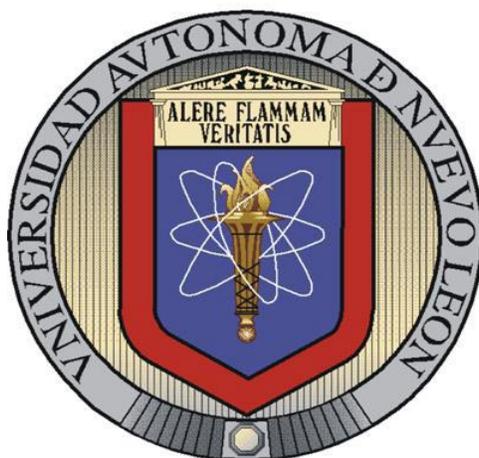


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**Producción de antocianinas por cultivo “*in vitro*” de *Rubus adenotrichus*
Schltdl (zarzamora)**

T E S I S

Que presenta

M.C. Nieves del Socorro Martínez Cruz

Como requisito para obtener el grado de:

DOCTORADO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

**Producción de antocianinas por cultivo “*in vitro*” de *Rubus adenotrichus*
Schltdl (zarzamora)**

T E S I S

Que presenta
M.C. Nieves del Socorro Martínez Cruz
Como requisito para obtener el grado de:
**DOCTORADO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

Comité de Tesis



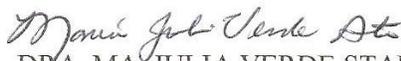
DRA. KATIUSHKA ARÉVALO NIÑO

Director de la Tesis



DRA. MA. EUFEMIA MORALES RUBIO

CoDirector



DRA. MA. JULIA VERDE STAR

Secretario



DRA. AZUCENA ORANDAY CÁRDENAS

Vocal



DRA. CATALINA RIVAS MORALES

Vocal

Enero 2012

Producción de antocianinas por cultivo “*in vitro*” de *Rubus adenotrichus*

Schlttl (zarzamora)

T E S I S

Que presenta

M.C. Nieves del Socorro Martínez Cruz

Como requisito para obtener el grado de:

DOCTORADO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA



DRA. KATIUSHKA AREVALO NIÑO

Director de la Tesis



DRA. MA. EUFEMIA MORALES RUBIO

CoDirector

Enero 2012

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo otorgado para la realización este proyecto, becario 46791.

A la **Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León** por recibirme y por las facilidades otorgadas en la realización de este proyecto.

A la **Universidad Veracruzana** por apoyarme y permitirme ausentarme para hacer posible mis estudios de doctorado.

A mis directoras de tesis: **Dra. Katiushka Arévalo Niño** y **Dra. María Eufemia Morales Rubio** por sus consejos, su tiempo y su disposición de ayudarme a resolver todos los problemas que se me presentaron en el desarrollo de este proyecto.

A mis asesoras la **Dra. María Julia Verde Star**, **Dra. Azucena Oranday Cárdenas**, **Dra. Catalina Rivas Morales** por sus consejos, motivación y apoyo.

Al **Dr. Mario Rodríguez Monroy** investigador del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional con sede en Yautepec Morelos así como a todo el personal de este centro de investigación por compartirme su conocimiento, experiencia y amistad.

Al **Dr. Francisco Gerardo Lorea Hernández** director del Herbario del Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz por su colaboración en la identificación taxonómica de la planta.

A mi comité tutorial: **Dra. Irma Olivia Martínez Vázquez**, **Dra. Isela Quintero Zapata** y **Dr. Carlos Francisco Sandoval Coronado** por su apoyo y motivación.

A la **Dra. María Adriana Núñez González** por su buena disposición a colaborar en este proyecto.

Al **Dr. Jaime Francisco Treviño Neávez** por su apoyo en el desarrollo de la parte estadística de este proyecto.

A la **Dra. María Porfiria Barrón González** por sus consejos, motivación y apoyo incondicional.

A todos mis amigos y compañeros estudiantes de posgrados: **Ruth, Ramón, Ezequiel, Miriam y Norma**, por su amistad y por compartir conmigo momentos de dificultades y de alegría.

A **Dulce** por su colaboración con las fotografías y por su amistad.

DEDICATORIA

A mi hija

Diana Estefanía el tesoro más grande que me ha dado Dios, gracias por tu cariño, apoyo, comprensión y compañía en este proyecto,

A mis padres

Por ser ejemplo de esfuerzo y dedicación, por el apoyo y confianza que siempre tuvieron en mí, vieron el inicio de este proyecto y aunque ya yo están entre nosotros sé que estarían muy felices de este logro.

A mis hermanos: Pedro y Juanita

El dúo dinámico que logra sonrisas aún en tiempos difíciles, por su apoyo incondicional.

A mis hermanos: Adolfo, Gilberto, Néstor, Emilio, Juan, Pablo y Jesús

Por el apoyo y confianza que me han brindado durante toda mi vida.

ÁREA DE TRABAJO

La realización del trabajo práctico se llevó a cabo en los laboratorio de: Fitoquímica y Química Analítica del Departamento de Química, en el Laboratorio de Micropropagación del Departamento de Biología Celular y Genética y en el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

INDICE DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN	1
1.1. ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. HIPÓTESIS	4
4. OBJETIVO	5
4.1. Objetivo general	5
4.2. Objetivos particulares	5
5. ANTECEDENTES	6
5.1 Generalidades del género <i>Rubus</i>	6
5.1.1 Posición taxonómica, descripción botánica y usos de <i>Rubus</i>	6
5.1.2 Distribución de <i>Rubus adenotrichus</i>	8
5.2 Fenoles	8
5.2.1 Flavonoides	10
5.2.2 Antocianinas	12
5.2.3. Especies reactivas del oxígeno y radicales libres	15
5.3 Cultivo <i>in vitro</i>	16
5.3.1 Germinación	17
5.3.1.1 Dormancia de semillas del género <i>Rubus</i>	17
5.3.1.2 Tratamientos pregerminativos	17
5.3.2 Cultivo de tejidos vegetales	18
5.3.2.1 Cultivo de células vegetales en medio semisólido	19
5.3.2.2 Cultivo de células vegetales en suspensión	19

5.3.2.3 Factores que influyen en la producción de antocianinas en cultivo <i>in vitro</i>	19
6 MATERIALES Y MÉTODO	21
6.1 Materiales	21
6.1.1 Material biológico	21
6.1.2 Reactivos químicos	21
6.2 Metodología	21
6.2.1 Preparación del material biológico	21
6.2.2 Cultivo <i>in vitro</i>	22
6.2.2.1 Germinación	22
6.2.2.1.1 Métodos pregerminativos	22
6.2.2.1.2 Medios de cultivo	22
6.2.2.1.3 Desinfección	22
6.2.2.1.4 Inoculación	23
6.2.2.1.5 Incubación	23
6.2.2.2 Generación de brotes	23
6.2.2.2.1 Medios de cultivo	23
6.2.2.2.2 Resiembra e incubación	24
6.2.2.3 Inducción de callo	24
6.2.2.3.1 Medios de cultivo	24
6.2.2.3.2 Desinfección	25
6.2.2.3.3 Inoculación	25
6.2.2.3.4 Incubación	25
6.2.2.4 Pruebas para inducción de crecimiento celular y producción	25
6.2.2.5 Viabilidad celular	26

6.2.2.6 Cultivo en Suspensión	26
6.2.2.6.1 Inducción de crecimiento celular en medio líquido	26
6.2.2.6.2 Producción de antocianinas en medio líquido	27
6.2.3 Preparación de extractos	27
6.2.3.1 Extracto de tallo y hojas de planta silvestre	27
6.2.3.2 Extracto de fruto silvestre	27
6.2.3.3 Extracto de callo, medio de cultivo sólido, células en	28
6.2.4 Pruebas preliminares de identificación de grupos funcionales	28
6.2.4.1 Prueba del cloruro férrico	28
6.2.4.2 Prueba de Shinoda	28
6.2.4.3 Prueba del permanganato de potasio	28
6.2.4.4 Prueba de 2,4-dinitrofenilhidracina	28
6.2.4.5 Prueba de Dragendorff	28
6.2.4.6 Prueba de Baljet	29
6.2.4.7 Prueba de Salkowski	29
6.2.4.8 Prueba para cumarinas (lactonas)	29
6.2.4.9 Prueba de DPPH	29
6.2.4.10 Cromatografía en capa fina	29
6.2.5 Espectroscopía Ultravioleta-Visible	30
6.2.5.1 Identificación de grupos funcionales por absorción de UV	30
6.2.5.2 Cuantificación de fenoles y flavonoides	30
6.2.6 Identificación y cuantificación de antocianinas por HPLC	31
6.2.7 Cuantificación de antocianinas por pH diferencial.	31
6.2.8 Actividad antirradical (DPPH).	32
6.2.9 Estadística	33

7. RESULTADOS	34
7.1 Identificación del material vegetal	34
7.2 Cultivo <i>in vitro</i>	34
7.2.1. Pruebas preliminares de germinación	34
7.2.2. Germinación	34
7.2.3 Brotación	37
7.2.4 Cultivo de callo	38
7.2.5 Cultivo en suspensión	39
7.3 Pruebas preliminares de identificación de grupos funcionales	40
7.4 Identificación de grupos funcionales en extracto de fruto	41
7.5 HPLC	42
7.6 Fenoles, flavonoides, antocianinas (pH diferencial) y DPPH	42
8. DISCUSIÓN	45
9 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	49
10. LITERATURA CITADA	51
11 APÉNDICE I MEDIOS DE CULTIVO	61

LISTADO DE TABLAS

Tabla	DESCRIPCIÓN	Página
I	Nomenclatura de las principales especies reactivas del oxígeno (ROS) ¹	16
II	Tratamientos para la germinación de semillas de <i>R. adenotrichus</i> Schlttdl	35
III	Identificación de grupos funcionales en <i>R. adenotrichus</i>	40
IV	Contenido de fenoles, flavonoides, antocianinas y DPPH en callo, fruto y planta silvestre	42
V	Contenido de fenoles y de flavonoides en: callo, cultivo en suspensión, fruto y en planta silvestre	43

LISTADO DE FIGURAS

Figura	DESCRIPCIÓN	Página
1	Planta silvestre de <i>Rubus adenotrichus</i> , (a) trasplantada a maceta, (b) desarrollo de tallos largos, (c) en su hábitat natural con flores y frutos, (d) fruto maduros.	7
2	Distribución geográfica (puntos amarillos) de <i>Rubus adenotrichus</i>	8
3	Estructura básica de los flavonoides.	11
4	Flavonoides más comunes en alimentos.	12
5	Antocianidinas más comunes en las plantas	13
6	Biosíntesis general de antocianinas	15
7	Germinación <i>in vitro</i> de <i>R. adenotrichus</i> . (a) Estructura y dureza de la testa, (b) Germinación de semilla del tratamiento 6, (c) Plántula germinada del tratamiento 3.	35
8	Germinación de semillas de <i>Rubus adenotrichus</i> Schltdl.	36
9	. Efecto de los tratamientos en la germinación de semillas de <i>Rubus adenotrichus</i>	37
10	Desarrollo de plantas <i>in vitro</i> de <i>Rubus adenotrichus</i> Schltdl. (a) Plantas de 8 semanas. (b) Plantas de 20 semanas. (c) Plantas con raíces desarrolladas. (d) Planta <i>in vitro</i> con gran número de brotes. La escala de la barra representa 1 cm.	37
11	Formación de callo de <i>Rubus adenotrichus</i> . (a) Inicia proliferación celular. (b) Callo con inicio de pigmentación. (c) Callo friable incoloro. (d) Callo pigmentado y friable. La barra de escala representa 1 cm.	38
12	Callo friable con células pigmentadas (antocianinas)	39
13	Inoculación de células cultivo en suspensión	40
14	Prueba de DPPH: a) Extracto de planta, b) Extracto de callo, c) Vitamina C	40
15	Espectro ultravioleta-visible del extracto metanólico de fruto silvestre	41
16	Extracto metanólico de fruto de <i>R. adenotrichus</i> y cromatograma HPLC	42

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
BA	6-bencilaminopurina
CE	Equivalentes de catequina
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
g	Gramo
GA ₃	Ácido giberélico
GAE	Equivalentes de ácido gálico
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IAA	Ácido Indolacético
IBA	Ácido Indol-3-butírico
K	Kinetina
M	Molar
MB	Medio de cultivo MS a ½ macronutrientes (50%)
µg	Microgramos
µm	Micrómetros
mg	Miligramo
mM	Milimolar
MS	Medio Murashige and Skoog
N	Normal
NAA	Ácido α-naftalen-acético
nm	Nanómetros
PVP	Polivinilpirrolidona
UV-VIS	Ultravioleta-visible
VCE	Volumen celular empacado
WPM	Woody Plant medium

RESUMEN

En la actualidad tienen una gran demanda las sustancias antioxidantes debido a que tienen efectos benéficos en contra de enfermedades degenerativas como el cáncer. Las plantas del género *Rubus* contienen metabolitos secundarios con actividad antioxidante, *Rubus adenotrichus* es una planta silvestre que crece en México y produce las zarzamoras. El cultivo *in vitro* de células vegetales es una alternativa para la producción controlada de metabolitos secundarios como los antioxidantes. En este trabajo se determinaron las características antioxidantes de la planta y fruto de *Rubus adenotrichus* y las condiciones para el cultivo *in vitro* así como la producción de antocianinas por cultivo de células. En los frutos silvestres (fruto seco) se obtuvo un total de 29.23 ± 1.4 mg GAE/g de fenoles, 5.26 mg CE/g de flavonoides y 12.3 mg/g de antocianinas. También se determinó la capacidad para inhibir radicales libres: CE_{50} 148 μ g/mL por el método DPPH y se identificó la antocianina cianidina 3-glucósido por HPLC. Para el cultivo *in vitro* se observó que las semillas de zarzamora presentan dificultad para la germinación por lo que se aplicaron varios tratamientos pregerminativos, el tratamiento en el que se obtuvo el más alto porcentaje de germinación fue la eliminación parcial de la cubierta de la semilla, el medio de cultivo y los reguladores de crecimiento no influyeron en el porcentaje de germinación. Las plantas germinadas *in vitro* generaron brotes y raíces con las características de las plantas silvestres. El crecimiento celular fue abundante, se obtuvo un callo friable y con pigmento morado que contenía fenoles y flavonoides. Después de varias resiembras y selección de las células se obtuvo un callo con células rojas con un contenido de fenoles de 24.09 mg GAE/g, flavonoides: 4.33 mg CE/g, antocianinas 1.06 mg/g de células secas, con capacidad para inhibir radicales libres: EC_{50} 184 μ g/mL. En el cultivo de células en suspensión proliferaron células con pigmento morado que produjeron fenoles (1.81 mg GAE/g) y flavonoides (0.29 mg CE/g). Este estudio establece las bases del cultivo *in vitro* de esta especie con el fin de producir metabolitos secundarios con capacidad antioxidante, tales como fenoles, flavonoides y antocianinas útiles para la salud humana.

1.1 ABSTRACT

At present, the antioxidants are in high demand because they have beneficial effects against degenerative diseases like cancer. *Rubus* plants contain secondary metabolites with antioxidant activity *Rubus adenotrichus* is a wild plant that grows in Mexico and produces blackberries. In vitro culture of plant cells is an alternative for the controlled production of secondary metabolites as antioxidants. In this study we determined the antioxidant properties of plant and fruit of *Rubus adenotrichus* and conditions for in vitro culture as well as the production of anthocyanins by cell culture. The berries studied contain phenols 29.23 ± 1.4 mg GAE/g, flavonoids 5.26 mg CE/g and anthocyanins 12.3 mg/g. We also determined the ability to inhibit free radicals: CE_{50} 148 μ g/mL by DPPH method and the anthocyanin cyanidin 3-glucoside was identified by HPLC. Blackberry seeds have difficulty germinating so several pre-germination treatments were applied; the treatment which achieved the highest germination percentage was the one in which part of the seed coat was manually removed; the culture medium and growth regulators did not influence the germination percentage. *In vitro* germinated plants generated shoots and roots with the characteristics of wild plants. Cell growth was abundant, friable callus was obtained with a purple pigment that contained phenols and flavonoids. After reseeded and selection of callus cells it was obtained a callus with red cells that contained phenols: 24.09 mg GAE/g, flavonoids: 4.33 mg CE/g, anthocyanins: 1.6 mg/g dry cell, able to inhibit free radicals: EC_{50} 184 μ g/mL. In the culture of cells in suspension, cells proliferated with purple pigment and they produced phenols (1.81 mg GAE/g) and flavonoids (0.29 mg CE/g). This study provides the basis of in vitro culture of this species to produce secondary metabolites with antioxidant capacity, such as phenols, flavonoids and anthocyanins useful for human health.

INTRODUCCIÓN

El género *Rubus* pertenece a la familia Rosácea, es uno de los más diversos y de amplia distribución geográfica, presenta una gran diversidad morfológica y genética; comprende un gran número de especies silvestres además de las que se cultivan domesticadas por sus frutos comestibles (Salazar *et al.*, 2007, Jennings, 1988). El consumo de frutos de este género ha tenido gran aceptación en años recientes por su elevado poder antioxidante y su relación con la salud (Seeram *et al.*, 2006). En las plantas de este género se ha encontrado un alto contenido y gran variedad de sustancias fenólicas, Milivojević *et al* (2011) reporta una correlación positiva entre el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante y recomienda utilizar especies silvestres en programas de cultivo, como fresa y zarzamora con el fin de aumentar el valor nutritivo y los beneficios a la salud.

Un grupo importante de estas sustancias son los flavonoides, ampliamente conocidos por sus propiedades benéficas para la salud. Las antocianinas son un subgrupo de los flavonoides, son pigmentos responsables del variado color rojo a morado en muchas frutas vegetales y cereales. Se ha intensificado el interés en estos pigmentos por su potencial como colorante natural y por sus propiedades terapéuticas. Los beneficios a la salud asociados con extractos de antocianinas incluye reducción del riesgo de enfermedades coronarias, anticancerígeno y actividad antitumoral, anti-inflamatorio y efecto antidiabético, mejoramiento de la agudeza visual y mejoramiento cognitivo conductual. Las propiedades bioactivas de las antocianinas abren nuevas perspectivas para el uso de estos pigmentos en la obtención de productos coloreados con valor agregado para el consumo humano.

3. HIPÓTESIS

El cultivo *in vitro* de células de *Rubus adenotrichus* (zarzamora) produce metabolitos secundarios con actividad antioxidante entre las cuales se encuentran las antocianinas.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones para el cultivo “in vitro” de *Rubus adenotrichus* que permitan producir antocianinas

OBJETIVOS PARTICULARES

- Colectar e identificar taxonómicamente la planta y el fruto de *Rubus adenotrichus*.
- Determinar las condiciones de desinfección, el método pregerminativo más adecuado y la influencia de los reguladores de crecimiento en la germinación *in vitro* de las semillas.
- Determinar las condiciones del cultivo *in vitro* para la generación de brotes y el mantenimiento de plántulas obtenidas de la germinación *in vitro*.
- Establecer las condiciones de desinfección de explantes de hojas y las condiciones del cultivo *in vitro* para la formación de callo.
- Establecer las condiciones del cultivo *in vitro* de células en suspensión.
- Identificar los metabolitos secundarios (grupos funcionales) en extractos metanólicos planta silvestre y de callo.
- Identificar antocianinas mediante bandas de absorción UV-VIS y HPLC
- Identificar y cuantificar fenoles y flavonoides con pruebas coloridas y espectroscopía UV-VIS
- Determinar la actividad anti-radical de los extractos: fruto silvestre, planta silvestre y callo.
- Cuantificar antocianinas en extractos metanólicos con HPLC y pH diferencial.

5. ANTECEDENTES

5.1 Generalidades del género *Rubus*

El género *Rubus* pertenece a la familia de las Rosáceas, comprende más de 700 especies distribuidas en todo el mundo (Tomczyk and Gudej, 2005; Mertz *et al.*, 2007). Las hojas de *Rubus idaeus* han sido usadas tradicionalmente como relajante y estimulante del útero durante el parto, para el tratamiento de diarrea y como astringente. Investigaciones de varias especies de *Rubus* han mostrado posible aplicación en las infecciones bacterianas, el dolor, la inflamación y la ansiedad (Patel *et al.*, 2004). Los extractos de *Rubus chigii* han presentado una buena actividad inhibidora de radicales libres (Ding, 2011).

Una diversidad de especies del género *Rubus* se agrupan con el nombre común de zarzamora, en este trabajo se estudió la especie *Rubus adenotrichus*.

5.1.1 Posición taxonómica, descripción botánica y usos de *Rubus adenotrichus*

Reino: Vegetal

Subreino: Cormofita

División: Espermatofita

Subdivisión: Angiospermas

Clase: Dicotiledóneas

Orden: Rosales

Familia: Rosáceas

Género: *Rubus*

Especie: *adenotrichus*

Nombre científico: *Rubus adenotrichus*

(<http://www.eol.org/pages/300826>)

Rubus adenotrichus es un arbusto perenne con hábito de crecimiento trepador, tallos semirrectos de longitud variable (hasta 5 m de longitud, Figura 1a y 1b), redondeados, espinosos, ramificados y constantemente se forman nuevos brotes en la base de la planta. Las hojas están compuestas de 3 a 5 folíolos de 5 a 10 cm de largo, ápice agudo, borde

doblemente aserrado, pecíolos cilíndricos, blancuzcos y pubescentes, el haz piloso con algunas espinas en la superficie y el envés pubescente y algunas espinas en la nervadura central; flores de color blanco o rosa con abundantes estambres (Figura 1c); fruto ovoide de aproximadamente 4 cm de largo y 2 cm de ancho, formado por varias drupas jugosas pequeñas, de color rojo o negro cuando están maduras y sabor ácido (Figura 1d).

(<http://www.oirsa.org/aplicaciones/subidoarchivos/BibliotecaVirtual/BuenasPracticasMoraOrganica.pdf>).



Figura 1. Planta silvestre de *Rubus adenotrichus*, (a) trasplantada a maceta, (b) desarrollo de tallos largos, (c) en su habitad con flores y frutos, (d) frutos maduros.

El fruto es comestible, se prepara en atole, tamales, vino y mermelada principalmente. La raíz se utiliza como fortificante (Navarro y Avendaño, 2002), para curar úlceras en la boca, hemorroides (Sánchez *et al.*, 2003) y para la disentería

(<http://www.oirsa.org/aplicaciones/subidoarchivos/BibliotecaVirtual/BuenasPracticasMoraOrganica.pdf>).

5.1.2 Distribución de *Rubus adenotrichus*

Rubus adenotrichus se encuentra en centro y Sudamérica, de México a Ecuador (Figura 2, <http://www.eol.org/pages/300826>). Crece en lugares húmedos, a la orilla de bosques de pino y pino-encino, en un rango de altitud de 1200 a 3400 metros sobre el nivel del mar. En México se encuentra en bosques mesófilos de montaña (Equihua *et al.*, 2007).



Figura 2. Distribución geográfica (puntos amarillos) de *Rubus adenotrichus*

5.2 Fenoles

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de las plantas, algunas de estas sustancias son indispensables para las funciones fisiológicas y otras son de utilidad para defenderse ante situaciones de estrés. Los fenoles intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas y en procesos defensivos frente a patógenos, predadores o radiación ultravioleta, son sustancias químicas que poseen al menos un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilo, su estructura molecular puede

incluir grupos funcionales como ésteres, metil-ésteres y glicósidos entre otros (Martínez-Valverde *et al.*, 2000; Duthie and Crozier, 2000).

Aunque existe una gran variedad de compuestos fenólicos en las plantas, la mayor parte de ellos tienen como origen metabólico común la ruta del ácido shikímico que conduce mediante la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina) a los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos y derivados, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano) (Robards *et al.*, 1999). Otra ruta de biosíntesis importante para los fenoles es la de los poliacetatos por la cual se originan quinonas, xantonas y orcinoles entre otros. Algunos compuestos fenólicos como es el caso de los flavonoides, se originan a través de rutas metabólicas mixtas, en este caso se forman por la combinación de la vía del sikimato y del acetato.

Las distintas familias de compuestos fenólicos se caracterizan principalmente por el número de átomos de carbono de su esqueleto básico molecular:

- Ácidos cinámicos (C6-C3)
- Ácidos benzoicos (C6-C1 o C6-C2)
- Flavonoides (C6-C3-C6)
- Proantocianidinas o taninos condensados ((C6-C3-C6)_n)
- Estilbenos (C6-C2-C6)
- Cumarinas (C6-C3)
- Lignanos (C6-C3-C3-C6)
- Ligninas ((C6-C3)_n)

Así, los compuestos fenólicos comprenden desde moléculas simples como ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, flavonoides hasta compuestos altamente polimerizados como los taninos y ligninas (Siriwoharn and Wrolstad, 2004; Häkkinen *et al.*, 1999). Los fenoles se presentan en las plantas en cantidades y tipos que varían en función de la especie vegetal, variedad, parte de la planta, horas de exposición solar, grado de madurez, condiciones de cultivo, procesado, almacenamiento entre otros (García, 2005). Se presentan en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilo, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello la forma más común de

encontrarlos en la naturaleza es en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y disolventes orgánicos.

Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. Los compuestos a los que se encuentran unidos con más frecuencia son: glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos (Bravo, 1998; King y Young, 1999, Duthie *et al.*, 2003).

En la actualidad los fenoles de origen vegetal presentan gran interés nutricional por su actividad antioxidante que se atribuye a su facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre y a la posibilidad de deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático (Duthie *et al.*, 2003). Los compuestos fenólicos poseen además una estructura química ideal para captar iones metálicos (principalmente hierro y cobre) y por tanto para inhibir la formación de radicales libres a través de reacciones de Fenton (Rice-Evans *et al.*, 1997). Además de las propiedades antioxidantes, a estos compuestos se les atribuyen actividades biológicas benéficas para la salud. Entre estas destacan sus efectos vasodilatadores, anticarcinogénicos, antiinflamatorios, bactericidas, estimuladores de la respuesta inmune, antialérgicos, antivirales, efectos estrogénicos, o inhibidores de enzimas prooxidantes, como ciclooxigenasa, lipooxigenasa y xantina oxidasa (Cao *et al.*, 1997).

5.2.1 Flavonoides

Los flavonoides son los metabolitos secundarios fenólicos más distribuidos en las plantas, generalmente se encuentran en forma de glicósidos en frutos y vegetales (Hertog *et al.*, 1992, Harborne and Williams, 2000). Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpirano $C_6C_3C_6$, formado por dos anillos de fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8 y los del anillo B desde 2' al 6' como se muestra en la figura 3 (Harborne, 1994, Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

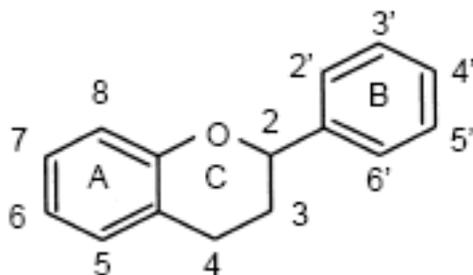


Figura 3. Estructura básica de los flavonoides.

Fuente: Martínez-Flórez *et al.*, 2002.

Los flavonoides se biosintetizan por la combinación de dos rutas metabólicas, la ruta de ácido shikímico y la ruta del ácido malónico. Posteriormente ocurren modificaciones que adicionan ó reducen el número de grupos hidroxilo, generan la metilación de grupos hidroxilo en posición orto, la isoprenilación, la dimerización (para producir biflavonoides) y la glicosilación produciendo O y C-glicósidos. El azúcar que generalmente está presente en los flavonoides es la glucosa para formar los O-glicósidos. Los flavonoides naturales suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos y se encuentran generalmente unidos a azúcares en forma de glicósidos, aunque también se presentan con relativa frecuencia como agliconas libres (Cartaya y Reynaldo, 2001).

Los flavonoides se clasifican de acuerdo a su estructura química, los más comunes en alimentos son los flavonoles, flavonas, antocianidinas, flavanoles, isoflavonas, catequinas, charconas y flavandioles. Dentro de todos estos grupos las flavonas (apigenina, luteolina y diosmetina), los flavonoles (quercetina, miricetina y kampferol) y sus glicósidos son los compuestos más abundantes en vegetales (Hertog *et al.*, 1992).

En la figura 4, se muestran algunas estructuras básicas de los flavonoides antes mencionados, observando que mantienen la estructura básica $C_6C_3C_6$ y mostrando variantes en el tipo de sustituyentes y en la posición de estos (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

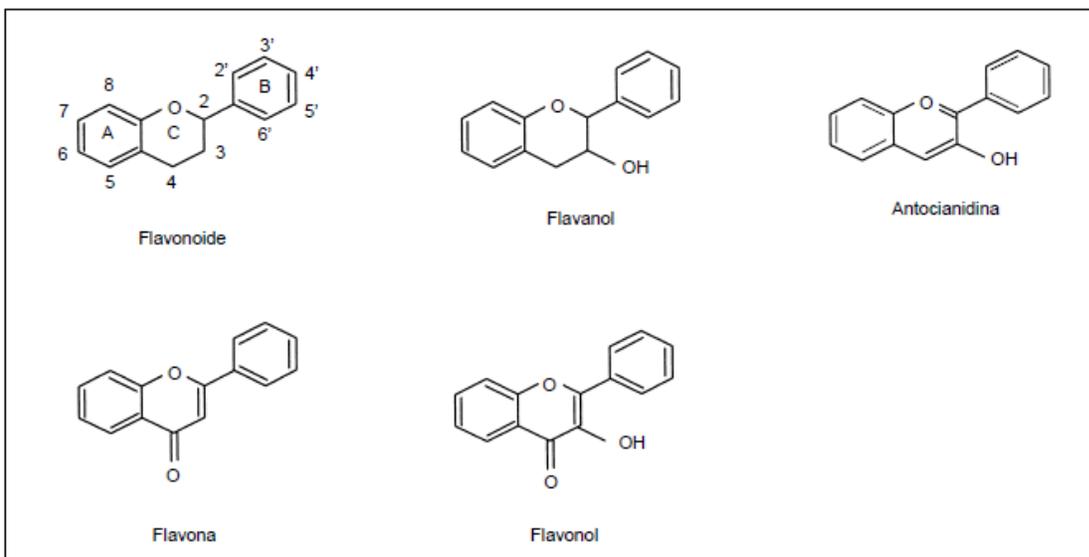


Figura 4. Flavonoides más comunes en alimentos.

Fuente: Martínez-Flórez *et al.*, 2002.

Varios estudios han sugerido que los flavonoides tienen un beneficio potencial para la salud (Beattie *et al*, 2005, He and Giusti, 2010), en particular, se ha documentado una asociación inversa entre el consumo elevado de flavonoides y la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Mazza, 2007). La actividad biológica de los flavonoides que ha resultado de mayor interés es la actividad antioxidante, tienen la capacidad de reducir los radicales libres y así pueden contribuir en la regulación del mecanismo oxidoreducción junto con los antioxidantes endógenos. Algunos flavonoides suprimen la formación de especies reactivas del oxígeno por la quelación de iones de metales de transición o por la supresión del avance de reacciones superóxido que generan especies activas de oxígeno (Pietta, 2000).

5.2.2 Antocianinas

Las antocianinas son pigmentos solubles en agua responsables del color azul, púrpura y rojo de muchos tejidos de plantas (cerezas, ciruelas, fresas, frambuesas, zarzamoras, uvas, grosella), son un subgrupo de los flavonoides y se encuentran principalmente como glicósidos o acilglicósidos de su respectiva aglicona de antocianidina

(Mazza, 1993, Clifford, 2000; Scalbert and Williamson, 2000). Las agliconas raramente se encuentran en la planta fresca. Aproximadamente 17 antocianidinas se encuentran en la naturaleza (Mazza, 1993), mientras que solo 6 de ellas cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina, pelargonidina y la malvidina se encuentran ampliamente distribuidas (Figura 5).

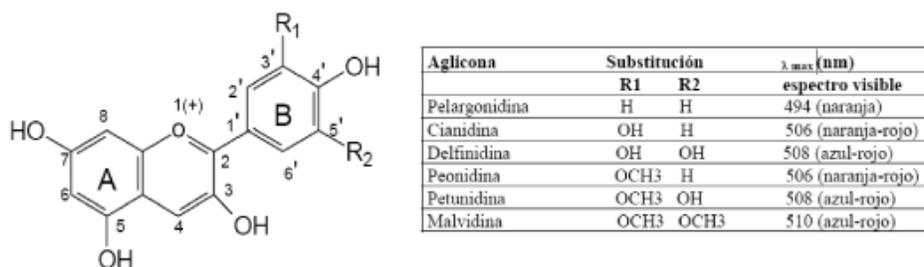


Figura 5. Antocianidinas más comunes en las plantas

Fuente: Durst and Wrolstad, 2001.

Se han reportado más de 600 antocianinas de origen natural (Anderson, 2002, Anderson and Jordheim, 2004), varían en el número y posición de los grupos hidroxilo y metoxilo unido al esqueleto básico de antocianidina, la identidad, número y posición de los azúcares, el grado de acilación del azúcar y la identidad del agente de acilación. Los azúcares más comunes son; glucosa, galactosa, ramnosa y arabinosa, normalmente unidos a la posición 3 o a las posiciones 3 y 5, generando diglicósidos (Clifford, 2000). Las antocianinas más comunes en las frutas son los 3-monoglucósidos de cianidina, delphinidina, peonidina, pelargonidina y petunidina, la cianidina-3-galactósido y la cianidina-3-arabinósido (Robards *et al.*, 1999). También se encuentran disacáridos de glucosa (soforósidos), de ramnosa y glucosa (rutinósidos), de xilosa y glucosa (sambubiósidos) y trisacáridos (Clifford, 2000). Además de las glicosilaciones, se pueden encontrar antocianos acilados (Robards *et al.*, 1999) con ácidos cinámicos (cafeico, p-cumárico, ferúlico y sinápico) y ácidos alifáticos (acético, málico, malónico, oxálico o succínico) (Clifford, 2000).

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilos y metoxilos de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia

tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas. Stintzing *et al.*, 2002, demostraron que el tipo de sustitución glicosídica y la acilación producen efectos en el tono de las antocianinas, sustituciones glicosídicas en la posición 5 al igual que acilaciones aromáticas presentan desplazamientos hacia tonalidades púrpura. El color intenso de las antocianinas ha despertado un gran interés por considerarlas como potenciales colorantes en la industria de los alimentos, por sus actividades biológicas estas biomoléculas se podrían utilizar en la formulación de fármacos o como nutraceúticos en alimentos. Los factores químicos que determinan el color y la estabilidad de las antocianinas son además de la estructura química, pH, concentración, temperatura, presencia de oxígeno, ácido ascórbico y la actividad de agua de la matriz donde se aplica (Garzón, 2008).

Se cree que las antocianinas juegan un papel importante en la polinización y en la dispersión de las semillas.

Las antocianinas presentan actividades biológicas, limpieza de radicales libres, antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno, antilipooxidación y prevención de la obesidad (Kang *et al.*, 2003, Liu, 2003, Lila, 2004, He and Giusti, 2010). La actividad antioxidante de las antocianinas ha sido ampliamente estudiada y demostrada (Kahkonen and Heinonen, 2003, Zheng and Wang, 2003).

El anillo A de la estructura de los flavonoides (Figura 5) se biosintetiza a través de la ruta del ácido malónico con la condensación de 3 moléculas de malonil-CoA y el anillo B se forma a través de la ruta del ácido shikímico. El ácido shikíquimo forma la fenilalanina por acción de la enzima fenilalanina amonio liasa, luego pierde una molécula de amonio para convertirse en ácido para-cumárico. El para-cumaril-CoA se condensa con 3 moléculas de maolonilCoA para formar una chalcona de 15 C por acción de chalcona sintetasa, por isomerización se transforma en una flavona. Finalmente la flavona se transforma en la correspondiente antocianidina por hidroxilación en carbono 3 y después deshidratación. Esta molécula se estabiliza por glicosilación del heterociclo y después posibles metilaciones de los hidroxilos seguido de acilaciones (Figura 6).

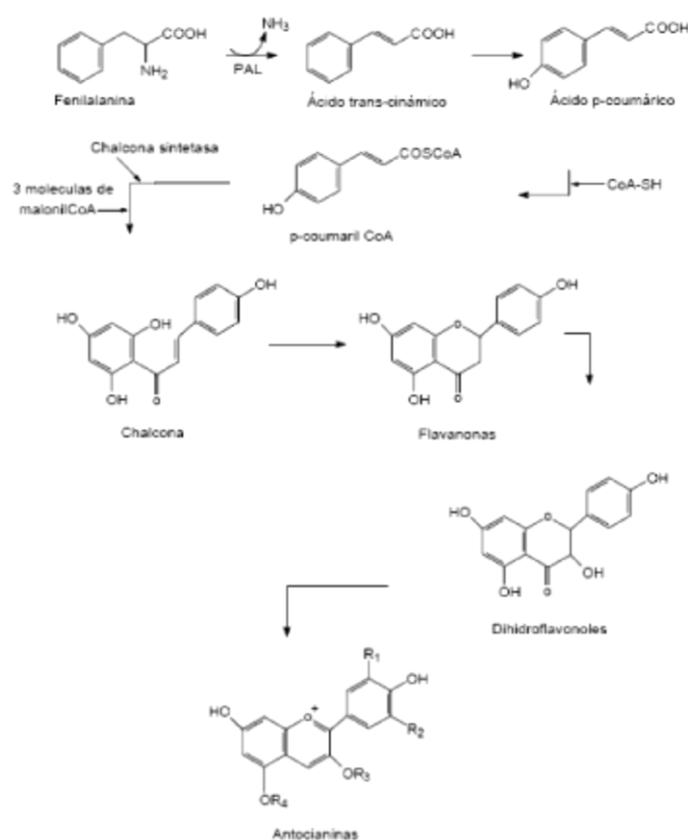


Figura 6. Biosíntesis general de antocianinas

Fuente: Delgado-Vargas *et al.*, 2000.

5.2.3. Especies reactivas del oxígeno y radicales libres.

Una especie oxidante es aquella capaz de aceptar electrones de modo que va a generar un desequilibrio electrónico en las moléculas vecinas. El término antioxidante hace referencia a cualquier sustancia que, estando presente a una concentración más baja comparada con la de un sustrato oxidable, es capaz de retrasar o prevenir la oxidación de dicho sustrato. Los radicales libres se definen como especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, lo cual las hace altamente inestables y reactivas. Para estabilizarse reaccionarán rápidamente con moléculas adyacentes mediante reacciones de óxido-reducción. El término especies reactivas del oxígeno (Tabla I) es un término colectivo que incluye radicales libres y ciertas especies no radicales que son oxidantes y/o

se convierten fácilmente en radicales libres, como por ejemplo HClO, HBrO, O₃, ONOO-, ¹O₂, o H₂O₂ (Halliwell y Whiteman 2004).

Tabla I. Nomenclatura de las principales especies reactivas del oxígeno (ROS)¹

Nombre del radical	Estructura química	Nombre no radical	Estructura química
Hidroxilo	•OH	Peróxidos orgánicos	ROOH
Alcoxilo	RO•	Oxígeno singlete	¹ O ₂
Superóxido	HOO•	Peróxido de hidrógeno	H ₂ O ₂
Peróxido	O ₂ •	Ácido hipocloroso	HClO
Óxido nítrico	NO•	Ácido nitroso	HNO ₂
Dióxido de nitrógeno	NO ₂ •	Catión nitrilo	NO ₂ ⁺
		Peroxinitrilo	ONOO ⁻
		Ácido peroxinitroso	ONOOH
		Alquil peroxinitrito	RONOO
		Ozono	O ₃
		Ácido hipobromoso	HBrO

¹Modificada de Halliwell y Whiteman (2004)

El mecanismo de oxidación celular desempeña un papel clave en el desarrollo de cáncer y enfermedades coronarias, los radicales libres generados pueden atacar biomoléculas como lípidos, proteínas o ADN, este proceso puede ser inhibido por sustancias antioxidantes (Van der Sluis *et al.*, 2001).

5.3 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de tejidos de plantas es una alternativa para resolver la dormancia (Daubeny, 1996), problemas de plagas (Tsao *et al.*, 2000) y para establecer una micropropagación eficiente (Martinussen *et al.*, 2004, Wu *et al.*, 2009) así como la producción de biomoléculas de interés en las industrias de alimentos y farmacéutica (Chung *et al.*, 2007).

Reed (1990) reportó la respuesta del crecimiento *in vitro* de germoplasma almacenado de 256 especies de este género *Rubus*. El cultivo de meristemas de *Rubus* seguido por micropropagación *in vitro* es una técnica valiosa para la producción en masa de germoplasma libre de enfermedades (Donnelly *et al.*, 1980). El cultivo *in vitro* de un gran número de especies de este género se ha reportado: *R. idaeus* y *R. occidentalis* (Anderson, 1980), *R. idaeus* cv Royalty (Berejsza-Wysecki y Hrazdin, 1994), *R. idaeus* (Erig *et al.* ,

2002), *R. spp* (Tsao y Reed, 2002), *R. pubescens* Raf (Debnath, 2004), *R. glaucus* Bent (Solórzano *et al.*, 2004, Martínez *et al.*, 2005), *R. geoides* (Vater y Arena, 2005), *R. chamaemorus* L (Debnath, 2007; Thiem, 2003), entre otros; sin embargo, hasta el momento no hay informes sobre la propagación in vitro de *R. adenotrichus*.

5.3.1 Germinación

5.3.1.1 Dormancia de semillas del género *Rubus*

Dormancia es un periodo en el que el ciclo biológico de un organismo se detiene temporalmente. Hay dos tipos básicos de dormancia de semillas, el primero se llama dormancia del tegumento o dormancia externa, que es causada por la presencia de una cubierta dura que protege a la semilla y no permite la entrada del agua u oxígeno hasta el embrión, por eso éste no puede ser activado, el segundo tipo se llama dormancia del embrión o dormancia interna la cual es causada por la condición del embrión que no permite la germinación (Black *et al.*, 1987).

Las semillas del género *Rubus* presentan una dormancia profunda causada por la cubierta impermeable de la semilla (endocarpio), la resistencia mecánica de la cubierta al crecimiento, inhibidores químicos en el endocarpio y dormancia del embrión (Jennings, 1988; Nybom, 1980; Ourecky, 1975). La dormancia de las semillas es una característica adaptativa que mejora la supervivencia de la próxima generación, optimizando la distribución de la germinación en el tiempo, sin embargo, a veces es considerada un rasgo indeseable (Kermode, 2005). La dormancia causa retraso y bajas tasas de germinación.

5.3.1.2 Tratamientos pregerminativos

En la naturaleza las *cubiertas* duras de las semillas se ablandan por diversos agentes del ambiente, como abrasión mecánica, congelamiento y deshielos alternados, ataque por microorganismos del suelo, paso por el tracto digestivo de aves y mamíferos, desgaste por el fuego, sol y agua (Monroy, 1985).

En el Laboratorio se han utilizado una variedad de tratamientos para mejorar la germinación, como la escarificación química (ácido sulfúrico, hipoclorito de sodio), escarificación mecánica (eliminación de parte del endocarpio, testa y del endospermo), el tratamiento hormonal (ácido giberélico), exposición a altas temperaturas (inmersión en

agua hirviendo), la estratificación en frío, la inmersión en agua oxigenada y el tratamiento con nitratos.

El tratamiento con ácido sulfúrico cambia significativamente la estructura y el grosor de las cubiertas de la semilla así como su peso, para bayas negras se recomienda largos periodos de tiempo de escarificación con ácido sulfúrico concentrado: de 40 a 60 min (Ourecky, 1975), 2 h (Nybom, 1980), 3 h (Moore *et al.*, 1974). Por otro lado Peacock y Hummer (1996) reportaron que el tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 30 min aumenta significativamente la germinación de *R. paraviflorus*, *R. eustephanos* y *R. ursinus*.

Ke *et al.* (1985) reportaron que el corte de aquenios del género *Rubus* aumenta la velocidad y reduce el periodo lag. de la germinación en comparación con aquenios enteros. Sin embargo, esto generalmente no es posible para los lotes de semillas de gran tamaño.

A pesar de los esfuerzos para mejorar la uniformidad de la germinación, los resultados son muy variables dentro y entre las especies y parece que no existe un método estándar para la germinación de las especies en el género *Rubus*.

5.3.2 Cultivo de tejidos vegetales

Actualmente se ha incrementado la demanda de la población por productos naturales lo que ha generado la orientación de la investigación hacia el cultivo *in vitro* de células vegetales para la potencial producción de metabolitos secundarios. El cultivo de células vegetales se ha utilizado como fuente de sabores, aromas, fragancias, biocombustibles, enzimas, preservativos, cosméticos, pigmentos naturales y compuestos bioactivos (Trigiano and Gray, 2005). Los sistemas de producción de pigmentos en callo y en suspensión se caracterizan por dos fases, una de crecimiento celular y posteriormente la fase de acumulación de producto, el medio de cultivo y las condiciones que son mejores para el crecimiento celular pueden ser diferentes que las que inducen la mayor producción de pigmento.

5.3.2.1 Cultivo de células vegetales en medio semisólido

El cultivo *in vitro* de callo de un gran número de especies de plantas en condiciones controladas han presentado síntesis y acumulación de antocianinas (Cállebáut *et al.*, 1990; Shuler *et al.*, 1990; Kobayashi *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 1993; Zubko *et al.*, 1993; Hirner *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2001; Konczak-Islam *et al.*, 2003, 2000; Grusak *et al.*, 2004). En el cultivo celular de *Vitis*, *Ipomaea*, *Glehinia* y *Vaccinum* ha sido reportada la acumulación de antocianinas en cantidades mayores que en partes de la planta crecida *in vivo* (Cormier and Do, 1993; Kandil *et al.*, 2000; Lila, 2004).

5.3.2.2 Cultivo de células vegetales en suspensión

El cultivo en suspensión de células de cultivo vegetales es un método útil para llevar a cabo estudios de inducción de embriogénesis somática, crecimiento y diferenciación, organogénesis, genética, bioquímica y metabolismo así como la obtención de metabolitos secundarios como fenoles, flavonoides, antocianinas, antraquinonas entre otras (Pérez, 1998)

5.3.2.3 Factores que influyen en la producción de antocianinas en cultivo *in vitro*

La producción de antocianinas es afectada por un gran número de factores: los componentes del medio de cultivo (tipo y niveles de azúcares, nitratos, amonio), en los reguladores de crecimiento vegetal, pH, temperatura e iluminación. Estos factores producen estrés y como consecuencia la expresión del pigmento.

Fuente de Carbono. Las dos formas de variación de la fuente de carbono es su tipo y concentración. La fuente más utilizada es la sacarosa en una concentración de 30 g/L, sin embargo se ha utilizado una gran variedad de concentraciones de sacarosa y también se ha utilizado la galactosa (Trigiano and Gray, 2000).

Reguladores de crecimiento vegetal. El efecto de estas sustancias depende del medio de cultivo empleado y de la combinación con otros reguladores de crecimiento, por tal motivo el resultado óptimo se obtendrá de la combinación de estos factores. Pasqua *et al.*, 2005 reportaron un aumento de 40% en la producción de antocianinas en el cultivo de *C. acuminata* cuando agregaron ácido 2,4-diclorofenoxiacético también obtuvieron buenos

resultados con la kinetina; la adición de BA incrementó la producción de antocianinas (Yahia *et al.*, 1998).

pH. El crecimiento óptimo de las células vegetales en suspensión se da en un pH entre 5 y 6, el cual puede cambiar en el curso del cultivo, dependiendo principalmente del consumo de nitratos y de amonio.

Temperatura. La temperatura es un factor importante en el cultivo de células vegetales, juega un papel fundamental en la estabilidad de las proteínas, en transcripción de genes y transferencia de calor y masa (Yeoman y Yeoman, 1996, Schlatmann *et al.*, 1996). Una selección adecuada de la temperatura puede afectar la acumulación de metabolitos secundarios, en *F. ananasa* la temperatura óptima del proceso logró aumentar un 300% la producción de antocianinas (Zhang *et al.*, 1997).

Iluminación. Las características de la iluminación como la longitud de onda, intensidad y fotoperiodo influyen en el crecimiento y en la producción de metabolitos secundarios. El incremento en la intensidad lumínica en suspensiones de *Vitis vinifera* y *C. arabiga* produce cambios significativos en la densidad de la biomasa (Zhang *et al.*, 2002). La producción de antocianinas también es afectada por altas intensidades lumínicas (5klux) aumentan la acumulación de antocianinas en cultivos de *F. x ananassa*, *Perilla frutescens*, *Daucus carota* y *V. vinifera*. En cultivos de *C. acuminata* es esencial la iluminación para activar la producción de antocianinas (Pasqua *et al.*, 2005). El cultivo de explantes en la oscuridad puede ayudar a reducir la oxidación fenólica, los fenoles son productos muy lábiles que se oxidan fácilmente, los productos que se originan por su oxidación pueden ser fitotóxicos y pueden aumentar los procesos de oxidación porque después de la oxidación se convierten ellos mismos en oxidantes muy fuertes (Alonso, 2002).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1 Material biológico

Se colectaron ejemplares de planta silvestre con flores y frutos inmaduros en el mes de marzo de 2007 y en junio del mismo año se colectaron los frutos maduros en el municipio de Tlacolulan del estado de Veracruz, México (2000 msnm). Los frutos fueron transportados en un termo a -4°C , posteriormente se congelaron a -70°C hasta su liofilización. En el mes de diciembre de 2007 se colectaron explantes de hojas para cultivo in vitro, en la misma localidad.

6.1.2 Reactivos químicos

Las sustancias químicas utilizadas fueron de grado analítico a excepción del metanol, acetonitrilo, ácido fosfórico, agua y cyanidin 3-glucoside (kuromanin) que fueron grado HPLC y se adquirieron en Fluka, Sigma-Aldrich Co.

6.2 METODOLOGÍA

6.2.1 Preparación del material biológico

Los ejemplares para identificación taxonómica se canalizaron al herbario del Instituto de Ecología en Xalapa, Veracruz, México.

Las semillas se extrajeron del fruto, se lavaron con agua de la llave, se secaron a temperatura ambiente y se guardaron en un frasco hermético.

Las hojas que se usaron como explantes para la inducción de callo se transportaron en bolsa plástica con agua estéril para evitar su deterioro y se utilizaron al siguiente día después de ser cortadas. Hojas y tallo se secaron a temperatura ambiente para elaborar el extracto.

6.2.2 Cultivo *in vitro*

6.2.2.1 Germinación

6.2.2.1.1 Métodos pregerminativos

Las semillas de *Rubus adenotrichus* requieren de un proceso de escarificación para su germinación, por lo que fueron sometidas a 7 tratamientos pregerminativos, para determinar el mejor. 1) Inmersión por 30 min en ácido sulfúrico concentrado, 2) Inmersión por 60 min en ácido sulfúrico concentrado, 3) inmersión por 120 min en ácido sulfúrico concentrado, 4) inmersión por 180 min en ácido sulfúrico concentrado, 5) lijado manual seguido de una inmersión por 15 min en ácido sulfúrico, 6) lijado manual seguido de una inmersión por 24 h en solución de giberelinas, 7) lijado manual seguido de una inmersión por 24 h en solución de hipoclorito de sodio 1% y retirado de la testa con pinzas y bisturí estériles. Semillas no tratadas fueron usadas como control.

6.2.2.1.2 Medios de cultivo

Para la germinación *in vitro* se empleó el medio Murashige and Skoog 1962 (MS, Apéndice I). En base a este medio se diseñaron diferentes medios de cultivo y se les asignó las siglas MA, MB, MC, MD y ME a los cuales se les adicionó varias combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento: 6-bencilaminopurina (BA), Ácido Indol-3-butírico (IBA) y Ácido giberélico (GA₃) para seleccionar el mejor. Los medios de cultivo empleados fueron los siguientes:

MA: Medio MS adicionado con BA (1 mg/L) y IBA (0.5 mg/L)

MB: Medio MS adicionado con BA (1 mg/L) y GA₃ (0.5 mg/L)

MC: Medio MS adicionado con BA (2 mg/L) y IBA (0.5 mg/L)

MD: Medio MS adicionado con BA (2 mg/L) y GA₃ (0.5 mg/L)

ME: Medio MS sin reguladores

6.2.2.1.3 Desinfección

Los explantes (semillas) se lavaron durante 20 min con agua corriente y unas gotas de detergente líquido comercial, después fueron lavados nuevamente con agua destilada y unas gotas de tween 20 por 5 min, posteriormente se enjuagaron 10 s en etanol, luego se pasaron a una solución de blanqueador al 20% (0.6% de hipoclorito de sodio) con 0.1 mL/L

de tween 20, se lavaron en esta solución en agitación durante 25 min. Finalmente los explantes fueron lavados 3 veces con agua bidestilada estéril en la campana de flujo laminar.

6.2.2.1.4 Inoculación

Para las pruebas preliminares, se utilizaron un total de siete métodos pregerminativos y cinco medios de cultivo, que al combinarlos dieron un total de 35 tratamientos diferentes. Se sembraron 10 semillas para cada tratamiento (5 semillas en cada frasco de 250 mL de capacidad conteniendo 30 mL de medio de cultivo). Para las pruebas definitivas de germinación se utilizaron 3 métodos pregerminativo y dos medios de cultivo por lo que se probaron seis tratamientos diferentes, se sembraron 10 semillas en cada frasco, 10 réplicas de cada uno de los tratamientos además del tratamiento control. Las semillas se sumergieron ligeramente en el medio de cultivo en condiciones asépticas en la campana de flujo laminar.

6.2.2.1.5 Incubación

Una vez sembradas las semillas y etiquetados los frascos se incubaron en el área de cultivo donde se mantuvieron con fotoperiodos de 12 h luz blanca y 12 h oscuridad, a una temperatura de 22 ± 2 °C, se revisaron diariamente durante 60 d.

6.2.2.2 Generación de brotes

6.2.2.2.1 Medios de cultivo

Para la proliferación de brotes y el mantenimiento de las plantas obtenidas de la germinación *in vitro* se utilizaron los medios de cultivo MS y WPM (Woody Plant medium). El WPM se probó sin reguladores, sin antioxidantes y con los antioxidantes ácido L-ascórbico y polivinilpirrolidona (PVP). A estos medios de cultivo se les asignó las siglas ME, MF, MG y MH de acuerdo a la siguiente formulación.

ME:MS sin reguladores de crecimiento

MF: MS adicionado con 1 mg/L de BA

MG: WPM sin reguladores de crecimiento vegetal y sin antioxidantes

MH: WPM adicionado con ácido L-ascórbico (50 mg/L), polivinilpirrolidona (150 mg/L)

La preparación de los medios se describe en el Apéndice I.

6.2.2.2.2 Resiembra e incubación

Las plantas que se obtuvieron por germinación se resembraron cada 4 semanas en los medios de cultivo anteriormente descritos (ME, MF, MG, MH), una planta en cada frasco, se incubaron en el área de cultivo donde se mantuvieron con fotoperiodos de 12 h luz blanca y 12 h oscuridad, a una temperatura de 22 ± 2 °C.

6.2.2.3 Inducción de callo

6.2.2.3.1 Medios de cultivo

Para la proliferación callo se emplearon explantes de hojas se probaron los medios de cultivo Murashige and Skoog (MS), Woody Plant medium (WPM) y medio basal (MB), en algunos casos con reguladores de crecimiento vegetal: 6-bencilaminopurina (BA), Ácido Indol-3-butírico (IBA), Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), Kinetina (K), Ácido α -naftalen-acético (NAA.).

Se asignó las siglas ME, MI, MJ, MK, ML y MM de acuerdo a la siguiente formulación:

ME: MS sin reguladores de crecimiento vegetal.

MI: MB adicionado con BA (2 mg/L) y IBA (0.5 mg/L)

MJ: MS adicionado con BA (2 mg/L) y IBA (0.5 mg/L)

MK: MB adicionado con 2,4-D (1 mg/L) y K (0.5 mg/L)

ML: MS adicionado con NAA (1 mg/L) y K (0.5 mg/L)

MM: WPM adicionado con PVP, ácido ascórbico, 2,4-D (0.5 mg/L) y K (0.75 mg/L) propuesto por Trigiano and Gray 2000 con phytigel en lugar de agar.

La preparación de los medios se describe en el Apéndice I.

6.2.2.3.2 Desinfección

Los explantes de hojas silvestres se lavaron durante 20 min con agua corriente con unas gotas de detergente líquido comercial, después fueron lavados nuevamente con agua destilada y unas gotas de tween 20 por 5 min, posteriormente se dio una inmersión por 10 s en etanol, luego se lavaron durante 15 min con solución blanqueadora al 15% (0.45% de hipoclorito de sodio) adicionada con 0.1 mL de tween 20. Finalmente los explantes fueron lavados 3 veces con agua bidestilada estéril en la campana de flujo laminar.

6.2.2.3.3 Inoculación

Se sembró un explante de hoja en cada frasco, 5 repeticiones en cada medio de cultivo para inducción de callo.

6.2.2.3.4 Incubación

Una vez sembrados y etiquetados los frascos se incubaron en el área de cultivo donde se mantuvieron con fotoperiodos de 12 h luz blanca y 12 h oscuridad, a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y se revisaron diariamente para observar contaminación o formación de callo.

6.2.2.4 Pruebas para inducción de crecimiento celular y producción de antocianinas en medio sólido

Para la inducción de callo (producción de antocianinas) fueron usados los dos medios de cultivo que dieron mejores resultados en las pruebas preliminares: ML y MM.

Con un horador estéril de 1 cm de diámetro se cortaron círculos de hoja previamente desinfectada siguiendo el protocolo ya descrito, se sembró un explante en cada frasco con 30 mL de medio de cultivo, después de tres semanas se subcultivaron las células que habían proliferado, a las 5 y a las 7 semanas se repitió el procedimiento, los cultivos se incubaron en un cuarto oscuro a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ (Trigiano and Gray 2000).

A las 9 semanas de incubación y después de 3 resiembras se subcultivó el callo en el medio de cultivo WPM sólido para producción de pigmento (Apéndice 1), los frascos se incubaron en un cuarto con tres tipos de iluminación constante (luz blanca, luz azul, luz UV) durante seis semanas.

Se escogieron algunos callos friables crecidos en la oscuridad para iniciar el cultivo en suspensión.

6.2.2.5 Viabilidad celular

Para determinar si las células vegetales estaban vivas o muertas, se preparó una solución del colorante azul de Evans (0.25% en agua) y a las muestras depositadas en cubreobjetos se le agregó el colorante para posteriormente observarlas al microscopio, las células muertas se ven de color azul ya que tienen dañada la pared celular y esto permite la penetración del colorante, en cambio las células vivas se ven del color que normalmente aparecen sin colorante.

6.2.2.6 Cultivo en Suspensión

6.2.2.6.1 Inducción de crecimiento celular en medio líquido

Se seleccionaron los callos que presentaban mayor friabilidad, pigmentación y que no presentaban oxidación, se colocaron en caja Petri estéril en la campana de flujo laminar para separar los conglomerados más pequeños e inocularlos en matraces con medio WPM líquido para inducción de crecimiento celular (Apéndice I). Posteriormente se incubaron en las siguientes condiciones: oscuridad, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y agitación orbital constante 100 rpm. A los 8 d de incubación en la campana de flujo laminar se filtró el cultivo por tamices metálicos estériles para seleccionando los agregados celulares entre 500 y 1000 μm de diámetro, estas células se sembraron nuevamente en medio de cultivo líquido en una proporción de aproximadamente el 10% del volumen total de la suspensión. Se realizaron resiembras periódicas cada 15 d transfiriendo unos mililitros de suspensión a un matraz con medio de cultivo en condiciones de esterilidad, conservando la proporción de un inóculo inicial de 10% del volumen total. Se seleccionaron los matraces que tenían células más pigmentadas y aglomerados celulares más homogéneos para resembrar en medio de cultivo para producción de antocianinas.

6.2.2.6.2 Producción de antocianinas en medio líquido

Se tomaron células del cultivo en suspensión para crecimiento celular y se inocularon en WPM líquido para producción de antocianinas (Apéndice I). Estos cultivos se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y agitación pero con iluminación constante con luz blanca. Se monitoreó visualmente la pigmentación de células y del medio de cultivo y se tomaron muestras para determinación cualitativa y cuantitativa de fenoles, flavonoides.

6.2.3 Preparación de extractos:

6.2.3.1 Extracto de tallo y hojas de planta silvestre

Secciones de tallos y hojas secas (2.3 g) se maceraron en mortero con 50 mL de metanol y posteriormente el material se transfirió a un matraz erlenmeyer, se tapó y protegió de la luz y se dejó a temperatura ambiente en reposo durante 8 d, se retiró el disolvente y se repitió la extracción en condiciones similares dos veces más. Los extractos se concentraron a sequedad utilizando presión reducida y se almacenaron en frasco ámbar en refrigeración.

6.2.3.2 Extracto de fruto silvestre

Los frutos congelados se liofilizaron (liofilizador Labconco freeze dryer 5), después se molieron en una licuadora (Osterizer modelo 4108), se pesó en balanza analítica 0.8960 g. La extracción de las sustancias polares se hizo de acuerdo al método de Kim and Lee (2002) con algunas modificaciones, la muestra se depositó en un matraz erlenmeyer, se agregó metanol acidificado (0.01% HCl), posteriormente se agitó durante 15 min a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno y protegido de la luz, se filtró utilizando vacío para recuperar el disolvente, la muestra fue extraída 3 veces más en iguales condiciones. Los extractos se concentraron en rotavaporador (Büchi RII) a 40°C, el extracto se recuperó totalmente y se completó a 100 mL en matraz aforado, se centrifugó y el sobrenadante se filtró en una membrana nylon con poro de 0.45 µm, por último se guardó en un frasco ámbar a -20°C hasta su análisis.

6.2.3.3 Extracto de callo, medio de cultivo sólido, células en suspensión, medio de cultivo en suspensión

Las muestras congeladas se procesaron de igual manera que para la obtención de extracto de fruto.

6.2.4 Pruebas preliminares de identificación de grupos funcionales

6.2.4.1 Prueba del cloruro férrico

A 0.5 mL de extracto metanólico se agregaron tres gotas de solución de FeCl_3 1% y se observó la aparición de color violeta que es indicativa de fenoles y/o enoles, se comparó con un blanco del extracto libre de reactivo y con un blanco de agua destilada con cloruro férrico (Shriner *et al.*, 1982).

6.2.4.2 Prueba de Shinoda

A 0.5 mL de extracto metanólico se agregó un trocito de Mg y 3 gotas de HCl concentrado, se observó la coloración que apareció inmediatamente y se determinó si era indicativa del grupo de benzopirona (Domínguez, 1973, Harborne, 1998).

6.2.4.3 Prueba del permanganato de potasio

A 0.5 mL de extracto metanólico se agregó unas gotas de solución de KMnO_4 al 2%, se observó la presencia de precipitado café de dióxido de manganeso indicativa de insaturaciones en la cadena carbonada.

6.2.4.4 Prueba de 2,4-dinitrofenilhidracina

A 0.5 mL de extracto metanólico se agregó unas gotas de solución de 2,4-dinitrofenilhidracina, se observó la formación de precipitado amarillo o naranja que es la fenilhidrazona producida por un aldehído o una cetona.

6.2.4.5 Prueba de Dragendorff

A 0.5 mL de extracto metanólico se agregó unas gotas de reactivo de Dragendorff y se observó la aparición de color naranja o rojo oscuro persistente por 24 h, prueba positiva para alcaloides.

6.2.4.6 Prueba de Baljet

A 0.5 mL de extracto metanólico se agregó unas gotas de la mezcla de reactivos A y B de Baljet y se observó la aparición de color naranja o rojo oscuro en caso de sesquiterpenlactonas.

6.2.4.7 Prueba de Salkowski

A 0.5 mL de extracto metanólico se agregó 1 mL de ácido sulfúrico y se observó la aparición de color rojo en caso de esteroides y metilesteroides.

6.2.4.8 Prueba para cumarinas (lactonas)

A 0.5 mL de extracto metanólico se agregó unas gotas de solución de NaOH y se observó la aparición de color amarillo que desaparece al acidular, esta prueba es positiva cuando está presente el anillo de lactona.

6.2.4.9 Prueba de DPPH

En una placa de cromatografía se colocó una gota de una solución de antioxidante comercial (vitamina C) y una gota del extracto, después de dejar secar se reveló la placa con solución de DPPH, el color amarillo sobre un fondo violeta es indicativo de actividad antirradical. La prueba fue semicuantitativa ya que se disolvió 1 mg de cada sustancia en 1 mL de metanol y se depositaron volúmenes iguales en la placa de cromatografía para comparar la actividad antirradical de cada extracto con la actividad de la vitamina C en base a la intensidad del color amarillo de cada muestra.

6.2.4.10 Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina se utilizó para visualizar los metabolitos que formaban parte de los extractos, se ocuparon cromatoplasmas de aluminio con silicagel 60 F₂₅₄ marca Merck. Se probaron varias fases móviles y se revelaron con luz ultravioleta de onda larga (365 nm) y de onda corta (254 nm). Posteriormente se revelaron con solución de CoCl₂ que se preparó con 2 g de CoCl₂ y 10 mL de H₂SO₄ llevados a un volumen de 100 mL con H₂O destilada. Una vez humedecida la cromatoplasma con la solución de CoCl₂ fue calentada a

35°C en una placa de calentamiento para observar las sustancias que fueron oxidadas por la solución (Domínguez, 1973; Keese *et al.*, 1990).

6.2.5 Espectroscopía Ultravioleta-Visible

6.2.5.1 Identificación de grupos funcionales por absorción de ultravioleta-visible.

Los fenoles absorben en la región ultravioleta (UV). En el caso de los fenoles de tipo flavonoides se presentan 2 bandas de absorción características (Merken and Beecher, 2000): la banda del anillo aromático A con un máximo de absorción en el rango 240-285 nm (banda benzoil) y otra banda del anillo B con máximo de absorción en el rango 300-550 nm (banda cinamoil). Muestras de los extractos se analizaron en el espectrofotómetro ultravioleta visible, se hizo un barrido de 200 a 800 nm de longitud de onda para identificar los grupos funcionales considerando la longitud de onda de máxima absorción. Para todas las determinaciones de absorción de radiación ultravioleta visible se utilizó el espectrofotómetro Beckman coulter DU 650.

6.2.5.2 Cuantificación de fenoles y flavonoides

Para la cuantificación de fenoles se utilizó una modificación del método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, el reactivo Folin-Ciocalteu está formado por una mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico que se reducen en presencia de fenoles y forman óxidos azules de tungsteno y molibdeno (Singleton and Rossi, 1965, Kim *et al.*, 2003). La solución estándar fue ácido gálico en una concentración de 400 ppm en metanol y agua destilada 1:1, se prepararon diluciones por triplicado del extracto metanólico y del estándar, de cada una de estas diluciones y del blanco se depositaron 250 µL en un tubo de ensaye, se agregaron 500 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu recién preparado (dilución 1:10), se mezclaron y se dejaron reposar 5 min, se agregaron 500 µL de solución de carbonato de sodio (7%), se mezclaron y se dejaron reposar 90 min a 23°C en oscuridad. Posteriormente se realizó la lectura de la absorbancia a 750 nm. El resultado se expresó como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de fruto seco, se reportó la media ± SD de tres repeticiones.

La cuantificación de flavonoides se hizo de acuerdo al ensayo colorimétrico del cloruro de aluminio (Zhishen *et al.*, 1999), con algunas modificaciones. Se utilizó como estándar

una solución de catequina de 400 ppm disuelta en metanol y agua 1:1. Se prepararon diluciones por triplicado del extracto metanólico y del estándar, de cada una de estas diluciones y del blanco se depositó en tubos de ensaye 150 μ L. Se agregó 40 μ L de solución de NaNO₂ (5%), se homogeneizó y se dejó reposar 5 min, se adicionó 40 μ L de solución de AlCl₃ (10%), se mezcló y se dejó reposar 1 min, se agregó 250 μ L de solución de NaOH (1M) y por último se adicionó 750 μ L de agua destilada, se mezcló y se realizó la lectura de absorbancia a 510 nm. El resultado se expresó como mg de equivalentes de catequina (CE) por gramo de fruto seco, se reportó la media \pm SD de tres repeticiones.

6.2.6 Identificación y cuantificación de antocianinas por HPLC

La cuantificación e identificación de antocianinas se realizó por el método HPLC, se utilizó un equipo SHIMADZU SPD-10AV con detector UV-VIS, columna C-18 fase reversa de 250 mm de longitud y diámetro de 4.6 mm. El método que se utilizó para correr la muestra fue el método descrito por Nicué *et al.*, 2007, se inyectó 20 μ L de muestra a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 520 nm. Para este análisis se utilizaron dos fases móviles, el disolvente A fue acetonitrilo, el disolvente B fue ácido fosfórico 4% en agua, el gradiente de elución utilizado fue: 0 min 94% B, 55 min 75% B, 65 min 75% B, 70 min 94% B. La velocidad de flujo utilizada fue 1 mL/min, el estándar fue kuromanin chloride (cloruro de cianidina-3-glucosido), se hizo una curva de calibración con el estándar para calcular la concentración de antocianinas en la muestra.

La identificación en el extracto de cloruro de cianidina-3-glucosido se realizó por comparación del tiempo de retención que presentó el estándar y la muestra utilizando idénticas condiciones para ambos análisis.

6.2.7 Cuantificación de antocianinas por pH diferencial.

La cuantificación de antocianinas también se realizó por el método de pH diferencial (Giusti and Wrolstad, 2001), es un método espectrofotométrico que se basa en la transformación estructural de las antocianinas con el cambio de pH (pH 1 coloreadas y pH 4.5 incoloras). Se prepararon diluciones del extracto metanólico con solución buffer pH 1.0 de cloruro de potasio 0.05M y con solución buffer pH 4.5 de acetato de sodio 0.4M. Se midió la absorbancia de cada muestra a la longitud de onda de máxima absorbancia

($\lambda_{\text{max}}=515$ nm) y a 700 nm. De la ecuación de Lambert-Beer se obtiene $C=A/\epsilon L$, C es la concentración molar, A es la absorbancia, ϵ corresponde a la absorbancia molar o coeficiente de extinción molar (constante física para especies moleculares en un solvente a una determinada longitud de onda, se pueden utilizar los valores de absorbancia molar para pigmentos purificados tomados de la literatura), L es la longitud de recorrido en cm y la mayoría de las cubetas para espectrofotómetro tienen una longitud de 1. La concentración en mg/L puede ser determinada multiplicando por el peso molecular (PM) del pigmento y por el factor de dilución (FD). Para el cálculo del contenido de antocianinas se utiliza el peso molecular y la absorbancia molar del pigmento antociano presente en mayor proporción, en este caso es la cianidina (PM 449.2 y ϵ 26900).

Por lo anterior la concentración de antocianinas monoméricas se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/L)} = (A)(\text{PM})(\text{FD})(1000)/\epsilon(1)$$

La absorbancia (A) se calculó de la forma siguiente:

$$A = (A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{700})_{\text{pH}=1.0} - (A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{700})_{\text{pH}=4.5}$$

La concentración de antocianinas totales se obtuvo de la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas totales (mg/L)} = A'(\text{PM})(\text{FD})(1000)/\epsilon(1)$$

La absorbancia (A') se calculó como se indica a continuación:

$$A' = (A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{700})_{\text{pH}=1.0}$$

6.2.8 Actividad antirradical (DPPH).

Para la determinación de la actividad antirradical se utilizó una modificación del método 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) de Brand-Williands *et al.*, 1995, este método evalúa la actividad de las sustancias frente a una solución alcohólica de DPPH de color violeta intenso, color que disminuye de acuerdo a la cantidad de concentración de sustancias que contenga la muestra con capacidad de neutralizar a este radical libre. La solución de DPPH que se utilizó fue 0.1 mM en etanol, se preparó inmediatamente antes de ser utilizada y se protegió de la luz para evitar su degradación. Como estándar se utilizó vitamina C se preparó 1 mg en 1 mL de metanol protegida de la luz, se prepararon diluciones del estándar y del extracto metanólico, se realizaron cuatro repeticiones para cada dilución.

Se adicionó a cada tubo de ensaye 750 μL de solución de DPPH y 250 μL de cada una de las disoluciones de vitamina C ó del extracto. Se agitó y se protegió de la luz, se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min, se realizó la lectura de la absorbancia a 517 nm, se utilizó etanol para ajustar a cero la lectura en el equipo. La actividad de eliminación del radical se reportó como EC_{50} (concentración efectiva media necesaria para reducir el 50% del radical DPPH).

6.2.9 Estadística

Los resultados de germinación fueron estadísticamente comparados por análisis de varianza (ANOVA) usando el SPSS versión 17, se hizo la comparación múltiple de medias con la prueba de Tukey y la diferencia entre medias fueron consideradas estadísticamente significativas a $p \leq 0.05$ como prueba de menor diferencia significativa (LSD).

7. RESULTADOS

7.1 Identificación del material vegetal

Los ejemplares de la planta estudiada quedaron depositados en el herbario del Instituto de Ecología en Xalapa, Veracruz, México, fueron registrados con el número XAL-106448.

7.2 Cultivo *in vitro*

7.2.1. Pruebas preliminares de germinación

Las semillas sometidas a los tratamientos pregerminativos # 5 (lijado manual seguido de una inmersión por 15 min en ácido sulfúrico) y # 6 (lijado manual seguido de una inmersión por 24 horas en solución de giberelinas) al igual que las semillas no tratadas (control), no germinaron en las condiciones descritas después de 60 d de incubación. Las semillas que fueron tratadas durante 120 y 180 min con ácido sulfúrico (tratamiento pregerminativo #3 y #4) presentaron muy baja germinación y las plántulas murieron en menos de una semana. En los tres tratamientos pregerminativos restantes: # 1 (inmersión por 30 min en ácido sulfúrico), # 2 (inmersión por 60 min en ácido sulfúrico) y # 7 (lijado manual seguido de una inmersión por 24 h en solución de hipoclorito de sodio 1% y retirado de la testa con pinzas y bisturí estériles) hubo germinación y las plántulas permanecieron vivas por más de dos meses. Los medios de cultivo MA y ME fueron los que presentaron mayor número de semillas germinadas de los cinco medios de cultivo utilizados para este ensayo.

7.2.2. Germinación

En base a los resultados preliminares de germinación se seleccionaron los métodos pregerminativos #1, #2 y #7 y los dos medios de cultivo que dieron mejores resultados (MA y ME), por lo que se diseñó un experimento con seis tratamientos para la germinación de las semillas (Tabla II).

Tabla II		
Tratamientos para la germinación de semillas de <i>R. adenotrichus</i> Schldtl		
Método pregerminativo	Medio de cultivo MA	Medio de cultivo ME
Ácido sulfúrico 30 min	Tratamiento 1 (T ₁)	Tratamiento 2 (T ₂)
Ácido sulfúrico 60 min	Tratamiento 3 (T ₃)	Tratamiento 4 (T ₄)
Eliminar parte de la cubierta de la semilla	Tratamiento 5 (T ₅)	Tratamiento 6 (T ₆)
Ningún método pregerminativo	Control 1	Control 2
MA: Medio MS adicionado con 1 mg/L BAP y 0.5 mg l/L IBA. ME: Medio MS sin reguladores de crecimiento. El ácido sulfúrico usado fue concentrado. Diez semillas por frasco, diez réplicas por tratamiento		

Las semillas presentan una cubierta muy gruesa y dura que impide la germinación (Figura 7a), los tratamientos aplicados permitieron que la germinación iniciara el décimo día de incubación en todos los tratamientos (Figura 7b y 7c); se hicieron registros diarios hasta los sesenta días de incubación.

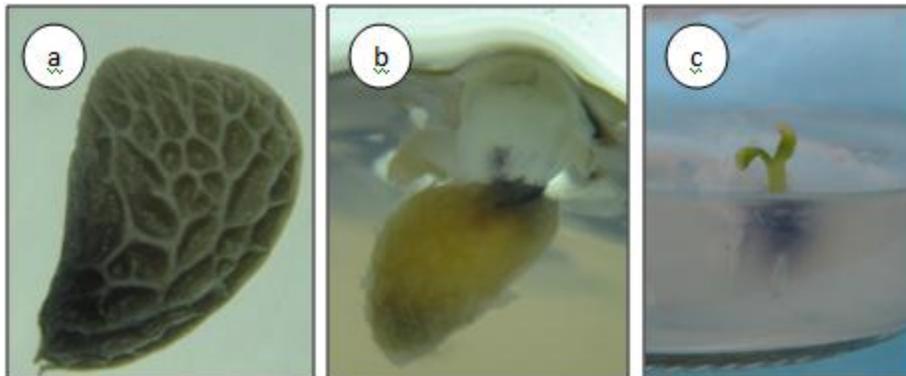


Figura 7. Germinación *in vitro* de *R. adenotrichus*. (a) Estructura y dureza de la testa, (b) Germinación de semilla del tratamiento 6, (c) Plántula germinada del tratamiento 3.

Los resultados de incrementos en los porcentajes de germinación en relación al tiempo son presentados en la Figura 8. La velocidad de germinación que presentaron los seis

tratamientos probados fue: T₁ 0.52, T₂ 0.64, T₃ 1.22, T₄ 1.55, T₅ 2.37 y T₆ 3.19 semillas por día.

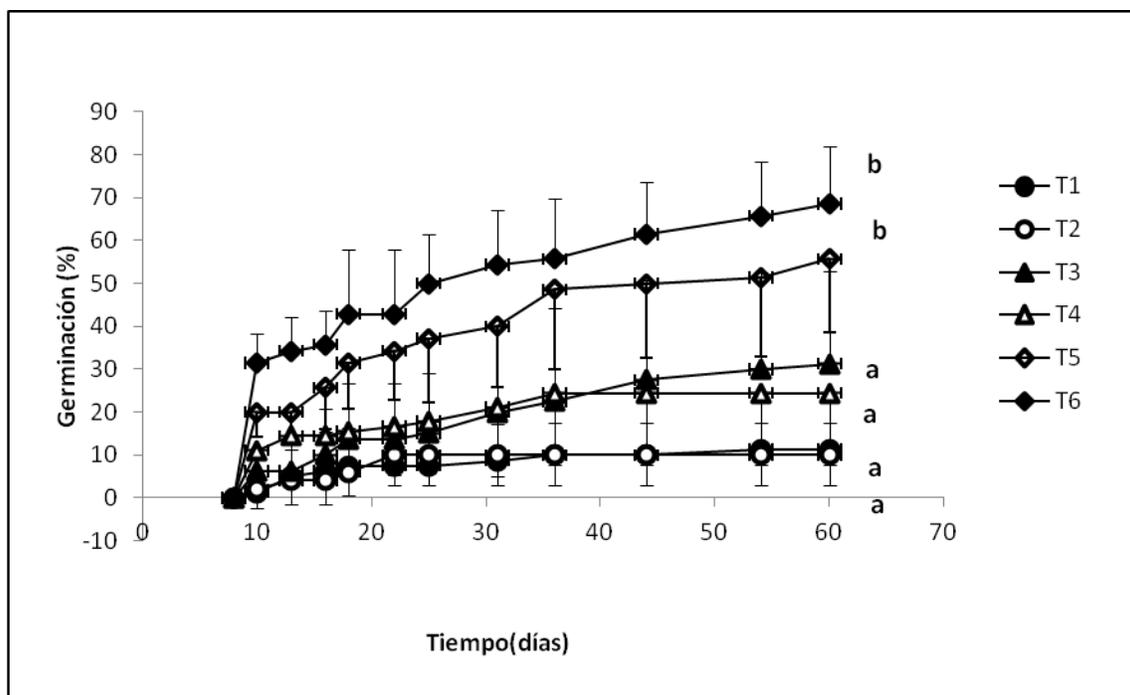


Figura 8. Germinación de semillas de *Rubus adenotrichus* Schldtl.

La germinación total se muestra en la Figura 9, los resultados indican que T₆ induce la más alta tasa de germinación, este tratamiento consiste en remover la cubierta de la semilla y sembrarlas en medio MS sin reguladores de crecimiento, el tratamiento en el que se obtuvo el más bajo porcentaje de germinación fue T₂ en el cual las semillas fueron escarificadas por 30 min con ácido sulfúrico y sembradas en medio MS sin reguladores, el control no germinó.

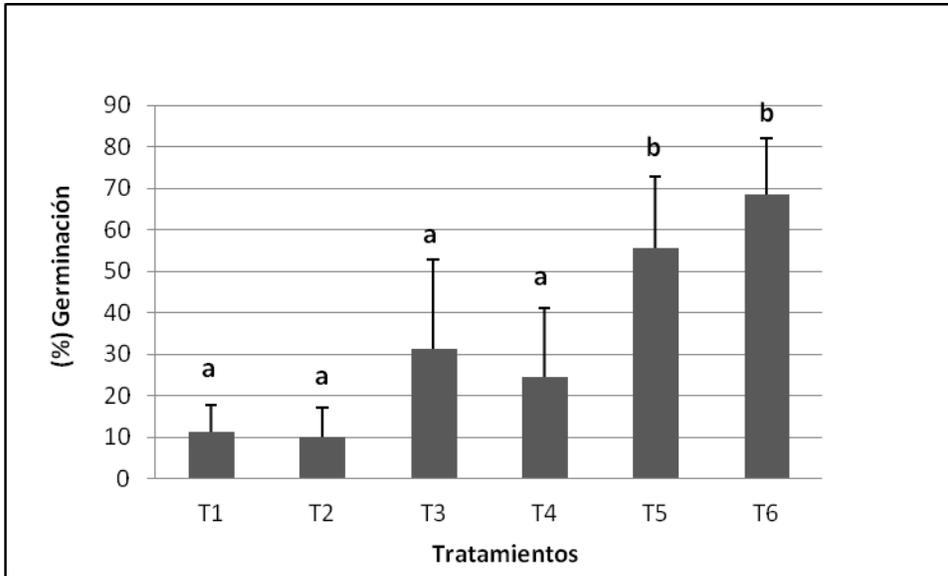


Figura 9. Efecto de los tratamientos en la germinación de semillas de *Rubus adenotrichus*

7.2.3 Brotación

Después de la germinación se obtuvieron brotes y plantas desarrolladas con todas las características morfológicas de las plantas silvestres, estas plantas fueron subcultivadas en los medios ME, MF, MG y MH. En las Figura 10a y 10b se observan plantas *in vitro* de 8 y 20 semanas respectivamente, son vigorosas y perfectamente diferenciadas hojas y raíces. En la Figura 10c, se observa el desarrollo de raíces en una planta germinada *in vitro*; algunas plantas generaron un gran número de brotes (Figura 10d), el medio de cultivo en el cual se mantuvieron las plantas por un mayor periodo de tiempo en buenas condiciones fue el medio MH.



Figura 10. Desarrollo de plantas *in vitro* de *Rubus adenotrichus* Schltld. (a) Plantas de 8 semanas. (b) Plantas de 20 semanas. (c) Plantas con raíces desarrolladas. (d) Planta *in vitro* con gran número de brotes. La escala de la barra representa 1 cm.

7.2.4 Cultivo de callo

Después de realizar las pruebas preliminares para la inducción de callo en los seis medios de cultivo (ME, MI, MJ, MK, ML, MM), se escogieron el ML y el MM para realizar las pruebas definitivas. En ambos medios de cultivo empleados para la inducción de callo (ML y MM), creció tejido friable y abundante. En este procedimiento se utilizaron hojas de plantas silvestres, la dediferenciación para callo inició después de dos semanas de incubación, la Figura 11a muestra un callo de tres semanas de incubación; a las seis semanas la proliferación celular continúa e inicia la producción de pigmento (Figura 11b). En la Figura 11c se observa un callo con abundante crecimiento celular disperso, esto muestra su característica de friabilidad, y por último la Figura 11d presenta crecimiento celular abundante friable y pigmentado.

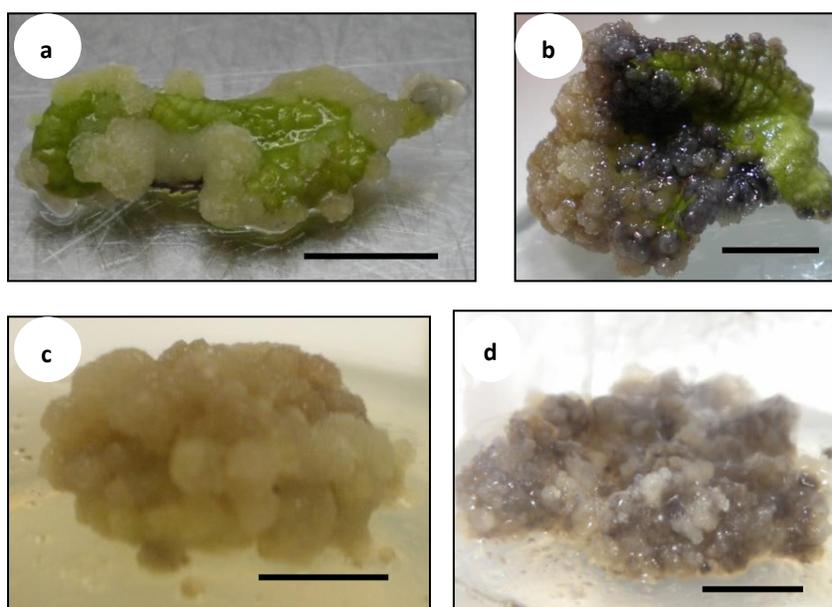


Figura 11. Formación de callo de *Rubus adenotrichus*. (a) Inicia proliferación celular. (b) Callo con inicio de pigmentación. (c) Callo friable incoloro. (d) Callo pigmentado y friable. La barra de escala representa 1 cm.

Se seleccionó un callo que se desarrolló en medio MM en oscuridad, para subcultivarlo en medio WPM sólido (para producción de pigmento) para la inducción de antocianinas, se incubó con luz blanca las 24 h. Después de 4 semanas se resebró en WPM líquido para producción de pigmento (cultivo en suspensión, agitación orbital, manteniendo iguales condiciones de iluminación), a las 4 semanas las células se resebraron nuevamente en WPM sólido para producción de pigmento, se hicieron resiembras periódicas cada cuatro semanas en el mismo medio de cultivo y se fueron seleccionando las células que presentaban coloración rojiza. En la figura 12 se observa el callo con pigmentos rojizos después de resiembras mensuales durante un año.

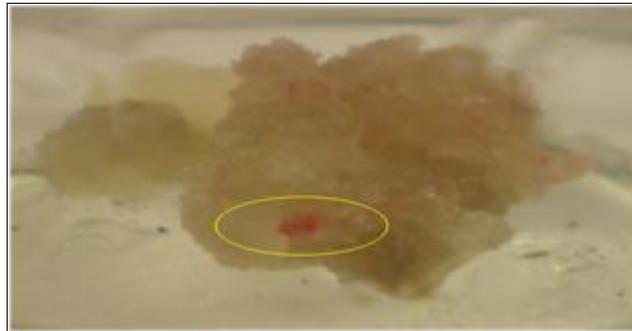


Figura 12. Callo friable con células de color rojo (antocianinas)

7.2.5 Cultivo en suspensión

Se logró establecer un cultivo homogéneo en suspensión a partir de callos friables color crema y de color violeta (Figura 13), las células se mantuvieron vivas esto se verificó por tinción con Azul de Evans, sin embargo en las condiciones en las que se cultivaron no se logró producir células con pigmento rojo.



Figura 13. Inoculación de células cultivo en suspensión

7.3 Pruebas preliminares de identificación de grupos funcionales

Los resultados de las pruebas de identificación de grupos funcionales para los extractos metanólicos de planta silvestre (tallo y hojas) y de callo se presentan en la Tabla III.

TABLA III		
Identificación de grupos funcionales en <i>R. adenotrichus</i>		
Prueba Química	Planta silvestre	Callo
Cloruro férrico (hidroxilo fenólico)	+	+
Shinoda (Flavonoides)	+	+
Permanganato de potasio (insaturaciones)	+	+
2,4-dinitrofenilhidracina (carbonilo)	+	+
Dragendorff (alcaloides)	+	+
Baljet (sesquiterpenlactonas)	+	+
Salkowski (saponinas)	-	-
Hidróxido de sodio (cumarinas-lactonas)	+	+
DPPH (anti radicales)	+	+

La prueba semicuantitativa con DPPH se observa en la Figura 14, la vitamina C decoloró completamente al DPPH y los extractos de planta silvestre y de callo tuvieron una reacción menos visible.

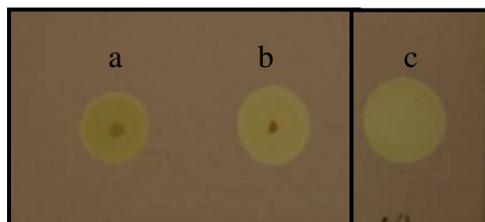


Figura 14. Prueba de DPPH: a) Extracto de planta, b) Extracto de callo, c) Vitamina C

En la cromatografía en capa fina se observa un gran número de sustancias polares en los extractos metanólicos de planta silvestre y de callo, la planta silvestre presenta mayor número de sustancias que el callo y otras son comunes a ambos extractos. Indicar número de fracciones para ver la diferencia.

7.4 Identificación de grupos funcionales en extracto de fruto silvestre UV-VIS

El análisis ultravioleta visible del extracto de fruto silvestre, presentó una banda de absorción máxima entre 200 y 300 nm que corresponde a la banda benzoyl o banda II característica para el anillo aromático A de flavonoides y otra banda a 515 nm que es la banda I o banda cinamoil y corresponde al anillo aromático B de la estructura flavonoide. El extracto de callo (callo con células rojas) también presenta las bandas de absorción descritas para el extracto de fruto. En la Figura 15 se presenta el espectro UV/VIS del extracto de callo donde se observan las bandas de absorción para a 515 nm característica de flavonoide tipo antocianina.

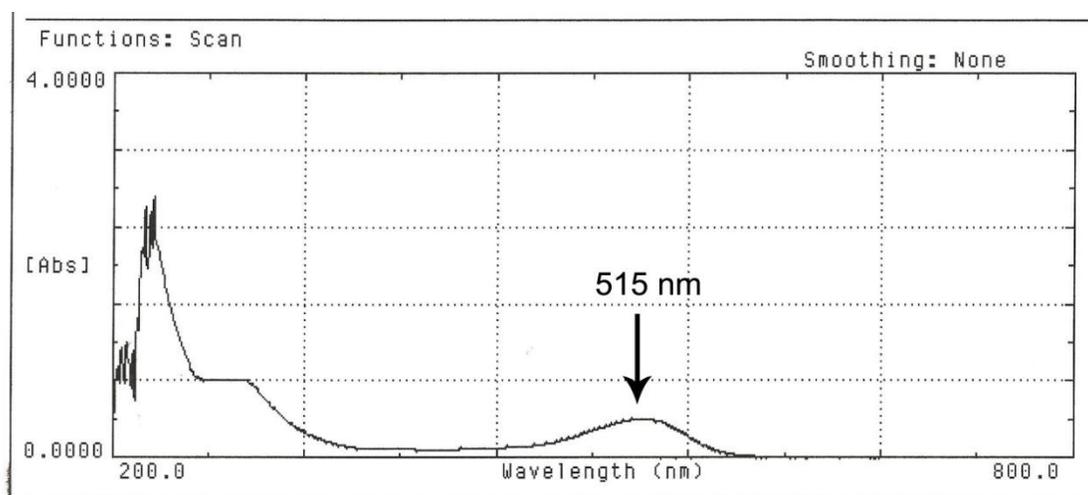


Figura 15. Espectro ultravioleta-visible del extracto metanólico de fruto silvestre

7.5 HPLC

En el extracto metanólico de fruto de *R. adenotrichus* se identificó la antocianina cianidina-3-glucósido por comparación del tiempo de retención del estándar con el pico que presenta la muestra, el t_R fue 60.6 min y se observa en la Figura 16. La cuantificación de antocianinas en fruto por este método fue 11.5 mg/g de fruto seco.

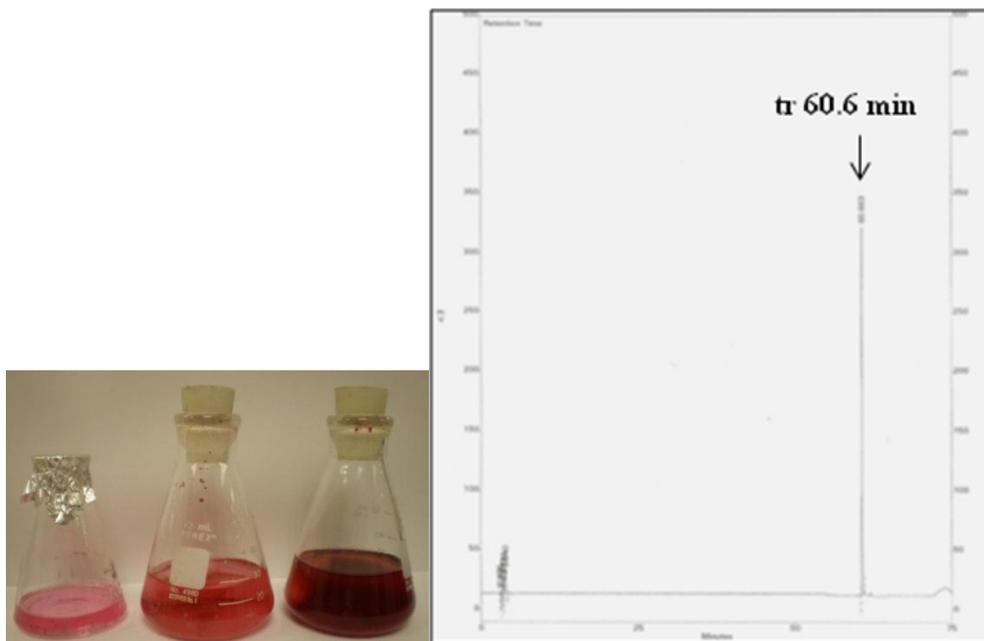


Figura 16. Extracto metanólico de fruto de *R. adenotrichus* y cromatograma HPLC

7.6 Fenoles, flavonoides, antocianinas (pH diferencial) y DPPH

Los resultados obtenidos para fenoles, flavonoides, antocianinas (método pH diferencial) y DPPH para los extractos de dos muestras de callo y de fruto silvestre se presentan en la Tabla IV.

Tabla IV				
Contenido de fenoles, flavonoides, antocianinas y DPPH en callo, fruto y planta silvestre				
Muestra	Fenoles mg GAE/g	Flavonoides mg CE/g	Antocianinas mg/g	DPPH EC₅₀ µg/mL
Callo 1(luz blanca)	14.92	2.83	0.4943	238.91
Callo 2(luz blanca)	24.09	4.33	1.06	184.5
Fruto silvestre liofilizado	29.23	5.26	12.3	148.0

Callo 1: Proliferación celular en medio MM, subcultivado en WPM para producción de pigmentos, algunas células con pigmento rojo. Callo 2: Callo obtenido por selección de células con pigmento rojo del callo 1. Para DPPH el estándar fue vitamina C y la CE₅₀ fue 18.7 µg/mL.

Puede observarse que el fruto silvestre liofilizado presenta mayor contenido de fenoles (29.23 mg GAE/g) que el callo 1 y el callo 2, sin embargo el contenido es mayor en el callo 2 que en el callo 1 debido a la selección de líneas celulares productoras de estos metabolitos secundarios. Para el caso de flavonoides, antocianinas y DPPH el comportamiento es similar, notándose una correlación directa entre el contenido de estos metabolitos secundarios y la capacidad para neutralizar los radicales libres.

En el extracto metanólico de planta silvestre se obtuvo 54.7 mg GAE de fenoles, 19.14 mg CE de flavonoides por cada gramo de extracto seco y la EC₅₀ fue 78.21 µg/mL, estos resultados muestran un contenido elevado de metabolitos antioxidantes.

En la Tabla V se presenta el contenido de fenoles y flavonoides en callos incubados en luz azul, luz blanca y luz ultravioleta así como biomasa del cultivo en suspensión expuesta a luz blanca. Se determinó también el contenido de fenoles y flavonoides del medio de cultivo semisólido y el líquido para localizar los metabolitos secundarios producidos.

Tabla V		
Contenido de fenoles y de flavonoides en: callo, cultivo en suspensión, fruto y en planta silvestre		
Muestra	Fenoles mg GAE/g	Flavonoides mg CE/g
Callo 3 (luz azul)	5.23	0.78
Callo 4 (luz blanca)	4.10	0.35
Callo 5 (luz ultravioleta)	2.42	0.18
Biomasa suspensión (luz blanca)	1.81	0.29
Medio suspensión (luz blanca)	0.26*	0.07*
Medio de cultivo sólido (luz bca.)	0.32*	0.11*
Fruto silvestre liofilizado	29.23	5.26
Todos los callos, biomasa y medios de cultivo tienen un periodo de 4 semanas de incubación en medio WPM para inducción de pigmentos con la iluminación indicada. *Fenoles mg GAE/20 mL de medio de cultivo, flavonoides mg CE/20 mL de medio de cultivo. *Fenoles en mg GAE/ g de medio sin liofilizar. Flavonoides mg CE/g de medio sin liofilizar.		

El contenido de fenoles y flavonoides se comporta de forma similar: es mayor en el callo expuesto a la iluminación azul que en los callos expuestos a luz blanca y ultravioleta, el menor contenido se presenta en los callos expuestos a la iluminación ultravioleta, demostrándose la influencia de la iluminación en la producción de estos metabolitos. Para la biomasa que se produjo en el cultivo en suspensión el contenido de fenoles y flavonoides fue menor comparado con los callos anteriormente mencionados, esto indica que se deben optimizar las condiciones del cultivo en suspensión para mejorar la producción de estas sustancias. El contenido de fenoles y flavonoides en los medios de cultivo líquido y sólido muestran que los metabolitos producidos se están liberando al medio de cultivo, esta característica es benéfica para la recuperación de estas sustancias en un sistema de producción. El contenido de fenoles y antocianinas de los frutos silvestres es muy superior a los obtenidos en el cultivo celular *in vitro*.

8. DISCUSIÓN

Rubus adenotrichus pertenece al grupo de plantas que produce las frutas conocidas como zarzamoras y que de acuerdo a la literatura presentan mayor dormancia que las frambuesas (Galletta *et al.*, 1989).

El tratamiento pregerminativo más comúnmente utilizado para incrementar el porcentaje de germinación de las semillas de zarzamoras es el ácido sulfúrico, el tiempo de exposición y la concentración varía de acuerdo a las especies. El ácido sulfúrico es altamente corrosivo, esta propiedad se utiliza para reducir la testa de las semillas pero puede dañar al embrión, por lo que es importante determinar las condiciones que incrementen la germinación y no lo dañen. Las semillas de los tratamientos T₁ y T₂ fueron escarificadas con ácido sulfúrico por 30 min, mostraron un bajo porcentaje de germinación (T₁ 11% and T₂ 10%), no hubo diferencia significativa entre estos dos tratamientos. En los tratamientos T₃ y T₄, las semillas fueron escarificadas con ácido sulfúrico por 60 min, y fueron sembradas en medio MS con reguladores (T₃) y MS sin reguladores (T₄) el porcentaje de germinación a los 60 días es mayor (T₃ 31% y T₄ 24%) que el obtenido para la escarificación de 30 min con ácido sulfúrico, sin embargo, estadísticamente no hay diferencia entre los tratamientos de 30 y 60 min con ácido sulfúrico. Las semillas que fueron sembradas sin tratamiento pregerminativo no germinaron, por lo tanto el ácido sulfúrico incrementa significativamente el porcentaje de germinación de *Rubus adenotrichus*, esto es consistente con lo reportado en la literatura (Ourecky 1975, Moore *et al.* 1974, Nybom 1980, Peacock and Hummer 1996).

Los tratamientos T₅ y T₆ en los cuales parte de la cubierta de la semilla fue removida tuvieron el mayor porcentaje de germinación a los 60 días (T₅ 55% y T₆ 68%), no hay diferencia significativa entre estos tratamientos, confirmándose que la germinación no depende de los reguladores adicionados al medio de cultivo pero sí depende de los métodos de escarificación empleados. El análisis estadístico muestra que los tratamientos T₅ y T₆ son significativamente diferentes y mejores que los otros tratamientos, estos resultados son consistentes con los resultados de El Hamdouni *et al.* (2001), donde el corte de aquenios mejora claramente la tasa de germinación para la fresa.

El medio de cultivo MS es el más común para el cultivo *in vitro* del género *Rubus*, sin embargo también han sido empleado el medio Anderson (Anderson, 1980; Berejsza-Wysecki and Hrazdin, 1994), el N6 (Ambrozic *et al.*, 1994) y el WPM (Lloyd and McCown, 1980), medio recomendado para plantas leñosas con resultados satisfactorios para *Rubus* (Castro y Gaviria, 1995).

El crecimiento celular fue abundante y se obtuvo un callo friable en medio MM (WPM con 2,4-D, K y 30 g/L sacarosa) estos resultados concuerdan con McNicol and Graham (1990), ellos reportaron una moderado producción de callo en el cultivo *in vitro* en WPM adicionado con BAP, 2,4-D y 20 g/L de sacarosa. Hollmann *et al.* (2002) obtuvieron callo friable de *R. parviflorus*, *R. spectabilis* and *R. strigosus* en medio MS modificado, ellos usaron diferentes reguladores para cada especie, para *R. spectabilis* adicionaron NAA y zeatina; en el caso de *R. adenotrichus* al medio MS se adicionó NAA y K y se obtuvo un crecimiento abundante de callo friable.

Todas las pruebas de identificación de grupos funcionales que dieron positivas para el extracto de planta silvestre también fueron positivas para el extracto de callo, por lo cual este es un cultivo de células vegetales prometedor para la obtención de flavonoides, antocianinas y alcaloides entre otros.

En el barrido ultravioleta-visible se presenta una banda ancha a 515 nm, por la forma y el desplazamiento es característica para flavonoides del grupo de las antocianinas (Hong and Wrolstad, 1990; Robards and Antolovich, 1997) comprobándose así la presencia de estas sustancias en el extracto de fruto y de callo.

En el extracto metanólico de fruto de *R. adenotrichus* se identificó la antocianina cianidina-3-glucósido por comparación del tiempo de retención del estándar con el pico que presenta la muestra, el t_R fue 60.6 min, esta antocianina se ha encontrado en *R. adenotrichus* y en *R. glaucus* (Mertz *et al.*, 2007), así como también en *R. lanciniatus*, *R. idaeus*, *R. ursinus* x *R. idaeus* (Wada and Ou, 2002), el aglicón antocianidina se ha encontrado también en fruto de *Rubus pinnatus* y *Rubus rigidus* (Byamukama *et al.*, 2003). Para la cuantificación se hicieron diluciones del estándar y se construyó la curva de calibración por HPLC, posteriormente se determinó el contenido de antocianinas y fue de 11.5 mg/g de fruto seco. Se reportan 680 mg de cianidina-3-glucósido en 100 g de materia seca de *R. adenotrichus* (Mertz *et al.*, 2007), es decir 6.8 mg/g, el resultado que nosotros

obtuvimos (11.5 mg/g) es más elevado que el reportado para la especie Andina. *R. adenotrichus* presenta un contenido mayor de cianidina-3-glucósido que de las otras antocianinas (Mertz *et al.*, 2007). El aglicón cianidina muestra una elevada actividad antioxidante en comparación con la delphinina, petunidina, malvidina, peonidina y quercetina (Zheng and Wang, 2003), característica que le proporciona al fruto de *R. adenotrichus* propiedades antioxidantes sumamente elevadas.

Se ha reportado el contenido de antocianinas para 5 especies del género *Rubus* determinado por el método de pH diferencial (Wada and Ou, 2002), cuatro de estas especies de *Rubus* presentaron valores que van de 5.69 a 11.92 mg/g de materia seca, solo *R. occidentalis* presentó un mayor contenido de antocianinas (34.65 mg/g) que el resultado que se obtuvo en este estudio para *R. adenotrichus* (12.3 mg/g). También se determinó el contenido de antocianinas en los extractos de los callos 1 y 2 (células rojas y presentaron banda de absorción en 515 nm), los resultados fueron 0.49mg y 1.06 mg por gramo de células secas respectivamente, el mayor contenido en el callo 2 se debe a que son células seleccionadas del callo 1 y subcultivadas. Los resultados obtenidos están muy por abajo del obtenido para el fruto (12.3 mg/g); sin embargo, se debe considerar que se partió de tejido de hojas que no contenía antocianinas y que el manejo de algunos factores en el cultivo aumenta la producción.

Se reportó 42.5 mg de fenoles por g de fruto seco para *Rubus adenotrichus* colectada en Costa Rica (Mertz *et al.*, 2007), otros resultados (Wada and Ou, 2002) para cinco especies de este género muestran valores en un rango de 30.94 mg/g a 57.65 mg/g. El contenido de fenoles del extracto de fruto silvestre para este estudio (29.23 mg/g) es menor que los mencionados anteriormente pero es casi igual al contenido reportado para *Rubus lanciniatus* (30.94 mg/g) (Wada and Ou, 2002); aunque el contenido de sustancias fenólicas es un indicativo de la actividad antioxidante de una muestra, es muy importante analizar el contenido de algunos tipos de fenoles con actividad antioxidante elevada como es el caso de los flavonoides y específicamente de las antocianinas.

En la literatura normalmente solo se reporta el contenido de fenoles y de antocianinas para frutos del género *Rubus*; sin embargo, no se reporta el contenido del total de flavonoides por lo cual no se pudo comparar resultados.

Los frutos del género *Rubus* presentan una actividad neutralizadora de los radicales libres elevada (Wada and Ou, 2002, Liu *et al.*, 2002, Acosta-Montoya *et al.*, 2010), sin embargo, hasta el momento no se han encontrado estudios en los que se haya determinado la actividad antioxidante por el método DPPH.

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ✓ Los frutos de *Rubus adenotrichus* (zarzamora) contienen compuestos fenólicos (29.23±1.4 mg GAE/g de fruto seco) con capacidad de neutralizar radicales libres (CE₅₀ fue 148 µg/mL); y un alto contenido de antocianinas (11.5 - 12.3 mg/g de fruto seco).
- ✓ Se identificó en el extracto metanólico de fruto de *R. adenotrichus* la antocianina cianidina 3-glucósido (HPLC), la cual esta reportada por otros autores con actividad antioxidante relevante.
- ✓ La capacidad de neutralizar los radicales libres (DPPH) del extracto del fruto silvestre fue superior (CE₅₀ 148 µg/mL) que la del extracto de callo (CE₅₀ 184 µg/mL).
- ✓ El mejor método pregerminativo para la germinación *in vitro* de *R. adenotrichus* fue remover parte de la cubierta de la semilla.
- ✓ Las plantas germinadas *in vitro* generaron brotes y raíces con todas las características morfológicas de las plantas silvestres en los medios ME (MS sin reguladores de crecimiento), MF (MS adicionado con 1 mg/L de BA), MG (WPM sin reguladores de crecimiento vegetal y sin antioxidantes) y MH (WPM adicionado con 50 mg/L de ácido L-ascórbico y 150 mg/L de polivinilpirrolidona).

- ✓ En los dos medios de cultivo empleados para la inducción de callo: ML (MS adicionado con 1 mg/L de NAA y 0.5 mg/L de K) y el medio MM (WPM adicionado con PVP, ácido ascórbico, 0.5 mg/L de 2,4-D y 0.75 mg/L de K) creció tejido friable y abundante y con pigmento morado.
- ✓ En el tejido de callo desarrollado en el medio MM: (WPM adicionado con PVP, ácido ascórbico, 0.5 mg/L de 2,4-D y 0.75 mg/L de K), se identificaron: fenoles, flavonoides, alcaloides, sesquiterpenlactonas.
- ✓ En el medio WPM sólido para producción de pigmento proliferaron células rojas con un contenido de 1.06 mg de antocianinas por cada g de células secas.
- ✓ Las células que se cultivaron en suspensión (WPM líquido) produjeron pigmentos de color morado con un contenido de fenoles 181 mg GAE/g y contenido de flavonoides 0.29 mg CE/g de materia seca.

Este estudio contribuye al conocimiento científico de los frutos silvestres de nuestro país al obtener información del contenido de metabolitos de trascendencia para la salud del hombre. Otro aspecto importante es que se establecen las bases del cultivo *in vitro* de esta especie para producir metabolitos secundarios con capacidad antioxidante como: fenoles, flavonoides y antocianinas.

Se recomienda continuar con la selección de la línea celular productora de antocianinas para optimizar su producción y posteriormente cultivarla en suspensión para producir estos metabolitos con un valor potencial para el desarrollo de nutraceuticos y/o medicamentos.

10. LITERATURA CITADA

- Acosta-Montoya O., Vaillant F., Cozzano S., Mertz C., Perez A.M., Castro M.V. 2010. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl) during three edible maturity stages. *Food Chem.* 119(4): 1497-1501.
- Ambrozic T. B., Swartz H.J., Zimmerman R.H. 1994. Adventitious shoot regeneration from in vitro-cultured leaves of *Rubus* genotypes. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 38:11-17.
- Anderson W. C. 1980. Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *Rubus occidentalis*. *Acta Horticulturae* 112:13-20.
- Anderson O. M. 2002. Anthocyanin occurrences and analysis. In *Proceedings of the International Workshop on Anthocyanins: Research and Development of Anthocyanins*, Adelaide, South Australia.
- Anderson O. M., Jordheim M. 2004. Anthocyanins. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*; Andersen, O. M., Markham, K. R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL.
- Berejsza-Wysecki W., Hrazdin G. 1994. Establishment of callus and cell suspension cultures of raspberry (*Rubus idaeus* cv. Royalty). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 37: 213-216.
- Beattie J., Crozier A., Duthie G.G. 2005. Potential health benefits of berries. *Curr Nutr Food Sci* 1: 71-86.
- Byamukama R., Kiremire B.T., Andersen O.M., Steigen A. 2003. Anthocyanins from fruits of *Rubus pinnatus* and *Rubus rigidus*. *Phytochemistry* 63:8 905-911.
- Black M, Butler J, Hughes M. 1987. Control and development of dormancy in cereals. In: Mares DJ, ed. *Fourth International*
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset E. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Tech.* 28: 25-30.
- Bravo L. 1998. Polyphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews.* 56 (11): 317-333.
- Cartaya O., Reynaldo I. 2001. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales.* 22: 5-14.
- Clifford M.N. 2000. Anthocyanins: Nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 80:1063-1072.

- Chung I-M., Hong S-B., Peebles C.A.M., Kim J-A., San K.Y. 2007. Effect of the engineered indole pathway on accumulation of phenolic compounds in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnology Progress* 23:327-332.
- Cállebáut A., Hendrickx G., Voets A. M., Motte J. C. 1990. Anthocyanin in cell cultures of *Ajuga reptans*. *Phytochemistry* 29: 2153–2158.
- Castro R. D., Gaviria G. B. 1995. Propagación in vitro de especies del género *Rubus*. Universidad Católica de Oriente. Fundación de Fomento Agropecuario Buen Pastor 10: 4-9.
- Cao G., Sofic E., Prior R.L. 1997. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids. Structureactivity relationships. *Free Rad Biol Med.* 22:749-760.
- Cormier F., Do C. B. 1993. *Vitis vinifera* L. In vitro production of anthocyanins. In: Bajaj Y. P. S. (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry, medicinal and aromatic plants V*, vol. 24. Springer, Berlin, pp 373–386.
- Daubeny H. A. 1996. Brambles. In: Janick, J., and J. N. Moore (eds). *Fruit Breeding. Vol II Vine and small fruits*. John Wiley & Sons. New York, USA. pp: 109-190.
- Debnath S. C. 2004. Clonal propagation of dwarf raspberry (*Rubus pubescens* Raf.) through in vitro axillary shoot proliferation. *Plant Growth Regulation* 43: 179–186.
- Debnath S. C. 2007. A two-step procedure for in vitro multiplication of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) shoots using bioreactor. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 88:185–191.
- Delgado-Vargas F., Jiménez A.R., Paredes-López O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains-characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40(3): 173-289.
- Ding H.-Y. 2011. Extracts and Constituents of *Rubus chingii* with 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) Free Radical Scavenging Activity. *International Journal of Molecular Sciences* 12(6):3941-3949.
- Domínguez X. A. 1973. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. 1ª. Edición. Limusa. México. Pp. 84-85.
- Donnelly D. J., Stace-Smith R., Mellor F.C.. 1980. In vitro culture of three *Rubus* species. *Acta Horticulturae* 112:69-76.
- Durst R., Wrolstad R.E. 2001. Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. In: *Handbook of Food Analytical Chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons; p. 33-45.
- Duthie G., Crozier A. 2000. Plant-derived phenolic antioxidants. *Curr Opin Lipidol.* 11:43-47.

- Duthie G.G., Gardner P.T., Kyle J.A.M. 2003. Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc Nutr Soc.* 62:599-603
- El Hamdouni E. M., Lamarti A., Badoc A.. 2001. In vitro germination of the achenes of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) cvs 'chandler ' and 'tudla'. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux* 140: 31-42.
- Equihua Z. M, Muñoz V. L., Castillo C. G., Meza P. E., Friso H. B. 2007. Vrije Universiteit Amsterdam, Instituto de Ecología, A.C. Reporte Técnico Final.
- Erig A. C., De Rossi A., De Luces F. G.R.. 2002. 6-benzylamino purine and indol butyric acid on the in vitro multiplication of blackberry (*Rubus idaeus*), cv. Tupy. *Ciencia Rural Santa María* 32: 765-770.
- Galletta G. J., Ballington G.R., Draper A.D. 1989. Pregermination treatment of seeds of species and hybrids in *Rubus* with sodium hypochlorite. *Acta Horticulturae* 262: 289-296.
- García A.F.J. 2005. Evaluación in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis doctoral. Universidad de Murcia. España.
- Garzón G.A. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos:revisión. *Acta biol Colomb* 13(3): 27-36.
- Giusti M.M., Wrolstad R.E. 2001. Unit F1.2: Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: Wrolstad RE editors. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley and Sons. p. 1-13.
- Grusak M. A., Rogers R. B., Yousef G. C., Erdman J. W., Lila M. A. 2004. An enclosed chamber labeling system for the safe ¹⁴C-enrichment of phytochemicals in plant cell suspension cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40: 80–85.
- Häkkinen S. H., Kärenlampi S. O., Heinonen M., Mykkänen H. M., Törrönen A. R. 1999. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J. Agric. Food Chem* 47: 2274–2279.
- Halliwell B., Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 142:231-255.
- Harborne J.B. 1998. *Phytochemical Methods a guide to modern techniques of plant analysis.* 3a ed. London: Chapman & Hall. p. 1-32.
- Harborne J. 1994. *The flavonoids-Advances in research since 1986;* Chapman and Hall: London.

- Harborne J. B., Williams C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. 55: 481-504.
- He J., Giusti M. 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Food Sci Technol* 1: 163-187.
- Hertog M. G. L., Freskens E. J. M., Hollman P. C. H., Katan M. B., Kromhout D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet*. 342: 1007-1011.
- Hertog M. G. L., Hollman P. C. H., Venema D. P. 1992. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 1591-1598.
- Hirner A., Veit S., Seitz H. 2001. Regulation of anthocyanin biosynthesis in UV-A irradiated cell cultures of carrot and in organs of intact carrot plants. *Plant Sci* 161: 315–322.
- Hollmann P. J., Lohbrunner G.K., Shamoun S.F., Lee S.P. 2002. Establishment and characterization of *Rubus* tissue culture systems for in vitro bioassays against phytotoxins from *Rubus* fungal pathogens. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68:43-48
- Hong V., Wrolstad R.E. 1990. Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *J Agric Food Chem*. 38: 708–715.
- Jennings D.J. 1988. Raspberries and blackberries: their breeding, diseases and growth. Academic Press, London.
- Kahkonen M. P., Heinonen M. 2003. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J. Agric. Food Chem*. 51: 628-633.
- Kandil F. E., Song L., Pezzuto J. M., Marley K., Seigler D. S., Smith M. A. L. 2000. Isolation of oligomeric proanthocyanidins from flavonoid-producing cell cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36: 492–500.
- Kang S., Seeram N., Nair M., Bourquin L. 2003. Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in *Apc* (Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Lett* 194: 13–19.
- Ke S., Skirvin R.M., McPheeters K.D., Otterbacher A.G., Galleta G.. 1985. In vitro germination and growth of *Rubus* seeds and embryos. *HortScience* 20:1047-1049.
- Keese R., Müller R. K., Toubé T. P. 1990. Métodos de Laboratorio para química orgánica. Gallegos G.R.M. Limusa. México. Pp. 41-51.

- Kermode, A. R. 2005. Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation* 24:319-344.
- Kim D.O., Jeong S.W., Lee C.Y. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem.* 81: 321-326.
- Kim D. O., Lee C.Y. 2002. Extraction and Isolation of Polyphenolics. In current protocols in Food Analytical Chemistry. Wrolstad, R.E. Ed.; Wiley, New York.
- King A., Young G. 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association* 99:214-216.
- Kobayashi Y., Akita M., Sakamoto K., Liu H., Shigeoka T., Koyano T., Kamamura M., Furuya T. 1993. Large scale production of anthocyanin by *Aralia cordata* cell suspension cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 40: 215–218.
- Konczak-Islam I., Yoshinaga M., Hou M., Terahara N., Yamakawa O. 2003. Potential chemopreventive properties of anthocyanin rich aqueous extracts from in vitro produced tissue of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *J Agr Food Chem* 51: 5916–5922.
- Konczak-Islam I., Yoshinaga M., Nakatani N., Terahara N., Yamakawa O. 2000. Establishment of an anthocyanin-producing cell line from sweet potato storage root. *Plant Cell Rep* 9: 472–477.
- Lila M. A. 2004. Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach. *J Biomed Biotechnol* 5: 306–313.
- Liu M., Li X. Q., Weber C., Lee C.Y., Brown J., Liu R.H. 2002. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Raspberries .*J. Agric. Food Chem.* 50: 2926–2930.
- Liu R. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Amer J Clin Nutr* 78: 517S–520S.
- Lloyd G., McCown B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society* 30:421-427.
- Marinova D., Ribarova F., Atanassova M. 2005. Total phenolic and total flavonoids in Bulgarian fruit and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy.* 40:255-260.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego J., Culebras J. M., Muñón M. J. 2002. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria.* XVII: 271-278.

- Martínez-Valverde I., Periago M.J., Provan G., Chesson A. 2002. Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J Sci Food Agric* 82:323-330.
- Martínez MA., Solano A., Pacheco M.J. 2005. Análisis de algunos factores que afectan la embriogénesis somática en tejidos juveniles de *Rubus glaucus* Bent. *Journal Colombian Association of Biological Sciences* 17: 95-107.
- Martinussen I., Nilsen G., Svenson L., Junttila O., Rapp K. 2004. In vitro propagation of cloudberry (*Rubus chamaemorus*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 78: 43–49.
- Mazza G., Miniati E. 1993. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*; CRC Press: Boca Raton, FL. 362 pp.
- Mazza G.J. 2007. Anthocyanins and heart health. *Ann Ist Super Sanita* 43: 369-374.
- McNicol R. J., Graham J. 1990. In vitro regeneration of *Rubus* from leaf and stem segments. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 21:45-50.
- Merken H.M., Beecher G.R. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A Review. *J Agric Food Chem.* 48: 577-599.
- Mertz C., Cheynier V., Günata Z., Brat P. 2007. Analysis of Phenolic Compounds in Two Blackberry Species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem.* 55: 8616–8624.
- Milivojević J., Maksimović V., Nikolić M., Bogdanović J., Maletić R., Milatović D. 2011, Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild fragaria and *Rubus* berries. *Journal of Food Quality* 34: 1–9.
- Monroy E. V. M. 1985. Efecto de escarificación y de tres estimuladores de la germinación en semillas de cardamomo (*Elettaria cardamomum* (L) Maton) bajo condiciones de laboratorio y de campo. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. pp. 84.
- Moore J. N., Brown G.R., Lundergran C.A. 1974. Effect of duration of acid scarification on endocarp thickness and seedling emergence of blackberries. *HortScience* 9:204-205.
- Mori T., Sakurai M., Sakuta M. 2001. Effects of conditioned medium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. *Plant Sci* 160: 335–360.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum.*15: 473-497.

- Navarro P. L. C., Avendaño R. S. 2002. Flora útil del municipio de Astacinga, Veracruz, México. *Polibotánica*. 14: 67-84.
- Nicoué E. E., Savard S., Belkacemi K. 2007. Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: Extraction and identification. *J Agric Food Chem*. 55: 5626-5635.
- Nybom H. 1980. Germination in Swedish blackberries (*Rubus* L subgen *Rubus*). *Journal Botaniska Notiser* 133:619-631.
- Ourecky D. K. 1975. Brambles. In: Janick, J., and J. N. Moore (eds). *Advances in fruit breeding*. Purdue University Press. Indiana, USA. pp: 98-129.
- Pasqua G., Monacelli B., Mulinacci N., Rinaldi S., Giaccherini C., Innocenti M., Vinceri F. 2005. The effect of growth regulators and sucrose on anthocyanin production in *camptotheca acuminata* cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 293-298.
- Patel A.V., Roja-Vera J., Dacke C.G. 2004. Therapeutic Constituents and actions of *Rubus* species. *Current Medicinal Chemistry* 11(11): 1501-1512.
- Peacock D. N., Hummer K. E. 1996. Pregermination studies with liquid nitrogen and sulfuric acid on several *Rubus* species. *HortScience* 31: 238-239.
- Pérez P. J. N. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de plantas. 13-56.
- Pietta P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63: 1035-1042.
- Reed B. M. 1990. Multiplication of *Rubus* gerplasm. In vitro: a screen of 256 accessions. *Fruit Varieties Journal* 44:141-148.
- Rice-Evans C. A., Miller N.J., Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2:152-159.
- Robards K., Prentzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem*. 66:401-436.
- Robards K., Antolovich M. 1997. Analytical chemistry of fruit bioflavonoids. *Analyst*. 122: 11R-34R.
- Sánchez S.P., Gil A.P., Sánchez Z.D. 2003. Las plantas silvestres los remedios históricos dermatológicos. *Med Cutan Iber Lat Am* 31(5): 337-346.
- Salazar Y. M., Pardo C. V. M., Buriticá C. P. 2007. Especies de Colombia, Ecuador y Perú pertenecientes al género *Gerwasia raciborski* del orden uredinales. *Caldasia* 29(1):105-120.

- Scalbert A., Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 130:2073S-2085S.
- Schlatmann J., Hoopen H., Heijnen J. 1996. Large-scale production of secondary metabolites by plant cell cultures. pp. 11-52. En Dicosmo, F., Misawa M., (eds.). *Plant cell culture secondary metabolism toward industrial application*. New Cork: CRS Press. 232 p.
- Seeram N.P., Adams L.S., Zhang Y., Lee R., Sand D., Scheuller H.S., Heber D. 2006 Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cell in vitro. *J Agric Food Chem* 54:9329–9339.
- Shriner R.L., Fuson R.C., Curtin D.Y. 1982. Identificación sistemática de compuestos orgánicos. Domínguez X.A. Limusa. México. Pp. 143-144.
- Shuler M., Hirasuna T., Prince C., Bringi V. 1990. Bioreactor considerations for producing flavours and pigments from plant tissue culture. In: Schwarzberg H.; Rao M. (eds) *Bioprocess and food process engineering*. Marcel Decker, New York, pp 45–66.
- Singleton V. L., Rossi J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am J Enol Vitic.* 16: 144-158.
- Siriwoharn T., Wrolstad R. E. 2004. Characterisation of phenolics in Marion and Evergreen blackberries. *J. Food Sci.* 69, 233–240.
- Solórzano C., Linares S., Marante R. 2004. Normalización y estandarización del protocolo para propagación in vitro de mora de castilla (*Rubus glaucus*). *Revista Científica de la Universidad Nacional Experimental de Táchira* 16:47-54.
- Stintzing F. C., Stintzing A. S., Carle R., Frei B., Wrolstad R.E. 2002. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *J Agric Food Chem* 50: 6172-6181.
- Thiem B. 2003. *Rubus chamaemorus* L. A boreal plant rich in biologically active metabolites: a review. *Biology Letters* 40:3-13.
- Tomczyk P., Gudej J. 2005. Polyphenolic compounds from *Rubus saxatilis*. *Chemistry of Natural Compounds* 41:349-351.
- Trigiano R. N., Gray D.J. 2005. *Plant development and biotechnology*. CRC Press. USA. pp. 285-289.
- Trigiano R. N., Gray D.J. 2000. *Plant tissue culture concepts and laboratory exercises*. 2a ed. CRC Press. USA. pp. 361-372.
- Tsao C-W. V., Postman J. D., Reed B. M. 2000. Virus infections reduce in vitro multiplication of ‘Malling Landmark’ raspberry. *In vitro Cellular Developmental Biology Plant* 36:65–68.

- Tsao C-W. V., Reed B.M. 2002. Gelling agents, silver nitrate and sequestrene iron influence adventitious shoot and callus formation from *Rubus* leaves. *In vitro Cellular Developmental Biology Plant* 38:29-32.
- Van der Sluis A. A., Dekker M., De Jager A., Jongen W. M. F. 2001. Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple: Effect of Cultivar, Harvest Year, and Storage Conditions *J. Agric. Food Chem.* 49: 3606-3613.
- Vater G., Arena M. E. 2005. *In vitro* propagation of *Rubus geoides*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 33: 277-281.
- Wada L, Ou B. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 3495-3500.
- Wu J-H., Miller S. A., Hall H. K., Mooney P. A. 2009. Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 99:17-25.
- Yahia A., Kevers C., Gaspar T., Chénieux J. C., Rideau M., Créche J. 1998. Cytokinins and ethylene stimulate indole alkaloid accumulation in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* by two distinct mechanisms. *Plant Science* 133: 9-15.
- Yeoman M., Yeoman C. 1996. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *New Phytologist* 134: 553-569.
- Zhang W., Curtin C., Kikuchi M., Franco C. 2002. Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science* 162: 459-468.
- Zhang W., Seki M., Furasaki S. 1997. Effect of temperature and its shift on growth and anthocyanin production in suspension cultures of strawberry cells. *Plant Science* 127: 207-214.
- Zheng W., Wang S. Y. 2003. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *J Agric Food Chem.* 51:502-509.
- Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64: 555-559.
- Zhong J., Yoshida M., Fujiyama D., Seki T., Yoshida T. 1993. Enhancement of anthocyanin production by *Perilla frutescens* cells in a stirred bioreactor with internal light irradiation. *J Ferment Bioeng* 75: 299-303.

Zubko M., Schmeer K., Glabgen W., Bayer E., Seitz H. 1993. Selection of anthocyanin accumulating potato (*Solanum tuberosum* L.) cell lines from calli derived from seedlings germinated from gamma irradiated seeds. *Plant Cell Rep* 12: 555–558.

Material electrónico:

Encyclopedia of life. *Rubus adenotrichus* [internet] disponible en el sitio de red:

<http://www.eol.org/pages/300826> Revisado en la página de Internet el 29 de diciembre del 2011.

Buenas Prácticas agrícolas en Mora orgánica. Guatemala 2003. Documento Word en resguardo [internet] disponible en el sitio de red:

<http://www.oirsa.org/aplicaciones/subidoarchivos/BibliotecaVirtual/BuenasPracticasMoraOrganica.pdf> Revisado en la página de Internet el 29 de diciembre del 2011.

11. APÉNDICES

APÉNDICE I

SOLUCIONES STOCK Y MEDIOS DE CULTIVO

I) PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK PARA MEDIO MURASHIGE Y SKOOG (MS)

Solución stock I Macronutrientes

En un vaso de precipitados de un litro se puso aproximadamente 800 mL de agua bidestilada y una barra magnética, se colocó en una plancha de agitación y se agregó una a una las siguientes sustancias:

NH ₄ NO ₃	16.5000 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	4.4000 g (Si es anhidro pesar 3.3220 g)
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	3.7000 g
KNO ₃	19.0000 g
KH ₂ PO ₄	1.7000 g

Una vez disueltas completamente todas, la solución se pasó a un matraz aforado de un litro y se agregó agua bidestilada hasta completar un litro. Un volumen de 100 mL de esta solución se utilizó para preparar un litro de medio de cultivo.

Solución stock II Micronutrientes

Se prepararon primero las siguientes soluciones:

Se disolvieron 100 mg de CoCl₂.6H₂O en 100 mL de agua bidestilada.

Se disolvieron 100 mg de CuSO₄.5H₂O en 100 mL de agua bidestilada.

Se disolvieron 100 mg de Na₂MoO₄.2H₂O en 100 mL de agua bidestilada.

Se depositó en un vaso de precipitados de 1 L aproximadamente 700 mL de agua bidestilada y una barra magnética, se colocó en una plancha de agitación y se agregó una a una las siguientes sustancias:

MnSO ₄ .H ₂ O.....	1.6900 g
H ₃ BO ₃	0.6200 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0.8600 g
KI.....	0.0830 g

Una vez disueltas completamente todas las sustancias, se agregaron los siguientes volúmenes de las soluciones que se prepararon: 25 mL de la solución de molibdato de sodio, 2.5 mL de la solución de sulfato de cobre y 2.5 mL de la solución de cloruro de cobalto. Se pasó la solución a un matraz aforado de 1000 mL y se agregó agua bidestilada hasta la marca. Se tomaron 10 mL de esta solución para preparar un litro de medio de cultivo.

Solución stock III Hierro y EDTA

Se puso en un vaso de precipitados de 100 mL aproximadamente 40 mL de agua bidestilada y una barra magnética, se calentó y se agregó 0.4129 g Na₂EDTA 2H₂O se agitó hasta disolución total. En un vaso de precipitados de 100 mL se puso aproximadamente 40 mL de agua bidestilada y una barra magnética, se agregó 0.2780 g de FeSO₄.7H₂O y se agitó hasta disolución total.

Una vez disueltas completamente se pasaron las dos soluciones a un matraz aforado de 100 mL y se agregó agua bidestilada hasta la marca. Se tomaron 10 mL de esta solución para preparar un litro de medio de cultivo.

Solución stock IV Vitaminas

En un vaso de precipitados de 500 mL se depositaron aproximadamente 300 mL de agua bidestilada y una barra magnética, se colocó en una plancha de agitación y agregó una a una las siguientes sustancias:

Glicina.....	2.0000 g
--------------	----------

Ácido nicotínico..... 0.5000 g

Piridoxina.HCl..... 0.5000 g

Tiamina.HCl..... 0.1000 g

Una vez disueltas completamente todas las sustancias se pasó la solución a un matraz aforado de 1 L y se agregó agua bidestilada hasta la marca. Se utilizó 1 mL de esta solución para preparar un litro de medio de cultivo.

Las soluciones se guardaron en frasco color ámbar en refrigeración a 4°C.

PREPARACIÓN DE UN LITRO DE MEDIO DE CULTIVO MS

En un vaso de precipitados de 2 litros con aproximadamente 800 mL de agua bidestilada en agitación con una barra magnética se agregaron las siguientes soluciones previamente preparadas:

- 100 mL de solución I
- 10 mL de solución II
- 10 mL de solución III
- 1 mL de solución IV
- 0.1000 g de Mio-inositol
- 30 gramos de sacarosa
- Reguladores de crecimiento (en caso de que se indique)

Una vez disueltas completamente las sustancias, se puso esta solución en un matraz aforado de un litro y se agregó agua bidestilada hasta la marca, se mezcló y se vació nuevamente al vaso de precipitados, se ajustó el PH a 5.7 con soluciones de HCL 1N y NaOH 1N.

La solución se calentó y se agitó simultáneamente, se añadió 7 g de agar, se mantuvo en agitación y calentamiento hasta disolución completa. Se utilizaron frascos de 250 mL, se depositó en cada frasco 30 mL de medio de cultivo, se taparon y esterilizaron en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Los frascos con el medio estéril se guardaron en bolsas de plástico, una vez a temperatura ambiente se guardaron en refrigeración hasta su utilización.

PREPARACIÓN DE UN LITRO DE MEDIO DE CULTIVO BASAL (MB)

50% Macronutrientes

En un vaso de precipitados de 2 litros con aproximadamente 800 mL de agua bidestilada en agitación con una barra magnética se agregaron las siguientes soluciones previamente preparadas:

50 mL de solución de macronutrientes

10 mL de solución de micronutrientes

10 mL de solución de Hierro-EDTA

1 mL de solución de vitaminas

0.1000 g de Mio-inositol

30 gramos de sacarosa

Reguladores de crecimiento (cuando este indicado)

Una vez disueltas completamente las sustancias, se puso esta solución en un matraz aforado de un litro y se agregó agua bidestilada hasta la marca, se mezcló y se vació nuevamente al vaso de precipitados, se ajustó el PH a 5.7 con soluciones de HCL 1N y NaOH 1N.

La solución se calentó y se agitó simultáneamente, se añadió 7 g de agar se mantuvo en agitación y calentamiento hasta disolución completa. Se utilizaron frascos de 250 mL, se depositó en cada frasco 30 mL de medio de cultivo, se taparon y esterilizaron en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Los frascos con el medio estéril se guardaron en bolsas de plástico, una vez a temperatura ambiente se guardaron en refrigeración hasta su utilización.

II) PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK WOODY PLANT MEDIUM (WPM)

Solución stock I de macronutrientes

En un vaso de precipitados de un litro con aproximadamente 800 mL de agua bidestilada y una barra magnética en agitación constante se agregaron una a una las siguientes sustancias:

NH_4NO_3	4.0000 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.9600 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5.5600 g
KH_2PO_4	1.7000 g

Una vez disueltas completamente todas las sustancias, se pasó la solución a un matraz aforado de un litro y se agregó agua bidestilada hasta completar un litro. Se tomaron 100 mL de esta solución para preparar un litro de medio de cultivo.

Solución stock II de macronutrientes

En un vaso de precipitados de un litro con aproximadamente 800 mL de agua bidestilada y una barra magnética en agitación constante se agregó una a una las siguientes sustancias:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7000 g
K_2SO_4	9.9000 g

Una vez disueltas completamente todas las sustancias, se pasó la solución a un matraz aforado de un litro y se agregó agua bidestilada hasta completar un litro. Se tomaron 100 mL de esta solución para preparar un litro de medio de cultivo.

Solución stock III de micronutrientes

Se prepararon las siguientes soluciones:

Se disolvieron 100 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua bidestilada.

Se disolvieron 100 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de agua bidestilada.

En un vaso de precipitados de 1 L con aproximadamente 700 mL de agua bidestilada y una barra magnética en agitación constante se agregó una a una las siguientes sustancias:

H ₃ BO ₃	0.6200 g
MnSO ₄ .H ₂ O.....	2.2300 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0.8600 g

Una vez disueltas completamente todas las sustancias, se agregó los siguientes volúmenes de las soluciones que se prepararon: 25 mL de la solución de Na₂MoO₄.2H₂O y 25 mL de la solución de CuSO₄.5H₂O. Se pasó la solución a un matraz aforado de 1 L y se agregó agua bidestilada hasta la marca. Se tomaron 10 mL de esta solución para preparar un litro de medio de cultivo.

Solución stock IV Hierro y EDTA

Se preparó una solución con 0.4129 g Na₂EDTA 2H₂O que se disolvió en 40 mL de agua bidestilada caliente.

Por otro lado se preparó una solución disolviendo 0.2780 g de FeSO₄.7H₂O en 40 mL de agua bidestilada.

Se mezclaron las dos soluciones y se aforaron a 100 mL con agua bidestilada. Se tomaron 10 mL de esta solución para preparar un litro de medio de cultivo.

Solución stock V vitaminas

La solución se preparó disolviendo los siguientes reactivos en agua bidestilada:

Glicina.....	0.5000 g
Ácido nicotínico.....	0.1250 g
Piridoxina.HCl.....	0.1250 g
Tiamina.HCl.....	0.1250 g (WPM lleva 0.0010 g,

éste es un caso especial para antocianinas)

Posteriormente se completaron con agua bidestilada a 250 mL en un matraz aforado. Se tomó 1 mL de esta solución para preparar un litro de medio de cultivo.

Las soluciones se guardaron en frasco color ámbar etiquetado en refrigeración a 4°C.

PREPARACIÓN DE UN LITRO DE MEDIO DE CULTIVO WPM

En un vaso de precipitados de 2 litros con aproximadamente 600 mL de agua bidestilada en agitación constante se agregó lo siguiente:

- 100 mL de solución I
- 100 mL de solución II
- 10 mL de solución III
- 10 mL de solución IV
- 1 mL de solución V
- 0.1000 g de Mio-inositol
- 30 gramos de sacarosa
- Reguladores de crecimiento (cuando este indicado)

Una vez disueltas las sustancias, se puso esta solución en un matraz aforado de un litro, se agregó agua bidestilada hasta la marca, se mezcló, se vació nuevamente al vaso de precipitados, se puso en agitación y se ajustó el PH 5.7 con soluciones de HCL 1N y NaOH 1N.

Para solidificar se añadió 7 g de agar o 2 g de phytigel, se calentó y se agitó simultáneamente hasta disolución total (solución transparente).

Una vez disuelto se vació el medio de cultivo en frascos completamente limpios, se taparon y esterilizaron en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Se guardaron en bolsas de plástico y se dejaron enfriar en una superficie plana. Se guardaron en refrigeración hasta su utilización.

PREPARACIÓN DE UN LITRO DE WPM SÓLIDO

Inducción de crecimiento celular adicionado con antioxidantes

Se depositó en un vaso de precipitados de 2 litros aproximadamente 600 mL de agua bidestilada, se agitó en una plancha con una barra magnética. Se agregó lo siguiente:

- 100 mL de solución I
- 100 mL de solución II
- 10 mL de solución III
- 10 mL de solución IV
- 1 mL de solución V
- 0.1000 g de Mio-inositol
- 30 gramos de sacarosa
- 0.5 mg de 2,4-D
- 0.75 mg de K
- 150 mg Polivinilpirrolidona
- 50 mg ácido ascórbico

Una vez completamente disueltas las sustancias, se pasó la solución a un matraz aforado de un litro y se agregó agua bidestilada hasta la marca, se mezcló y se vació nuevamente al vaso de precipitados donde se mantuvo en agitación y se ajustó el PH 5.7 con soluciones de HCL 1N y NaOH 1N.

Se añadieron 2 g de phytigel, se calentó y agitó simultáneamente hasta disolución total (solución transparente).

Una vez disuelto se vació el medio de cultivo en recipientes completamente limpios, se taparon y esterilizaron en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Los frascos se guardaron en bolsas de plástico y se dejaron enfriar en una superficie plana, después se Guardar en refrigeración hasta su utilización.

PREPARACIÓN DE UN LITRO DE WPM SÓLIDO

Producción de pigmento adicionado con antioxidantes

En un vaso de precipitados de 2 litros se depositó aproximadamente 600 mL de agua bidestilada, se mantuvo en agitación con una barra magnética. se agregó lo siguiente:

- 100 mL de solución I
- 100 mL de solución II
- 10 mL de solución III
- 10 mL de solución IV
- 1 mL de solución V
- 0.1000 g de Mio-inositol
- 30 gramos de sacarosa
- 0.4 mg de IAA
- 0.76 mg de K
- 150 mg Polivinilpirrolidona
- 50 mg ácido ascórbico

Una vez completamente disueltas las sustancias, se puso esta solución en un matraz aforado de un litro y se agregó agua bidestilada hasta la marca y se mezcló, se vació nuevamente al vaso de precipitados se puso en agitación y se ajustó el PH 5.7 con soluciones de HCL 1N y NaOH 1N.

Se añadió 2 g de phytigel, se calentó y agitó simultáneamente hasta disolución total (solución transparente).

Una vez disuelto se vació el medio de cultivo en recipientes completamente limpios, se taparon y esterilizaron en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Se guardaron en bolsas de plástico y se dejaron enfriar en una superficie plana. Se guardaron en refrigeración hasta su utilización.

PREPARACIÓN DE UN LITRO DE WPM LÍQUIDO

Inducción de crecimiento celular adicionado con antioxidantes

En un vaso de precipitados de 2 litros se puso aproximadamente 600 mL de agua bidestilada, se puso a agitar en una plancha con una barra magnética. Se agregó lo siguiente:

- 100 mL de solución I
- 100 mL de solución II
- 10 mL de solución III
- 10 mL de solución IV
- 1 mL de solución V
- 0.1000 g de Mio-inositol
- 30 gramos de sacarosa
- 0.5 mg de 2,4-D
- 0.75 mg de K
- 150 mg Polivinilpirrolidona
- 50 mg ácido ascórbico

Una vez que las sustancias se disolvieron completamente, se vertió la solución en un matraz aforado de un litro y se agregó agua bidestilada hasta la marca, se mezcló y se vació nuevamente al vaso de precipitados, se ajustó el PH 5.7 con soluciones de HCL 1N y NaOH 1N manteniendo la mezcla en agitación.

Se midieron volúmenes de 100 mL de medio de cultivo y se vaciaron en matraces erlenmeyer bafleado de 250 mL, se taparon con papel aluminio y se esterilizaron en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Se guardaron en bolsas de plástico y se dejaron enfriar en una superficie plana. Se guardaron en refrigeración hasta su utilización.