del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología.

SciELO - Scientific Electronic Library Online.

Google Académico - Google Scholar.

DOAJ, Directorio de Revistas de Acceso Público.

Dialnet portal de difusión de la producción científica hispana.

REDIB Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico.

LATINDEX, Sistema regional de información en línea para revistas científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal.

PERIODICA, Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias.





Polibotánica

ISSN electrónico: 2395-9525

polibotanica@gmail.com

Instituto Politécnico Nacional

México

<http://www.polibotanica.mx>

CALLOGÉNESIS Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE *Euphorbia nutans* Lag.

CALLOGENESIS AND PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF *Euphorbia nutans* Lag.

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

CALLOGÉNESIS Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE *Euphorbia nutans* Lag.

CALLOGENESIS AND PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF *Euphorbia nutans* Lag.



Instituto Politécnico Nacional

Núm. 60: 337-354 México. Julio 2025

DOI: 10.18387/polibotanica.60.20



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

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

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

CALLOGÉNESIS Y
ANÁLISIS FITOQUÍMICO
DE *Euphorbia nutans* Lag.

CALLOGENESIS AND
PHYTOCHEMICAL
ANALYSIS OF *Euphorbia
nutans* Lag.

POLIBOTÁNICA

Instituto Politécnico Nacional

Núm. 60: 337-354. Julio 2025

DOI:
10.18387/polibotanica.60.20

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

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

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

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

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

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

Juan Martínez-Solís † 09/04/2025

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

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

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

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

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

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

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

INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

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

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

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

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

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

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

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

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

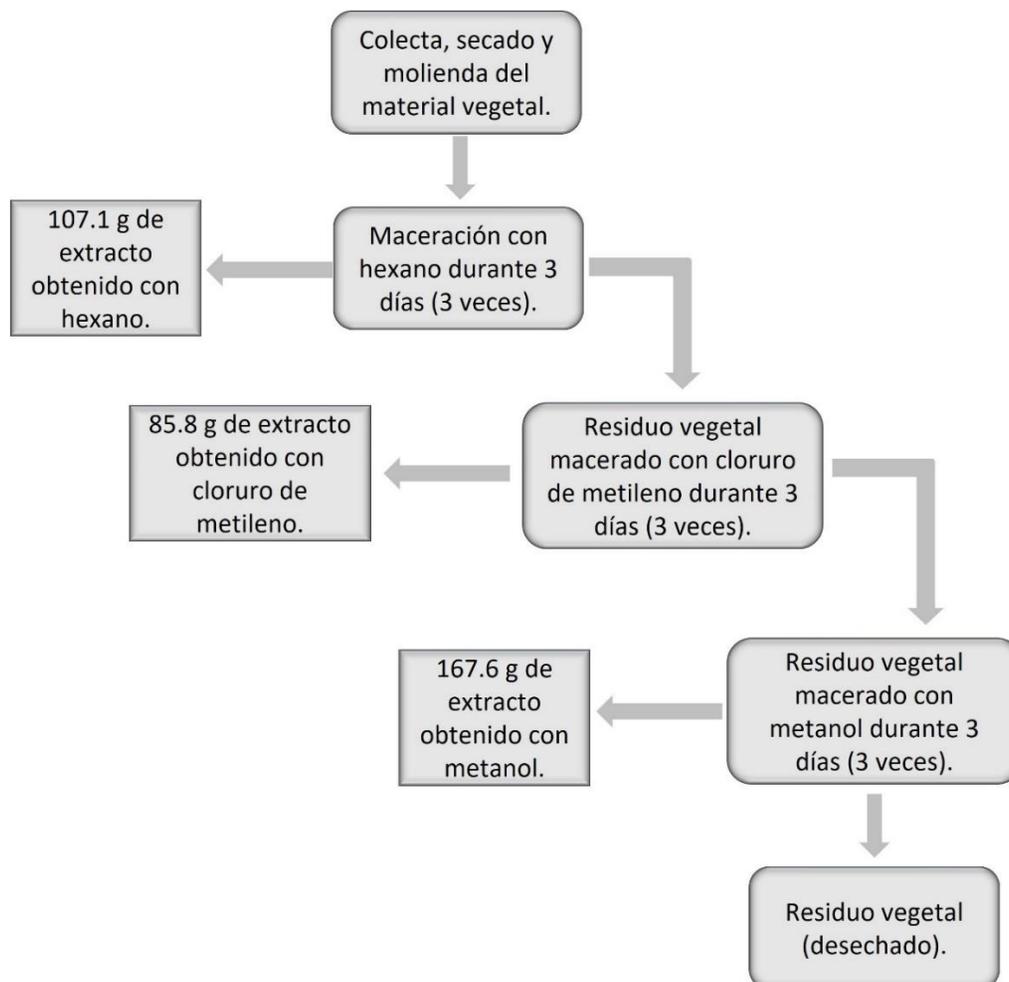


Figura 1. Diagrama del proceso para la obtención de extractos vegetales a partir de plantas silvestres de *Euphorbia nutans* Lag.

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

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

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

Análisis de datos

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

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

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

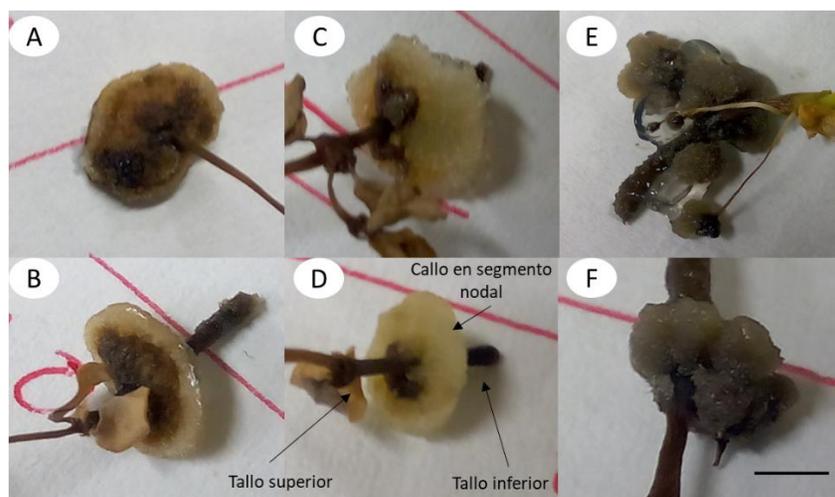


Figura 2. Formación de callos a partir de segmentos nodales de *Euphorbia nutans* Lag. en condiciones *in vitro*. A y B) Callos obtenidos con Kin + ANA, C y D) Callos obtenidos con 2i-p + ANA, E) Callos obtenidos con BA + ANA, F) Callos obtenidos con Kin + 2,4-D. Barra = 5 mm.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

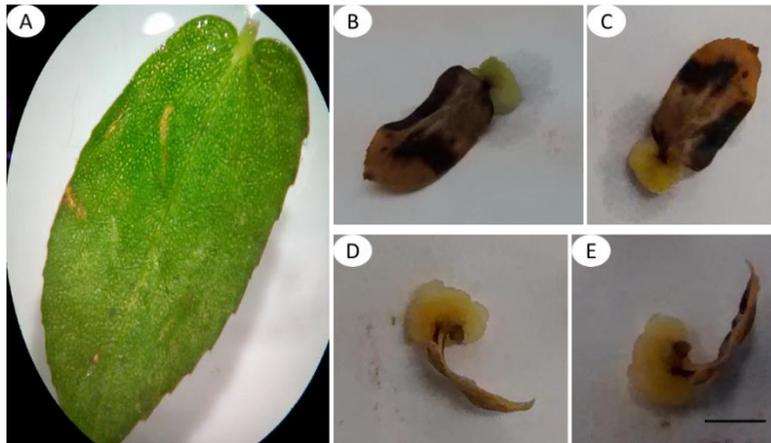


Figura 3. Callos formados en hojas completas *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. A) Hoja completa de *Euphorbia nutans* Lag., B) y C) Respuesta para formación de callo en hojas completas con el haz hacia arriba, D y E) Respuesta para formación de callo en hojas completas con el haz hacia abajo. Barra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

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

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

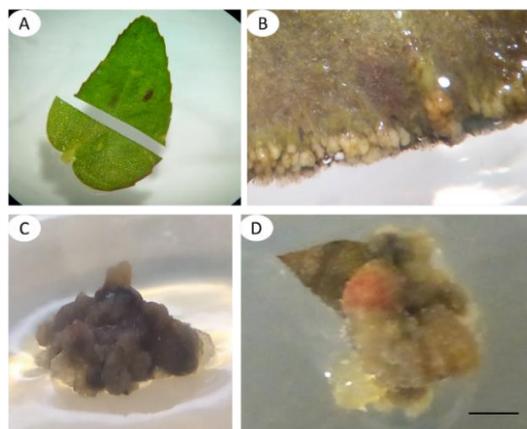


Figura 4. Respuestas a la formación de callo *in vitro* en segmentos de lámina foliar media de *Euphorbia nutans* Lag. sin hendir la nervadura central por la mitad. A) Restos de hoja después de aislar la parte media, B) Inicio de respuesta a callo en el margen foliar herido con el bisturí, C) Formación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

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

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

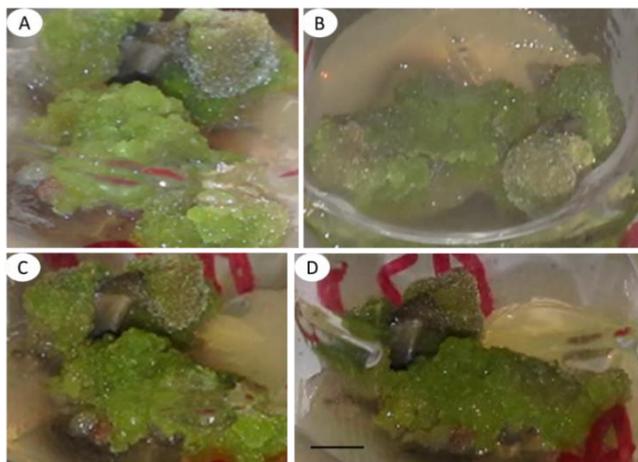


Figura 5. Obtención de callos *in vitro* en *Euphorbia nutans* Lag. a partir de segmentos de lámina foliar, con la nervadura central hendida por la mitad a 7 días de cultivo en medio MS 100% + BA y ANA 10.0 mg L⁻¹. A-B) Haz foliar en contacto con el medio de cultivo, C-D) Envés foliar en contacto con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

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

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

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

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

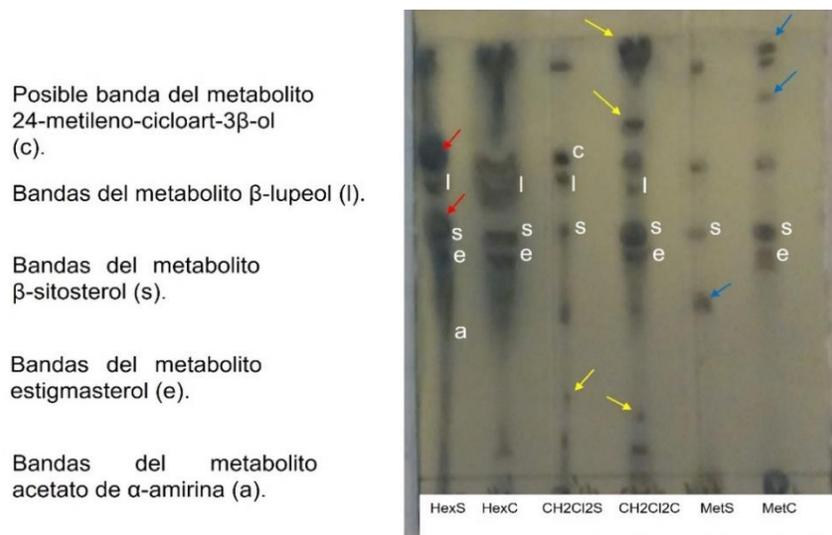


Figura 6. Placa cromatográfica en capa delgada en la que se utilizó una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH, 7/3 (v/v) como eluyente, para comparar los metabolitos obtenidos en extractos de plantas silvestres vs extractos de callos *in vitro* de *Euphorbia nutans* Lag. HexS: Extracto hexánico de plantas silvestres, HexC: Extracto hexánico de callos, CH₂Cl₂S: Extracto con diclorometano de plantas silvestres, CH₂Cl₂C: Extracto con diclorometano de callos, MetS: Extracto con metanol de plantas silvestres, MetC: Extracto con metanol de callos.

Figure 6. Thin layer chromatographic plate in which a mixture of CH₂Cl₂/MeOH, 7/3 (v/v) was used as eluent, to compare the metabolites obtained in wild plant extracts vs *in vitro* callus extracts of *Euphorbia nutans* Lag. HexS: Hexane extract of wild plants, HexC: Hexane extract of calluses, CH₂Cl₂S: Dichloromethane extract of wild plants, CH₂Cl₂C: Dichloromethane extract of calluses, MetS: Methanol extract of wild plants, MetC: Methanol extract of calluses.

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

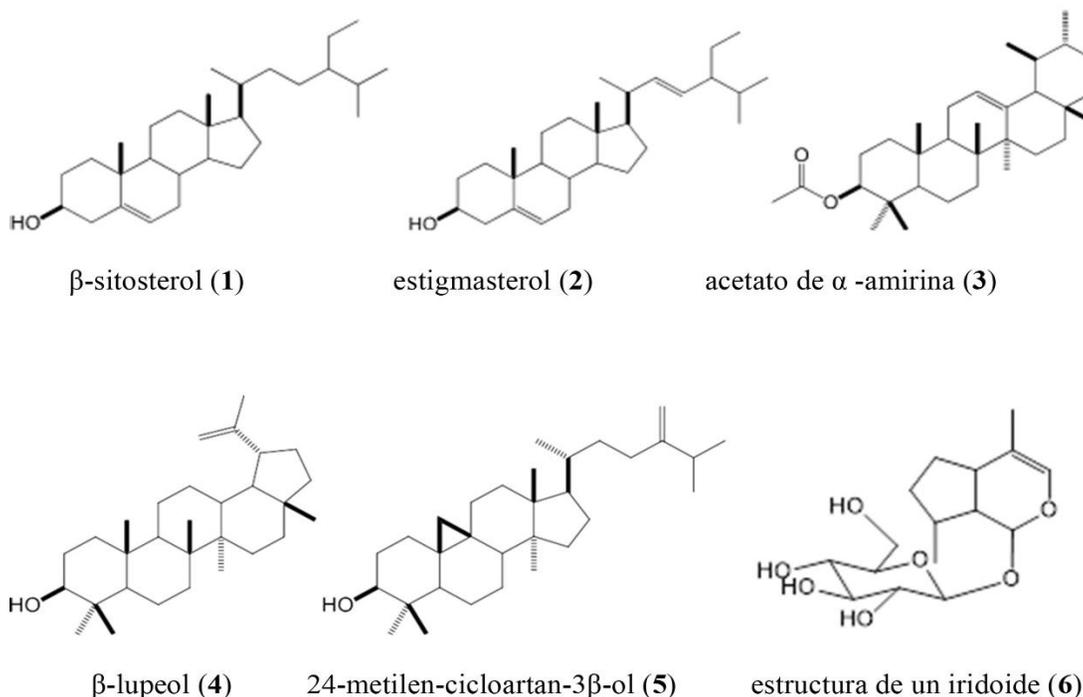


Figura 7. Estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados de *Euphorbia nutans* Lag.
Figure 7. Molecular structure of the secondary metabolites isolated from *Euphorbia nutans* Lag.

CONCLUSIONES

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

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

LITERATURA CITADA

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

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

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

Recibido:
14/diciembre/2024

Aceptado:
23/junio/2025

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